

テクニカルノート

#4 核酸パフォーマンスデータ

序文

核酸の定量は、NGS・qPCRを含め、多くのライフサイエンスプロトコルにおいて重要なステップです。ナノフォトメーターは、dsDNA、ssDNA、RNA、miRNA、オリゴなどの核酸が測定できます。また、miRNAおよびオリゴのシーケンスだけでなく、カスタムの吸光係数を入力することもできます。色素の吸収極大によりラベル化した核酸を測定することも可能です。色素の濃度と取り込み効率は自動的に計算および表示されます。

このテクニカルノートではナノフォトメーター NP80 の性能について、260nm で微量の核酸を定量し、直線性と精度の観点から説明します。核酸は 260 nm で特徴的な吸収スペクトルを示します。ランベルト・ベールの法則を利用して、サンプルの核酸濃度を決定できます。核酸濃度の測定だけではなく、ナノフォトメーター NP80 は 260/230 比と 260/280 比を計算することで、純度も評価します。ナノフォトメーターは、緩衝液またはコンタミネーションのためにブランクに大きなバックグラウンドが生じた場合、ユーザに自動的に警告するブランクコントロール機能があります（テクニカルノート#3「ブランクコントロール」もご参照ください）。

材料と方法

Sigma 社魚精子由来 DNA（カタログ番号 74782、ロットナンバー 1343783）を使用して、30,000 ng/μL の水溶性原液を調製しました。蒸留水で希釈し異なる濃度のサンプルを用意しました。希釈率は微量天秤（ザルトリウス、型式 BP221S）を使用し、重量で決定しました。予測吸光値は校正済みの UV/Vis 分光高度計 UVIKON XL（シリアルナンバー 110178）を使用し、10 mm 石英ガラスキューベット（Hellma Analytics、カタログ番号 100-QS）で決定しました。

全サンプルの測定にはナノフォトメーター NP80（シリアルナンバー M80798）を使用しました。

DNA 濃度の測定は 1 μL のサンプルを使用して、5 回実施しました。測定する前にサンプルをボルテックスで良く混ぜ、均一な状態にしました。測定が終わる度に、わずかに湿らせたリントフリーのティッシュで測定部とミラー部をきれいにし、新たにサンプルをアプライしました。

精度結果

表 1 では、予測 DNA 濃度と各 DNA 濃度の 5 回の測定値の平均値を示します。さらに各サンプルの 0.67 mm / 0.07 mm 光路長における吸光度の標準偏差 (SD) を示します。

表 1: DNA の測定結果

平均値は 5 回の測定値から算出。平均吸光度の SD (0.67 mm の光路 / 0.07 mm の光路)

予測 ng/μL	測定値 ng/μL	SD	光路長
1.89	1.62	0.0005	0.67mm
3.44	4.86	0.0031	0.67mm
7.99	9.62	0.0008	0.67mm
15.51	16.74	0.0002	0.67mm
29.55	31.26	0.0003	0.67mm
60.11	61.05	0.0005	0.67mm
117.66	117.91	0.0008	0.67mm
234.43	232.77	0.0022	0.67mm
468.71	467.93	0.0050	0.67mm
932.01	940.16	0.0075	0.67mm
1,863.91	1,936.84	0.0033	0.07 mm
3,711.00	3,809.34	0.0072	0.07 mm
7,369.30	7,521.32	0.0233	0.07 mm
14,711.00	15,469.20	0.0285	0.07 mm

比

ナノフォトメーター NP80 は 260/230 比と 260/280 比を計算してサンプルのコンタミネーションに関する情報を提供します。260/230 比は >2.0 に設定します。これより低い値の場合、核酸の単離/精製中に使用されるチオシアン酸グアニジンまたはその他の緩衝塩 (Tris、EDTA) などによるコンタミネーションを示します。260/280 比は核酸サンプル中の蛋白質の存在を示します。純度の高い DNA および RNA では、それぞれ ≥ 1.8 および ≥ 2.0 の吸光度比が出ます。

