

核酸 (DNA・RNA) の定量法

——吸光分析法と蛍光分析法を中心に——

柴山 祥枝

1 はじめに

核酸 (DNA や RNA) はウイルスを含むすべての生物の遺伝情報を担う物質であり、近年、技術の進歩や社会的なニーズの増大に伴い様々な分野で定量が行われるようになってきた。特に、食品分野、環境分野、医療分野においては核酸の定量がルーチンワークになっていると言っても過言ではない。食品分野においては、品種判別や肉種判定、食品中に混入した食中毒原因菌の検出、遺伝子組換え作物 (GMO) の検出等が核酸の定性・定量を通して行われている。環境分野においては、環境中微生物の分布や動態観察に核酸が用いられている。医療分野においては、病原菌の検出に使用される程度であったが、2006 年以降、遺伝子関連検査として 84 種が保険収載されたこともあり、病気の診断のための核酸の定性・定量が爆発的に増加している。このような背景から、核酸定量の重要性は日々高まっている。本稿では、まず基本的な核酸の構造および核酸定量法の紹介を行う。そして、核酸定量法の中でも特に一般的に使用される吸光分析法を用いた方法と蛍光色素を用いた方法について述べる。

2 核酸の構造

核酸には大きく分けて二つの種類があり、それぞれデオキシリボ核酸 (deoxyribo nucleic acid, DNA)、リボ核酸 (ribo nucleic acid, RNA) と呼ばれている。核酸は、核酸塩基、糖、リン酸基から成るヌクレオチドを構成単位 (モノマー) とする重合体である。結合する糖の種類によって DNA 又は RNA が区別されており、DNA ではデオキシリボースが、RNA ではリボースが結合している (図 1)。

図 1(a) および (b) は DNA と RNA のモノマーの一つである、デオキシアデノシン-リン酸とアデノシン-リン酸を、それぞれ示している。これらの物質の違いは、糖の 2 位の炭素に結合しているヒドロキシル基の

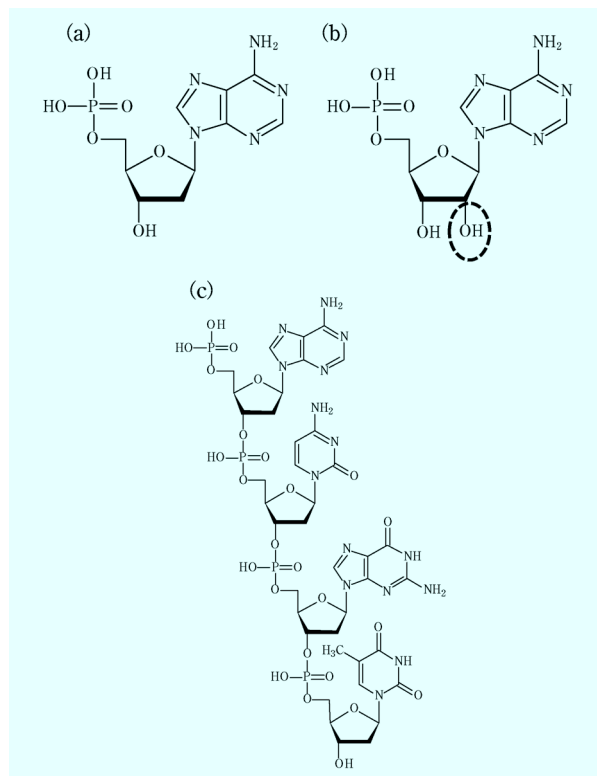


図 1 核酸の構造；(a) DNA のモノマー、(b) RNA のモノマー (DNA のモノマーとの違いを○で囲った)、(c) DNA の構造

有無 (図中の点丸) である。また、DNA や RNA はリン酸ジエステル結合により重合し、ポリマー構造中では糖とリン酸基が核酸の構造を作る骨格的な役割を果たしている (図 1(c))。

DNA と RNA では結合する核酸塩基の種類も異なっている。DNA、RNA とともに構造中に 4 種類の核酸塩基が含まれているが、DNA ではアデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、チミン (T) が、RNA ではチミンの代わりにウラシル (U) で構成されている (図 2)。

3 核酸の定量法の概観

核酸の定量法には様々な手法があり、核酸の構造や物理化学的性質を利用した定量が行われている。一般的な核酸定量法としてなじみ深い吸光分析法や蛍光試薬を用

Analysis of Proteins, Nucleic Acids, and Genes—The Quantification Methods of Nucleic Acid: Focusing on Spectrophotometry and Fluorescence Spectroscopy.

