



Title	紫外線吸収測定によるRNAの定量に対する一考察
Author(s)	井村, 孝嗣; IMURA, Koji
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 20(2), 127-133
Issue Date	1969-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23386
Type	departmental bulletin paper
File Information	20(2)_P127-133.pdf



紫外線吸収測定による RNA の定量に対する一考察

井 村 孝 嗣*

A Consideration on RNA Estimation by Ultraviolet Absorption Measurement

Koji IMURA*

Abstract

The experiment was undertaken for the purpose of making the correcting formula for spectrophotometric estimation of ribonucleic acid in tissue by using a small amount of the tissue. The factors necessary to make the correcting formula were the specific extinction coefficients of ribonucleic acid at two wavelengths and the ratio of the specific extinction coefficients at the same wavelengths which comes from peptide contaminants. In this experiment, the specific extinction coefficients of ribonucleic acid were determined by the estimation of the phosphorus in the ribonucleic acid fraction purified by the method of DE DEKEN-GRENSON AND DE DEKEN and of the absorbancy of the same fraction and the ratio of the specific extinction coefficients which comes from peptide contaminants were computed from the difference between the absorbancy of the ribonucleic acid fraction and the purified ribonucleic acid fraction. The corrected values of the ribonucleic acids which were computed by the formula agreed with the values obtained from the method of DE DEKEN-GRENSON AND DE DEKEN within 2% of error.

緒 言

組織中の核酸の最も正確な定量法の一つとして、イオン交換樹脂を使用して核酸分画中に遊離したペプチドを除く DE DEKEN-GRENSON AND DE DEKEN¹⁾の方法があげられているが、操作が煩雑であるとして余り多く用いられていない。一方定量の迅速化と正確さ及び微量定量を可能にするため、紫外線の二つの波長での吸収を読み、補正式を用いて定量する方法が、TSANEV AND MARKOV²⁾, FLECK AND MUNRO³⁾, DE TORRES AND POGO⁴⁾, FLECK AND BEGG⁵⁾, らによって研究された。特に FLECK AND MUNRO³⁾は定量法の条件を検討し、紫外線吸収測定による定量の標準的な方法を報告した。彼らのもとづいた補正式は

$$C_{\text{RNA-P}}(\mu\text{g/ml}) = \frac{E_{\lambda_1}}{r_1 - r_2(p_1/p_2)} - \frac{E_{\lambda_2}}{r_1(p_2/p_1) - r_2}$$

であり、ここに E_{λ_1} , E_{λ_2} は RNA 分画の波長 λ_1 , λ_2 での吸光度, r_1 , r_2 は λ_1 , λ_2 での RNA の吸光係数 (RNA-P 1 μg あたりの λ_1 , λ_2 での RNA の吸光度), p_1/p_2 はペプチドの λ_1 , λ_2 での吸光係数の ratio である。彼らは KIRBY⁶⁾ 法によって分離した RNA を分解して r_1 , r_2 を決定し, p_1/p_2 を透析してヌクレオチドを除去した RNA 分画を真空凍結乾燥したものをを用いて決定した。ところが

* 北海道大学水産学部生物化学講座
(Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

この方法は、各係数を決定するのにやや多くの組織と時間を必要とする。この FLECK AND MUNRO³⁾の方法は同じ組織であれば、37° で 0.3 N KOH による 1 時間の RNA の分解の際に生じるペプチドの紫外線吸収特性はほぼ同一であるということに依存しているので次のような見通しを与える。すなわち r_1 , r_2 を DE DEKEN-GRENSON AND DE DEKEN¹⁾の方法によってペプチドを除去した RNA 分画を用いて決定し、 p_1/p_2 をペプチドを除去されていない RNA 分画と除去した分画の紫外線吸収の差を利用して算出することによって、補正式に必要な係数を少量の組織で決定することができる。著者は、この見通しのもとに研究を行なったので結果を報告する。

実験および方法

1) 各 RNA 分画の調製

補正式中の係数、すなわち r_1 , r_2 , p_1/p_2 を決定するために 3 種類の RNA 分画を調製した。使用した組織はニジマス肝臓及び腎臓と金魚の肝臓である。

