

Thermal Melt 실험에서 더 빠른 램핑 속도 달성

Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 램핑 속도와 무관하게 동일한 결과 달성



저자

Kevin Grant, Matt Quinn
Agilent Technologies,
Australia

서론

온도를 올려 이중 나선 핵산이 단일 나선으로 분리되도록 유도할 수 있습니다. 염기 쌍 사이의 수소 결합은 일정한 온도에서 끊어집니다. Thermal Melt 실험은 DNA의 경우 adenosine 대 thymine(A=T) 및 guanine 대 cytosine(G≡C) 뉴클레오티드 사이, 그리고 RNA의 경우 adenosine 대 uracil(A=U) 및 G 대 C 사이의 수소 결합 수의 차이를 이용합니다. G≡C 뉴클레오티드는 세 개의 수소 결합을 포함하기 때문에 분리에 필요한 열 에너지는 이중 결합 쌍의 열 에너지보다 더 큼니다. 이는 DNA 및 RNA가 더 많은 G≡C 쌍을 포함할 수록 그 용융점이 더 높음을 의미합니다. 용융 온도(T_m)는 시료의 염기 조성(G≡C 대 A=T/U=T 비율)을 정확히 나타냅니다.

용융점은 260nm에서 단일 나선 핵산의 흡광도가 이중 나선 핵산의 흡광도보다 높다는 점을 활용하여 UV-Vis 분광 광도계로 측정됩니다(1). 그림 1은 siRNA(short interfering RNA) 시료를 사용하는 예를 보여줍니다. 260nm에서의 흡광도는 85°C에서 25°C에 비해 훨씬 더 높습니다.

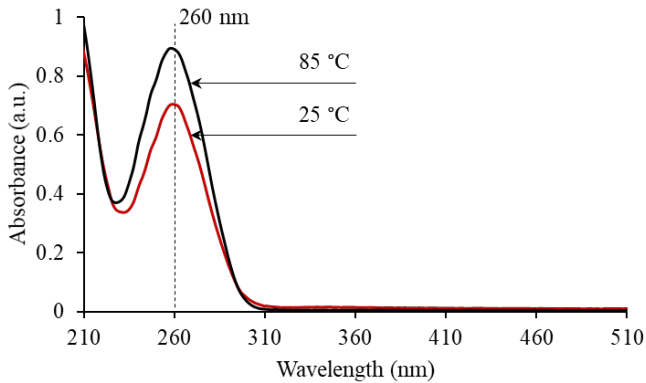


그림 1. 25°C(빨간색) 및 85°C(검정색)에서 siRNA 시료의 파장 스캔.

Thermal melt 실험은 일반적으로 260nm에서 흡광도를 측정하여 수행합니다. 이후 제어된 pH 및 이온 세기 조건에서 시료를 가열합니다. 일반적인 온도 램핑 속도는 0.5°C/분입니다(2, 3, 4). 이처럼 매우 느린 온도 램핑 속도는 정확하고 재현성 있는 데이터를 보장하기 위해 필요합니다. 아쉽게도 느린 온도 램핑 속도는 실험이 오래 걸린다는 것을 의미하기도 합니다. 예를 들어 0.5°C/분의 속도로 온도가 20°C에서 95°C까지 올라가려면 2.5시간 걸립니다. 실험실에서는 재현성 있는 결과를 보장하기 위해 종종 이런 측정을 반복하는 데, 이렇게 되면 완전한 thermal melt 실험에 상당히 많은 시간이 걸릴 수 있습니다.

Thermal melt 실험 시간을 줄이는 다양한 방법이 있습니다. 예를 들어 일부 기기는 실험을 여러 단계로 나눠 각 단계에 서로 다른 온도 램핑 속도를 적용합니다. 시작 및 종료 단계에서 빠른 램핑 속도를 적용하고 시료가 변성되는 온도 범위에서는 느린 램핑 속도를 적용할 수 있습니다.

최근 분광 광도법 측정 장비의 발전으로 인해 thermal melt 측정 경과 시간이 크게 줄었을 뿐만 아니라 온도 정확도가 이전보다 더 높아졌습니다. Agilent Cary 3500 Multizone UV-Vis 분광 광도계는 실험 중 용액의 온도를 정확히 제어하기 위해 통합 in-cuvette 온도 프로브를 사용합니다. 멀티셀 홀더는 기기에 내장되며, 물이 없는 공랭식 Peltier를 사용하여 시료의 온도를 0~110°C로 제어합니다.

