次世代微量分光 Lunatic の内部をご紹介

はじめに

Lunatic はタンパク質と核酸の次世代定量化のための濃度測定装置です。Lunatic は 2 uL の試料でフルスペクトル測定によって 0.03 から 275OD という広い吸収範囲、そして様々なアプリのライブラリーが提供する独自の分析手法を用います。異なるニーズに応えるために 2 種類の Lunatic が用意されています（図 1）。一つは Little Lunatic で、より軽い作業に適しており最大 16 個の試料の濃度を 2 分間で測定します。もう一つの Big Lunatic はプレートを基盤とするシステムで最大 96 個の試料の濃度をわずか 5 分間で測定します。Big Lunatic は、ワークフローの自動化や大幅な迅速化を目的として、分注ロボットと統合することもできます。法令遵守（コンプライアンス）の確保が必要な場合、Big Lunatic に関してはオプションとして 21 CFR Part 11 パッケージもご利用可能です。

Big または Little ともに Lunatic は、所定の光路長をもつマイクロキュベット内でわずか 2 uL の試料を用いて高速紫外可視（UV/Vis）スペクトル分析を行います。Lunatic のプレートやチップ内に装着された独自のマイクロ流路により二次汚染や蒸発は生じません。分析結果に影響を及ぼすような夾雑物をご心配ですか？Lunatic のアンミックス（Unmix）・アルゴリズムによって種々の一般的な不純物や緩衝液成分の存在を前提とした上での核酸またはタンパク質の定量化が可能となりますので、安心して分析を進めることができます。

このテクニカル・ノートで詳細に説明したいことは、紫外可視分光測光法における諸原則を用いたタンパク質や核酸の濃度の測定を目的として、Lunatic が如何にして最先端の光学系、信号処理、そして専用のアプリケーションを有しているかという点です。

紫外可視分光測光法の基礎

光が液体を透過する際にその内の幾分かは吸収されますが、その割合はその液体の化学成分、濃度、そして試料を通過する光路長に依ります。吸光性、濃度、および光路長の関係は次のランバートベールの法則によって表されます。

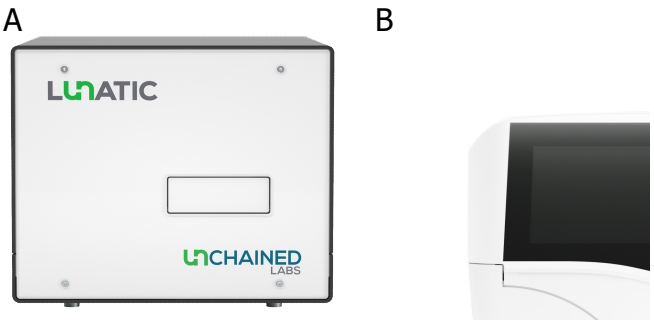

図 1 ：Lunatic：次世代紫外可視読取機器。（A）Big Lunatic はプレートを基盤とするシステムで最大 96 個の試料を 5 分間で読み取ります。（B）Little Lunatic はチップ・フォーマットを用い、わずか 2 分間で 16 個の試料を読み取ります。

$$\text{吸光度} = \varepsilon \times c \times l$$

本等式においては、ε が吸光係数、c が濃度、そして I が光路長です。この法則を適用すると、試料の濃度がその吸光度から判明します。タンパク質と核酸は周知の吸光度スペクトルを有し、各々の特性ピークは紫外線領域においてそれぞれ 280nm と 260nm になります。紫外可視分光測定器は、既知の光路長を有する試料を通過する前後の特定の波長における光度を計測します（図 2）。これらの光強度は試料の吸光度スペクトル測定のために使用されます。

Lunaticのような紫外可視分光光度計が試料の吸光度スペクトラムを測定する場合、私たちは、以下のランバートベールの法則を再構成した式を用いてその濃度を測定するべく、既知の経路長を有するこのスペクトルと、試料に特有の吸光係数を使用します。

$$c = \text{吸光度} / \varepsilon \times l$$

LUNATIC 内部構造の解説

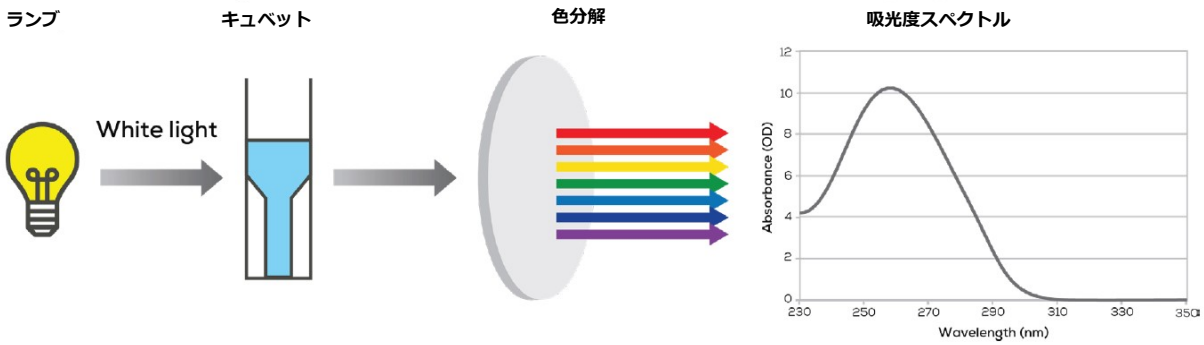

図２：紫外可視分光光度計に関するこの基本的な図式においては、所定の経路長をもつキュベット内にある試料を白光が透過します。試料はその成分に応じて光の各種波長を吸収します。プリズムまたは回折格子と同様に、光学的構成要素によって光は個々の波長へと分離され、検出後に紫外可視吸光度スペクトラムへと変換されます。

紫外可視分光測光法はタンパク質や核酸を定量化する方法としては最も古くかつ広く受け入れられているものの１つです。Lunatic はこの手法を取り入れつつ、革新的な光学系、消耗品、そして特有の分析手法を用いてこの手法を１つ上の段階へと押し上げています。

光学設計について

Lunatic 機器の核心部分は特有の光学設計にあります（図３）。効率的で長持ちするキセノン・フラッシュランプが光源としての役割を果たします。各フラッシュランプは約２万個の試料を扱う耐久性を有し（または７年間の通常使用）、紫外可視スペクトラムの全域で一定強度の光を低消費電力で生み出します。