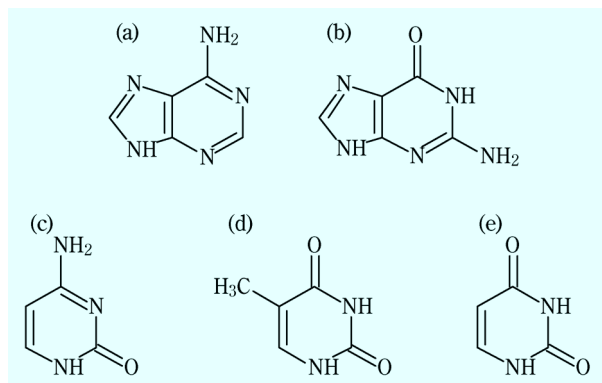


図2 核酸塩基の構造式；(a)アデニン，(b)グアニン，(c)シトシン，(d)チミン，(e)ウラシル

いた蛍光分析法（本稿では単に蛍光分析法と記す），ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction, PCR）を使用した手法のほか，精確な核酸の定量が可能な核酸のモノマー（ヌクレオチド）やヌクレオシド（ヌクレオチドからリン酸基が脱離した物質），核酸塩基を分析対象とした高速液体クロマトグラフィー同位体希釈質量分析法（LC-IDMS）や，核酸構造中のリンを指標とした誘導結合プラズマ発光分析法（ICP-OES）や誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）等，様々な定量法がある。DNA を例として，核酸の構造と各定量法における測定対象物質との対応を図3に示す。

これらの手法は，目的とする感度，特異性，精確さ，簡便さ等に応じて使い分けられ，自分が行いたい定量に適する手法を選択するべきである。

本稿では，上記の分析法の中でも特に広く用いられている吸光分析法および蛍光分析法について取り上げ，分析の一般的な原理や核酸定量への応用，測定における注意事項について説明する。

4 吸光分析法を用いた核酸定量

4.1 吸光分析法の原理¹⁾

吸光分析法とは，一般的に物質による紫外・可視領域の光の透過，吸収または反射を測定する分析法である。紫外（UV）領域は200～350 nmの波長領域として，可視（Vis）領域は350～750 nmの波長領域としてそれぞれ定義されている。光は小さい波長になるほど高いエネルギーを持つため，紫外領域の光の方が可視領域の光よりも高いエネルギーを持つ。

ある物質に対して光が照射されたとき，物質は光からエネルギーを受け取ることで安定な状態（基底状態）からより高エネルギーな状態（励起状態）へと変化（励起）する。この一連の過程のことを，光の吸収と呼ぶ。励起状態の物質は非常に不安定であり，分子運動や他の物質との衝突等様々な事象を介して，余分なエネルギーを放出し基底状態へと戻る。