이 연구는 Cary 3500 Multizone UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 siRNA 시료의 계산 용융 온도(T_m)에 미치는 온도 램핑 속도 증가의 영향을 평가하였습니다.

실험

시료

siRNA 시료는 애질런트의 핵산 솔루션 사업부에서 제공하였습니다. 약 0.3mg/mL의 siRNA 용액은 100mM NaCl, 0.1nM EDTA 및 10mM sodium phosphate를 포함하는 완충액 (pH 7.0으로 조정)에서 제조하였습니다.

표준 석영 큐벳(부피 3.5mL, 광학 경로 길이 10mm)을 사용하였으며 순수 인산염 완충액을 참조 용액으로 사용하였습니다.

기기 및 분석법

모든 측정에는 Cary 3500 Multizone UV-Vis 분광 광도계를 사용하였습니다. 분석법 파라미터는 표 1에 나와 있습니다.

연구 중에 변경된 유일한 파라미터는 온도 램핑 속도였습니다. 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30°C/분의 총 8개 램핑 속도를 사용하였습니다.

모든 측정은 동일한 조건에서 최소 3개의 시료 용액을 사용하였습니다. 각 시료 큐벳은 참조 용액을 결합하였으며 8-위치 멀티셀 홀더에 올려놓았습니다. In-cuvette 온도 프로브를 각 시료 큐벳에 삽입하였고(그림 2), 실험 온도 제어를 위해 사용할 수 있었습니다.



그림 2. 측정 동안에 실험 온도를 제어하기 위해 사용된 in-cuvette 온도 프로브

온도가 0.5°C 올라갈 때마다 데이터를 수집하였고, 신호는 각 데이터 포인트가 기록되기 전에 1초간 평균화 시켰습니다. 30°C/분의 온도 램핑 속도에서 측정하는 데 약 5분 걸렸습니다. 시험 수행 시 전체 큐벳에 충분히 균일한 온도를 제공하기 위해 교반 장치는 500rpm으로 설정하였습니다.

표 1. 분석법 파라미터

파라미터	설정
Wavelength (nm)	260
스펙트럼 대역폭(nm)	5
신호 평균 시간(s)	1
데이터 간격(°C)	0.5
시작 온도(°C)	25
종료 온도(°C)	86
리턴(Return) 온도(°C)	25
단계 수	1
유지 시간(분)	0.5
온도 램핑 속도(°C/분)	변화함
교반 속도(RPM)	500
온도 구간 수	4
온도 제어	온도 프로브

결과 및 토의

서로 다른 온도 램핑 속도에서의 T_m 값

데이터 분석은 타사 소프트웨어 패키지에서 수행했습니다. 8개의 온도 램핑 속도에서 수집된 흡광도 데이터는 그림 3에 나와 있습니다. 데이터는 0~1 흡광도 단위로 정규화 되었고 보기 편하게 배열하였습니다. 각 온도 램핑 속도의 1차 도함수를 계산하여 표시하였습니다. 각 1차 도함수 플롯의 피크는 용융 곡선의 중간 지점, 즉 T_m 값을 나타냅니다.

표 2. 각 온도 램핑 속도에서 측정된 siRNA 시료의 T_m 값.

	램핑 속도 (°C/분)	반복 1 T_m °C	반복 2 T_m °C	반복 3 T_m °C	평균 T_m (°C) (n=3)
실험 1	0.5	78.5	78.5	78.5	78.50
실험 2	1	78.5	78.5	78.0	78.33
실험 3	5	77.5	78.0	77.5	77.67
실험 4	10	78.0	77.5	77.9	77.80
실험 5	15	78.4	78.5	77.9	78.27
실험 6	20	78.4	78.3	78.5	78.40
실험 7	25	78.7	77.8	78.3	78.27
실험 8	30	79.0	78.9	78.2	78.70

