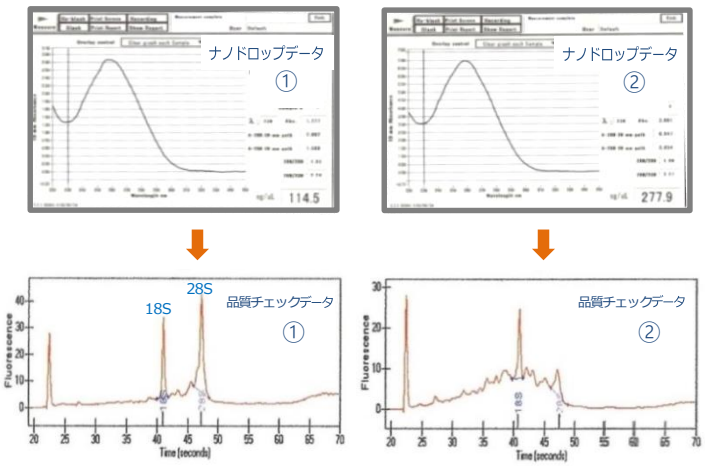
RNA 品質チェック

RNA サンプル、分解していませんか？

RT-qPCR、RNA-Seq 解析、マイクロアレイによる遺伝子発現解析等には分解されていない RNA が必要不可欠です。
吸光光度計で RNA の品質確認をしている方も多いようですが、吸光光度計で OD_{260} のピークがきれいに検出されていても RNA の分解が起きていることがあります。（左下図参照）
信頼性・再現性の高いデータを出すためには、RNA の品質チェックを行うことが必要です。

Total RNA の分解度合いの確認

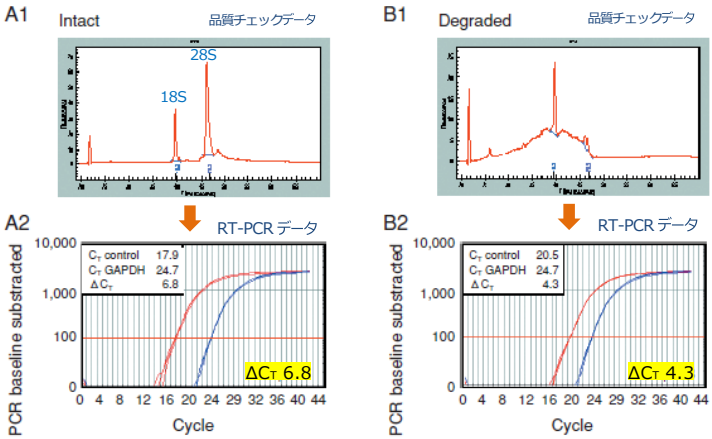
吸光度の測定では、タンパク質や試薬などのコンタミをチェックすることはできますが、RNA の分解の度合いを確認することはできません。



<RNA が保存されている状態>　　<RNA が分解している状態>

RNA の品質がリアルタイム PCR に与える影響

リアルタイム PCR を用いた遺伝子発現解析では、抽出された RNA の量と質が実験の再現性に大きな影響を与えます。RNA サンプルに問題があると、最悪の場合には間違った結論が導き出される可能性があります。



サンプル RNA が分解しているだけで、得られる相対定量値に大きな影響を与えます。

2006 9-10 バイオテクノロジージャーナルより

RNA 品質チェック

Total RNA サンプルを電気泳動し、18S rRNA と 28S rRNA のピーク比から RNA の分解度を確認することができます。
Total RNA サンプル中の 18S rRNA と 28S rRNA は上図のようなピークで検出されます。細胞内で 18S rRNA と 28S rRNA の比は 1：1 ですが、大きさの比は 1：2 であるため、完全な RNA サンプルでは 1：2 に近いピーク比で検出されます。

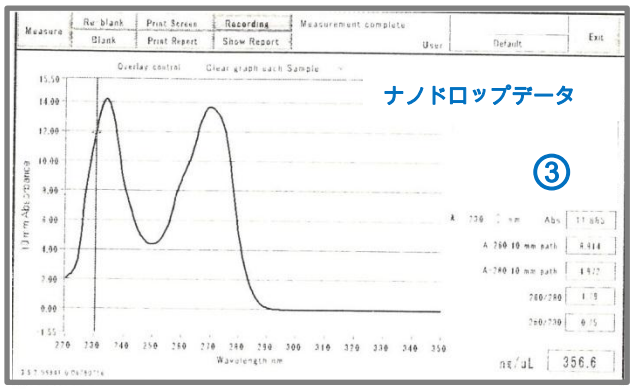
リアルタイム PCR のガイドラインである **MIQE ガイドライン**では、RNA Integrity（RNA の完全性）と RQI（RNA Quality Indicator）の記載が不可欠情報と指定されています。
分光光度計では純度が測定されても、その RNA が分解しているか否かは電気泳動でないと確認できません。そして、RNA の完全性（品質）は RT-qPCR 実験では不可欠情報として扱われるほどに重要なファクターです。

