

GeneChip発現解析 サンプル準備の手引き

Part 1	本資料と受託解析の流れ	2
Part 2	送付サンプルのご用意	3
1	サンプル調製について	
2	サンプル調製上の注意事項	
3	発送前のサンプル品質チェック	
4	品質チェックができない場合	
5	サンプル送付方法	
6	サンプルをお送りいただく前に	
Part 3	各種追加作業料金	6
1	サンプル再送による品質検定	
2	RNA精製	
3	オプションサービス -微量RNAからの解析	
4	解析中止	
Part 4	RNA品質が基準に満たない場合	7
1	品質不合格の際の方針組み立て	
2	オプションサービス -微量RNAからの解析	
3	精製による品質回復	
4	精製についての注意事項	
5	DNaseI処理による精製プロトコル	
6	フェノールクロロホルム処理による精製プロトコル	
7	エタノール沈殿による精製プロトコル	
Part 5	RNA品質検定	12
1	品質検定の流れ	
2	NanoDropによる検定	
3	Agilent 電気泳動装置による検定	

本資料と受託解析の流れ

ここでは本資料の使い方と受託解析の大きな流れについて概要をご案内します。

GeneChip発現解析受託の全体の流れは以下のようになって
います(図1)。

- (1)お客様によるRNAサンプル準備
- (2)お客様によるRNAサンプルの品質チェック
- (3)サンプル梱包、弊社への発送
- (4)弊社でのサンプル品質検定
- (5)実験作業
- (6)データ解析、納品物発送

本資料はGeneChip発現受託解析をお受けする上でお問合
せの多い、(1)～(4)の部分に焦点を当てています。

ご準備していただいたRNAサンプルは送付前に必ず品質の
チェックをお願いします。本資料 Part 2 にサンプル送付前の
品質チェック項目、サンプル調製や発送時の注意事項につい
て記載してありますのでご参照ください。

サンプルは弊社到着後に品質検定を行います、その結果、
品質不良であった場合には再送、精製作業の発生に伴い、
追加作業料金が必要になる場合があります。Part 3 では追加
作業料金についてご案内しています。サンプル発送前に必ず
ご確認をお願いいたします。

Part 4 ではサンプル送付前に品質不良が明らかになった場
合の対応方法についてご案内しています。サンプルRNAを精
製することで品質の回復が見込める場合はお客様ご自身で
行っていただけますと追加作業料金の発生を抑えることがで
きる場合が多くあります。Part 4 にはRNA精製のプロトコルも記
載してありますのでご参照ください。

Part 5 では弊社で行う品質検定の流れや基準について紹
介しています。検定が終了してからご確認いただいてもよろし
いですが、お客様の品質チェック時にも参考になる部分があ
るかと思います。できれば予めご確認ください。

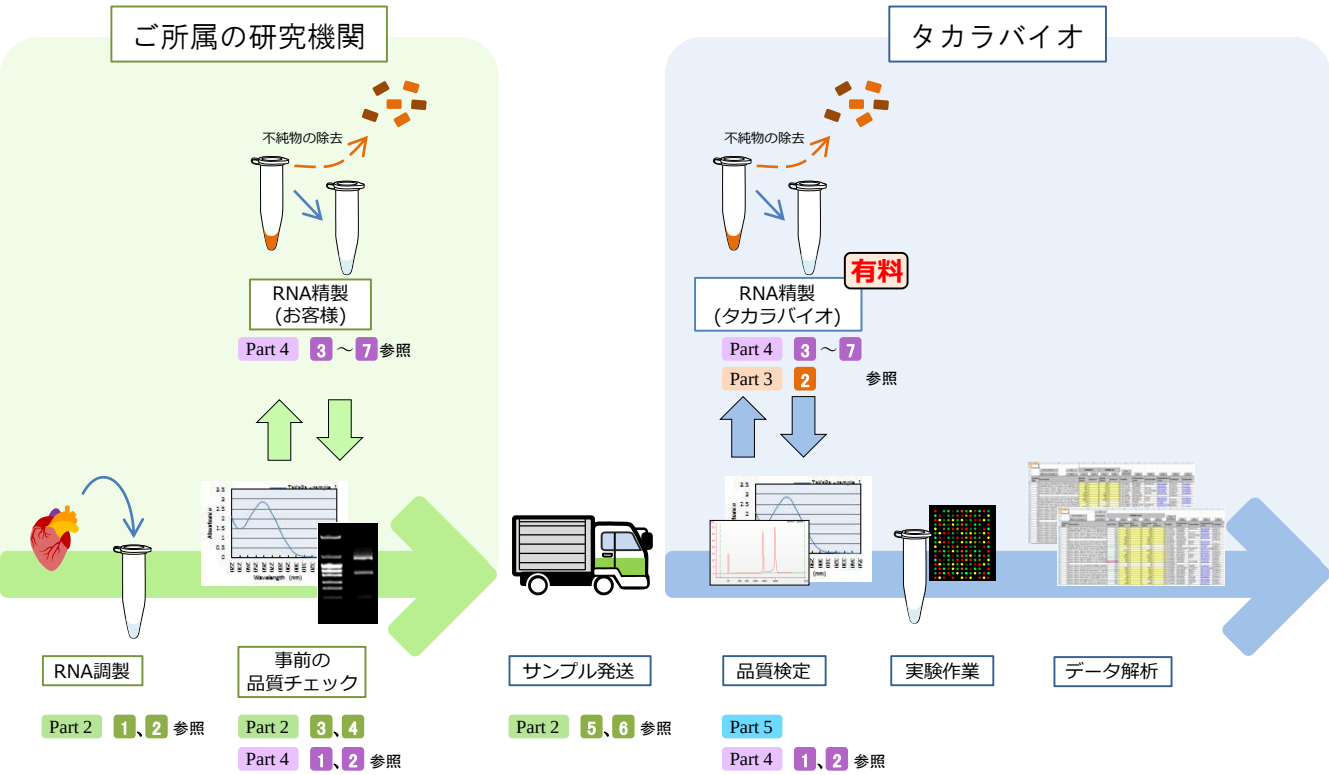


図1 解析フローチャート

送付サンプルのご用意

品質の良いtotal RNAをご用意いただくことはスムーズな解析と安定したデータの取得に重要です。ここでは要求されるRNA品質の基準値や注意事項についてご案内いたします。

