

UV TALK LETTER



UV TALK LETTER

ライフサイエンス紫外可視分光光度計 BioSpec-nano

ライフサイエンス研究ではPCR(Polymerase Chain Reaction)、定量PCR、クローニング、塩基配列決定、DNAマイクロアレイ解析などに抽出、精製した核酸(DNA、RNA)サンプルを取り扱います。これらの処理プロセスを成功に導くためには、核酸の濃度、純度の情報が不可欠であり、紫外可視分光光度計による核酸分析が広く行われています。本稿では微量、簡単、迅速な核酸分析を実現するライフサイエンス紫外可視分光光度計BioSpec-nanoを紹介します。

1. BioSpec-nanoの特長

BioSpec-nanoは従来型の分光光度計と異なり、セル(キューベット)を使用しない光学系を採用しています。光学系はキセノンフラッシュランプ、上部窓、ターゲット(ファイバーロッド)、ホログラフィックグレーティング、フォトダイオードアレイ検出器から構成されています。BioSpec-nanoはサンプルを上部窓とターゲットで挟み込むことにより一定の光路(0.2mmまたは0.7mm)を形成し、測定を行います。このような光学系を採用することで、1~2 μ Lの微量サンプル測定や高濃度のサンプルの無希釈測定を可能にするとともに、分析操作性を大幅に向上させました。従来型の装置ではセルの洗浄、乾燥に非常に手間と時間がかかり、これが分析操作上の大きな障害になっていましたが、BioSpec-nanoの接液部(上部窓、ターゲット)のクリーニングは簡単な拭き取り操作のみで行えます。さらに、BioSpec-nanoには自動で光路長形成を行う画期的な自動マウント機構と接液部の拭き取りを行う自動ワイピング機構が搭載されており、ドロップ&クリックのスタイルでの分析を実現しています。自動ワイピングを含めた分析時間はわずか15秒で、スムーズに多数のサンプルの分析を進めることができます。



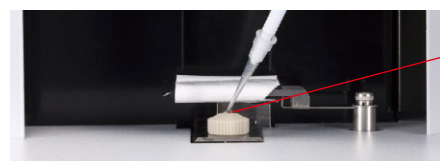
図1 BioSpec-nano

2.ドロップ&クリック分析

BioSpec-nanoの分析手順を図2に示します。最初にサンプルをターゲット上に1 μ L(光路長0.2mm)または2 μ L(光路長0.7mm)滴下します。装置またはソフトウェアのstartボタンをクリックすると、自動マウント機構より上部窓が下げられ、サンプルを上部窓とターゲットとの間に挟み込むことにより、設定レバーで選択した光路長が自動的に形成されます。この状態でキセノンフラッシュランプを点灯させ、紫外可視吸収スペクトル(220~800nm)を3秒で取得し、分析結果を得ます。分析結果は図3のようにソフトウェア上に表示されます。分析終了後、自動ワイピング機構により接液部(ターゲット、上部窓)の拭き取りを行います。

自動ワイピングにはワイピング専用開発されたクロスを採用しています。ワイピングクロスは超微細繊維構造を有し、高い吸水性により優れたワイピング性能を示します。クロス1枚当たりおよそ100回のワイピングが可能です。拭き取った溶液は毛细管現象で内部にトラップされるため、キャリーオーバー(拭き残し)は非常に低く抑えられています。精製dsDNA(double-strand DNA、二重鎖DNA)サンプルによる連続120回のワイピングテストではキャリーオーバーは0.3%以下でした¹⁾。

(1)ターゲットへサンプル滴下

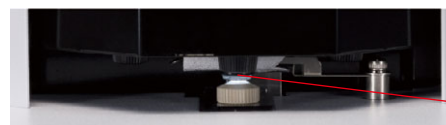


ターゲット

(2)startボタンをクリック

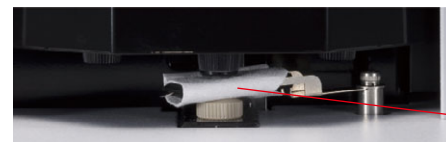


(3)自動マウント(上部窓の移動)、光路長を形成し、スペクトル測定



上部窓

(4)自動ワイピング



ワイパー

図2 ドロップ&クリック分析

3.優れた分析性能

0.7mmまたは0.2mmの光路長選択により、それぞれ0.3~21 OD*(15~1,000 ng/ μ L dsDNA)、1~75 OD(50~3,700 ng/ μ L dsDNA)の広い濃度範囲で定量が可能です。自動マウントシステムによって安定した光路が形成されることにより、1~2 μ Lのサンプルでも高精度かつ正確なデータが得られます¹⁾。

