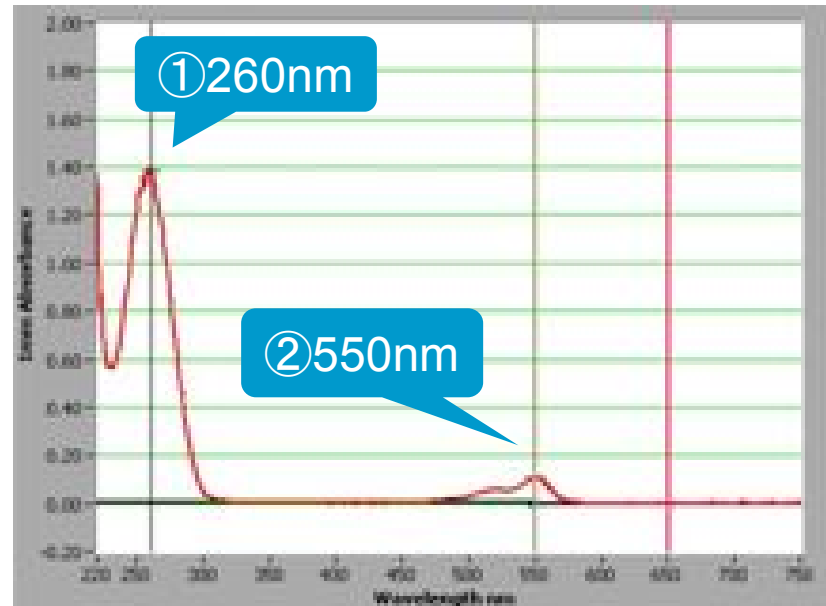


ラベル化cRNAの品質確認

-吸光度測定による収量・取込率の確認

測定が必要な波長(Cy3の例):



① **A260** RNAの濃度測定
1 = 40 ug/mL (RNA)

② **A550** Cy3の濃度測定
(1色法・2色法の場合)

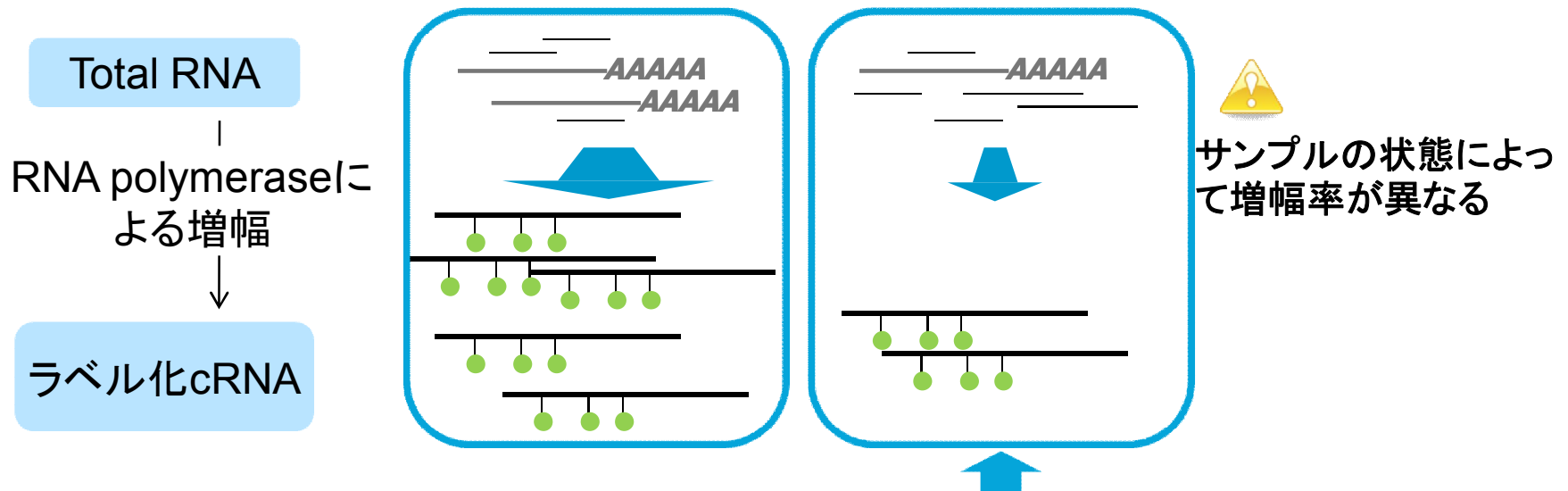
A650 Cy5の濃度測定
(2色法の場合)



ラベル化cRNAの品質確認

-吸光度測定による収量の確認

収量とは ➡ 増幅の結果得られたラベル化cRNAの量(ug)



