

Cary 3500 UV-Vis 分光光度計による 核酸の熱安定性測定のベストプラクティス

迅速かつ正確な温度依存的 UV-Vis 吸光度測定を用いた
熱融解 (T_m) 分析

Cary 3500 ペルチェ UV-Vis システムでは、温度機能を持つ UV-Vis 分光光度計を使用して、生体分子およびその他の分子の熱安定性とプロファイルの分析が可能です。

UV-Vis 分光光度計は、核酸が 260 nm で最大吸光度を示すことを利用して、核酸の定量および品質管理 (QC) に広く使用されてきました (1)。核酸の濃度は、260 nm での吸光度と所定の吸収係数を使用して簡単に推定できます。多くの場合、バックグラウンド補正も実行されます。例えば、核酸以外をすべて含む溶液を使用してベースラインを収集する方法や、核酸が吸収しない波長での吸光度を測定する方法が行われます。

2 本鎖核酸は、塩基ペア間の水素結合によって結合しています。2 本鎖核酸が変性して 1 本鎖になる温度は、次に依存します。

- 核酸の配列と長さ
- pH とバッファの条件
- 2 本鎖間塩基ペアのミスマッチ

そのため、変性する温度は非常に有用な分析ツールであり、温度の上昇または下降に伴う 260 nm での吸光度をモニタリングすることで変性する温度を調べることができます。温度が上昇すると、鎖間の水素結合が切断され、2 本鎖核酸が 2 本の別々の鎖に分離します。鎖が分離すると、260 nm での吸光度が増大します。転移温度は「融解温度」(T_m) と呼ばれます (1)。

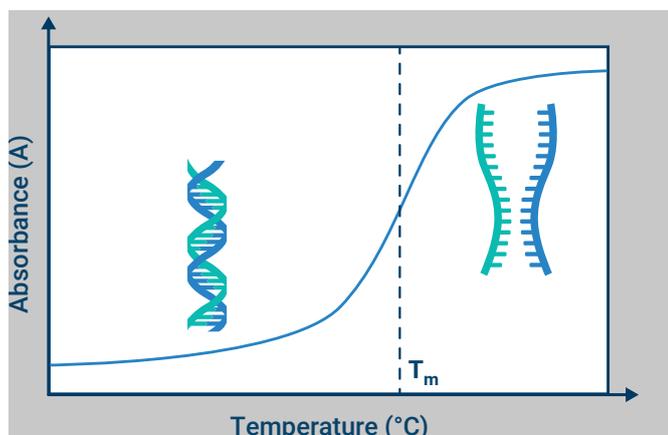


図 1. DNA サンプルの融解曲線を表すプロット

他の分子/化合物の融解プロファイルも、UV-Vis 分光光度計を使用して分析できます。その他の例として、ポリマーの曇点の決定、薬物間相互作用、タンパク質の熱変性などがあります。

本文書では、 T_m 測定の実験条件を最適化して、信頼性の高い高品質データを取得する方法について説明します。役立つヒントをこれからご紹介します。

適切なキュベットを使用する

選択されるキュベットは、分析するサンプルの量、UV-Vis 分光光度計の光軸高さ¹、および使用する波長によって異なります。UV-Vis 分光光度計で最も広く使用されているキュベットの光路長は 10 mm、容量は 3.5 mL です。

T_m 測定は通常、UV 波長で行われるため、キュベットは紫外線を透過させる必要があります。このため、石英製キュベットを推奨します。ポリメチルメタクリレート (PMMA) や、ポリスチレン、通常のガラスキュベットは、可視波長範囲でのみ透明であるため、避けてください。

測定中は、透明な側面をビームが通過するようにキュベットをキュベットホルダに配置してください。少量のサンプルしか利用できない場合は、サンプルが確実にビーム光路上に来るように、容量が小さいキュベットを検討してください (表 1 を参照)。

Cary 3500 システムは、幅が 1.5 mm 未満の高集束ビームを用いているため、少量の核酸サンプルの測定に最適です (図 2 を参照)。Cary 3500 システムの光学系は工場調整済みであるため、複数のキュベットを同時に測定する場合でも、測定を行う前に調整する必要はありません。



図 2. Cary 3500 の高集束ビーム

1 度に複数のサンプルを測定する場合は、すべてのキュベット位置で同じタイプのキュベットを使用することをお勧めします。ベルチエ熱電素子からサンプルへの熱伝達は、キュベットの物理的特性に依存するため、違う種類のキュベットを使用すると、測定に誤差が生じる可能性があります。

表 1 に、さまざまなキュベットの選択肢を示します。

¹ 光軸高さは、キュベットの底部から光線の中央までの距離です。

表 1. Cary 3500 システムで使用可能なキュベットタイプ。各キュベットの アジレント部品番号は、列 1 に記載されています (例: 5061-3387)。Cary 3500 は、キュベット内温度プローブ (温度制御列に「プローブ」で示されているもの) を使用するか、キュベットホルダの温度 (「ブロック」で表示) に基づいて、キュベット内のサンプルの温度を制御することができます。温度プローブを取り付けることができないキュベットを使用する場合は、最大昇温速度を ≤ 0.5 °C /分に設定する必要があります。

