

# 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<sup>1</sup>。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<sup>2</sup>。

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<sup>2</sup>。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<sup>2</sup>。PNA プローブはアンチセンスオリゴヌクレ オチド分析<sup>3</sup>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<sup>4,5</sup>。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<sup>6</sup>。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<sup>6</sup>。



このため、DNA で観測されるよりも高いサーマルメルト値が生 成されます。さらに、PNA プローブは、とりわけタンパク質分 解酵素に耐性があります。また、ハイブリダイゼーション過程で あらゆる酵素の攻撃を最小限に抑える細胞環境中におけるヌ クレアーゼ分解にも耐性があります<sup>6</sup>。通常の DNA プローブの ハイブリダイゼーションより強いハイブリダイゼーション分析に おいては、上述のすべての要因により PNA プローブが使用さ れます。

熱力学的データは、特異的な分析を最適化する方法として、生物医学の研究、製薬および診断研究の分野にますます使用されてきています。Cary 蛍光あるいは UV-Vis のサーマルメルトア プリケーションは、ハイブリダイゼーションのエンタルピー (Δ H)、エントロピー (ΔS)、自由エネルギー (ΔG) および速度定数 (k) のような熱力学計算を自動的に行います<sup>1</sup>。この情報は、核酸サンプルと対象となる色素についての最適な実験条件を確立するために使用できます。特に、温度、平衡時間および実験のボリュームを、いくつかの異なる実験を行うことなく確立することができます<sup>7</sup>。Cary の計算には、Van't Hoff および Marky メソッドの修正版を採用しています<sup>8</sup>。

色素を伴わない核酸ハイブリダイゼーションを測定することが できる他の方法があります。たとえば、円偏光二色性<sup>9</sup> およびハ イパークロミシティー<sup>1</sup> のような吸光度分光光度計技術、熱量 測定法<sup>12</sup> および核磁気共鳴<sup>11</sup> などを使用することができます。 これらの手法は、蛍光 標識化を必要としませんが、多量のサン ブルが必要です。蛍光には標識化が必要ですが、高感度の手法 であるため低い濃度での測定が可能になります。また、マルチ 標識化 (たとえば、1つの実験において、各 DNA タイプに対し て、いくつかの異なる蛍光プローブを用いて蛍光を観測する能 力) が可能になります。さらに、フルオロフォアは、その環境に 対する感度が高いため、分離分析で2つの種を分離することな くハイブリダイゼーション/非ハイブリダイゼーションを検出す る手段として用いることができます。

FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) は、対象の環境に対するフル オロフォアの感度を、核酸の状態 (変性/アニール) を示す手段 として用いることができることを示す良い例です<sup>12</sup>。 この実験では、5-および 6-カルボキシフルオレセイン標識 DNA に結合した DABCYL (4-((-4-(ジメチルアミノ)-フェニル)-アゾ)-安息香酸) 標識 PNA プローブ (9mer および 13mer)の 2 つの異 なる長さを分析しました。

#### a) 9mer

Flu-DNA sequence:	5' F EEEEEEEEEEE	eeeeeee 3,
DABCYL-PNA sequence:	3' D €€€€€€€€ 5'	
(regions)	(quencher)	(primer)
b) 13mer		
Flu-DNA sequence:	5' F <del>eeeeeeeeeeeeeee</del> e	EEEEEEE 3'
DABCYL-PNA sequence:	3' D €€€€€€€€€€€ 5'	
(regions)	(quencher)	(primer)

図 1. DABCYL 標識 PNA プローブにハイブリダイズした 5'6-カルボキシフル オレセイン標識 DNA。パート a) は、9mer PNA プローブを表し、b) は、13mer PNA プローブを表しています。より長い PNA プローブは、9mer よりも DNA の領域に対してさらに強く結合するため、結合を切断し、ストランドを分離 するエネルギーがさらに必要になることから、全体のサーマルメルト (Tm) が高くなる可能性があります

DABCYL は、適切な条件下において非蛍光クエンチャーであり、 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の過程を通してフルオレセイ ン分子の励起状態からエネルギーを吸収することができます <sup>12,13</sup>。