Lunatic は垂直方向の光路を有するため、設置面積が小さいにもかかわらず高速での読取りが可能となります。キセノン・フラッシュランプからの光は光ファイバーケーブルに沿ってピンホールを通った後に細いビームを生じさせます。レンズによって光の焦点が合わされ、焦点面が各マイクロキュベットの中心を通過することにより最大感度が得られます。Little Lunatic では光は２つの光線に分けられます。１つはチップを通過し、もう１つは参照フォトダイオードに進入します。一方、Big Lunatic は試料分光光度計と同一設定の参照分光光度計を使用します。次に両機器とも各々の基準測定を用いて、ランプからのスペクトラル出力において時間経過に伴って生じるわずかな変化を補正することができます。これによって試料吸光度のより正確な測定と機器に対するより高い信頼性が得られます。光がマイクロキュベットを通過すると、次に分光光度計ブロックに進入します。

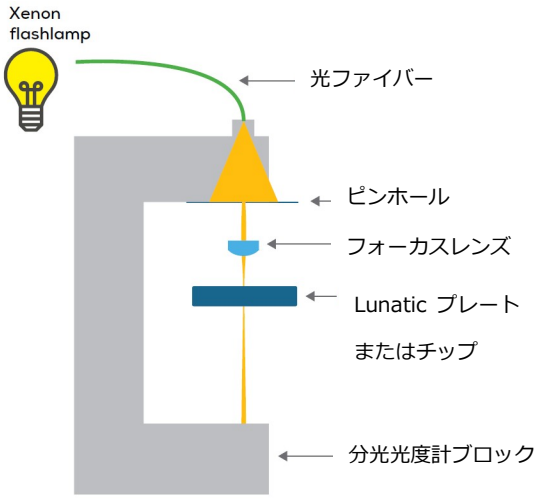

図３：Big Lunatic と Little Lunatic の両者とも、キセノン・フラッシュランプからの光は光ファイバーケーブルに沿って針穴と集束レンズを通過し、試料含有プレートまたはチップ上に集結されます。その後、光は分光光度計に進入し、分光および色検出されます。

Big Lunatic と Little Lunatic の両者とも、頑丈かつコンパクトな多色性分光光度計ブロックにその特徴があります（図４）。そのデザインは、別々の光学的構成要素の諸機能を１つのモジュールへと結集させることにより、ツェルニーターナー構成を改善しています。したがって、Lunatic は余り場所を取りません。単色光分光器を基盤とする紫外可視機器とは異なり、Lunatic は移動式フィルターまたはグリッドを要することなく紫外可視の全範囲を一度に測定します。その結果、Lunatic は保守管理にあまり人手を要することなく早期に結果を導きます。

LUNATIC 内部構造の解説

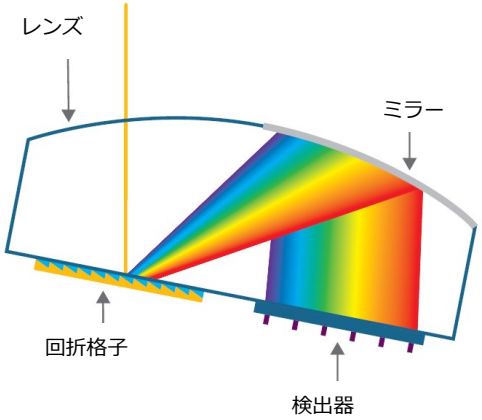

図 4 : Lunatic の小型かつ頑丈な分光光度計ブロックは稼働式部品を備えていないため、位置合わせがずれるといったことはありません。分光光度計に進入した光はシリンダー状のレンズを通過して回折格子にぶつかり、ビームを反射するとともに種々の光に分かれます。

分光計ブロックの内部においては、円筒形のレンズを通じて進入光の視準が回折格子に対して合わせられ、その結果、各色に分かれてレンズの鏡面上にそのスペクトルが映し出されます。鏡面によってそのスペクトルの焦点が検出器上に合わせられ、反射されます。検出器のフォトダイオード・アレイ（PDA）が光を感知し、低雑音のアナログ・デジタル変換器を通して信号を送出します。最後に、Lunatic はこの信号を 230 – 750 nm の吸光度スペクトルへと加工します。

すべての Lunatic 機器は、水銀ランプやキセノン・ランプに加えてホリミウム・ガラスやジジウム・ガラスを用いた工場での厳正な較正作業を経ています。各機器は、最大の吸光度が紫外可視スペクトル全域に亘る諸試料を用いた品質検査および較正作業を受けています。かかる設計検査や工場検査の目的は、Big Lunatic や Little Lunatic が 0.03 - 275 OD を範囲とする線形吸収範囲とともに正確・高精度な波長検知や吸光度測定を確実にチェックする点にあります（表 1 ）。

Lunatic の固有かつ革新的な設計は紫外可視分光測光法においてよく理解されている諸原則を踏まえつつもそれらを改良したものであり、正確、高精度かつ詳細な紫外可視スペクトルを迅速に提供します。Lunatic は工場での較正作業や厳正な品質管理によってさらに最適化されます。紫外可視分光光度計である Big Lunatic と Little Lunatic はともに小型、頑丈、長寿命かつ低維持費という特長を有しているので、核酸やタンパク質の定量化において信頼できる製品になっています。

ストリップ、チップおよびプレート

Lunatic は、2 µL の試料から、230– 750 nm という紫外可視の全範囲で 0.03– 275 OD の範囲の吸光度を測定します。すべての測定は試料を Lunatic 独自のマイクロ流路の中に取り込むことから始まり、それによって広いダイナミックレンジと低試料量の実現が可能になります（図 5 ）。

仕様	Big Lunatic	Little Lunatic
寸法	37cm (幅) x 46cm (奥行) x 33cm (高); 21 kg	23cm (幅) x 30cm (奥行) x 28cm (高); 9kg
稼働電圧	24VDC, 30W (最大)	
光源	キセノン・フラッシュランプ	
検出器	紫外可視多色性分光光度計	
波長範囲／精度	230– 750 nm | ≤ 0.2 nm	
スペクトラル解像度	2-2.5 nm (FWHM at Hg 253.7 nm)	
吸光度正確性／精度	0.001 OD (0.5 mm path) | 4% (0.66 OD at 350 nm)	
認証規格	CE, FCC, CSA	CE, FCC

