

レーザーマイクロダイセクション試料から抽出した RNA の品質検討

高木 均、松川 茂（福井大学 ライフサイエンス支援センター バイオ実験機器部門）

TAKAGI Hitoshi, MATSUKAWA Shigeru:

The integrity assessment of RNA extracted from Laser Microdissection samples

Laser microdissection(LMD) is a device to procure subpopulations of tissue sections under direct microscopic visualization. Generally, we need a line of tissue treatments such as fixation, staining and wash of tissue sections when perform LMD. Therefore, many factors during tissue treatments may influence preservation of RNA integrity. We tested the influence of fixation and staining protocols and preservation period of fixed tissue sections on the integrity of RNA from LMD samples.

1. 目的

レーザーマイクロダイセクション (LMD) は、組織切片を顕微鏡下で観察しながら、標的とする細胞群を非接触でレーザーで切り出し、回収する装置である。LMD を使用する場合、基本的には切片の固定、染色、洗浄などが必要である。そのため、回収された試料より RNA 抽出を行う場合、組織からの常法による RNA 抽出に比べて RNA が分解する可能性が高くなる。今回の実験では、条件を変えて LMD 試料を作製し RNA の分解の程度がどのように変わるのかを検討した。

2. 方法

LMD を使用して RNA 抽出を行うまでの基本的な手順は、「凍結切片を LMD 専用スライドに張り付ける → 固定 → 洗浄 → 染色 → 洗浄 → 風乾 → LMD で目的部位の回収 → RNA 抽出」となっている。そこで、(1) 固定液の種類、(2) 染色液の種類、(3) LMD で切り出すまでの時間などの条件を変えて LMD 試料を作製し、抽出した RNA をバイオアナライザー（マイクロチップ型電気泳動装置）で分析した。

3. 結果

(1) 固定液の検討

腎臓（マウス）の凍結切片を、3 種類の固定液（A：エタノール/酢酸溶液（19：1）、B：アセトン、C：95%エタノール）で固定（2分、on ice）し、洗浄（30秒、on ice）→ 風乾 → LMD → RNA 抽出の順で試料を作製、分析した。その結果、コントロールと比較して、いずれも RNA の分解はほとんど見られなかった（図1）。

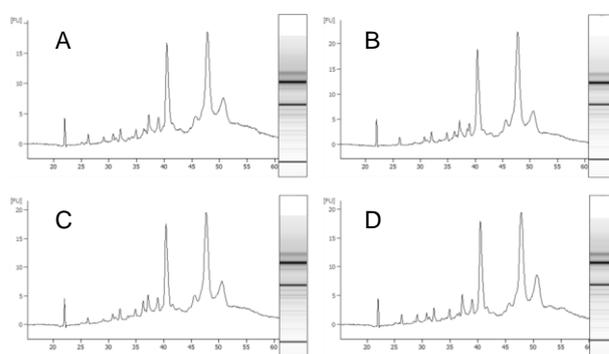


図1 固定液の検討

A：エタノール/酢酸（19：1）、B：アセトン、C：95%エタノール、D：コントロール（未固定）

RNA の分解の指標である RIN 値は A：7.4、B：7.7、C：7.1、D：7.4、となっており、コントロールと比較して、いずれも、それほど大きな RNA の分解は見られない。

(2) 染色液の検討

腎臓の凍結切片を A：トルイジンブルー、B：エオジン、C：Ambion 社 LCM Staining Kit を使用して染色を行い RNA 抽出した。トルイジンブルー及びエオジン染色は、固定 → 洗浄 → 染色 → 洗浄（2回）の手順で試料を作製した（固定2分、その他30秒、全て on ice）。Ambion 社キットは 95%エタノール → 75% " → 50% " → クレシルバイオレット → 50%エタノール → 75% " → 100% "（2回） → キシレン（2回）という手順であった（95%エタノール2分、その他30秒、全て室温）。RNA の品質は、エオジン染色した RNA のベースラインが他に比べて若干高いが、全体的に大きな RNA の分解は見られなかった。但し、染色性や染色の簡単さにおいて今回染色した組織ではトルイジンブルーが優れていた（図2）。

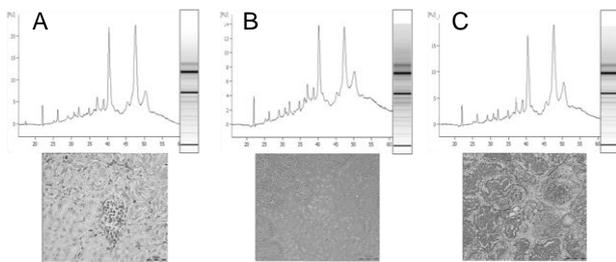


図2 染色液の検討

A: トルイジンブルー (0.1%) (RIN : 6.7)、B: エオジン (0.1%) (RIN : 6.0)、C: Ambion 社キット (RIN : 7.0) エオジンのベースラインが若干高くなっているが、全体的にそれほど大きな RNA の分解は見られない。但し、染色性や染色の簡単さにおいて今回染色した組織ではトルイジンブルーが優れていた。

