

蛍光 BioMelt パッケージを用いた クエンチャー (DABCYL) 標識 PNA プローブと蛍光標識 DNA 間の ハイブリダイゼーションの蛍光測定

アプリケーションノート

著者

Katherine Lighton,
Agilent Technologies, Inc.
Mulgrave, Victoria 3170,
Australia.
Mark J. Fiandaca,
Boston Probes, Bedford,
Massachusetts 01730, USA.

はじめに

生体細胞においては、可逆ハイブリダイゼーションは、複製、転写および翻訳の過程で重要な必要条件です。可逆ハイブリダイゼーションは、アニールおよび変性した後、もう一度、アニールする核酸の能力です。核酸は、通常、環境温度と PH に依存しており、アニールおよび変性する能力があります¹。特別なポリヌクレオチド配列を検出するためのアッセイを開発するため、この自然に生じる現象が科学者によって用いられることが増えています。より多くの DNA (*Hoffman La Roche*) を生成するためのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) やペプチド核酸 (PNA) 技術といった種々の異なる方法におけるツールとしても用いられています²。

PNA プローブは、食品、飲料、水および環境の微生物を検出するために工業界で使用されることが増えてきています²。製薬および研究の分野では、配列特異性の PNA プローブ (配列が既知の場合) が識別対象の特定 DNA についてのハイブリダイゼーション分析を行うために開発されています²。PNA プローブはアンチセンスオリゴヌクレオチド分析³用の伝達ベクターとしてや、安定性研究のための三重らせん DNA 分析に用いられています^{4,5}。PNA は、Watson-Crick ハイブリダイゼーション特性についての DNA 模倣物であり、主鎖は DNA の特徴である糖リン酸主鎖ではなく、アミノ基にリンクした N-2-アミノエチルグリシン単位の繰り返しで構成されています⁶。PNA 分子の特異構造では、一般的な塩基対の形成がないだけでなく、その構造がアキラルで、プローブの主鎖において荷電されていないため、非常に高速で強いハイブリダイゼーションをもたらします⁶。



Agilent Technologies

装置

- Cary Eclipse 蛍光分光光度計
- マルチセルベルチェ
- 温度制御装置
- クォーツ 10 mm、ストッパー付
- Eclipse Thermal ソフトウェア (Bio ソフトウェアパッケージ)

サンプル調製

ストランドの作成: PCRの間、非蛍光 DNA プライマーを二本鎖分子中に組み込みます¹⁴。

使用する色素ラベル:

DNA : 5'-カルボキシフルオセイン (混合異性体)

PNA : DABCYL (4-((4-(ジメチルアミノ)-フェニル)-アゾ)-安息香酸) (上記の図 1 を参照)。

PNA と DNA の両方を 1 mL の緩衝液中に 50 nM 入れました。緩衝液は 100 mM NaCl, 10 mM KPO₄ pH 7.1 です。

装置およびソフトウェアパラメータ

図 2~4 には、Cary Eclipse Thermal ソフトウェアアプリケーションにおけるパラメータ設定が示されています。

Cary タブ:

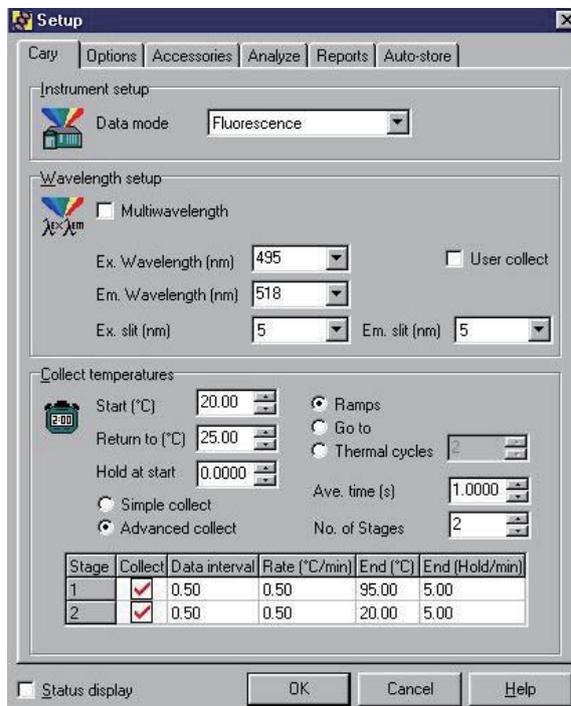


図 2. 励起 495 nm 発光 518 nm、ランプ 20~95 °C および 95~20 °C (正および負のランプ)。95 °C までに上げる前の 5 分間のホールドタイム、再び 20 °C に下げる前の 5 分間のホールドタイム

