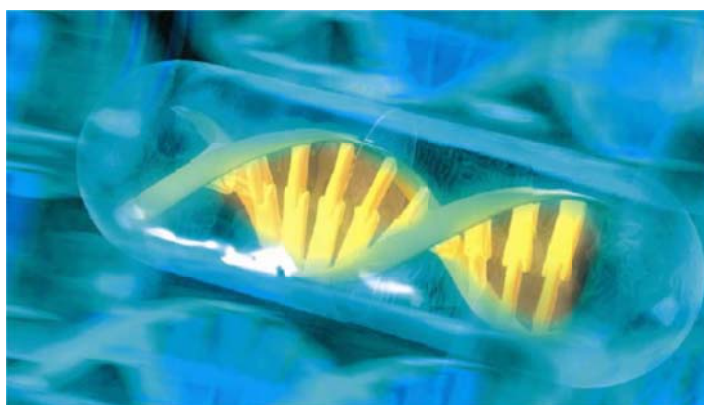


小容量サンプル中 DNA の蛍光測定法

NanoQuant Plate™の蛍光測定への適用性



緒言

分子生物学の手法の中には、DNA の正確な定量を要するものが複数ある。このような手法の例としてライブラリ作製のための cDNA 合成、フラグメント精製、PCR 増幅産物の定量が挙げられる。従来、核酸試料の濃度は波長 260 nm での吸光度 (A_{260}) を用いて測定される。しかし、吸光度法は感度に限界があり、DNA と RNA を区別することができない。代替法として、DNA 分子に結合する蛍光色素を使用して高感度で核酸試料を定量する方法がある。

Infinite® (インフィニット) 200 NanoQuant は完全装備の分光光度計であり、マイクロプレートの吸光度測定機能に加え、特別設計の NanoQuant Plate™を用いて小容量サンプル中の核酸を簡便かつ正確に定量する機能を備えている。また、インフィニット 200 NanoQuant は個々の目的に合わせたアップグレードが可能であり、2 μ L という小容量の蛍光測定用サンプルを分析する蛍光測定機能を付与することができる[1]。インフィニット 200 シリーズの全機種で NanoQuant Plate の測定が可能である。

本アプリケーションノートでは、Pico Green® (二本鎖 DNA 定量用の超高感度蛍光色素) を用いた小容量サンプル中 DNA の蛍光定量へのインフィニット 200 マルチモードリーダー及びその関連製品 NanoQuant Plate の適用について述べる。

材料及び方法

機器及びプレート

- インフィニット M200 マルチモードプレートリーダー Quad4Monochromators (Tecan, Austria)
- 石英光学部品を組み込んだサンプルポジション数 16 の NanoQuant Plate (Tecan, Austria)
- 96 ウェル平底ポリスチロール製マイクロプレート (Greiner BioOne, Germany)

試薬及び追加材料

- Quant-iT PicoGreen 定量用試薬 (Invitrogen, CA, USA)
- λ DNA 標準液、100 μ g/mL (Invitrogen, CA, USA)
- 20 \times Tris/EDTA バッファ (Sigma)
- ddH₂O
- 70%エタノール
- キムワイプ類
- シングル及びマルチチャンネルピペット、そのチップ

試薬の調製

20 倍濃度 (20 \times) の Tris/EDTA (TE) バッファを ddH₂O で希釈し 1 倍濃度とした (1 \times TE)。1 \times TE は Quant-iT PicoGreen 試薬及び λ DNA 標準液の希釈に使用した。

製造業者の指示に従い、Quant-iT PicoGreen 定量用試薬をストック溶液の 200 倍希釈により新たに調製した。

各希釈液の 50 μ L を 96 ウェルマイクロプレートのウェルに入れ、PicoGreen 溶液 50 μ L と混合して最終体積 100 μ L とした。TE バッファ 50 μ L と PicoGreen 定量用試薬を合わせたブランクを同じプレートに調製した。

DNA 希釈系列

表 1 の概要に従い、 λ DNA 標準液を 1 \times TE バッファで希釈して 1000~0.9 ng/mL の希釈系列を得た。

試料	DNA 濃度 [ng/mL]	2 μ L 中の DNA 量
1	1000	2.0 ng
2	500	1.0 ng
3	250	0.5 ng
4	125	0.25 ng
5	62.5	0.12 ng
6	31.3	0.06 ng
7	15.6	0.03 ng
8	7.8	0.015 ng
9	3.9	0.007 ng
10	1.9	0.003 ng
11	0.9	0.002 ng
12	0(ブランク)	0

表 1: λ DNA 標準液の TE バッファ中希釈系列

機器の設定

蛍光測定法には、NanoQuant Plate を標準の i-control™モードで使用しなければならない。

すべての測定前に NanoQuant Plate は対応する Quick Guide の説明[1]に従い、超音波洗浄機及び高圧圧縮機空気を用いて洗浄した。表 2 に示すパラメータに従い測定スクリプトを i-control V1.5 に設定した。

インフィニット M200 NanoQuant の測定設定	
パラメータ	設定
Plate	Tecan 16 Flat Black [NanoQuant Plate]
Part of the plate	A1-H2
Fluorescence	Top reading mode
Excitation	485 nm
Bandwidth	9 nm
Emission	535 nm
Bandwidth	20 nm
Gain	optimal
Flashes	25
Integration time	20 μ s

