

Application News

No. A577

光吸収分析

核酸の定量測定

– TrayCellやNano Stickを用いた微量測定 –

多くの分野で物質の定量や定性を目的として紫外可視分光光度計が利用されています。その中で、ライフサイエンス分野では、核酸やたんぱく質などの純度確認や定量測定を行いますが、これらの試料は少量しかない場合が多く、より微量での測定が求められています。

今回は試料の量が数 μL でも測定できる 2 種類のセル {TrayCell™ (Hellma Analytics 製) と Nano Stick (SINCO 社製)} を用いて、紫外可視分光光度計 UV-1900 で核酸の微量測定を行いましたのでご紹介します。また、UV-1900 のバイオメソッドに関して簡単にご紹介します。

K. Sobue

■ TrayCell を使用した核酸の測定

UV-1900 の外観を図 1 に示します。省スペース設計 (450 (W) × 501 (D) × 244 (H) mm) かつ人間工学に基づいたハードデザインを採用しています。操作パネルはカラータッチパネルになるとともに、「一目で状態が分かる」「一目で使い方が分かる」を実現したユーザインターフェース (UI) を採用しています。

核酸分析によく用いられる二本鎖 DNA の一種である Lambda-DNA を調製して、濃度の異なる標準試料を 5 点準備しました。また、エタノール沈殿の操作を行い未知濃度となった試料も準備しました。TrayCell では 2 種類の蓋があり光路長を 1.0 mm と 0.2 mm で使い分けことができます。今回は光路長 1.0 mm の蓋を使用し、4 μL 滴下して表 1 の条件で測定しました。図 2 に示す検量線は $\text{Abs}=0.0021\text{Conc.}$ と表せて、相関係数の 2 乗は 0.9999 となりました。未知試料を 3 倍希釈した場合 373 $\text{ng}/\mu\text{l}$ となり、希釈せず測定すると 1020 $\text{ng}/\mu\text{l}$ となりました。検量線測定時に使用した試料と共にスペクトルを図 3 に示します。また、440 $\text{ng}/\mu\text{l}$ の試料を繰り返し 10 回測定した時の結果を表 2 に示します。相関係数や CV 値から、TrayCell を使用し微小容量でも精度良く測定できていることがわかります。



図 1 UV-1900 の外観

表 1 測定条件

使用装置	: UV-1900
波長 (検量線)	: 260 nm、320 nm
波長範囲	: 220~330 nm
スキャンスピード	: 低速
サンプリングピッチ	: 1.0 nm

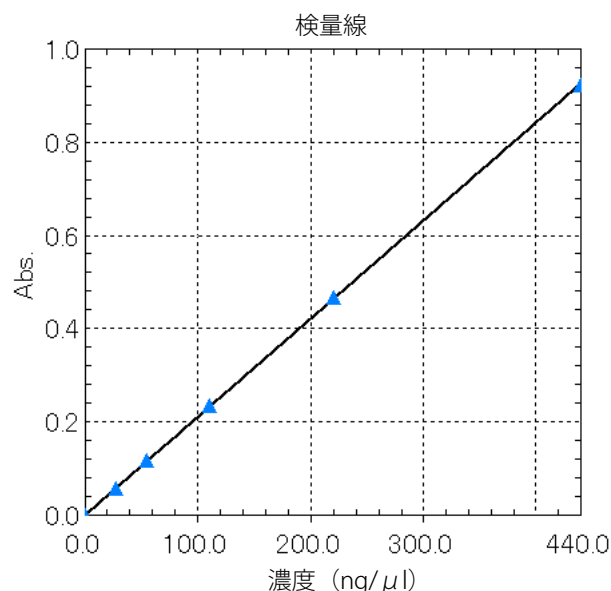


図 2 TrayCell を用いた場合の Lambda-DNA の検量線

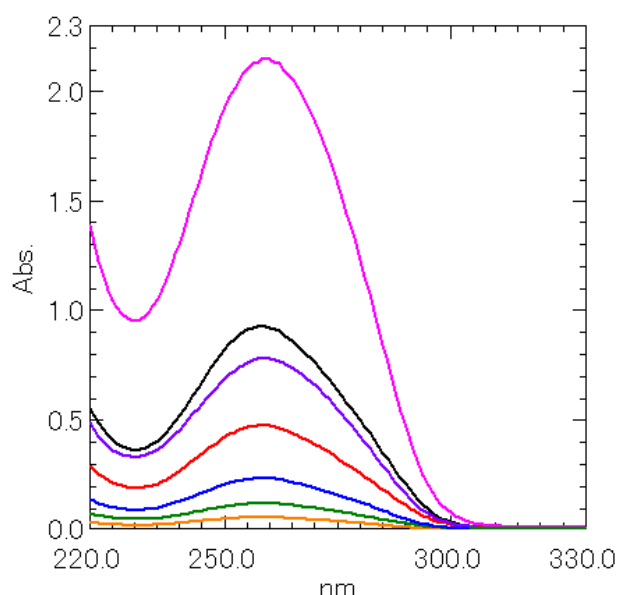


図 3 TrayCell を用いた場合の Lambda-DNA の吸収スペクトル
 ピンク：未知試料、紫：未知試料 3 倍希釈、黒：440 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 、
 赤：220 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 、青：110 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 、緑：55 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 、オレンジ：27.5 $\text{ng}/\mu\text{l}$

