

## PicoGreen® dsDNA 定量試薬および PicoGreen® RNA 定量試薬を用いた 高速かつ簡単な DNA および RNA の定量

Infinite™ F200 および Infinite M200 を用いた蛍光強度測定



### はじめに

#### DNA 定量

微量の DNA を検出、定量することは、ライブラリーを作成するための cDNA 作成、製剤工程での DNA 不純物の検出など、さまざまな分野での生物学的応用にきわめて重要である。

核酸の濃度を測定する技術で最もよく使用されているのが、260 nm ( $A_{260}$ ) の吸光度測定によるものである。しかし、この方法には、相対感度が  $A_{260}$  の 0.1 に相当する約 5  $\mu\text{g/ml}$  dsDNA であるという制約がある。さらに、この測定法では RNA、ssDNA、dsDNA を区別することができない。

ほかの DNA 測定法は、DNA 分子に対して蛍光色素が結合することを利用している。ビスベンズイミド 33258 のような Hoechst 色素であれば、DNA 濃度を 10 ng/ml まで検出、定量することができる [1]。

もうひとつ別の蛍光色素結合法に、Quant-iT™ PicoGreen dsDNA 試薬を用いたものがある。これは、Hoechst 色素を用いた測定法の 400 倍以上の感度を有する [2]。

本稿では、蛍光マイクロプレートリーダー Tecan Infinite™ F200 または M200 を用いて、測定溶液 200  $\mu\text{l}$  中の dsDNA わずか 20 pg を検出したことを報告する。

#### RNA 定量

cDNA ライブラリーの作成、逆転写 PCR、Differential Display PCR のような最新の分子レベル技術には、微量の RNA を高感度で検出できることが必要になる。

260 nm での吸光度によって RNA を検出、定量しようとすると、シグナルに対するタンパク質の相対的寄与率や遊離ヌクレオチド、操作に起因する汚染物質など、DNA と同じ問題が浮かび上がってくる。

溶液中の RNA 濃度 4  $\mu\text{g/ml}$  に相当する 260 nm での OD は 0.1 である。これと比較すると、RiboGreen 試薬を用いた蛍光定量法では、1 ng/ml の RNA まで検出することが可能である。代表的な蛍光マイクロプレートリーダーを使用すれば、測定溶液 200  $\mu\text{l}$  中の RNA 200 pg を検出することも可能である [3]。

RiboGreen キットの場合、2 種類の色素濃度を用いることによって、直線範囲は 1 ng/ml から 1  $\mu\text{g/ml}$  までとなっている。high-range 測定でおよそ 20 ng/ml から 1  $\mu\text{g/ml}$  まで、low-range 測定で 1 ng/ml から 50 ng/ml までを検出する。

上記のような希釈液を、Tecan Infinite 200 シリーズで容易に測定可能である。最適なゲイン関数を利用すると、RNA 濃度 1 µg/ml から 1 ng/ml までを、ひとそろいの希釈系列と、同じ測定手順とを用いて測定することができ、検出可能な RNA を最小にできる。

## 材料と方法

### 機 器

- Infinite F200 フィルター方式検出システム (Tecan、オーストリア)
- Infinite M200 Quad4 Monochromator™ 検出システム (Tecan、オーストリア)

### マイクロプレート

- 96 ウェル平底型黒色ポリスチロールマイクロプレート (Greiner Bio-One、ドイツ)

### 試薬および測定法

#### 試 薬

- Quant-iT PicoGreen 定量試薬 (Invitrogen、カリフォルニア州)
- RiboGreen RNA 定量試薬およびキット (Invitrogen、カリフォルニア州)
- 20 × TE (Invitrogen、カリフォルニア州)
- ラムダ-DNA、100 µg/ml (Invitrogen、カリフォルニア州)
- ヌクレアーゼフリー水 (Fluka BioChemika、スイス)

### 試薬調製

#### Quant-iT PicoGreen

ヌクレアーゼフリー水で 20 × TE バッファーを 1 × TE バッファーに希釈する。この 1 × TE バッファーを、Quanto-iT PicoGreen 試薬、ラムダ-DNA の希釈に用いるほか、それ自体も測定に用いた。その都度調製する Quant-iT PicoGreen 試薬は、1 × TE バッファーで 200 倍に希釈し、室温暗所で保管する。

