

## 2) 培養細胞からの RNA の回収と cDNA の合成操作

(社) 日本食品科学工学会 高橋 弓子

### はじめに

ヒトゲノム計画によるヒトの全塩基配列解読が終了し、ポストゲノム時代の到来とともに、各研究分野ではゲノム情報を活用した応用研究が盛んに行われている。食品学、栄養学の分野では、食品成分の摂取に伴って起こる mRNA やタンパク質の発現量の変化を網羅的に解析する手法であるニュートリゲノミクスをはじめ、プロテオーム (タンパク質)、メタボローム (代謝物質) 解析等による食品の機能性評価が、今後の機能性食品開発や新しいバイオマーカーの探索に活用されることが期待されている。本項では、こうしたゲノミクス関連の研究においても必須の技術である RNA の抽出を中心とした基本操作について述べる。

**各実験に共通して準備するもの** (RNA 実験の際の試薬, 器具の取り扱いについては項末の注意点参照のこと)

マイクロピペット, マイクロピペット用チップ, 1.5mL チューブ, 15mL および 50mL のチューブ, 卓上遠心機 (培養細胞用, 15mL, 50mL チューブ対応), 小型遠心機 (スピンドウン用), ボルテックスミキサー, ディスポーザブル手袋, アルミホイル

### 【Total RNA の抽出】<sup>1)</sup>

RNA の取り扱いに際して重要な点は、RNA の分解を最小限にすることである。最近では RNA 抽出についてもワンステップ試薬やキットなどを用いることで操作が簡便化され失敗が少なくなった。

#### (1) 有機溶媒を用いた抽出法

DNA と RNA のリボースの構造の違いによって、酸性条件下でフェノール処理すると DNA は有機相, RNA は水相に分配される。この性質を利用した抽出法である AGPC (Acid-Guanidium-Phenol-Chloroform) 法では、タンパク質変性剤であるグアニジンチオシアネートにより RNase の失活と細胞の可溶化を行なった後、フェノール/クロロホルム処理によって液層を分離し、RNA を回収する。本項では AGPC 法を基にして製品化された抽出試薬を用いた抽出法を紹介する。

## 準備するもの

### 1. 実験器具

- ・ マイクロチューブ用高速遠心機 (冷却機能付き)

### 2. 試薬

- ・ TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen) 他社では ISOGEN (ニッポンジーン), RNAiso Plus (タカラバイオ), easy-BLUE<sup>™</sup> (コスモ・バイオ) 等があり, 使用方法はほぼ同じ.
- ・ クロロホルム
- ・ イソプロパノール (=2-プロパノール, イソプロピルアルコール)
- ・ 75%エタノール
- ・ RNase-free 水

## プロトコール

### 1. 培養細胞の溶解

接着細胞: アスピレータで培養液を除去し, PBS で 2 回程洗浄後, カルチャーディッシュに直接 TRIzol<sup>®</sup> Reagent を添加し (ディッシュ面積 10cm<sup>2</sup> に対して TRIzol<sup>®</sup> Reagent 1mL (35mm ディッシュ= 約 10cm<sup>2</sup>)), 数回ピペッティングを行い, 細胞を溶解する. その後, 1.5mL チューブに細胞溶解液を回収する.

浮遊細胞: 細胞を遠心分離し, 培養液を除去し, PBS で洗浄, 遠心を 2 回程繰り返す, 細胞ペレットとする. 細胞ペレットを軽くタッピングしてから, 細胞 5-10×10<sup>6</sup> 個に対して TRIzol<sup>®</sup> Reagent 1mL を加え, ピペッティングにより, 細胞を溶解する. その後, 得られた細胞溶解液を 1.5mL チューブに移す.

### 2. 液層分離

1) 1. で得た細胞溶解液を室温 (15-30°C) で 5 分間静置.

2) TRIzol<sup>®</sup> Reagent 1mL に対して, 0.2mL のクロロホルムを加える.

3) チューブのフタをしっかりと閉め, 15 秒間手で激しく振って攪拌し, 室温で 2-3 分間静置する.

4) 12,000×g, 4°C で 10 分間遠心分離.