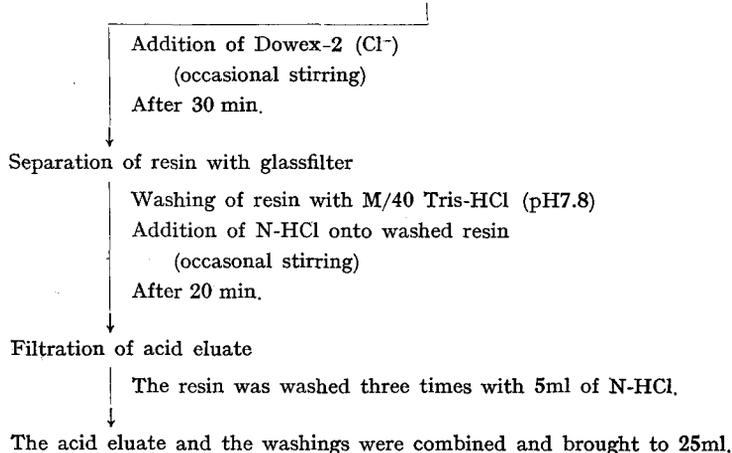
約 1 g の凍結した組織を乳鉢中に入れ、乳棒で細かく砕きさらに糊状になる迄よくすりつぶす。その後 19 倍量の氷冷水を徐々に加えながらホモジナイズする。このホモジネートを 5 ml ずつホールピペットで三つの遠心管にとりわけける。

分画 1: 上述の一つの遠心管に氷冷 0.6 N HClO₄ を 2.5 ml 加えて攪拌後、遠心分離して酸可溶性物質を除去し、残渣をさらに 2 度、氷冷 0.2 N HClO₄ で洗浄する。残渣を 1 ml の冷水によく懸濁させ、あらかじめ 37° に保温してあった 0.4 N KOH を 3 ml 加えて 37° にインキュベートした。1 時間後氷冷し、氷冷 1.2 N HClO₄ を 2.5 ml 加えて遠心分離後上澄をとり、さらに 2 度残渣を氷冷 0.2 N HClO₄ で洗浄後、上澄と洗液を合わせて終濃度 0.1 N HClO₄ 濃度として一定量に稀釈した。

分画 2: 分画 1 と同様に酸可溶性物質を除去したのち、アルカリによる分解を分画 1 と同じ条件下で 20 時間行ない、RNA 分画を取り出し、40% KOH で中和後、KClO₄ の沈澱を除去して、その一定量をとってペプチドを除去するために樹脂処理を行なった。

分画 3: 残りの遠心管に氷冷 1.2 N HClO₄ を 2.5 ml 加えて遠心分離後、残渣をさらに 2 度 0.4 N HClO₄ で洗浄した。残渣を 1 ml の冷水に懸濁させ 95% エタノールを 5 ml 加えて遠心分離後、さら

Scheme 1. Procedure of DE DEKEN-GRENSON AND DEKEN
Neutralized RNA fraction + M/20 Tris-HCl buffer (pH7.8)
(1 : 1)



にエタノール 5 ml で洗浄した。次にエタノール：クロロホルム (3:1) 混液で 2 度，エタノール：エーテル (3:1) 混液で 1 度それぞれ室温で攪拌することによりリン脂質を除去し，最後にエーテルで洗浄後乾燥して分画 2 と同様に分解し，RNA 分画を調製後樹脂処理を行なった。

2) RNA 分画中のペプチドの除去

分画中のペプチドの除去は DE DEKEN-GRENSON AND DE DEKEN¹⁾ の方法によった。その方法の概略は Scheme 1 に示したとおりであるが，樹脂からのヌクレオチドの回収を完全にするために，溶出剤である 1 N HCl を原報よりも多く用いた。

3) その他の操作

紫外線の吸収を島津分光光度計 QV-50 型で測定し，リンの定量を FISKE AND SUBBAROW の方法により行なった。

結 果

1) 樹脂からのヌクレオチドの除去

KIRBY²⁾ 法によってサケの肝臓から分離した RNA を 0.3 N KOH で 37° において 20 時間分解したものをを用いて樹脂からの回収率を調べた。その結果を Table 1 に示したが，ほぼ完全な回収をみた。

