

UV-Vis 分光光度計を用いた 二本鎖核酸の熱融解温度の高速測定

Agilent Cary 3500 UV-Vis により高速昇温速度で
再現性に優れた融解温度 (T_m) データを実現

著者

Wesam Alwan and
Mathieu Rault
Agilent Technologies, Inc.



はじめに

二本鎖核酸は、温度を上昇させると分離して一本鎖になります。この現象は、特定の温度で塩基ペア間の水素 (H) 結合が切断されることにより生じます。熱融解実験では、核酸塩基間の H 結合数の違いを利用します。例えば、DNA ではヌクレオチドのアデノシンとチミン (A=T) およびグアニンとシトシン (G=C)、RNA ではアデノシンとウラシル (A=U) および G と C の各塩基間に H 結合が形成されます。ヌクレオチド間の塩基結合 G=C には 3 つの水素結合が関与するため、その切断には二重結合のペアよりも大きな熱エネルギーが必要となります。また、DNA および RNA に含まれる G=C ペアが多いほど、融解温度は高くなります。このように、融解温度 (T_m) は、サンプル中の塩基組成 (G=C に対する A=T または U=T の比率) を正確に表す指標になります。

核酸の創薬、開発、製造では、研究者およびメーカーにより T_m が二次同定試験 (QC チェック) として広く使用されています。核酸の吸光ピーク波長である 260 nm における一本鎖核酸の吸光度は二本鎖核酸よりも高いため、通常、融解点の測定には UV-Vis 分光光度計が使用されます¹。例えば、ニシン精子 DNA の場合、図 1 に示すように、260 nm における吸光度は 25 °C のときより 90 °C のときの方が明らかに高くなっています。

核酸熱融解実験では、一般に 260 nm における吸光度の変化を測定します。その際、pH およびイオン強度条件の制御下で、通常は 0.5 °C /min の昇温速度でサンプルの温度を徐々に上昇させます^{2~4}。このように緩慢な昇温速度を使用することで、正確で再現性の高いデータが確実に得られます。しかし、昇温

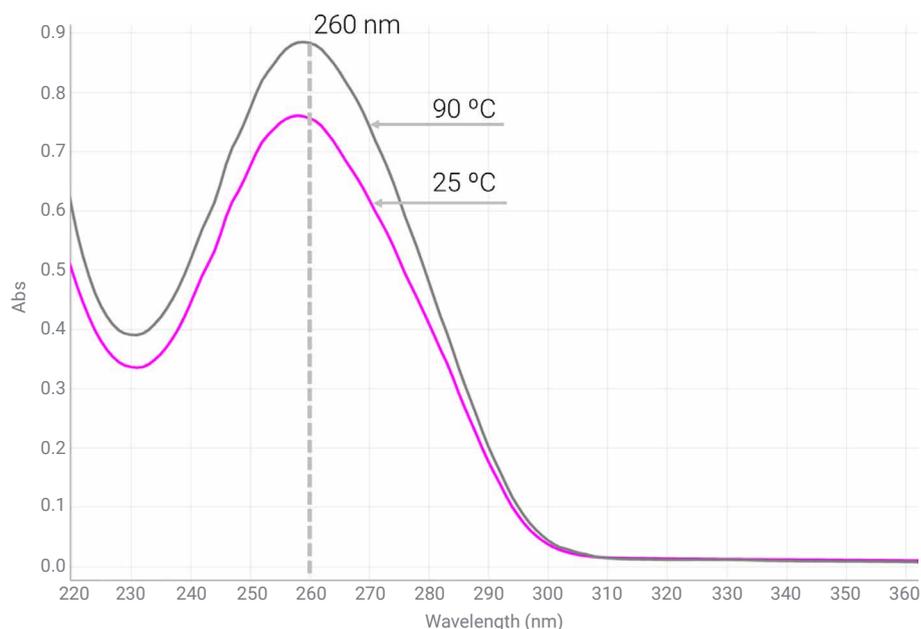


図 1. 25 °C (2 本鎖、紫) および 90 °C (1 本鎖、グレー) におけるニシン精子 DNA サンプルの波長スキャン

速度が低速であることは、実験に時間がかかることも意味します。例えば、0.5 °C /min で 20 °C から 95 °C まで温度を変化させるには 2.5 時間かかります。多くの場合、ラボでは再現性の高い結果を確保するためにこの測定を繰り返しており、熱融解実験を完了するには非常に長い時間を要します。