*OD(Optical Density)は光学密度、光路長10mm換算の吸光度です。

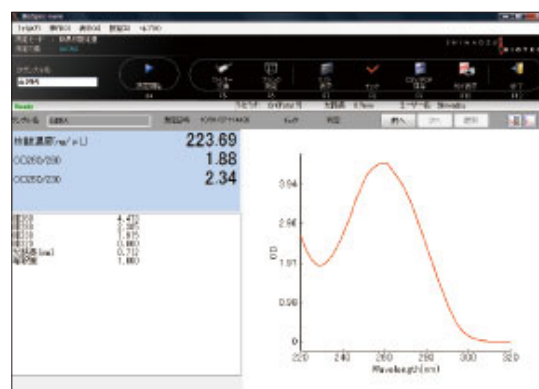


図3 dsDNAの分析結果

4. BioSpec-nanoによる核酸、タンパク質分析

BioSpec-nanoには簡易核酸定量、ラベル化核酸定量、タンパク質定量(OD280法)モードがあり、表1のように定量モードに応じた分析結果が表示されます。

4.1 核酸の分析

簡易核酸定量モードは精製されたRNA、dsDNA、ssDNA(single-strand DNA、一本鎖DNA)、OligoDNA(オリゴDNA)を分析対象とします。分析結果には核酸濃度(ng/μL)とOD比(OD260/280、OD260/230)が表示されます。OD260/280はDNA、RNAの純度の指標となります。タンパク質は280nmに吸収を持ちますが、これが混入すると、OD260/280は低くなります。純度の高いDNA、RNAのOD260/280は1.8以上になります。OD260/230はRNAの純度の指標となり、タンパク質、EDTA、フェノール、その他の有機物の混入により値が低下します。純度が高いRNAのOD260/230は2.0以上になります。

4.2 ラベル化核酸の分析

ラベル化核酸定量モードの分析対象はDNAマイクロアレイ、ノーザンブロット、サザンブロット、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(Fluorescence in situ Hybridization、FISH)、機能解析などにCy3、Cy5などで蛍光標識(ラベル)化された核酸です。

ラベル導入率は核酸1μg当たりのラベルピコモル数(pmol)です。ラベル導入率とヌクレオチド/ラベル比によりラベル化反応の効率チェックができます。

4.3 タンパク質、ラベル化タンパク質の分析

タンパク質定量モードでは構造解析、機能解析、分子間相互作用解析などのために高度に精製されたタンパク質、ラベル化タンパク質ならびに、免疫染色、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット用の抗体、ラベル化抗体の分析を行います。タンパク質定量は280nmにおける紫外吸収(紫外吸収法、OD280法)によります。タンパク質の280nmにおけるモル吸光係数(ϵ_{280})が既知の場合は値を直接入力します。 ϵ_{280} が不明な場合には、トリプトファン(Trp)、チロシン(Tyr)、シスチン(S-S)の残基数から算出できます³⁾。なお、短光路長での定量のため、BSA(Bovine Serum Albumin)換算で0.45mg/mL以上(光路長0.7mm)の高濃度サンプルが必要になります。

