

Key words

- ・ ピペット分注精度
- ・ 定量実験 (Real Time-PCR 実験)
- ・ 分注精度と定量実験の精度の関係

◎要約

マイクロピペット(プッシュボタン式液体用微量体積計)の分注精度が定量的な測定実験(Real Time-PCR や酵素活性測定)の結果への程度影響するか調べた。

弊社の高分注精度を特長とした電動ピペット(製品名: pipetty)を用いて Real Time-PCR 実験を行った結果、他社の分注精度が良くないピペットと比べて実験結果のばらつきが小さかった。この結果を受けて、ピペットの分注精度(重量測定法により得られたデータ)は、Real Time-PCR 実験結果に反映されると判断した。さらに、他社に比べ分注精度が高い pipetty は Real Time-PCR 実験に向いていると判断した。

◎諸言

酵素や DNA など貴重な試薬を取り扱う生物学分野において、それら試料はマイクロリットルサイズで扱われ、それらの作業はマイクロピペットによって行われる。マイクロピペットは便利な体積計である。しかしその反面、ピペット装置の溶液を分取するパーツであるチップそのものには容量を示す目盛りが付いていないので、分取量が設定値とずれていても目視ではわかりにくいという欠点がある。ユーザーが分取量を確認できない欠点をピペットが持つため、ピペットを取り扱うメーカーごとに分注精度を重量法により測定しそのデータを開示している。

今回の私たちは重量法により測定された分注精度が異なるピペットを 2 機種用意し、定量的な測定実験の結果へ影響を及ぼすか評価をすることにした。定量的な実験法として Real Time-PCR 実験を用いて評価した結果、分注精度が Real Time-PCR の実験精度に影響を及ぼすことが分かったので報告する。

◎方法：(実験方法の詳細は「方法詳細」と「試薬と実験機材」の項目を参照。)

分注精度と Real Time-PCR 実験精度を以下の方法で求めて、相関があるか調べた。

ピペットの分注精度を重量法により測定後、同じピペットで Real Time-PCR を 5 回繰り返し測定し、その実験データのばらつきを求めて実験精度を評価した。