キュベットのタイプ		容積	必要サンプル容量	温度制御	攪拌子の挿入
10 mm 石英製キュベット、PTFE フタ付き (5061-3387)		3.5 mL	攪拌子あり: 1.5 mL 攪拌子なし: 2.0 mL	ブロック	可
10 mm 石英製キュベット (5061-3387) と温度プローブ (G9889-60005)		3.5 mL	攪拌子あり: 1.5 mL 攪拌子なし: 2.0 mL	プローブ	可
10 mm 石英製キュベット、PTFE ストッパー付き (5062-2477)		3.0 mL	2.0 mL	ブロック	不可
セミマイクロセル (5063-6559) と温度プローブ (G9889-60005)		1.0 mL	400 μ L	プローブ	不可
セミマイクロセル、PTFE ストッパー付き (5063-6561)		1.0 mL	800 μ L	ブロック	不可
セミマイクロセル、2 個入りペア、PTFE ストッパー付き (6610012700)		900 μ L	400 μ L	プローブ	不可
ウルトラマイクロセル、PTFE ストッパー付き (5062-2496)		50 μ L	50 μ L	ブロック	不可
低ヘッドスペースセル (Starna キュベットカタログ ²)		10 ~ 160 μ L	Starna キュベットカタログを参照	ブロック	不可

²https://www.starna.com/images/cell_cat_2014_v22042014.pdf

キュベットを清浄に保つ

キュベットが清浄で傷がないことが重要です。キュベットを洗浄して、汚染と気泡の形成を防ぐ必要があります。アルカリ性洗浄液³を使用してください。キュベットとストッパーの両方を（できれば分析に使用した溶媒またはバッファで）すすぎ、洗浄・風乾してください。

バッファと pH を最適化する

信頼性と再現性のある分析を確実にを行い、測定の際のばらつきを最小限に抑えるには、適切な pH で適切な塩成分を含む最適なバッファに生体サンプルを溶解する必要があります。生体サンプルの分析では、バッファと pH の最適化検討が推奨されています（2, 3）。

最適なバッファ条件は、さまざまな温度でチェックする必要があります（2）。ブランクとサンプルには同じタイプのバッファを使用しなければなりません。新しく調製したバッファの使用が推奨されます。

キュベットへの結露を避ける

次の場合に、キュベットの外側に結露が発生することがあります。

- サンプルの温度を周囲温度（つまり室温）より低くする場合。キュベットの外側に結露が形成され、測定の際の妨げとなるおそれがあります。
- 低温で保存されることが多い生体サンプル/バッファを、室温でキュベットに直接入れる場合。

測定用のサンプルを調製するときは、結露を防ぐために、サンプルとキュベットが室温になっていることを確認してください。測定中に周囲温度より低い温度が必要な場合は、サンプルコンパートメントを窒素ガスでパージして、できた結露を取り除きます。パージ手順については、Cary 3500 UV-Vis 分光光度計のユーザーガイドを参照してください⁴。

図 3 は、結露が存在する場合の T_m 測定の例を示しています。サンプルには無関係のノイズや吸光度ばらつきが現れています。

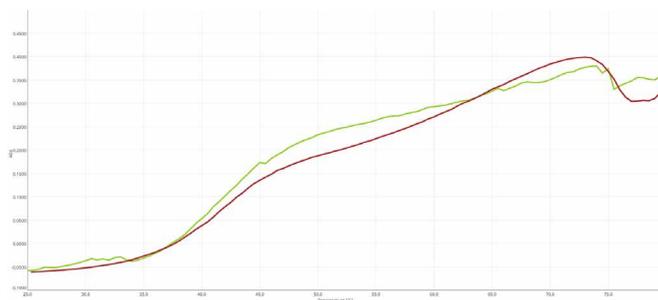


図 3. キュベット壁の結露によって引き起こされる融解曲線の吸光度アーチファクトの 2 つの例

サンプル濃度を最適化する

サンプルの濃度が非常に高い場合は、分光光度計の直線範囲内で測定を行うのに希釈が必要になる場合があります。熱変性実験を開始する前に、サンプルの波長スキャンを実施して適切な濃度となっていることを確かめ、サンプルの品質を確認してください。核酸では、開始時の適切な吸光度は、260 nm で 0.5 Abs です。サンプルが変性すると、吸光度は約 15 % ~ 20 % 増加します（1）。

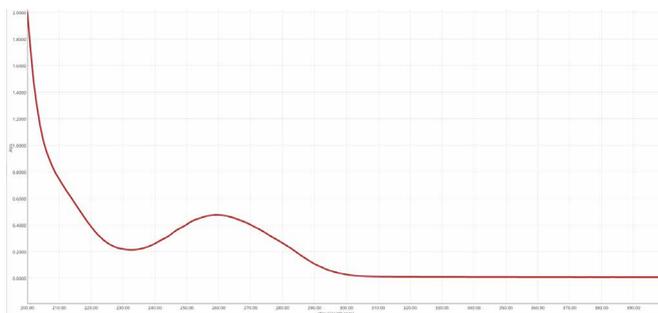


図 4. DNA サンプルの波長スキャン。260 nm で約 0.5 Abs の吸光度レベルを示しています。

サンプルの蒸発を防ぐ

変性実験中に温度が上昇することに伴い、サンプル溶液が蒸発する可能性があります。バッファが蒸発すると、図 5 に示すように、残りの溶液中の核酸の濃度が増加し、時間の経過とともに吸光度が増加します。