熱融解測定に必要な時間を短縮するには、さまざまな手法があります。例えば一部の機器では、1 つの実験を複数の段階に分けて、それぞれの段階で異なる昇温速度を使用することができます。開始段階と終了段階では高速の昇温速度を使用し、サンプルが変性する温度範囲では低速とします。近年の分光光度計の進歩により、熱融解測定全体にかかる時間が以前よりも大幅に短縮され、温度精度が向上しています。

ただし、再アニーリング実験は、一本鎖核酸の再アニーリングを完了させるための時間を設けるために、より低速で行う必要があります。

Agilent Cary 3500 マルチゾーン UV-Vis 分光光度計では、組み込み型キュベット内温度プローブにより、熱融解実験中の溶液の温度が正確に制御されます。サンプルの温度は、冷却水循環装置を使用しない空冷式ペルチェ装置により 0 ~ 110 °C の範囲で調整されます。

今回の研究では、Cary 3500 マルチゾーン UV-Vis 分光光度計を用いて、昇温速度の高速化がニシン精子 DNA の T_m の計算値に与える影響を評価しました。

実験方法

サンプル

リン酸緩衝生理食塩水 (0.01 M リン酸緩衝液、0.0027 M 塩化カリウム、0.137 M 塩化ナトリウム、pH 7.4、25 °C) で約 15 µg/mL のニシン精子 DNA (D6898) 溶液を調製しました。リファレンス (ブランク) 溶液には、リン酸緩衝生理食塩水を使用しました。測定には、アジレントの石英製セミマイクロセル (部品番号 5063-6559) と温度プローブ (部品番号 G9889-60005)、サンプル量 600 µL、光路長 10 mm を使用しました (図 2)。サンプルの蒸発を最小限に抑えるため、数滴の鉱物油 (FS-SM015) をキュベット内のサンプル液面上に浮遊させました。

機器とメソッド

Cary 3500 マルチゾーン UV-Vis 分光光度計は Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアでコントロールしました。測定には、表 1 に示すメソッドパラメータを使用しました。実験中に変化させたパラメータは昇温速度のみで、合計 6 種類の昇温速度 (1、5、10、20、30、40 °C /min) を使用しました。すべての測定で、少なくとも 3 つの一定分量のサンプルを使用し、同一条件下で同時に測定しました。各サンプルキュベットをリファレンスとペアにして、8 ポジションのマルチセルホルダに配置しました。キュベット内温度プローブを各サンプルキュベットに挿入し (図 2)、プローブからのフィードバックをもとに実験温度を調整しました。

1 °C ごとにデータを収集し、各データポイントが記録される前の 0.1 秒間の信号を平均化しました。30 °C /min の昇温速度では、測定に約 10 分かかりました。

表 1. Agilent Cary 3500 UV-Vis のメソッドパラメータ

パラメータ	設定値
波長	260 nm
信号平均化時間	0.1 秒
データ間隔 (nm)	1 °C
開始温度	25 °C
終了温度	100 °C
昇温後設定温度	25 °C
昇温速度	1、5、10、20、30、40 °C /min
昇温ステップ数	1
温度制御	温度プローブ
スムージングフィルタ	11
スムージングデータ間隔	0.5 °C
微分フィルタ	11
微分データ間隔	0.5 °C



図 2. 測定中に実験温度を制御するために使用したアジレントのセミマイクロセル (1) とキュベット内温度プローブ (2)

結果と考察

異なる昇温速度での T_m 値

6種類の昇温速度（1、5、10、20、30、40 °C/min）で収集した吸光度データを図3に示します。図3には、各スキャンの一次導関数の計算結果も示されています。各一次導関数プロットの最大ピークは、融解曲線の間中点、すなわち T_m 値を示します。図3および表2に示すように、実験で使用した6種類すべての昇温速度において、ニシン精子 DNA サンプルの T_m 測定値の標準偏差は ±0.2 °C に収まりました。

表2. 各昇温速度におけるニシン精子 DNA サンプルで測定された T_m 値

エントリ	昇温速度 (°C/min)	レプリケート1の T_m (°C)	レプリケート2の T_m (°C)	レプリケート3の T_m (°C)	各昇温速度の T_m (°C) 平均値 (n = 3)	各昇温速度の T_m (°C) 標準偏差 (n = 3)
1	1	87.1	87.1	87.1	87.1	0.0
2	5	87.0	86.6	86.5	86.7	0.2
3	10	86.7	87.1	87.0	86.9	0.2
4	20	87.1	87.1	87.1	87.1	0.0
5	30	87.1	87.0	86.6	86.9	0.2
6	40	86.6	87.0	87.0	86.9	0.2
全昇温速度の T_m (°C) 平均値 (n = 6)		86.9	87.0	86.9		
全昇温速度の T_m (°C) 標準偏差 (n = 6)		0.2	0.2	0.2		