1 サンプル調製について

品質の良いサンプルとはRNAの分解がなく、夾雑物の混入が少ないサンプルのことを指します。RNAの分解や夾雑物の混入は発現解析結果に影響を及ぼす可能性があります。

お送りいただくサンプルの品質基準については(表1)注)、(表2)を、サンプル調製上の注意点については「2 サンプル調製上の注意事項」を事前によくお読みください。

サンプル調製には以下の製品か、それに準ずる試薬がご使用になります。

・RNAiso Plus 製品説明書にはDEPC水使用と記載されていますがRNase-Free水をご使用ください。

・マッハライ・ナーゲル社製品 NucleoSpin RNA XSをご使用の場合はCarrier RNA(PolyA RNA)の添加は行わないでください。

total RNAを調製いただきましたら、弊社へ発送いただく前に吸光度測定と電気泳動による品質のチェックをお願いします。品質チェックの詳細については次ページ「3 発送前のサンプル品質チェック」をご覧ください。

2 サンプル調製上の注意事項

(1) RNAはRNase-free水に溶解する

TEや界面活性剤、DEPC水を使用すると、酵素反応が阻害される可能性があります。また、品質検定が正確に行えない場合がありますのでご使用にならないでください。

(2) RNAを少量の液に溶解しない

RNAは10 µL以上の液量を目安に溶解させてください。弊社での品質検定におよそ1.5 µL使用します。揮発の影響を受けやすく、また検定使用による損失が大きくなるため、なるべく5 µL以下の少量の液量での溶解は避けるようお願いします。

(3) グリコーゲンを使用しない

RNA調製時にエタノール沈殿を実施する際、共沈剤としてグリコーゲンを使用しないでください。グリコーゲンは反応を阻害する可能性があります。共沈剤を使用する場合はアクリルアミド系の共沈剤をご使用ください。弊社では「Genとるくん™エタ沈キャリア」の取り扱いがございます。

(4) 分画・濃縮はしない

polyA RNAなどへの分画・濃縮をせず、total RNAとしてご準備ください。分画・濃縮を行うと濃度測定が正確に行えず、解析に使用するRNA量を統一することができなくなります。既に濃縮している場合はご相談ください。

(5) 抗凝固剤ヘパリンを使用しない

血液サンプルの調製時に抗凝固剤を使用する場合は、ヘパリンは絶対にご使用にならないでください。ヘパリンは酵素反応を著しく阻害し、分離精製も困難です。抗凝固剤にはクエン酸かEDTAをご使用ください。

(6) サンプルの保存には1.5mLチューブを使う

8連、12連PCRチューブなどは輸送中に破損する恐れがあるためご使用にならないでください。

(7) 凍結で剥がれにくいシールを使う

チューブへのサンプル名記入にシールを使用する場合は、凍結に強いタイプのシールをご使用ください。輸送中にシールが剥がれることがございますので、念のためチューブにも油性ペンで直接記入をお願いします。

吸光度測定チェック項目	
濃度	50~300 ng/µL
RNA量	500 ng以上
A_{260}/A_{230}	1.6以上
A_{260}/A_{280}	1.6以上
吸光度ピークが A_{260} にある	

表1 吸光測定のチェック項目

注) お客様と弊社の測定環境の違いから検定結果に差異が生じることがあります。その場合でもスムーズに解析を開始できるよう、サンプルを調製いただく段階では濃度、RNA量の基準を高めにご案内しています。

電気泳動チェック項目
rRNAバンドが明瞭に見える
ゲノムDNAの混入がない

表2 電気泳動のチェック項目

3 発送前のサンプル品質チェック

total RNAの発送前に、吸光度測定と電気泳動による品質確認をお願いします。吸光度に関する基準値は前ページ(表1)をご参照ください。

良好なサンプルは(図2)のような波形の吸光グラフになります。濃度、RNA量が基準を満たしていることをご確認ください。

有機溶媒やTEなどが混入していると A_{230} の吸光度が高くなります(図3)。弊社ではサンプル純度指標の一つとして核酸吸光度 A_{260}/A_{230} が1.6以上であることを検定基準としています。

RNAサンプルにタンパク質やDTTなどの物質が混入していると A_{280} が高くなります。その結果、通常は A_{260} に見えるピークが A_{270} 側にシフトし(図4)、さらに混入が著しい場合には A_{260}/A_{280} の値が低値を示します(図5)。サンプル純度指標として A_{260} のピークがシフトしていないこと、核酸吸光度 A_{260}/A_{280} が1.6以上であることを検定基準としています。

