



ベックマン・コールター Agencourt RNAdvance Cell v2キットとBiomek NX^P マルチチャネルシステムを用いた、精製エクソソーム由来のmicroRNAの抽出

Bee Na Lee, *Randy Carney, John Palys, *Sidhartha Hazari, *Alisha Knudson, and *Kit S. Lam

*University of California, Davis and Beckman Coulter Life Sciences

Summary

エクソソームは *in vivo*、*in vitro* を問わず、様々な細胞から分泌される 30 ~ 150 nm 以下の膜小胞であり、血液、尿、羊水、悪性腹水といった様々な体液中で見つかっています。腫瘍細胞と通常細胞では、microRNA (miRNA) の発現パターンが明らかに異なっている可能性があります。そのため、これらの循環エクソソーム内 miRNA のモニタリングは、初期がんに対するスクリーニングや検出のためのバイオマーカーとして活用することができます。

エクソソームは、超遠心分離法や沈降法で精製できます。本報告ではベックマン・コールター Biomek 自動分注機で Agencourt RNAdvance Cell v2 キットを使用した、培養細胞血清培地由来で沈殿状態の精製エクソソームからの miRNA 抽出について解説します。SPRI (Solid Phase Reversible Immobilization) 試薬は、自動化に適し、さらに安定した DNA/RNA 精製法であり、遠心分離や吸引ろ過といった工程を必要としません。精製 DNA/RNA は、溶出液により簡単に磁気ビーズから得られ、下流工程へ向けて柔軟なサンプル調製が可能です。96 ウェルプレート上の 96 サンプルを 2 時間以内に処理可能であり、qPCR、マイクロアレイ、NGS-RNA シーケンシングといった解析用途のサンプル調製について、効率的なワークフローを提供します。

Materials and Methods

SKOV3 または A7890 培養細胞に由来するエクソソームは、Total Exosome Isolation Reagent (TEI) (Life Technologies, 4478360) で精製しました。血清由来のエクソソームは、ExoQuick Exosome Precipitation Solution (System Biosciences, EXOQ5A-1) で精製しました。細胞と残渣を除去するために、マウス血清 (LAMPIRE Biological Laboratories, 7324300) 250 μ L を 3000 x g、15 分間で遠心分離しました。遠心済み血清上清を別のチューブに移し、ExoQuick 溶液 60 μ L を添加し、4°C で 30 分間反応しました。反応後、Microfuge 18 小型遠心機 (Beckman Coulter, 367160) にて 1500 x g、30 分間で遠心分離し、エクソソーム沈殿を RNA 抽出用の 1x PBS で再懸濁しました。細胞は密集度 10% で培養を行った後、10% FCS を含むエクソソーム回収用培地 (EMEM または RPMI 1640) を加えました。FBS に由来する内因性ウシエクソソームは、予め 100,000 x g、18 時間で超遠心分離 (Beckman Coulter Optima L-80 XP 超遠心機および SW 32 Ti ローター) し、沈殿物として除去しました。細胞は増殖停止まで、24 ~ 48 時間培養を行いました。培地 15 mL に対して、エクソソーム抽出試薬 7.5 mL を十分に混合し、4°C で一晩反応しました。反応後、10,000 x g、4°C、1 時間の遠心分離 (Beckman Coulter, Microfuge 18 小型遠心機) を行い、上清を除去し、沈殿を 1x PBS 170 μ L で再懸濁しました。エクソソームサンプル 1 μ L を 5 倍容の溶解バッファー (RIPA Lysis Buffer, Upstate, 20-188) で溶解し、BCA アッセイ (Pierce BCA Protein Assay キット, 23225) でタンパク質濃度を測定しました。エクソソームサンプルを用時ろ過 (0.1 μ m Nylon syringe filter) した PBS で希釈し、Nanoparticle Tracking Analysis (NTA, NanoSight LM10) にて室温条件下でのエクソソームのサイズ分布、数、濃度を測定しました (data not shown)。細胞培地 20 μ L から精製したエクソソーム (タンパク質濃度 3.5 ~ 5 mg/mL) 20 μ L、または血清 25 μ L から精製したエクソソームは、溶解バッファー 60 μ L とプロテイナーゼ K 3 μ L で 30 分間、室温で酵素消化を行いました。溶解物は miRNA/RNA 抽出のため Biomek NX^P マルチチャネルシステムにセットし、RNAdvance Cell v2 miRNA supplemental protocol (Beckman Coulter, AAG-850SP03.15-A) および RNAdvance Cell v2 キット (Beckman Coulter, A47942) で処理しました。RNA は、最終工程でヌクレアーゼフリー水 40 μ L で溶出しました。RNA 1 μ L を 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) を用いて、Agilent RNA 6000

