

PolyATtract® System 1000を使った自動化 Poly(A)+ mRNA単離



Promega

By Terri Grunst, B.S.
Promega corporation

要約

poly(A)+ mRNA単離を自動化するとサンプル処理能力が向上し、次に行うmRNAの解析結果の改良にもつながります。しかし、多くの自動化方法では、必要以上に多くのサンプル処理能力があることや、必要な機器が高価であることがシステム導入の障害となっています。本稿ではPolyATtract® System 1000をLabsystemsのKingFisher™ mLに適用し、培養細胞からのpoly(A) mRNAの単離を自動化した例を採り、中規模の自動化を比較的低コストで実現できるシステムを紹介します。なお、このシステムで単離されたサンプルではサンプル間の交差汚染は確認されませんでした。

はじめに

細胞溶解液からmRNAを直接単離し、RT-PCRによってmRNAを分析することは、分子生物学では基本的なアプリケーションです。本誌では以前Biomek® 2000ラボオートメーションシステムにPolyATtract® mRNA isolation reagents(カタログ番号Z5420)(1,2)を使ったハイスループット(高速多検体処理)のmRNA単離システムを紹介しました。しかし、そのハイスループットシステムにはいくつかの制限がありました。主な制限は、ハイスループットシステムでは、自動化装置の導入と試薬にかかる費用が高額であり、また、多検体を高速で処理しなければならないために、検体あたりの容積が使用するプレートのサイズにより少量になってしまう点です。今回ご紹介するのは、KingFisher™ mL 機器(Labsystems)においてPolyATtract® System 1000を使用し、少数から中程度の検体数を処理できる自動化mRNA単離システムです。KingFisher™ mL機器による自動化では1度に15検体までのサンプルを20分で処理することが可能であり、他のハイスループット機器より安価で検体あたりの容量も最大で1mlまで変えられる柔軟性をもちます。

組織培養細胞からのmRNA単離の自動化

細胞を1×PBSで洗浄後、100μlのGTC Extraction Bufferを直接細胞培養プレートのウェルに加え、細胞溶解液を作製します。ピペティングによりウェルの溶解液を撹拌し、次に組織培養プレートから新しい微量遠心チューブに溶解液を移します。その他の必要な試薬を準備する間、溶解液は氷上で保存してください。

次にハイブリダイゼーション溶液とStreptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles (SA-PMPs, カatalog番号Z5481)の準備を行ないます。ハイブリダイゼーション溶液のマスターミックスはサンプル数に従って準備します。それぞれのサンプルにつき400μlのDilution Buffer、8.2μlのβ-メルカプトエタノール、0.6μlのビオチン化 Oligo(dT) Probeが必要になります。KingFisher™ でmRNA単離操作を行う前に、必ずハイブリダイゼーション溶液を65℃に予熱してください。

SA-PMPsの調製は、2mlのSA-PMPsを2mlの0.5×SSCで3回洗浄を繰り返し、最後に2mlの0.5×SSCに懸濁して行います。これらの試薬を準備した後、表1に従ってKingFisher™ mLストリップチューブを準備します。

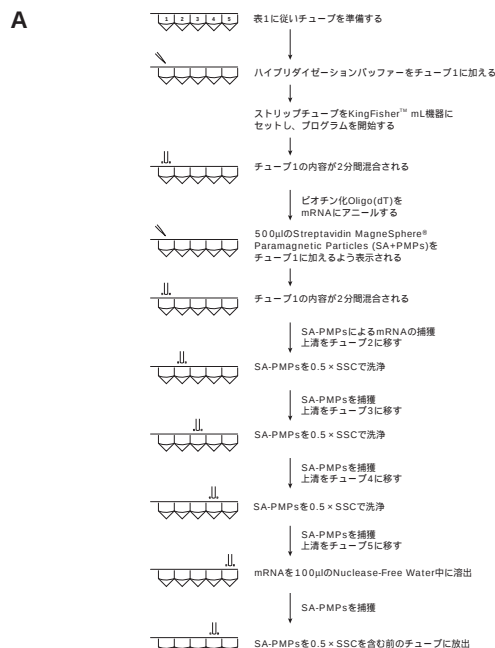
1本のストリップチューブ毎に1つのmRNAサンプルが処理できます。KingFisher™ mLストリップチューブの準備が終わった後に、65℃に予熱した細胞溶解液(100μl)をチューブへ加え、再度そこへ予熱した400μlの