Options タブ:

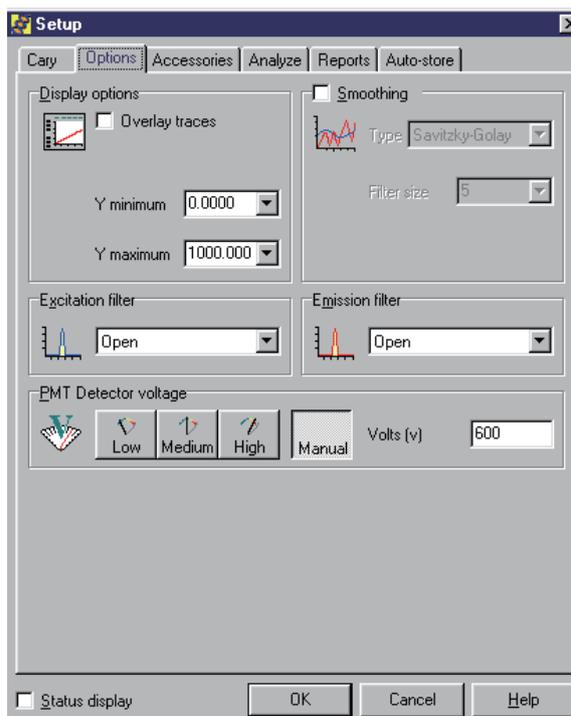


図 3. 励起および発光モノクロメータの両方について、フィルタをオープンにセットしました。PMT 電圧を 600 V に設定しました

Accessories タブ :

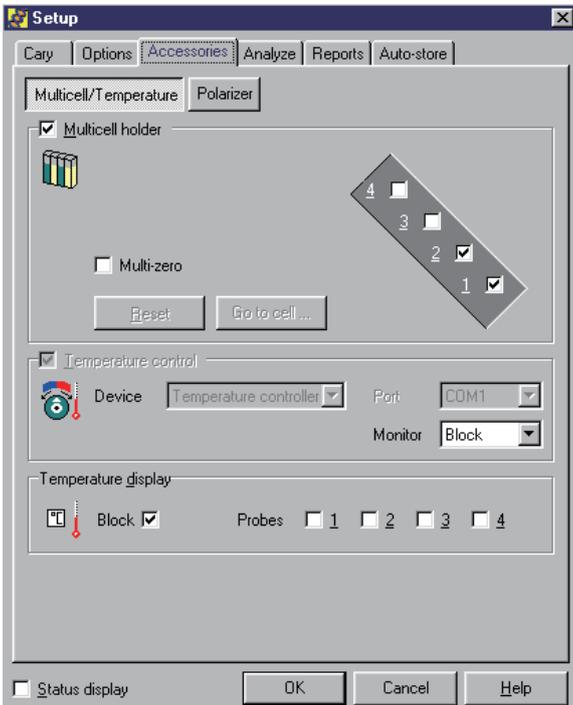


図 4. Eclipse マルチセルペルチェを用いて、2つのサンプルを測定しました。溶液プローブではなくブロックを観測し、表示しました

Analyze タブ :

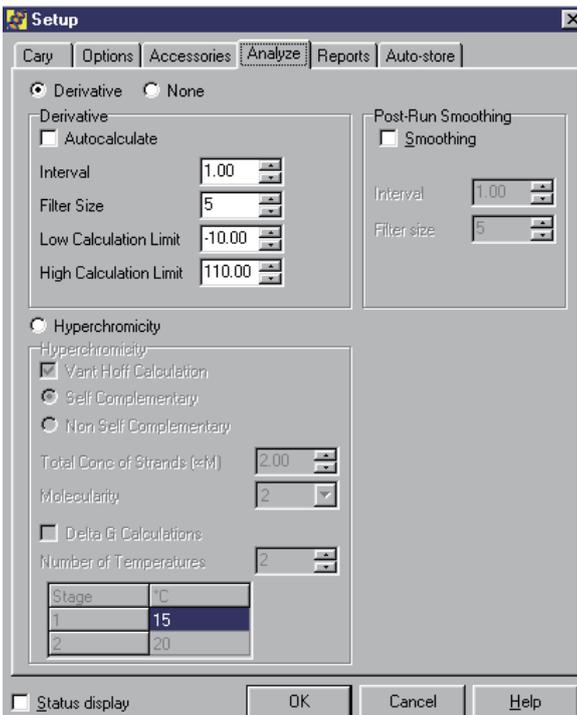


図 5. Thermal ソフトウェアで設定された一次導関数を用いて行われる計算

この分析では、導関数法を用いて T_m 値 を計算しました (以下の図 6 および図 7 を参照)。必要に応じて、Marky らによるメソッドの修正版を採用している Thermal ソフトウェアの計算を用いて、さらに熱力学計算 (エンタルピー (ΔH)、エントロピー (ΔS)、自由エネルギー (ΔG) および速度定数(k) を行うことができます⁸。