Pico chipでの濃度測定、small RNA chipでの品質測定 (Agilent Technologies, 5067-1513, 5067-1548) を行いました。miRNA (let7c, miR16, miR21, miR200, miR205) 遺伝子発現量は、Taqman microRNA assays (Life Technologies, assay ID000379, 000391, 000397, 002623, 000509, 002251) で測定しました。RNA 2 ~ 5 μ L を、TaqMan micro RNA Reverse Transcription キット (Life Technologies, 4366596) での逆転写反応に使用しました。cDNA 1 μ L を、Taqman Universal Master Mix II (Life Technologies, 4440038) での 10 μ L の qPCR 反応 (Integrated DNA Technologies) に使用しました (3 回の実験実施)。ACTB、B2M、GAPDH、HPRT1 の primer probe assay ID は、それぞれ Hs.PT.39a.22214847、Hs.PT.39a.22214845、Hs.PT.39a.22214836、Hs.PT.39a.22214821 です。逆転写と PCR の詳細については、AAG-700APP11.14-B (Reference 2) に記載しています。Biomek NX^P マルチチャンネルシステムで使用したツールおよび消耗品については、Table 1 に示しました。

Table 1: 96 サンプルの解析に必要なツールと消耗品

TYPE	QUANTITY	DESCRIPTION AND PART NUMBERS	VENDOR
Devices	1	Orbital Shaker, 379448	Beckman
ALPS	1	Biomek NX ^P Span-8 4x3 ALP Kit, 989839	Beckman
Magnet Plate	1	Agencourt SPRIPlate 96R-Ring Super Magnet Plate, A32782	Beckman
Reservoirs	2	Pyramidal bottom 300mL Sterile Reservoir, RPI3014-ST	Phenix
Consumables	3	Biomek AP96 P250, Presterile with Barrier, 717253	Beckman
	2	96-Well Riplate-2.2 mL, 43001-0200	Ritter
	2	Hard-Shell Thin-Wall 96-Well Skirted PCR Plate	BioRad
	2	ABgene 1.2mL 96-Well Storage Plate, AB1127	ABgene
	1	Assay plate 96 well, Round bottom plate, 3795	Costar

Results and Discussion

Biomek 自動分注機でエクソソームから抽出を行った miRNA の収量と品質

SKOV3 由来のエクソソーム 25 μ L からの total RNA の平均収量は、Agilent RNA 6000 Pico Chip と Bioanalyzer 2100 により 171.63 pg/ μ L +/- 24 と測定されました。Figure 1 左パネルは miRNA と small RNA のプロファイリング例 (miRNA 率 63% で、52.4 pg/ μ L) で、中央パネルは small RNA とサイズの大きな RNA を含む total RNA のプロファイリング例です。血清 250 μ L 由来のエクソソームサンプルからは miRNA 率 77% で 741 pg/ μ L という、さらに大量の miRNA と small RNA が検出されました。

