

SpectraMax ABS Plus マイクロプレートリーダーを用いた微量サンプルのハイスループットな DNA とタンパク質の検出

Hoang Ha | Applications Scientist | Molecular Devices

はじめに

核酸とタンパク質の定量は、遺伝学と分子生物学において、多くの高度なアッセイの初期段階で行われる重要な測定です。これらの定量のために様々な手法が開発されてきましたが、最も一般的に利用されている方法は、紫外光 (UV) 分光測定法です。すべての分子が特定の波長範囲の光を吸収または透過することが分光測定法の原理であり、サンプルのモル吸光係数と光路長が明らかであれば、分子の濃度はランベルト・ベールの法則 (式 1) を用いて算出できます。

$$A = \epsilon cL$$

式 1: ランベルト・ベールの法則は、吸光度 (A) は測定する分子のモル吸光係数 (ϵ)、濃度 (c)、測定に用いた光路長 (L) の積に等しい、ということを表しています。この式を変形すると、吸光度から濃度を求めることができます。

核酸の定量法はすでに確立されており、その基本原理は当初からほとんど変わっていません。核酸の濃度を求めるにはサンプルの 260 nm の吸光度を測定し、230 nm と 280 nm の波長で補助的な測定を行ってサンプルの純度を確認します。

タンパク質も UV 分光測定法で定量できますが、より正確な比色定量法を利用することもできます。UV 分光測定法は 280 nm の光を吸収するトリプトファン芳香族アミノ酸としての性質を利用していますが、アミノ酸配列中のトリプトファン残基の数が多様であることから、算出されたタンパク質濃度に誤差がある場合があります。その代わりに、ピシニコニン酸 (BCA) タンパク質アッセイではアミノ酸配列の構成や長さとは無関係にタンパク質濃度を測定できます。このアッセイは、アルカリ性環境下でペプチドが銅イオンに配位するビウレット反応を利用しており、キレート錯体の形成によって呈色される紫色の濃さを測定します。

利点

- 190 ~ 1000 nm の波長範囲で定量実験の幅が広がります
- SpectraDrop 微量サンプル測定プレートを用いることで、感度を維持しながらサンプル容量を最小限に抑えられます
- SoftMax Pro ソフトウェアにプリセットされたプロトコルを用いることで、実験を単純化し、迅速に進められます

SpectraMax® ABS Plus は、このようなタイプの定量アッセイに理想的な、コンパクトな紫外・可視光吸光マイクロプレートリーダーです。このアプリケーションノートでは、SpectraMax ABS Plus と SpectraDrop™ 微量サンプル測定プレートおよび SoftMax® Pro ソフトウェアとを組み合わせ、二本鎖 DNA とウシ血清アルブミン (BSA) タンパク質を定量する方法をご紹介します。

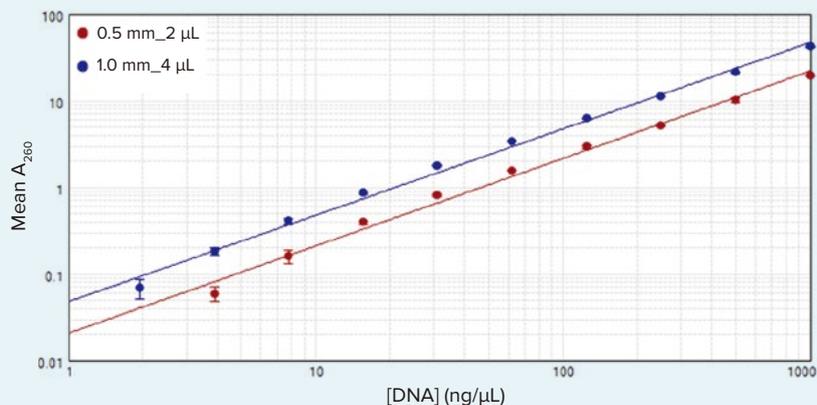


図1 SpectraDrop 微量サンプル測定プレートを用いた二本鎖 DNA の定量。SpectraMax ABS Plus マイクロプレートリーダーと SpectraDrop 微量サンプル測定プレートを用いて二本鎖 DNA サンプルを測定しました。光路長 1.0 mm (青) のカバースリップでは 2 ng/μL まで、0.5 mm (赤) のカバースリップでは 4 ng/μL までの DNA を定量性良く検出できました。