テクニカルノート

#4 核酸パフォーマンスデータ

直線性の結果

1.89~14,711 ng/μL レンジのカーブは、予測濃度と測定濃度間に密接な相関関係 ($R^2=0.9998$) があることを示しています (図 1)。

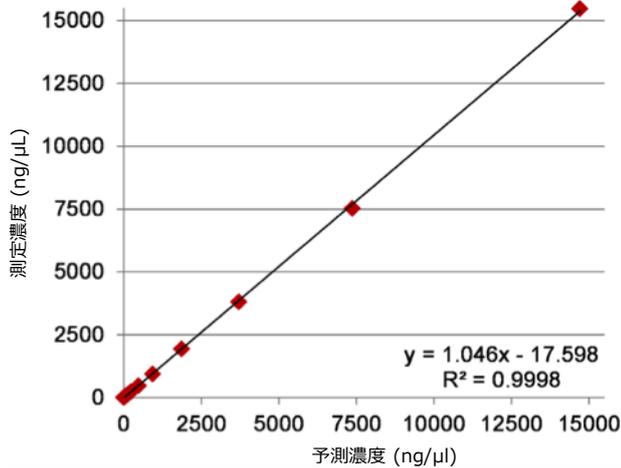


図 1: 1.89~14,711 ng/μL の DNA サンプル測定結果 (平均値) (光路長は自動的に選択)

図 2 は、光路長 0.67mm (希釈係数 15) で測定した、1.89~932 ng/μL の低濃度の DNA サンプルの直線性を示します。

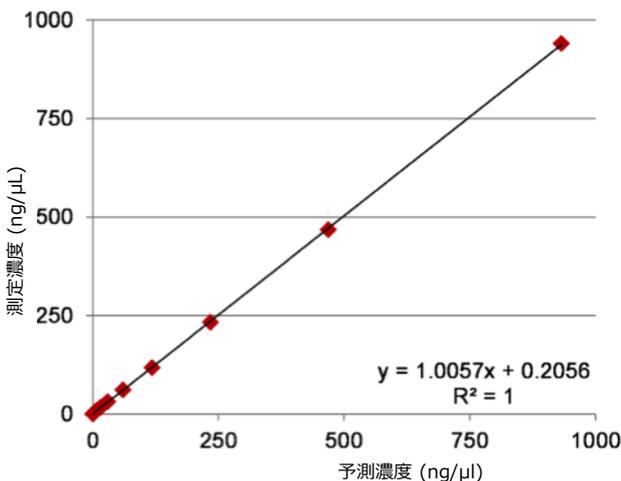


図 2: 1.89~932 ng/μL の DNA サンプル測定結果 (平均値) (光路長 0.67mm)

図 3 は、光路長 0.07mm (希釈係数 140) において測定した、1,863.9~14,711 ng / μL の高濃度の DNA サンプルの直線性を示します。

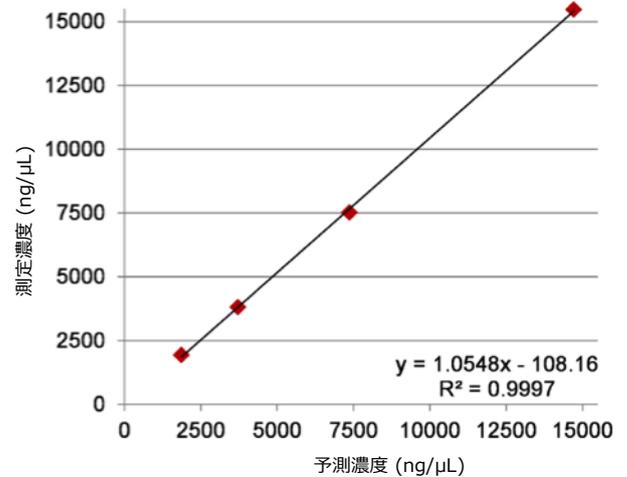


図 3: 1,863.9~14,711 ng/μL の DNA サンプル測定結果 (平均値) (光路長 0.07mm)

ディスカッション

このテクニカルノートでは、DNA サンプルのダイナミックレンジ全体において、ナノフォトメーターの優れた直線性 ($R^2=0.9998$) を示します。さらに、高精度の 2 種類の光路長は優れた精度と直線性に十分であることをデータが証明しています。2 つのアンカーポイントを備えたナノフォトメーターの密封式メカニカルセットアップにより、高精度の性能を保証します。

図 1 ではダイナミックレンジ全体を分析しているのに対し、図 2 および図 3 では低/高濃度サンプルに重点を置いています。その結果、ナノフォトメーター NP80 の検出の上限から加減にわたって、機器の精度と直線性の信頼性が非常に高いことが明確になりました。

サマリー (概要)

このテクニカルノートで示すデータは、機器のダイナミックレンジ全体にわたってナノフォトメーターの高精度と高直線性を示しています。

密封型光学環境において独自の True Path テクノロジーを利用し、固定アンカーポイントを備えたわずか 2 種類の高精度光路長より、装置内の機械的な変更がなくなります。技術的な詳細については、テクニカルノート #1 「True Path テクノロジー」をご参照ください。ナノフォトメーターは、True Path テクノロジーを使用した唯一の機器であり、機器が寿命に至るまで、再校正する必要がなく、精度の高い結果を提供します。