



# Agencourt RNAdvance Cell v2を用いた、培養細胞からの高品質なRNAおよびSmall RNA画分の精製

Jun Onodera; Koki Fujimura | Beckman Coulter KK.

## Summary

品質の高いRNAを抽出することは、全長をカバーしたcDNAライブラリの調製、ひいては次世代シーケンス解析のデータ品質に直結する重要なポイントである。ここでは、培養細胞からのAgencourt RNAdvance Cell v2を用いたRNA抽出において得られるRNA品質の検証を行った。その結果、得られたRNAのRIN値は9.9と非常に高品質なtotal RNA精製が可能であることが示された。さらに、イソプロパノールとエタノールを高濃度にした改変プロトコルでは、高品質なtotal RNAに加えて大量のsmall RNA画分の抽出にも成功した。

## Materials and Methods

### RNAdvance Cell v2によるRNA抽出と精製

培養細胞は、浮遊系であるJurkat細胞（5万細胞）を使用した。Small RNA画分を含まないRNAは、Agencourt RNAdvance Cell v2 (Beckman Coulter) のマニュアル記載の方法 (DNase I処理実施、DEPC水40  $\mu$ L 溶出) で抽出・精製を行った。Small RNA画分を含むtotal RNAは、Agencourt RNAdvance Cell v2 (Beckman Coulter) の改変プロトコル (Reference 1, DNase I処理実施、DEPC水40  $\mu$ L 溶出) の方法で同時抽出・精製を行った。マニュアルからの改変点は以下のとおり：

- Wash Buffer 溶液の調製は、マニュアル記載のWash Bufferと100%イソプロパノールの混合比「3 : 2」に対して、改変プロトコルでは「1 : 2」を用いた。
- Bind Buffer 溶液は、添付マニュアルの「1サンプルあたり、Bind Buffer 80  $\mu$ Lと100%イソプロパノール95  $\mu$ Lの合計175  $\mu$ L」に対して、改変プロトコルでは「1サンプルあたり、Bind Buffer 80  $\mu$ Lと100%イソプロパノール250  $\mu$ Lの合計330  $\mu$ L」を用いた。
- 磁性ビーズの洗浄に用いるエタノール濃度は、添付マニュアルの「70%」に対して、改変プロトコルでは「85%」とした。

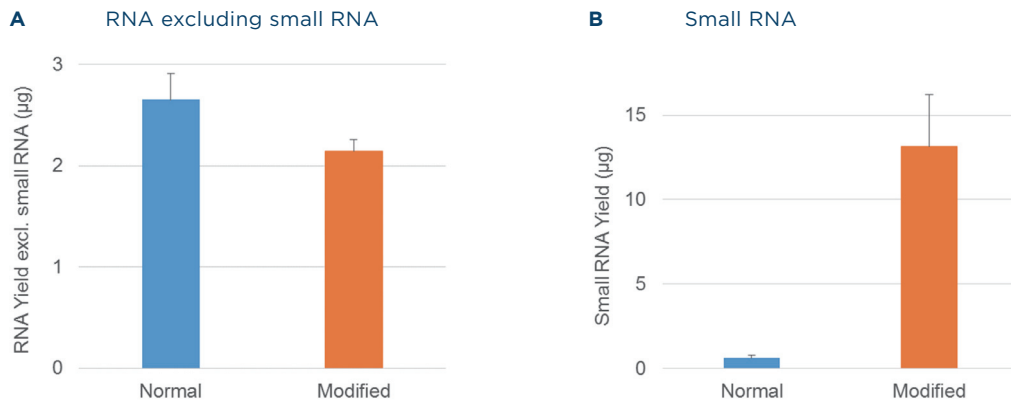
### RNAの定量および評価

RNAの定量は、Qubit 3.0 Fluorometer、small RNA以外についてはQubit RNA HS Assay Kit、small RNAについてはQubit micro RNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) による蛍光法により行った。RNAの質的な評価は、Agilent 2200 TapeStationおよびRNAキット (Agilent Technologies) により行った。