実験で用いたシステムでは、DNA プライマーが PCR を行ってい る間、ダブルストランド分子に組み込まれるまで非蛍光となる ように設計しました<sup>14</sup>。一度組み込まれると、DABCYL 標識 PNA が置換されるため、蛍光性になり、クエンチが生じることはあ りません。サーマルメルト (Tm) プロファイルを用いて、DNA に 結合した 9mer PNA プローブの安定性を分析し、同じ DNA の 種に結合している 13mer PNA プローブと比較しました。

## 装置

- Cary Eclipse 蛍光分光光度計
- マルチセルペルチェ
- 温度制御装置
- ・ クオーツ 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<sup>14</sup>。

#### 使用する色素ラベル:

DNA:5'6-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 ソフトウエ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:

nstrun	nent setup	-				
*	Data mode	Fluorescend	e	<u>•</u>		
<u>V</u> avel	ength setup					
Le× Jem	Multiwaveleng	gth				
	Ex. Wavelength (	nm) 495	<b>_</b>		Γυ	ser collect
	Em. Wavelength	(nm) 518	•			
	Ex. slit (nm)	5		Em. slit	(nm) 5	•
olleci	temperatures					
	Start (°C)	0.00	• Ba	amps		
	Return to (°C)	5.00 🛨	C Go	) to ermal cur	-lee 2	-
	Hold at start 0	0000		iennai eye		
	C Simple collect		Ave.	time (s)	1.00	
	Advanced co	llect	No. o	f Stages	2	<u>×</u>
St	age Collect Data i	nterval Rati	e (°C/min)	End (°C	) End (Hol	d/min)
1	0.50	0.50	l	95.00	5.00	
2	0.50	0.50	l	20.00	5.00	

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

#### Options タブ:

🖉 Setup 🛛 🗙						
Cary Options Accessories Analyze Reports Auto-store						
Display options						
C Overlay traces	Type Savitzky-Golay					
Y minimum 0.0000	Filter size 5					
Y maximum 1000.000 💌						
Excitation filter	E <u>m</u> ission filter					
Open 💌	Dpen 💌					
PMT Detector voltage						
V 17 7 Low Medium High	Manual Volts (v) 600					
□ <u>S</u> tatus display 0	K Cancel <u>H</u> elp					

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





**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:

Setup							
Cary Options Accessories Analyze Reports Auto-store							
Derivative C None Derivative Autocalculate Interval Interval Size Low Calculation Limit 110.00 High Calculation Limit		Post-Run Smo <u>S</u> moothin Interval Filter size	pothing g				
Hyperchromicity Hyperchromicity Vant Hoff Calculation Self Complementary Non Self Complementary Table Complementary	2 00 -						
Molecularity	2						
Delta & Calculations Number of Temperatures Stage 1°C							
1 15 2 20	ΟΚ	Cancel	Help				
Diardes display	OK	Cancer	Holp				

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 Tm 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 ( $\Delta$ H)、エントロピー ( $\Delta$ S)、 自由エネルギー ( $\Delta$ G) および速度定数(k)) を行うことができま す<sup>8</sup>。

#### 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 Tm 値。Tm 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 ℃ 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Tm値。Tm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 Tm 値は 49.94 °C、13mer PNA プローブの Tm 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 (Tm) 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Tm 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 Tm 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。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、Tm 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

- 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
- Guzzo-Pernell, N., Tregear G.W. Triple Helical DNA formation by a Hydrophobic Oligonucleotide-Peptide Molecule. *Aust. J. Chem*, 2000, 53, 699-705.
- Guzzo-Pernell, N.; Lawlor J.M. & Haralambidis J. Triple Helical DNA. *Biomedical peptides, proteins and nucleic acids*, 1997, 2, 107-122.
- 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
- 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.

- Morrison, L.E. & Stols L.M.; Sensitive Fluorescence Based Thermodynamic and Kinetic Measurements of DNA Hybridization in solution. *Biochemistry*, 1993, **32**, 3095-3104.
- 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.
- Breslauer, K.J. Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology, 1986, (Hinz, H.J., Ed.) pp 402-427, Springer-Verlag, New York.
- Patel, D.J., Pardi, A., & Itakura, K. DNA Conformation, dynamics and interactions in solution. *Science*, 1982, **216**, 581-590.
- Clegg, R.M. Fluorescence Resonance Energy Transfer and Nucleic Acids. *Methods in Enzymology*, 1992, **211**, 353-388.
- 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