収量が低くなる原因

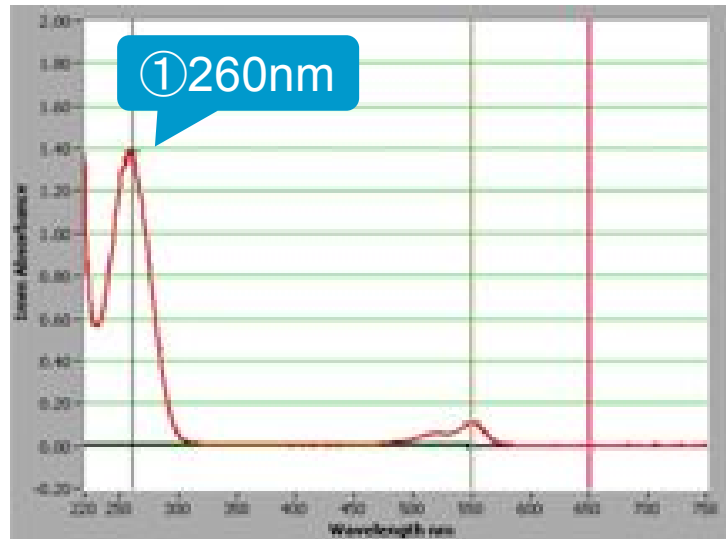
- ・酵素反応の阻害物質が混入している
- ・Total RNA中のmRNAが少ない
- ・RNAがひどく分解している...

➡ cRNAの濃度測定を行い、RNAの収量(ug)を計算



Agilent Technologies

ラベル化cRNAの品質確認 -収量の計算と基準値

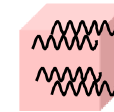


■ cRNA濃度(ug/mL): $A_{260} \times 40$

■ 収量(ug): $\text{cRNA濃度(ug/uL)} \times \text{液量(uL)}$

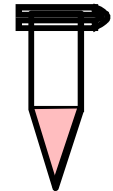
収量 =
cRNA全量

=



溶液1 mL中の
cRNAの量

×



cRNA溶液の量

収量の基準値(1色法の場合)

マイクロアレイフォーマット	収量(ug)
1 パック (1x244K, 1x1M)	5
2 パック (2x105K, 2x400K)	3.75
4 パック (4x44K, 4x180K)	1.65
8 パック (8x15K, 8x60K)	0.825



cRNA溶液の量は、使用した
精製キットによって異なります

- ・ RNeasy mini kit ... 30 uL
- ・ Absolutely RNA Nanoprep ... 20 uL



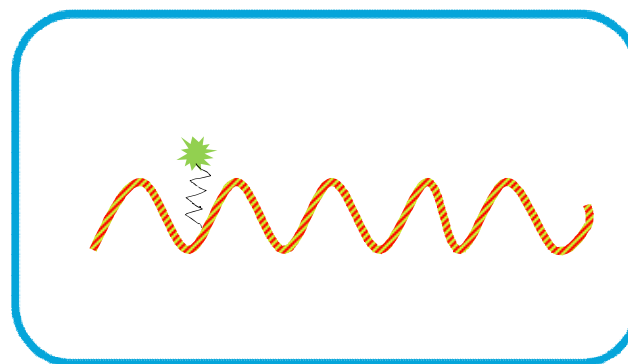
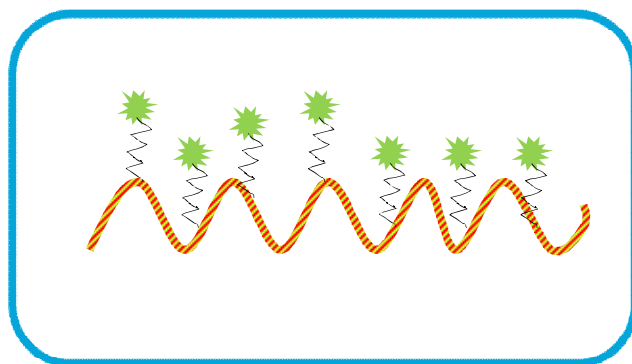
Agilent Technologies

Page3

ラベル化cRNAの品質確認

-吸光度測定による取込率の確認

取込率とは ➡ cRNA1 ug中に取り込まれた色素の量 (pmol/ug)



同じ量のcRNAが合成できても、色素が取り込まれていなければ十分なアレイのシグナルが得られない

取込率が低くなる原因

- ・色素が退色/劣化している
- ・NTP mixが劣化している
- ・RNAがひどく分解している...

