

BioSpec-nanoによる核酸定量

Quantitation of Nucleic Acid by BioSpec-nano

BioSpec-nanoは2つの光路長(0.2 mm, 0.7 mm)を有し、それぞれ1 μ L, 2 μ Lのサンプル量で核酸定量が可能です。さらに、オプションの光路長5 mmセル(サンプル量: 2 mL)により、セル(キュベット)を使用した測定も可能です。

今回、各光路長に対する種々の濃度のdsDNAを測定し、得られた核酸定量における測光値(OD)の直線性、測定再現性: CV値(%), 測光値(OD)の正確さの結果を報告します。また、核酸定量時におけるワイピング性能も合わせて述べます。

Y. Harada

分析条件

Analysis Conditions

サンプルはTris-EDTA(TE)バッファーに溶解した精製dsDNAです。各光路長に対して、右記のような濃度範囲のサンプルを準備しました。次に、BioSpec-nanoで種々の光路長、濃度で10回ずつ測定を行い、260 nmにおけるOD(Optical Density, 光学純度, 光路長10 mm換算の吸光度)を求めました。Fig.1, 2, 3の縦軸値(Measured OD260)がBioSpec-nanoの測定値に相当します。

正確さを求めるための基準値(Corrected OD260, 各図の横軸値)は島津紫外可視分光光度計UV-2450でサンプルを適宜、希釈し、光路長1 mmセルによって求めました。Fig.1, 2, 3の直線は基準値を示す直線であり、各々の直線からの乖離が誤差に相当します。

1) 光路長0.7 mm

サンプル濃度 : 0.3 ~ 21 OD (15 ~ 1000 ng/ μ L dsDNA)

サンプル量 : 2 μ L

2) 光路長0.2 mm

サンプル濃度 : 1 ~ 75 OD (50 ~ 3700 ng/ μ L dsDNA)

サンプル量 : 1 μ L

3) オプション光路長5 mmセル

サンプル濃度 : 0.04 ~ 3 OD (2 ~ 150 ng/ μ L dsDNA)

