



## ベックマン・コールター Agencourt RNAdvance Bloodキットを用いた、 血漿由来の循環セルフリーDNAとmiRNAの抽出

Bee Na Lee, Ph.D. Staff Application Scientist, Beckman Coulter Life Sciences

### Summary

腫瘍細胞は、血中に循環セルフリー DNA (cfDNA) を放出することから、患者血中 cfDNA レベル上昇と悪性腫瘍存在との相関性が強く示唆されています。最近では非侵襲的なリキッドバイオプシーとして頻用される血液サンプルから、特異的な遺伝子変異の同定や参照配列に対する稀少変異を検出することが可能となっています。循環腫瘍細胞 (CTCs) や循環セルフリー DNA (cfDNA) を標的とした、血液サンプルの解析は盛んに行われています。これらの研究は、腫瘍成長の初期ステージ検出のためのリアルタイムモニタリングや、各患者の治療抵抗性を勘案しての個別のがん治療法選択を可能とします。

本報告では、ベックマン・コールターの Agencourt RNAdvance Blood キットを用いた血漿 200 ~ 300  $\mu$ L からの cfDNA 精製方法について紹介します。ベックマン・コールターの SPRI (Solid Phase Reverse Immobilization) 磁気ビーズにより、ボルテックス、遠心分離、ろ過処理を必要としない、簡単、迅速、高収量、安定、かつ自動化の容易な解析が可能となります。本解析では、ヒト血漿からの cfDNA 抽出および qPCR による検出に成功しました。さらに miRNA についても、cfDNA と同じプロトコルでの抽出が可能でした。

### Materials and Methods

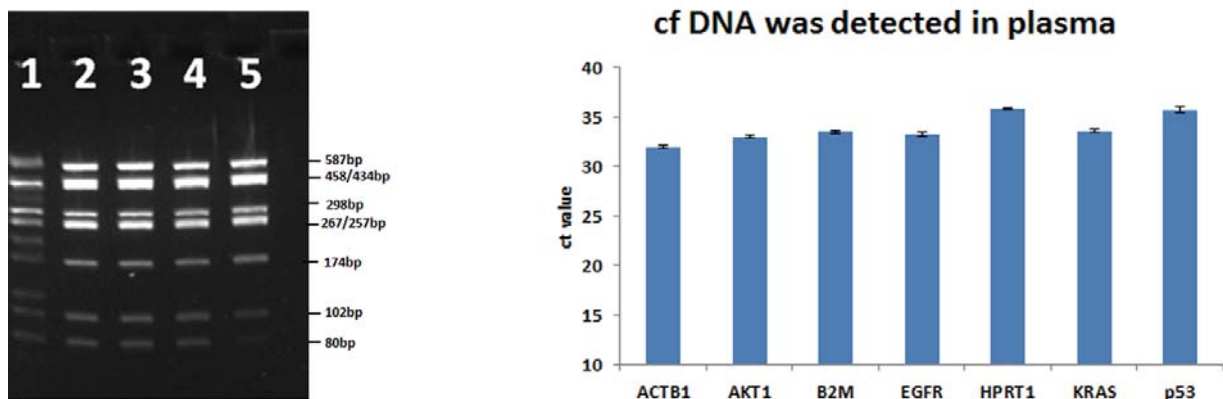
ヒト全血は、同意済の成人から K2-EDTA 抗凝固剤入りチューブ (Avena Medica) にて回収しました。血漿は、回収後 2 時間以内にベックマン・コールター Allegra X-22R と SX4250 ローター (392187, 392243) で 4°C、1,500 x g、10 分間の遠心分離によって調製しました。血漿上清をヌクレアーゼフリーのチューブに移し、細胞残渣とゲノム DNA の混入を最小限とするために Microfuge 18 小型遠心機 (Beckman Coulter, 367160) にて 16,000 x g、15 分間の遠心分離を行いました。凍結ヒト血漿 K2-EDTA 200  $\mu$ L に溶解バッファー 300  $\mu$ L とプロテイナーゼ K 20  $\mu$ L を添加し、室温、1,000 rpm、30 分間の振盪により酵素消化を行いました。cfDNA は RNAdvance Blood キット (Beckman Coulter, A35605) を用いて、cfDNA supplemental protocol (reference #1, AAG-1256SP11.15-A) (RNase 処理なし) により抽出しました。核酸は、最終工程でヌクレアーゼフリー水 30  $\mu$ L によって溶出しました。溶出した核酸は、Ribogreen アッセイ (Life Technologies, R11490) およびプレートリーダー (Molecular Devices, FilterMax F5) にて濃度測定を行いました。OD260/OD280 比は、NanoDrop 2000 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific) で測定しました。低分子核酸回収に最適な結合および洗浄条件を決定するため、コントロールである非ヒトの合成 cel-miR39 (Qiagen, 219610) をウシ血漿に添加し、使用しました。miRNA 回収率は、定量的 Taqman qPCR アッセイ (Life Technologies, 4427975, assay ID 000200) によって測定しました。miRNA 遺伝子発現量測定のための qPCR アッセイは、reference #2 (AAG-1025APP07.15-A) 記載の方法で行いました。DNA 検出のためのプライマーは IDT primer design tool, Primerquest (<http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) を用いて、エクソン配列から設計を行いました。またプライマー配列については、SNPs や非特異的結合が無いことを確認しました。溶出した DNA のうち 5  $\mu$ L を、Taqman Universal Master Mix II (Life Technologies, 4440038) の 10  $\mu$ L 反応系に使用し、qPCR を行いました。本解析で使用したプライマー配列は、Table 1 に示します。

