

サンプル発送前の品質検査について(遺伝子発現解析)

解析するサンプルの品質は、アレイデータに影響する重要なファクターです。サンプルをお送りいただく前に、ご自身で品質チェックを実施されることをお勧めいたします。ここでは、品質チェックの方法とその判断基準についてご紹介いたします。

ご自身で品質チェックを行うことが難しい場合、そのままお送りいただいても構いませんが、弊社の品質検査で基準以下だった場合、サンプルの再送や精製サービスのご利用をお願いする場合がございます。
3回以上の品質検査や、精製サービスは別途料金が発生いたしますので、あらかじめご了承ください。

吸光度測定

RNAの濃度・量の確認

吸光度測定で、RNAの濃度・量を確認します。

表1のサンプル量と濃度について、基準を満たしているか、ご確認ください。

採取が難しい貴重なサンプル等の場合、**表2**に記載された量までスタート量を下げることができます。解析に必要なTotal RNA量は使用するアレイのフォーマットによって異なります。

品質検査は濃度に関わらず5 μ L程度使用しますので、液量は最小でも8 μ L以上をご用意ください。5 μ L使用後に、**表2**のRNA量が残っているようにサンプルを調製してください。

ただし、**表2**は1回のアレイ解析に必要なスタート量の下限量となります。スタート量の異なる同じサンプルのアレイデータを比較すると、スタート量が多い方が検出できるプローブ数は多くなります。比較するサンプル間ではスタート量をそろえることをお勧めいたします。また、試薬やスライドの不具合(サンプル以外の原因)で再解析が必要になった際、無償で再解析を実施しますが、**表1**の推奨基準に満たない微量サンプルの場合、再解析分のサンプルが確保できない恐れがございます。あらかじめご了承ください。RNAが十分にある場合は**表1**の基準を目安にサンプルをご準備ください。

表1 吸光度測定での確認項目(弊社推奨基準)

サンプル量	500ng 以上
濃度	50ng/ μ L 以上
A260/A280	1.8~2.1
A260/A230	2.0以上

表2 解析に必要な最小サンプル量

品質検査(液量)	5 μ L	
アレイ解析 (RNA量)	8 x	10ng
	4 x	25ng
	2 x、1 x	50ng

RNAの純度の確認

吸光度測定で、RNAの純度を確認します。**表1**の吸光度比について、基準を満たしているか、ご確認ください。

サンプルによっては、基準値を下回っていても問題なく解析できる場合もございます。詳しくは後述の**Appendix1**をご覧ください。

主な波長での吸光が示す意味は**表3**をご参照ください。また、吸光度比が問題ない場合でも、260nmの波長の吸光度が多糖類の影響を受ける可能性がございます。そのため、多糖類が混入しない抽出方法でTotal RNAを抽出してください。

純度の高いサンプルの吸光スペクトルは**図1**のような波形になります。230nmに吸収極小、260nmに吸収極大があり、長波長側の吸光度は0で安定しています。

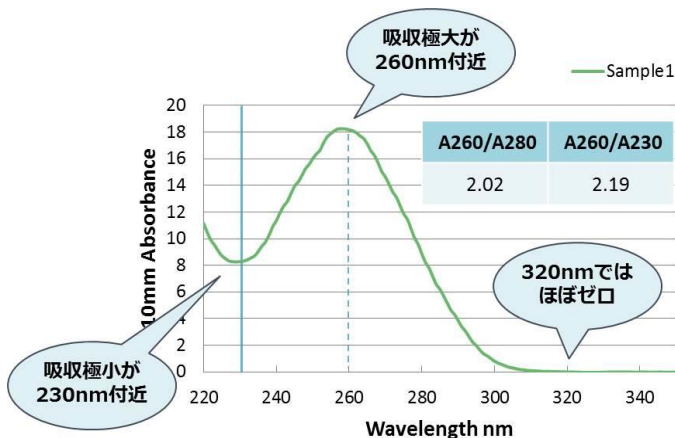


図1 純度の高いサンプルの波形

表3 各波長の吸光が示す意味

A230	グアニジンイソチオシアネートや塩類・糖類、その他有機溶媒などの混入を検出します
A260	核酸の濃度を測定します ※多糖類の吸光に影響を受けることがあります
A280	タンパク質・フェノールの混入を検出します
A320	異常な吸収がないかチェックします

図2はA260/A230の比が基準値以下のサンプルの例です。この場合、有機溶媒や塩類・糖類などの230nm付近の波長に吸収を持つバッファーが混入している可能性が高く、ラベリングの際に酵素反応が阻害される恐れがあります。