表2 TrayCell を用いた場合の繰り返し測定結果

No.	吸光度 (260 nm)	吸光度 (260 nm~320 nm)
1	0.933	0.932
2	0.931	0.929
3	0.935	0.931
4	0.935	0.929
5	0.934	0.934
6	0.935	0.933
7	0.933	0.930
8	0.936	0.933
9	0.926	0.927
10	0.941	0.939
平均値	0.934	0.932
標準偏差	0.0038	0.0034
CV 値 (%)	0.41	0.36

■ Nano Stick を使用した核酸の測定

次に Nano Stick を用いて TrayCell で測定した Lambda-DNA を表 1 と同じ条件で測定しました。Nano Stick の光路長は 0.5 mm であり、3 μ L で測定しました。図 4 に示す検量線は $Abs=0.0010Conc$ と表せて、相関係数の 2 乗は 0.9999 となりました。未知試料は 3 倍希釈した場合 365 ng/μ L となり、希釈せず測定すると 1066 ng/μ L となりました。検量線測定時に使用した試料と共にスペクトルを図 5 に示します。また、440 ng/μ L の試料を繰り返し 10 回測定した場合の結果を表 3 に示します。相関係数や CV 値から、Nano Stick を使用し微小容量でも精度良く測定できていることがわかります。

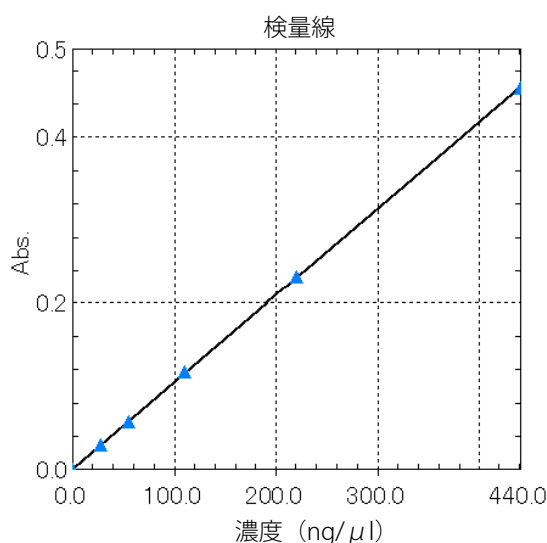


図4 Nano Stick を用いた場合の Lambda-DNA の検量線

表3 Nano Stick を用いた場合の繰り返し測定結果

No.	吸光度 (260 nm)	吸光度 (260 nm~320 nm)
1	0.467	0.461
2	0.472	0.457
3	0.471	0.464
4	0.465	0.458
5	0.468	0.458
6	0.471	0.459
7	0.471	0.459
8	0.469	0.459
9	0.470	0.459
10	0.468	0.460
平均値	0.469	0.459
標準偏差	0.0022	0.0020
CV 値 (%)	0.47	0.43

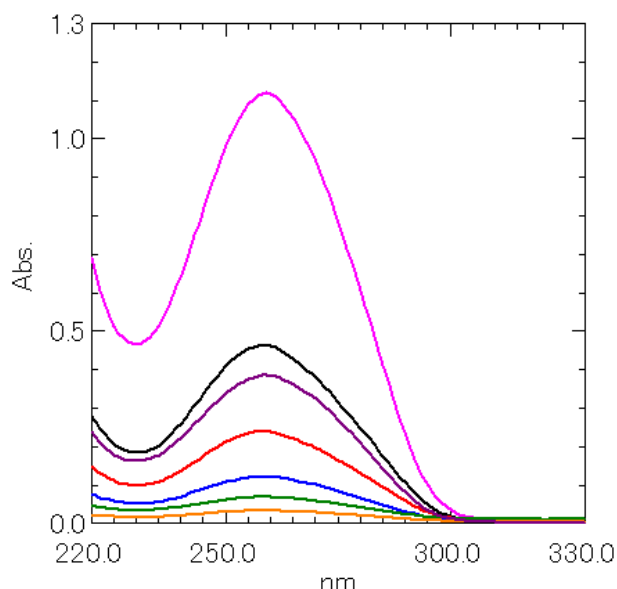


図5 Nano Stick を用いた場合の Lambda-DNA の吸収スペクトル
 ピンク：未知試料、紫：未知試料 3 倍希釈、黒：440 ng/μ L、
 赤：220 ng/μ L、青：110 ng/μ L、緑：55 ng/μ L、オレンジ：27.5 ng/μ L

■ UV-1900 のバイオメソッド

UV-1900 のバイオメソッドの中には、1 核酸定量、2 Lowry 法、3 BCA 法、4 CBB 法 (Bradford 法)、5 Biuret 法、6 UV 吸収法の 6 種類の測定条件が内蔵されており、目的に応じて簡単に測定ができます。UV-1900 は操作パネルのスクリーンショット機能を備えており、図 6 に核酸定量を用いた場合の測定結果画面を示します。純度の確認に使われる吸光度比や DNA 濃度、蛋白質濃度などを計算して表示することができます。



図6 核酸定量の測定結果画面

■ まとめ

紫外可視分光光度計 UV-1900 と TrayCell や Nano Stick を用いることで、数 μ L といった微量な試料でも精度良く簡単に測定できることが確認できました。また、UV-1900 のバイオメソッドを用いれば、簡単に吸光度比や DNA 濃度、蛋白質濃度を確認することができます。

TrayCell は、Helma GmbH の商標です。