サンプル量 : 2 mL

光路長0.7 mmにおける分析結果

Analysis Results at 0.7 mm Pathlength

基準値(Corrected OD260)に対する測定値(Measured OD260)の相関係数は0.999となりました。

1.4 OD(70 ng/ μ L dsDNA)以上のとき、測定再現性: CV値(%)として1.4%以下, OD誤差(%)として-8.6% ~ 4.4%の結果が得られました。データをFig.1に示します。

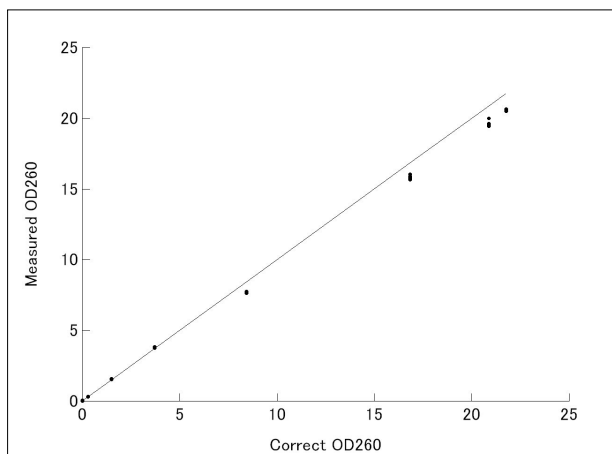


Fig.1 光路長 0.7 mmにおける分析結果
Analysis Results at 0.7 mm Pathlength

光路長0.2 mmにおける分析結果

Analysis Results at 0.2 mm Pathlength

基準値(Corrected OD260)に対する測定値(Measured OD260)の相関係数は0.999となりました。

5 OD(250 ng/ μ L dsDNA)以上のとき、測定再現性: CV値(%)として1.4%以下, OD誤差(%)として-5.4% ~ 2.8%の結果が得られました。データをFig.2に示します。

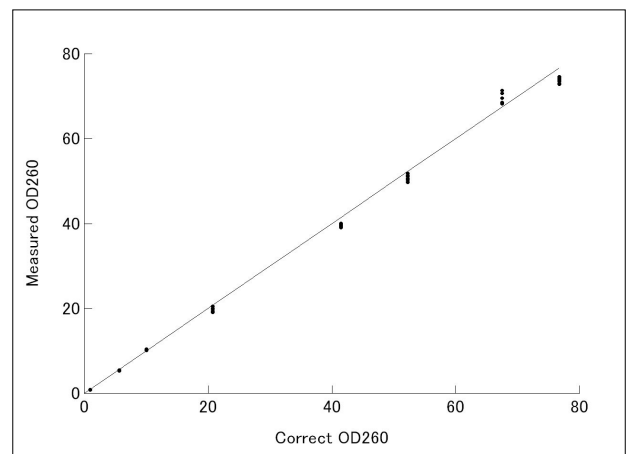


Fig.2 光路長 0.2 mmにおける分析結果
Analysis Results at 0.2 mm Pathlength

オプション光路長5 mmセルにおける分析結果

Analysis Results at Optional 5 mm Pathlength Cell

基準値(Corrected OD260)に対する測定値(Measured OD260)の相関係数は0.999となりました。

0.2 OD(10 ng/μL dsDNA)以上のとき、測定再現性：CV値(%)として0.6%以下、OD誤差(%)として-1.6%~3.6%の結果が得られました。データをFig.3に示します。

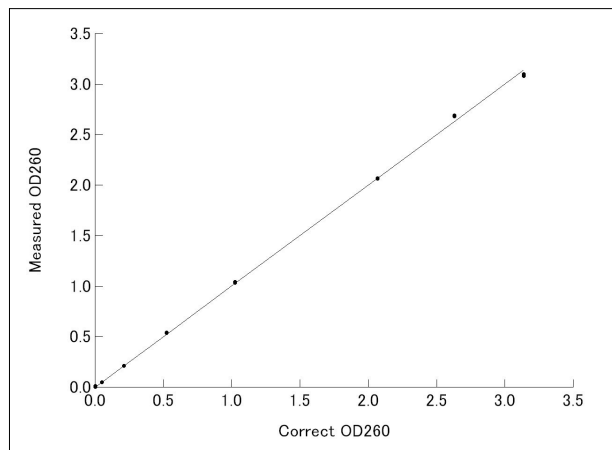


Fig.3 オプション光路長5 mmにおける分析結果
Analysis Results at Optional 5mm Pathlength Cell

核酸定量における自動ワイピング性能

Performance of Automatic Wiping
in Nucleic Acid Quantitation

光路長0.7 mm, サンプル量3 μL, ワイピング1回で精製dsDNA(11.7 OD, 578 ng/μL)とTEバッファーを交互に測定しました。

自動ワイピング性能の指標として、TEバッファーへのdsDNAのキャリーオーバー(%)を用いました。測定サイクルを下記に示します。

ラウンド1

dsDNA測定, ワイピング1回

TEバッファー測定, ワイピング1回

ラウンド2

dsDNA測定, ワイピング1回

TEバッファー測定, ワイピング1回

.....

1ラウンド(Round)で2回の自動ワイピングが実行されます。各ラウンドのキャリーオーバー(%)は下式で求めました。

$$\text{キャリーオーバー(}\%) = 100 \times \frac{[\text{TE測定時の核酸濃度}]}{[\text{dsDNA測定時の核酸濃度}]}$$

まとめ

Summary

セル(キュベット)フリー方式の分光光度計によりμLオーダーのサンプル量で核酸定量を行う場合、液滴の形成状態が分析結果に影響を与えます。Biospec-nanoには光路長を自動的に形成する自動マウント機構が採用されており、良好な形状を有する液滴が安定して得られます。

光路長0.2 mm, 0.7 mmにおいてそれぞれ1 μL, 2 μLの精製dsDNAサンプルで核酸定量の検証を行い、優れた測光値直線性、測定再現性、測光値正確さを示す結果が得られました。

Fig.4に示すように60ラウンド(ワイピング120回)までキャリーオーバー(%)は0.3%以下に保たれており、自動ワイピング使用時のキャリーオーバーは非常に低く抑えられています。

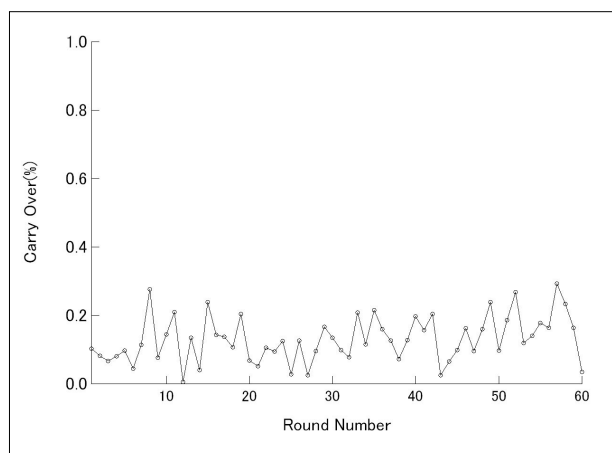


Fig.4 核酸定量における自動ワイピング性能
Performance of Automatic Wiping in Nucleic Acid Quantitation

自動ワイピング機構は手間や時間のかかる接液部のクリーニングの操作からユーザーを解放する画期的な機構です。精製dsDNAのサンプルを用いた自動ワイピング性能の検証において、連続使用120回、キャリーオーバー0.3%以下のデータが得られました。

初版発行：2009年12月

島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

- 0120-131691(携帯電話不可)
- 携帯電話専用番号(075)813-1691

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制Web Solutions Navigatorで閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。