図3はA260/A280の比が基準値以下のサンプルの例です。この場合、タンパク質やフェノールなど、280nm付近の波長に吸収を持つ物質の混入が考えられます。ラベリングの際に酵素反応が阻害される恐れがあるほか、280nmの吸光が260nmの吸光度に影響し、核酸が正しく定量できない可能性があります。

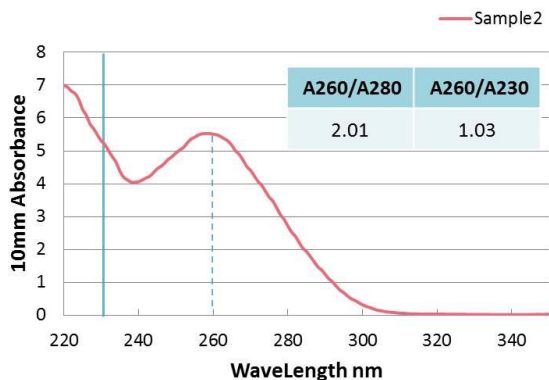


図2 A260/A230が低い波形

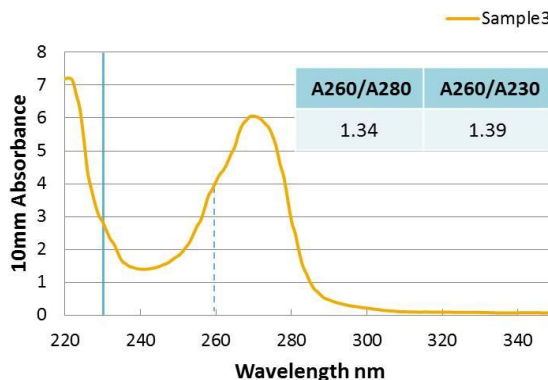


図3 A260/A280が低い波形

A260/A230、A260/A280が基準以下だった場合は、Appendix1を参照し、必要に応じてRNA精製を実施してください。

Appendix1：吸光度比が基準以下でも問題ない場合

次の①、②のいずれかに該当するサンプルの場合は、吸光度比が基準値を下回っていても、吸光スペクトルに大きな変化がなければ問題なく解析に使用することができます。

①カラム抽出由来、またはカラム精製済のサンプル

サンプルによっては、サンプル由来の原因でA260/A280、A260/A230が低くなる場合がございます。純度が低い原因が、混入物によるものか、サンプル由来かは、測定値から判断することはできませんので、弊社ではスピнкаラムの使用の有無についてお伺いしております。カラムを通したサンプルの場合、溶媒が置換されておりますので、バッファー等の残存の可能性が低いと考えられます。

②濃度が薄いサンプル

濃度が薄いサンプルの場合、測定値が装置の検出限界に近くなり、260nmのピークと280nmのスロープがバックグラウンドとほとんど差がなくなるため、正確な吸光度が測定できていないと考えられます。(図4)

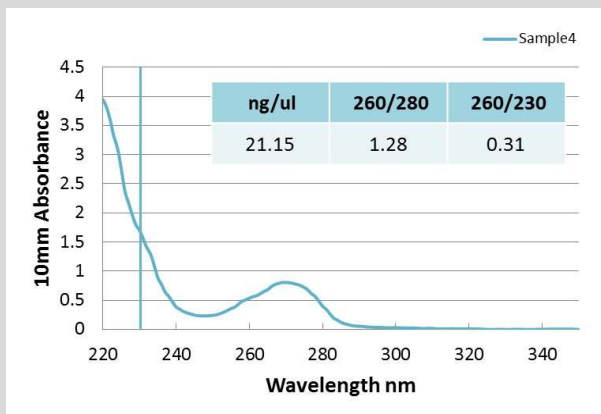


図4 濃度が薄いサンプルの波形

RNAの分解度合の確認

電気泳動(またはバイオアナライザ(Agilent Technologies))で、RNAの分解度合を確認します。
RIN はバイオアナライザで測定される、RNAの分解度合いを表す指標です。分解が見られない状態が10で、分解の進行に応じて1~10に分類されます。□

分解のないサンプルの場合、**図5**の泳動像のように、rRNAの2本のピーク(バンド)が明瞭で、それ以外の領域にはほとんどRNAは検出されません。

分解が進むと**図6**の泳動像のように、2つのピークの間や、低分子の領域に核酸の分解物が検出され、rRNAのピークが小さくなります。

完全に分解すると、**図7**の泳動像のようにrRNAのピークが確認できなくなります。

遺伝子発現アレイの場合、分解が進んだサンプルを解析すると偽陽性が多くなることが判明しております。
また、ラベリングの際、オリゴdTプライマーを使用して逆転写・増幅するため、分解度合が強いサンプルではラベリングされない恐れがあります。