表 1 ：Big Lunatic と Little Lunatic の仕様

LUNATIC 内部構造の解説

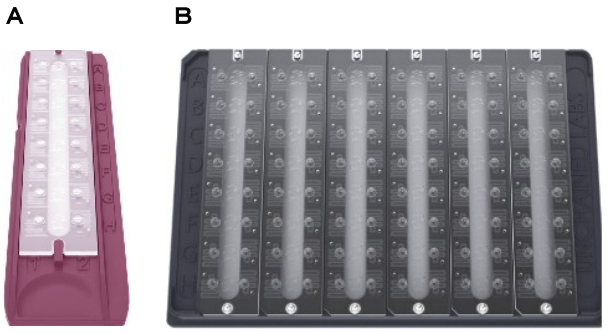

図５： 16 の個々のマイクロ流路サーキットを含むストリップがフレームに装着され、（A）Little Lunatic チップおよび（B）Big Lunatic プレートが構成されています。

Lunatic のストリップは低吸光度環状オレフィン・ノルボルネン（COC）プラスチックから成形された専有のマイクロ流体を有していますが、その目的は二次汚染または蒸発のリスクなしに試料を一時的に保持する点にあります。これらのサーキットに組み込まれているのは測定に使用される所定の光路長を有するマイクロキュベットです。各ストリップは 16 個のマイクロ流体を包含し、Little Lunatic のチップにはストリップ単体として（図 5A）、そして Big Lunatic のプレートにはストリップ 8 個を 1 つのセットとして（図 5B）、ポリスチレン・フレーム上に装着されています。ポリスチレンと COC プラスチックはハロゲンを含んでいません。なお Big Lunatic については再利用可能な金属板もまたお求めいただけます。

Big Lunatic のプレートは標準的な 96 ウェル・マイクロプレートと同じ寸法です。すなわち、Big Lunatic は液体ハンドラーやその他の研究用自動機器に容易に統合することができ、ハンズオフ（自動）かつハイスループット（高生産性）な分析を可能にします。

Lunatic のストリップには 2 種類あります。標準 Lunatic Strip と High Lunatic Strip です。標準版ストリップは 0.5 mm の光路長をもつ 1 個のマイクロキュベットを有し、0.03– 40 OD の範囲のダイナミックレンジを可能にしています（図 6）。High Lunatic Strip は各マイクロ流路に 2 つのマイクロキュベットを備え、0.1 mm と 0.7 mm を測定します（図 7）。この 2 つの異なるサイズのマイクロキュベットによって 0.03– 275 OD の範囲の広ダイナミックレンジが可能になります。0.1 mm のキュベットはその光路の短さゆえに検出可能な吸光度の最大化が可能となります。検出下限に関しては両種類のストリップで同じです。

各サーキットには主に 5 つの機能が備えられています。投入ウェル、保存スペース、マイクロキュベット、オーバーフローリザーバー、および通気口です（図 7）。試料は投入ウェルに置かれた後に毛細管作用によって保存スペースに引き込まれます。試料は流路内で蒸発なく最長 2 時間まで保存スペース内に置いておくことができます。Lunatic は、読込み作業中に、ポンプを通気口に接続して試料を保存スペースからマイクロキュベットへと移動させます。Lunatic は過剰充填の回避を目的としてマイクロキュベットを通じて輸送中の状態を検知します。過剰充填のさらなる防御策として、各マイクロ流路はオーバーフロー貯蔵装置を備えています。

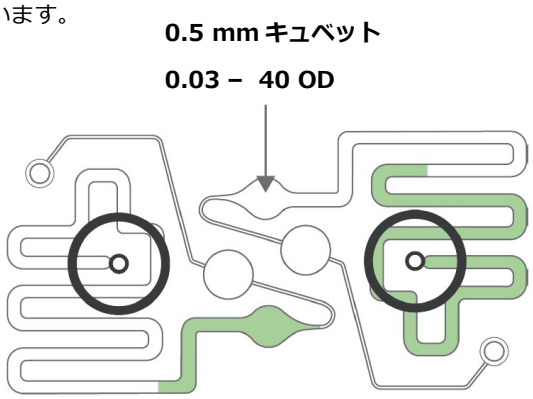

図 6 :1 個のマイクロキュベットを有する Lunatic マイクロ流路サーキットおよびそのダイナミックレンジの説明図

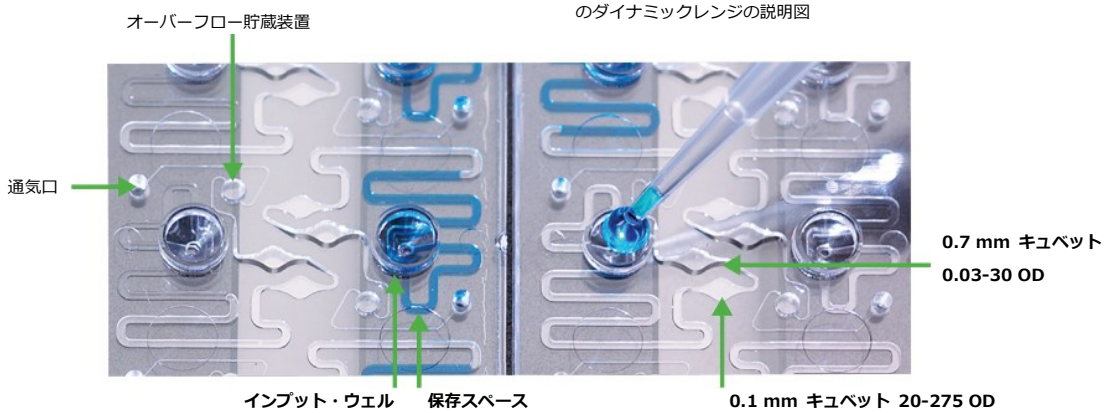

図７： 2 つの異なる経路長のマイクロキュベットを有する高 Lunatic マイクロ流路サーキットおよびそれらのダイナミックレンジの近接撮影図

LUNATIC 内部構造の解説

High Lunatic Strip に関しては、ポンプによって試料が 2 個のマイクロキュベットを通過し、両マイクロキュベットがともに各回路において 0.03-275OD の範囲で読み取ります（図８）。

成分	最大濃度
Tween 80	10%
Triton X-100	0.01%
Tween 20	2%
NP-40	0.01%
SDS	0.5%
CHAPS	20%
RIPA	0%
Brij 97	0.125%
Brij 35	10%
CTAB	0.06%
DMSO	100%
メタノール	20%
エタノール	20%