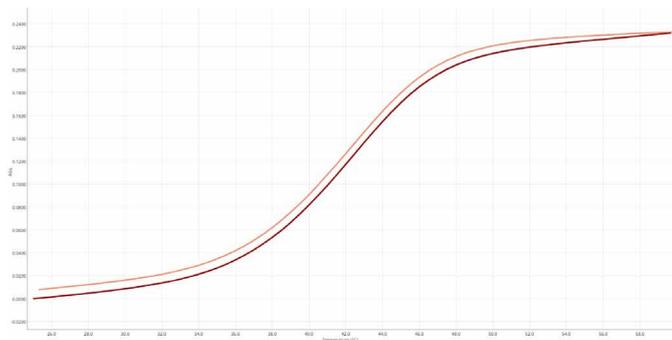


図 5. 温度が上昇（暗赤色）および下降（琥珀色）するときの 260 nm における吸光度。蒸発により濃度が上昇するため、温度下降時の吸光度レベルは同じ温度での温度上昇時よりもわずかに高くなります。

さらに、高濃度のサンプルが測定中に蒸発すると、キュベットの壁に塩が付着する可能性があります。サンプルを測定した後、キュベットの壁に液滴が付着していないことを確認してください。液滴は、蒸発が起こったことを示しています。蒸発を防ぐために、次のアプローチを実行してください。

- 常にストッパー付きキュベットを使用する。
- 鉱物油を数滴加えて、キュベットのサンプルの上に浮かせる。シリコンオイルなどの別の種類のオイルの併用は非推奨。
- ヘッドスペースの少ないキュベットを使用して、サンプル表面とストッパーの底部の間のデッドスペースを減らす（表 1 を参照）。
- キュベットの上部とそのストッパーの間にパラフィルムを巻く。

汚染を防ぐ

ヒトの皮膚に見られるヌクレアーゼなどの粒子によるサンプルの汚染を避けるために、手袋とフェイスマスクを着用することをお勧めします。

サンプルを複数調製する

測定精度を確保するには、サンプルを複製して測定するか、同じサンプルを繰り返し測定することをお勧めします。

サンプルを脱気する

サンプルは加熱すると自然に脱気されます。図 6 に示すように、サンプルを通過する光線を乱す気泡がこのプロセスにより生成されます。この問題は、熱融解実験中に使用する温度が溶媒の沸点に近い場合に発生する可能性が高くなります。

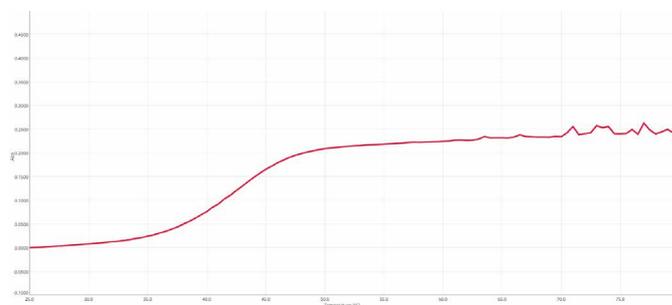
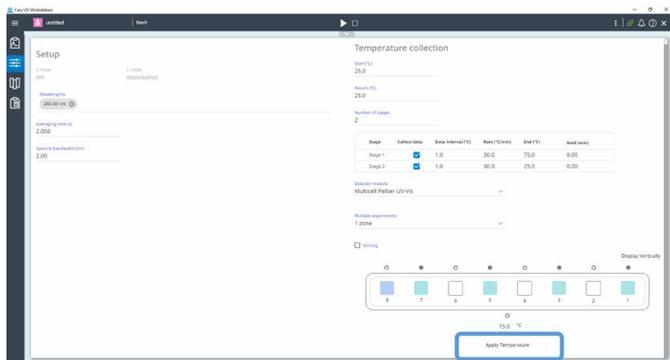


図 6. サンプルの脱気による高温でのスパイクを示す融解曲線

サンプルが温度とともに脱気しやすい場合は、この現象を抑制するために、サンプルを予備加熱するか、真空下で室温脱気を行うことをお勧めします (3, 4)。予備加熱手順には次のようにさまざまな方法があります。

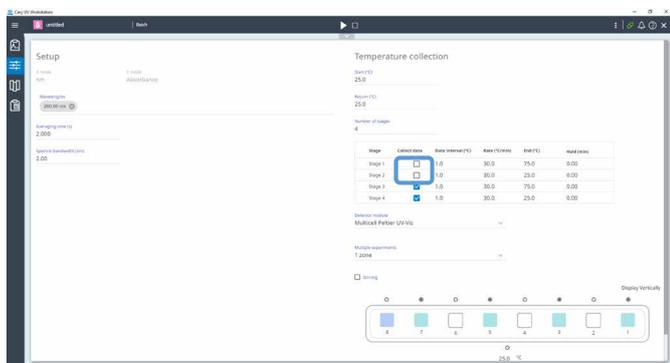
脱気方法 1

データ取得を開始する前に、実験の上限温度で 5 分間サンプルを保持します。これを行うには、ソフトウェアの[温度 ON (Apply Temperature)] ボタン（下の画面の強調表示箇所）を使用します。



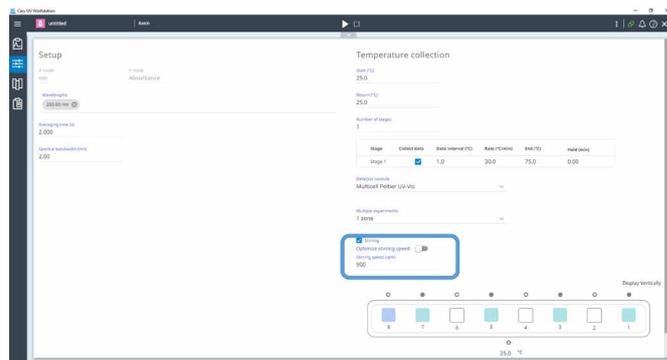
脱気方法 2

[データ測定 (Collection data)] チェックボックスをオフにして、測定に使われる最高温度設定を使用して、サンプルの温度を上下に徐々に変化させます（下の画面の強調表示箇所）。測定は、「データ測定 (Collection data)」チェックボックスをオンにした状態で、次の段階で実行されます。