ハイブリダイゼーション溶液を加えます。これらの準備が完了したら、直ちにストリップチューブをKingFisher™ mLに装填し、図1に記述されているプログラムに従ってmRNAの単離作業を開始します。KingFisher™ mLが最初の混合のステップを終了するとピープ音が鳴るので、500μlのSA-PMPsをチューブ1に加えます。単離されたmRNAは最後に100μlのNuclease-Free Waterに溶出されます。

表1. KingFisher™ mLストリップチューブの準備

チューブ1	100μl 細胞溶解液(65℃、1分間の予熱を行う*)
チューブ2	500μl 0.5×SSC
チューブ3	500μl 0.5×SSC
チューブ4	500μl 0.5×SSC
チューブ5	Nuclease-Free Water

*チューブ2～5の後にチューブ1を調製



B



図1. KingFisher™ mL機器を用いたmRNA単離
パネルA: PolyATtract®を使ったmRNA単離用プログラムのステップ。
パネルB: KingFisher™ mL機器。

単離したmRNAの分析

段階希釈により調製されたNIH3T3繊維芽細胞(1ウェルあたり 4×10^5 、 2×10^5 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 cells)から生成されたmRNAをRT-PCRにて β -Actinを増幅して分析しました。まず、2 μ lの精製したmRNAをoligo(dT)で逆転写し、その2 μ lの反応液とプロメガの β -Actin Primer Pair(カタログ番号G5740)を用い、そのcDNAに特異的な285bpの断片を増幅しました。図2のアガロースゲル写真は、2 μ lの精製したmRNAからRT-PCRにより β -Actinに特異的な産物を泳動したものです。1 $\times 10^4$ 個の細胞からの精製したmRNAから β -Actinに特異的な産物が確認できます。

次にKingFisher™ 機器でmRNA単離作業中にサンプル間の交差汚染が起るかどうかについて検討しました。交互にサンプルを並べてmRNA単離を行う実験では、細胞溶解液(5 $\times 10^4$ 個の K562 細胞) と水のみのプランク的一方をチューブ1に加え、前項で記述した方法で工程を完了させました。精製したmRNAはRT-PCRにて*bcr-abl* 転写産物の一部分を増幅して分析しました。その*bcr-abl* を部分的に増幅したプライマーは、染色体転座の区切りを挟んで*bcr-abl* 融合転写産物をフィラデルフィア染色体陽性のK562株(3-6)より増幅するようにデザインしてあります。このプライマーはゲノムDNAからは目的産物を増幅しません。RT-PCRの結果、隣接するサンプル間の交差汚染はありませんでした(図3)。

KingFisher™ mL機器を使用した自動mRNA単離工程における重要事項

細胞溶解液とハイブリダイゼーション溶液を65℃に予熱することがこの方法で成功するための重要なポイントです。しかし、細胞溶解液は長時間にわたって熱を加えるとmRNAの収量が減少する傾向にあるため、65℃で1分以上加熱しないよう注意して下さい。短時間の細胞溶解液とハイブリダイゼーション溶液の予熱工程がピオチン化Oligo(dT)とmRNAのハイブリダイゼーションが効率的に行われるようにします。細胞溶解液とハイブリダイゼーション溶液を予熱しなかった場合、ピオチン化Oligo(dT)とmRNAのハイブリダイゼーションの効率が落ち、mRNAの収量が減る結果になります。

一般的にRNA単離を行うときには、リボヌクリアーゼがない実験環境を維持することが実験の成功に必要です。使い捨ての手袋を着用し、無菌操作によって試薬を取り扱います。RNAを扱う場合、できるかぎり使い捨てのプラスチック容器を利用するのもよいでしょう。mRNAの溶出は必ずNuclease-Free Waterを使用します。精製したmRNAは-70℃で冷凍保存し、操作するときは必ず氷上で行ってください。