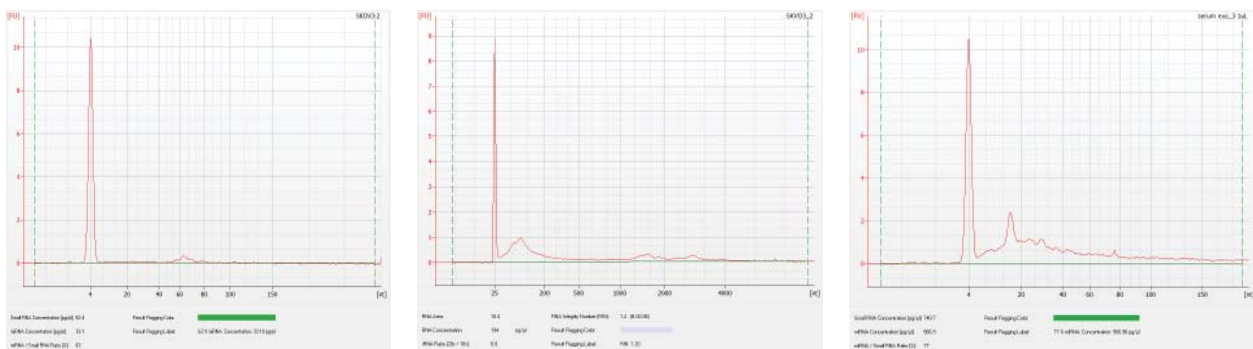


Figure 1: 精製エクソソームの miRNA と RNA のプロファイリング。SKOV3 由来のエクソソーム RNA を small RNA Chip (左パネル) および RNA Pico Chip (中央パネル) で測定。マウス血清由来のエクソソーム RNA を small RNA Chip (右パネル) で測定。

遺伝子発現量データが示す、RNAAdvance Cell v2 キットと Biomek 自動分注機による、エクソソームサンプルからの miRNA/RNA の良好な抽出

miR16, miR21, let7c, miR200, miR205 の遺伝子発現量解析には、RNA 溶出液 5 μ L を使用しました。平均 Ct (cycle threshold) 値は、3 回の実験結果から求めました。SKOV3 細胞由来のエクソソームで発現す

る miR16、miR21、let7c、miR200、miR205 遺伝子の平均 Ct 値は、それぞれ 29.17 \pm 0.041、26.79 \pm 0.022、32.23 \pm 0.17、34.77 \pm 0.25、30.02 \pm 0.002 でした (Figure 2, 左パネル)。SKOV3 細胞由来のエクソソームで最も強く発現している遺伝子は miR21 で、最も発現量が少ないのは miR200 でした。エクソソームからメッセンジャー RNA が抽出されているかを確認するために、ACTB1、B2M、GAPDH、HPRT のハウスキープ遺伝子発現量解析を行いました (RNA 溶出液 5 μ L を使用)。平均 Ct 値は、3 回の実験結果から求めました。ACTB、B2M、GAPDH、HPRT1 遺伝子の平均 Ct 値は、それぞれ 27.21 \pm 0.034、36.10 \pm 0.189、31.78 \pm 0.07、36.98 \pm 0.19 でした (Figure 2, 右パネル)。RNAAdvance Cell v2 キットと Biomek 自動分注機を使って、TEI キットにより培養細胞から調製したエクソソームから高品質な miRNA とメッセンジャー RNA が抽出できたことを示します。