光の吸収が起こった場合，物質に照射された光（入射

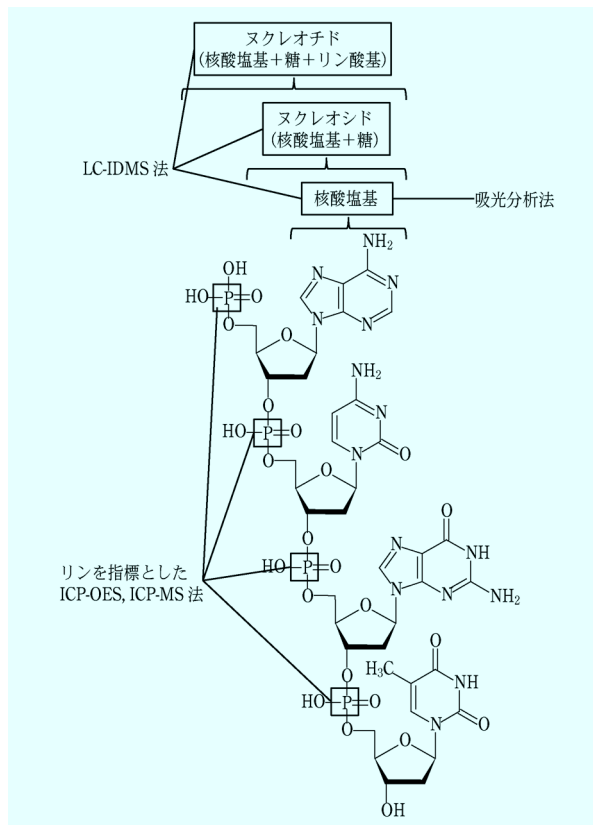


図3 DNAの構造と各定量法の測定対象物質（ただし蛍光分析法やPCR法は除く）

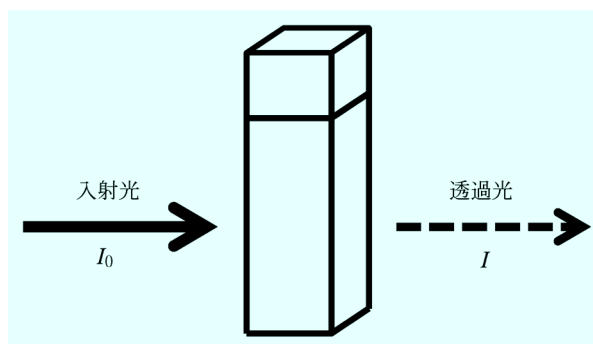


図4 物質の光の吸収を示した模式図

光）と透過した光（透過光）を比較すると，入射光の方がエネルギーが高く，強度も強い。そのため吸光分析法では，「ある波長における光の強度」は，試料を光路中に置いた場合と置かない場合に検出されるその波長における強度との比較から決定される（図4）。

光がある物質を通った際に，強度がどの程度弱まるかを示した値を吸光度（absorbance, A ）と呼び，式（1）によって定義される。また，吸光度は光学密度（optical density, OD）と呼ばれることもある。

$$A = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) \dots\dots\dots (1)$$

ここで， A は吸光度， I_0 は入射光強度， I は透過光強度

を示す。吸光度は光路長 l と試料の濃度 c に比例することが知られており、ランバート・ベール（ランベルト・ベール）の法則または単にベールの法則と呼ぶ。通常、光路長 l の単位には cm が用いられ、試料濃度の単位として g/L を用いる場合は吸光係数 a を、mol/L を用いる場合はモル吸光係数 ϵ を使用し、式(2)で表される。

$$A = alc = \epsilon lc \dots\dots\dots (2)$$

吸光係数 a およびモル吸光係数 ϵ は物質固有の定数である。従って、ある物質の濃度未知の試料に関して、ある波長における吸光係数 a やモル吸光係数 ϵ が既知の場合、その波長の吸光度を測定することで、式(3)からその物質の濃度を決定することができる。

$$c = \frac{A}{al} = \frac{A}{\epsilon l} \dots\dots\dots (3)$$

また、吸光係数 a やモル吸光係数 ϵ が未知であっても、測定対象物質の純度や濃度が分かっている標準物質を入手し、濃度に対して吸光度をプロットすることで検量線を作成することができれば、定量が可能となる。

4・2 吸光分析法を用いた核酸の定量

多くの物質は紫外・可視領域に吸収を持っており、核酸もこの領域における吸収を持つ。一般的な核酸の吸収スペクトルを図5に示す。

核酸は、構造中の核酸塩基が 260 nm 付近に吸収極大を持っているため、核酸全体としても 260 nm に吸収極大を持つ。そのため、一般的に 260 nm の波長を用いて核酸の定量は行われる。核酸を定量する際には、単位として $\mu\text{g/mL}$ や $\text{ng}/\mu\text{L}$ を使用することが多く、式(3)を用いることで、光路長 l 、260 nm における吸光度 A_{260} （または OD_{260} ）、260 nm における核酸の吸光係数 a から試料中の核酸濃度が定量できる。

一般的な吸光光度計は光路長が 1 cm で固定されており、測定用の試料量としてマイクロセルで 100 μL 程度、一般的なセルでは 1 mL 以上を必要とする。しか

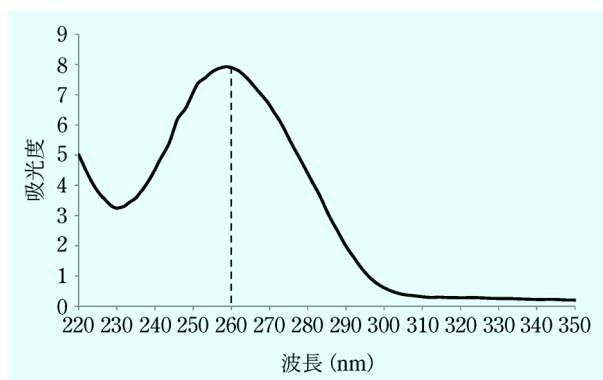


図5 紫外領域における核酸の吸収スペクトル

し、核酸試料は多量の試料を得ることが難しい場合が多く、試料量を確保することが難しい。この欠点を補うため、1 μL 程度の試料でも核酸を定量可能な微量吸光光度計が市販されている。微量分光光度計は試料の表面張力を利用して数 mm の光路長を確保することで、吸光度を測定し核酸の定量を行う。光路長は装置によって変わるため、使用の際は装置の光路長を確認してほしい。