(3) LMD で切り出すまでの時間の影響

LMD を使用するとき、目的の部位が小さいケースでは数多くの部位を切り出さなければならず、時間がかかる場合がある。そこで、エタノール/酢酸溶液 (19 : 1) で固定し、トルイジンブルー (0.1%) 染色を行った切片 (マウス・小腸) を室温で 3 時間放置後、RNA 抽出を行った。また、 -80°C で 5 ヶ月間保存した切片 (マウス・腎臓) から RNA 抽出し分析した。その結果、RNA の品質はほとんど問題がなかった (図 3)。

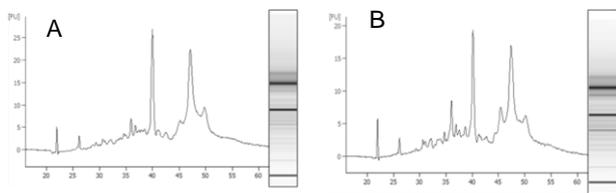


図3 LMD で切り出すまでの時間の影響

A: 室温で 3 時間放置した切片 (マウス・小腸) (RIN : 6.6)、B: -80°C で 5 ヶ月間保存した切片 (マウス・腎臓) (RIN : 6.2) それほど大きな RNA の分解は見られない。

(4) 様々な組織からの RNA 抽出

マウスの腎臓及び小腸以外の様々な組織についても LMD による微小領域の回収及び RNA 抽出を行った。使用した組織は、マウスの大脳皮質、大腸、肝臓、膵臓であり、エタノール/酢酸溶液で固定し、トルイジンブルー染色を行った。その結果、大脳皮質、大腸、肝臓については RNA の品質に問題はなかったが、膵臓の RNA は分解していた (図 4)。これは、膵臓には、RNase が他の組織に比べて非常に多く含まれているためと考えられる。そこで、RNase A (Sigma) 溶液を未固定及び固定した肝臓の切片 (マウス) に滴下し風乾した後、LMD で回収し RNA 抽出を行った。その結果、

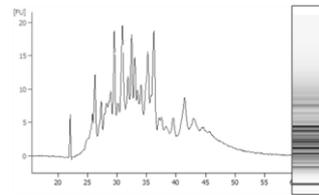
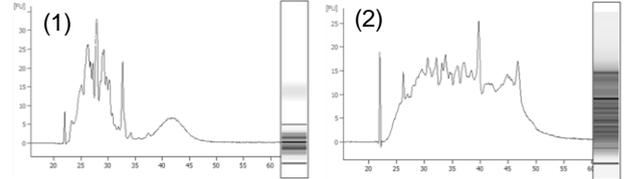


図4 膵臓 (マウス) LMD 試料からの RNA 抽出 RNA はかなり分解している (RIN : 2.6)。

A : RNase A 滴下



B : Nuclease free water 滴下

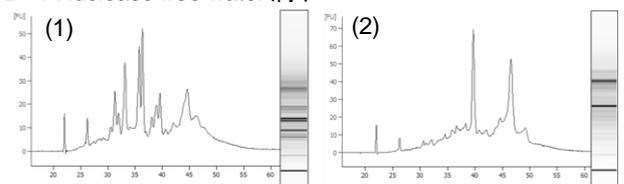


図5 RNase A を滴下し RNA 抽出 (マウス・肝臓)

A : RNase A ($100\text{ng}/\mu\text{l}$) 滴下

(1) 未固定切片 (RIN : 2.3)、(2) 固定切片 (RIN : 3.3)

B : Nuclease free water 滴下

(1) 未固定切片 (RIN : 3.4)、(2) 固定切片 (RIN : 6.4)

RNase A を滴下した未固定切片の RNA は膵臓と同様に分解が確認された (図 5A)。但し、固定済みの切片では RNA の分解の程度は未固定の切片に比べて少なかった。また、RNase A 溶液の代わりに Nuclease free water を滴下した場合においても、未固定切片では RNA の分解が認められたが、固定済み切片から抽出した RNA は、大きな分解反応は見られなかった (図 5B)。

4. 考察

固定液、染色方法を 3 種類ずつ変えてみたが、いずれの方法においても全体的に RNA の品質は保存されていた。切片作製から RNA 抽出まで、長時間室温に放置されていても RNA の品質には問題なく、また、凍結切片を風乾後、ディープフリーザーに 5 か月保存しても特に問題はなかった。組織によっては RNA の分解が著しいものがあり、RNA の品質に一番影響を及ぼす要因は組織中に含まれる RNase とおもわれる。また、凍結切片を有機溶媒で固定することは、タンパクを凝集させ RNase を働きにくくさせる作用があると推測される。しかし、膵臓のように RNase が非常に多く存在する組織の場合、固定する前の段階で RNase が作用し、RNA を分解すると考えられる。