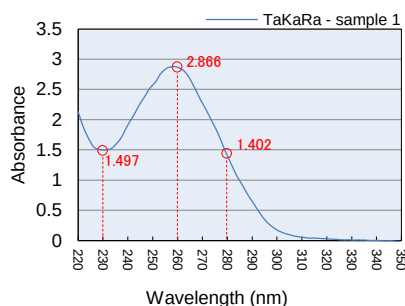


図2 良好なサンプルの吸光度グラフ例

A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
1.91	2.04

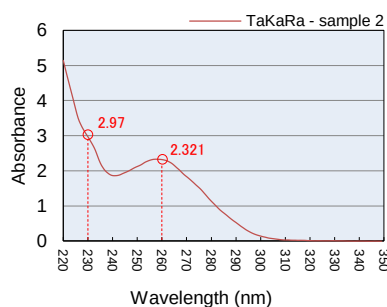


図3 A_{260}/A_{230} が悪いサンプル例

A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
0.78	2.04

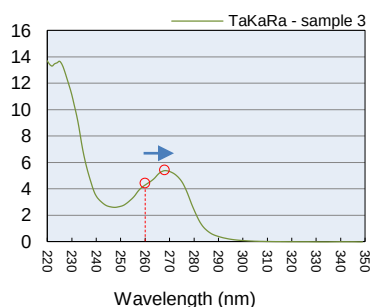


図4 A_{260} のピークがシフトしたサンプル例

A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
0.38	1.76

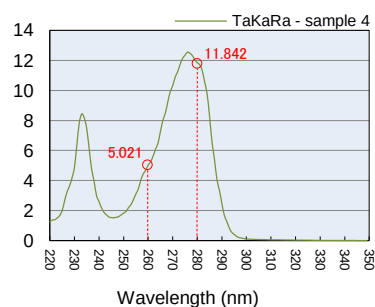


図5 A_{260}/A_{280} が悪いサンプル例

A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
1.04	0.42

電気泳動では2本のrRNAのバンドが明瞭に検出されることをご確認ください(図6, Lane1)。スメアなバンドが検出された場合、分解が進行している可能性があります(図6, Lane2)。また、rRNA以外にバンドが検出された場合、ゲノムDNAが混入していると考えられます(図6, Lane3)。

Agilent 2100 バイオアナライザ(もしくはTapeStation)による検定の詳細は「Part 5 RNA品質検定について 3 Agilent 電気泳動装置による検定」をご確認ください。

ご用意いただいたサンプルの品質が基準を満たない場合は、「Part 4 RNA品質が基準を満たない場合」をご参照いただき、可能な場合は必要に応じてRNA精製を行ってください。

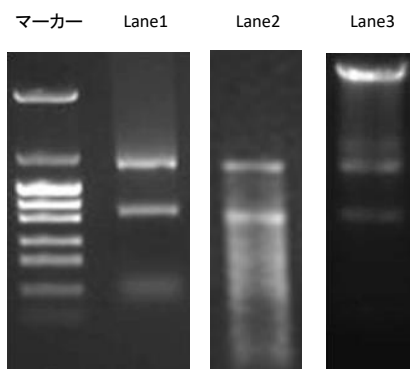


図6 電気泳動像の例

Lane1: 分解のないRNA
Lane2: 分解の始まったRNA
Lane3: ゲノムDNAが混入したRNA

4 品質チェックができない場合

サンプルをお送りいただいた後に必ず、弊社でも品質検定を行います。測定機器をお持ちでないなど、ご自身での品質チェックができない場合はそのままサンプルをお送りいただいても構いません。しかし、弊社での検定で品質不良が明らかになった場合は、サンプル再送やRNA精製など、別途、追加作業料金が必要となる工程が発生することがあります。料金につきましては「Part3 各種追加作業料金」をご参照ください。

5 サンプル送付方法

解析サンプルは融解、乾燥、漏れ、容器破損が起こらないように梱包してください。凍結状態を維持するために十分量のドライアイスと同梱し、冷凍便、平日午前着指定で下記の住所へお送りください。遠隔地を除き、翌日必着で送付ください。また、ドライアイス不足の恐れがあるため、休日をはさまないように送付をお願いします。

お送りいただいたサンプルでごく稀に、ドライアイス残量が少なくなっていることや、チューブ破損などが見受けられます。(図7)に弊社からお客様へ冷凍品を送付する際の梱包方法を紹介します。サンプル送付のご参考にしてください。

- 送付先 -

タカラバイオ株式会社 遺伝子解析センター
アレイ受託受付担当 宛
〒525-0058 滋賀県草津市野路東7丁目4番38号
Tel 077-567-9262

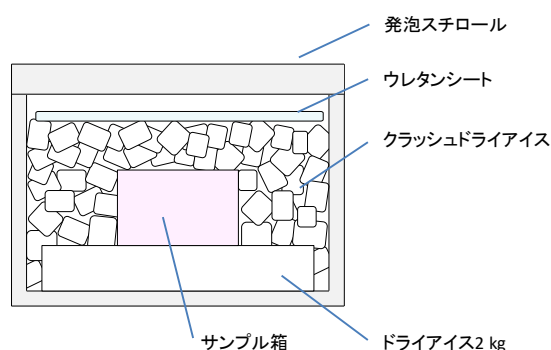


図7 送付サンプルの梱包例

チューブ破損防止のためサンプルは箱に入れる。
箱の下にドライアイス 2kg、周囲をクラッシュドライアイスで被う。上部にウレタンシートなどの緩衝材を入れてフタをし、フタが外れないようにテープで固定する。

6 サンプルをお送りいただく前に

サンプルが弊社へ到着いたしましたら、チューブ破損がないか、サンプル数、名称が解析依頼書と合致しているか等を確認し、メールにてご連絡差し上げます。その後、弊社でのRNA品質検定へと作業を進めてまいります。品質に問題がない場合には、その旨をご一報した後、ターゲット合成へと作業を進めてまいります。

弊社での品質検定の結果、品質に不良が見られた場合には、その後の作業方針についてメールにてご相談させていただきます。よくあるケースではサンプルを再送いただくか、弊社でRNA精製を行うかという流れになりますが、その場合、通常の解析料金に加えて追加作業料金が発生いたします。料金については次ページ「Part 3 各種追加作業料金」にございますので、サンプルをお送りいただく前に必ず事前のご確認をお願いいたします。

各種追加作業料金

サンプルを再送いただく場合や弊社にてRNA精製などを行った場合、解析料金にそれらの料金が追加になります。サンプルをお送りになる前に、追加になる可能性のある料金についてご確認をお願いします。