表２：マイクロ流路サーキット適合表。本表は指針としての機能を果たします。バッファーや化学成分のわずかな変更でさえも試料の性質に影響を及ぼし得るからです。

Lunatic のストリップは生命科学の研究開発において使用されているほとんどのバッファー（緩衝材）と互換性があります。ただし、濃度測定に使用される技術ですべての試料に有効なものはありません。Unchained Labs は、どの程度の濃度が Lunatic の測定結果に影響を及ぼし得るのかを見極めるべく、いくつかの一般的に使用されている洗浄剤や溶剤の諸効果の特性を明らかにしました（表２）。バッファーや化学成分のわずかな変更でさえも試料の性質に影響を及ぼし得るので、研究者の方々は自身の特定の目的においてこれらの影響が容認可能なものか否かを判断しなければなりません。

Lunatic および High Lunatic の両方のストリップは、高基準のストリップ性能を保証すべく、多岐の濃度に亘る有機、無機および紫外可視吸収化合物を使用した厳格な検査を受けています（表３）。

Lunatic の測定手順

試料プレートまたはチップを Lunatic 本体に装着した時点で以下の５つのステップが完了して測定が行われます。Big Lunatic は 96 個の試料を約 5 分で、Little Lunatic は 16 個の試料を約 2 分で測定することができます。

１．空の状態でのビーム測定

Lunatic は、試料分光光度計と参照検出器を用いて、キセノン・フラッシュランプから空気を通して放出される光の強度スペクトルを測定します。Little Lunatic の参照検出器はフォトダイオードであり、Big Lunatic についてはもう１つの分光光度計です。Lunatic は、全ての実験においてキセノン・フラッシュランプからの正確なスペクトル出力の測定のために、空の状態でのビーム測定を行います。

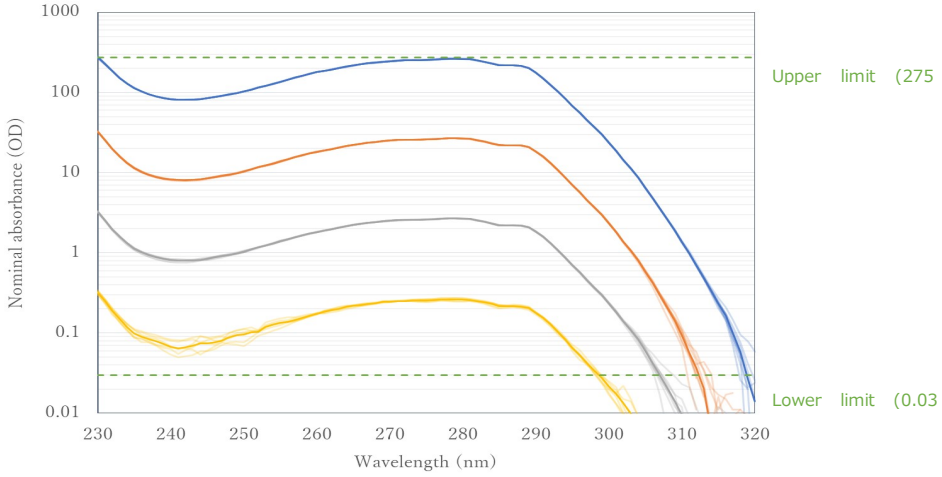

図８：Big Lunatic が 8 枚の高 Lunatic プレートを用いて 10 倍に連続希釈された水溶 L-トリプトファンの吸収スペクトラ（E1% = 271.5）を測定しました。薄い色の各線は個々の測定値、より濃い色の各線は平均の吸光度を示しています。Lunatic が有する約 10,000 倍に亘るダイナミックレンジを表示するために Y 軸には対数尺度が用いられています。

LUNATIC 内部構造の解説

Lunatic ストリップ仕様	Lunatic ストリップ	高 Lunatic ストリップ
測定キュベット数 / 試料	1 マイクロキュベット	2 マイクロキュベット
（諸）経路長	0.5 mm	0.1 & 0.7 mm
推奨される試料量	2 µL	
試料保持時間	最大 2 時間	
測定範囲 OD 10 mm ng/µL dsDNA mg/mL 平均タンパク質混合	0.03 – 40 OD 1.5 – 2,000 ng/µL 0.03 – 40 mg/mL	0.03 – 275 OD 1.5 – 13,750 ng/µL 0.03 – 275 mg/mL
精度	<2 OD: ±0.01 OD 標準偏差 >2 OD: ±1.5% CV	<2 OD: ±0.01 OD 標準偏差 >2 OD: ±1.5% CV >200 OD: ±3.5% CV

表 3 ：Lunatic ストリップ仕様

2．自動位置調整

Lunatic は、スペクトルの最適な測定を目的として、キセノン・フラッシュランプ光の焦点が各マイクロキュベットの中心を通り抜けるようにプレートまたはチップの位置を調整します。Big Lunatic は、プレート位置の細かな調整を行いつつ空の状態のマイクロキュベットから伝達される光の強度を測定し、この過程を後 2 回行います。これら 3 回の測定に基づき、Big Lunatic はプレートの正確な位置調整を自動的に行います。Little Lunatic のチップはより小型なため、 2 度の調整しか必要としません。

3．空の状態のマイクロキュベット測定

Lunatic は空の状態のマイクロキュベットから伝達される光の強度スペクトル（*lempty*）を測定しつつ、マイクロキュベットの充填度を観察するとともに試料吸光度スペクトルを測定します。空の状態の個々のマイクロキュベットの強度スペクトルを測定することにより、周辺のプラスチックがスペクトル上にもたらす寄与分を Lunatic は除去します。その結果として得られる吸光度が試料のみに帰属します。

4．試料ポンピング

空の状態のマイクロウェーブを測定した後、Lunatic はマイクロ流体の通気口にポンプを接続し、マイクロキュベット内の伝達された光の強度の変化を観察しつつそのポンプを 22.5 mbar で動作させます。この自動制御された充填感知を用い、Lunatic はマイクロキュベットが充填されたのかを確認してポンピング作業を中止します。この作業により測定時間が削減されます。

5. 充填されたマイクロキュベットの測定

最終的に、Lunatic は充填されたマイクロキュベットから伝達される光の強度スペクトル（I_{filled}）を測定します。Lunatic は、各ユーザーに特有のマイクロ流路サーキットの 1 つ 1 つに対してここで述べた 3 – 5 のステップを繰り返し、空の状態および充填された強度スペクトルを取得します。その後、ソフトウェアがこれらの強度スペクトルを使用して試料吸光度スペクトルを測定します。それと同時に、Lunatic の多色検知器は紫外可視スペクトラムの全範囲に亘る波長を測定します。可能な限り短時間で高品質のスペクトルデータを提示するために 5 つの全ステップが最適化されます。

