



微量サンプルのハイスループット DNA 定量および純度測定

Tecan Spark™10M マルチ検出モードマイクロプレートリーダー、NanoQuant Plate™により微量サンプルの DNA 定量、純度測定、フルスペクトル解析を実現

緒言

ラボにおける高速で信頼性の高い核酸定量および純度測定の重要性は日々高まってきており、それを後押ししているのが次世代シーケンシング技術やハイスループット核酸解析技術である。いずれの手法においても、ダウンストリーム工程に後れを取らないよう、微量サンプルでの高速、高精度の解析が求められている。

Spark 10M マルチ検出モードマイクロプレートリーダーは、特許出願中の High Speed Monochromators (HSM) を搭載し、高精度、高再現性、超高速の吸光測定が可能である。この独自の光学システムによって、測定領域は 200~1,000 nm へと拡大され、特に A_{260}/A_{230} 核酸純度測定といった紫外線の吸光測定等、フルレンジの光学測定が可能となる。Spark リーダーはまた、特許取得 NanoQuant Plate (図 1) を用いることで、微量サンプルの吸光測定、蛍光測定にも最適である。この当社独自の石英光を使えば、わずか 2 μ l のサンプル量で、16 サンプルを同時測定することが可能である。

最も一般的な核酸濃度測定法は 260 nm (A_{260}) での吸光測定である。DNA または RNA サンプルの純度測定は 230、260、280 nm の吸光度の比較により行う ($260/280$ 比および $260/230$ 比)。DNA の

場合 $260/280$ 比が ≤ 1.8 、RNA の場合 ≤ 2.0 であれば、タンパク質 (芳香族基) およびフェノール類の混入が考えられる。 $260/230$ 比が ≤ 2.0 であれば、糖質、塩類、有機溶媒の混入が考えられる。



図 1: Tecan 製 NanoQuant Plate。微量サンプルの核酸定量が可能。

SparkControl™ソフトウェアは、「ワンクリック」で核酸定量を実行するようデフォルト設定されたアプリケーションで、速さと簡便さを兼ね備えている。本リーダーは 230、260、280 nm での吸光度を自動的に測定し、200~1000 nm の高速スペクトルスキャンを (1 nm ずつ) 実行する。これに要する時間は 1 サンプルにつき 5 秒程度であるため、試料蒸発といった問題を回避できる。SparkControl ソフトウェアによる測定後、吸光スペクトルが表示、解析される。

本テクニカルノートでは、Spark 10M リーダーを用いた微量 DNA 定量について詳述する。NanoQuant Plate を使用することで、フルスペクトル分析を含んだ、2 μ l のサンプルの DNA 定量を数秒間で実行することが可能である。

材料及び方法

- Spark 10M マルチ検出モードマイクロプレートリーダー
- NanoQuant Plate
- 96-ウェル UV-Star[®]、平底、透明マイクロプレート (Greiner Bio-One, オーストリア)
- トリス-EDTA (TE) バッファ (BioThema, スウェーデン)
- ファージ λ -DNA、300 μ g/ml (Invitrogen, 米国)
- 70%エタノール
- ddH₂O

測定パラメーターおよび機器設定

SparkControl ソフトウェアでは、「NanoQuant Nucleic Acid Quantitation」コントロールバーから、個別ブランキング (デフォルト設定) または平均ブランキングのいずれかを簡単に選択することができる。個別ブランキングでは、各ウェルのブランク値を用いて対応する測定値の減算を行い、平均ブランキングでは、ブランキングに使用した全ウェルの平均値を用いて測定値の補正を行う。図 2 は、ブランキング後、サンプルの測定を行った後の SparkControl ソフトウェアのワークフロー画面である。

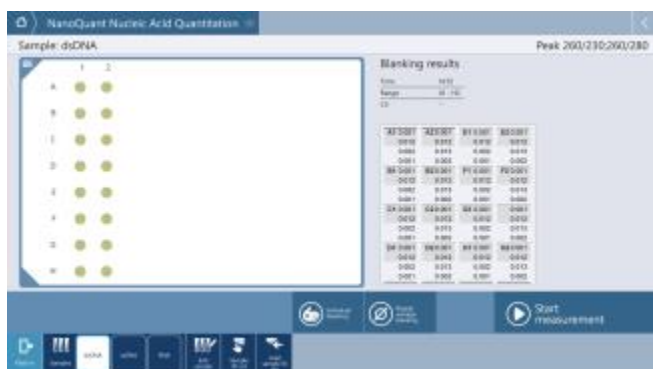


図 2: ブランキング後のアプリケーション画面

SparkControl ソフトウェアでは、310 nm を内部補正標準波長として、全波長領域の核酸定量測定が自動的に実行される。200~1,000 nm のフルスペクトルで、260/280 比、260/230 比の両方の結果が出される。

