

サンプル発送前の品質検査について(miRNA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。

必要なサンプル量は表2をご参照ください。

品質検査は濃度に関わらず5μL程度使用しますので、液量は最小でも8μL以上をご用意ください。5μL使用後に、100ng以上RNA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、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/μL 以上
A260/A280	1.8~2.1
A260/A230	2.0以上

表2 解析に必要なサンプル量

品質検査(液量)	5μL
アレイ解析(RNA量)	100ng

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。

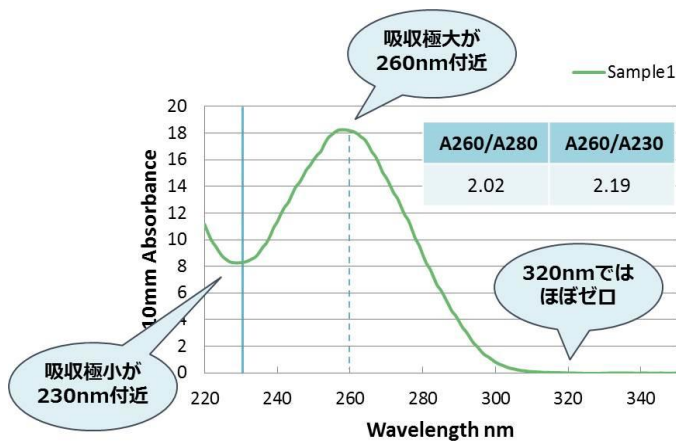


図1 純度が高いサンプルの波形

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。

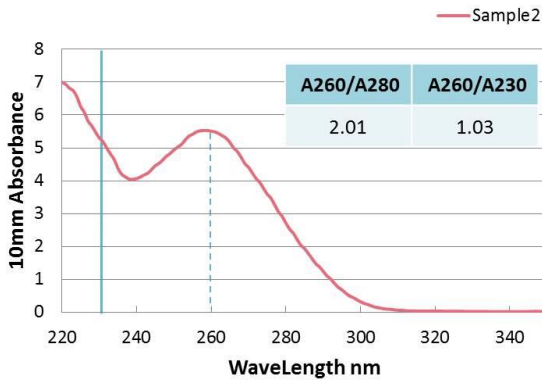


図2 A260/A230が低い波形

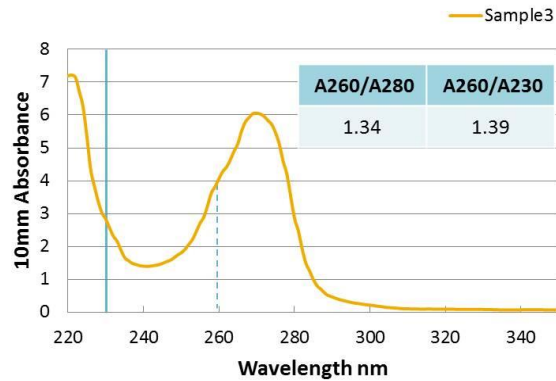


図3 A260/A280が低い波形

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)

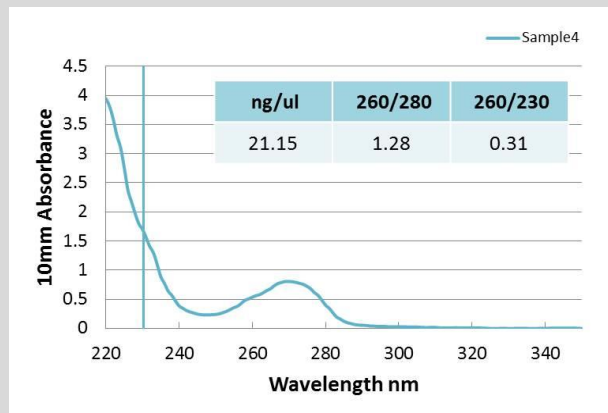


図4 濃度が薄いサンプルの波形

RNAの分解について

miRNA解析では、RNAの分解はアレイ結果にほとんど影響しないことが判明しておりますので、分解について考慮する必要はありません。ただし、同一サンプルで遺伝子発現解析も実施される場合はRIN = 7 以上を推奨しておりますので、そちらに合わせてサンプルをご準備ください。詳しくは遺伝子発現解析用の注文書に付属の本項をご覧ください。