試料吸光度の測定

Lunaticの検知器は512個の感光性シリコンフォトダイオードから成るフォトダイオード・アレイ（PDA）で、各ダイオードは光に晒されると電流を発生します。これらの電流を観察・利用して、各ダイオードに降り注ぐ光の強度が測定されます。キセノン・フラッシュランプから放出される白光が回折格子によって分離されると、異なる波長がアレイ内の異なるフォトダイオードに降り注ぎます。アレイ内のダイオードの位置とアレイに降り注がれる光強度を知ることにより、Lunatic は各波長の光強度を測定します。空の状態および充填されたキュベットから伝達される光強度の比較を通じてLunaticは試料吸光度スペクトルを測定します。

LUNATIC 内部構造の解説

暗電流補正

あらゆる半導体と同じく、Lunatic のフォトダイオード・アレイ（PDA）のシリコン・フォトダイオードはその検知器に全く光が降り注いでない時でさえもわずかな電流を発生させています。これは「暗電流（dark current）」として知られています。Lunatic はこの暗電流を観察し、フラッシュランプが各ウェルを測定すべく起動される直前にその値を記録します。そして、その暗電流の寄与分をスペクトル強度から自動的に差し引きます。

自動較正

あらゆる測定において、Big Lunatic は参照分光光度計および試料分光光度計からのビーム測定値を比較します。Big Lunatic は、この比較を利用して、試料分光光度計からの信号をキセノン・ランプのスペクトル出力と関連付けます。Little Lunatic は同様のプロセスを参照フォトダイオードにより検知された強度出力を利用して行います。Lunatic はランプの出力スペクトル内の変化にリアルタイムでに適応するため、最小限のメンテナンス要件で長期間に亘って効果的に稼働します。

ダイオードから波長への変換

スペクトルが検知器にぶつかった時、種々の光の波長がアレイ内の種々のダイオードに降り注ぎます。Lunatic は各ダイオードに降り注ぐ光の強度を測定しますが、アレイ内にあるダイオードの位置に対応する波長に変換する必要があります。この変換は検知器の信号を既知のキセノン・スペクトルに自動較正することによって行われます。Lunatic は各測定の直前にこの関係を測定するので、その結果として得られる吸収スペクトラは例外なく信頼できるものになります。

迷光補正

迷光とは紫外可視検知器が測定した光の内で予め選択された波長ではない範囲の光のことです。迷光は紫外線範囲において最大の影響を及ぼす傾向がありますが、当該範囲もまた核酸とタンパク質の定量化において最も重要なものです。Lunatic 分光光度計は内部反射や二次回折のような一般的な迷光の影響を最小化することによって線形性を最大化します。特に高吸光度試料に関しては、迷光を補正しない紫外可視分光光度計の精度はより低いものになります。

精度をより向上させるべく、Lunatic の各機器は工場での較正作業を経ており、当該作業内ではそのピークが紫外可視スペクトルの全範囲に亘る高吸光度試料が使用されています。全てのスペクトルに適用される個別化された迷光の特性を創出するためにかかる較正作業の結果が使用されます。このような組立・較正作業を通じて迷光の影響はほぼゼロとなり、Lunatic はその結果として検知可能な吸光度の最小値から最大値に至るまで線形性を維持する事ができます。

強度を吸光度に変換

Lunatic は、以下の諸等式を用いて空の状態のマイクロキュベットのスペクトル強度（*Iempty*）および充填されたマイクロキュベットのスペクトル強度（*Ifilled*）から試料吸光度スペクトルを算出します。Lunatic は名目光路長が 1cm である吸光度スペクトルを示していますが、その目的はそれらがその他のキュベットを基盤とする紫外可視分光光度計との比較を容易にする点にあります。

$$\text{吸光度} = -\log\left(I_{filled} / I_{empty}\right)$$

$$\text{名目吸光度} = 10\ \text{mm} / \text{キュベット経路長（mm）} \times \text{吸光度}$$

吸光度を表す数値は光路長と直接的な比例関係にあるため、名目光路長への変換は単純乗算になります。名目試料吸光度は全ての後続する計算および分析アプリケーションに使用されます。大部分のアプリケーションにおいては、結果として得られる吸収スペクトルは Savitzky-Golay フィルタリングを用いて平滑化されますが、平滑化されない吸収スペクトルもまたソフトウェア内でアクセス可能です。

High Lunatic ストリップは 2 つのキュベットを備えているため、各試料は 2 つの明確な吸収スペクトルを得ることができます。より小型のマイクロキュベットは高吸光度の試料に最適で、大型のマイクロキュベットは低吸光度のものに最適なので、Lunatic はそれらを 1 つのスペクトルに結合させます。名目吸光度が 30OD を上回る場合にはより小型のマイクロキュベットからの数値が使用され、名目吸光度が 20OD を下回る場合にはより大型のマイクロキュベットのものが使用されます。20 から 30OD までの間の数値に関しては、Lunatic はアルゴリズムにより両キュベットからの数値を平均化します。

LUNATIC 内部構造の解説

最適化された測定ステップおよび信号処理とは何かと言えば、Lunatic が迅速かつ正確に広吸収範囲および紫外可視スペクトルの全範囲に亘る吸収スペクトルを読み込むことに他なりません。Lunatic の分析ソフトウェアは潜在的な様々な可能性に対して柔軟に計算します。そこには加工されていない吸収スペクトルデータ、デコンボリューテッド信号または専用アルゴリズムが含まれます。

様々なアプリケーション

核酸用 A260

Lunatic の種々のアプリや手法を用いれば、核酸試料は濃度および品質の両観点から検査可能です（表４）。核酸は最大 260 nm (A260)の吸光度を有し、この波長での分光読込みは溶液内の dsDNA、ssDNA、RNA およびオリゴヌクレオチドを検知するためには最も一般的な手法です。ランバートベールの法則に基づけば、10 mm の経路長キュベット内で A260 が 1.0 の結果は－50 ng/µL dsDNA、－33 ng/µL ssDNA、または －40 ng/µL RNA に相当します。したがって、濃度（c）は A260 から以下の等式を用いて計算することが可能です。

$$c = A260 \times F$$

F は対象となる核酸に対応する濃度係数を表しています。

各 Lunatic アプリによってそれがどの濃度係数を使用しているのかや相当量の核酸（sDNA、ssDNA、または RNA）を識別します。

核酸の精製後、タンパク質または試料準備試薬のような残留細胞混入物質はしばしば溶液内に残留して A260 測定を妨害することもあり得るので、その場合には不正確な結果へとつながります。それらはさらに下流の過程においてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）またはシークエンシングのような問題を引き起こすこともあり得ます。タンパク質と DNA は両方とも紫外線を吸収しますが、異なる吸収カーブを有しています。核酸は吸収のピークが 260 nm である一方で、タンパク質は強力に 280 nm で吸収します。したがって、DNA 試料の純度は吸光度を示す 2 つの値の比率を検討することによって計算することが可能です。1.7– 1.8 の A260/A280 の値は「きれいな（clean）」DNA を表し、高品質の RNA は 2.0 を上回る A260/A280 比を有しています。より低い数値はタンパク質、フェノールまたはその他の芳香性化合物混入の可能性を示唆します。