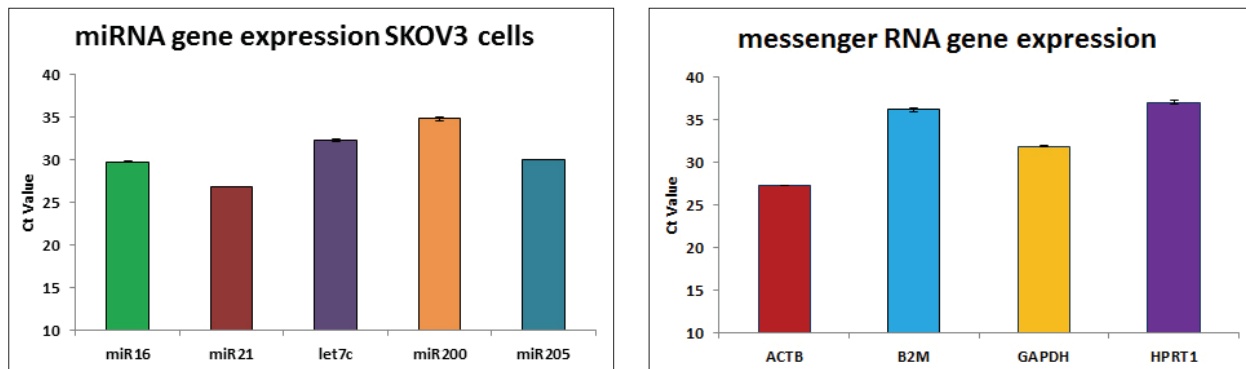


Figure 2: SKOV3 培養細胞由来サンプルの、miRNA (左パネル) とメッセンジャー RNA (右パネル) 遺伝子発現量。

Biomek による自動抽出による再現性の高い miRNA の回収

Biomek による抽出が安定した miRNA 抽出方法であることを証明するため、miR39 1 \times 10⁷ コピーを 1 \times PBS に再溶解したものをインプットサンプルとし、合計 24 サンプルを qPCR により定量しました。溶出した RNA 1 μ L を逆転写反応し、調製した cDNA 1 μ L を qPCR 定量に用いました。24 サンプル平均で、Ct 値は 24 \pm 0.038 (CV% 0.2) という結果となりました。

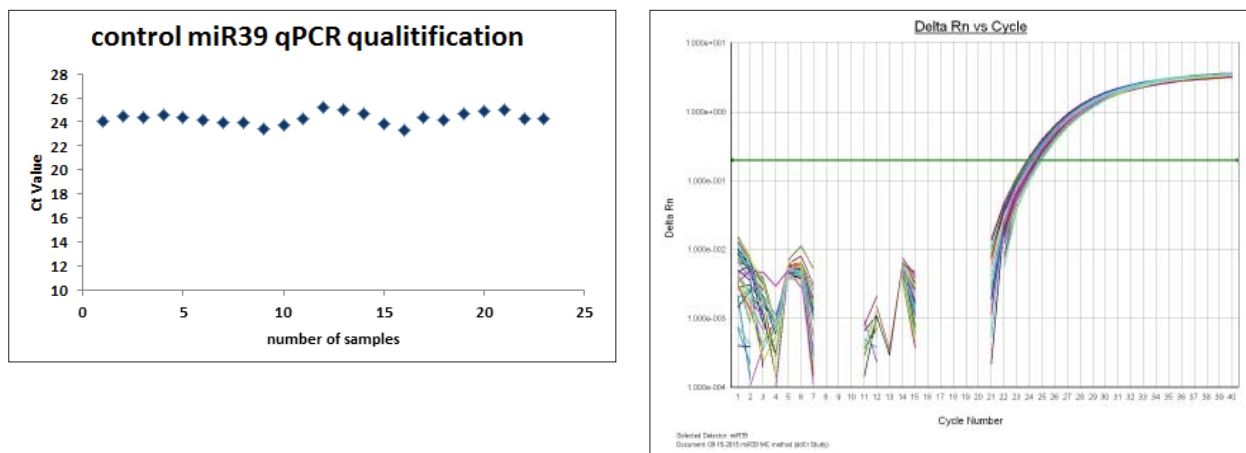


Figure 3: Biomek 自動分注機で抽出した、miR39 添加のコントロール 24 サンプルの Ct 値 (左パネル)。miR39 の増幅プロット (右パネル)。

RNAAdvance Cell v2 キットは、他社カラム精製キットよりも miRNA を高収量で抽出

MCF7 乳がんセルライン (EXOP-100A-1, System Biosciences) 由来の 1 \times 10⁶ 凍結精製エクソソームを用いて、RNAAdvance cell v2 プロトコルと他社カラム精製キットの血清抽出プロトコルでの miRNA および small RNA の回収率比較を行いました。両プロトコルにおいて、ヌクレアーゼフリー水 25 μ L での溶出を行いました。Small RNA は両キットで同様な結果でしたが、miRNA では RNAAdvance Cell v2 キットの回収率が高いという

