

UV-Vis 分光光度計による超微量サンプルの濃度分析

Agilent Cary 60 UV-Vis と TrayCell 2.0 による
簡単に精密な非破壊濃度分析



著者

Geethika Weragoda,
Wesam Alwan, and
Fabian Zieschang
Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計に TrayCell 2.0 ウルトラマイクロボリュームセルを取り付けて使用し、タンパク質と核酸サンプルを分析しました。μL レベルのサンプルを非破壊で測定することは、サンプル保存、サンプルの取り扱い、煩雑でエラーが発生しやすい希釈を不要にするという点で有用です。TrayCell 2.0 は迅速かつ簡単に使用でき、ユーザーのワークフローが改善されます。

はじめに

最新のラボでは、DNA、RNA、タンパク質のようなサンプルを希釈せずに分析するための正確、精密で使いやすいメソッドへの要求がますます高まっています。Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計と、対象物に適した光路長のキャップを取り付けた TrayCell 2.0 ウルトラマイクロボリュームセルにより、超微量サンプルを直接測定するための便利で使いやすいプラットフォームを構成できます。高濃度と低濃度のサンプルに、それぞれ光路長が短いキャップと長いキャップを使用して分析することで、広いダイナミックレンジを確保できます。使用するメソッドは非破壊であるため、貴重なサンプルを回収することができます。また、TrayCell 2.0 は簡単にクリーニングでき、使いやすさに優れています。

Cary 60 UV-Vis 分光光度計 (図 1) は、反復的なルーチンアプリケーションや、より高度なアプリケーションにも対応できるように設計されています。また、本装置はダブルビーム方式で、強力で集束度の高いキセノンフラッシュランプが搭載されています。このランプでは、サンプルを通過する光線の強度を最大化することにより、高品質の測光結果が得られます。そのため、Cary 60 UV-Vis は、少量のサンプルを正確かつ高い再現性で測定する場合に最適です。キセノンフラッシュランプは、データ取り込み時のみサンプルを照射するため、感光性サンプルの劣化を防止するとともに、電力消費を抑えられます。さらに、Cary 60 UV-Vis 分光光度計は、室内光による歪みの効果の影響を受けません。このように、Cary 60 UV-Vis は室内光下でも測定可能であるため、サンプルコンパートメントを開けたまま簡単に操作でき、操作ミスによるデータ品質低下のリスクが低減されます。機器の制限のために不正確で再現性の低い結果が得られる場合のある既存のメソッドと比較して、高性能の Cary 60 UV-Vis では高品質のデータが得られます。



図 1. Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計

より持続可能なラボの実現に向けて

Cary 60 UV-Vis は、独立監査を受けており、環境負荷低減のための My Green Lab で検証済みの ACT ラベル (Accountability = 説明責任、Consistency = 整合性、Transparency = 透明性) を取得しています。このラベルには、Cary 60 UV-Vis がライフサイクル全体を通して環境に与える影響に関する情報が記載されています (図 2)。

Cary 60 UV-Vis は、生産性や科学的進歩を妨げることなく、ラボの環境負荷を改善します。



図 2. ACT ラベルには、製品とそのパッケージの製造、使用、廃棄が環境に与える影響に関する情報が記載されています。

一般的な吸光度測定では、TrayCell 2.0 ウルトラマイクロボリュームセル（部品番号 G6871C）を、Cary 60 UV-Vis 分光光度計の標準セルホルダに取り付けます。TrayCell 2.0 には、光路長 2.0 mm（部品番号 G6871-68005）、1.0 mm（部品番号 G6871-68004）、0.2 mm（部品番号 G6871-68003）、0.1 mm（部品番号 G6871-68002）という 4 種類の交換可能なキャップを取り付けることができ、広いダイナミックレンジが得られます。超微量サンプル（0.7～10 μL 、光路長に応じて異なる）を、TrayCell 2.0 にピペットで移し、選択した光路長に対応するキャップを上に取り付けます。Cary 60 UV-Vis の集束度の高い光線が、TrayCell 2.0 内の光ファイバーを通してサンプルに照射されます（図 3）。光線はキャップ内のミラーで反射され、再度サンプルを通過して分光光度計の検出器に戻されます（図 4 参照）。