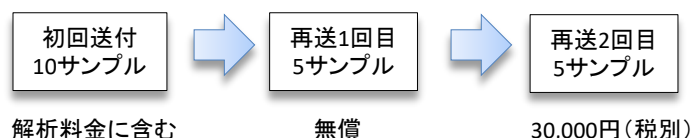
1 サンプル再送による品質検定

サンプル品質が弊社基準を満たしていなかった場合、サンプルの再送をお願いすることがあります。再送1回目（送付2回目）はご依頼サンプル数を上限として無償にて品質検定を行っております^注。再送2回目（送付3回目）以降からは品質検

定料金が発生します。

料金は4検体までを一律25,000円（税別）、以降10検体までは1検体ごとに5,000円（税別）を加算した料金を頂戴します。それ以上の検体数の場合の加算価格は変動となります。

例）10検体のご依頼で再送が2回発生した場合



注）再送1回目のサンプル数が少数であった場合でも再送2回目から料金が発生します。

2 RNA精製

サンプル品質が基準を満たしておらず、RNA精製による回復が見込める場合にはRNA精製をご提案いたします。精製料金は5サンプルまでを一律30,000円（税別）、以降は1サンプルごとに5,000円（税別）を加算した料金を頂戴します。精製内容

はサンプルの状態に合わせてDNaseI処理、フェノールクロロホルム処理、エタノール沈殿等から適したものをご提案します。いずれの作業内容でも料金は同じとなっています。また、精製後の品質検定料金は精製料金に含まれます。

3 オプションサービス -微量RNAからの解析

サンプル品質が基準を満たしておらず、弊社オプションサービスを適応することで解析可能になると判断できる場合には「微量RNAからの解析」オプションサービスをご提案いたします。オプションサービスについては「Part 3 RNA品質が基準

に満たない場合 **2** オプションサービス -微量RNAからの解析」をご参照ください。

オプション料金は別途ご相談ください。

4 解析中止

品質検定終了後に解析中止サンプルが発生した場合は4検体まで25,000円（税別）、以降10検体まで1検体ごとに5,000円（税別）（以降加算価格は変動）の中止料金を頂戴します。

ターゲット合成段階で解析中止サンプルが発生した場合は、そこまでの作業料金として1サンプルにつき50,000円（税別）を頂戴します。

RNA品質が基準に満たない場合

精製を行うことでRNA品質が向上する場合や、弊社オプションサービスで解析が可能な場合があります。ここではサンプルの状態ごとの作業方針と、それらの注意事項についてご案内します。

1 品質不合格の際の方針組み立て

RNA品質不良には大きく分けて6つのパターンがあります。

- 1. RNA量の不足
- 2. RNAの分解
- 3. ゲノムDNAの混入
- 4. タンパク質の混入
- 5. RNA濃度の不足
- 6. 有機溶媒やTE、DTTなどの混入

上記1～2の項目はRNA調製後に回復させる方法がありません。逆に3～6の項目は精製作業による品質回復が可能な場合があります。それぞれのパターンの大まかな解析方針については(図8)をご覧ください。

1～2の場合は基本的にサンプル調製からやり直す必要があります。予備のサンプルがない場合や、再調製を行っても同程度の品質であることが予想される場合には、弊社の有料オプションサービスを適用することで、そのまま解析できる可能性があります。詳細は下記の「2 オプションサービス -微量RNAからの解析」をご参照ください。

3～6の場合は分解していない十分量のRNAがあれば精製作業によって品質を回復させることができます。詳しくは「3 精製による品質回復」をご覧ください。

基準に満たないサンプルからの解析を承ることも可能ですが、結果への影響や途中で解析が中止になる可能性をご了承ください。解析中止となった場合の料金は「Part 3 各種追加作業料金 4 解析中止料金」をご覧ください。

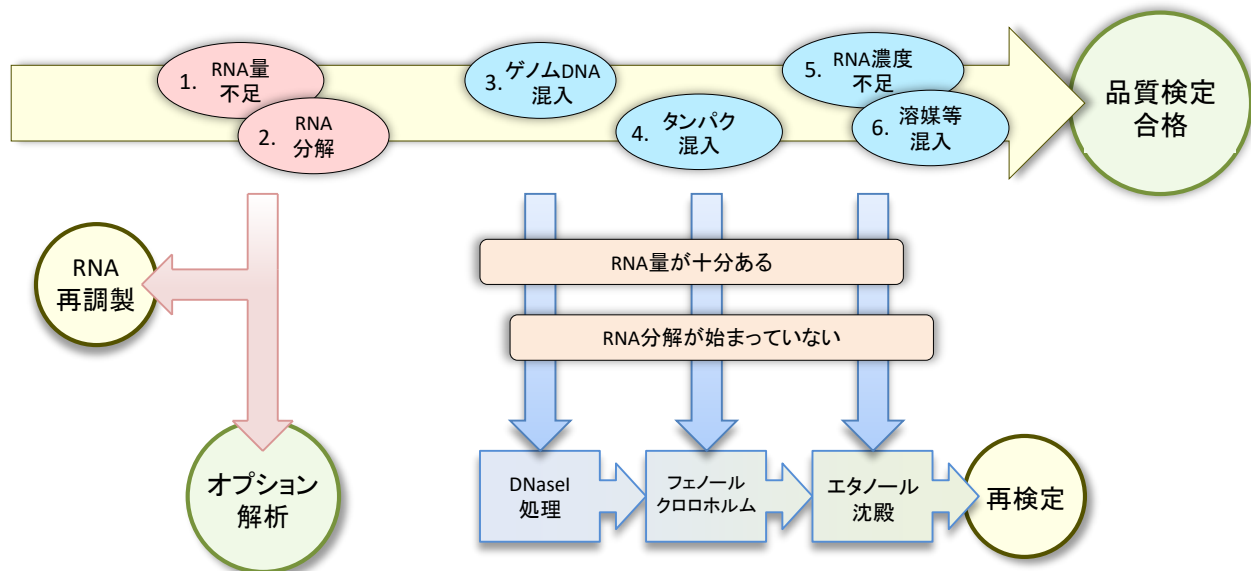


図8 各種、品質問題点ごとの作業方針チャート

品質が基準に満たない場合でもオプション解析、精製などで解析に持ち込める場合が多い。

2 オプションサービス - 微量RNAからの解析

品質不良の項目1～2の場合は通常の手法による解析は行えませんが、増幅試薬を用いた有料オプション「微量RNAからの解析」を適用することができます。

このキットは微量RNAからのcDNA増幅を行うことが可能となっています。特徴として増幅primerにOligo dT primerだけでなく、Random primerも使用しているため、total RNA全域が増幅対象となり、分解の進行した低品質のRNAサンプルからも解析することができます。

