

正確なブランク – 一日で最も大切な測定

Thomas Sahiri, PhD, Implen GmbH, Munich, Germany

機器のブランク測定はラボの研究者によって頻繁に行われています。しかし Implen 社 NanoPhotometer または他の高品質な UV/VIS 分光光度計においてブランク測定が何を意味するものか、またブランク測定がいかに簡単にワークフローやその結果に大きな影響を及ぼすのかについてほとんどのユーザーは十分には理解していません。

ブランクの測定は、その日うちの最も重要な測定です。ブランクが不正確、もしくはうまくいかない場合、全ての測定値が不正確になってしまいます。そのため、本資料ではブランクの科学的背景、また測定結果に悪影響を及ぼす可能性のある要因について、いくつかご紹介いたします。

ランベルト・ベールの法則¹

分光光度計で測定が行われる度、波長ごとの光強度が機器によって記録され、透過率(T)が決定されます。

$$T = I / I_0$$

(I)はサンプルを通過した後の光強度、(I₀)は光強度の初期値です。(A 吸光度)と(T)の関係は次の通りです。

$$A = -\log T = -\log (I / I_0)$$

ブランク測定の度にブランク溶液の透過率が記録され、サンプルの測定値を補正するためのバックグラウンドとして分光光度計のコンピューターに保存されます。

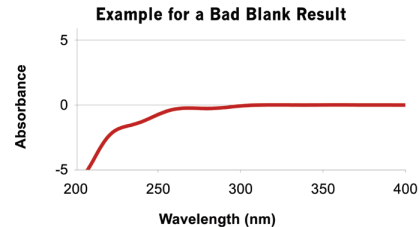
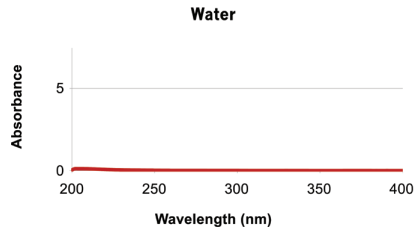
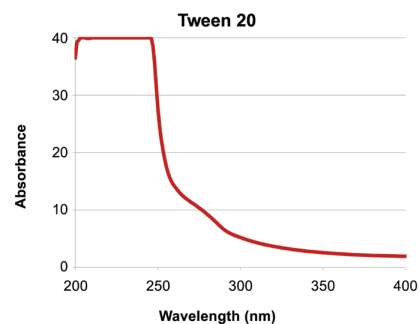
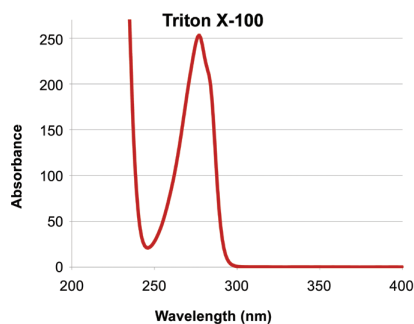
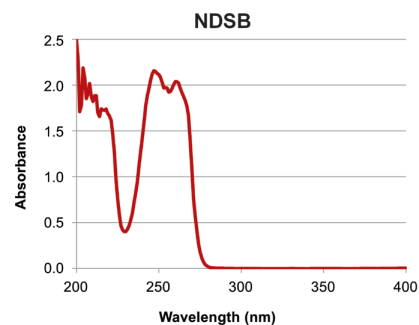
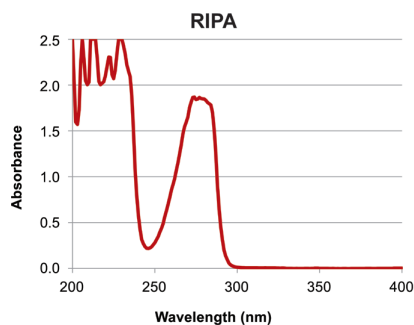
$$A = -\log T = -\log (I / I_0)_{\text{sample}} / (I / I_0)_{\text{blank}} \\ = e \cdot c \cdot l$$

(e)吸光係数 (c)濃度 (l)光路長

サンプルの吸光度は、分光光度計に保存されたバックグラウンド(ブランクの吸光度)に大きく依存していることが明白です。

ここで、ブランクが不正確であるというだけで研究者が1日のハードワークを台無しにしないために、いくつかの手順の概要を説明します。各ステップでは必ず新しいピペットチップを使用してください。

