

《forum in FORUM》

Agilent バイオアナライザー2100 の紹介

理工学研究科博士前期課程生体制御コース 石田 泰大

科学分析支援センター 畠山 晋

ゲノム情報が続々と開示される近年の動きに伴い、生命科学の研究分野はポストゲノムと呼ばれる時代に入り、網羅的かつ精細な分析技術が必要となってきた。遺伝子の発現解析に関しては、20 世紀の終わりまでは DNA プローブによる mRNA の検出(ノザン解析)が主流であったが、21 世紀に入り、リアルタイム PCR による遺伝子発現の定量的な解析、あるいはマイクロアレイによる特定の条件下の遺伝子発現の網羅的解析が主流となってきた。これらの解析技術は日々著しく進歩しており、操作性・検出感度がともに格段に上昇している。然るにこれらの二つの解析技術において最も肝要であることは、解析対象の RNA の品質が十分に高いことである。言うまでもなく、RNA を研究対象サンプルから抽出するには、細心の注意を払う必要があり、遺伝子発現を研究する者たちは、神経をすり減らして RNA を破壊する因子(汗、唾液、etc)を排除しながら抽出作業を行なう。その苦勞が果たして報われ、十分に高い品質の RNA が抽出できたであろうか？その問いに答えることができるのが、Agilent 社の「バイオアナライザー 2100」(Fig.1)である。品質の低い RNA を上記の解析に用いたとき、例えばリアルタイム PCR のように mRNA を1コピーから検出できる感度をもった解析では、分析対象の mRNA の分解は致命的である。またマイクロアレイ解析においては低発現している遺伝子が分解を受けることで、この遺伝子発現を見逃す可能性が高くなる。生命現象の鍵を握っている遺伝子は低発現量が低いという事実も鑑みると、RNA の品質を検定する意義が十分理解できるであろう。



Fig.1 Agilent バイオアナライザー2100

1. 従来法との比較

RNA の品質を検定するには、従来はホルマリンを含むアガロースによって RNA を電気泳動により分離し、臭化エチジウムにより染色されるリボソーム RNA の濃度(18S:28S rRNA が概ね 1:2 であること)、およびこれらのバンドのシャープさ、の 2 点において、RNA がどの程度「分解を受けずに」抽出されているかを、主観的に評価していた。

バイオアナライザー2100 による RNA の検定の原理は従来法に同じく電気泳動を基本にしている。解析に用いるマイクロチップ(Fig.2)の、非常に狭い流路に充填されたゲルを用いた電気泳動によってサンプル RNA が分離される。アプライ前に蛍光標識した RNA の分離状態は、流路に保持される時間に対する蛍光強度のクロマトグラムとして得られる。従来法との大きな違いは次の 2 点である。1)得られたクロマトグラムを元にサンプル間の品質の客観的な評価が出来る点、2)解析サンプルの全 RNA 量が、従来法が 10 μ g であるのに対して、バイオアナライザー2100 では最少 50 pg が解析可能(使用キットに依存)、である。なお、本機器の全 RNA の分析スピードは 12 サンプルあたり 30 分である。



Fig.2 マイクロチップ(全 RNA 解析用)

2. 分析例-アカパンカビの全 RNA の解析例

アカパンカビ (*Neurospora crassa*) を液体培養し、菌糸をガラスビーズにて破碎し、塩化リチウム法によって RNA を抽出した。分光光度計により全 RNA を定量し、「RNA6000 ナノキット」によって 300 ng (1 μ l) を分析した。

上記のキットを用いてバイオアナライザー2100 によって解析すると、HPLC のようなクロマトグラム (Fig.3A, 3C) が得られる。これは近似的に電気泳動図にも変換可能である (Fig.3B, 3D)。Fig.3 のサンプルは異なる二人の実験者が抽出した RNA を示している。上段と下段のサンプルを比較すると、下段のサンプルは明らかに RNA の分解を示すピークが多数出現してしまっている。よって、下段のサンプルの品質は低いということが、主観的にも判断される。

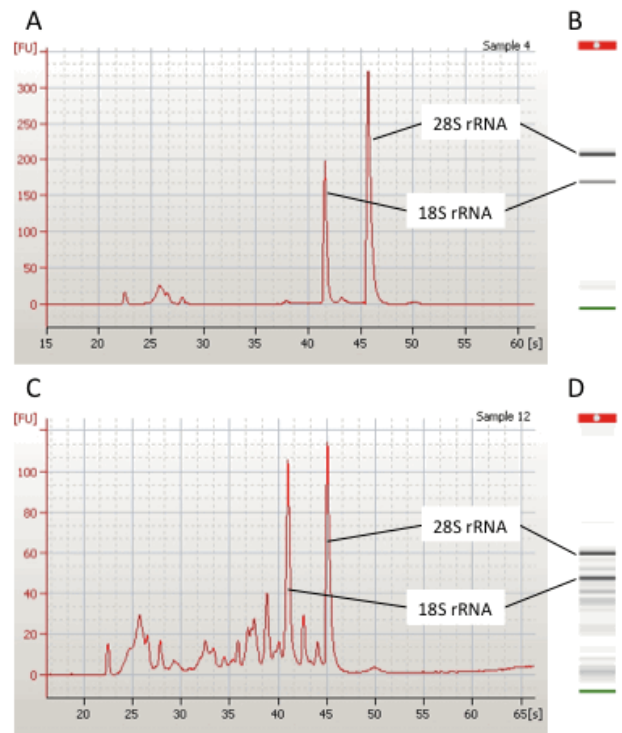


Fig.3 全 RNA 解析結果(アカパンカビ RNA)

3. RIN (RNA Integrity Number)

全 RNA の品質を客観的に評価するために、RIN というツールが用意されている。これは、解析サンプルに対する理想的なクロマトグラムを 8 点のピークについて比較し、それを数値化するアルゴリズムである。十分に高い RNA の品質を 10 とする。Fig.3 のサンプルでは上段のサンプルの RIN 値は 9.3 であったので十分に高い品質であると言える。

4. バイオアナライザー2100 のその他のアプリケーション

本機器は、これまで記述した様に RNA の品質解析において優れた性能を有している。本機器は基本原理がゲル電気泳動であることから、RNA の他に、DNA、タンパク質の解析も高精度で行なう事ができる。特にタンパク質の解析は銀染色レベルの精度があり、一般的な SDS ポリアクリルアミド電気泳動と銀染色の作業性とかかる時間を考慮しても、この機器は精度とスピードにおいて有効である。