ばらつきは実験結果の標準偏差を用いて評価し、精度は標準偏差を平均値で割った C.V.値を指標とした。

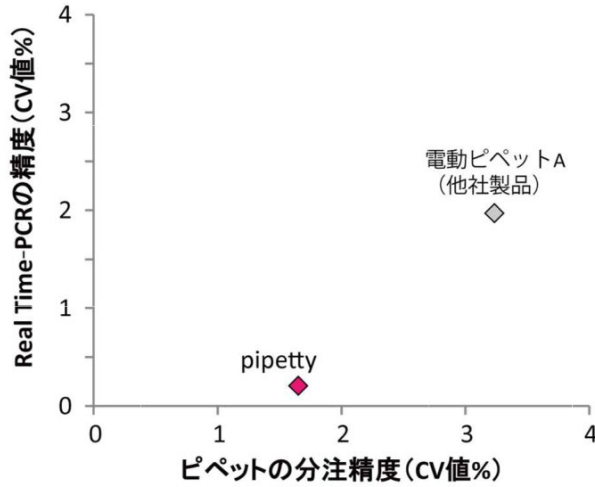
◎結論：

分注精度が良いピペットは Real Time-PCR 実験の結果のばらつきが小さいと判断した。

◎結果：

- 1) 分注精度が良いと Real time-PCR の測定精度が上がった。

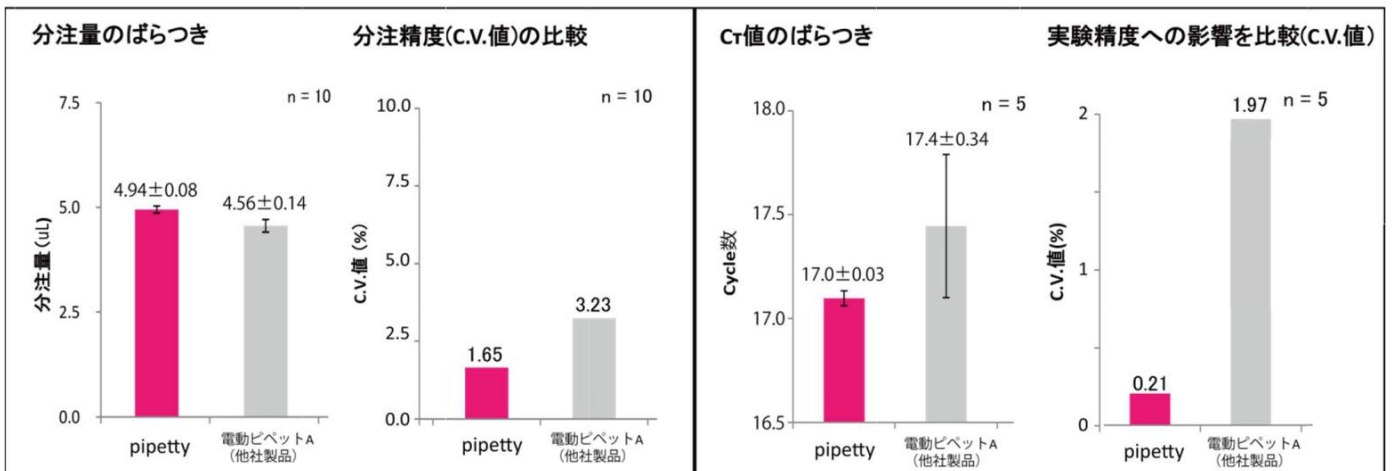
分注精度がReal Time-PCRの結果に及ぼす影響



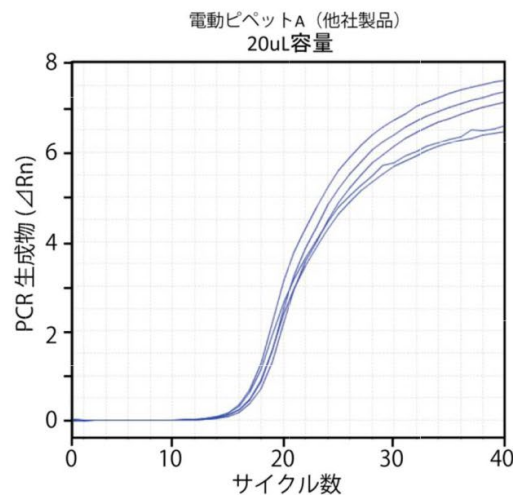
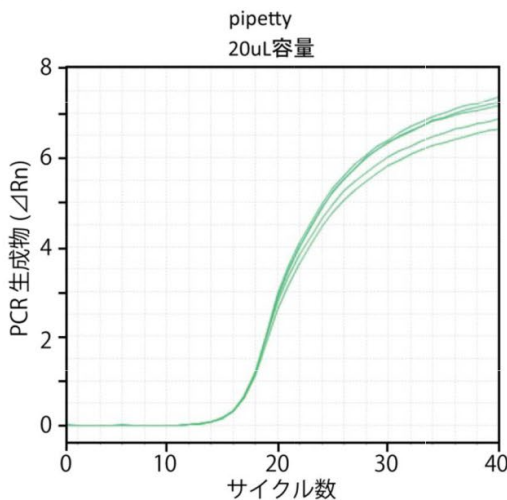
- 2) 電動ピペット 2 製品を(アイカムス・ラボ社: pipetty と他社: 電動ピペット A) 評価した結果、pipettyの方が分注精度と Real time-PCR の測定精度が良よかった。

◎重量法による分注精度の測定

◎分注精度がReal Time-PCRの結果に及ぼす影響



- 3) ピペットによる分注精度が Real time-PCR 測定精度へ及ぼす影響を評価するため、測定を 5 回繰り返して実験データのばらつきを評価した。pipetty にて得られた実験はばらつきが小さかった。増幅プロット



◎方法詳細

1) 重量法による分注精度の測定

1. 電子天秤の電源を入れて、天秤皿上に 50ml 遠沈管のフタを置く。
2. 重量の表示が安定したらリセットボタンを押し重さを「0」表示にする。
3. 蒸留水を入れた 50ml 遠沈管を用意する。
4. ピペットを用いて蒸留水を 50ml 遠沈管より 5 μ L 分吸取る。
5. 天秤皿上のフタにピペットのチップ先端を近づけて 5 μ L 分液滴を載せる。
6. 電子天秤に表示された重さを記録する。
7. 液滴を紙で拭き取る。
8. 作業 4-7 を 10 回繰り返す。

2) Real Time-PCR 実験

1. PCR MIXTURE を製作するため、以下の 4 種類の液を取り出し、1.5mL チューブに注ぎよく混ぜる。

・2xSYBR PCR Master	100 μ L
・5 pmol/ μ L Primer (S)	20 μ L
・5 pmol/ μ L Primer (AS)	20 μ L
・蒸留水	20 μ L
2. Real Time-PCR 用 96well に PCR MIXTURE を 8 μ L ずつ以下のピペットで分注する。
 - ・well 番号 D4-8 (5well) pipetty
 - ・well 番号 F4-8 (5well) 電動ピペット A(他社製品)
3. Real Time-PCR 用 96well にマウスゲノムを 2 μ L 分注する。
 - ・well 番号 D4-8 (5well) pipetty
 - ・well 番号 F4-8 (5well) 電動ピペット A(他社製品)
4. Real Time-PCR 装置 (PRSMI 7900) にセットして以下の内容で PCR をかける。
 - ①95 $^{\circ}$ C 10min
 - ②94 $^{\circ}$ C 15sec
 - ③60 $^{\circ}$ C 30sec
 - ④72 $^{\circ}$ C 1min

◎試薬と実験機材

○試料

品名	企業名	型番	備考
Mouse genomic DNA: 4 ng/ μ l	Millipore,	C at.69239	Real Time -PCR実験にて 使用

○試薬-消耗品

品名	企業名	型番	備考
Fast SYBR [®] Green Mas ter Mix	Life Technologies	4385612	Real Time-PCR用試薬
Primer (S)	invitrogen	配列:C AAAATGGTGAAGGTCGGTGT G	DNA 合成を委託
Primer (AS)	invitrogen	配列:ATTTGATGTTAGTGGGGTCTCG	DNA 合成を委託
ART 10 REACH マイクロポイント	MBP	NF: 10 μ l E	液切れの良いチップ
ART 200 マイクロポイント	MBP	NF: 200 μ l	液切れの良いチップ

○実験-測定機材

品名	企業名	型番	備考
電子天秤	メトラートレド	AG285	分注精度の測定に使用
電動ピペット: pipetty	アイカムス・ラボ	20 μ L 容量	分注に使用
Fast Real Time PCR System	lifetechnologies	PRIISM 7900	Real Time-PCR装置