一方で、吸光分析を用いた核酸定量における最大の問題は、260 nm における核酸の吸光係数 a に関して厳密に決定された数値がないことである。その理由は、測定対象となる核酸の長さや配列がほぼ無限に存在するためである。5種類の核酸塩基の吸収極大波長を表1に示す。それらの値は 260~275 nm の間に存在し、同じ値を示すものもあるが、ほとんどはばらばらである。またこれらが重合してできる核酸の長さや配列（核酸塩基の組成）には無限の組み合わせがあるため、吸光係数を一つの値に決定できない。このような場合、本来であれば定量対象と同じ長さや配列を持ち、濃度や純度の定まった核酸の標準物質を利用して検量線を作成し濃度を決定すべきである。しかし、そのようにオーダーメイドで標準物質を作成することも現状では難しいため、検量線による定量はほぼ不可能である。

そのため、現在一般的に行われている計算手法としては、吸光係数 a の代わりに 260 nm における吸光度 A_{260} が 1.0 となる核酸濃度が用いられており、それを表2に示す。この値の正確さはしばしば議論の対象となっているものの¹⁾、現状では、核酸に対応した微量分光光度計ではこの値を使用して濃度計算が行われている。

また、吸光分析を用いた核酸の定量では、測定に際して分離手段を持たないため、試料中に含まれる総核酸濃度（正確には 260 nm の波長を吸収する物質の総濃度。詳細は 4・4 参照）を定量することとなる。そのため、

表1 核酸塩基の吸収極大波長

核酸塩基	吸収極大波長 (nm)
アデニン	260
シトシン	265
グアニン	275
チミン	265
ウラシル	260

表2 260 nm における吸光度 (A_{260}) が 1 となる核酸濃度

核酸種	$A_{260}=1$ となる濃度 (ng/ μL)
DNA	50
RNA	40
オリゴ DNA*	33

*: PCR のプライマーに使用されるような 15~25 mer 程度の短鎖の DNA を想定

生体試料から抽出した核酸溶液中に含まれる特定の塩基配列を持つ核酸だけを定量することは不可能である。

4.3 吸光分析を用いた核酸純度の評価

核酸 (DNA・RNA) は微生物や植物、細胞等の生体試料から抽出することで得られるが、抽出に使用する試薬や生体試料中の成分等が抽出した核酸試料中に残存することがある。これらの夾雑成分はその後の実験を阻害する場合もあるため、夾雑成分が少ない、きれいな核酸試料を実験に用いる必要がある。

核酸定量用の微量吸光度計を利用して核酸試料を測定したとき、濃度の定量値以外に、 A_{260}/A_{280} (または OD_{260}/OD_{280}) という値も同時に求めることが多い。この値は、試料中に核酸以外の物質が含まれているかどうか、すなわち核酸の純度の指標として用いられている。 A_{260}/A_{280} は、260 nm と 280 nm の吸光度の比を示している。260 nm の吸収は核酸由来であることは既に述べたが、もう一方の 280 nm の吸収はタンパク質を想定している。すなわち A_{260}/A_{280} の比はタンパク質の混入度合いを示し、1.8~2.0 の場合、試料の核酸純度が高いとされる。実際に、PCR や次世代シーケンサーによる実験では、 A_{260}/A_{280} が 1.8~2.0 の間となるように調製した試料を使用する³⁾⁴⁾。しかし、この A_{260}/A_{280} を使用した核酸の純度評価法についても、現在では議論の対象となっている。例えば、多量のタンパク質を含む RNA 試料 (RNA : タンパク質 = 3 : 7) であるにもかかわらず A_{260}/A_{280} の値が 1.9 以上となることが報告されている⁵⁾。このことは、裏を返せばタンパク質が多少混入していても純度が高い核酸試料であると誤解される可能性を示している。また、既に 260 nm の吸収は、核酸中の核酸塩基に由来するものであると述べたが、260 nm における吸光度は、溶液の pH やイオン強度によって変化することも報告されている⁶⁾。そのため、測定する環境や溶媒種によって吸光度が大きく変化し、それに伴い A_{260}/A_{280} の値も変化する可能性がある。

以上のことから、 A_{260}/A_{280} の値だけで純度が高い核酸試料であると結論づけるのではなく、核酸の吸収スペクトルを確認し、必要に応じてゲル電気泳動などで検証を行う必要がある。