A260/A280 比そのものが DNA 純度を完全に表しているわけではありません。EDTA、グアニジン、または炭水化物のようなその他の添加物または混入物質は 280nm の吸光度を有してはいますが、230nm 周辺の紫外線も吸収します。さらに、芳香アミノ酸残留物が少ないいくつかのタンパク質は 280nm では低い吸光度を有する一方で、すべてのタンパク質はそのペプチド結合によって 190-230nm の範囲で明確な吸収ピークを有しています。この事実により、A260/A230 比は核酸試料内でのタンパク質またはその他の不純物の存在を示す重要な指標となります。したがって、230nm および 280nm での吸光度によって核酸試料内に存在する可能性がある混入物質のより良い推定が提示されます。純粋な核酸試料の A260/A230 比は 1.8 以上であるはずです。
Lunatic に搭載されている核酸アプリは紫外可視吸収スペクトルから純度および濃度を算定する目的で設計されたものです

タンパク質用 A280
Lunatic は複数の条件下でタンパク質を定量化するためのアプリを備えています（表５）。280nm での紫外線吸光度の測定かつランバートベールの等式内の吸光係数を用いる濃度計算を通じて、タンパク質濃度を測定することができます。この手法は精製されたタンパク質を定量化するのに適しています。Lunatic は A280 からタンパク質濃度を計算するために以下の等式を用います。

$$\boldsymbol{C = A280 \times 10 / E1\%}$$

E1%とは、タンパク質の 1%溶液または 100mL の溶液内にある 1 グラムのタンパク質の A280 測定時に観察される分子吸光係数のことです。

プロテインの紫外線吸光度は芳香性アミノ酸（Trp、Tyr および Phe）ならびにそれらアミノ酸配列内にある Cys-Cys ジスルフィド結合の数に依存します。翻訳後修飾およびタンパク質構造もバッファーの種類、イオン強度および水素イオン指数（pH）と同様に影響を与えます。A280 によるタンパク質濃度の測定の際の最良のアプローチは、対象となるタンパク質吸光係数の経験的な導出または公表済みのタンパク質吸光係数の探索です。あるいは、測定されるタンパク質のアミノ酸配列が既知である場合、理論上のモル吸光係数は以下の等式を用いて計算することができます。

$$\varepsilon = 5{,}500 \times Trp + 1{,}490 \times Tyr + 125 \times Cys$$

ε がモル吸光係数で、Trp、Tyr および Cys がトリプトファン、チロシンおよびシステインの各々の数になります。

LUNATIC 内部構造の解説

Lunatic はそのタンパク質吸光度計算にモル吸光係数ではなく E1%を用います。以下の等式で示されているように、E1%はモル吸光係数（ε ）およびプロテインの分子量（MW）から算出可能です。

$$E\ 1\% = \varepsilon \times 10 / MW$$

Lunatic に搭載のタンパク質アプリによって濃度の高低に関わらず定量化が容易なものになります。

混合物分離（Unmix）

混合物分離アプリケーション（Unmix）は紫外可視スペクトル測定の潜在能力を最大限発揮する事で、混合試料内の抽出済み核酸、PCR 単位複製配列またはタンパク質の特定濃度の測定を可能にします。

Lunatic の紫外可視性能に目を向けると、混合物分離アプリケーションは測定された紫外可視スペクトルに内在する特定のスペクトルデータを再評価することによって吸収混入物質の存在を明らかにします。混合物分離アルゴリズムは一般的な生物学的実験に共通する混入物を探すように改良が重ねられています。その結果、測定された吸光スペクトルは、個々の化学成分の複数のスペクトルへとその重なりが分離され（deconvoluted）、対象となる生体分子の定量化を可能とするとともに試料の品質および純度を評価します。各混合物分離アプリの詳細な内容については、表 4 および 5 内の青字のアプリ名称をご参照ください。

標準カーブ分析

Big Lunatic の対応アプリケーションを用いれば、BCA、Bradford および Lowry といった比色タンパク質分析の標準カーブによるタンパク質濃度定量化も容易に実行できます。これらの諸手法はタンパク質溶液および細胞溶解物の定量化に一般的に用いられます。

用いるものは既知の濃度を有する参照試料一式です。Big Lunatic システムは吸光度スペクトルを測定するとともに参照濃度と一定の波長で測定された OD を関連付ける標準カーブを創出します。未知の濃度を有する試料を測定する際、未知の試料の濃度を算出するために参照波長での OD は標準カーブと比較されます。

Homebrew

ライフサイエンスにおける諸問題の解決にはカスタマイズされた分析が時には必要となります。Homebrew ツールキットを使用すれば Lunatic で独自の分析アプリケーションを簡単に作成できます。吸光度のように予め組み込まれている値、または代数的、算術的または統計的な関数およびユーザー定義の変数を用いて計算式を作成することで、カスタマイズされた紫外可視スペクトル解析を行えます。各分析に最も関連するバックグラウンド補正の種類を選択します。副生物の濃度の平均および標準偏差の決定から、抗体ー薬物コンジュゲートの薬物取り込み効率の解明まで、Homebrew には、カスタムソリューションを構築するためのツールを有しています。

バックグラウンド補正オプション

Lunatic のアプリケーションはバックグラウンドの吸光度を補正するいくつかのオプションを提供します。濁度補正は波長とレイリー（Rayleigh）散乱の間の既知の関係を用いて、吸収スペクトルに波長固有の補正を適用します。320-400nm の試料吸光度スペクトラムを測定することにより、Lunatic は独自の濁度分析結果を測定し、測定結果に基づいたバックグラウンド補正を最適化します。