弊社では**RIN = 7 以上**を推奨しておりますので、バイオアナライザでの測定が可能な場合、RIN = 7 以上を基準にサンプルをご用意ください。

RNAの分解は精製によって品質を回復することができませんので、分解が見られた場合はサンプルの調製からやり直す必要があります。

サンプルが無いなど、再調製が不可能な場合は、基準以下でも解析を承ることは可能ですが、アレイ結果に影響が出る可能性について予めご了承ください。

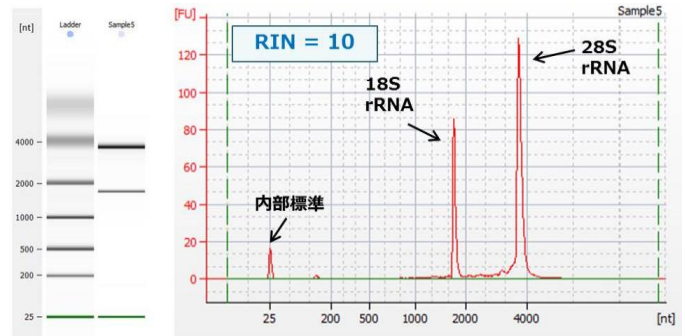


図5 分解のないサンプルの泳動例

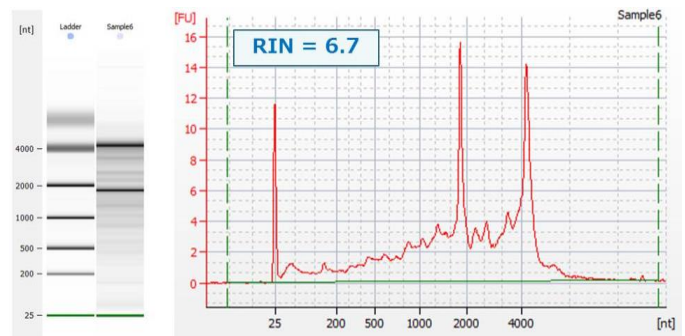


図6 分解が進んだサンプルの泳動例

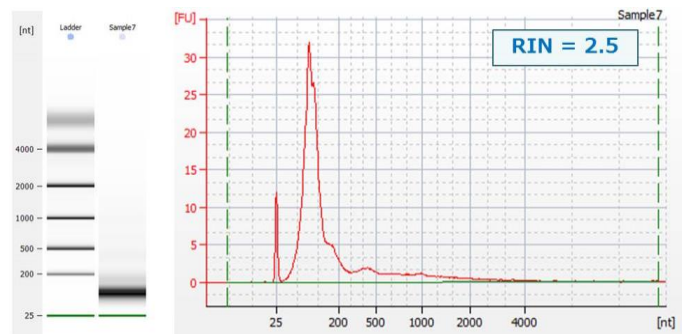


図7 完全に分解したサンプルの泳動例

Appendix2 : 哺乳類以外のサンプルについて

哺乳類以外のサンプルの場合、rRNAのサイズや泳動パターンが異なります。(図8、図9)

この場合はバイオアナライザのRIN値が指標にならないケースが多いため、rRNAのピークが明瞭で、他の領域に検出される核酸が少ないことを確認してください。

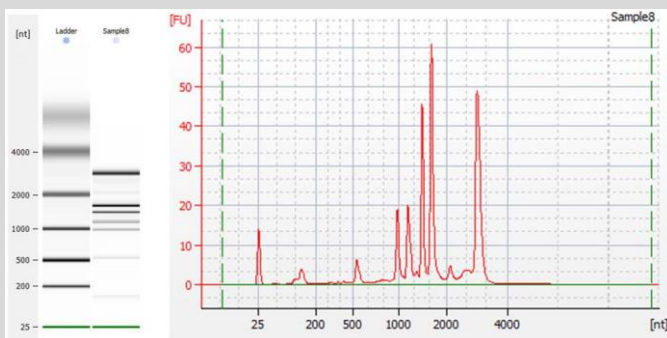


図8 植物で分解のないサンプルの泳動例

光合成組織ではオルガネラのrRNAが豊富に含まれるため、28S/18Sの他にもピークが検出される

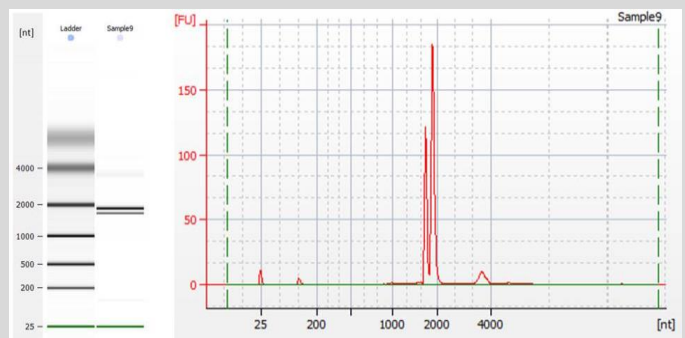


図9 昆虫で分解のないサンプルの泳動例

昆虫の28S rRNAはmaturationの段階でhidden breakが起こり、18S付近のサイズに切断されている

DNAの混入の有無の確認

電気泳動(またはバイオアナライザ(Agilent Technologies))で、DNAの混入の有無を確認します。
DNAの混入がある場合、**図10**上図や、**図11**のように、rRNAとは異なる領域にシグナルが検出されます。