4.4 測定における注意点

吸光分析法の測定における注意点として、ランバート・ベールの法則では濃度が高くなるにつれて吸光度と直線関係が得られなくなることが知られている。そのため、ランバート・ベールの法則に従って定量を行うためには、直線性を確保できる濃度域の決定が必要である。もし試料が直線性のない濃度域にある場合、試料を希釈し直線性の範囲に収まるようにする必要がある。分光光度計のスペックとして、測定可能な吸光度の上限下限を

示しているものもあるので、測定した吸光度がその範囲内に収まっているかを確認するのも一つの方法である。

また、吸光度には加成性という性質があり、ある波長における光吸収を複数の物質が持つ場合、式(4)に示すように吸光度は個々の物質の吸光度の和となる。

$$A_{\text{混合物}} = A_{\text{化合物 A}} + A_{\text{化合物 B}} + \dots + A_{\text{化合物 N}} \quad (4)$$

そのため、核酸測定で用いる 260 nm の波長に吸収を持つ物質が試料中に混入している場合、核酸の濃度として算出した値は過大評価されることとなる。通常、混入が考えられる物質として、生体試料から抽出して得られた核酸試料ではタンパク質や糖類、抽出に使用した試薬 (フェノール類) などがあり、また反応や合成などで得られた核酸試料、例えば PCR 産物では PCR の基質として使用するヌクレオチド三リン酸や酵素が含まれる可能性がある。また、核酸を溶解する溶媒として、TE バッファーを用いることが多いが、TE バッファー中には 260 nm における吸収を持つエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) が含まれる。他の物質が混入している場合、吸収スペクトルが図 5 とは異なる形状を示すことが多く、一例を図 6 に示す。

図 5 と比較すると、図 6 では 260 nm における吸収極大が見えず、それよりも短波長側に大きな吸収を持つことが分かる。また、320 nm 付近に吸収を持つ物質が混入していることが分かる。このような一般的な核酸から得られる吸収スペクトルと異なる場合には、夾雑成分を取り除く必要がある。それには限外ろ過やイオン交換カラムによる精製、エタノール沈殿等が有効な手段となる。精製後に再度吸収スペクトルを取り、精製の良否を確認すべきである。

また、TE バッファー中の EDTA のような溶媒由来の低分子を含まない溶媒へ変更することで吸光度への影響を低減できる。しかし、例えば EDTA は DNase 等の酵素の働きに必要な金属イオンをキレートする性質を持ち、それらの酵素の働きを抑えて核酸を安定化する等の役割があるため、溶媒の変更が難しい場合が多い。この

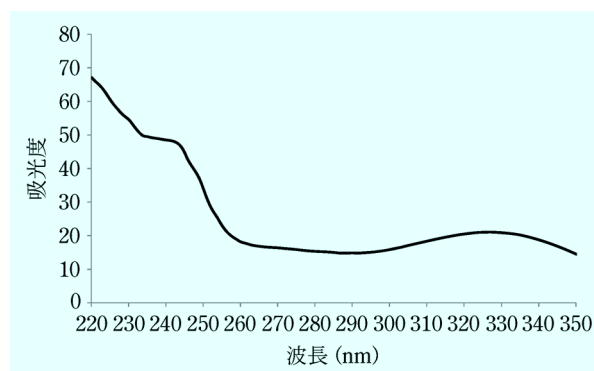


図 6 夾雑成分が混入した抽出核酸試料の吸収スペクトル

ような場合は、式(5)に示すように吸光度の加性を利用することで核酸由来の吸光度を求めることが可能となる。

$$A_{\text{化合物 A}} = A_{\text{混合物}} - (A_{\text{化合物 B}} + \dots + A_{\text{化合物 N}}) \dots\dots\dots (5)$$

すなわち、核酸試料から核酸を除いた溶液をブランク(試料を溶かす前の TE バッファー等)として測定し、核酸試料の吸光度からブランクの吸光度を差し引くことで、核酸由来の吸光度を求めることができる。従って、吸光度測定においてブランク試料の選定および調製は、非常に重要な事項となる。

4・5 吸光分析法を用いた核酸定量のまとめ

吸光分析法を用いた核酸定量は、試料中の核酸の総量を簡便に定量可能な手法である。核酸定量に特化した装置が市販されていることから、微量な試料の定量も可能であるが、定量値の精確さに関しては、吸光係数の問題から十分とは言えない。しかし、吸収スペクトルのデータと併せることで夾雑成分の混入についての情報が得られる等の利点もある。従って、吸光光度分析を用いた核酸定量は、試料中の核酸のおおよその濃度や精製純度を知るには有用な手法であると考えられる。