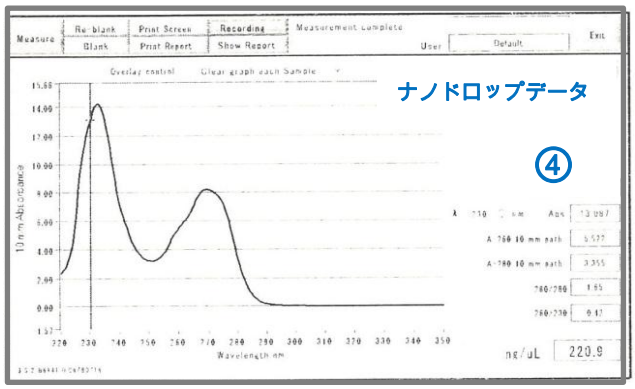
◇RNA 抽出時に試薬類が残っていませんか？

RNA 抽出時に抽出試薬（フェノール試薬等）が残っている場合には、吸光光度計･ Experion（RNA 品質チェック）どちらのデータにおいても影響があります。（下図参照）

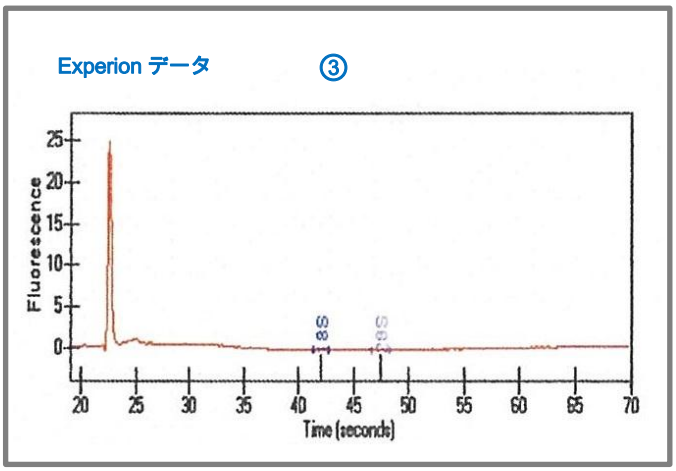
＜試薬類が残っている場合のデータ＞

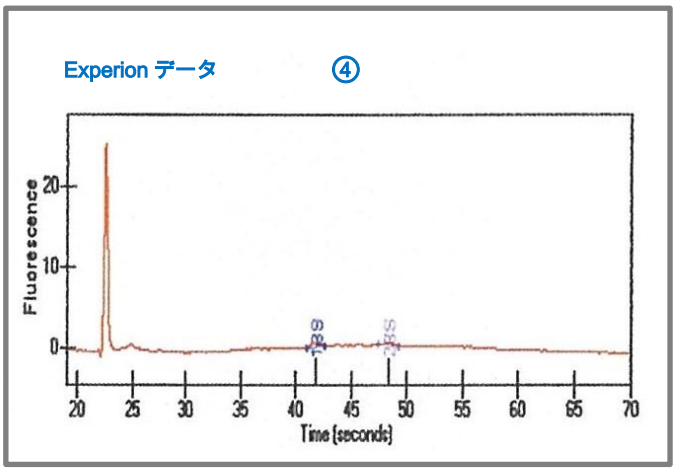
●吸光光度計ではピークが OD_{260} からずれて検出されます。



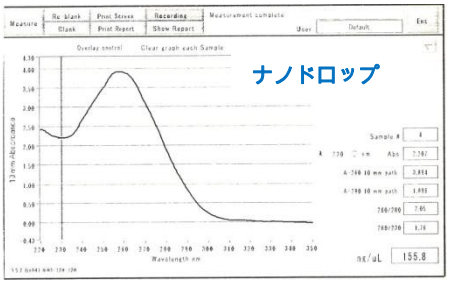


●Experion（RNA 品質チェック）では 18S rRNA,28S rRNA のピークが検出されていません。

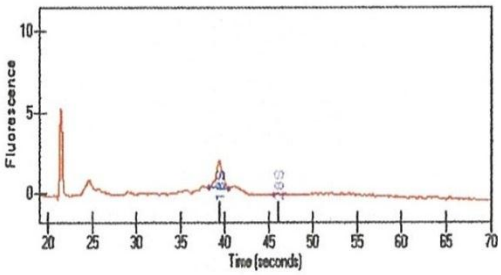




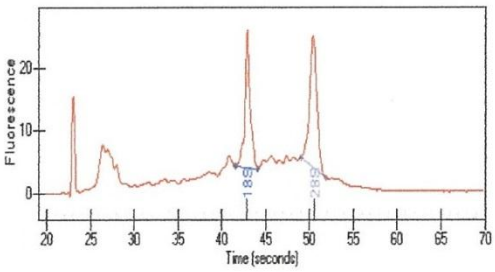
◇RNA 抽出時、クロロホルム処理 1 回のみの場合、不純物の影響で 18S rRNA,28S rRNA のピークが出ない事があります。同じサンプルを用いてクロロホルム処理をもう一度行うと不純物が取り除かれ 18S rRNA,28S rRNA のピークが検出されました。（プロトコールは下記参照）



クロロホルム処理 1 回



クロロホルム処理 2 回



* RNA 抽出法の例

重要ポイント

1. 組織を取り出して液体窒素、RNA Later につけるまでは迅速に行う
2. ホモジナイズの時間は組織により異なるが、2～5 秒が理想（できるだけ短い時間で）
3. フェノール試薬の入ったキットを使用する場合はクロロフォルム処理を 2 回行う

（ISOGEN を使用した例）　　★赤点線の部分が追加操作

1）サンプル（50～100 ㎎組織、5～10×10^6 細胞を 2ml の丸底エッペチューブに入れたもの）に ISOGEN　1ml を加え、ホモジナイズ * を行う（ホモジナイズ処理は組織によって異なる。処理強度、処理時間）