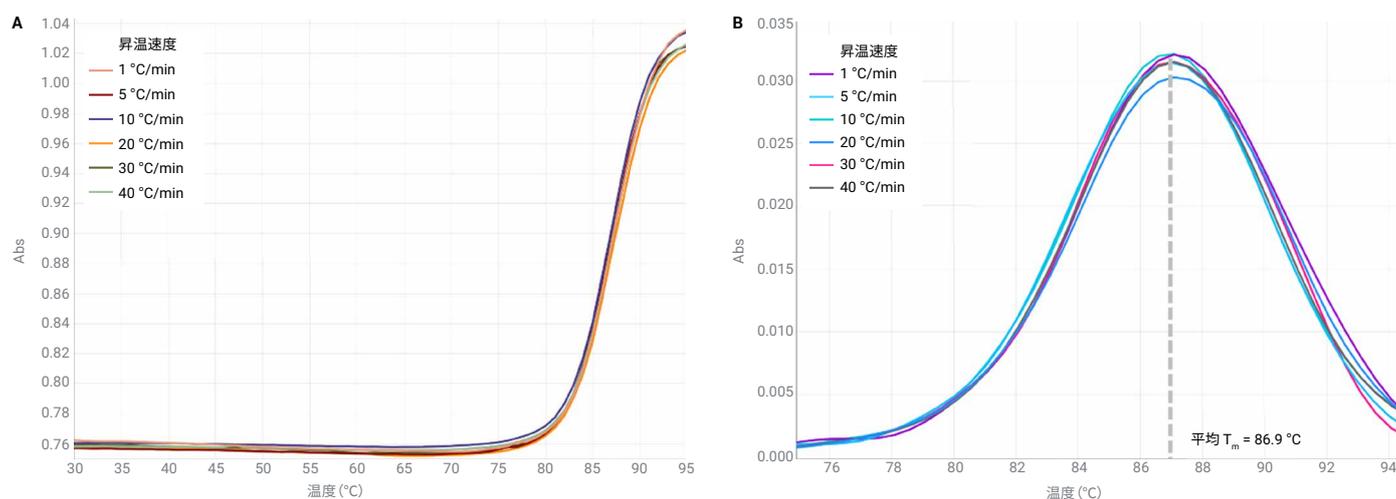


図3. 各昇温速度におけるニシン精子 DNA の吸光度と温度の関係 (A) および対応する一次導関数 (B)

Cary UV ワークステーションに標準搭載のスムージングおよび微分計算機能

Cary UV ワークステーションソフトウェアには、融解温度の計算に役立つスムージングおよび微分機能が搭載されています。スムージングを適用すると、スペクトルの干渉やノイズを低減できます。また、微分機能では一次導関数が計算されます。

スムージングおよび微分機能では Savitzky-Golay 法が使用されます⁵。どちらの機能もフィルタと間隔のサイズを必要とします。フィルタサイズは各出力点を生成するために使用する点の数を定義します。データ解析にデータ収集時とは異なる間隔値を使用すると、計算データは指定した間隔に設定されます。スムージングと微分の間隔は、収集間隔と同じにすることを推奨します。

スムージングと微分の計算はメソッドに保存できます。これにより、データ取り込み終了時に計算が自動的に適用されます (図 4)。

結論

Agilent Cary 3500 マルチゾーン UV-Vis 分光光度計を使用して、6 種類の昇温速度でニシン精子 DNA サンプルの融解点 (T_m) を測定しました。融解点の測定値の標準偏差は、すべての昇温速度について ± 0.2 °C 以内でした。このレベルの再現性は、ラボにおいて、標準プロトコルの 0.5 °C/min より高速の昇温速度を使用して、結果の品質を損なうことなく実験時間を大幅に短縮できることを意味します。今回の研究により、Cary 3500 UV-Vis を使用することで、これまで実験で 2.5 時間かかっていた測定を約 10 分で完了できることが実証されました。