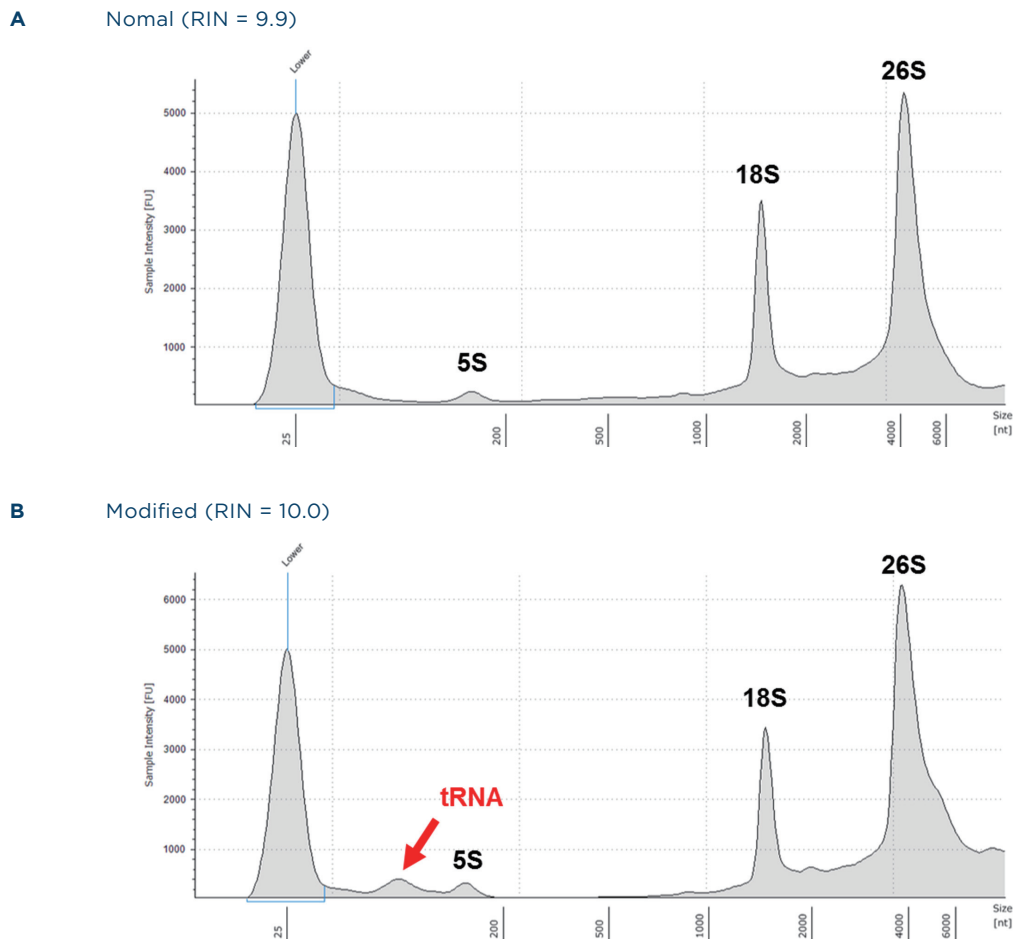
## Results

### Agencourt RNAdvance Cell v2精製後のRNA収量

Jurkat細胞5万細胞から、RNAdvance Cell v2マニュアル記載の方法と上述の改変プロトコルとで、それぞれ3回独立して精製を行った。Small RNA以外のRNAを蛍光定量した結果、通常プロトコルでは $2.65 \pm 0.262 \mu\text{g}$ 、改変プロトコルでは $2.14 \pm 0.112 \mu\text{g}$ という収量が得られた (Figure 1A)。Small RNAのみを蛍光定量した結果、通常プロトコルでは $0.614 \pm 0.262 \mu\text{g}$ 、改変プロトコルでは $13.1 \pm 3.10 \mu\text{g}$ という収量となった (Figure 1B)。イソプロパノールの濃度を増して精製を行う改変プロトコルは、small RNA画分の収量を大きく改善することが分かった。細胞からの抽出であるため、改変プロトコルのsmall RNA画分には相当量のtRNA (約70 nt) が含まれると予想された。



**Figure 1.** Jurkat 細胞から精製した RNA の収量。Normal は RNAdvance Cell v2 の通常プロトコル、Modified は改変プロトコルで精製。A. Small RNA 以外の RNA の蛍光定量結果 B. Small RNA のみの蛍光定量結果 (n = 3)



**Figure 2.** Jurkat 細胞から精製した RNA の断片サイズ評価。Lower は内部マーカー。A. RNAdvance Cell v2 通常プロトコルで精製 B. 改変プロトコルで精製

## 精製RNAの質的評価

Jurkat細胞から精製を行ったRNAについて、Agilent 2200 TapeStationを用いた断片長測定による質的評価を行った。RNAAdvance Cell v2通常プロトコルおよび上述の改変プロトコルで精製した両方のRNAは、18Sおよび26S rRNAの分解が見られない高品質なRNAであった (Figure 2)。改変プロトコルで精製したRNAでは70 nt前後にtRNAのピークが検出され、small RNA画分も併せて精製されていることが確認できた (Figure 2B)。RNAの精製指標となるRINについては、RNAAdvance Cell v2マニュアルの精製方法では9.9、改変プロトコル精製で10.0という良好な数値であった。

## Conclusions

Agencourt RNAAdvance Cell v2による培養細胞からのRNA抽出・精製では、高品質かつ高収量なtotal RNAが得られることが示された。分解の少ない高品質なRNAは、mRNA-Seqの遺伝子発現量解析において長い配列を持つ遺伝子の発現量を正確に反映し、正しい知見をもたらす。さらに改変プロトコルではsmall RNA画分の抽出にも成功した。Small RNAの発現パターンは、癌マーカーの一つとして注目されており、本報告で示す遺伝子転写産物RNAとsmall RNAの同時抽出法は、同一検体からの多彩な下流解析の可能性を提供する。また、遠心分離や吸引濾過を用いない磁性ビーズ精製法は、自動分注機システムでのハイスループットな自動精製にも対応しており、大量の培養細胞検体を処理する研究などでの使用に適している。

## Reference

1. Agencourt RNAAdvance Cell v2 supplemental protocol for micro-RNA and total RNA isolation from cultured cells. (B2013-14282, IB-18266A)

# ベックマン・コールター株式会社

本社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 ☎ 0120-566-730 ☎ 03-6745-4704 FAX 03-5530-2460  
e-mail [bckkcas@beckman.com](mailto:bckkcas@beckman.com) URL <http://www.beckmancoulter.co.jp>