

Application News

スペクトル評価機能を用いた核酸の定量分析と純度の自動合否判定

岡本 尚規、祖父江 和樹

ユーザーベネフィット

- ◆ スペクトル評価機能では、任意の波長や測光値に対して、閾値を設定して合否判定することが可能です。
- ◆ 核酸の定量分析にスペクトル評価機能を使用することで、定量だけでなく純度の合否判定を同時に行うことができます。

■はじめに

紫外可視分光光度計は溶液の定量分析に用いられますが、ランベルト・ベールの法則に従い、セル長が一定の場合、溶液濃度に比例する変数として吸光度値が用いられます。例えば、核酸の定量分析では、核酸塩基が最大吸収を有する波長260 nmの吸光度値を用いて定量測定を行います。核酸の塩基配列や配列長、使用する溶媒などにより吸光度値が変化します。このため、正しい定量結果を得るためにはオリゴヌクレオチドごとに吸光係数を算出することが一般的です。また近接波長に吸収を持つ、タンパク質などの夾雑物質が存在する場合にも、吸光度値が変化します（タンパク質の吸収波長は280 nm）。今回は、紫外可視分光光度計UV-1900i Plusおよび制御ソフトウェアLabSolutions™ UV-Visを用いて、核酸の吸収スペクトルを測定し、スペクトル評価機能の定量計算を使用することで、極大吸収波長における吸光度値を用いた定量分析を行いました。また、同時に、定量結果に影響を与える夾雑物質の有無を純度（260 nmと280 nmの測光値比：OD₂₆₀/OD₂₈₀）から確認し、合否判定を行いました。

■LabSolutions UV-Visによる定量分析

定量分析では濃度と濃度に比例する変数を用いて検量線を作成します。濃度に比例する変数は、指定した波長における吸光度値以外に、指定した波長範囲の極大吸収波長における吸光度値や面積値などが用いられます。

当社紫外可視分光光度計制御ソフトウェアLabSolutions UV-Visは、分析者の様々なニーズに対応できる測定用アプリケーションを備えています。測定用アプリケーションはLabSolutions UV-Visのランチャー画面（図1）から選択します。



図1 LabSolutions UV-Visのランチャー画面

測定アプリケーションである「定量」（図1の赤枠）では、指定した固定波長における吸光度値のみを測定することで検量線を作成し、対象物の定量分析を行うことが可能です。一方、測定用アプリケーション「スペクトル」（図1の青枠）では、設定波長範囲におけるスペクトルを測定後、スペクトル評価機能の定量計算を用いることで、設定した条件で検量線を作成し、対象物の定量分析を行うことが可能です。

■スペクトル評価機能の定量計算

スペクトル評価機能

スペクトル評価機能は、測定したスペクトルに対してあらかじめ登録した解析を自動で行い、その結果（評価値）に対して合否判定を行うことができる機能です。スペクトル評価機能はLabSolutions UV-Visのランチャー画面（図1）の測定アプリケーションである「スペクトル」を選択し、「評価」-「テーブル設定」-「評価項目」を設定することで使用することができます。図2にスペクトル評価機能の詳細設定画面を示します。

評価項目には測光値、最大値、最小値、ピーク、バレイ、面積、統計、カットオフなどがあり、これらを単独で使用したり組み合わせることによって、様々なスペクトル評価に対応することが可能です。



図2 スペクトル評価機能の詳細設定画面

スペクトル評価機能の定量計算

スペクトル評価機能の定量計算は、スペクトル評価機能の「評価項目」-「定量」から変数を選択し設定します。図3には、スペクトル評価機能の定量計算における設定画面を示します。定量計算に用いることができる変数は、測光値、ピーク、面積のほかに、表色系の三刺激値*、黄色度*など最大19種類から選択することが可能です。

スペクトル評価機能の定量計算では、これらの変数を用いた定量計算に測光値比であるOD₂₆₀/OD₂₈₀などの評価項目を組み合わせることによって、様々な定量評価に対応することが可能です。

*オプションソフトウェア LabSolutions UV-Vis Colorが別途必要です。

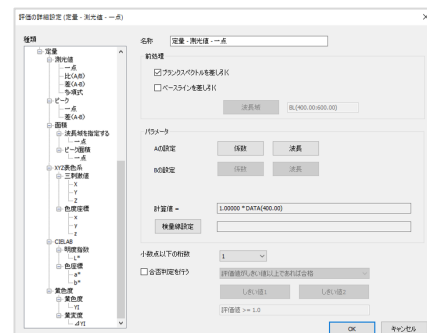


図3 スペクトル評価機能の定量計算設定画面

■核酸の吸収スペクトルを用いた様々な定量分析

核酸の一種であるオリゴヌクレオチドM13-F25merをバッファー（66.7 mMリン酸緩衝液）に溶解して500倍～10倍の希釈を行い、オリゴヌクレオチド濃度が0.2～10.0 ng/μLになるよう、測定溶液を調製しました。

紫外可視分光光度計UV-1900i Plus（図4）に超マイクロセルホルダを取り付け、光路長10 mmのマイクロブラックセルを用いてオリゴヌクレオチドのスペクトル測定を行いました。光路長10 mmのセルを用いることで、1.0 ng/μL以下の低濃度核酸溶液も測定することが可能です。



図4 UV-1900i Plusの装置外観

スペクトル測定の詳細な分析条件を表1に、各濃度のオリゴヌクレオチドの吸収スペクトルを図5に示します。

表1 スペクトル測定の測定条件

装置	: UV-1900i Plus
	超マイクロセルホルダ マイクロブラックセル
測定波長範囲	: 220 - 400 nm
データ間隔	: 0.5 nm
スキャン速度	: 中速
スリット幅	: 1 nm

