

Q&A No.4

質問 : DNA 量測定の際に行う RNase 処理の効果判定について

DNA 量測定の際、RNase が十分に効いていることを証明する方法はありますか。ガイドライン記載の細胞数と RNase 量、処置時間をいつも信用してよろしいのでしょうか。

回答 :

信頼できる市販品で適切に管理保存・使用されたものであれば、ガイドラインの記載の通りで、まずは大丈夫です。しかし、理想的には RNase が効いているかどうかをチェックするのが望ましいです。その方法は、RNase 処理を施さない検体をコントロールとして測定することです。コントロールに比べて、RNase 処理を施した検体の方が G1 ピークのチャンネル数や CV が小さければ効果があったと判定します。なお、細胞や細胞分散法によっては、RNA の少ないものもあるかもしれません。例えば、界面活性剤で裸核状にした細胞では RNA は少ないです。また、長く保存した細胞では RNA が自然に消化されている可能性もあります。このような検体では両者に差があまりないかもしれませんので、ご注意ください。

また、RNA 処理時間に関してもガイドラインに示す範囲(室温 30 分など)で一応、十分だと思います。しかし、これもチェックするのが望ましいです。その方法は、RNase 処理開始直後から経時的に(数分毎に)、G1 ピークのチャンネル数や CV を測定することです。いずれもが次第に小さくなり、一定時間が経つと殆ど変化しなくなる(安定してくる)と思います。安定まで時間が必要最低限の処理時間と考えられます。

回答者からの補足説明 :

DNA 量をより正確に測定するために、RNase 試薬の中に含まれる微量の DNase の不活化を行うことがあります。RNase 容液を 5 分間沸騰させるだけで DNase は不活化します。DNase を含まない purified RNase は高価です。但し、実験の目的によりますが、多くの施設で、DNase 不活化はあまり行われていないようです。