表 2: Tecan i-control™ソフトウェアを用いたインフィニット M200 NanoQuant の測定パラメータ及び機器の設定

PicoGreen 定量用試薬と比 1:1 で混合した各 DNA 希釈液 2 μ L をマイクロプレートのウェルから NanoQuant Plate のサンプルスポットに移した。プレートのふたを静かに閉め、表 2 にまとめたスク립トによりプレートの測定を実施した。すべての測定は少なくとも 3 反復の独立したサンプルについて実施した。

結果

直線性

生の測定データをブランクで補正し、平均値、標準偏差 (stdev)、CV を Microsoft Excel で算出した。平均値を直線図にプロットし、近似線を追加した。傾き及び決定係数 (R^2) を算出した。1000~0.9 ng/mL の λ DNA 希釈液の NQP (NanoQuant Plate) による測定は良好な線形性を示し、 R^2 は 0.9966 であった。

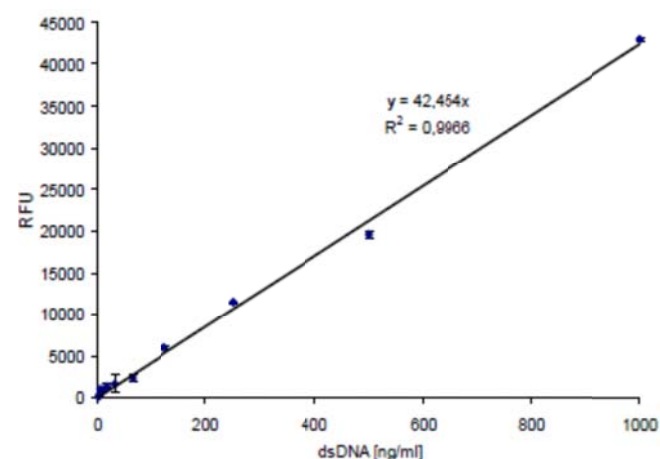


図 1: DNA 希釈液からの蛍光シグナルの線形性

感度

DNA 量 [ng/mL]	平均 RFU	標準偏差	CV[%]
1000	44285	40.31	0.09
500	20821	353.55	1.70
250	12691	41.72	0.33
125	7260	376.89	5.19
62.5	3636	323.15	8.89
31.3	2935	114.55	3.90
15.6	2615	169.00	6.46
7.8	2194	66.47	3.03
3.9	2247	21.92	0.98
1.9	1437	152.74	10.63
0.9	1479	224.15	15.15
0(ブランク)	1281	132.94	10.38

表 3: PicoGreen で蛍光発色させた濃度 1000~0.9 ng/mL の DNA 希釈液の 3 反復測定の平均 RFU 及び標準偏差

代表的な DNA 濃度として 250 ng/mL を選択し、この濃度のシグナルを用いて PicoGreen の蛍光発色による DNA 定量の感度を算出した。検出限界は次式に従い算出した。

$$\text{検出限界[ng/mL]} = \frac{3 \times \text{標準偏差}_{\text{ブランク}} \times [c]_{\text{サンプル}}}{(\text{平均シグナル} - \text{平均ブランク})}$$

得られた検出限界は dsDNA 濃度 8.7 ng/mL であった。この値は、NanoQuant Plate を使用したときサンプル量 2 μ L 中の dsDNA 量約 17 pg に相当する。

試料	1 mL 中の検出限界	2 μ L 中の検出限界(NQP)
250 ng/ml	8.7 ng	17 pg

表 4: NanoQuant Plate を用いた PicoGreen の蛍光発色による DNA 定量の検出限界

考察

サンプル中の核酸の正確な検出及び高感度の定量は、分子生物学における様々なアプリケーションの基本である。

Quant-iT PicoGreen システムに NanoQuant Plate の小容量測定特性を組み合わせると、17 pg という少量の dsDNA を定量する高感度で信頼性の高い方法となる。この値は、Quant-iT PicoGreen キットの公称検出限界(サンプル量 200 μ L 中 25 pg) よりはるかに低い。

この組み合わせでは、2 μ L という小容量のサンプルを分析できる NanoQuant Plate の機能により、Quant-iT PicoGreen システムの検出範囲はさらに改善され、試薬の仕様よりはるかに高い感度が得られる。

結論

インフィニット 200 を NanoQuant Plate と組み合わせて dsDNA の蛍光定量に使用すると、時間を節約した信頼性の高い方法となり、サンプルの消費を最低限にしながら高感度かつ正確な結果が得られる。

略語

cDNA	相補的 DNA
CV	変動係数
dsDNA	二本鎖 DNA
NQP	NanoQuant Plate
RFU	相対蛍光単位
RNA	リボ核酸
ssDNA	一本鎖 DNA
stdev	標準偏差
TE	Tris/EDTA

参考文献

- [1] Quick Guide NanoQuant PlateTM, 2008 (Tecan Austria)
- [2] Singer VL et al.: *Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation*. Analytical Biochemistry, 249, 228 - 238 (1997)

※このアプリケーションノートは 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。PicoGreen は米国 Invitrogen 社の登録商標です。