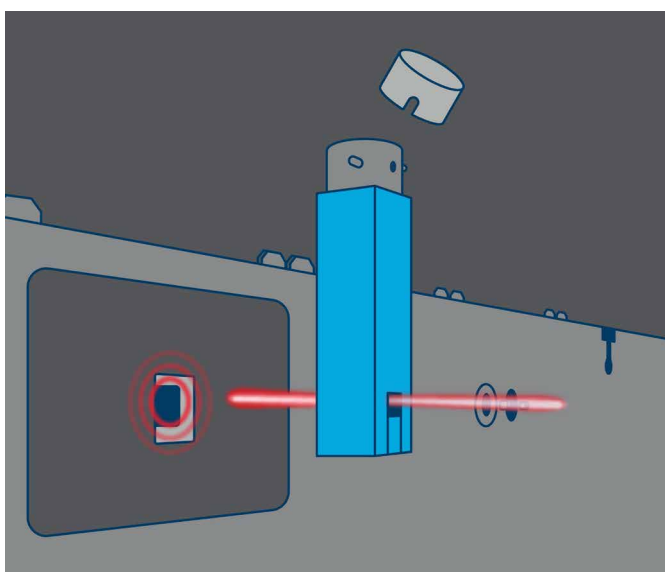


図 3. Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計に TrayCell 2.0 ウルトラマイクロボリュームセルを取り付けて、超微量サンプルを直接測定する際の概略図。TrayCell 2.0 を通過する、Cary 60 UV-Vis の集束度の高い光線を示しています。

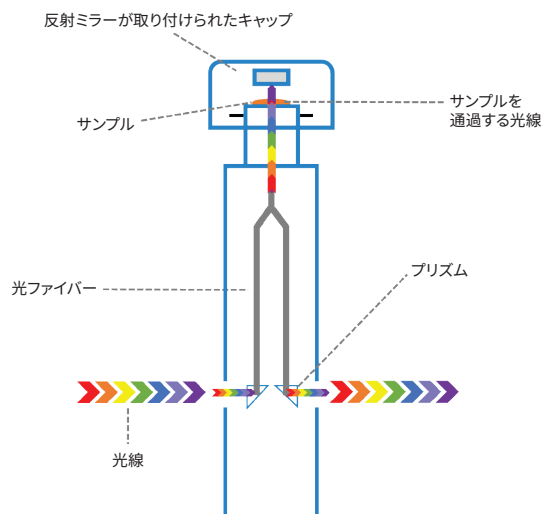


図 4. TrayCell 2.0 ウルトラマイクロボリュームセルの光学設計

次のサンプルを TrayCell 2.0 に移す前に、キャップ内部の窓とミラーをクリーニングする必要があります。窓のクリーニング時に、TrayCell 2.0 をセルホルダから取り外す必要はありません。キャップ内部の窓とミラーの間隔は正確に規定されているため、光路長の正確さが保証され、すべての測定において一定に保たれます。

この実験では、Cary 60 UV-Vis 分光光度計と TrayCell 2.0 ウルトラマイクロボリュームセルを用いて、超微量のタンパク質と DNA サンプルを測定しました。TrayCell 2.0 で光路長の異なるキャップを使用することにより、希釈を減らしてサンプルの測定可能な濃度範囲を拡大しました。ウシ血清アルブミン（BSA）とニシン精子 DNA サンプルを用いて、Cary 60 UV-Vis 分光光度計と TrayCell 2.0 の測光性能を評価しました。

機器と試薬

- Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計
- TrayCell 2.0 ウルトラマイクロボリュームセル
- BSA タンパク質：400 mg/mL の原液を調製するために、既知量の BSA タンパク質 (Sigma-Aldrich、CAS 9048-46-8) を、PBS 緩衝液 (リン酸緩衝生理食塩水) に溶解しました。原液を順次希釈して、異なる濃度でサンプルを調製しました。
- ニシン精子 DNA：5 mg/mL の原液を調製するために、既知量のニシン精子 DNA (Sigma-Aldrich、CAS 438545-06-3) を、PBS 緩衝液に溶解しました。原液を順次希釈して、一連のサンプルを異なる濃度で調製しました。

超微量 (3 μ L) のサンプルをピペットで移して測定し、Agilent Cary WinUV ソフトウェア、バージョン 5.1.3.1042 を使用して、データを取り込みました。