* ホモジナイザーはハンディータイプ（Polytron PT1200E）使用

液体窒素に入った組織：溶けない内に ISOGEN 溶液を入れる

RNA Later づけの組織：できるだけ RNA Later 溶液を取り除き、ISOGEN 溶液を入れる

2）ホモジナイズ処理後、室温　5 分静置

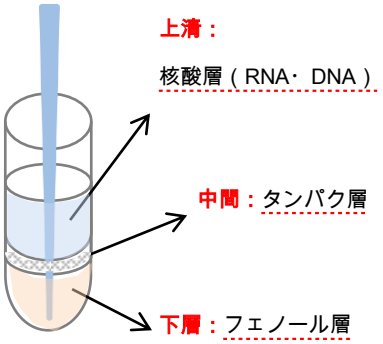
3）クロロホルムを 200 μℓ（ISOGEN の 0.2volume）入れ、ロッキングモーションで 15 秒間十分に撹拌
（クロロホルムの量でできる層が逆になることもあるので注意）

4）室温　2～3 分静置

5）遠心操作　12,000Xg 10 分　4℃

6）下層（フェノール層）を取り捨てる

（下層のフェノール層が少し残る程度まで取る）

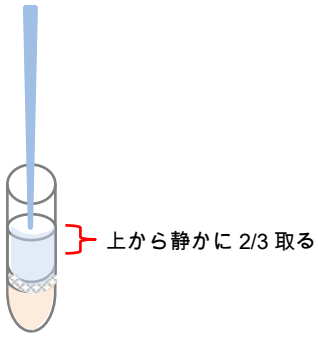


7）クロロホルムを 200 μℓ（1 回目と等量）入れロッキングモーションで撹拌

8）遠心操作　12,000Xg　10 分　4℃

9）上清に 3 等分の印をつけ、上から 2/3 を新しいエッペンドルフチューブに移す

（タンパク層より上の残りの 1/3 に染色体が含まれている可能性がある）



10）イソプロパノール 500 μℓ（または水層の 0.8volume）を入れ、十分に振盪撹拌

11）室温　5～10 分（氷中 20～30 分でもよい）静置

12）遠心操作　12,000Xg 10 分　4℃

13）沈殿を吸わないように上清を取り除く

14）フレッシュな 70%エタノールを 1ml 入れる

15）遠心操作　12,000Xg　5 分　4℃

16）沈殿を吸わないように上清を取り除く（上清を残さないよう十分に吸い取る）

17）室温 2 分乾燥後（アルコールの匂いがしなければよい）、氷中に置く

18）dH_2O または TE（pH8.0）をペレットの量に合わせて適量（約 30 μℓ）入れる

19）氷中　5 分以上静置後、タッピングし、溶解する

20）OD_{260} 測定