**Table 1:**

Genes	Primer 1	Primer 2	Probe
ACTB1	GGAAATCGTGCCTGACATTAAG	AGCTCGTAGCTCTTCTCCA	CTGGACTTCGAGCAAGAGATGGCC
AKT1	GGCTGTGCCTCAGGTTG	CACAATCTCAGCGCCATAGAA	AGCTGTTCTCCACCTGTCCCG
B2M	TGA TGT ATC TGA GCA GGT TGC	GCT TTG AGT GCA AGA GAT TGA AG	TA GGA GGG CT GGC AAC TTA GAG GT
EGFR	CTGGACCTTGAGGGATTGTTT	AACTGCGTGAGCTTGTACT	TTTCTCCAGTTTGCCAAGGCACG
HPRT1	TGT CAG TTG CTG CAT TCC T	TCA CTC AAT AGT GCT GTG GTTA TA	AA CAA CAA TC CGC CCA AAG GGA AC
KRAS	CAGACTGTGTTTCTCCCTTCTC	CTCATGTACTGGTCCCTCATTG	TCGACACAGCAGGTCAAGAGGAGTA
P53	ACAATGGCTCCTGGTTGTAG	AGCATCTGTATCAGGCAAAGT	TTAAAGGACCAGACCAGCTTTCAA

## Results and Discussion

RNAAdvance Blood キットプロトコルは、PAXgene で保存された血液からの total RNA 精製方法として開発されました。100 bp 以上の RNA 精製に最適化され、100 bp 以下の RNA は洗浄によって除去されます。低分子量 RNA を精製するため、reference #3 (B2012-13440) の方法により精製条件を 22 nt に最適化しました。DNA 回収効率を調べるため、puc18 HaeIII digested DNA fragments (Sigma, D6293) 1  $\mu$ g をテストサンプルとして 200  $\mu$ L、300  $\mu$ L、400  $\mu$ L のウシ血漿に添加し、ヌクレアーゼフリー水 40  $\mu$ L で溶出します。よって回収率が 100% であれば、25 ng/ $\mu$ L の収量となります。Figure 1 では、4% EX-gel and E-Gel agarose electrophoresis apparatus (Life Technologies, G401004) での DNA 測定による回収程度を示しています。本結果では、200  $\mu$ L (レーン 3) と 300  $\mu$ L (レーン 4) のサンプルでコントロール (ビーズ精製を行っていない 25 ng/ $\mu$ L; レーン 2) と同様の回収程度を示しています。しかしながら、血漿 400  $\mu$ L では 80 bp 断片の回収率が低下しました (レーン 5)。よって本方法では、300  $\mu$ L 以下での抽出を推奨条件としました。



**Figure 1 left.** サンプル 1  $\mu$ L を各レーンにロードした泳動結果。レーン 1 は 10 bp DNA size marker ladder、レーン 2 はコントロール (ビーズ精製を行っていない puc18 HaeIII digested DNA 25 ng/ $\mu$ L)、レーン 3-5 は 200  $\mu$ L、300  $\mu$ L、400  $\mu$ L のウシ血漿からそれぞれ精製した puc18 HaeIII 消化 DNA 1  $\mu$ L。

