

Tm 解析システム TMSPC™-8 による 核酸医薬品の熱安定性解析

近年、核酸医薬品をはじめとした機能性核酸が注目されています。この機能性核酸の開発や評価を行う上で、構造や機能を支配する因子である熱安定性を把握することは重要です。また、PCR や DNA マイクロアレイなど核酸のハイブリダイゼーションに基づく手法においても熱安定性解析が不可欠となっています。

今回、紫外可視分光光度計 UV-1900i と Tm 解析システム (TMSPC-8) を用いて核酸の熱安定性解析 (Tm 解析) を行いました。本システムを用いることにより、核酸の Tm 値を簡便に算出できます。

A. Goto

■ 核酸の熱的挙動

核酸 (DNA、RNA) は二重鎖らせん構造をとりますが、温度を上昇させると、水素結合が切断され、次第に二重鎖は解離し、一本鎖の構造になります。この現象を核酸の融解と呼び、二重鎖と一本鎖の占める割合が等しくなる温度を融解温度 (Melting Temperature; Tm) と定義します。Tm 値は核酸の熱安定性を示す指標となり、塩基配列や核酸濃度、ミスマッチ (非相補的塩基対) などに依存します。

核酸は 260 nm 付近に紫外吸収ピークを持ち、融解の際には吸光度が増加することが知られています (図 1)。分光光度計の Tm 解析システムでは、この吸光度変化を測定し、Tm 値を決定します。

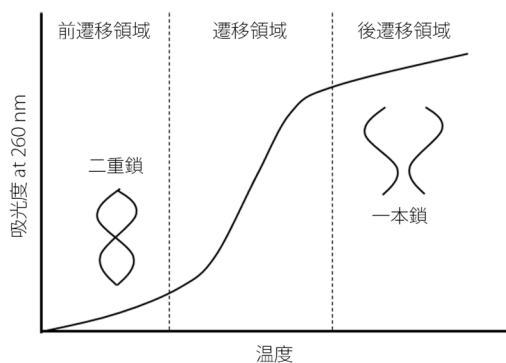


図 1 核酸の融解曲線

■ Tm 解析システム (TMSPC-8)

図 2 に UV-1900i と Tm 解析システム (TMSPC-8) の外観を示します。本システムは 8 連電子冷却式セルホルダ、専用 8 連セル (光路長 10 mm、1 mm)、温度コントローラ、Tm 解析ソフトウェアから構成されており、同時に最大 8 サンプルの測定が可能です。

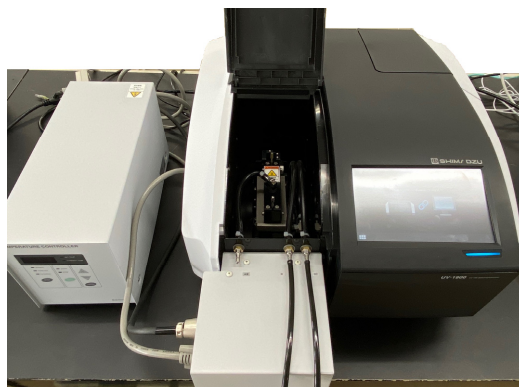


図 2 UV-1900i と Tm 解析システム (TMSPC-8)

■ TMSPC-8 による核酸の Tm 解析

今回、核酸の一種である M13-25mer をサンプルとして用いました。

前処理として、サンプル溶液の脱気を行いました。(サンプル溶液に空気が溶存すると高温時に気泡を生じ、正確な測定ができません。) また、センス鎖とアンチセンス鎖の間に完全に二重鎖を形成させるためのアニーリングを行う必要があります。今回は 95 °C で 10 分以上温度を保持してから、2°C/分の速度で温度を下げ、アニーリングしました。

専用 8 連セルは光路長が 10 mm と 1 mm の 2 種類あり、サンプルの吸光度 (濃度) に応じて選択が可能です。今回は 260 nm における吸光度が 0.5~1 となるようにサンプルを調製し、光路長 10 mm のセルを使用しました (図 3)。測定は表 1 の測定条件で行いました。

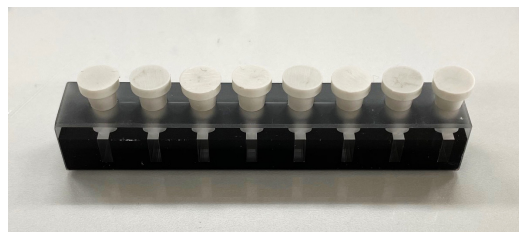


図 3 専用 8 連セル (光路長 10 mm)

表1 測定条件

使用装置	: UV-1900i、Tm 解析システム TMSPC-8
◆測定パラメータ	
測定波長	: 260 nm/320 nm*1
スリット幅	: 1.0 nm
セルブランク補正	: 有効
◆温度パラメータ	
開始温度	: 15 °C
開始保持時間	: 1800 秒
温度速度	: 1.0 °C/分
測定待機	: 45 秒
測定間隔	: 0.5 °C
終了温度	: 95 °C