結果

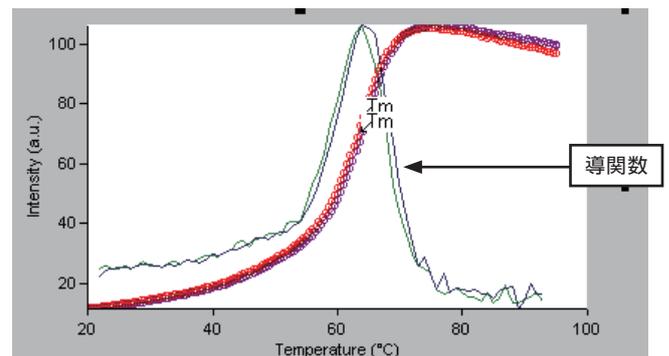


図 6. 5'6-カルボキシフルオセイン標識 DNA の 13mer DABCYL 標識 PNA プローブを用いた T_m 値。 T_m は、Cary Eclipse Thermal ソフトウェアを用いて、導関数曲線によって計算しました。計算された温度は 63.9 °C でした

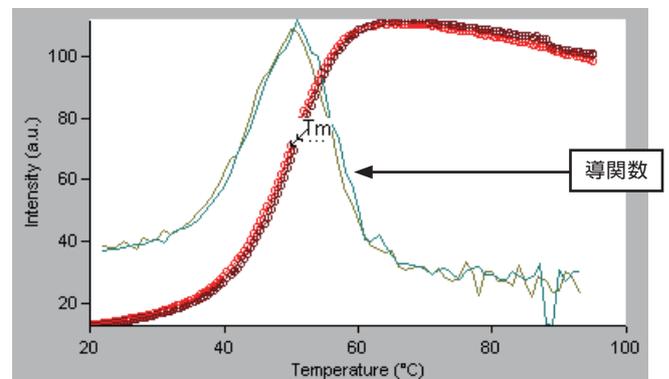


図 7. 5'6-カルボキシフルオセイン標識 DNA の 9mer DABCYL 標識 PNA プローブを用いた T_m 値。 T_m は、Cary Eclipse Thermal ソフトウェアを用いて、導関数曲線によって計算しました。計算された温度は 49.94 °C でした

図 6 と図 7 は、13mer と 9mer PNA サンプルの両方について、それぞれ温度の関数として蛍光強度が変化することを示しています。両方のサンプルは、ハイブリダイゼーションの間 (クエンチャー (DABCYL) 標識 PNA プローブと 5'6-カルボキシフルオセイン標識 DNA の間でアニーリング中) で、低い蛍光を示しています。

温度が上昇するにつれて、ストランドは別々に融解し、DABCYL は蛍光から移動します。フルオレセインの蛍光強度を増加させるエネルギー移動はありません。9mer PNA プローブの T_m 値は 49.94 °C、13mer PNA プローブの T_m 値は 63.9 °C となります。

考察

図 6 と図 7 におけるデータを比較すると、わずかに異なった融解プロファイルであることがわかります。DNA 成分が両方のサンプルで同じであることを考慮すると、観測された差は、PNA プローブの長さが変化することに起因していると考えられます。9mer PNA (図 7) が 13mer PNA (図 6) より低い融解温度 (T_m) になっていることは明らかです。前述したように、PNA プローブのポリアミン主鎖は、DNA の糖リン酸主鎖より安定しています。したがって、より多くのポリアミン結合 (13mer PNA プローブなど) が存在しているときに、DNA 領域で強い結合があることは容易に想像できます。さらに、2 つのストランド間の結合を切断するには高い温度が必要となり、その結果、全体の T_m 値が高くなります。錯体中の PNA プローブが長くなるときに高い T_m が観測される場合には、PNA (ポリアミン結合) の結合特性が DNA (糖リン酸) のものより強いと考えることができます⁶。したがって、一部のハイブリダイゼーション分析では、PNA プローブの高い安定性と強いハイブリダイゼーションの特性が、現在使用されている従来型の DNA プローブより有益であることがわかります。