気泡を取り除く

水と同様の粘度の液体で満たされた標準の 3.5 mL キュベット内では、約 900 rpm の攪拌速度で最高の温度均一性が得られます。星型攪拌子（アジレント部品番号 7418000400）が、標準キュベット（アジレント部品番号 5061-3387）に推奨されます。ロッド型の攪拌子は、気泡を生成またはトラップする可能性があるため、推奨されません。気泡は、キュベットとサンプルを通過する光を妨害し、UV-Vis 測定でスパイクやその他の異常を引き起こすおそれがあります。サンプルを攪拌すると、気泡がキュベット内を動き回り、光路に出入りすることがあります。攪拌子の気泡を取り除くために、測定を開始する前にサンプルを攪拌し、キュベットを目視で検査して気泡が残っていないことを確認することをお勧めします。Cary 3500 では、データ取得の前に攪拌をオンにする Cary UV ワークステーションソフトウェアの「攪拌速度最適化 (Optimize stirring speed)」オプションを使用することで、これを実行できます（以下のスクリーンキャプチャを参照）。



サンプルの粘度に合わせて攪拌速度を設定する

より粘性の高いサンプルを測定する場合は、攪拌速度を上げる必要があります。溶存ガスは高温で溶解度が低くなるため、気泡がキュベットの内壁に蓄積することが多くなります。正確な測定を確実に実施するために、キャップを付けた状態で、キュベットの底部を軽くたたきます。この動作により、気泡が除去されるはずですが。

攪拌は、アニーリングプロセス中にも役立ちます。攪拌すると、再アニーリングのための 1 本鎖ヌクレオチドの相互作用が増えます。サンプルを攪拌しないと、特に（比較的大きな容量の）標準的なキュベットを使用している場合、降温時で得られる Tm 値よりも昇温中の値の方が高い温度で現れる可能性があります。これは、より低温の溶液で 1 本鎖ヌクレオチドの拡散が遅いためです。

温度制御に関連する測定パラメータを理解する

Cary 3500 UV-Vis 分光光度計は、次の 3 つの温調システムが利用できます。

- Cary 3500 コンパクトペルチェ
- Cary 3500 マルチセルペルチェ
- Cary 3500 マルチゾーン

Cary 3500 コンパクトペルチェは、2 つのキュベット位置（一方がリファレンスチャンネルで、もう一方がサンプルチャンネル）用の単一のペルチェブロックを中心として設計されています。温度は、温度プローブを使用してキュベット内のサンプルからか、キュベットが装着されるキュベットホルダの温度センサからかのいずれかによって制御できます。複数のチャンネルの下にある 1 つのラジオボタンは、ペルチェブロックセンサを表しています。各チャンネルの上のラジオボタンは、温度プローブを接続できる位置を表しています。

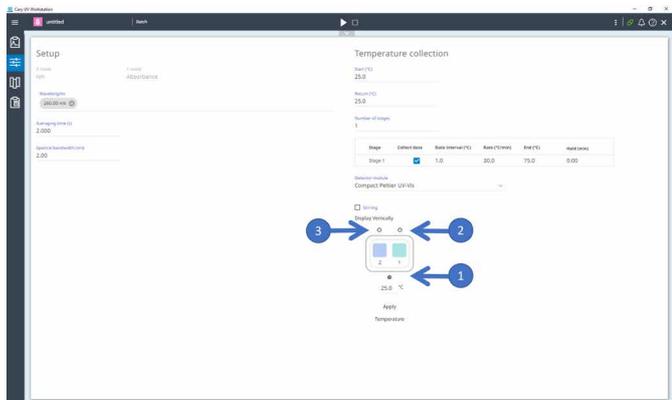


図 7. Cary 3500 コンパクトペルチェ用の Cary UV ワークステーションサーマルアプリケーションのインターフェース。温度制御は選択されたラジオボタンで表されます。(1) のボタンが選択されている場合、温度はペルチェブロック温度センサ制御によって制御されます。(2) のボタンが選択されている場合、温度はサンプルチャンネルによって制御されます。(3) のボタンが選択されている場合、温度はリファレンスチャンネルによって制御されます。

Cary 3500 マルチセルペルチェは、4 つの独立したペルチェブロックで構成されており、合計 7 つのサンプルチャンネルと 1 つのリファレンスチャンネルがあります。キュベットの各ペア（キュベット 1 と 2、キュベット 3 と 4、キュベット 5 と 6、およびキュベット 7 と 8）は、それぞれ独立したペルチェブロックに配置されます。温度は、各ペルチェブロックの温度センサでのみ制御されます。サーマルプローブは、位置 8 でのみ、その位置の温度を読み取るために使用でき、システムの温度制御には用いられません。