*1 核酸が吸収しない 320 nm における吸光度をベースラインとして差し引きました。これによりセル毎でのベースラインのずれが緩和され、よりばらつきの少ないデータを得ることができます。

Tm 測定により得られた融解曲線（温度に対して 260 nm における吸光度をプロットした曲線）を図 4 に示します。昇温時と降温時の両方の結果を示しています。図 4 より、温度上昇に伴い吸光度が大きくなっていることがわかります。また、融解曲線は温度が低い順に前遷移領域、遷移領域、後遷移領域の 3 つの領域に分けることができます。前遷移領域、後遷移領域ではそれぞれ二重鎖、一本鎖が過剰に存在しています。

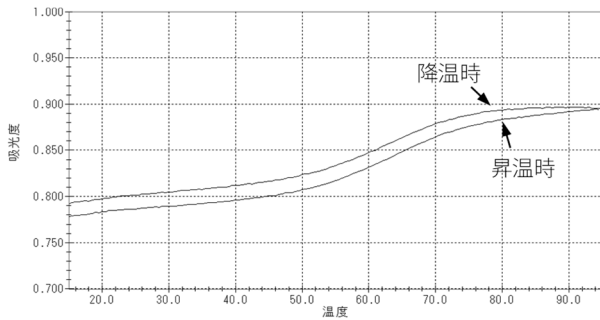


図 4 サンプルの融解曲線

Tm 値は中線法と微分法の 2 種類の計算方法で算出しました。両者の解析により得られた Tm 値の結果を表 2 に示します。昇温時と降温時で、それぞれ同等の結果が得られました。

表 2 Tm 解析の結果

計算方法	Tm 値 (°C)	
	昇温	降温
中線法	63.58	63.56
微分法	63.68	64.10

中線法では前遷移領域、後遷移領域で選択された区間ごとにそれぞれ接線を引き、2本の接線の中線と吸光度曲線との交点を Tm 値（融解温度）として計算されます。図 5 のように前遷移領域と後遷移領域を任意に設定し、Tm 値を求めました。

一方で、微分法では設定された区画内で設定されたポイント数毎に 1 次微分演算を行い、その最大値を示す位置が Tm 値（融解温度）と計算されます。図 6 のように判定領域を任意に設定し、Tm 値を求めました。

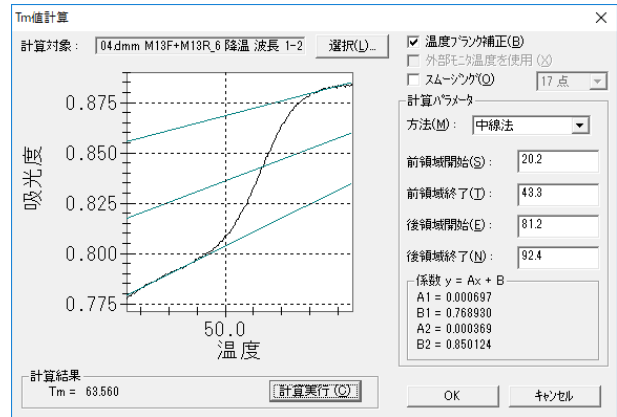


図 5 中線法による解析

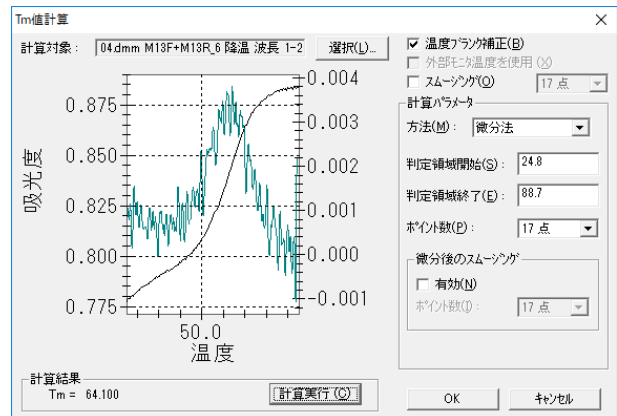


図 6 微分法による解析

■ まとめ

今回は紫外可視分光光度計 UV-1900i と Tm 解析システム (TMSPC-8) を用いて核酸の熱安定性解析 (Tm 解析) を行いました。本システムでは、温度上昇に伴う 260 nm における吸光度変化を測定することで Tm 値を算出しています。また専用 8 連セルを用いることで同時に最大 8 サンプルの測定が可能です。

測定により得られた融解曲線から、中線法と微分法の 2 種類の計算方法で Tm 値を算出しました。このように、本システムを用いることにより、簡単に Tm 値が算出できます。

TMSPC は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2020 年 4 月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。