1.0mm_4uL												
Sample	Well	KnownConcentration ng/uL	A260	Average A260	STDev A260	A280	A230	260:280	260:230	Co		
01	H7	1000.000	41.445	41.776	0.889	21.457	17.843	1.931	2.323			
	I7		41.351			21.470	17.785				1.926	2.325
	J7		41.207			21.322	17.663				1.933	2.333
	K7		43.101			27.930	24.539				1.543	1.756
02	H8	500.000	21.129	21.102	0.103	10.872	8.875	1.944	2.381			
	I8		21.029			10.808	8.813				1.946	2.386
	J8		21.015			10.801	8.817				1.946	2.383
	K8		21.237			11.183	9.203				1.899	2.308
03	H9	250.000	11.329	11.282	0.041	5.859	4.691	1.933	2.415			
	I9		11.257			5.808	4.641				1.938	2.426
	J9		11.259			5.816	4.639				1.936	2.427
	K9		Masked			Masked	Masked				Masked	Masked
04	H10	125.000	6.335	6.296	0.035	3.367	2.567	1.881	2.468			
	I10		6.283			3.321	2.505				1.892	2.508
	J10		6.269			3.320	2.509				1.889	2.499
	K10		Masked			Masked	Masked				Masked	Masked
05	H11	62.500	3.449	3.425	0.031	1.914	1.349	1.802	2.557			
	I11		3.395			1.868	1.291				1.818	2.630
	J11		3.401			1.884	1.311				1.806	2.594
	K11		3.453			1.909	1.331				1.808	2.594

図2 SoftMax Pro ソフトウェアにプリセットされたデータテーブル。ソフトウェアにプリセットされたプロトコルは、未知のサンプルの吸光度比と濃度の自動計算が組み込まれており、DNA の定量実験を単純化しています。

材料

- SpectraMax ABS Plus マイクロプレートリーダー (Molecular Devices #ABS Plus)
- SpectraDrop 微量サンプル測定プレート (Molecular Devices #0200-6262)
- 96 ウェル透明平底ポリスチレンマイクロプレート (Greiner Bio-One #655101)
- UltraPure™ 仔ウシ胸腺 DNA 溶液 (ThermoFisher Scientific #15633019)
- Pierce BCA タンパク質アッセイキット (ThermoFisher Scientific #23225)
- Pierce™ ウシ血清アルブミン標準アンブル、2 mg/mL (ThermoFisher Scientific #23209)
- UV-Star® 96 ウェルマイクロプレート (Greiner Bio-One #655801)

方法

DNA の定量

UltraPure 仔ウシ胸腺 DNA を 1 × PBS を用いて希釈し、1000 ng/μL から 2 倍の希釈系列を作製しました。2 μL または 4 μL のサンプルを SpectraDrop 微量サンプル測定プレート (64 ウェルタイプ) にピペットで分注し、それぞれ光路長 0.5 mm または 1.0 mm のカバースリップで覆いました。SoftMax Pro ソフトウェアで、プリセットされたプロトコル「SpectraDrop DNA Quantitation」を開き、所定の条件でプレートを読み取りました。また、測定データに log-log (両対数) カーブフィットを適用し、検量線を作成しました。さらに、すべての濃度について 220 nm から 350 nm までの範囲を 4 nm 刻みでスペクトルを測定し、サンプルの純度を評価しました。

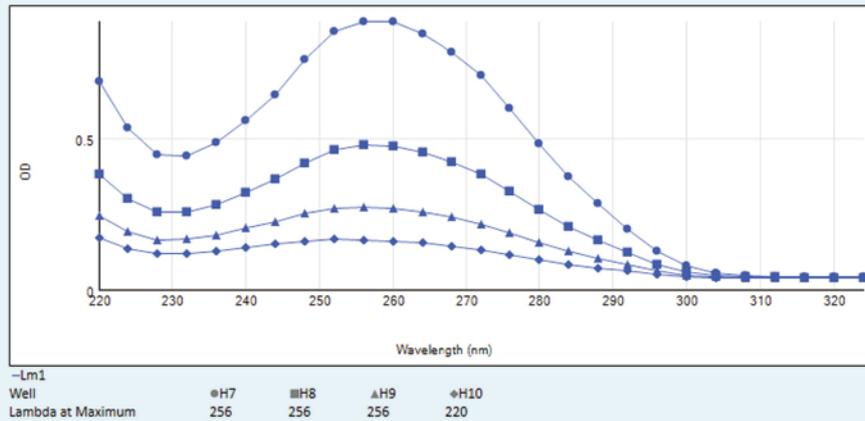


図3 スペクトルスキャンによるサンプル純度の評価。サンプルの純度を評価するため、スペクトルスキャンを行いました。4種類の濃度のDNAサンプルを測定したところ、260 nmのピークのみが識別され、高純度な二本鎖DNAであることが示されました。