このようなサンプルでは、吸光度測定により算出した濃度にDNAの濃度が含まれてしまうため、Total RNAの量を正確に測定できていない可能性が高くなります。

DNAの混入を調べるには、Qubit(invitrogen)などのターゲット特異な蛍光光度計での測定も有効です。
UV測定 of 波形に問題がないのに、UV測定で算出された濃度と蛍光光度計での濃度に乖離がある場合はDNAの混入の可能性が考えられます。

DNAの混入が疑われる場合は、DNase処理を実施されることをお勧めします。

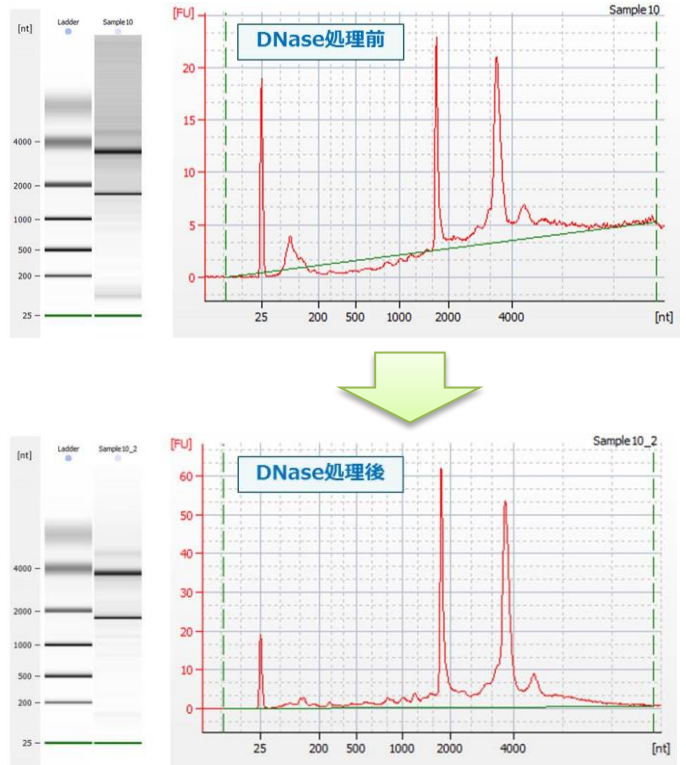


図10 DNAが混入したサンプルの泳動像(上図)と、DNase処理後の泳動パターンの変化(下図)

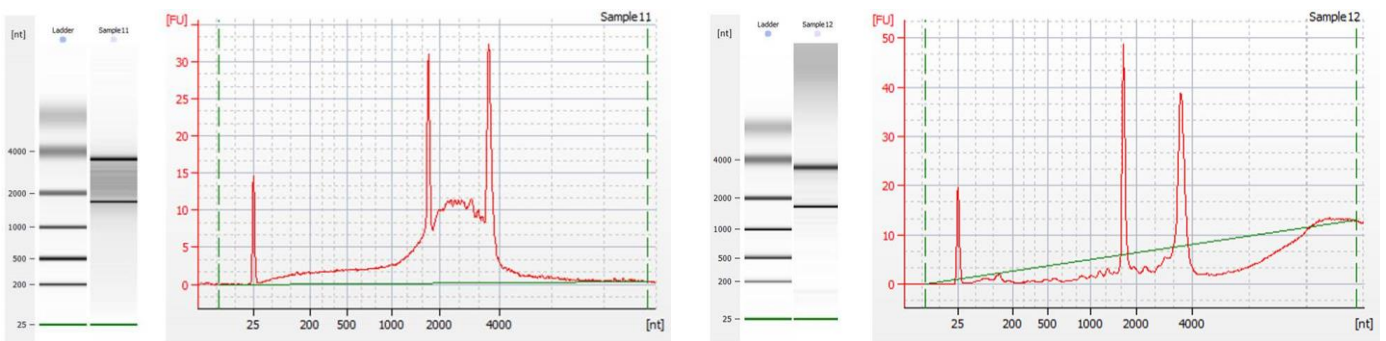


図11 さまざまなDNA混入サンプルの泳動パターン例