#### RiboGreen

RNA を扱うにあたっては、RNase フリーの作業環境が必要である。RNase の混入を予防するため、取り扱い時や全調製作業には、清潔なディスポーザブル手袋と、RNase フリー滅菌ディスポーザブルプラスチック製品を用いた。RiboGreen RNA 定量キットのなかの 20 × TE バッファーを、ヌクレアーゼフリー水で 1 × TE バッファーに希釈した。RiboGreen 試薬の希釈については、実施するアッセイに応じたものとした。具体的には、low-range アッセイには RiboGreen 試薬原液を 2,000 倍に希釈し、high-range アッセイには RiboGreen 試薬原液を 200 倍に希釈して調製した。どの溶液も、光分解を避けるため数時間以内に使用することとする。

## アッセイプロトコール

### Quant-iT PicoGreen DNA 定量法

ラムダ-DNA 希釈系列を表 1 のとおりに作成した。どの濃度のものも 100 µl をウェルに分注し、Quant-iT PicoGreen 水溶液 100 µl を加えて、最終的にアッセイ容積が 200 µl となるようにした。ブランクには、TE バッファー 100 µl と Quant-iT PicoGreen 100 µl との混合液を使用した。測定不成功を回避するため、希釈系列のそれぞれについて、3つのレプリカを作成した。室温暗所で5分放置したのち、Infinite F200 および Infinite M200 でプレート測定した。

#	DNA 濃度 / ml	DNA 濃度 / アッセイ (200 µl)
1	1 µg	200 ng
2	500 ng	100 ng
3	250 ng	50 ng
4	50 ng	10 ng
5	10 ng	2 ng
6	2.5 ng	500 pg
7	1500 pg	300 pg
8	250 pg	50 pg
9	100 pg	20 pg
10	25 pg	5 pg
11	0 [ブランク]	0 [ブランク]

表 1 1 × TE バッファーによるラムダ-DNA の希釈系列 1-11 およびアッセイ容積 200 µl あたりの DNA 量

### RiboGreen RNA 定量法

高濃度 RNA サンプルおよび低濃度 RNA サンプル (1 µg/ml から 1 ng/ml までの) を定量するため、それぞれにリボソーム標準 RNA 希釈系列を 1 × TE を用いて作成した (表 2)。濃緑色の行は high-range RNA 濃度であることを示しており、200 倍希釈の RiboGreen を用いた。一方、淡緑色の行は low-range RNA 濃度であることを示しており、2,000 倍希釈の RiboGreen 試薬を用いた。各 RNA 希釈溶液 100 µl に、RNA 濃度に応じて、対応する RiboGreen 試薬希釈液 100 µl を加えた。

#	RNA 濃度 [ ng/ml ]	RNA RNA 濃度 [ ng/200 μl アッセイ ]
1	1000	200
2	500	100
3	100	20
4	50	10
5	25	5
6	15	3
7	10	2
8	1	0.2
9	0 [ ブランク ]	0 [ ブランク ]

表 2 : 1×TE バッファーによるリボソーム標準 RNA の希釈系列 1-9 およびアッセイ容積 200 μl あたりの RNA 量

### 測定

#### 測定の設定

DNA の定量、RNA の定量のいずれも、Infinite F200 および M200 とともに、同じ測定パラメータを選択した。Infinite F200 については、最適のゲイン関数を選択したため、サンプルに応じて、最高濃度の RNA/DNA が最大蛍光強度となった。

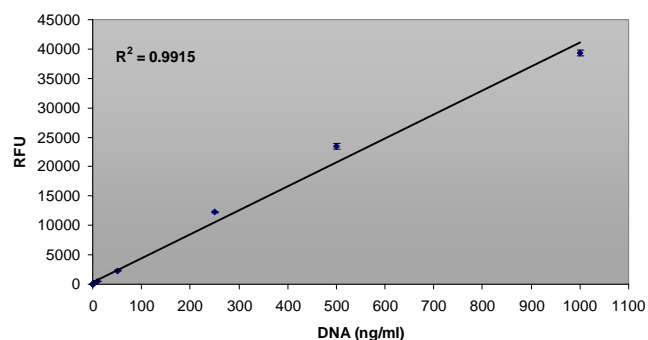
Measurement Infinite F200	
パラメータ	設定
Ex wavelength	485 nm
Ex bandwidth	20 nm
Em wavelength	535 nm
Em bandwidth	25 nm
Lag time	0 μs
Integration time	20 μs
Number of reads	25

Measurement Infinite M200	
パラメータ	設定
Ex wavelength	485 nm
Ex bandwidth	9 nm
Em wavelength	535 nm
Em bandwidth	20 nm
Lag time	0 μs
Integration time	20 μs
Number of reads	25