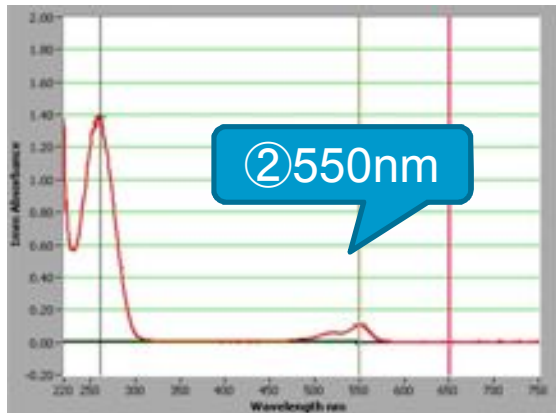
➡ 色素の濃度測定(pmol/uL)を行い、色素の取込率(pmol/ug)を計算



ラベル化cRNAの品質確認

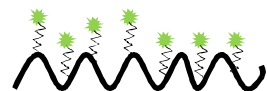
-取込率の計算と基準値

■ 色素濃度(pmol/uL): $A_{550} \times 1000 \div 150 \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Cy3の場合)
 : $A_{650} \times 1000 \div 250 \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Cy5の場合)



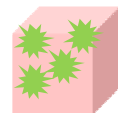
150mM⁻¹cm⁻¹ : Cy3のモル吸光係数
 250mM⁻¹cm⁻¹ : Cy5のモル吸光係数
 光路長1cmの吸光度計でCy3またはCy5 1mMを測定した時の吸光度

■ 取込率(pmol/ug): 色素濃度(pmol/uL) ÷ RNA濃度(ug/uL)



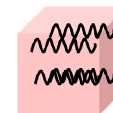
cRNA1ug中の色素の量

=



溶液1uL中の色素の量

÷



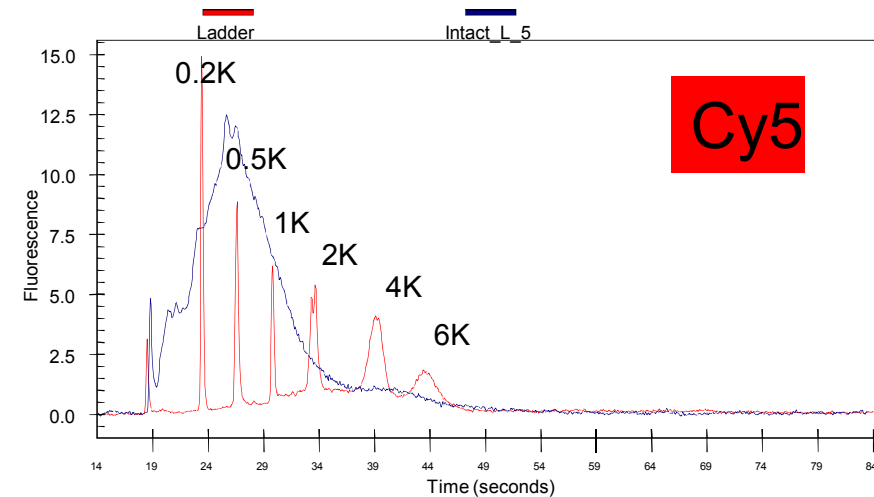
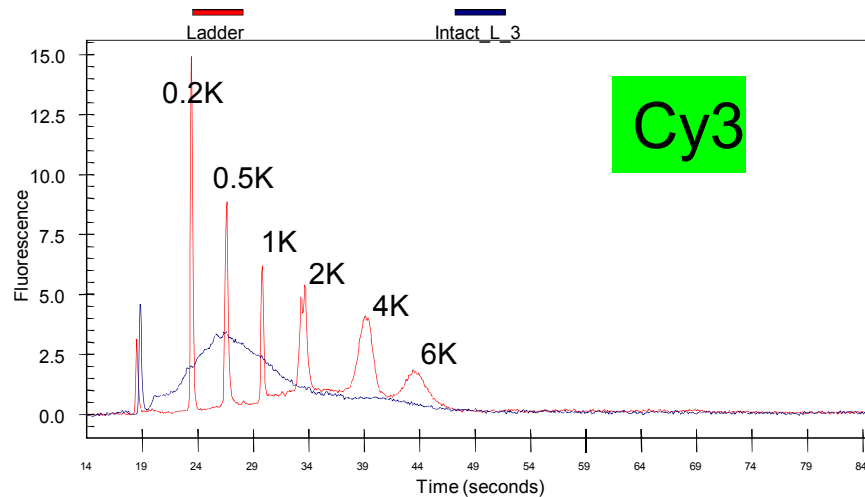
溶液1uL中のcRNAの量

取込率の基準値

	1色法	2色法
Low Input Quick Amp Labeling Kit	6pmol/ug	6pmol/ug
Quick Amp Labeling Kit	9pmol/ug	8pmol/ug

ラベル化cRNAの品質確認

-電気泳動による長さの確認



2色法の場合の注意

: バイオアナライザは核酸を蛍光色素によって検出します。

検出に使用する蛍光色素の励起・蛍光波長がCy5の励起・吸光波長と近い
ため、Cy5もバイオアナライザによって検出されるため、
Cy5標識cRNAはバイオアナライザで定量できません

長さの基準値

大部分が200～2000baseである



Agilent Technologies