2) 波長の決定

補正式作成のために波長を決定しなければならないが，一つの波長として，RNA が吸収極大をもつ 260 m μ を採用した。もう一つの波長としては 230 m μ 付近あるいは 275 m μ 付近が主として用いられているが，どちらがよいか検討した。すなわち数個体のニジマスの肝臓の分画 2 について 230 m μ と 260 m μ の吸収の ratio と 275 m μ と 260 m μ の吸収の ratio をとると Table 2 のとおりであった。それにみられるように 230 m μ の吸収のバラツキが 275 m μ のそれより大きいということがわかったので，もう一方の波長として 275 m μ を採用した。

Table 1. Recovery test of pure ribonucleotides from Dowex-2

Weight of resin	Absorbancy at 260m μ	Recovery (%)
0 (Control)	0.600	
300mg	0.589	97.1
350mg	0.594	99.0
400mg	0.599	99.8

Table 2. Observed ratios of absorbancy at 230 m μ and 260 m μ and at 275 m μ and 260 m μ in some purified RNA fractions of the liver of rainbow trout

Sample	230m μ	260m μ	275m μ
	260m μ	260m μ	260m μ
1	0.344	1	0.771
2	0.346	1	0.774
3	0.330	1	0.777
4	0.321	1	0.776
5	0.327	1	0.774

3) ニジマス肝臓 RNA 定量のための補正式の作成

分画3のリンと 260 m μ の吸光度を測定することにより r_1 を決定した。 r_1 より得られた $\epsilon(P)$ は 10344 となり, KIRBY⁶⁾ 法によって分離したニジマス肝臓 RNA の 10480 とかなりよい一致を示した。 r_2 を r_1 に分画2の 275 m μ の吸収値を 260 m μ の吸収値で割った商を掛けることによって算出した。 その結果を Fig. 1 と Table 3 に示した。 Fig. 1 に分画1と分画2のスペクトルの差を記入してあるが, この差をペプチドの紫外線吸収スペクトルとして使用した。 従って p_1/p_2 は分画1と2の 260 m μ での吸収の差を 275 m μ での吸収の差で割ることによって求められる。

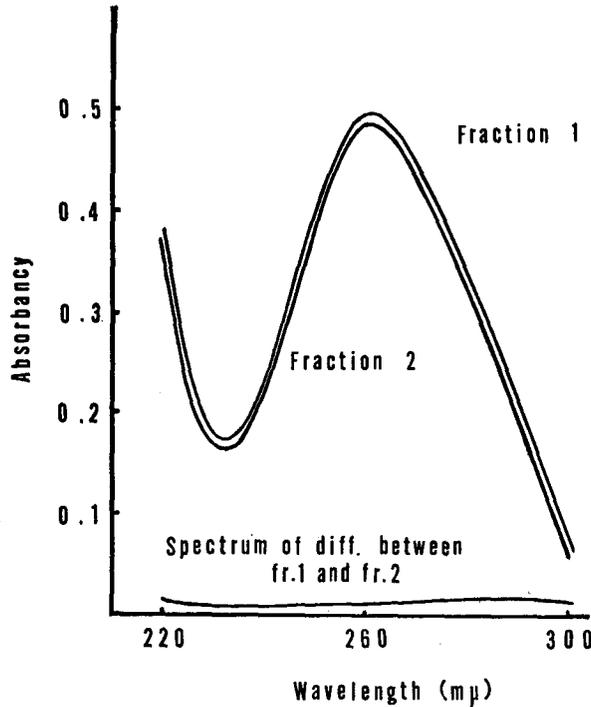


Fig. 1 Absorption spectra of the liver of rainbow trout
Each fraction was prepared as described in the text.

Table 3 The correcting formula for RNA of the liver of rainbow trout

Fraction 1		Fraction 2		Fraction 3	
260m μ	275m μ	260m μ	275m μ	260m μ	Phosphorus
0.497	0.392	0.488	0.376	0.475	1.424 μ g/ml
		0.489	0.377		
	Mean	0.489	0.377		

$$r_1 = 0.475 / 1.424 = 0.344 \quad \epsilon(P) = 10344 \text{ (from fraction 3)}$$