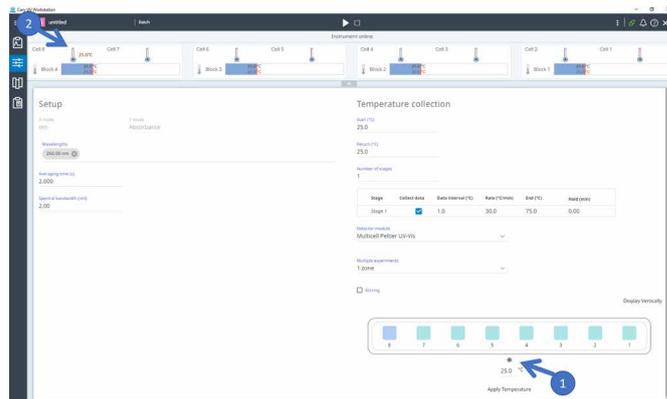


図 8. Cary 3500 マルチセルペルチェ用の Cary UV ワークステーションサーマルアプリケーションのインターフェース。温度制御、選択したラジオボタンで表されます。ここでは (1) が選択されており、各ペルチェブロックのペルチェブロック温度センサ制御を表しています。(2) は、リファレンスチャンネルに接続された温度プローブからの測定値を表します。

Cary 3500 マルチゾーンソフトウェアアドオンを使用すると、サンプル温度を直接モニタリングできます。また、このシステムは、Cary 3500 マルチセルペルチェシステムのような 4 つの独立したペルチェブロックで構築されており、温度プローブによって個々のペルチェブロックを制御する機能が追加されています。

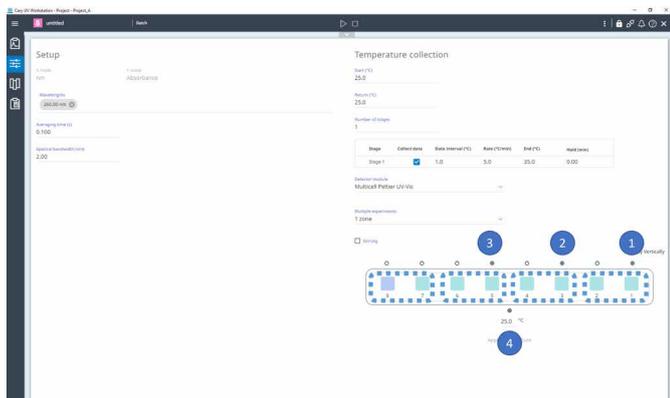


図 9. Cary 3500 マルチゾーン用の Cary UV ワークステーションサーマルアプリケーションのインターフェース。独立した各ペルチェブロックは青い破線のボックスで表され、それぞれが温度プローブまたはペルチェブロック温度センサのいずれかによって駆動されます。右から左に、最初の 3 つのペルチェブロック (1、2、3) は、選択されたラジオボタンで表される温度プローブによってモニタリングされます。左端のペルチェブロックは、温度プローブが選択されていません (ラジオボタンが未選択)。これは、選択されたラジオボタンで表されるペルチェブロック温度センサ (4) によって駆動されることを意味します。

注：4 つのペルチェブロックはそれぞれペルチェブロックに組み込まれた温度センサ、またはペルチェブロック内の 2 つの位置のうち 1 つに接続された温度プローブによって制御できます。2 つの温度プローブを同じペルチェブロックに接続することはできません。

Cary 3500 は、定温温度実験つまりカイネティクスアプリケーション、または昇温実験に使用できます。定温温度実験では、マルチゾーンソフトウェアアドオンを使用すれば、キュベットペアを同時に異なる温度に設定できます。このように 2 つまたは 4 つのゾーンを使用するようなシステム設定は、定温温度をそれぞれ変えて、さまざまなパッファを複数の実験に使用する場合などに有効です。これらの実験は同時に実施できます。

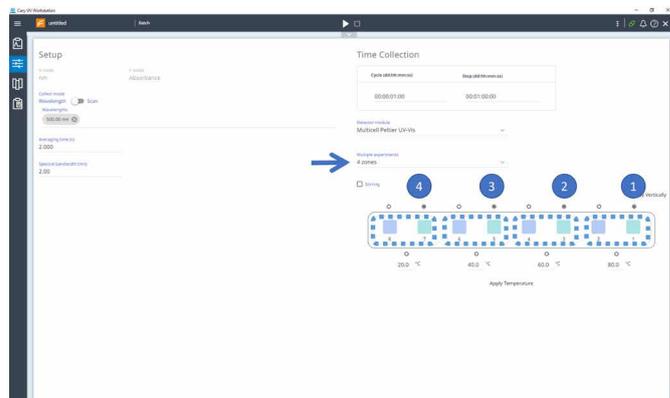


図 10. Cary 3500 マルチゾーン用の Cary UV ワークステーションカイネティクスアプリケーションのインターフェース。システムは、4 つの独立したゾーン (青い矢印) を使用するように設定されています。カイネティクス分析は、異なる温度 (1、2、3、および4) の 4 つのゾーンで同時に実行されます。

Cary 3500 マルチゾーンを使用した昇温実験では、昇温速度を 0.1 ~ 40 °C /分に設定できます。独立したペルチェブロックの温度はすべて、同じ昇温速度で制御されます。最高の精度を得るには、サンプルに温度プローブを直接挿入し、このプローブを使用して温度変化を制御します (この機能は、Cary 3500 コンパクトペルチェおよび Cary 3500 マルチゾーンで使用できます。Cary 3500 マルチセルペルチェは、温度プローブを用いた制御は行いません。キュベットホルダの温度を制御します)。温度プローブは、測定が行われている場所に近いサンプルの温度をモニタリングしているため、最も正確な温度測定ができます。