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5**上図や、**図6**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測定の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。

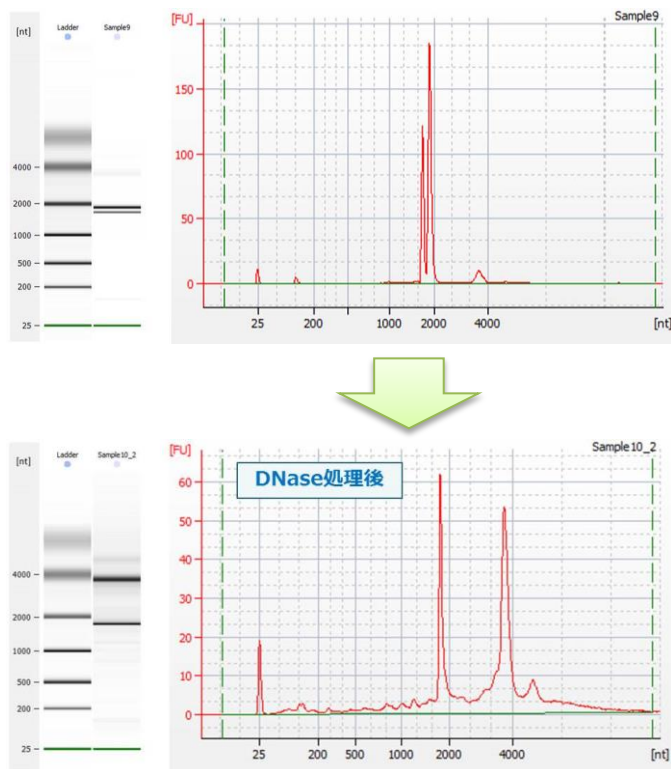


図5 DNAが混入したサンプルの泳動像(上図)と、DNase処理後の泳動パターンの変化(下図)

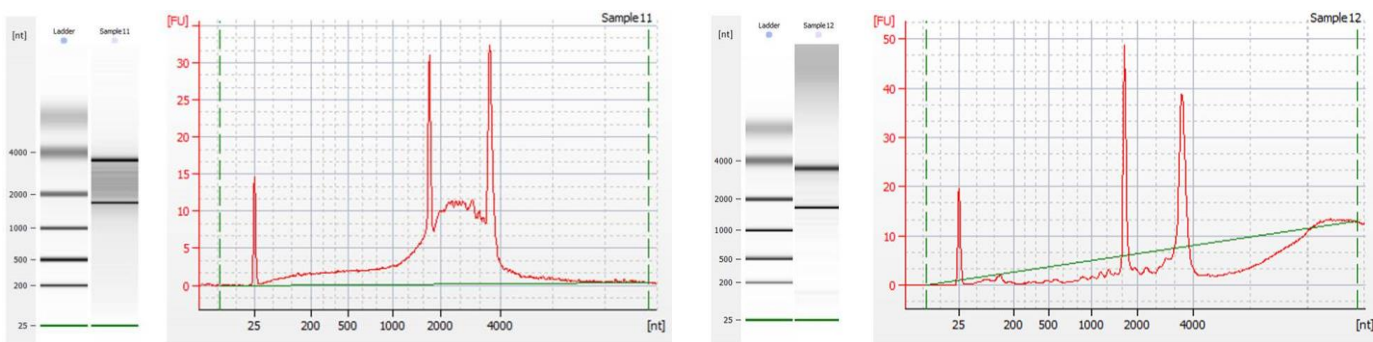


図6 さまざまなDNA混入サンプルの泳動パターンの例