- ブランク測定のため、常に最初に新鮮な脱イオン水を利用してください。測定部に1滴(1 - 1.5 µL)、ピペットでアプライし、ブランク値を取得します。気泡を避けるため、リバースピペッティング²をお勧めします。脱イオン水を利用できない場合、開封直後の飲料水を利用できます。容器を開封すると汚染の恐れがあるため、RNAse フリーと言われているものでも、開封済みの水は使用しないでください。
- ブランク測定後の脱イオン水を、清潔で乾燥したキムワイプで取り除きます。次に新鮮な脱イオン水を再度アプライし、サンプルとして測定します。気泡を避けるため、リバースピペッティングをお勧めします。負のピークが表示される場合や、またはスペクトルが水平の平坦な線でない場合は、測定部が十分にクリーニングされていないか、ブランクに使用されている水が汚染されていることを示しています。完全に平らなスペクトルが得られるまで、ブランクを繰り返します。
- バッファーをアプライし、サンプルとして測定します。ここでも、リバースピペッティングをお勧めします。バッファーには通常、界面活性剤や気泡を生じるその他成分が含まれています。界面活性剤などの泡を生じる成分を含むバッファーを利用する場合は、必ずリバースピペッティングをしてください。バッファーに、選択した波長範囲内の光を吸収する成分が含まれている場合、すぐに1つまたは複数のピークが表示されます。これらのピークがサンプルの測定範囲と一致しないことを確認してください。タンパク質や核酸のUV測定での使用に適さないバッファーまたは成分の例として、RIPA、Tween 20、NDSB、Triton X があります。



- 一部のバッファーは、時間の経過とともに劣化または変化する可能性があります（pH など）。そのため新鮮で汚染されていない溶液のみを使用し、サンプル測定中にバッファーの性質が変わらないようにしてください。pH、EDTA 濃度の変化などは測定値に影響を及ぼすため、結果の精度（総濃度、比率）にも影響を及ぼします。
- バッファーがサンプルに干渉しないことが確認できたら、バッファーをブランクとして記録し、バッファーの寄与を補正することができます。バッファーをアプラインしてブランクを押すだけです。新しいバッファーを再度アプラインしサンプルとして測定して、水平の平らな線が表示されることを確認します。

クリーニングは、最初に湿らせたキムワイプで行い、次に乾いたワイプで測定部と Lid のミラーから残っている水分を取り除きます。必要に応じて 70% アルコールを使用し、水に溶けない汚染物質を取り除きます。アルコールは UV の高い範囲で吸光度を示す可能性があるため、アルコールの後は、水で湿らせたキムワイプと乾いたワイプでクリーニングします。表面にアルコールが残っていないことを確認する必要があります。誤って汚染物質が混入しないように、常に新鮮な脱イオン水を使用してください。

リバースピペッティング²について：リバースピペッティングは、泡や泡の形成を減らすため、泡立ちやすい溶液を分注する際に一般的に推奨される手法です。タンパク質、核酸、またはその他の少量の液体を分注する場合、フォワードピペッティングよりもリバースピペッティングの方が、はるかに正確です。リバースピペッティングは、次の手順に従って行ってください。

1. 正しいチップがピペットに取り付けられていることを確認します。プランジャーを 2 段目まで押し込みます。吸引するのに十分な深さまで、サンプル容器にチップを入れます。
2. プランジャーをゆっくりと元の位置に戻します。
3. プランジャーを 1 段目まで静かに押して液体を分注します。潜在的な泡や気泡を含む液体がチップ内に残ります。
4. 必要に応じて、チップに残ったサンプルをサンプル容器に戻すことができます。
5. チップを外します。

Implen 社 NanoPhotometer には、ブランクコントロールという機能を備えています。これはバッファーの汚染と潜在的なバックグラウンドを自動的に特定するのに役立つ新しいテクノロジーです。特に超低濃度サンプルの測定では、このアプリケーションノートに記載されているプロトコルに従って、適切なブランク測定を行われることをお勧めします。

参考文献

¹ UV-VIS-Spektroskopie und ihre Anwendungen, Heinz-Helmut Perkampus, Springer 1986

² Practical Approaches to Method Validation and Essential Instrument Qualification, Chung Chow Chan, Herman Lam, Xue-Ming Zhang, Wiley 2010

提供 : Implen GmbH 文責 : ワケンビーテック株式会社



ワケンビーテック株式会社