図 11. Cary のキュベット内温度プローブは、軽量で、表面積が大きく、サンプルの温度をすばやく反映させます。

注：温度プローブを使用して Cary 3500 マルチゾーンのサンプル温度を速い昇温速度で制御する場合は、温度プローブを使用する場所にサンプルを配置することをお勧めします。同じペルチェブロックの他の位置は空のままにしてください。次の図は、位置 1、3、5、および 7 にサンプルを設定する方法と、位置 2、4、および 6 をオフにする方法を示しています。マウスを各キュベットの位置に合わせて、[サンプル (Sample)] または [未使用 (Unused)] を選択します。

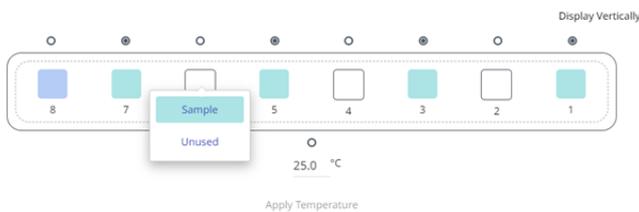


図 12. Cary 3500 マルチゾーンのインターフェース。温度プローブは位置 1、3、5、および 7 にあり、選択したラジオボタンで表されます。位置 2、4、および 6 は「未使用」に設定されています。

注：Cary 3500 マルチセル/マルチゾーン構成では、すべてのサンプル位置が同時に測定されます。これは、各サンプルを逐次測定して測定値間で重要なデータポイントが欠落するリスクのある、一般的な UV-Vis 分光光度計の電動マルチセルアクセサリとは異なります。

あるいは、ペルチェブロックの温度を使用して温度変化を制御することもできます。この場合、特定のサンプルごとの最適な昇温速度を決定するために、プレ実験の実施が推奨されます。一般に、より遅い昇温速度（例えば、0.1 ~ 0.5 °C /分）を使用すると、熱融解実験の精度が高くなります。温度の変化速度を遅くすると、キュベット内のサンプルとキュベットが設置されているペルチェブロックの間の温度のギャップが小さくなります。

吸光度の読み取りは、ソフトウェアで定義されたデータインターバルで行われます。異なる温度間で吸光度の大きなシフトが観察される場合は、温度変化全体でより多くのデータポイントが取得されるように、データインターバルを小さくすることが推奨されます。

Cary 3500 システムを使用した熱融解実験では、最大 10 段階のステージをプログラムできます。各ステージには次が含まれます。

1. 終了温度
2. データインターバル
3. レート
4. ホールド時間

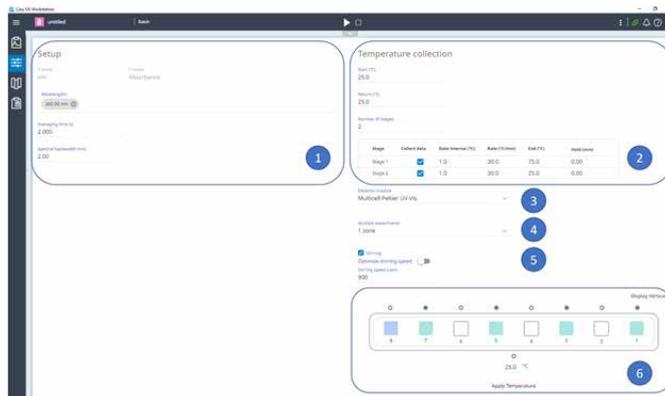
ホールド時間は、次のステージが開始されるまで、サンプルが終了温度で保持される時間を決定します。長いホールド時間を使用する場合は、サンプルの蒸発を考慮する必要があります。[「サンプルの蒸発を防ぐ」を参照してください。](#)

温度を急激に下げると、再アニーリングプロセスには時間依存性があるため、アニーリングが不完全になる可能性があります (1)。

システムのパラメータ設定を理解する

Cary 3500 の熱制御構成のソフトウェアインターフェースにより、次に示す複数のパラメータを制御できます。

- 分析波長
- 平均化時間
- スペクトルバンド幅
- 開始および終了温度
- 温度ステージ数
- 温度ゾーンの数（システムタイプによって異なります）
- 攪拌
- 温度制御メソッド



これらのパラメータを画像（右）で示します。詳細は表 2 のとおりです。

表 2. Cary UV ワークステーションサーマルアプリケーションのパラメータと設定

番号	パラメータの説明
1.	分析波長、信号平均化時間、およびスペクトルバンド幅を選択します。表 3 を参照。
2.	温度のパラメータを定義します：開始温度と終了温度、およびステージ数。各ステージは、データインターバル、昇温速度、終了温度、およびホールド時間によって定義されます。 「温度制御に関連する測定パラメータを理解する」を参照してください
3.	コンパクトセルまたはマルチセルのいずれかのモジュールを選択します。
4.	<p>Cary 3500 マルチゾーンの場合のみ、温度ゾーンの数を実験室タイプによって定義します（すべてのゾーンの温度は同じ速度で制御されます）。システムは、ゾーンが 1 つ、つまり 7 つのサンプルと 1 つのリファレンスチャネルを使用できます。または、システムのゾーンを 2 つ（3 つのサンプルと 1 つのリファレンスチャネルの 2 つのペア）または 4 つ（1 つのサンプルチャネルと 1 つのリファレンスチャネルの 4 つのペア）に分割できます。以下の図では、リファレンス位置が青色で示されています。</p> <p>1 ゾーン構成</p> <p>2 ゾーン構成</p> <p>4 ゾーン構成</p>
5.	必要に応じて、攪拌を選択します。 「サンプルの粘度に合わせて攪拌速度を設定する」を参照してください。
6.	温度プローブまたはブロックのいずれかの温度制御方法を定義します。上記の画像で選択されているラジオボタンは、選択されているセルブロックを表しています。 「使用する温度測定値の選択」を参照してください。