結果と考察

低濃度における測光再現性

Cary 60 UV-Vis 分光光度計に TrayCell 2.0 を取り付けられた際の有効な吸光度範囲を評価するために、高濃度と低濃度のサンプルを測定しました。低濃度の微量サンプル測定の場合は、超微量サンプル専用の TrayCell 2.0 が最適です。また、多くの分光光度計は、25 ng/ μ L 未満の濃度を測定できる感度を備えていないのに対して、Cary 60 UV-Vis は低濃度を測定するのに十分な感度を備えています。このような低濃度では分光光度計の性能が非常に重要になるため、波長スキャンを複数回実行して、代表的なサンプル曲線を確実に生成する必要があります。Cary 60 UV-Vis と、光路長 1.0 mm のキャップを取り付けた TrayCell 2.0 を使用して、20 ng/ μ L のニシン精子 DNA サンプルの 10 回繰り返し波長スキャンによる測定結果を取得しました。このサンプルの吸光度は 0.04 で、この値は 10 mm 標準キュベットの 0.4 Abs に相当します。図 5 に示すように、Cary 60 UV-Vis において、波長スキャンによる再現性の高い測定結果が得られました。これは超微量分析において重要なことです。

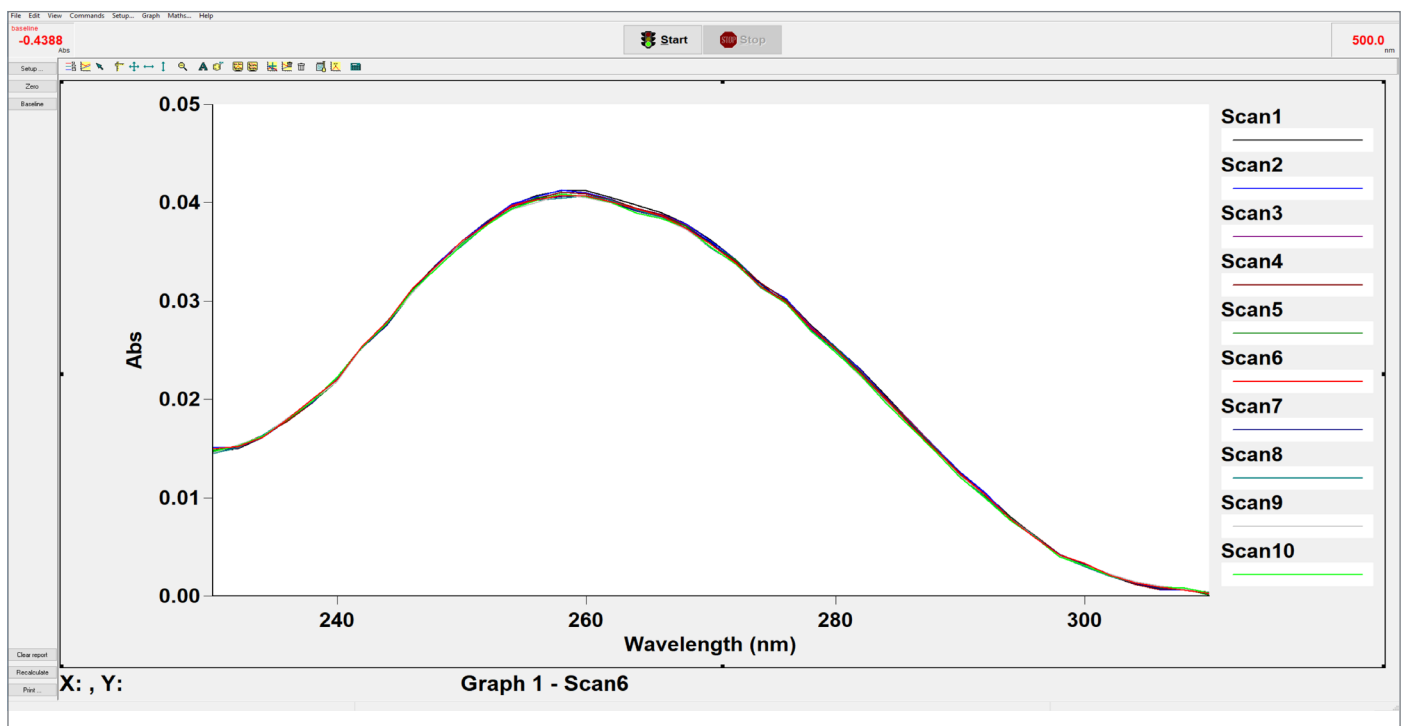


図 5. Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計と、光路長 1.0 mm のキャップを取り付けた TrayCell 2.0 ウルトラマイクロボリュームセルを使用して取り込んだ、ニシン精子 DNA の 10 回繰り返し波長スキャンによる測定結果 (20 ng/ μ L、260 nm で 0.04 Abs)