5 蛍光分析法を用いた核酸定量

蛍光分析法を用いた核酸定量は、蛍光色素の種類や原理によって大きく二つに分類される。一つ目は二本鎖 DNA や RNA に特異的にインターカレートすることで蛍光を発するようになる蛍光色素を用いた方法であり、二つ目は TaqMan プローブ等に代表される蛍光色素を結合させたプローブを用いた方法である。二つ目に関しては、PCR や DNA マイクロアレイに応用されている技術であるため本稿では触れず、一つ目の蛍光色素を用いたインターカレートによる核酸定量法について述べる。

5・1 蛍光分析法の原理⁷⁾⁸⁾

蛍光分析法は、基底状態にある物質に対して光エネルギーが加わることで励起状態へと遷移させるまでは吸光分析法と同じであるが、その後のエネルギーを放出して基底状態に戻る過程が異なる。蛍光分析法では、余分なエネルギーの一部を入射光よりも低エネルギー(長波長)の光として放出し、残りのエネルギーは発光以外の過程で消失する。この一連の過程で放出された光のことを蛍光と呼び、蛍光分析ではこれを測定する。そのため、蛍光物質は吸収スペクトルと蛍光スペクトルを持つこととなり、蛍光スペクトルの方が吸収スペクトルよりも長波長側に観察される。それぞれのスペクトルの吸収極大の値を励起波長および蛍光波長として測定の際に使用する。一般的に、蛍光分析は吸光分析法よりも高感度であ

る。

蛍光物質が励起状態となると、励起状態となった蛍光物質の数は吸収された光子(光の粒子、波長に応じたエネルギーを持つ)の数に比例し、また、蛍光を放出して基底状態へと戻る蛍光物質の数は放出した光子の数に比例する。これら両者の比を蛍光量子収率 ϕ と呼び、式(6)で求められる。

$$\phi = \frac{\text{放出された光子数}}{\text{吸収された光子数}} \dots\dots\dots (6)$$

蛍光量子収率 ϕ が蛍光物質の濃度 c に限らず一定の場合における、蛍光物質の濃度 c と蛍光強度 F の関係は次のようになる。蛍光は吸収した励起光の強さ I_a に関係し、励起光の吸収はランバート・ベールの法則に従うため、式(7)が成立する。

$$F = I_a \times \phi_f = (I_0 - I) \phi_f \dots\dots\dots (7)$$

さらに、式(1)と式(2)を用いて式(7)を変形させると式(8)となる。

$$F = I_0(1 - 10^{-\epsilon c l}) \phi_f \dots\dots\dots (8)$$

式(8)をテイラー展開することで、式(9)が得られる。

$$F = I_0(2.303\epsilon c l) \left[1 - \frac{2.303\epsilon c l}{2} + \frac{(2.303\epsilon c l)^2}{6} + \dots \right] \phi_f \dots\dots\dots (9)$$

$\epsilon c l$ が非常に小さいとき、式(9)は式(10)に近似できる。

$$F = I_0(2.303\epsilon c l) \phi_f \dots\dots\dots (10)$$

式(10)からわかるとおり、 $\epsilon c l$ が微小な時、蛍光強度 F は濃度 c に比例する。すなわち、 $\epsilon c l$ が 0.02 以下で F は c に比例するため式(10)が適用でき、 F と c の関係は直線性を示す。しかし $\epsilon c l$ が大きくなると式(9)の第二項以下の影響を無視できなくなり、 F と c の関係は曲線となる。

5・2 核酸の濃度決定

核酸の定量には、核酸と特異的に結合することで蛍光を発する特殊な蛍光試薬を用いる。核酸の定量に用いられる代表的な蛍光試薬とその励起波長および蛍光波長を表3に示す。これらの蛍光試薬は、一般的に核酸と結合していない状態では弱い蛍光しか持たないが、核酸と結合することで構造変化が起こり強い蛍光を発するようになる。蛍光試薬によっては、一本鎖 DNA には結合せず二本鎖 DNA にもみ結合するものもあるため、二本鎖 DNA のみを定量する等の特定の核酸種のみを定量する

表3 核酸定量に用いられる代表的な蛍光試薬およびその励起波長, 蛍光波長, 結合する核酸種

蛍光試薬	励起波長	蛍光波長	結合する核酸種
臭化エチジウム	300	605	二本鎖 DNA RNA
SYBR® Green	498	522	二本鎖 DNA
SYBR® Gold	495	537	二本鎖 DNA 一本鎖 DNA RNA
PicoGreen®	480	520	二本鎖 DNA