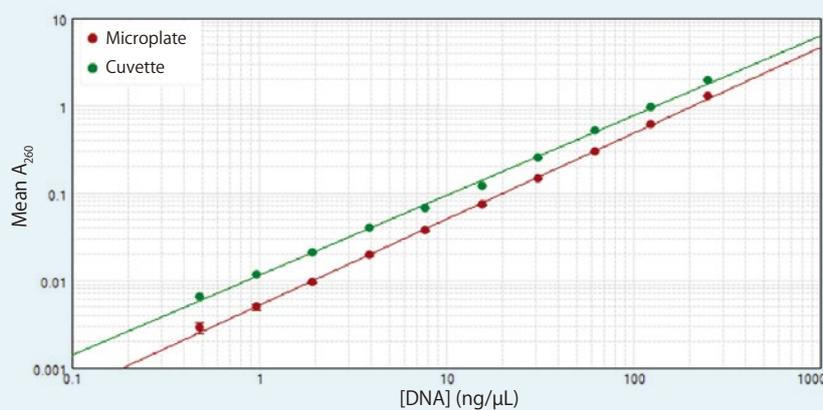


図4 96ウェルマイクロプレートおよびキュベットを用いた二本鎖DNAの定量。二本鎖DNAの希釈系列は、キュベットでもマイクロプレートでも0.50 ng/μLから250 ng/μLの範囲で検出可能でした。また、いずれの希釈系列でも高い直線性が得られました。

タンパク質の定量

BCAアッセイキットのプロトコルに従い、BSAを希釈して、検量線を作成しました。タンパク質標準溶液25 μLとBCA試薬200 μLを96ウェルプレートに分注し、37°Cで30分間インキュベートしました。SoftMax Proソフトウェアにてプリセットされたプロトコル「BCA」を開き、所定の設定で562 nmの吸光度を測定しました。データにQuadratic（二次式）カーブフィットを適用し、SoftMax Proソフトウェアを用いて検量線を作成しました。

結果

SpectraMax ABS Plus マイクロプレートリーダーは、微量測定プレートでも標準のマイクロプレートでも二本鎖DNAの濃度を定量できました。SpectraDropとプリセットされたプロトコルを使用すれば、SpectraMax ABS Plusによってわずか4 μLのサンプルを用いて2 ng/μLのDNAを検出でき、 A_{260}/A_{280} 比および A_{260}/A_{230} 比などの重要なパラメータを自動的に算出できました（図1、図2）。さらにスペクトルスキャンによって、サンプルに不純物がないことを示すことができました（図3）。

また、SpectraMax ABS Plusは、マイクロプレートでもDNAを定量できます。UV透過マイクロプレートを使用すると、わずか0.5 ng/μLのdsDNAを測定できました（図4）。

最後に、SpectraMax ABS Plusは、BCAアッセイを利用したタンパク質サンプルの定量にも使用できます。所定のプロトコルに従い、BSAの標準サンプルを測定したところ、アッセイキットの文献に記載されている検量線と同様の検量線を作成できました（図5）。

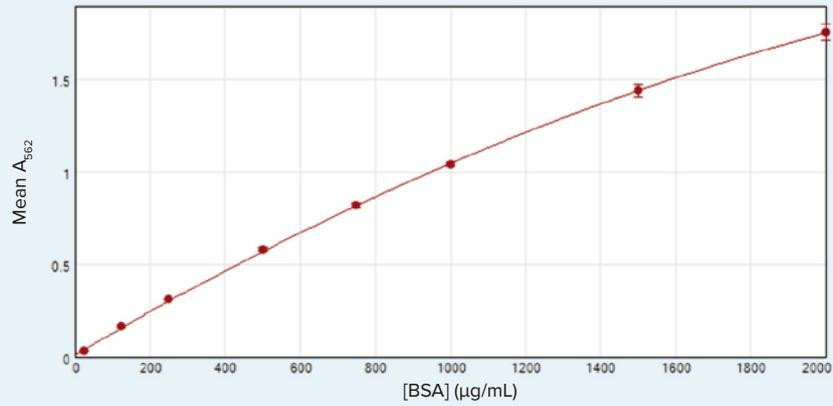


図5 BCA アッセイ検量線。SpectraMax ABS Plus は BCA アッセイにより BSA の標準サンプルを検出できました。SoftMax Pro ソフトウェアを用いてデータに Quadratic (二次式) カーブフィットを適用し、ロバスト性の高い検量線 ($r^2 = 1.000$) が得られました。

結論

SpectraMax ABS Plus マイクロプレートリーダーは、キュベットやマイクロプレートなどの様々なフォーマットで核酸やタンパク質を定量できる、コンパクトで柔軟性のあるマイクロプレートリーダーです。SpectraDrop 微量サンプル測定プレートと組み合わせて使うことで、1回の測定で、最大 64 種類のサンプルをわずか 2 µL の容量で定量できます。また、SoftMax Pro ソフトウェアのプリセットされたプロトコルにより実験を最適化でき、迅速に結果が得られます。

Contact Us

モレキュラーデバイスジャパン株式会社

Phone: [0120-993-656](tel:0120-993-656)

Web: www.moleculardevices.co.jp

Email: info.japan@moldev.com