測光直線性

Cary 60 UV-Vis と TrayCell 2.0 を用いて、ニシン精子 DNA と BSA タンパク質の定量、定性分析をしました。光路長 1.0 mm のキャップは、3 ~ 5 μL の範囲のサンプル測定向けに設計されており、DNA、RNA、タンパク質濃度のルーチン分析に最適です。

ニシン精子 DNA の測光直線性の測定

濃度範囲 5 ~ 1,500 $\text{ng}/\mu\text{L}$ のニシン精子 DNA サンプルについて、260 nm におけるシングル波長吸光度測定を実施しました。図 6 に示すように、光路長 1.0 mm のキャップを取り付けた TrayCell 2.0 を使用した場合、最高 2.4 Abs まで優れた測光直線性を示しました。ニシン精子 DNA の 2.4 Abs に対応する濃度は 1,500 $\text{ng}/\mu\text{L}$ でした。光路長 1.0 mm のキャップを使用した場合、5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (0.008 Abs、相当吸光度 0.08) という非常に低濃度の DNA サンプルについても、優れた測光直線性を示しました (図 6 の挿入図)。

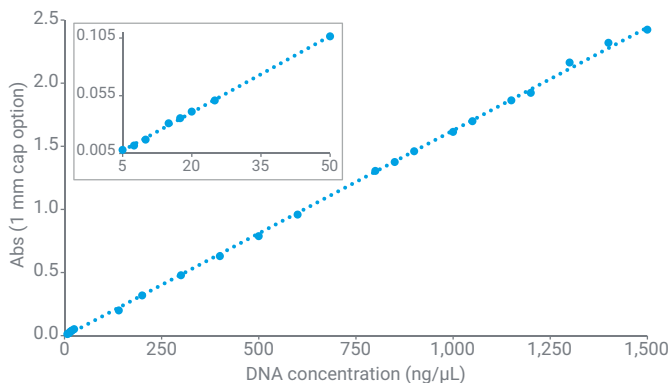


図 6. ニシン精子 DNA サンプルの最高 1,500 $\text{ng}/\mu\text{L}$ までの測光直線性。挿入図は、5 ~ 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ の低濃度サンプルの測定結果を示しています。

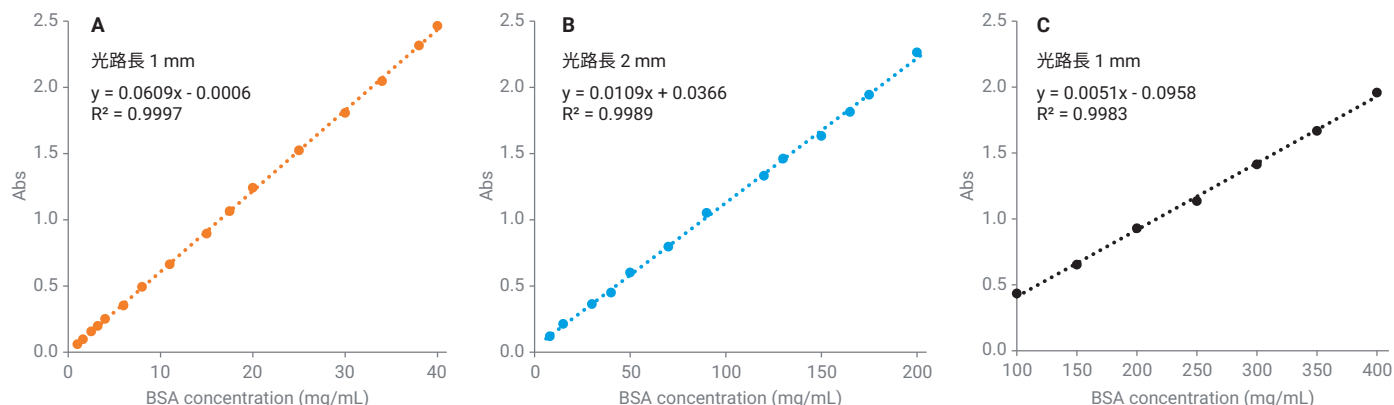


図 7. BSA 濃度の測光直線性の測定結果。(A) 最高 40 mg/mL まで光路長 1.0 mm のキャップを使用した場合、(B) 最高 200 mg/mL まで光路長 0.2 mm のキャップを使用した場合、(C) 最高 400 mg/mL まで光路長 0.1 mm のキャップを使用した場合