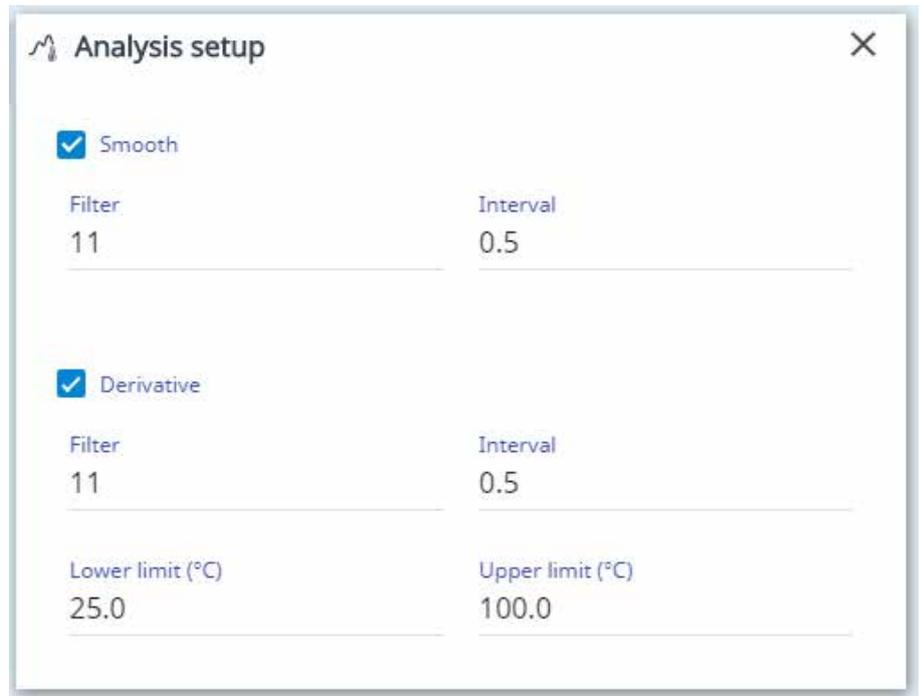


図 4. Agilent Cary UV ワークステーションに標準搭載されているスムージングおよび微分計算機能

Cary 3500 UV-Vis の 8 ポジションマルチセルにより、少なくとも 3 つのサンプルレプリケートとリファレンスを同時に測定できたことも、実験全体の測定時間が短縮された要因です。

Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアには、DNA 融解温度の計算機能 (スムージングおよび微分) が搭載されており、実用的な結果がすばやく得られます。計算はメソッドに保存できるため、データ収集後に自動的に計算が適用され、結果が表示されます。

高速昇温速度の使用は、温度に応じて他の UV-Vis 吸光度測定にも拡張できるため、温度制御された実験を実施するラボの生産性が大きく向上します。また、8 つのキュベットポジションをすべて同時に測定できることから、

他の実験変数を一定にして温度のみを変化させ、それに対する液体サンプルの反応を調査するラボでは、生産性のさらなる向上を実現できます。

Cary UV ワークステーションソフトウェアは Agilent OpenLab ソフトウェアと統合することもできます。OpenLab では、データを安全に取り込み、処理、レポート、保存するための技術管理機能が提供されます。これらの技術管理機能は、FDA 21 CFR Part 11、EU Annex 11、GAMP5 に加え、ISO/IEC 17025 および EPA 40 CFR Part 160 のコンプライアンスガイドラインへの準拠が求められるラボで必要になります。

参考文献

1. Shen, C-H. *Diagnostic Molecular Biology*, Chapter 7 - Detection and Analysis of Nucleic Acids, Academic Press: 2019; pp 167–185.
2. Chetana, P. R. *et al.* New Ternary Copper(II) Complexes of L-Alanine and Heterocyclic Bases: DNA Binding and Oxidative DNA Cleavage Activity. *Inorganica Chimica Acta* **2009**, *362*, 4692–4698.
3. Rao, R.; Patra, A. K.; Chetana, P. R. Synthesis, Structure, DNA Binding and Oxidative Cleavage Activity of Ternary (L-leucine/isoleucine) Copper(II) Complexes of Heterocyclic Bases. *Polyhedron* **2008**, *27*, 1343–1352.
4. Davis, T. M. *et al.* Melting of a DNA Hairpin Without Hyperchromism. *Biochem.* **1998**, *37(19)*, 6975–6978.
5. Savitzky, A.; Golay, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedure. *Anal. Chem.* **1964**, *36*, 1627–39.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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。

DE80572371

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, August 15, 2022

5994-0384JAJP