結果となりました。RNAAdvance Cell v2 キットで抽出した small RNA の濃度は 181.8 pg/ μ L (54% miRNA)、他社カラム精製キット抽出では 164.9 pg/ μ L (30% miRNA) でした。RNAAdvance Cell v2 で抽出した RNA の qPCR Ct 値は、テンプレートを同量使用条件下で、他社カラム精製キットより低い値を示しました。低発現の let7c 遺伝子については、RNAAdvance Cell v2 キットの平均 Ct 値が 29.74 \pm 0.03、他社カラム精製キットでは 34.8 \pm 0.12 でした。適度な発現量の遺伝子である miR16、miR21 については、RNAAdvance Cell v2 キットの平均 Ct 値が 25.26 \pm 0.027、24.87 \pm 0.102 であるのに対し、他社カラム精製キットでは 28.55 \pm 0.027、25.79 \pm でした。次に、A7890 培養細胞由来のエクソソームを用いて miRNA 発現量解析を行いました。miR16、miR21 発現については、RNAAdvance Cell v2 では 29 \pm 0.02、34.02 \pm 0.185 であるのに対し、他社カラム精製キットでは 32.50 \pm 0.1855、32.50 \pm 0.117 という結果でした (Data not shown)。

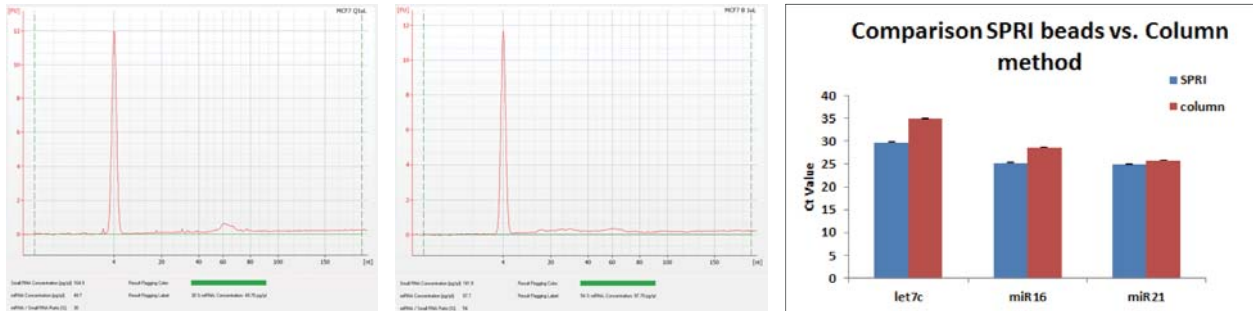


Figure 4: 他社カラム精製キット (左パネル) およびRNAAdvance Cell v2キット (中央パネル) を用いて抽出したsmall RNAプロファイリング。RT-qPCR反応にRNA溶出液3 μ Lを使用したときの、RNAAdvance Cell v2 キットおよび他社カラム精製キットでのmiRNA遺伝子発現量の比較 (右パネル)。

Conclusions

今回 microRNA qPCR で評価した結果、RNAAdvance Cell v2 キットが他社カラム精製キットよりも miRNA の回収率が高いという結果となりました。RNAAdvance Cell v2 キットと Biomek NX^P マルチチャンネルシステムの組み合わせでは、96 サンプル (96 ウェルプレート) を 2 時間以内に処理できました。このシステムは、qPCR、マイクロアレイ、NGS-RNA シーケンシング解析などの下流のアプリケーションのためのサンプル調製に、効率的なワークフローを提供します。

Acknowledgements

エクソソームは、UC Davis から供与されました。Randy P. Carney は、T32 HL07013 training grant から資金援助を受けており、これに感謝します。