BSA タンパク質の測光直線性の測定

Cary 60 UV-Vis 分光光度計で、280 nm における BSA タンパク質のシングル波長吸光度測定を実施しました (濃度範囲 1 ~ 400 $\text{mg}/\mu\text{L}$)。ニシン精子 DNA サンプルと同様に、光路長 1.0 mm のキャップを使用した場合、最高 2.4 Abs まで優れた測光直線性を示しました (図 7A)。BSA タンパク質の 2.4 Abs に対応する濃度は 40 mg/mL でした。ここでは、TrayCell 2.0 のキャップを光路長が短いキャップと交換するだけで、高濃度の BSA タンパク質サンプルを正確に分析できました。光路長 0.2 mm のキャップを使用して、最高濃度 200 mg/mL まで BSA タンパク質を分析しました (図 7B)。200 mg/mL の BSA タンパク質に対応する吸光度は 2.3 でしたが、この値は 10 mm 標準キュベットでの 115 Abs に相当します。TrayCell 2.0 内で使用できる光路長が最も短い 0.1 mm のキャップを使用して、最高 400 mg/mL まで濃度を測定しました (図 7C)。

これらの結果より、Cary 60 UV-Vis に TrayCell 2.0 を取り付けて用いることで、時間がかかり誤差が生じやすい希釈を実施せずに、最高 400 mg/mL まで BSA タンパク質サンプルを簡単に直接測定できることが示されました (表 1)。

表 1. 光路長 1.0、0.2、0.1 mm のキャップを使用した場合の BSA タンパク質の相当吸光度の比較

	TrayCell 2.0 ウルトラマイクロボリュームセル		
	1.0	0.2	0.1
光路長 (mm)	1.0	0.2	0.1
最高濃度測定値 (mg/mL)	40	200	400
吸光度測定値	2.4	2.3	2.0
10 mm 標準キュベットの相当吸光度	24	115	200

注：相当吸光度は、光路長 10 mm で計算した吸光度の値です。最高 400 mg/mL を測定できる利点は、高濃度のタンパク質溶液を希釈することなく直接測定することが可能なことです。

Cary WinUV Concentration モジュールによる迅速かつ簡単なデータ取り込みと分析

Cary WinUV ソフトウェアには、データを取得、分析、保管、表示すると同時に、そのデータを効率的に管理するための強力な機能と合理化されたメソッドが備えられています。さらに、定性的な波長スキャンまたは読み取り、濃度分析、酵素カインेटクス測定などの幅広いアプリケーションに対応するように設計されたさまざまなモジュールも含まれています。

この実験では、**Scan** モジュールを使用して波長のフルスキャンを実行すると同時に、**Concentration** モジュールを使用して、シングル波長吸光度測定として測光直線性を測定しました。**Concentration** モジュールで作成する機器設定と関連する結果レポートについて示すために、光路長 0.1 mm のキャップを使用して、BSA タンパク質サンプルの測光直線性を測定しました（同じ結果が図 7C に示されています）。Cary WinUV ソフトウェアは、以下のような迅速で簡単な手順で設定することができます（図 8 参照）。

- 1) **Concentration** モジュールを開き、**Setup**（設定）タブをクリックして機器設定ウィンドウを開きます。
- 2) **Cary** タブの **Wavelength**（波長）オプションに、シングル波長測定で使用する波長を入力します（BSA タンパク質の場合は「280.0」nm と入力）。
- 3) **Replicates**（繰り返し分析回数）または **Sample/Std Averaging**（サンプル/標準平均化回数）を使用して、各標準に必要な繰り返し分析回数を入力します。この例では、各 BSA 標準溶液のデータを、3 回の連続した測定の平均値として取得しました。
- 4) **Standards**（標準）セクションで、標準サンプルの濃度を昇順に入力し、**Fit type**（フィッティングタイプ）を選択します。この例では、**Fit type**（フィッティングタイプ）を **Linear**（直線）として選択し、最小 R^2 （**Min R²**）を「0.95000」に設定しました。
- 5) これで、分析のソフトウェアと機器の準備が完了しました。**Start**（開始）ボタンをクリックして分析を開始したら、後は標準/サンプルのロード手順に従って分析を続行するだけです。