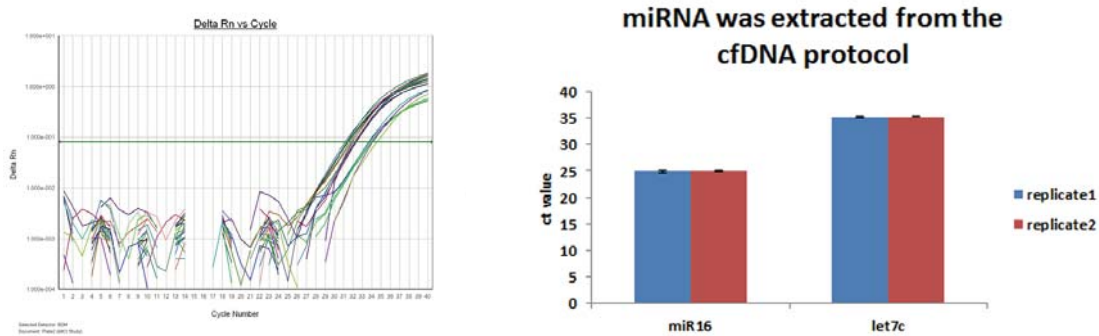
**Figure 1 right.** ヒト血漿 200  $\mu$ L から抽出した核酸 1 ng を増幅したときの、cfDNA の Ct (cycle threshold) 値。

### qPCR アッセイによる、ヒト血漿サンプルからの循環 DNA 抽出の確認

ヒト血漿からの循環 cfDNA 抽出を確認するために、ACTB、AKT1、B2M、EGFR、HPRT1、KRAS、P53 の各遺伝子のエクソン配列から特異的なプライマーとプローブを設計しました。溶出したサンプルのうち 5  $\mu$ L を qPCR 反応に用いました。ACTB、AKT1、B2M、EGFR、HPRT1、KRAS、P53 の Ct 平均値は、それぞれ 31.88 $\pm$ 0.153、32.95 $\pm$ 0.112、33.50 $\pm$ 0.155、33.19 $\pm$ 0.23、35.77 $\pm$ 0.078、33.55 $\pm$ 0.11、35.70 $\pm$ 0.27 でした (Figure 1, right)。RNAAdvance Blood キットを用いて、ヒト血漿からの cfDNA が抽出に成功していることがわかります。

## miRNA と cfDNA 両方の抽出に対応

血漿から抽出した RNA については、特異的な miRNA プライマーとプローブを用いて miRNA 遺伝子発現量を調べることができます。Figure 2 では、miR16 と let7c 増幅効率を示しています (2 回の実験実施)。溶出液 3  $\mu$  L を逆転写反応に、cDNA 1  $\mu$  L を 3 回の PCR 反応に使用しました。miR16 の Ct 平均値は 24.89 $\pm$ 0.05 および 25 $\pm$ 0.013、let7c では 35.15 $\pm$ 0.268 および 35.18 $\pm$ 0.138 でした。同じ方法で、循環 miRNA と cfDNA 両方の抽出ができることがわかりました。



**Figure 2 left.** 7 種類の遺伝子エクソン配列を用いた増幅プロット。

**Figure 2 right.** miR16 と let7c の特異的プライマーとプローブを用いた、miRNA RT-qPCR アッセイの複数回実施結果。1 反応あたり、ヒト血漿 200  $\mu$  L から抽出した核酸 750 pg を使用。

## Conclusions

本報告では、ベックマン・コールター RNAdvance Blood キットにより、血漿からの循環 miRNA と cfDNA の抽出に成功しました。磁気ビーズ抽出プロトコルは、スループット拡大に必須である自動化に適しています。Biomek RNAdvance Blood 96 demonstrated method (reference #4, AAG-1251APP11.15) は、血漿 / 血清 200 ~ 300  $\mu$  L または PAXgene 保存の血液サンプル 400  $\mu$  L から RNA 抽出を行う、簡便、安定、完全自動化の使いやすいワークフローです。96 ウェルプレート上の 8 ~ 96 サンプルを 2.5 ~ 3 時間で処理可能です。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。

## References

1. Supplemental Protocol for free circulating DNA and miRNA/RNA isolation from 200-300 $\mu$ L of plasma and serum (AAG-1256SP11.15-A).
2. MicroRNA and RNA extraction from plasma and serum using Beckman Coulter's Agencourt RNAdvance Blood kits (AAG-1025APP07.15-A).
3. Highly-efficient miRNA Isolation using the Agencourt FormaPure and RNAdvance Cell v2 Kits and Biomek Automated Extraction Methods (B2012-13440).
4. Automation of Micro RNA and Total RNA Purification from plasma using the Agencourt RNAdvance Blood Kits and Biomek Span-8 automated workstation (AAG-1251APP11.15-A).



**ベックマン・コールター株式会社**

〒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 🌐 <http://www.beckmancoulter.co.jp/>