当オプションサービスの作業料金は別途ご相談ください。

3 精製による品質回復

不合格項目3～6の場合は精製を行うことでサンプルの品質を回復させることができます。精製に関わる注意事項の詳細については「4 精製についての注意事項」にあります。作業開始前によくご確認ください。

サンプルの状態により、必要な作業内容は異なりますがDNaseI処理、フェノールクロロホルム処理、エタノール沈殿の3種類の作業の組み合わせになります。例えば、ゲノムDNAの除去はDNaseI処理⇒フェノールクロロホルム処理⇒エタノール沈殿となります。従いまして、ゲノムDNAの混入だけでなくタンパク質や有機溶媒の混入が同時に発生している場合でも、DNaseI処理以降の工程で混入物の除去が可能です。必要な作業内容については(図8)と下記をご参照ください。

a. ゲノムDNAが混入している場合

DNaseI 処理を行うことでゲノムDNAを除去することができます。弊社で同様の作業を行う際には通常、10～20 µgを精製に用いています。ゲノムDNAの混入率によっては回収されるRNAの量が大きく変動しますので、予めご注意ください。処理後、DNaseIを除去するためにフェノールクロロホルム処理による精製を、RNAを回収するためにエタノール沈殿を行います。

b. タンパク質が混入している場合

フェノールクロロホルム処理を行うことで不要なタンパク質を除去することができます。弊社で同様の作業を行う際には通常、最低5.0 µgを精製に用いています。処理後、RNAを回収するためにエタノール沈殿による精製を行います。

c. 有機溶媒等が混入している場合

エタノール沈殿を行い、RNase-free水に再溶解させることで不要な有機溶媒等を除去することができます。弊社で同様の作業を行う際には通常、最低2.0 µgを精製に用いています。

d. RNA濃度が基準に満たない場合

エタノール沈殿を行い、回収したRNAをより少量のRNase-free水で再溶解することでサンプルを濃縮することができます。弊社で同様の作業を行う際には通常、最低2.0µgを濃縮に用いています。

4 精製についての注意事項

精製作業を行う際に注意していただきたいポイントがいくつかございます。「Part 2 送付サンプルのご用意について

2 サンプル調製上の注意事項」と合わせてご確認ください。

a. 作業バイアスの回避

作業によるバイアスを避けるため、同一の実験群に含まれるサンプルは全て同様の精製作業を行うことをお勧めいたします。

b. 精製によるサンプル量の減少

精製の過程でRNA量の減少が起こります。精製に用いるRNA量は「3 精製による品質回復」各項の弊社使用量を参考にしてください。少量サンプルで精製を行うと、その後の解析に必要な量のRNAが回収されない可能性があります。

また、ゲノムDNAや有機溶媒の混入により見かけ上のRNA濃度が高く測定されている場合、混入物除去の結果、数値上のRNA量が大きく減少することが予想されます。「Part 5 RNA品質検定 3 Agilent 電気泳動装置による検定」にそのような場合の例がありますのでご参照ください。

c. RNA分解の進行

RNAの分解が始まっているサンプルの場合、精製作業の過程で分解がさらに進行する可能性があります。分解の進行をなるべく抑えるため、作業の際にはRNAサンプルは常に氷上に置き、冷却を保持して操作を行ってください。

d. 精製の成否

サンプルによっては精製を行っても A_{260}/A_{230} 、 A_{260}/A_{280} の値が回復しない場合や、精製前よりも数値が低くなる場合があります。サンプル由来の原因であると思われる場合がありますが、少量サンプルで精製を行った場合にもそのような傾向が見られます。溶媒を一度置換していますので、基準値を大きく下回っているのであれば多くの場合、以降の解析で問題が発生することはありません。

5 DNaseI処理による精製プロトコル

使用試薬

- [Recombinant DNase I \(RNase-free\)](#)
添付: 10 x buffer
- [Recombinant RNase Inhibitor](#)

- (1) (表3)を参照の上、該当のRNA量のサンプルにRNase-Free水を添加し、液量を合わせる。(例: 20 µgの場合は87.5 µL)
- (2) (表3)を参照の上、他の試薬を添加し、混合する。
- (3) 37 °Cで30分間インキュベートする。

10～50 µg反応系の場合は以下の手順を追加

- RNase-Free水を100 µL添加し、混合する。(total volume 200 µL)



RNA量	10～50 (µg)	50～100 (µg)	100～150 (µg)	150～200 (µg)	200～250 (µg)
RNAサンプル + RNase-Free水	87.5	175.5	263	351	439
10 x buffer	10	20	30	40	50
RNase Inhibitor (40 U/µL)	0.5	0.5	1	1	1
DNaseI (5 U/µL)	2	4	6	8	10
total volume	100 µL	200 µL	300 µL	400 µL	500 µL

表3 DNaseI処理の反応組成

6 フェノールクロロホルム処理による精製プロトコル(2) へ進む

6 フェノールクロロホルム処理による精製プロトコル

- (1) RNA 5.0 µg分のサンプルにRNase-Free水を添加、混合し、200 µLに液量を合わせる。
- (2) サンプル液量と同量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25 : 24 : 1)を添加する。
- (3) Vortexで激しく混合する。
- (4) 室温、15,000 rpmで5分間、遠心する。
- (5) 下層(有機層)に触れないように上層(水層)のみを慎重に回収し、新しいチューブに移す。
- (6) 回収した液量と同量のクロロホルム/イソアミルアルコールを添加する。
- (7) Vortexで激しく混合する。
- (8) 室温、15,000 rpmで5分間、遠心する。
- (9) 下層(有機層)に触れないように上層(水層)のみを慎重に回収し、新しいチューブに移す。



