

Application News

No. A484

光吸収分析
Spectrophotometric Analysis

TrayCell を用いた微量核酸定量

Quantitation of DNA Using TrayCell

はじめに

Introduction

核酸、蛋白質の純度の確認や定量には紫外可視分光光度計が用いられます。これらの試料は少量しかない場合が多いため、微量測定できるセルが求められます。従来は試料量 25 μ L で測定できる超マイクロブラックセルを用いていました。今回は試料量 3 ~ 5 μ L で測定できる Hellma 社の TrayCell を用いて核酸の微量測定を行いましたのでご紹介します。

A. Hashimoto

Hellma 社製 TrayCell

Hellma TrayCell

TrayCell の標準仕様は光路長が 1.0 mm で、分析に必要なサンプル量は 3 ~ 5 μ L です。Fig. 1 に示すように、セル上部に試料を滴下し、上蓋をセットし、分光光度計の試料室にセットするだけで、測定が容易に行えます。

UV-1800 のバイオメソッド

UV-1800 Biomethod Mode

UV-1800 (Fig. 2 参照) は Fig. 3 に示す測定モードを備えています。1. 核酸定量, 2. Lowry 法, 3. BCA 法, 4. CBB 法, 5. Biuret 法, 6. UV 吸収法の 6 種類の測定項目より目的に応じた測定メソッドを選ぶことができます。

「1. 核酸定量」の測定画面を、Fig. 4 に示します。Fig. 4 の画面上で、必要事項を入力して、測定ボタンを押すだけで、 λ_1 , λ_2 に設定した波長での吸光度を自動的に読み取り、瞬時に吸光度比、DNA 濃度、蛋白質濃度を表示します。



Fig. 1 TrayCell の外観および試料滴下
Photograph of TrayCell and Sample Pipetting



Fig. 2 UV-1800 外観図
UV-1800

バイオメソッド

1. 核酸定量
2. Lowry 法
3. BCA 法
4. CBB 法 (Bradford 法)
5. Biuret 法
6. UV 吸収法

項目番号を入力して下さい。

Fig. 3 バイオメソッド画面
Biomethod Screen

核酸定量

1. 測定波長 : $\lambda_1 = 260.0\text{nm}$ $\lambda_2 = 230.0\text{nm}$
 2. BG 補正 : なし $\lambda_b = 320.0\text{nm}$
 3. 係数 : $K_1 = 49.100$ $K_2 = 3.4800$
 $K_3 = 183.00$ $K_4 = 75.800$
 計算式 吸光度比 = A_1/A_2
 DNA 濃度 = $K_1 \cdot A_1 - K_2 \cdot A_2$
 蛋白質濃度 = $K_3 \cdot A_2 - K_4 \cdot A_1$

項目番号を入力して下さい。(START:測定)

Base補正 試料制御 測定画面 条件記憶

Fig. 4 核酸定量画面
DNA Quantitation Screen

■ TrayCell を使用した核酸の測定

Analyses of DNA Using TrayCell

TrayCell を用いて、核酸分析によく用いられる二本鎖 DNA の一種である Lambda-DNA を、Table 1 に示す分析条件で分析しました。10 回測定したときの 260 nm における測光値および標準偏差値を Table 2 に、濃度の異なる核酸のスペクトルの重ね書きを Fig. 5 に、検量線を Fig. 6 に示します。

吸光度 1.0 の濃度の試料をくり返し 10 回測定した時の標準偏差は 0.014629, CV 値は 1.34 %, 検量線式は、 $Y = 0.00201x + 0.00827$ 相関係数は、 $r^2 = 0.99989$ で精度よく測定できることがわかります。

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

| | |
|-----------|-----------------------|
| 使用装置 | : 島津紫外可視分光光度計 UV-1800 |
| 波長範囲 | : 220 - 350 nm |
| スキャンスピード | : 中速 |
| サンプリングピッチ | : 1.0 nm |
| 測光値 | : 吸光度 |
| スリット幅 | : 1 nm (固定) |

Table 2 260 nm における測光値および標準偏差値
Absorbance Values and Standard Deviation of DNA Measured Ten Times at 260 nm

| 260 nm における吸光度値 | |
|-----------------|----------|
| 1 | 1.074 |
| 2 | 1.092 |
| 3 | 1.072 |
| 4 | 1.065 |
| 5 | 1.086 |
| 6 | 1.092 |
| 7 | 1.087 |
| 8 | 1.101 |
| 9 | 1.104 |
| 10 | 1.110 |
| 平均 | 1.088 |
| 標準偏差 | 0.014629 |
| CV値 | 1.34 % |

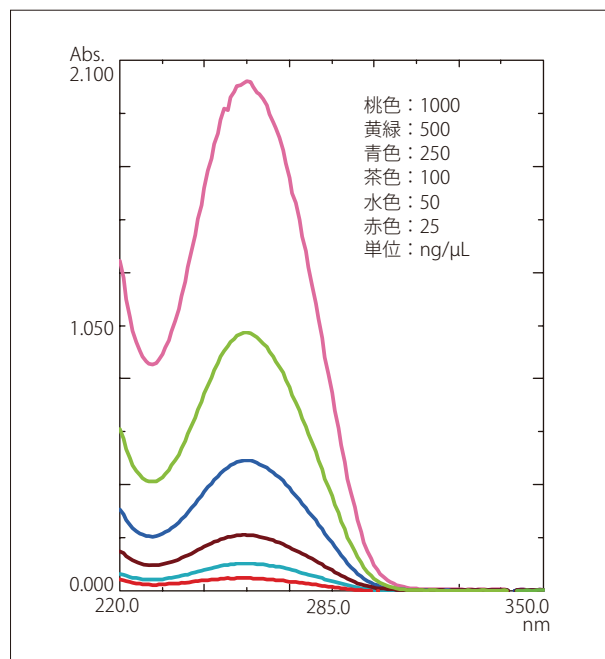


Fig. 5 濃度の異なる核酸のスペクトル
Spectra of Different Concentrations of DNA
Red: 25 ng/μL, Aqua: 50 ng/μL, Brown: 100 ng/μL
Blue: 250 ng/μL, Greenish yellow: 500 ng/μL
Pink color: 1000 ng/μL

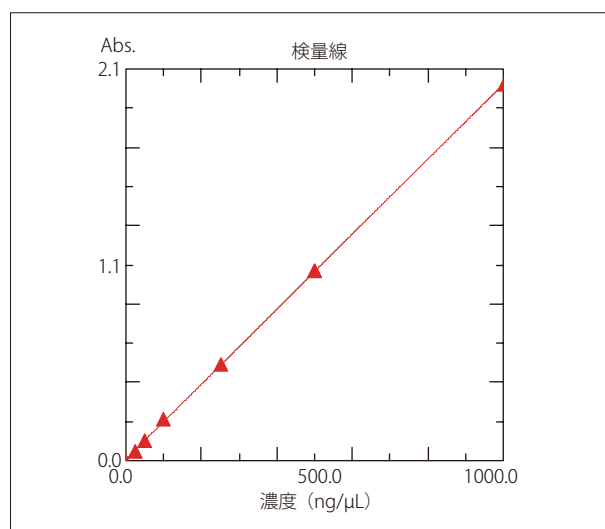


Fig. 6 核酸の検量線
Calibration Curve of DNA

■ まとめ

Conclusions

島津紫外可視分光光度計 UV-1800 と TrayCell を用いることにより、極微量の試料量でも、精度よく簡便に定量できることがわかりました。