5) 遠心分離後, 無色透明の上層 (水相) と白色の中間相, 赤色の下層 (有機相) に分離する. (図 1)

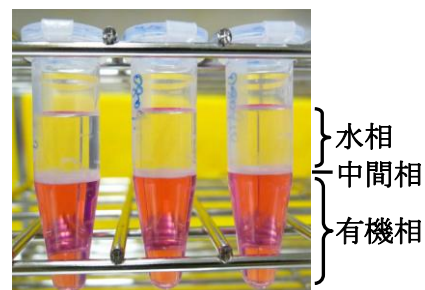


図 1 TRIzol による液層分離

### 3. RNA の沈殿

1) 2. で得た上層 (水相) を慎重に回収し, 新しい 1.5mL チューブに移す.

2) 1. で細胞に添加した TRIzol<sup>®</sup> Reagent 1mL に対して 0.5mL のイソプロパノール

を加え、チューブのフタをしっかりと閉め、数回転倒混和し、室温で 10 分間静置する。

- 3) 12,000×g, 4°C で 10 分間遠心分離し、上清を除去する。
4. RNA の洗浄 (グアニジン塩の除去)
  - 1) 3. で上清を除去したチューブに 1mL の 75%エタノールを加え、転倒混和する。
  - 2) 7,500×g, 4°C で 5 分間遠心分離後、上清を完全に除去し、チューブのフタを開けた状態でキムワイプをかぶせ、RNA ペレットを風乾する。(10-15 分間)
  - 3) 10-100μL の RNase-free 水を加え、RNA ペレットを溶解する。
  - 4) -80°C で保存する。

### プロトコールのポイント

1. 細胞はペレットもしくは、ホモジナイズ後、クロロホルム添加前の状態で、-80°C, 1 ヶ月間保存可能。また、4. RNA の洗浄の 75%エタノール中で冷蔵(2-8°C) 1 週間, -20°C で 1 年間保存可能。
2. 水相を回収する際は下層(中間相, 有機相)が混入しないよう充分留意する。下層が混入した場合は、再度遠心して回収しなおす。
3. 細胞数が  $10^4$  個以下もしくは  $10^7$  個以上の場合は適宜抽出試薬の量を加減する。(詳細は試薬の取扱説明書参照)
4. RNA ペレットを乾かしすぎると再溶解しづらくなるので注意する。
5. より純度の高い RNA が必要な場合(マイクロアレイ等)は、本法で抽出後、次項のスピンカラム処理を行う事を勧める。

### (2) スピンカラムを用いた抽出法

他の分子生物学的手法と同様に、核酸抽出においても各社から様々なキットが市販されている。これらのキットを使用することで、短時間で高純度の RNA 抽出が可能となった。本項で紹介する抽出法では、グアニジンチオシアネートで処理した溶液をシリカゲルメンブレンカラムに通して total RNA のみをカラムに結合させ溶出する。

### 準備するもの

1. 実験器具
  - ・ マイクロチューブ用高速遠心機
  - ・ ホモジナイザー(ポリトロン, ヒスコトロン等, シャフトの直径がマイクロチューブ対応のもの)もしくは 20-21G の注射針とシリンジ
2. 試薬
  - ・ RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) (一般的な培養細胞であれば、細胞数にして、約

$10^2$ - $10^7$  個, total RNA 量で 100 $\mu$ g までに対応)

キットの内容: 1.5 および 2.0mL のチューブ, Buffer RLT, Buffer RW1, Buffer RPE, RNase-free 水

- 14.3M  $\beta$ -メルカプトエタノール ( $\beta$ -ME)
- 70%および 100%エタノール
- RNase-free 水

## プロトコール

実験開始前の注意事項: 1) Buffer RPE に 4 倍量の 100%エタノールを添加する。  
2) Buffer RLT 1mL に対し, 10 $\mu$ L の  $\beta$ -ME を添加する。3) すべての操作は室温で迅速に行い, 遠心機の温度設定も 20-25 $^{\circ}$ C で行う。