システムパラメータの最適化

UV-Vis 分光光度計を使用して熱融解を実施する場合、表 3 に要約されているように、次のパラメータを最適化する必要があります。

表 3. 熱融解実験の推奨パラメータ

パラメータ	推奨値	最適化のヒント
スペクトルバンド幅 (SBW) ⁵	1 ~ 2 nm	より高い信号スループットが必要な場合は、設定を広くするとサンプルを通過する光の量が増えるため、スペクトルバンド幅が広がります。 SBW が特定の値 (通常は約 2 nm) を超えて増加すると、波長の分離が明確に定義されなくなり、最大値での吸光度が低下する可能性があります。さまざまなスペクトルバンド幅設定を試して、特定のサンプルごとの最適な設定を決定することをお勧めします。ほとんどの生体サンプルで、1 ~ 2 nm が最適です。
平均化時間 (SAT)	> 2 秒	この設定は、次のデータポイントに移動するまでに、信号が平均化される時間を決定します。一般に SAT が長いほど、バックグラウンドノイズが減少して信号が平滑化されることで、S/N 比 (SNR) が向上します。熱融解実験の場合、初期値として 2 ~ 3 秒の平均化時間が推奨されます。このパラメータは、昇温速度と並行して最適化する必要があります。
昇温速度	ブロック制御: ≤ 0.5 °C /分 プローブ制御: ≤ 40 °C /分	この設定は、システムが特定のステージで温度を変化させる速度を表します。昇温速度が大きいほど、システムがステージの終了温度に到達するまでの時間が短くなります。
データインターバル	≤ 1 °C	このパラメータは、システムによってデータが取得される頻度を定義します。例えば、1 °C のデータインターバルは、データポイントが 1 °C ごとに取得されることを意味します。データインターバルが小さいほど、結果の品質が向上する傾向があります。シンプルな融解実験は、1 つのステージで温度上昇または温度降下を実行できます。 より高度な融解実験は、複数のステージで実行できます。例えば、温度上昇を 3 段階のステージ (転移前のプラトー用に 1 ステージ、転移に 1 ステージ、転移後のプラトー用に最後の 1 ステージ) に分割します。転移前後のプラトーでは、吸光度がゆっくりと変化するため、データインターバルが大きくてもよいかもしれません。転移中は、吸光度が急速に変化するため、データインターバルを小さくする必要があります。
プローブ制御: サンプルからの温度フィードバック	マルチゾーンまたはコンパクトベルチェで利用可能	温度プローブ制御を使用すると、キュベットの内側から温度を瞬時に測定することができます。 「使用する温度測定値の選択」を参照してください。
ブロック制御: ベルチェからの温度フィードバック	すべてのベルチェモジュールで利用可能	キュベットが設置されているベルチェブロックからの温度を使用する場合は、遅い昇温速度を使用してください。これにより、キュベットを介した熱伝達が、サンプル温度が目的の温度で確実に平衡に達するのに十分であることが保証されます。昇温速度は、≤ 0.5 °C /分が推奨です。 サンプル量が多い場合は、ベルチェブロックとサンプル間の熱平衡を確実にするために、昇温速度を最適化する必要があります。温度平衡をより迅速に達成するには、攪拌が有効です。
攪拌	3.5 mL キュベットを使用する場合に利用可能	Cary 3500 の攪拌機能は、星型の攪拌子 (直径= 9.5 mm、高さ= 9.5 mm) 用に設計されています。攪拌は、サンプルの良好な温度平衡を達成するのに役立ちます。

⁵https://www.agilent.com/cs/library/posters/public/Optimum_Parameters_Poster_38x25_5994-0399EN.pdf

使用する温度測定値の選択

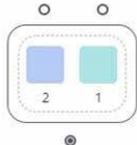
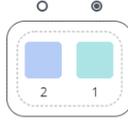
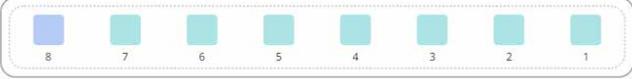
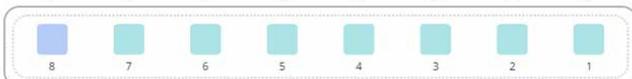
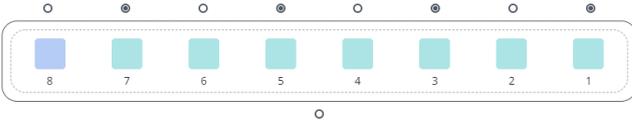
Cary 3500 マルチゾーンの温度は、次のいずれかの測定値を使用して制御できます。

- キュベットが装着されるペルチェブロック温度センサ
- 温度プローブ

ペルチェブロックを使用して実験を制御する場合、特に速い昇温速度を使用する場合、サンプルの温度が「ブロック」温度より遅れる場合があります。

表 4 に、これら 3 つの異なるオプションに対して、ソフトウェア内で温度制御モードを設定する方法を示します。

表 4. 3 つの異なる Cary 3500 オプションに対するソフトウェア温度制御オプション

システムオプション	温度制御オプション
Cary 3500 コンパクトペルチェ	 <p>ペルチェブロック制御</p>
	 <p>位置 1 の温度プローブ制御</p>
Cary 3500 マルチセルペルチェ	 <p>ペルチェブロック制御</p>
Cary 3500 マルチゾーン	 <p>ペルチェブロックごとのペルチェブロック制御</p>
	 <p>各ペルチェブロックに対する位置 1、3、5、および 7 それぞれの温度プローブ制御</p>