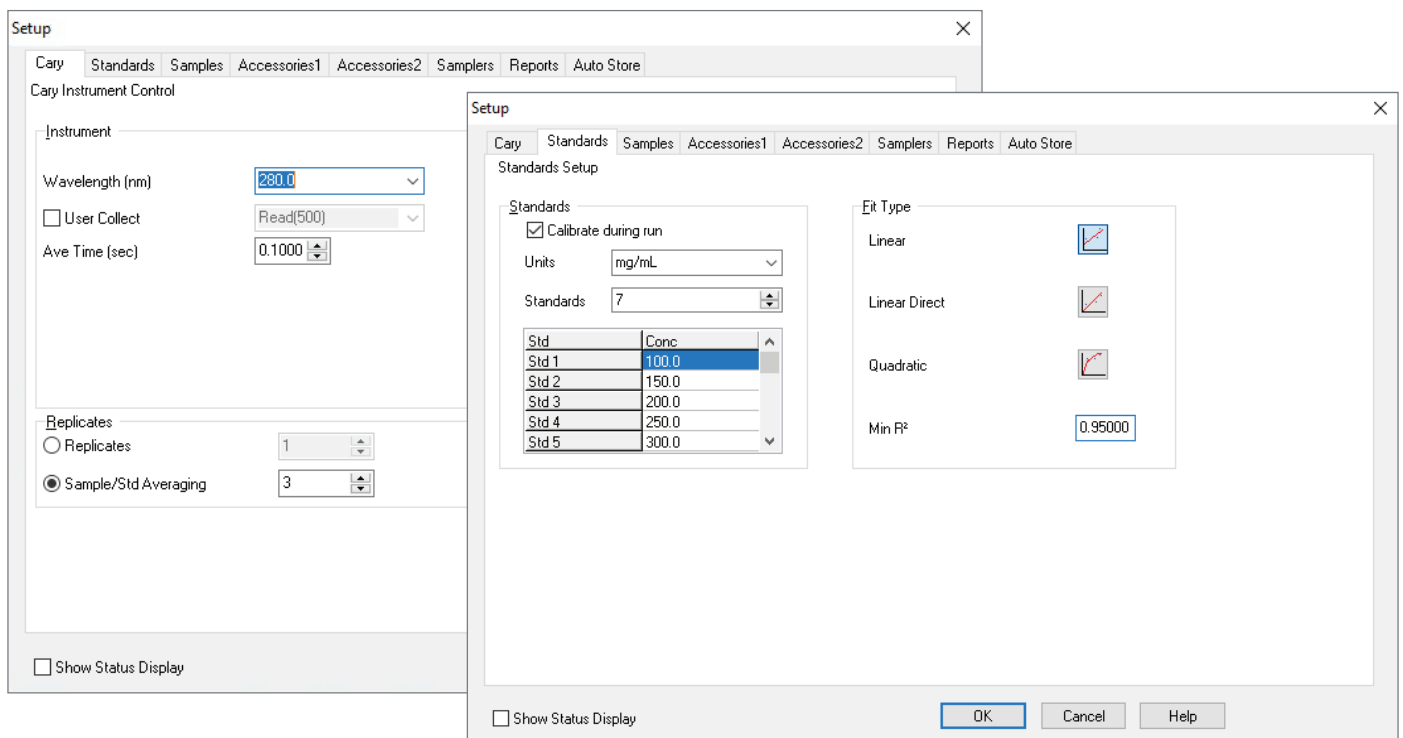


図 8. Agilent Cary WinUV ソフトウェアの Concentration モジュールを使用する際のデータ取り込みと分析の機器設定

データを取り込んだら、ソフトウェアにより、対応する濃度と吸光度の関係を示すグラフ（検量線）が自動的に生成されます（図 9）。これにより、時間のかかるデータ解析作業が削減されます。検量線は、**Concentration** モジュールに保存されます。未知サンプルを分析する際には、ソフトウェアが自動的に検量線を使用してサンプル濃度を計算し、レポートを作成します。

