

熱融解実験における高速昇温速度の実現

Cary 3500 UV-Vis 分光光度計により、
昇温速度に関係なく同一の結果を達成



著者

Kevin Grant and Matt Quinn

Agilent Technologies,
Australia

はじめに

温度が上昇すると、二本鎖の核酸が分離し一本鎖になります。特定の温度で、塩基対間の水素結合が切断されます。熱融解実験では、DNA の場合はアデノシンとチミン (A=T)、RNA の場合はアデノシンとウラシル (A=U) のそれぞれのヌクレオチドについて、グアニンとシトシン (G=C) との水素結合数の差を利用します。G=C ヌクレオチドには 3 つの水素結合が含まれるため、解離には二重結合対よりも大きな熱エネルギーが必要です。つまり、より多くの G=C 対を含む DNA と RNA は、より高い温度で融解することを意味します。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 との比) の的確な指標となります。

融解点の測定には UV-Vis 分光光度計を用います。この際、260 nm では一本鎖の核酸の吸光度が二本鎖の核酸よりも高くなることを利用します (1)。この例を、低分子干渉 RNA (siRNA) サンプルを使用して図 1 に示します。260 nm での吸光度は、85 °C の方が 25 °C よりも大幅に高くなっています。

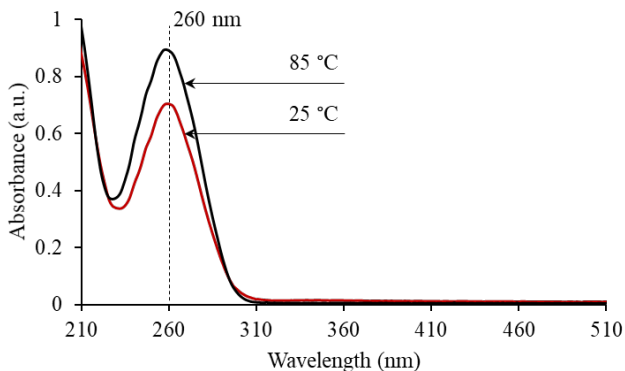


図 1. 25 °C (赤) および 85 °C (黒) での siRNA サンプルの波長スキャン

熱融解実験は一般的に、260 nm で吸光度を測定して実施します。制御された pH およびイオン強度の条件下で、サンプルの温度を徐々に上げていきます。通常は、0.5 °C/min で昇温します (2、3、4)。高精度で再現性のあるデータを得るには、このように非常に低速で昇温する必要があります。しかし、昇温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 ~ 95 °C に昇温するには、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。Agilent Cary 3500 マルチゾーン UV-Vis 分光光度計は、組み込み型キュベット内温度プローブを使用して、実験中の溶液の温度を正確に制御します。マルチセルホルダが内蔵されており、冷却水循環装置を使用しない空冷式パルチエ素子を用いて 0 ~ 110 °C の間でサンプルの温度を制御します。

この研究では、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 siRNA サンプルの融解温度の計算値 (T_m) に与える影響を評価しました。

実験方法

サンプル

siRNA のサンプルは、アジレントの Nucleic Acid Solutions Division から提供されました。pH 7.0 に調整した 100 mM NaCl、0.1 mM EDTA、および 10 mM リン酸ナトリウムを含む緩衝液中で、約 0.3 mg/mL の siRNA 溶液を調製しました。

標準の容量 3.5 mL、光路長 10 mm の石英製キュベットを使用しました。リン酸緩衝液をリファレンス溶液として使用しました。

機器とメソッド

すべての測定で、Cary 3500 マルチゾーン UV-Vis 分光光度計を使用しました。メソッドパラメータを表 1 に示します。

実験中に変更したパラメータは、昇温速度のみです。昇温速度は、0.5、1、5、10、15、20、25、30 °C/min の合計 8 種類を使用しました。

すべての測定で、少なくとも 3 つの一定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て (図 2)、実験温度の制御に使用しました。



図 2. 測定中に実験温度の制御に使用するキュベット内温度プローブ

0.5 °C ごとにデータを収集して、各データポイントが記録される前の 1 秒間の信号を平均化しました。30 °C/min の昇温速度で測定にかかった時間は約 5 分です。

攪拌を 500 rpm に設定し、確実にキュベット全体が十分に均一温度となるようにしました。

表 1.メソッドパラメータ

パラメータ	設定
波長 (nm)	260
スペクトルバンド幅 (nm)	5
信号平均化時間 (s)	1
データ間隔 (°C)	0.5
開始温度 (°C)	25
終了温度 (°C)	86
昇温後設定温度 (°C)	25
昇温ステップ数	1
保持時間 (分)	0.5
昇温速度 (°C/min)	条件により異なる
攪拌速度 (rpm)	500
温度ゾーン数	4
温度制御	温度プローブ

結果と考察

異なる昇温速度での T_m 値

データ解析は、サードパーティ製ソフトウェアで実施しました。8 つの昇温速度で収集した吸光度データを図 3 に示します。データは、0 から 1 の吸光度単位に正規化し、見やすいように重ねて表示しました。それぞれの一次導関数も計算し示しています。各一次導関数プロットのピークは、融解曲線の間接点、すなわち T_m 値を示しています。