際に非常に強力なツールとなる。これらの蛍光試薬は、単独で市販されているものもあるが、核酸測定に特化したキットとされているものも多い。目的とする実験系に合うキットを購入することで、核酸を高感度に定量することが可能となる。表3に挙げた蛍光試薬において、検出感度は臭化エチジウム (EtBr と略記されることもあり、エチジウムブロマイドやエチプロとも呼ばれる)、SYBR® Green, PicoGreen®, SYBR® Gold の順で高くなり、EtBr と SYBR® Gold では、10 倍以上の感度差がある。一方、蛍光試薬を用いた定量法では吸光分析法と異なり、測定にあたり核酸と蛍光試薬を反応させる必要がある。そのため、測定試料の調製にはそれなりの手順が必要となり、実験者の習熟が必要とされる。

蛍光分析法を用いた核酸定量は、吸光分析法と同様に分離工程を含まないため、試料中に含まれる核酸の総濃度である。一方で、吸光分析法と異なる部分としては、蛍光試薬の結合能による、DNA と RNA の区別や、一本鎖と二本鎖の DNA の区別が可能点が挙げられる。また、吸光分析法と比較するとその検出感度が高く、市販のキットや装置を利用することで溶液中の pg オーダーの核酸の定量が可能である⁷⁾。

5.4 測定における注意点

蛍光試薬を用いた核酸定量の注意点としては、核酸定量のみならず蛍光測定全般にわたっての事項と、核酸定量の際に特に気を付けるべき事項があり、本稿では以下に四つのポイントを述べる。

一つ目は、吸光分析法と同じく、蛍光試薬による定量においても検量線の直線性が問題となる。蛍光分析の検量線の直線範囲は、低濃度域で直線となり高濃度域では非線形となることは既に述べた。そのため、実験時には直線性を確認し、必要に応じて試料の希釈等の操作を行うべきである。

二つ目は、実験時には蛍光試薬および蛍光試薬と反応させた試料は遮光して使用する必要がある。理論上、蛍光物質は、無限に蛍光プロセスを繰り返すことができる。しかし実際には、励起した蛍光物質は構造的に不安定となり、非常に分解しやすい。分解した蛍光物質は蛍

光を放出できなくなるため、時間経過とともに蛍光は弱くなる。この現象を光退色と呼ぶ。光退色を抑制するためには蛍光試薬および試薬と反応させた試料が励起状態になるのを防ぐ必要があり、アルミホイルをかぶせることや暗所に置くといった遮光が非常に有力な手段となる。

三つ目は、蛍光光度計の取り扱いである。蛍光光度計は、光源や部品配置、検出部の応答が異なると蛍光強度が大きく変化することが知られている。そのため、測定を行う前には装置の校正が必要となる。一般的に装置校正にはキニーネやフルオレセインなどの蛍光物質が用いられるが、核酸測定においてはキットの中に校正用の核酸標準物質が付属していることもあり、付属の標準物質を用いた校正 (検量線の作成) が可能となる。そのため蛍光法による核酸定量において、定量値の精確さは標準物質の純度や作成した検量線に依存する。しかし、現状では、キットに付属する核酸標準物質の濃度は吸光分析法による定量で付与されているものが多く、その濃度の値が正確であるとは言い難い。

最後に、蛍光色素の毒性についても注意が必要である。核酸定量に使用する蛍光試薬は核酸と結合するため、変異原性 (突然変異を引き起こす性質) を持つ。特に、EtBr は変異原性が高く、体内に取り込まれた場合、DNA の複製や転写に異常を引き起こす。そのため、扱う際には手袋をはめ、皮膚に直接つかないようにする等の実験上の配慮が必要となる。SYBR 系の蛍光試薬は、EtBr の変異原性の高さを懸念して開発された背景があり、そのため EtBr と比較して変異原性は低い。しかし、核酸に結合する機構が変わりはないため、使用には注意が必要である。また、同じ理由から、蛍光分析法に使用した試薬はそのまま廃棄することはできず、活性炭に吸着させたうえで焼却する等の処理が必要となる。

5.5 蛍光分析法を用いた核酸定量のまとめ

核酸に結合する蛍光試薬を用いた核酸定量は、吸光分析法と同じく、試料中の核酸の総量を定量する手法である。吸光分析法と比較すると、高感度に分析が可能であり、配列の特異性はないものの、蛍光試薬の結合能を利用した DNA と RNA の区別や、一本鎖と二本鎖の DNA の区別が行うことが可能である。しかし、蛍光試薬との反応や検量線作成など、定量までにはいくつかのステップを必要とする。定量値の精確さは、定量に使用する標準物質の濃度に依存するため、正確な濃度が付与された標準物質を利用することができれば、精確な定量が行える可能性は高い。従って、蛍光法を用いた核酸定量は、試料中の超微量核酸および特定核酸のみの濃度を知るための有用な手法であると考えられる。