表 2 : Tecan i-control™ ソフトウェアを用いた Infinite F200 および Infinite M200 での蛍光強度測定パラメータ

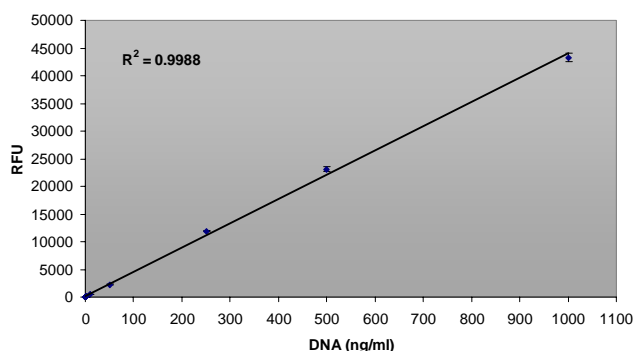
## 結果

### Quant-iT PicoGreen dsDNA 試薬を用いた DNA 定量



DNA [ng/ml]	1000	250	10	1,5	0,25	0,1	0,025	0
RFU	39340	12223	464	82	15	7	2	0

図 1 : Infinite F200 を用いて測定した 25 pg/ml から 1 μg/ml の DNA 濃度。RFU は、平均からブランクを差し引いて 3 倍したものである。



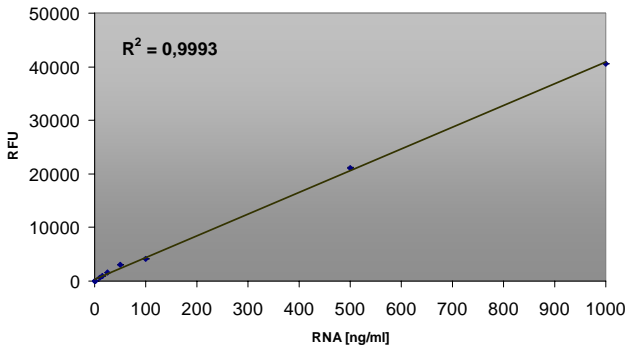
DNA [ng/ml]	1000	250	10	1,5	0,25	0,1	0,025	0
RFU	43277	11916	480	93	15	5	1	0

図 2 : Infinite M200 を用いて測定した 25 pg/ml から 1 μg/ml の DNA 濃度。RFU は、平均からブランクを差し引いて 3 倍したものである。

機器	High low range	感度 pg/ml	感度 pg/アッセイ
Infinite F200	1000 ng/ml	100	20
Infinite M200	1000 ng/ml	100	20

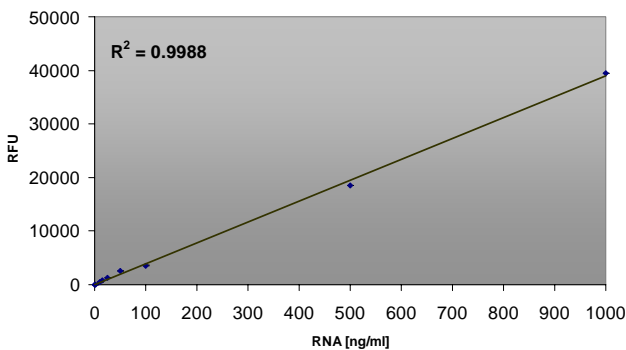
表 3 : high-low range の DNA 測定をめぐる Infinite M200 および F200 の感度。感度を pg/ml と pg/アッセイ容積 (200 μl) で表示した。

**RiboGreen 試薬を用いた RNA 定量**



RNA [ng/ml]	1000	500	100	50	25	15	10	1	0
RFU	40583	21160	4143	2964	1559	919	621	54	0

**図 3 :** Tecan Infinite F200 を用いた高濃度および低濃度からなる希釈系列ひと揃いの RNA 濃度。1 ng/ml から 1000 ng/ml までの RNA を測定した。表の RFU は、平均からブランクを差し引いて 3 倍したものである。



RNA [ng/ml]	1000	500	100	50	25	15	10	1	0
RFU	39429	18520	3593	2546	1339	792	530	48	0

**図 4 :** Tecan Infinite M200 を用いた高濃度および低濃度からなる希釈系列ひと揃いの RNA 濃度。1 ng/ml から 1000 ng/ml までの RNA を測定した。表の RFU は、平均からブランクを差し引いて 3 倍したものである。