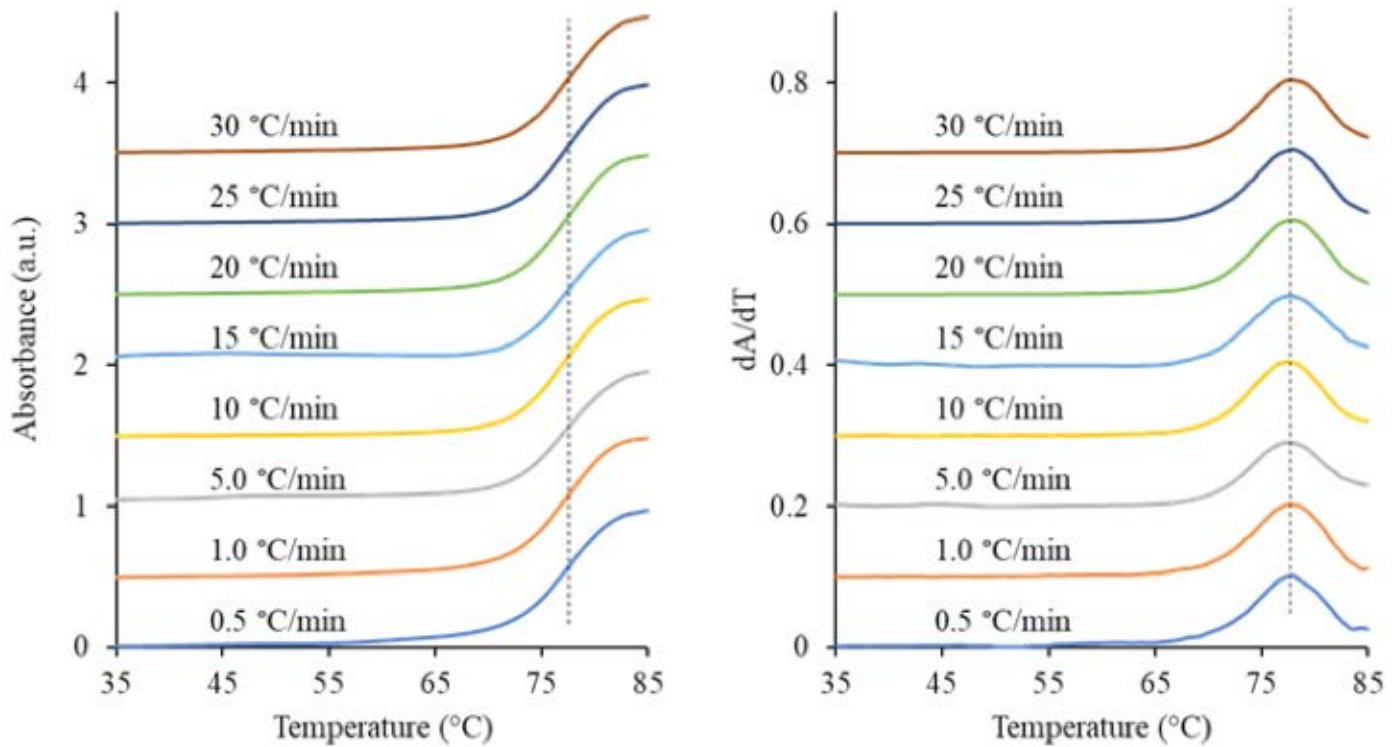


그림 3. siRNA(왼쪽) 시료의 흡광도 대 온도 그래프와 상응하는 온도 램핑 속도의 1차 도함수(오른쪽).

그림 3과 표 2에 나와 있는 것처럼, 실험에서 사용된 8개의 온도 램핑 속도에서 측정된 siRNA 시료의 T_m 값은 $\pm 1^\circ\text{C}$ 내에 있습니다.

결론

Cary 3500 Multizone UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 8개의 서로 다른 온도 램핑 속도에서 동일한 siRNA 시료의 용융점을 측정하였습니다. 각 램핑 속도에서 측정된 용융점은 모두 $\pm 1^\circ\text{C}$ 내에 있었습니다. 이는 실험실에서 사용하는 $0.5^\circ\text{C}/\text{분}$ 의 일반 프로토콜보다 더 빠른 온도 램핑 속도를 사용할 수 있다는 것을 의미합니다. 더 높은 램핑 속도를 적용하여 결과에 영향을 주지 않으면서 실험 시간을 크게 줄일 수 있었습니다. 본 연구는 이전에 2.5시간 걸렸던 실험이 Cary 3500을 사용할 경우 약 5분만에 측정될 수 있음을 증명하였습니다. 최소 3개의 반복 시료를 동시에 측정하는 것 역시 상당한 시간을 절약해줍니다.

빠른 시간 램핑 속도의 사용은 온도에 따른 UV-Vis 흡광도의 다른 측정으로 확장할 수 있어, 온도 제어 실험을 수행하는 실험실에 상당한 생산력 이점을 제공합니다. 8개의 큐벳 위치를 모두 동시에 측정하는 능력은 온도 변화에 대한 액체 시료의 반응 연구에 관심이 있는 실험실의 생산력을 추가로 향상시킵니다.

참고 문헌

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

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

DE44381.8766087963

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 7월 2일, 한국에서 인쇄
5994-0384KO

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com