DNA 定量と純度測定

測定前に NanoQuant Plate の Quick Guide [1] に従い、ブランク溶液を用いてプレートを洗浄し、4 系列の濃度の 16 のレプリケートの測定を行った (表 1)。

| 希釈液 | 濃度 (μ g/ml) |
|-----|------------------|
| A | 50 |
| B | 25 |
| C | 12.5 |
| D | 6.25 |

表 1: 定量および純度測定に使用した DNA 濃度系列

OD₂₆₀ 直線性

260 nm での直線性をファージ λ -DNA 希釈系列を用いて測定した。表 2 のとおり、ファージ λ -DNA は EDTA バッファを用いて 1:3 ずつ連続的に希釈した。各濃度の 8 レプリケートの平均値をとってブランキングを行い、補正後の平均 OD₂₆₀ 値をプロットした。

| 希釈液 | 濃度 (μ g/ml) |
|-----|------------------|
| A | 300 |
| B | 100 |
| C | 33.3 |
| D | 11.1 |
| E | 3.7 |
| F | 1.4 |

表 2: ファージ λ -DNA の希釈系列

結果

DNA 定量と純度測定

レファレンス測定およびブランキング後の平均値を表 3 に示す。SparkControl ソフトウェアを用いて算出された DNA 濃度は、同サンプルの理論値濃度と完全に相関していることが明確に示された。260/280 比 および 260/230 比も、高純度 DNA サンプルとしての想定値内であった。測定値の均一性 (全 16 レプリケートの %CV) は良好で、1.44~8.54% であった。本アプリケーションで測定された DNA の理論値検出限界は 1 μ g/ml と算出された。

| DNA 濃度 (µg/ml) | | %CV | 260/280 比 | 260/230 比 |
|----------------|------|------|-----------|-----------|
| 理論値 | 測定値 | | | |
| 50 | 50.4 | 4.73 | 1.87 | 2.03 |
| 25 | 26 | 1.44 | 1.88 | 2.07 |
| 12.5 | 12.1 | 5.53 | 1.89 | 2.09 |
| 6.25 | 6.9 | 8.54 | 1.90 | 2.09 |

表 3: DNA 定量および純度測定の結果

単一 DNA サンプルのブランク減算後の 215~300 nm の DNA のスペクトルを図 3 に示す。スペクトルの精度は高く、サンプルに関する純度以外の情報も提供することになり、解析の効率ならびにラボの生産性向上の一助となる。

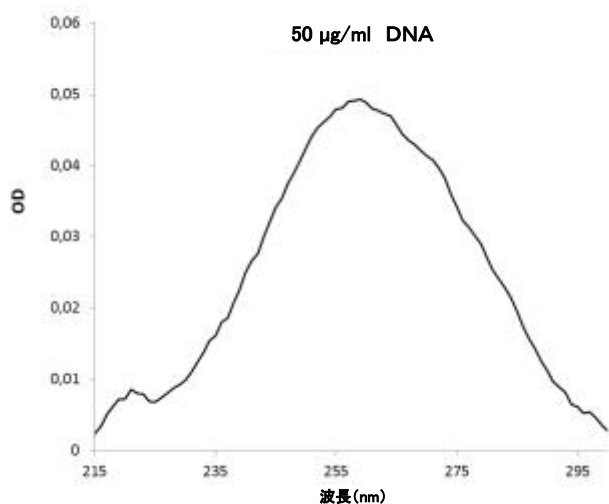


図 3: 容量 2 µl のサンプルを用いた NanoQuant Plate による測定値の、ブランク減算後の DNA スペクトル (50 µg/ml サンプル)。