### 1. 細胞の回収と溶解

- 1) 培養細胞の培養液除去後, 1.5mL チューブに細胞を回収して 300 $\times$ g, 5 分程度遠心し, さらに上清を除去する。接着細胞の場合は, ディッシュの培養液除去後, 直ちに次のステップへ進んでもよい。
- 2) ペレット化した細胞の入ったチューブを軽くタッピングし, Buffer RLT を添加。または培養液除去後のディッシュに直接 Buffer RLT を添加する。(表 1)  
ミキサーやピペッティングでよく混和し, 細胞溶解液とする。
- 3) ホモジナイザーで 30 秒 (氷冷下) もしくは注射針とシリンジに 5 回程度通過させホモジナイズする。

表 1 Buffer RLT の添加量

Buffer RLT ( $\mu$ L)	細胞数	ディッシュ径 (cm)
350	$<5 \times 10^6$	$<6$
600	$5 \times 10^6$ - $10^7$	6-10

### 2. Total RNA のカラムへの結合と溶出

- 1) 添加した Buffer RLT と同量の 70%エタノールを加え, よくピペッティングする。  
(遠心はしない)
- 2) サンプル 700 $\mu$ L を 2mL のチューブ (添付) をセットした RNeasy ミニスピнкаラムにアプライする。カラムのフタを静かに閉め, 8,000 $\times$ g 以上, 15 秒間遠心する。廃液を捨てる。2mL のチューブは再利用。サンプルが 700 $\mu$ L 以上の場合は同操作を繰り返す。
- 3) 700 $\mu$ L の Buffer RW1 をカラムにアプライする。フタを静かに閉め, 8,000 $\times$ g 以上,

- 15 秒間遠心。廃液を捨てる。2mL のチューブは再利用。
- 4) 500 $\mu$ L の Buffer RPE をカラムにアプライする。フタを静かに閉め、8,000 $\times$ g 以上、15 秒間遠心。廃液を捨てる。2mL のチューブは再利用。
- 5) 500 $\mu$ L の Buffer RPE をカラムにアプライする。フタを静かに閉め、8,000 $\times$ g 以上、2 分間遠心。
- 6) RNeasy ミニスピカラムに新しい 1.5mL チューブ (添付) をセットし、30-50 $\mu$ L の RNase-free 水を添加し、フタを静かに閉める。8,000 $\times$ g 以上、1 分間遠心。
- 7)  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存する。

### プロトコールのポイント

1. RNA 含有量は細胞種間で差があるので、RNA 含有量の情報についてはキット添付の資料を参照するか、情報がない場合は  $3-4 \times 10^6$  個程度で抽出を開始すると失敗が少ない。(細胞数の過剰、過少は回収率の低下につながる)
2. サンプルは、細胞溶解液の状態で  $-80^{\circ}\text{C}$  保存可能。また  $-80^{\circ}\text{C}$  保存された細胞ペレットから抽出を行うことも可能である。
3. Buffer RPE のサンプルへの持ち込みは RNA の溶出を阻害する場合がありますので、カラムが廃液と接触しないよう注意する。Buffer RPE の残留やカラム外側と廃液の接触が疑われる場合は、RNase-free 水で溶出する前に、カラムを新しい 2mL チューブ (添付) にセットし、最高スピードで 1 分間遠心する。

### 【RNA の定量と品質確認】

#### (1) 分光光度計による定量と品質確認

#### 準備するもの

1. 実験器具
  - ・ 分光光度計 (詳しい取り扱い方法は各機器の取扱説明書を参照のこと)
  - ・ 分光光度計用セル
2. 試薬
  - ・ TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)

#### プロトコール

1. 分光光度計の電源を入れ、起動が終わって安定したら、波長の設定を行う (260nm)。複数波長の測定が可能な機器であれば 260nm と 280nm に設定する。
2. 1.5mL チューブ中に、TE を用いて RNA サンプルを 50-200 倍程度に希釈する。(吸光度が 0.1-1.0 くらいになるように調整する。)
3. 洗ビンを用いて、セルを水洗し、キムワイプで水気を取り、セルに TE を入れ、

ブランクとして吸光度を測定する。

4. サンプルの吸光度を測定する。
5. 単波長測定の場合は、260nm での測定終了後に 280nm の測定を行う。

## 計算方法

### 1. RNA 濃度の算出

RNA 濃度は、260nm での吸光度 (A<sub>260</sub>) が 1 のときに 0.04μg/μL と定義される。よって測定した A<sub>260</sub> の値に 0.04 を掛けて濃度 (μg/μL) を算出する。