結論

本稿では、PolyATtract® System 1000 mRNA isolation SystemをKingFisher™ mL機器に適用したmRNA単離の自動化について紹介しました。KingFisher™ mL機器用に開発されたプロトコルでは15サンプルまでからRT-PCRにより増幅可能なmRNAを20分で処理することができます。サンプル間の検出可能な交差汚染なしで、培養細胞1 $\times 10^4$ 個からmRNAを精製できました。本稿では培養細胞からの自動化mRNA単離を紹介しましたが、この技術と機器のプログラムを利用した動物組織の溶解液や植物組織の溶解液からの単離も可能だと考えられます。しかし、組織を中心とするサンプルを処理する場合、組織破片等を除去することが必要な場合があります。KingFisher™機器は一般の高速多検体処理を目的とした自動化機器と異なり、中程度の自動化処理機能が必要とする実験に適しています。

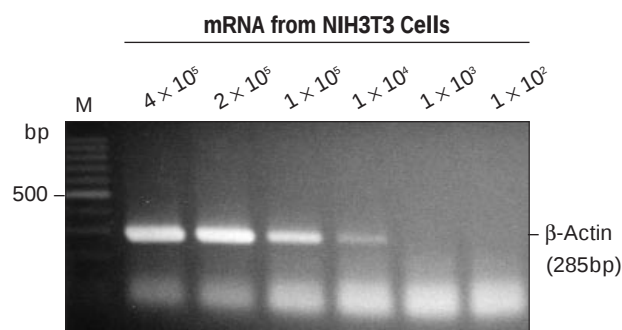


図2. NIH 3T3細胞から単離したmRNAのRT-PCRによる解析
各mRNAは表示の細胞数よりKingFisher™ mL機器を使って単離した。それぞれの単離したmRNA2 μ lにoligo(dT)を使って、45℃で60分間の逆転写反応を行った。この逆転写反応液から2 μ lをプロメガの β -Actin Primer Pair(カタログ番号G5740)を用いてPCRにより増幅した。PCRサイクルの条件は最初の1サイクルを95℃で2分、次の40サイクルは95℃を30秒、58℃を1分、72℃を1分で処理し、最後に4℃に保冷した。それぞれのPCR反応液から20 μ lを1.5%のアガロースゲルで泳動した。レーンMは100bp DNA Ladder(カタログ番号G2101)。

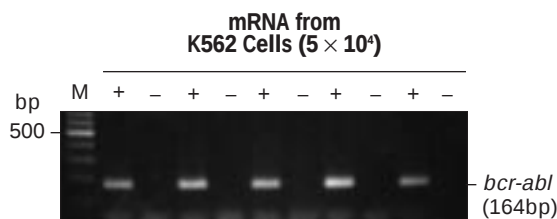


図3. KingFisher™ mL機器でのサンプル間の交差汚染試験
mRNA単離のサンプルは5 $\times 10^4$ 個のK562細胞またはプランクとして水を使用した。1 μ lのmRNA溶出液をプロメガのAccess RT-PCR System(カタログ番号A1250)により増幅した。プライマーは*bcr-abl* fusion mRNA transcriptに特異性を示す次の配列を使用した：上流プライマー、5'-GGAGCTGCAGATGCTGACCAAC-3'；下流プライマー、5'-GATACTGGCCGCTGAAGGGC-3'。RT-PCRの条件は最初の1サイクルを48℃で1分、次のサイクルで94℃を2分、その後の35サイクルは94℃を30秒、60℃を1分、68℃を1分、68℃で7分伸張を行い、最後に4℃で保冷した。1.5%のアガロースゲルを用い、それぞれの増幅サンプルより10 μ lを泳動した。レーンMは100bp DNA Ladder(カタログ番号G2101)。

参考文献

- Rhodes, R. and Kephart, D. (2000) *promega Notes* 75, 10-12.
- PolyATtract® System 1000 Technical Manual #TM228, Promega Corporation.
- Rowley, J. (1973) *Nature* 243, 290-293.
- Seong, D. et al. (1994) *Blood* 83, 2268-2273.
- Amiel, A. et al. (1994) *Cancer Genet. Cytogenet.* 76, 59-64.
- Lozzio, C. and Lozzio, B. (1975) *Blood* 45, 321-334.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
PolyATtract® System 1000 with Magnetic Stand	1システム	Z5420	69,000
Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles	15 $\times$ 0.6ml	Z5481	20,000
Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles	25ml	Z5482	54,000
Access RT-PCR System	100回分	A1250	76,000
β -Actin Primer Pair	20回分	G5740	20,000
100bp DNA Ladder	250 μ l	G2101	14,000