7 エタノール沈殿による精製プロトコル(2) へ進む

7 エタノール沈殿による精製プロトコル

使用試薬

- [Genとるくん™エタ沈キャリア](#)

添付: 3M CH₃COONa (pH 5.2)

- (1) RNA 2.0 µg分のサンプルにRNase-Free水を添加、混合し、100 µLに液量を合わせる。
- (2) 液量の1/10量の3M CH₃COONa (pH 5.2) を添加し、混合する。
- (3) Genとるくん™エタ沈キャリアを4.0 µL添加し、混合する。
- (4) 2.5倍量の100% エタノールを添加し、十分混合する。
- (5) 4°C、12,000 rpmで15分間、遠心する。
- (6) 白色の沈殿を残して、上清を取り除く。
- (7) 70% エタノールを500 µL添加し、転倒混和でチューブ内部を洗浄する。
- (8) 4°C、12,000 rpmで15分間、遠心する。
- (9) 白色の沈殿を残して、上清を取り除く。
- (10) 再度、チューブを軽くspin downし、上清を完全に取り除く。
- (11) 室温で1分間ほど風乾する。
- (12) 適当量のRNase-Free水を添加し、溶解させる。

RNA品質検定

弊社にサンプル到着後、NanoDropとAgilent2100バイオアナライザ(もしくはTapeStation)を使用して品質検定を行います。ここではそれらの品質検定項目についてご説明します。

1 品質検定の流れ

(1) 品質検定開始まで

弊社へのサンプル到着後、輸送中のチューブ破損がなかったか、サンプルの本数、名称などが解析依頼書と一致しているか等をチェックし、メールにてご連絡差し上げます。問題がなかった場合には翌日以降、サンプルの品質検定へと進みます。サンプル名称の整合性が取れないなど問題があった場合にはメールにてお尋ねすることがあります。

(2) 受託IDとサンプルIDについて

弊社ではお客様のご依頼ごとに受託ID (GeneChip発現解析ではEA****)を設定して管理しております。サンプルについても受託IDに通し番号を付与した固有のサンプルIDで管理しています。

(3) 品質検定結果の報告

品質検定の結果に問題がなければそのままターゲットの合成へと作業を進めます。

問題があった場合にはメールにて結果報告書(図9)をお送りし、以降の解析の方針についてご相談させていただきます。結果報告書にはサンプルIDとサンプル名称の対応表、品質検定の数値結果データ(不合格項目は赤字で記載)、NanoDropの吸光グラフ、Agilent2100バイオアナライザ(もしくはTapeStation)の泳動結果が記載されています。それぞれの品質検定内容の詳細については次ページ以降をご参照ください。

品質検定結果報告書につきましては納品時に解析データと共に納めさせていただきます。

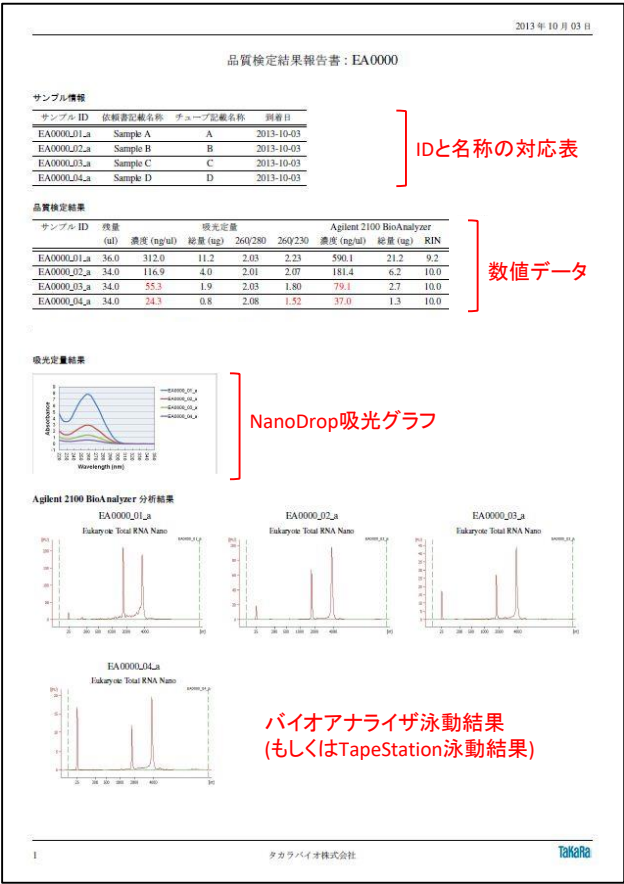


図9 品質検定結果報告書

2 NanoDropによる検定

吸光定量によりRNA濃度および有機溶媒、タンパク質等の混入を検査します。NanoDropの検定基準は(表4)をご参照ください。良好なサンプルは(図10)のような波形の吸光グラフになります。

(1) RNA濃度およびRNA収量

ターゲット合成ではtotal RNA 100ngを反応初発量として使用します。反応液中に持ち込めるサンプル液量は最大3.0μLのため33.3ng/μL以上の濃度が必要となります。「Part 2 送付サンプルのご用意」でご案内した数値と異なっている点にご注意ください。

(2) 有機溶媒、TE等の混入

RNAサンプルに有機溶媒やTEなどが混入しているとA₂₃₀の吸光度が高くなります(図11)。これらの混入はcDNA合成やビオチンの取り込みに影響を与える可能性があります。