$$r_2 = 0.344 \times 377 / 489 = 0.257$$

$$p_1/p_2 = (497 - 489) / (392 - 377) = 8/15$$

$$N (\mu\text{g-P/ml}) = 5.08E_{260\text{m}\mu} - 2.71E_{275\text{m}\mu}$$

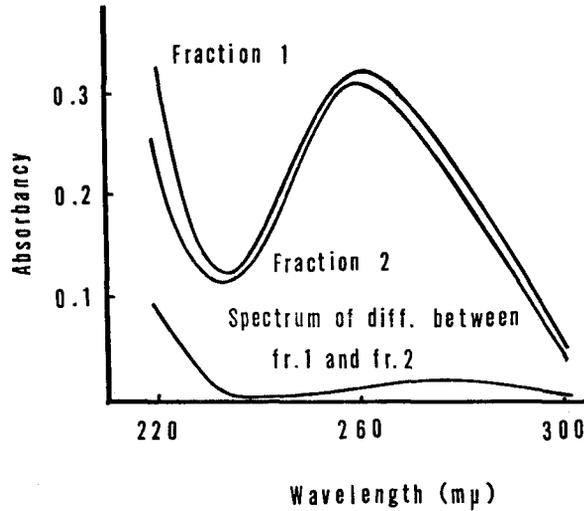


Fig. 2 Absorption spectra of the kidney of rainbow trout
Each fraction was prepared as described in the text.

Table 4 The correcting formula for RNA of the kidney of rainbow trout

Fraction 1		Fraction 2		Fraction 3	
260m μ	275m μ	260m μ	275m μ	260m μ	Phosphorus
0.322	0.253	0.310	0.234	0.221	0.714 μ g/m
		0.312	0.235		
	Mean	0.311	0.234		

$$r_1 = 0.310 \quad \varepsilon(P) = 9600$$

$$r_2 = 0.233$$

$$p_1/p_2 = 11/19$$

$$N (\mu\text{g-P/ml}) = 5.71E_{260\text{m}\mu} - 3.31E_{275\text{m}\mu}$$

Table 5 The correcting formula for RNA of the hepatopancreas of goldfish

Fraction 1		Fraction 2		Fraction 3	
260m μ	275m μ	260m μ	275m μ	260m μ	Phosphorus
0.571	0.461	0.513	0.399	0.389	1.258 μ g/ml
		0.511	0.400		
	Mean	0.512	0.400		

$$r_1 = 0.309 \quad \varepsilon(P) = 9571$$

$$r_2 = 0.241$$

$$p_1/p_2 = 59/61$$

$$N (\mu\text{g-P/ml}) = 13.2E_{260\text{m}\mu} - 12.8E_{275\text{m}\mu}$$

Table 6 The estimation of RNA

Sample	Absorbancy of RNA fraction (Fraction 1)		Absorbancy at 260m μ after resin treatment (Fraction 2)	Estimation of RNA (μ g RNA-P/ml)		
	260m μ	275m μ		from eqn.	after resin treatment	based on absorbancy at 260m μ
Liver of rainbow trout						
1	0.497	0.392	0.489	1.46	1.46	1.49
2	0.393	0.307	0.390	1.17	1.17	1.18
3	0.470	0.368	0.470	1.39	1.41	1.41
4	0.418	0.329	0.411	1.24	1.23	1.25
5	0.340	0.268	0.327	0.97	0.98	1.02
Kidney of rainbow trout						
1	0.322	0.253	0.311	1.00	1.00	1.04
2	0.482	0.377	0.460	1.51	1.48	1.56
3	0.370	0.300	0.348	1.12	1.12	1.19
4	0.406	0.324	0.384	1.25	1.24	1.31
Hepatopancreas of goldfish						
1	0.571	0.461	0.512	1.64	1.66	1.85
2	0.592	0.480	0.526	1.67	1.70	1.91
3	0.569	0.458	0.505	1.65	1.63	1.84
4	0.356	0.291	0.305	0.98	0.99	1.15

4) ニジマス腎臓 RNA および金魚肝臓 RNA 定量のための補正式の作成

ニジマス肝臓の場合と同様に作成した。その結果は Fig. 2 および Table 4, 5 に示したとおりである。ニジマス腎臓の場合は、肝臓よりややペプチドの影響が大きい程度であるが、金魚肝臓ではかなりの影響がみられる。