温度プローブの適切な挿入深さ

図 13 は、Cary 温度プローブと、光の遮蔽を回避するためにキュベットの側壁にプローブがどのように配置されるかを示しています。

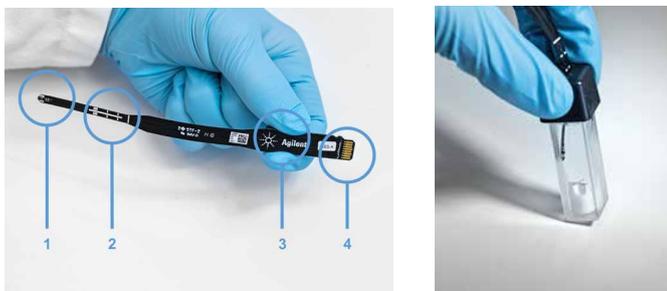


図 13. (左) Cary 温度プローブ - (1) センサ、(2) 高さガイド、(3) グリップ、(4) コネクタ。(右) 温度プローブはキュベット内に挿入され、キュベットの底には星型攪拌子があります。

温度プローブの高さは、キャップのスロットからプローブをやさしくスライドさせることで調整できます。3.5 mL キュベットで推奨される温度プローブの深さは、温度プローブの位置 2 のマーカーがキュベットキャップの上部にちょうど現れる位置です (図 14 を参照)。この深さは、プローブの先端が光線の中心のすぐそばに配置される位置です。リボン状のプローブは、キュベットの内側の側壁に設置されるように設計されています。この位置は、プローブがキュベットを通過する光線を遮らない位置です。温度プローブをこのように配置すると、温度プローブによって測定される溶液が、光線が通過する溶液に可能な限り近くなるようにできます。この設計により、非常に正確な結果が得られます。

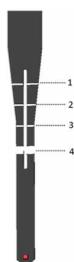


図 14.さまざまな位置を表す温度プローブ図

図 15 は、温度プローブをシステムに接続する方法を示します。



図 15. 温度プローブコネクタがシステムに接続される様子

温度プローブは最低でも液面下 5 mm の深さに挿入することが推奨されます。攪拌子を使用する場合は、プローブの下部と攪拌子の上部の間に 3 mm 以上の距離を確保するようにしてください。3.5 mL キュベット内に攪拌子を取り付けた状態では、温度プローブをプローブ深さガイドの位置 2 より低くしないでください。この位置であれば、プローブが攪拌子に干渉しません。900 rpm で攪拌すると、キュベット全体で最も優れた温度均一性が得られます。

Tm 値を計算する

スムージングは、曲線の微分を計算する前に干渉とノイズを減らすために融解曲線に適用できるオプション機能です。スムージングと微分の計算では、Savitzky-Golay 法を使用します。どちらの関数にも 2 つのパラメータ (フィルタ値とインターバル値) が必要です。

フィルタ値は、スムージングされた曲線の各データポイントを生成するために使用されるポイントの数を定義します。Savitzky-Golay アルゴリズムでは、フィルタ値として奇数を指定します。フィルタサイズを大きくすると、曲線内のデータポイントが少なくなります。Savitzky-Golay アルゴリズムでは、データインターバルも指定する必要があります。曲線の取得に使用されるデータ取得のインターバルと同じインターバルを使用することが推奨されます。

Cary UV ワークステーションサーマルアプリケーションの下限温度と上限温度（図 16 では (3) で示される箇所）は、 T_m 値の計算を実行する温度範囲を指定するために使用されます。ソフトウェアの再計算ボタンをクリックすると、サーマル計算テーブル、 T_m 値、および融解曲線の微分トレースが生成されます。

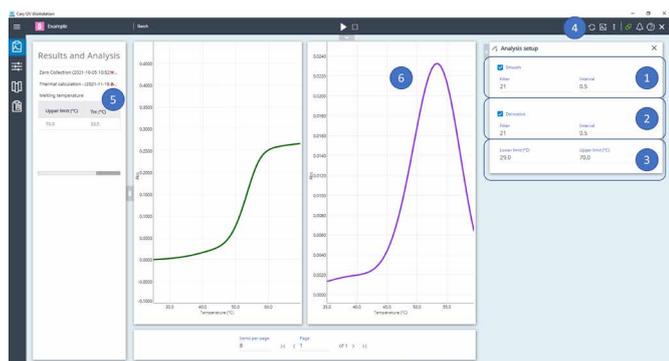


図 16. Cary UV ワークステーションサーマルアプリケーションの結果ページには、スムージングパラメータ (1)、導関数パラメータ (2)、および T_m 値計算の温度範囲 (3) が表示されます。(4) は再計算ボタンです。計算結果は、サーマル計算表と計算された T_m 値 (5) および微分グラフ (6) になります。

参考文献

1. Mergny JL, Lacroix L. Analysis of thermal melting curves. Oligonucleotides. **2003**;13(6):515-37
2. Hans Bisswanger, Enzyme Assays, Perspectives in Science, Vol 1, Issues 1-6, **2014**, pp 41-55
3. Good, N.E., et al. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. Biochemistry. **1966**; 5(2): 467–77.
4. Good, N.E. and Izawa, S. Hydrogen Ion Buffers. Methods Enzymol. **1972**; 24: 53–68.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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おりません。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。

DE50410706

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

5994-4028JAJP