弊社ではサンプル純度の指標の一つとして核酸吸光度A₂₆₀/A₂₃₀が1.6以上であることを検定基準としています。

(3) タンパク質、DTT等の混入

RNAサンプルにタンパク質やDTTなどの物質が混入しているとA₂₈₀の吸光度が高くなります。その結果、通常はA₂₆₀に見えるピークがA₂₇₀側にシフトし(図12)、さらに混入が著しい場合にはA₂₆₀/A₂₈₀の値が低値を示します(図13)。これらの混入はcDNA合成やビオチンの取り込みに影響を与える可能性があります。

サンプル純度の指標としてA₂₆₀のピークがシフトしていないこと、核酸吸光度A₂₆₀/A₂₈₀が1.6以上であることを検定基準としています。

NanoDrop 検定基準	
RNA最低濃度	33.3 ng/μL以上
RNA最少量	100 ng以上
A ₂₆₀ /A ₂₃₀	1.6以上
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1.6以上
吸光度ピークがA ₂₆₀ にある	

表4 NanoDropの検定基準

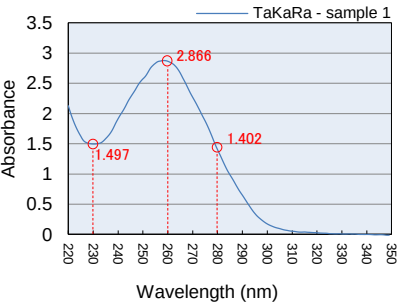


図10 良好なサンプルの吸光度グラフ例

A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
1.91	2.04

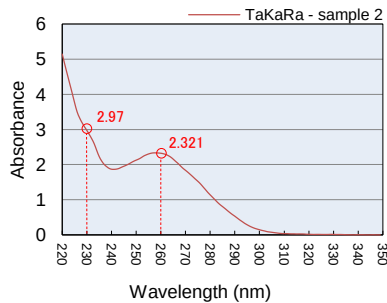


図11 A₂₆₀/A₂₃₀が悪いサンプル例

A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
0.78	2.04

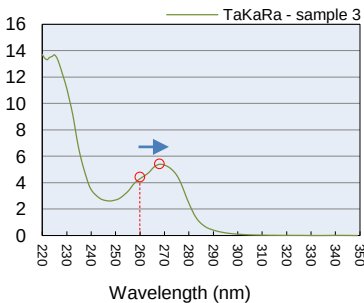


図12 A₂₆₀のピークがシフトしたサンプル例

A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
0.38	1.76

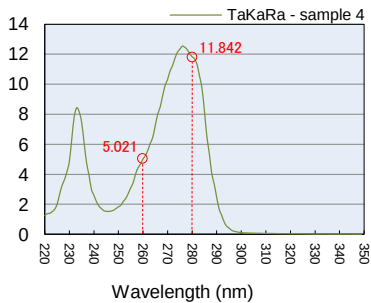


図13 A₂₆₀/A₂₈₀が悪いサンプル例

A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
1.04	0.42

3 Agilent 電気泳動装置による検定

Agilent 2100バイオアナライザ(もしくはTapeStation)による電気泳動でRNAの分解、ゲノムDNA混入の有無、RNA濃度を検査します。検定基準は(表5)をご参照ください。

Agilent 2100バイオアナライザ(もしくはTapeStation)ではアガロースゲルと同様に電圧によってゲル中を電気泳動し、リアルタイムに核酸を定量します。横軸が核酸の長さ(nt)、縦軸がシグナル強度を示しています。

注) RIN (RNA Integrity Number)は2100バイオアナライザ用ソフトウェアによって自動算出されるRNA品質の定量評価値です。1~10の数値で評価され、分解のないサンプルほど10に近い数値を示します。RINによる評価が適用されるのはヒト、マウス、ラットの生物種のみとなります。

RIN[®](RNA Integrity Number equivalent)はTapeStation用ソフトウェアによって自動算出されるRNA品質の定量評価値です。RIN[®]はRNA分解度の指標においてRINと非常に相関が高く、実績のあるRINと同様に判断の基準として利用できます。

Agilent 2100バイオアナライザ(もしくはTapeStation)検定基準	
(1)	Ribosomal RNA(rRNA)のピークが確認される
(2)	低分子のRNAが少ない
(3)	rRNAの割合が他のRNAに比べ十分に高い
(4)	RINが7.0以上 ^{注)}
(5)	ゲノムDNAの混入がない
(6)	NanoDropの測定濃度と著しい乖離がない

表5 Agilent 2100バイオアナライザ(もしくはTapeStation)の検定基準

(1) RNAの分解

(表5)の(1)~(4)の項目を確認します。良好なサンプルの場合、(図14)のように鋭い2本のrRNAシグナルが検出され、それ以外のシグナルはほとんど見られません。(25 ntのシグナルは2100バイオアナライザで使用するマーカーによるものです。)

分解が進行すると(図15)のように低分子域にかけて広範なシグナルが検出され、rRNAのピークが徐々に小さくなります(アガロースゲル電気泳動でスミアなバンドとなる状態)。