例) A<sub>260</sub> = 0.3, 100 倍希釈で測定した場合

$$\text{RNA 濃度 (}\mu\text{g}/\mu\text{L)} = 0.3 \times 0.04 \times 100 = 1.2$$

### 2. RNA 純度の確認

サンプルへのタンパク質の混在を確認するため A<sub>260</sub> / A<sub>280</sub> 比を算出し、純度を確認する。値が 1.9-2.1 であれば問題なく実験に使用できる。

## プロトコールのポイント

1. TE のかわりに蒸留水を使うと pH が不安定となり、吸光度や A<sub>260</sub> / A<sub>280</sub> 比に影響を与えるため正確な値が得られないおそれがあるので留意する。
2. セルは 100-200μL の液量でも測定可能なマイクロセルを用いると、品質確認に使用するサンプル量が減らせるので核酸測定用に準備するとよい。

## (2) ホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動による定量と品質確認

RNA は一本鎖のため分子内水素結合による高次構造を形成することが多く、そのまま電気泳動すると分子量と泳動度が相関しない。そのためホルムアルデヒド等の変性剤を用いて RNA を直鎖状分子にしてから電気泳動を行う。

## 準備するもの

### 1. 実験器具

- ・ サブマリン型泳動槽およびゲルトレイ (Mupid<sup>®</sup> (アドバンス社) 等)
- ・ インキュベーター (ヒートブロックもしくはサーマルサイクラー)
- ・ UV トランスイルミネーターおよびカメラ
- ・ 三角フラスコ      ・ メスシリンダー

### 2. 試薬

- ・ アガロース
- ・ 10×MOPS バッファー (0.2M MOPS, 50mM 酢酸ナトリウム, 10mMEDTA, pH7.0 (NaOH で pH 調製))

- ・ ホルムアルデヒド (36-38%)
- ・ ホルムアミド (分注して $-20^{\circ}\text{C}$  で保存)
- ・ 10×ゲルローディングバッファー (50% グリセロール, 10mM EDTA, 0.05% ブロモフェノールブルー (BPB), 0.05% キシレンシアノール)
- ・ RNase-free 水                      ・ 0.4mg/ml エチジウムブロマイド

## プロトコール

### 1. ホルムアルデヒド-アガロースゲルの作製

- 1) 三角フラスコに RNase-free 水 84.5mL を計り取り, アガロース 1.2g を加えて電子レンジで溶解する.
- 2) ゲルが  $60^{\circ}\text{C}$  程度に冷めたら, 10×MOPS バッファー 10mL とホルマリン 5.5mL を加え, よく混ぜる.
- 3) ゲルトレイに注ぎ, 上からラップをかけて固まるまで静置する.

### 2. RNA サンプルの調製と準備

- 1) 以下のサンプルバッファーを作製する. (容量は 1 サンプル当たり)

ホルムアミド	8.5 $\mu\text{L}$
ホルマリン	2.5 $\mu\text{L}$
10×MOPS バッファー	2.0 $\mu\text{L}$
0.4mg/ml エチジウムブロマイド	1.0 $\mu\text{L}$

- 2) 適量の RNA ( $\sim 10\mu\text{g}$ ) を RNase-free 水で 4 $\mu\text{L}$  にメスアップし, サンプルバッファーに加える.
- 3) インキュベータで  $65^{\circ}\text{C}$ , 10 分間インキュベート後, 氷冷する.
- 4) 軽く遠心し, 10×ゲルローディングバッファー 2.0 $\mu\text{L}$  を加える.

### 3. 電気泳動

- 1) RNase-free 水で 1×MOPS バッファーを作製し, 泳動槽に満たし, 1. で作製したアガロースゲルをセットする.
- 2) 2. 1) で調製した RNA サンプルをアプライする.
- 3) 50V で 1.5-2 時間程度泳動する. (BPB がゲルの 8 割程度進むまで)
- 4) UV トランスイルミネーターで確認し, 画像を保存する. 泳動像で 28S と 18S のリボソーマル RNA を確認し, 28S : 18S が 2 : 1 であれば分解の少ない RNA が抽出できたと考えてよい.