OD₂₆₀ 直線性

表 2 に示した各濃度の DNA 溶液の、260 nm での直線性を図 4 に示す。OD 値 0~3.5 の R² の希釈曲線は概して 0.999 以上であった。すなわち、高濃度サンプルを希釈する必要なく、幅広い範囲の測定が可能であるということであり、解析効率および生産性の向上につながる。

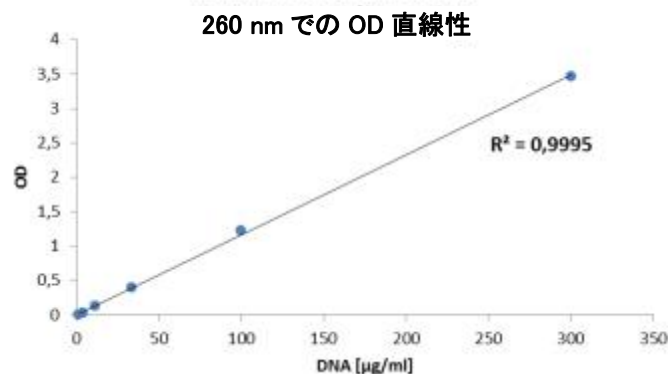


図 4: 260 nm での直線性

要約

Tecan Spark 10M マルチ検出モードマイクロプレートリーダーには High Speed Monochromators が搭載されており、超高速スキャン機能によって、サンプルごとに 5 秒弱でフルスペクトルのデータ取得および、高い直線性を有した DNA 定量が可能となる。この精巧なハードウェア設計を支えているのが、デフォルト設定された、核酸定量および純度測定「ワンクリック」ソフトウェアアプリケーションである。

本実験の結果、Spark 10M リーダーと NanoQuant Plate とを組み合わせれば、高い信頼性と効率性を兼ね備えた、微量サンプル向け核酸定量ツールとなることが証明された。また、専用ソフトウェアアプリケーションによって、核酸定量および純度測定 (260/280 比および 260/230 比) ならびに 200~1,000 nm のフルスペクトル高速スキャンが実行され、加えて、さらなる解析に資するその他の有用データの入手も可能となるのである。

参考文献

(1) Quick Guide NanoQuant Plate™ No.30035094 Rev

No. 1.4

※このテクニカルノートは Tecan (本社 スイス)が発行(原文英語)し、テカンジャパンが日本語翻訳したものです。翻訳文の表現等に疑義が生じた場合は、原文をご参照ください。

Australia +61 3 9647 4100 Austria +43 62 46 89 33 Belgium +32 15 42 13 19 China +86 21 2206 3206 Denmark +45 70 23 44 50 France +33 4 72 76 04 80
Germany +49 79 51 94 170 Italy +39 02 92 44 790 Japan +81 44 556 73 11 Netherlands +31 18 34 48 174 Singapore +65 644 41 886 Spain +34 93 595 95 25 31
Sweden +46 31 75 44 000 Switzerland +41 44 922 81 11 UK +44 118 9300 300 USA +1 919 361 5200 Other countries +43 62 46 89 33

Tecan Group Ltd.では本文書において正確かつ最新の情報をご提供するよう最善の努力を尽くしておりますが、誤謬や脱漏が生じる可能性があります。したがって、Tecan Group Ltd.では明示的または暗示的にかかわらず、本文書における情報の正確性または完全性につき、何らの表明または保証を行うものではありません。また、本文書は予告なく変更する場合があります。記載された商標はすべて法律によって保護されています。本文書に記載された仕様書の技術的詳細および詳しい手順については、テカンの担当者までご連絡ください。本文書で取り上げたアプリケーションおよび製品は一部の市場で入手困難な場合がありますので、営業担当者にお問い合わせください。

すべての記載された商標は法律で保護されています。本文書で記載された商標とデザインは Tecan Group Ltd. (スイス Männedorf) の商標、または登録商標です。完全なリストは www.tecan.com/trademarks で参照できます。リストには含まれませんが、ここに記載されている製品名および会社名はそれぞれの所有者の商標である場合があります。

Tecan は Tecan Group Ltd. (スイス Männedorf) の登録商標です。Spark, NanoQuant Plate, SparkControl は同商標です。

© 2014, Tecan Trading AG スイス 著作権所有

www.tecan.com www.tecan.co.jp/spark