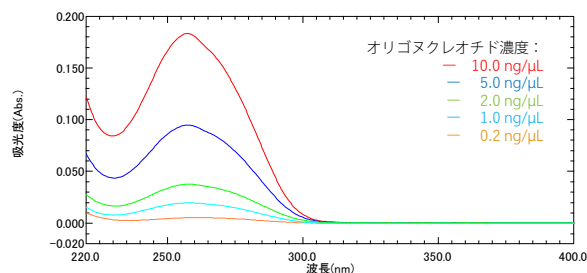


図5 濃度の異なるオリゴヌクレオチドの吸収スペクトル

図5に示したオリゴヌクレオチドの吸収スペクトルについて、得られた極大吸収波長を表2に示します。

表2 オリゴヌクレオチドの極大吸収波長

オリゴヌクレオチド濃度 (ng/μL)	極大吸収波長 (nm)
10.0	257.0
5.0	257.5
2.0	258.5
1.0	257.5
0.2	259.0

表2を見ると、希釈率の違いによって極大吸収波長位置が異なることがわかりました。そこで、固定波長および極大吸収波長の吸光度値を用いた検量線を作成し、比較を行いました。固定波長の吸光度値による定量ではスペクトル評価機能の「評価項目」-「定量」から「測光値」の項目で波長260 nmを設定し、極大吸収波長の吸光度値による定量では「評価項目」-「定量」から「ピーク」の項目を選択し、極大吸収波長とベースラインの波長範囲を選択しました。

上記の条件設定で各々の検量線を作成し、得られた結果を図6および図7に示しました。

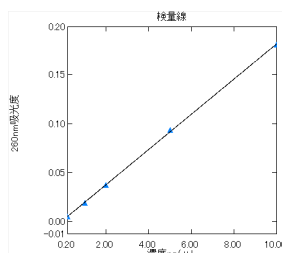


図6 固定波長で作成した検量線

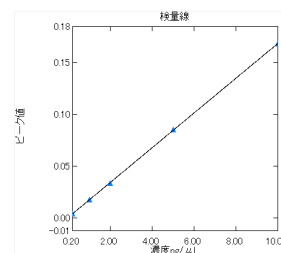


図7 極大吸収波長で作成した検量線

図6および図7で得られた相関係数の二乗値は、それぞれ $R^2=0.99976$ および 0.99992 となりました。

このように、濃度によって極大吸収波長が変動するような試料では、固定波長ではなく極大吸収波長を選択することにより、定量精度が向上することがわかりました。

■夾雑物質が混入した核酸純度の合否判定

図7に示した検量線を用いて未知試料の定量を行い、同時にスペクトル評価機能の測光値比（ OD_{260}/OD_{280} ）により核酸純度の合否判定を行いました。一般的に、測光値比が1.8以上の場合に核酸純度が高いとされ、次世代シーケンサーの測定でも推奨されているため、純度の合否判定は1.8以上に設定しました¹⁾。

オリゴヌクレオチドM13-M25merにウシ血清アルブミンを添加し、0.2 ng/μLに調整した溶液を夾雑物質が混入した疑似溶液としました。表1と同じ測定条件で測定した1.0 ng/μLのオリゴヌクレオチドとオリゴヌクレオチド+ウシ血清アルブミンの吸収スペクトルを図8に示し、スペクトル評価機能で核酸純度の合否判定を行った結果を表3に示します。表3より、疑似溶液中のオリゴヌクレオチド量は0.4 ng/μLという数値が得られましたが、測光値比は1.3となり、夾雑物質が原因で核酸純度が不合格となっていることがわかりました。

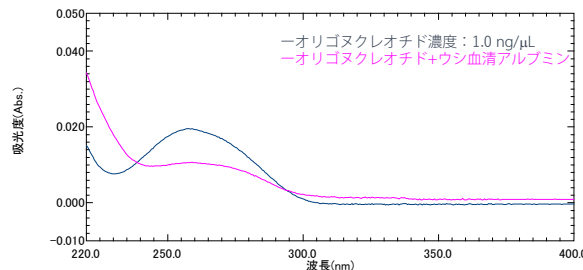


図8 オリゴヌクレオチドの吸収スペクトル

表3 スペクトル評価機能を使用した核酸純度の合否判定結果

ファイル名	ピーク定量		OD260 nm/OD280 nm	
	評価値	判定	評価値	判定
UNK_Contaminant_OligoDNA_Protein.vspd	0.4	N/A	1.3	FAIL

■まとめ

今回は、スペクトル評価機能の定量計算を用いて核酸の定量分析と核酸純度の合否判定を同時に行いました。この機能を使用することで、核酸の定量分析と純度判定を同時に実施することができます。また、核酸の熱安定性（ T_m ）解析および熱力学パラメータ解析のように、測定前に正確な核酸濃度の算出が必要な場合にも有効となります。

<参考文献>

- 1) L. Braglia, S. Giani, D. Breviaro, F. Gavazzi : Anal. Bioanal.Chem., 408, 8299 (2016).

<関連アプリケーション>

1. 核酸医薬品の熱安定性 (T_m) 解析と熱力学特性評価
[Application News No. 01-00322-JP](https://www.shimadzu.co.jp/Application_News/01-00322-JP)

LabSolutionsは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

01-00873-JP 初版発行：2025年 2月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器、体外診断用医薬品として承認・認証を受けておりません。本文書に記載されている分析手法を治療診断目的およびその手続き上で使用することはできません。

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。本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

▶ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



▶ UV-1900i Plus
紫外可視分光光度計

関連分野

▶ 医薬・バイオ医薬品

▶ 核酸・mRNA医薬品

▶ 価格お問い合わせ

▶ 製品お問い合わせ

▶ 技術お問い合わせ

▶ その他お問い合わせ