

微量 DNA および RNA 定量化

Infinite[®]F 200 および Infinite[®]M 200 における NanoQuant Plate[™]の使用



はじめに

現代の多くの遺伝学および法医学的な検査では、非常に少量の核酸の検出や定量化が必要となっている。核酸濃度を測定するにあたりもっとも一般的な方法は、260 nm (A_{260}) における吸光度の測定に基づくものである。DNA または RNA の純度は、260 または 280 nm における測定から得た吸光度の比較によって確認する (260/280 比)。

リアルタイム PCR アッセイおよびアレイハイブリダイゼーション実験には、色素標識したプローブが必要である。比較可能な結果を得るために重要なパラメーターの 1 つは、特定の色素を用いた DNA または RNA プローブの標識の程度である (標識効率)。

Tecan による新しい NanoQuant Plate によって、研究者は最大で 16 種類のサンプルを核酸の濃度および純度を同時に測定することが可能となる。さらに、この新しいツールを用いることで、色素を用いた核酸標識の効率を容易に測定することができる。

これらのアプリケーションでは、サンプル容量のたった 2 μ L しか必要としないため、分子生物学における最新のアプリケーションに対し、NanoQuant Plate は理想的なツールである。

材料と方法

機器

- インフィニット F200 フィルター方式検出システム (Tecan Austria, オーストリア)
- インフィニット M200 クワッド (4) モノクロメーター方式検出システム (Tecan Austria, オーストリア)

NanoQuant Plate

- 特別にデザインされた石英光軸を用いた 16 (2 \times 8) の個々のサンプルポジションを有する NanoQuant Plate (Tecan Austria, オーストリア)



図 1 : Tecan の NanoQuant Plate。図には、NanoQuant Plate をインフィニット 200 プレートリーダーによる検出を行う際の蓋を閉めた状態で示す。

各 NanoQuant Plate は、プレートリーダー内で正確な位置決めを行うために、最適化されたプレート定義ファイル (pdfx) とともにお届けします。

試薬

- 20×TE (Invitrogen、CA)
- ラムダ-DNA、100 ug/mL (Invitrogen、CA)
- ヌクレアーゼフリー水 (Fluka BioChemika、スイス)

ラムダファージ DNA は、最終濃度が 5、10、20、および 50 ug/mL となるように、ヌクレアーゼフリー水を用いて 1×TE に希釈する

測定パラメーターおよび設定

DNA の定量化および純度確認の測定について、インフィニット M200 およびインフィニット F200 機器におけるパラメーターを下記に示す。内部補正のための標準波長には、インフィニット M200 に対しては 310 nm における吸光度を、インフィニット F200 に対しては 340 nm における吸光度を選択した。

インフィニット 200 機器における測定	
パラメーター	設定
吸光度	260 nm
バンド幅	5 nm
吸光度	280 nm
バンド幅	5 nm
定着時間	0 ms
測定回数	25

表 1 : Tecan i-Control™ ソフトウェアを用いたインフィニット M200 およびインフィニット F200 における測定パラメーター

Tecan の i-Control を用いた容易な操作を可能とするために、選択制のアプリケーションタブを導入した。例 コントロールバー「核酸定量」。図 2 には、ブランク測定後のサンプル測定に際し i-Control ソフトウェアのワークフローパネルに現れる画面を示す。

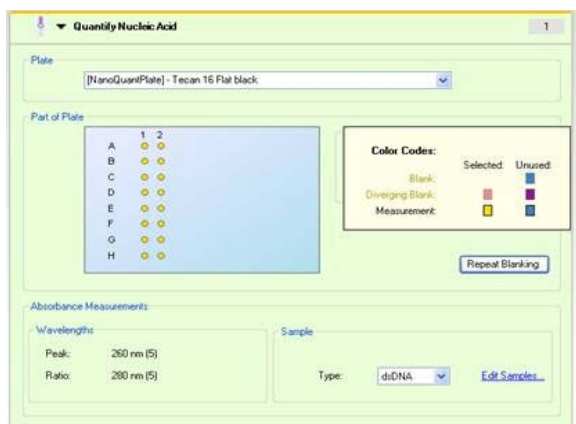


図 2 : i-Control ソフトウェアにおいてブランク測定後に現れる核酸定量画面

測定にあたり、NanoQuant Plate クイックガイド [1] に従い NanoQuant Plate を洗浄した。ブランク測定後に NanoQuant Plate の石英ポジションにピペットを用いてサンプルを注入した。サンプル注入にはマルチチャンネルピペットを用いた。

結果

核酸定量化のブランクおよび標準化の測定結果、純度確認および標識効率の測定に対する結果は、16 の測定ポジションすべてについて自動的に Excel® 上に表示される。図 3 には、例として 1 つのウェル (A1) に対する結果のみを示す。

DNA 定量化および純度確認

NanoQuant Plate を用いて 5 から 50 ug/mL の DNA サンプルを測定した。標準化およびブランク測定後の平均値を表 2 に示す。

DNA [ug/mL]	5	10	20	50
吸光度 260 [OD]	0.0047	0.0082	0.0184	0.0489
吸光度 260 [OD]	0.0023	0.0042	0.0098	0.0259
260/280 比	2.07	1.95	1.88	1.88