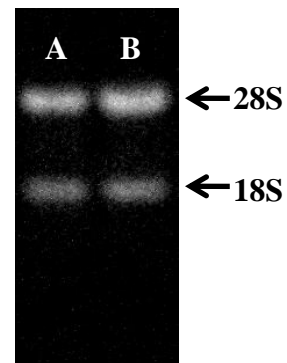


図 2 変性ゲル電気泳動像  
B16(A)および RBL-2H3 (B) 細胞から RNA 抽出を行い, 5 $\mu\text{g}$  相当を泳動

### (3) Agilent 2100 バイオアナライザによる定量と品質確認 (参考)

Agilent Technologies 社製の Agilent 2100 バイオアナライザは微量サンプルを専用チップで解析する装置である。一つの装置でチップを替えることにより RNA 以外に DNA、タンパク質の解析が可能である。この装置を用いる利点には、サンプル量の節約、迅速な分析、分解度の数値化による RNA 品質の標準化等があげられる。

#### 準備するもの

##### 1. 実験器具

- ・ Agilent 2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies) 解析装置一式
- ・ マイクロチューブ用遠心機
- ・ ヒートブロック

##### 2. 試薬

- ・ Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies)    ・ RNase-free 水
- バイオアナライザの操作、解析手順の詳細は装置、試薬の取扱説明書を参照

#### プロトコール

1. 操作手順に従い、バイオアナライザの電極を洗浄する。
2. RNase-free 水で 25-500ng/ $\mu$ L 程度に希釈した RNA サンプルとラダー (添付) を、操作手順に従って、熱処理する。(1枚のチップで 12 サンプル解析可)
3. 解析用チップに充填するゲル (添付) の調製を行い、チップにアプライする。
4. ラダーとサンプルをチップにアプライし、専用のボルテックスミキサー (添付) で混合する。
5. 調製の終わったチップをバイオアナライザにセットし、分析を開始する。
6. 解析は 5 分程で終了するので、その後添付のアプリケーションでデータ処理を行う。

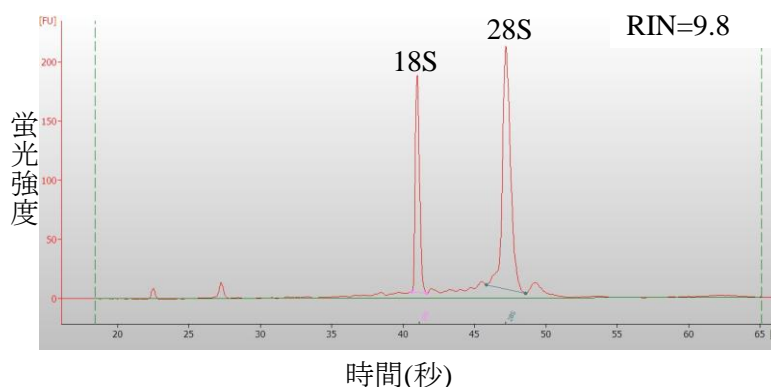


図3 Agilent 2100 バイオアナライザの泳動結果 (Electropherogram)  
解析結果は上図ピーク表示の他、ゲル泳動像、RNA 濃度、28s/18s、RNA Integrity Number (RIN) 等で表される。RIN は RNA の分解度 (品質) を数値化した値で 1-10 の数値で表示される。(10 に近いほど高品質)



## 【1 本鎖 cDNA の合成】<sup>2)</sup>

RNA の定量的な解析として代表的な手法にはノーザンブロット等があげられるが、その他にも、RNA を鋳型として逆転写反応を行い、cDNA 合成を行うことで、目的とする遺伝子のシークエンスや PCR、DNA マイクロアレイ等の様々な遺伝子解析が可能となる。

### 準備するもの

#### 1. 実験器具

- ・ ヒートブロックまたはサーマルサイクラー

#### 2. 試薬

- ・ 逆転写酵素 SuperScript™ III Reverse Transcriptase (RT) (Invitrogen)
- ・ cDNA 合成用プライマー (オリゴ(dT)<sub>20</sub> (50μM) もしくはランダムプライマー (50-250ng))
- ・ 10mM dNTP ミックス
- ・ RNase-free 水