完全に分解したサンプルでは(図16)のように低分子域のみでシグナルが検出され、rRNAは検出されません。

また、サンプルによりましては泳動後、RINが算出されずにN/Aと表示される場合があります。その場合は泳動像から分解の程度を判断します。

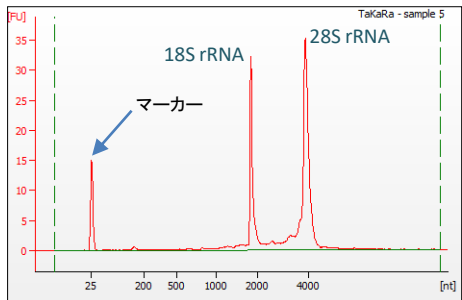


図14 良好なサンプルの泳動例

RIN=10
ほぼrRNAのみが検出される。

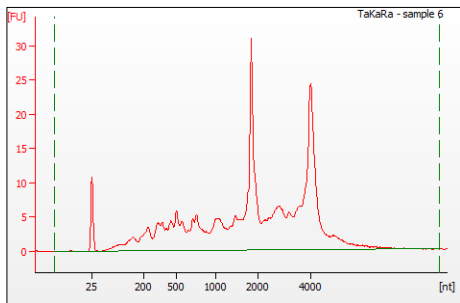


図15 分解傾向にあるサンプルの泳動例

RIN=6.8

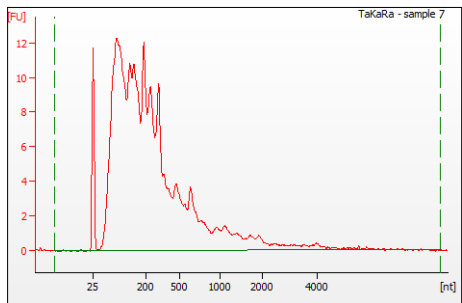


図16 完全に分解したサンプルの泳動例

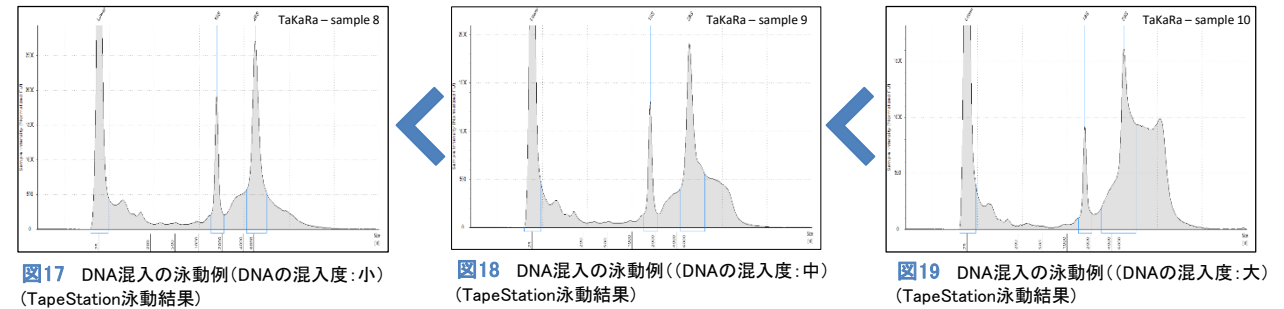
RIN=2.4

(2) ゲノムDNAの混入

DNAの混入があるとRNA濃度にDNAの値が含まれてしまいます。そのため、total RNA量を正確に計算できなくなり、サンプルの反応条件を統一することが難しくなります。

ゲノムDNAは(図17)、(図18)、(図19)のようにrRNAやその分解物とは異なる分子領域、パターンで検出されます。

また、ゲノムDNAの混入量が増加すると、異なる分子領域も増加します。



(3) NanoDrop測定濃度との乖離

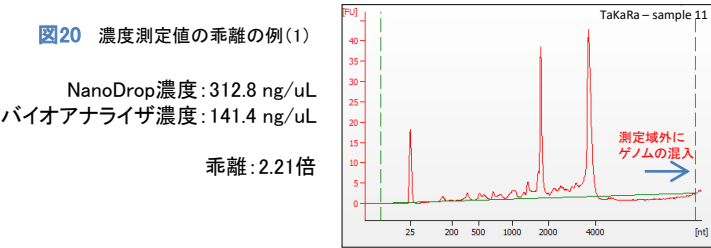
通常、解析に使用するRNA濃度はNanoDropの測定値を採用しています。しかし2種の測定機器の濃度に著しい乖離がある場合はより信頼性が高いと考えられる値を採用します。

乖離の大きくなる例として以下のようなものがあります。

a. バイオアナライザ(もしくはTapeStation)測定域外にDNAがある場合 (図20)

混入したDNAの分子量が大きい場合、DNAがゲル中を上手く泳動されないことがあります。NanoDropでは全核酸を含めた濃度が測定されますが、バイオアナライザ(もし

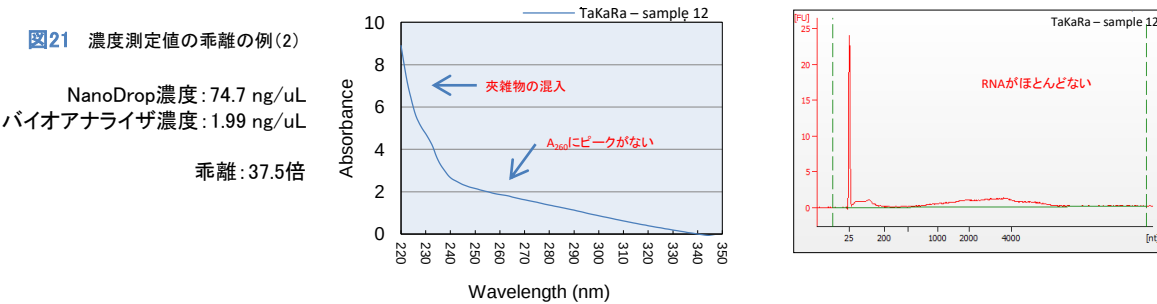
くはTapeStation)は測定域内の分子量のみが濃度として計算されます。そのため、両機器の測定濃度に乖離が発生します。



b. RNA量が少ないが夾雑物の混入が著しい場合 (図21)

A₂₆₀に吸光度ピークがなく、泳動像からもRNAがほとんど含まれていないことが分かります。しかし、夾雑物混入の影響でA₂₆₀の値が引き上げられ、見かけ上RNA濃度があ

る程度高いように算出されてしまいます。検定結果としてバイオアナライザ(もしくはTapeStation)の値を採用します。



よくある質問事項や、解析上問題になる恐れのある注意点を踏まえて本資料を作成しましたが、ご不明な部分があればお気軽にご連絡ください。

—お問合せ先—

タカラバイオ株式会社

受託窓口

TEL:077-567-9262

資料修正日 2021年2月