機器	High low range	感度 pg/ml	感度 pg/アッセイ
Infinite F200	1000 ng/ml	150	30
Infinite M200	1000 ng/ml	200	40

**表 4 :** High-low range をめぐる RNA 測定に対する Infinite M200 および F200 の感度。感度を pg/ml と pg/アッセイ容積 (200 μl) で表示した。

**考 察**

微量の DNA や RNA を検出、定量することが、さまざまな生物学的応用に必要となっている。しかし、最もよく用いられている吸光度測定法には、検出限界がおおよそ 5 μg/ml であるという欠点がある。

微量の RNA および DNA を測定、鑑別するため、蛍光核酸結合色素を用いた 2 種類の検出法を試験した。Quant-iT PicoGreen 試薬を用いて DNA を、RiboGreen 試薬を用いて微量の RNA を測定したのである。

Invitrogen によれば、Quant-iT PicoGreen の検出限界は、代表的な蛍光マイクロプレートリーダーを使用した場合、アッセイ容積 200 μl で DNA 25 pg であるとしている。さらに、有意性の高い結果を得るには、DNA の高濃度域と低濃度域とを別に測定することを推奨している。

しかし、Tecan Infinite F200 および Tecan Infinite M200、Quant-iT PicoGreen キットを組み合わせ使用したところ、DNA の高濃度域から低濃度域にまたがるひと揃いの希釈系列で、DNA を容易に測定することができた。Infinite 200 のいずれの機種も、記載されているよりも感度が高く、アッセイ容積 200 μl で DNA 20 pg であった。さらに、このふたつの機器は、1 μg/ml から低いものでは 1 ng/ml までのひと揃いの希釈系列のみにより、ごく微量の RNA を測定したところ、アッセイ容積あたり RNA 30-40 pg の感度を得たのである。

一連の測定操作のみにより、高濃度域から低濃度域までの DNA や RNA を検出することができるという Tecan Infinite 200 シリーズのこのような長所によって、貴重な作業時間や、一層重要な RNA や DNA のサンプルを節約することが可能となる。

**結 論**

幅広い濃度で、微量の dsDNA や RNA を検出、定量するため、Tecan Infinite 200 シリーズを用いて蛍光強度測定を実施したところ、高感度で正確な測定結果が得られた。

**略語の一覧**

FI	蛍光強度
ds	二本鎖
ss	一本鎖
RFU	相対蛍光単位
20 × TE	200 mM トリス塩酸、20 mM EDTA、pH 7.5

## 参考文献

- [ 1 ] Labarca C and Paigen K: A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Analytical Biochemistry*, 102, 344-352 (1980)
- [ 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)
- [ 3 ] Jones LJ *et al.*: RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. *Analytical Biochemistry*, 265, 368 - 374 (1998)

Tecan Group Ltd.は、本稿に正確かつ最新の情報を記載するよう努力していますが、遺漏や誤りがないとは限りません。このため、本稿にある情報の正確性、完全性について、Tecan Group Ltd.は明示的であれ黙示的であれ、一切の言明も保証も致しません。本稿を、随時、予告なく変更することがあります。このなかで言及した商標はいずれも、法律により保護されています。本稿に記載されている仕様の技術的詳細および操作の詳細については、最寄の Tecan 販売店にご連絡ください。本稿は、市場によっては入手できない製品について記載することがあります。最寄の販売店にご確認ください。

© 2007, Tecan Trading AG, スイス、著作権所有。

Tecan は、主要諸国で、スイス、Männedorf の Tecan Group Ltd.の登録商標です。

Infinite、Quad4 Monochromators、i-control は、スイス、Männedorf の Tecan Group Ltd.の商標です。Molecular Probes は、アメリカの Invitrogen Corporation の商標です。PicoGreen および RiboGreen は、アメリカの Invitrogen Corporation の登録商標です。

**Austria** T +43 62 46 89 33   **Belgium** T +32 15 42 13 19   **China** T +32 15 42 13 19   **Denmark** +45 70 23 44 50  
**France** +33 4 72 76 04 80   **Germany** +49 79 51 94 170   **Italy** +39 02 215 21 28   **Japan** +81 44 556 73 11  
**Netherlands** +31 18 34 48 174   **Portugal** +351 21 000 82 16   **Singapore** +65 644 41 886   **Spain** +34 93 490 01 74  
**Sweden** +46 31 75 44 000   **Switzerland** +41 44 922 89 22   **UK** +44 118 9300 300   **USA** +1 919 361 5200  
**ROW** +43 62 46 89 33

[www.tecan.com](http://www.tecan.com)