これらの結果は、プローブの安定性を特徴づけ、ハイブリダイゼーションの分析を最適化する際にサーマルメルトのプロファイルがきわめて有益であることを示しています。この手法は、RNA および DNA タンパク質のような他のサンプルの熱力学特性を特徴づける際にも有効です。この実験で使用された Agilent Cary Eclipse 装置、マルチセルペルチェおよび Thermal ソフトウェアでは、データ収集および今回のようなハイブリダイゼーション分析に必要なすべての計算を柔軟に行うことができます。

この特有のサーマルメルト分析には、0.5 °C/min のランプ速度を使用しましたが、溶融カーブのある段階でランプ速度を変化させることができます。ソフトウェアでは、0.06 °C/min という低速のランプ速度 (対象とする温度領域でより多くのデータを得るため) を設定できます。目的の温度に素早く到達させる必要がある場合には、30 °C/min という高速のランプ速度を設定できます (図 2 を参照)。

ホールド時間をプログラム (図 2 を参照) し、サンプルの変性や再アニールに必要となる時間で最高または最低の温度を用いて機器を維持することができます。Eclipse マルチセルペルチェブロックおよびクオーツキュベット間での効率的な温度伝達により、ホールド時間は 5 分で十分です。今回のような分析条件を最適化するには、温度精度と再現性が重要になるため、非常に正確な温度制御が必要になります。

結論

今回の結果では、T_m 値を使用すれば、特定の条件下で最高の安定性が得られるプローブを特定できることがわかりました。対象となる環境下でのサンプルのサーマルメルト特性によって、ハイブリダイゼーション分析の効率を確立し、最適化できます。この実験で得られた結果から、PNA プローブの長さが DNA 錯体の安定性に影響を与えることが明らかになりました。

参考文献

1. Plum, G.E., Pilch, D.S., Singleton, S.F. & Breslauer, K.J. Nucleic Acid Hybridization: Triple Stability and energetics. *Annu. Rev. Biomol. Struct*, 1995, **24**, 319-350.
2. www.bostonprobes.com
3. Guzzo-Pernell, N., Tregear G.W. Triple Helical DNA formation by a Hydrophobic Oligonucleotide-Peptide Molecule. *Aust. J. Chem*, 2000, **53**, 699-705.
4. Guzzo-Pernell, N.; Lawlor J.M. & Haralambidis J. Triple Helical DNA. *Biomedical peptides, proteins and nucleic acids*, 1997, **2**, 107-122.
5. Yang, M., Ghosh, S.S., Millar, P. Direct Measurement of Thermodynamic and Kinetic Parameters of DNATriple Helix Formation by Fluorescence Spectroscopy. *Biochemistry*, 1994, **33**, 15329-15337
6. Goforth, S. It's all in the backbone: Boston Probes PNA Probe technology offers an alternative to conventional DNA probes; *The Scientist*, Nov 2000, **14** [22]:19.

7. Morrison, L.E. & Stols L.M.; Sensitive Fluorescence Based Thermodynamic and Kinetic Measurements of DNA Hybridization in solution. *Biochemistry*, 1993, **32**, 3095-3104.
8. Marky, L.A. & Breslauer K.J. Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from melting curves. *Biopolymers*, 1987, **26**, 1601.
9. Bush, CA. Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry, 1974, (Ts'o, P. O. P., Ed.) pp 91-169, Academic Press, New York.
10. Breslauer, K.J. Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology, 1986, (Hinz, H.J., Ed.) pp 402-427, Springer-Verlag, New York.
11. Patel, D.J., Pardi, A., & Itakura, K. DNA Conformation, dynamics and interactions in solution. *Science*, 1982, **216**, 581-590.
12. Clegg, R.M. Fluorescence Resonance Energy Transfer and Nucleic Acids. *Methods in Enzymology*, 1992, **211**, 353-388.
13. Yaron, A., Carmel, A., Katchalski-Katzir, E. Intramolecularly quenched Fluorogenic Substrates for Hydrolytic Enzymes. *Analytical Biochemistry*, 1972, **95**, 228-235.
14. Fiandaca, M.J., Hyldig-Nielsen, J.J., Gildea, B.D., Coull, J.M. Self Reporting PNA/DNA Primers for PCR Analysis. *Genome Research*, 2001, **11**, 609-613 or www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.170401

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2001, 2012
Published December 18, 2012
Publication Number SI-A-1833JAJP



Agilent Technologies