表 2. 各昇温速度で測定された siRNA サンプルの T_m 値

	昇温速度 (°C/min)	繰り返し 1 T_m °C	繰り返し 2 T_m °C	繰り返し 3 T_m °C	平均 T_m (°C) (n = 3)
実験 1	0.5	78.5	78.5	78.5	78.50
実験 2	1	78.5	78.5	78.0	78.33
実験 3	5	77.5	78.0	77.5	77.67
実験 4	10	78.0	77.5	77.9	77.80
実験 5	15	78.4	78.5	77.9	78.27
実験 6	20	78.4	78.3	78.5	78.40
実験 7	25	78.7	77.8	78.3	78.27
実験 8	30	79.0	78.9	78.2	78.70

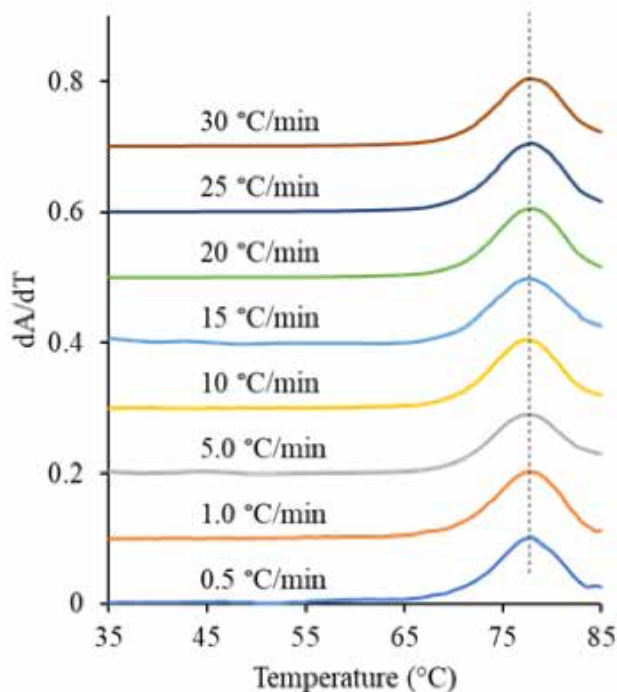
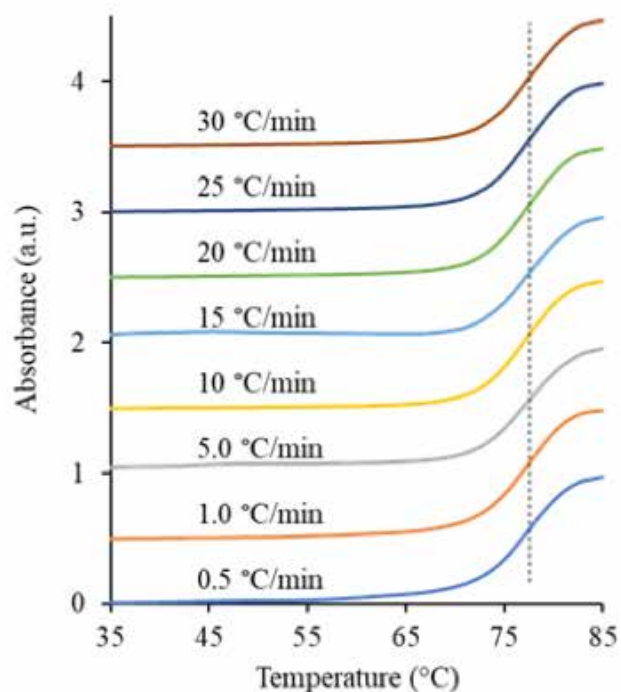


図 3. 昇温速度ごとの siRNA の吸光度対温度 (左) と対応する一次導関数 (右)

図 3 および表 2 が示すように、実験で使用した 8 つの昇温速度において、siRNA サンプルの T_m 測定値は $\pm 1^\circ\text{C}$ に収まりました。

結論

Cary 3500 マルチゾーン UV-Vis 分光光度計を使用し、8 つの異なる昇温速度で同じ siRNA サンプルの融解点を測定しました。各昇温速度で測定された融解点はすべて $\pm 1^\circ\text{C}$ 内でした。つまり、一般的なプロトコルである $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ よりも速い昇温速度が使用できることを意味します。高速な昇温速度に設定して測定を行っても、結果を損なうことなく、実験時間を大幅に短縮できます。今回の研究により、これまで 2.5 時間かかっていた実験が Cary 3500 の使用によって約 5 分で実行できることが示されました。また、3 回以上のサンプルの繰り返し同時測定でも、大幅な時間短縮が実現しました。

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。8 つすべてのキュベットポジションを同時に測定できるため、液体サンプルの温度変化に対する反応を調査するラボは、生産性のさらなる向上を実現できます。

参考文献

1. Thomas, R. Sur l'existence, dans la molécule des acides nucléiques, d'une structure secondaire à liaisons labiles. *Experientia*. **1951**, 7(261–262).
2. P.R.Chetana, Ramakrishna Rao, Mithun Roy, Ashis K. Patra, *Inorganica Chimica Acta*, 362, **2009**, pp 4692–4698
3. Ramakrishna Rao, Ashis K. Patra, P.R.Chetana, *Polyhedron*, 27, **2008**, pp 1343–1352
4. Tina M. Davis, Lori McFail-Isom, Elaine Keane, and Loren Dean Williams, *Biochemistry*, **1998**, 37, pp 6975-6978

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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2021
Printed in Japan, July 2, 2021
5994-0384JAJP
DE44381.8766087963