### プロトコール

1. 1.5mL チューブに cDNA 合成用プライマー1μL および 10mM dNTP ミックス 1μL を分注し、そこに 1-5μg 程度の total RNA を加え、全量 13μL となるように、RNase-free 水で調製する。
2. 65°C, 5 分間熱処理し、氷冷する。
3. チューブを軽く遠心し、SuperScript™ III RT に添付の 5×First-Strand Buffer 4μL, 0.1M DTT 2μL, SuperScript™ III RT 1μL を加え、タッピングで混合する。
4. ランダムプライマーの場合は 25°C (室温), 5 分間インキュベートする。
5. 50°C, 30-60 分間インキュベートする。
6. 70°C, 15 分間インキュベートし、反応を停止する。
7. 次の実験に進まない場合は、-20°C で保存する。

### プロトコールのポイント

1. ヒートブロックでインキュベートする場合は、2 台必要になるが、サーマルサイクラーでプロトコールを組めば 1 台で合成反応ができる。その場合は 0.2mL もしくは 0.5mL の PCR チューブを使用する。
2. 反応温度は複雑な 2 次構造を持つ等、合成の困難なテンプレートを用いる場合は 55°C まで上げられる。
3. SuperScript™ III RT は完全長 cDNA を合成することを目的として RNase H 活性を除去しているため、RNA が分解されず、cDNA は合成時点では RNA との 2 本鎖の状態にある。2 本鎖状態の cDNA を鋳型として PCR を行った場合、熱変性で

は 1 本鎖にならないことがある。PCR の効率を上げるため、特に増幅産物が 1kb 以上の場合は、37°C、20 分間の RNase H 処理を行ったほうがよい。

### RNA を取り扱う際の注意点

RNA は分解されやすく、分解酵素 (RNase) も至る所に存在することを念頭に置き、可能な限り RNase の存在しない (RNase-free の) 環境を維持しながら、実験を進める。また、RNA 実験操作に関する参考書や RNA 実験試薬、キット等のマニュアルに目を通し、手順や手法をよく理解してから実験に取り組む。以下に実験操作の基本的な留意点を挙げる。

- RNase は汗や唾液にも含まれるため、手袋を常用し、会話を慎む。
- 実験台は整理整頓し、RNase 除去剤等で RNase-free に近づける。実験する際は実験台にアルミホイルを敷く。
- 使用する全ての実験器具は、素材によって乾熱滅菌、RNase 除去剤、0.1N NaOH/1mM EDTA 処理等で RNase を失活させる。チューブやピペットチップなどは使い捨てで RNase-free の製品を購入することを勧める。
- 試薬はできるだけ分子生物学用で RNase-free のものを購入するか RNA 専用のものを準備し、分取は薬サジを使用せず、デカンテーションで行う。
- 試薬調製用の水は RNase-free 水を購入するか、自分で作製する場合は RNase 除去用のフィルターを通すか、DEPC (RNase 活性阻害剤；発癌物質のため取り扱い注意) を用いて RNase-free 水とする。一般的なバッファー類も核酸実験用に調製済みのものが市販されている。
- RNA 実験用の試薬や器具は RNA 用と明記し、専用の保管場所を確保する。

### おわりに

最近の研究現場では、分野を問わず実験操作のキット化、試薬調製の簡便化が進み、ゲノムサイエンスを含む分子生物学的な実験についても、非常に取りかかりやすくなった。またそうした現状から、実験操作技術の格差も少なくなり、効率的に安定した結果を得ることが可能となった。それらの便利な実験ツールを活用して新しい知見の蓄積につなげていただきたい。

### 参考文献

- 1) 無敵のバイオテクニカルシリーズ RNA 実験ノート 上巻 RNA の基本的な取り扱いから解析手法まで、稲田利文、塩見春彦編 (羊土社、東京)、(2008)。
- 2) 西方 敬人、真壁 和裕、細胞工学別冊 超実践バイオ実験イラストレイテッド レッスン 1 キットも活用遺伝子実験 (秀潤社、東京)、(2005)。