TrayCell 2.0 ウルトラマイクロボリュームセルのクリーニング

図 10 に、TrayCell 2.0 をクリーニングしてサンプルをロードする際に必要になる簡単な手順を示します。サンプル窓とキャップをリントフリーの綿棒またはリントフリーの布で拭いてクリーニングし、ピペットで次のサンプルをロードします。このような手順により、従来のキュベットで必要になる時間のかかるクリーニング手順が不要になるため、サンプルキャリアオーバーのリスクが低減されます。

柔軟性に優れたソリューション

TrayCell 2.0 用の光路長が異なるキャップを使用しても測定できないような、極度に希釈されたサンプルについては、光路長 10 mm の標準キュベットを推奨します。光路長 10 mm の標準キュベットは、40 µL ~ 3.0 mL の幅広い容量で使用できます。

より幅広い測定に対応するために Cary 60 UV-Vis 分光光度計は、光路長が長いセル、自動マルチセルチェンジャ、温度制御キュベットホルダを取り付けることができます。これにより、定量、サンプル自動化、カインティックプロセスの分析などの測定が可能になります。また、Cary 60 UV-Vis 分光光度計は構成部品の交換が容易であるため、ルーチンの生体 UV-Vis 測定に広く使用されています。

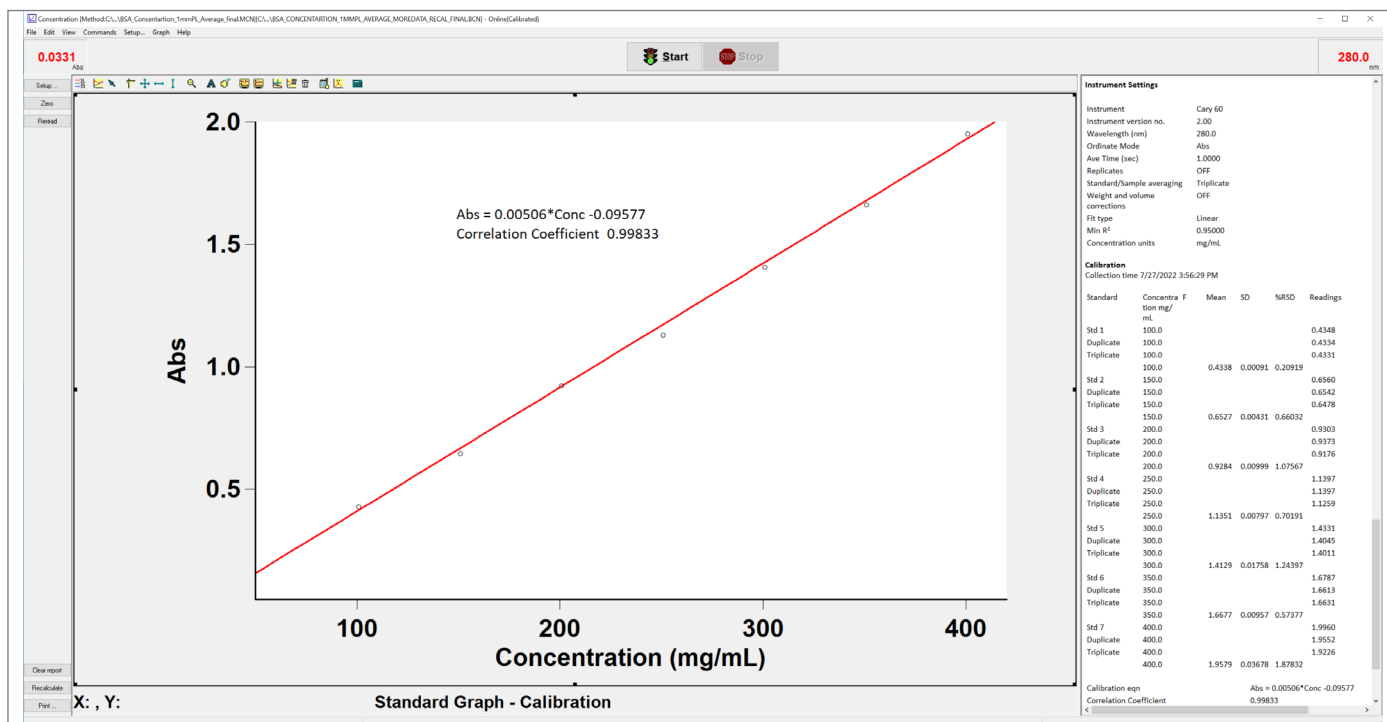


図 9. Agilent Cary WinUV ソフトウェアにより自動的に生成された検量線と濃度分析レポート。光路長 0.1 mm のキャップを取り付けた TrayCell 2.0 を使用して BSA タンパク質を測定。同じグラフが図 7C に示されています。

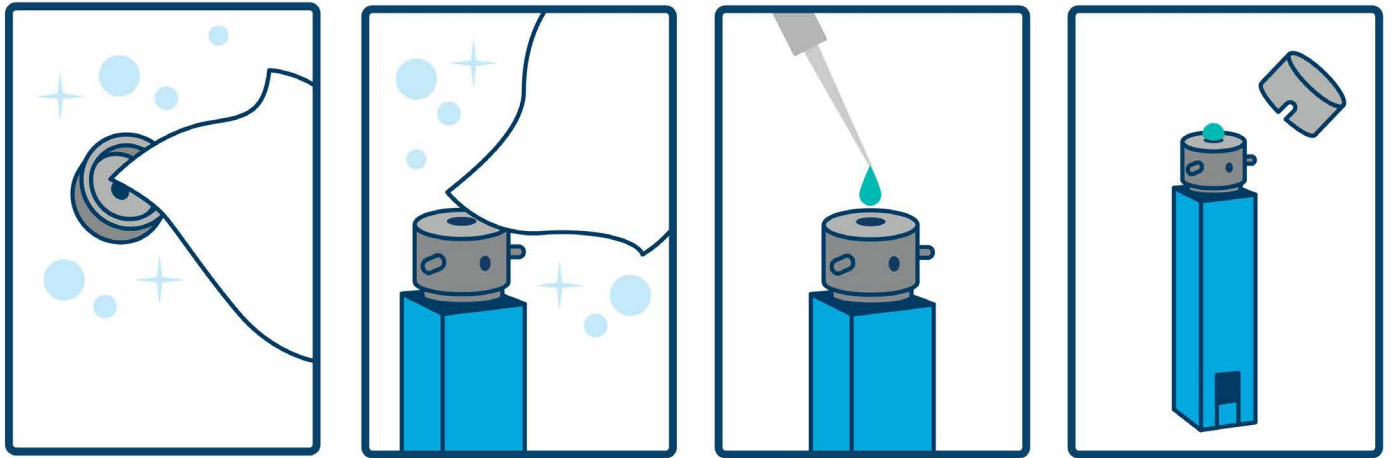


図 10. TrayCell 2.0 をクリーニングしてサンプルをロードする手順の概略図

結論

Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計に TrayCell 2.0 ウルトラマイクロボリュームセルを取り付けることにより、核酸やタンパク質のような超微量サンプルの測定に便利で使いやすいプラットフォームを構成できます。20 ng/μL のニンジン精子 DNA サンプルの定性的な繰り返し波長スキャンにより、超微量サンプル分析において、Cary 60 UV-Vis が高い感度と再現性を実現できることを実証しました。TrayCell 2.0 用の光路長が異なる 4 種類のキャップを使用することでメソッドの分析範囲が拡大し、煩雑でエラーが発生しやすい希釈の必要性を低減しました。ニンジン精子 DNA と BSA タンパク質サンプルは、それぞれ 5 ~ 1,500 ng/μL と 1 ~ 400 mg/mL の範囲で優れた測光直線性を示しました。Cary 60 UV-Vis 分光光度計と TrayCell 2.0 による合理的なワークフロー、汎用性、および測光性能は、希釈していない核酸やタンパク質の正確な測定に最適です。

詳細情報

- Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計
- Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計
- UV-Vis 分光光度計の学習ツール
- UV-Vis および UV-Vis-NIR 機器セレクションガイド
- UV/Vis 分光光度計アプリケーションの基礎
- UV-Vis 分光光度計に関する FAQ

www.agilent.com/chem/cary-60-uv-vis

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE21781667

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, December 20, 2022

5994-5455JAJP