5) 補 正 成 績

作成された補正式によって算出された RNA 値が、はたして DE DEKEN-GRENSON AND DE DEKEN¹⁾ の方法によって得られた値とどの程度一致するかを、数個体の試料について調べた。その結果は Table 6 に示したとおりであるが、いずれも 2% 以内の誤差で一致した。また比較のために分画 1 の 260 m μ の吸収にもとずいた RNA 値も示したが、ニジマス肝臓については必ずしも補正の必要はないようである。

考 察

DE DEKEN-GRENSON AND DE DEKAN¹⁾ の方法は個々の RNA 分画中の RNA の定量に用いるには確かに煩雑な操作であるけれども、この方法を利用すれば、非常に少量の組織量で補正式を作ることが可能であり、補正式を作っておけば、オリジナルな SCHMIDT AND THANNHAUSER⁷⁾ 法より迅速に定量ができる。

分画 1 と 2 は吸収の差をとる関係上、同じ組織ホモジネートを同一量用いれば以後の操作がしやすい。一方分画 3 は必ずしも分画 1 と 2 と同量である必要はない。Table 6 に示したようにニジマスの肝臓では分画 1 と 2 の間にほとんど差がなく、分画 1 はペプチドによってほとんど汚染されていない。このように分画 1 と 2 を作ってみるだけで、紫外線吸収を測定して RNA を定量する場合に補正の必要があるか否かの判定が出来る。Table 3 に示したニジマス肝臓に関するデータにおいては、分

画1, 2, 3とも全く同一量の組織ホモジネートを使用したのであるが、分画2の260 $m\mu$ での吸収より分画3のそれの方が若干少なく、HALLINAN⁸⁾らの結果ほどではないが、有機溶剤処理によってRNAが損失することを示している。またニジマス腎臓の場合、肝臓よりも損失は大であった。HALLINAN⁸⁾らの結果から判断すれば、分画3の酸可溶性物質を除去するHClO₄の濃度を0.8Nくらいにした方がよいかもしいない。

分画1のアルカリ分解条件はFLECK AND MUNRO⁹⁾の記述にもとずいて、0.3N KOH, 37°, 1時間を採用したが、ネズミ筋肉でRNAが完全に酸可溶性になるには0.3N KOH, 37°を用いた場合4~5時間は必要であろうという神立、斎藤⁹⁾の報告があるので、組織によってはRNAの分解条件を検討する必要がある。RNA分画中に遊離するといわれているリン蛋白由来する無機リンは、樹脂処理によっても除去されないと考えられるが、量的に少ないので無視した。しかしこれの補正も分画3中の無機リンを定量し、全リン値から差し引いた値をもとにして r_1 を決定すれば可能と考えられる。

要 約

少ない組織で、紫外線吸収測定による組織RNAの定量のための補正式を作る目的で実験を行なった。補正式を作るために必要な係数は二つの波長でのRNAの吸光係数と、同じ波長での遊離ペプチドの吸光係数のratioである。この実験では、RNAの吸光係数をDE DEKEN-GRENSON AND DE DEKEN¹⁾の方法で精製したRNA分画中のリン量と吸光度を測定することによって決定し、遊離ペプチドの吸光係数のratioをRNA分画の吸収と樹脂処理によって精製されたRNA分画の吸収の差より決定した。補正式によって計算されたRNA量はDE DEKEN-GRENSON AND DE DEKEN¹⁾の方法によって得られた値と2%以内の誤差で一致した。

最後に、御指導および御校閲の労をとられた北海道大学水産学部斎藤恒行教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) De Deken-Grenson, M. & De Deken, R. H. (1959). *Biochim. Biophys. Acta.* **31** 195.
- 2) Tsanev R. & Markov, G. G. (1960). *ibid.* **42** 442.
- 3) Fleck, A. & Munro, H. N. (1962). *ibid.* **55** 571.
- 4) De Torres, R. A. & Pogo, A. O. (1965). *Anal. Biochem.* **13** 281.
- 5) Fleck, A. & Begg, D. (1965). *Biochim. Biophys. Acta.* **108** 333.
- 6) Kirby, K. S. (1956). *Biochem. J.* **64** 405.
- 7) Schmidt, G. & Thannhauser, S. J. (1945). *J. Biol. Chem.* **161** 293.
- 8) Hallinan, T., Fleck, A. & Munro, H. N. (1963). *Biochim. Biophys. Acta.* **68** 131.
- 9) 神立 誠・斎藤洋子 (1968). *農化*, **42** 479.