Single-point バックグラウンド補正によって、ある波長を選択し、全スペクトラムからその波長の吸光度を差し引くことができます。この作業は他の紫外可視分光光度計においてもよく用いられています。また、Single-point 自動制御補正機能はソフトウェアに対して吸光度を有しない波長を用いるように指示し、その値をバックグラウンド補正に使用する事で、吸光度数が常に正の値であることを確保します。Homebrew のバックグラウンド補正選択には通常の濁度補正のほか、Single-point、および Single-point 自動制御補正等がありますが、その他にもいくつかのオプションがあります。Homebrew はある波長範囲の平均吸光度に等しい補正を適用できますが、それは通常、明確に定義された透明な波長範囲を有する色付きサンプルに使用されます。また、バックグラウンド補正を全く行わないことも選択できます。

核酸用アプリケーション

アプリケーション名	概要
dsDNA (Turbidity)	精製 dsDNA に最適です。260nm での総吸光度を 50 の濃縮係数(dsDNA 相当)およびサンプルバックグラウンド(濁度)補正を使用して、dsDNA 濃度(ng/µl)を計算します。
dsDNA (Single point)	精製 dsDNA に最適です。濃縮係数 50(dsDNA 相当)および 260nm での全吸光度と単一波長(340nm またはカスタム)バックグラウンド補正を使用して、dsDNA 濃度(ng/µl)を計算します。
ssDNA (Turbidity)	精製 ssDNA に最適です。濃縮係数 33(ssDNA 相当)およびサンプルバックグラウンド(濁度)補正で 260nm の全吸光度を使用して、ssDNA 濃度(ng/µl)を計算します。
ssDNA (Single point)	精製 ssDNA に最適です。濃縮係数 33(ssDNA 相当)の 260nm での全吸光度と単一波長(340nm またはカスタム)バックグラウンド補正を使用して、ssDNA 濃度(ng/µl)を計算します。
DNA (Tissue/blood)	組織及び血液から分離されたヒト/哺乳類の DNA を定量化するために使用されます。Unmix アルゴリズムは、サンプルのバックグラウンド(濁度)と不純物(RNA、チオシアン酸塩、EDTA、フェノール、アジド)を総吸収スペクトルから差し引き、DNA からの寄与を分離し、50 の濃縮係数(dsDNA 相当)を使用して DNA 濃度を計算します(ng/µl)。
DNA (Plant)	植物抽出物から分離された DNA の定量に使用されます。Unmix アルゴリズムは、サンプルのバックグラウンド(濁度)と不純物(RNA、チオシアン酸塩、EDTA、フェノール、クエン酸塩)を総吸収スペクトルから差し引き、DNA からの寄与を分離し、50 の濃縮係数(dsDNA 相当)を使用して DNA 濃度を計算します(ng/µl)。
DNA (Purified PCR)	精製された PCR 産物の定量に使用されます。Unmix アルゴリズムは、サンプルバックグラウンド(濁度)と不純物(dNTP、EDTA、ベタイン、チオシアン酸塩、PCR チューブ浸出物)を総吸収スペクトルから差し引き、DNA からの寄与を分離し、50 の濃縮係数(dsDNA 相当)を使用して DNA 濃度を計算します(ng/µl)。
Nucleic Acids (DNA equiv.)	任意のソースから単離された総核酸を定量化するために使用されます。Unmix アルゴリズムは、サンプルのバックグラウンド(濁度)と不純物(タンパク質、チオシアン酸塩、EDTA、フェノール、アジド、界面活性剤)を総吸収スペクトルから差し引き、核酸からの寄与を分離し、50 の濃縮係数を使用して核酸濃度を計算します(dsDNA 相当)。
Labeled dsDNA	濃縮係数 50 の 260nm での全吸光度を使用して、dsDNA 濃度(ng/µl)を計算します。特定の色素吸収波長とモル吸光係数を使用して、色素の取り込み(pmol/µl)および標識度(DoL)を決定します。

アプリケーション名	概要
Labeled ssDNA	濃縮係数 33 の 260nm での全吸光度を使用して、ssDNA 濃度(ng/µl)を計算します。特定の色素吸収波長とモル吸光係数を使用して、色素の取り込み(pmol/µl)および標識度(DoL)を決定します。
ssDNA Cy3/Cy5	Cy3 および Cy5(pmol/µl)で標識された ssDNA プローブの定量に使用されます。Unmix アルゴリズムは、総吸収スペクトルからサンプルバックグラウンド(濁度)および不純物(タンパク質、チオシアン酸塩、EDTA、フェノール、アジド、クエン酸塩)を差し引き、Cy3 および Cy5 色素からの寄与を分離し、33 の濃縮係数を使用して、ssDNA 濃度を算出し(ng/µl)。
RNA (Turbidity)	精製 RNA に最適です。260nm での全吸光度と 40 の濃縮係数(RNA 相当)およびサンプルバックグラウンド(濁度)補正を使用して、RNA 濃度(ng/µl)を計算します。
RNA (Single point)	精製 RNA に最適です。RNA 濃度(ng/µl)を計算するために、濃縮係数 40(RNA 相当)および単一波長(340nm またはカスタム)バックグラウンド補正で 260nm での全吸光度を使用します。
RNA (Any source)	あらゆるソースから分離された RNA の定量に使用されます。Unmix アルゴリズムは、サンプルのバックグラウンド(濁度)と不純物(DNA、タンパク質、チオシアン酸塩、フェノール、アジド)を総吸収スペクトルから差し引いて RNA からの寄与を分離し、40 の濃縮係数(RNA 相当)を使用して RNA 濃度