6 おわりに

本稿では、核酸定量法の中でも吸光分析法と蛍光分析

法を利用した手法について、各定量法の原理、核酸定量における特徴、測定における注意点について述べた。本稿で述べた二つの手法は、核酸定量法の中でも最も一般的に用いられており、核酸を扱う実験者であれば必ず触れる手法である。しかし簡便に核酸を定量することができる反面、ちょっとしたコツをつかんでいなければ核酸由来の定量値をきちんと測定することはできない。実験における気を付けるべき点を重点的に述べた本稿が、これから核酸を用いた実験を行う方や、既に核酸の定量を行っているが測定値に不安がある方の参考になれば幸いである。

文 献

- 1) 伊永隆史, 芝本幸平訳: “バイオ分析化学実験法”, (2006), (丸善); {K. K. Stewart, R. E. Ebel: “Chemical Measurements in Biological Systems”, (2000), (J. Wiley & Sons., Inc., New York)}.
- 2) M. J. Cavaluzzi, P. N. Borer: *Nucleic Acids Res.*, **32**, e13 (2004).
- 3) L. Braglia, S. Giani, D. Breviario, F. Gavazzi: *Anal. Bioanal. Chem.*, **408**, 8299 (2016).

- 4) A. Healey, A. Furtado, T. Cooper, R. J. Henry: *Plant Methods*, **10**, 21 (2014).
- 5) J. A. Glasel: *Biotechniques*, **18**, 62 (1995).
- 6) W. W. Wilfinger, K. Mackey, P. Chomczynski: *Biotechniques*, **22**, 478 (1997).
- 7) 渡辺光夫: “ケイ光分析—基礎と応用—”, pp. 3 (1977), (廣川書店).
- 8) 西川泰治, 平木敬三: “蛍光・りん光分析法”, pp. 23 (1984), (共立出版).
- 9) Thermo Fisher Scientific, Quant-iT™ Pico Green™ dsDNA Assay Kit: Manuals and Protocols (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P11496>) (2017年11月29日最終確認).



柴山祥枝 (Sachie SHIBAYAMA)

国立研究開発法人産業技術総合研究所計量標準総合センター物質計測標準研究部門バイオメディカル標準研究グループ (〒305-8563 茨城県つくば市梅園 1-1-1)。筑波大学大学院生命環境科学研究生命産業科学専攻修了。博士 (生物工学)。《現在の研究テーマ》精確な核酸定量法の開発および核酸標準物質の開発。《趣味》ヨガ。
E-mail: s-shibayama@aist.go.jp

新刊紹介

バイオマテリアルサイエンス
——基礎から臨床まで—— (第2版)

山岡哲二・大矢裕一・中野貴由・石原一彦 著

バイオマテリアルサイエンスは無機化学, 物理化学, 有機化学, 高分子化学, 界面化学, 機械・電子工学, 生化学, 生物細胞学, 免疫学, 医歯薬学などで構成されている。本書では, 各学問の詳細に立ち入ることなく, 生体の仕組み, 各種生体材料の種類・性質, 材料に対する生体の応答とそれを踏まえた材料設計, および, 再生医療, 遺伝子治療などのバイオマテリアルの用途などを俯瞰的に学ぶことができる。本書は, 工学部の材

料系または医療系の学部生を主な対象としているが, 例えば, 金属材料学・無機材料学など材料科学の基本を一通り学んだけれども, 高校で生物を選択履修しなかった学生にとっても, 生体の基本などを学びやすい内容になっていると感じられる。バイオマテリアルの研究に必要な分析法についても述べられており, 質量分析法, NMR法, 赤外分光法などの機器分析法, 電子顕微鏡等による形状と構造解析, XPS法などの表面分析法, フローサイトメトリー・酵素免疫測定法などの生理活性評価, 表面プラズモン共鳴法・電気泳動法による分子間相互作用解析の概要が簡潔に紹介されている。最終章では, 基礎研究・開発の成果を実用化するために必須の知識として関連法令, 生物学的安全性評価等について述べられている。日本におけるバイオマテリアルの基礎研究・開発の成果が実用化に辿り着くことを願っている著者の想いが込められた一冊である。

(ISBN 978-4-8079-0906-3・A5判・211ページ・2,600円+税・2018年刊・東京化学同人)