表 2 : 5 ug/mL から 50 ug/mL の DNA サンプルにおける吸光度測定。結果は NanoQuant Plate を用いてブランク補正された値である。

NanoQuant Plate を用いた核酸の定量化における検出限界は、約 3 ug/mL (または 3 ng/uL) と算出された。

標識効率

増幅した cDNA プローブを Cy5 によって標識し、NanoQuant Plate を用いて測定した。

サンプルタイプ	dsDNA	1			
Cy5:	649 nm	Abs		値	
A		260	0.2452	OD	191.20 ng/μl
		280	0.1563	OD	1.75 ratio
		Cy5	0.2093	OD	15.61 pmol/μl
		無		OD	pmol/μl

図 3 : A1 ポジションに対する測定結果の Excel シートアウトプット。260 nm、280 nm、および Cy5 吸光度の未処理データは左の列に示されている。核酸濃度、純度確認、および色素濃度の値を得るための算出値は右の列に示されている。

Cy5 標識プローブに対する付加的情報として、230~700 nm の吸光度スキャンを産出するためにインフィニット M200 のスキャンングオプションを用いた (図 4 参照)。

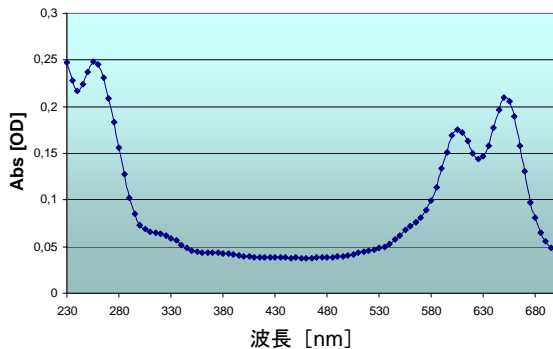


図 4 : Cy5 標識 cDNA プロブの吸光度スキャン。230~700 nm のスキャン、バンド幅 5 nm、曲線を生産するためプロットされているのは未処理値（非標準化、非ブランク化）である。Cy5 が 2 つの吸光ピーク（605 および 649 nm）を有することに注意。

結論

現代の多くの分子生物学的なアプリケーションでは、サンプルサイズがますます微量となり、現代の分子生物学では、微量サンプルにおける核酸濃度測定の意義について更に疑問を投げかけている。法医学的な解析においては、遺伝学的フィンガープリンティングに用いる DNA プロブが少数の細胞に過ぎないこともある。

再現性と高感度なツールと位置づけた NanoQuant Plate を検定用途に Tecan は供給を開始する。

色素標識プロブを用いたリアルタイム PCR アッセイおよびアレイハイブリダイゼーション実験におけるオリゴヌクレオチド標識反応の品質管理では、結果の評価に際し標識効率が重要なパラメーターとなる。NanoQuant Plate は、核酸プロブの標識効率の測定に対し容易に使用可能である。

算出に用いた各測定ポジションを参照するユニークな数学的アルゴリズムによって、NanoQuant Plate は信頼できる正確な結果が得られる理想的なツールとなっている。

Tecan Group Ltd.は、本稿に正確かつ最新の情報を記載するよう努力していますが、遺漏や誤りが無いとは限りません。このため、本稿にある情報の正確性、完全性について、Tecan Group Ltd.は明示的であれ黙示的であれ、一切の言明も保証も致しません。本稿を、随時、予告なく変更することがあります。このなかで言及した商標はいずれも、法律により保護されています。本稿に記載されている仕様の技術的詳細および操作の詳細については、最寄の Tecan 販売店に御連絡ください。本稿は、市場によっては入手できない製品について記載することがあります。最寄の販売店に御確認ください。

©2006, Tecan Trading AG, スイス、著作権所有。Tecan®は、主要諸国で、スイス、Männedorf の Tecan Group Ltd.の登録商標です。

Infinite™、Quad4 Monochromators™、i-control™ はスイス、Männedorf の Tecan Group Ltd.の登録商標です。

Molecular Probes™、PicoGreen®、RiboGreen®はアメリカ Invitrogen Corporation の登録商標です。

Tecan Asia (Pte) Ltd., T +65 644 41 886, Tecan Sales Austria GmbH, T +43 62 46 89 33, Tecan Sales International GmbH, T +43 62 46 89 33, Tecan Benelux B.V.B.A., T +32 15 42 13 19, Tecan Benelux B.V.B.A., T +31 18 34 48 17 4, Tecan Group Ltd., Beijing Rep. Office, T +86 10 586 95 936, Tecan Deutschland GmbH, T +49 79 51 94 170, Tecan France S.A.S., T +33 4 72 76 04 80, Tecan Italia S.r.l., T +39 02 215 21 28, Tecan Sales International GmbH, T +43 62 46 89 33, Tecan Japan Co. Ltd, T +81 44 556 7311, Tecan Nordic AB, T +46 31 75 44 000, Tecan Nordic AB, Rep. Office Denmark, T +45 70 234 450, Tecan Portugal, T +351 21 000 82 16, Tecan Sales Switzerland AG, T +41 44 922 89 22, Tecan Iberica Instr. S.L., T +34 93 490 01 74, Tecan UK Ltd., T +44 11 89 300 300, Tecan US Inc., T +1 919 361 5200

参考文献

[1] Quick Guide NanoQuant Plate™, 2008