	を計算します(ng/µl)。
RNA (FFPE)	FFPT 標本から分離された RNA の定量に使用されます。Unmix アルゴリズムは、サンプルのバックグラウンド(濁度)と不純物(タンパク質、チオシアン酸塩、EDTA、フェノール、キシレン、アジド、クエン酸塩、界面活性剤)を総吸収スペクトルから差し引き、RNA からの寄与を分離し、40 の濃縮係数(RNA 相当)を使用して RNA 濃度(ng/µl)を計算します。
Nucleic Acids (RNA equiv.)	任意のソースから単離された総核酸を定量化するために使用されます。Unmix アルゴリズムは、サンプルのバックグラウンド(濁度)と不純物(タンパク質、チオシアン酸塩、EDTA、フェノール、アジド、界面活性剤)を総吸収スペクトルから差し引き、核酸からの寄与を分離し、40 の濃縮係数(RNA 相当)を使用して核酸濃度を計算します。
Labeled RNA	RNA 濃度(ng/µl)を定量化するために、濃縮係数 40 で 260nm の全吸光度を使用します。特定の色素吸収波長とモル吸光係数を使用して、色素の取り込み(pmol/µl)および標識度(DoL)を決定します。
RNA Cy3/Cy5	Cy3 および Cy5(pmol/µl)で標識された RNA プローブの定量に使用されます。Unmix アルゴリズムは、サンプルのバックグラウンド(濁度)と不純物(タンパク質、チオシアン酸塩、EDTA、フェノール、アジド、クエン酸塩)を総吸収スペクトルから差し引き、Cy3 および Cy5 色素からの寄与を分離し、40 の濃縮係数を使用して RNA 濃度を計算します(ng/µl)。
アプリケーション名	**概要**
Oligo DNA Sequence	DNA オリゴヌクレオチド濃度(ng/µl および pmol/µl)を計算するために、配列依存の濃縮係数で 260nm の全吸光度を使用します。
Oligo RNA Sequence	RNA オリゴヌクレオチド濃度(ng/µl および pmol/µl)を計算するために、配列依存の濃縮係数で 260nm の全吸光度を使用します。
Oligo Molar E	260nm での全吸光度と、モル吸光係数によって決定される濃度係数と分子量を使用して、DNA および RNA オリゴヌクレオチド濃度(ng/µl および pmol/µl)を計算します。

表 4：核酸アプリの名前と説明。青い名前のアプリは Unmix アプリケーションです。

タンパク質用アプリケーション

アプリケーション名	概要
Protein (Turbidity)	精製タンパク質に最適です。ユーザー定義の E1%吸光係数とサンプルバックグラウンド(濁度)補正を伴う 280nm での全吸光度を使用して、タンパク質濃度(mg/ml)を計算します。
Protein (Single point)	精製タンパク質に最適です。ユーザー定義の E1%吸光係数と単一波長(340nm またはカスタム)バックグラウンド補正で 280nm の全吸光度を使用して、タンパク質濃度(mg/ml)を計算します。
Protein (Lysates)	細胞溶解物などの混合サンプルからの総タンパク質(mg/ml)の定量に使用します。Unmix アルゴリズムは、サンプルのバックグラウンド(濁度)と不純物(核酸、アジド、界面活性剤、多糖類、一般的なプロテアーゼ)を総吸収スペクトルから差し引き、ユーザー定義の E1%吸光係数でタンパク質からの寄与を計算します。
IgG (High concentration)	275OD スペクトル限界を超える吸収極大を持つ、高濃度の完全長 IgG サンプル(>200mg/ml)の定量に使用します。Unmix アルゴリズムは、13.7 の固定 E1%を使用して、スペクトル形状を外挿して正確なタンパク質濃度を計算します。
IgG (His-tagged)	IMAC Ni カラムからイミダゾール含有バッファーで精製した His タグつき IgG(mg/ml)の定量に使用します。Unmix アルゴリズムは、ユーザー定義の E1%吸光係数を使用して、総吸収スペクトルからサンプルバックグラウンド(濁度)とイミダゾールを差し引き、タンパク質の濃度を計算します。
Labeled Protein	280nm での全吸光度とユーザー定義の E1%吸光係数を使用して、タンパク質濃度(mg/ml)を計算します。色素の取り込み(pmol/µl)と標識化度(DoL)は、特定の色素の吸収波長とモル吸光係数を使用して決定されます。

660nm Assay	660nm プロテインアッセイまたは同様の(OD660nm)を使用して、総タンパク質濃度を定量します。
BCA Assay	BCA タンパク質アッセイ(OD 562nm)を使用して、総タンパク質濃度を定量化します。

アプリケーション名	概要
Bradford Assay	Bradford タンパク質アッセイ(OD 595 nm)を使用して、総タンパク質濃度を定量します。
Lowry Assay	Lowry タンパク質アッセイ(OD 650 nm)を使用して、総タンパク質濃度を定量します。
MS Injection volume	LC-MS/MS システム用のトリプシン消化後のプロテオームペプチドサンプルでの使用を目的としています。ペプチド濃度(µg/µl)は、280nm の全吸光度とデフォルトの E1%値 10 を使用して定量化され、ユーザー定義の注入量(µg)をもとに、目的の注入量(µl)を計算します。

表 5：タンパク質アプリの名前と説明。青い名前のアプリは Unmix アプリケーションです。

その他のアプリケーション

アプリケーション名	概要
Plasma QC	血漿品質評価に使用されます。Unmix アルゴリズムは、総吸収スペクトルを分析して、サンプルの濁度、ビリルビン、ヘモグロビン、およびタンパク質を分離及び定量し、ピーク吸光度値とデフォルトの E1%が 10 の各コンポーネントの濃縮係数を使用します。
UV/Vis	UV/Vis スペクトル測定に使用され、最大 3 波長の OD 値をレポートします。Single-Point バックグラウンド自動制御補正が適用されます。
Raw Absorbance	ブランクまたはバックグラウンド補正をせずに、未処理のフル UV/Vis スペクトル測定に使用します。
Culture OD600	600nm での細菌または細胞培養の光学密度を決定するために使用されます。
Standard Curve	既知の濃度を持つ一連の参照標準を使用して、ユーザー定義の標準曲線に基づいてサンプルの濃度を決定します。

表 6：その他のアプリ名と説明。青い名前のアプリは Unmix アプリケーションです。

結論

従来の紫外吸収分光測光法の原理を改善する事により、Lunatic はタンパク質と核酸の定量化と品質チェックを次のレベルに引き上げます。革新的な光学設計、マイクロ流路ベースのチップと固定光路長キュベット、安定な信号処理、そして様々な専用アプリの組み合わせにより、Lunatic は最先端の技術で正確な結果を提供します。
Lunatic は 230~750nm および 0.03~275OD の結果を提供します。Big Lunatic は、約 5 分で最大 96 個のサンプルの濃度を決定する、ハイスループットのプレートベースのシステムです。
Little Lunatic は、2 分間で最大 16 個のサンプルの濃度を測定し、軽い作業負荷に最適です。
Big、または Little Lunatic のいずれが最適かどうかにかかわらず、Lunatic は種々の内蔵アプリケーションを備えており、あらゆるソースからの核酸またはタンパク質の測定を容易にします。

参考文献

1. UV-VIS Spectroscopy and Its Applications, H Perkampus,
Germany: Springer Berlin Heidelberg, 2013.