表1 各モードの計算項目一覧

定量モード(分析対象)	計算項目	計算式
簡易核酸定量 (核酸)	核酸濃度(ng / μL)	希釈度 * 核酸濃度係数 * (OD260 - OD320)
	OD260 / 280	(OD260 - OD320) / (OD280 - OD320)
	OD260 / 230	(OD260 - OD320) / (OD230 - OD320)
ラベル化核酸定量 (ラベル化核酸)	核酸濃度(ng / μL)	希釈度 * 核酸濃度係数 * (OD260 - ラベルOD * CF260)
	ラベル濃度(M)	ラベル濃度(M) = 希釈度 * ラベルOD / ラベル ϵ
	ヌクレオチド濃度(M)	希釈度 * 核酸濃度係数 * 0.001 * (OD260 - ラベルOD * CF260) / ヌクレオチド分子量
	OD260 / 280	(OD260 - ラベルOD * CF260) / (OD280 - ラベルOD * CF280)
	ラベル導入率(pmol/μg)	ラベル濃度(M) * E9 / 核酸濃度(ng/μL)
	ヌクレオチド/ラベル比	ヌクレオチド濃度(M) / ラベル濃度(M)
タンパク質定量 (タンパク質)	タンパク質濃度(M)	希釈度 * OD280 / ϵ_{280}
	タンパク質濃度(μg/mL)	タンパク質濃度(M) * MW * 1,000
	ϵ_{280} (M ⁻¹ cm ⁻¹ , 残基数入力)	5,500 * [Trp残基数] + 1,490 * [Tyr残基数] + 125 * [S-S残基数]
タンパク質定量 (ラベル化タンパク質)	タンパク質濃度(M)	希釈度 * (OD280 - ラベルOD * CF280) / ϵ_{280}
	タンパク質濃度(μg/mL)	タンパク質濃度(M) * MW * 1,000
	ラベル濃度(M)	希釈度 * ラベルOD / $\epsilon_{ラベル}$
	ラベル化率	ラベル濃度(M) / タンパク質濃度(M)

核酸濃度係数²⁾: RNA(40.0)、dsDNA(50.0)、ssDNA(37.0)、OligoDNA(33.0)
 ヌクレオチド分子量: RNA(321.5)、dsDNA(309.0)、ssDNA(309.0)、OligoDNA(309.0)
 ラベルOD: ラベル波長におけるOD
 $\epsilon_{ラベル}$: ラベル波長におけるモル吸光係数(M⁻¹cm⁻¹)
 CF260、CF280: ラベルの260nm、280nmにおけるODの寄与を補正するための係数
 MW: タンパク質の分子量

参考資料

- 1) 島津アプリケーションニュース, No. A420.
- 2) Ausubel, F., et al., Short Protocols In Molecular Biology, 4th edition 1999, WILEY.
- 3) Pace, C.N., et al., Protein Sci., 4, 2411(1995).

核酸の熱安定性解析(T_m解析)

PCR、DNAマイクロアレイなど、核酸のハイブリダイゼーション(Hybridization)に基づく手法はライフサイエンス研究に不可欠になっています。また、核酸医薬品、siRNA(small interference RNA)をはじめとする機能性核酸が注目を集めています。これらの研究開発、応用に必須となった核酸の熱安定性解析(T_m解析)について概説します。

DNAは通常、二重鎖らせん構造をとっています。二重鎖ではセンス鎖、アンチセンス鎖の相補的塩基[G(グアニン)とC(シトシン)およびA(アデニン)とT(チミン)]が対をなし、相補的塩基対の間には水素結合が形成されています。温度を上昇させると、水素結合が切断され、二重鎖は解離し、一本鎖の構造をとります。この現象を核酸の融解(Melting)と呼びます。

核酸は260nm付近に紫外吸収ピークを持ち、融解の際に260nmにおける吸光度は増加します。温度上昇と吸光度の連動測定により得られたデータ曲線を紫外吸収-融解曲線と言います。融解曲線は紫外吸収測定以外にも、円偏光二色性測定、熱測定などにより得られます。融解温度(T_m、Melting Temperature)では、二重鎖と一本鎖の占める割合が等しくなります。T_mは核酸の熱安定性を表す指標となり、塩基配列、塩基数、核酸濃度、溶媒条件(塩組成、有機溶媒組成、pH)、ミスマッチ(非相補的塩基対)、核酸アナログ(人工核酸)の構造などの条件に依存します。

融解とは逆に、一本鎖の状態にある核酸の温度を下げると、相補的塩基対の間に水素結合が形成され、二重鎖の構造をとります。この現象をハイブリダイゼーションと呼びます。核酸のハイブリダイゼーションはPCR、DNAマイクロアレイ、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション、in situハイブリダイゼーションなどに利用されています。siRNA、アンチセンス核酸、アンチジーン核酸、リボザイムなどの機能を有する核酸(機能性核酸)が創薬研究、医薬品、診断などに応用されています。核酸の熱安定性は核酸の構造、ハイブリダイゼーション、機能を支配する重要な因子であり、これらの分野で核酸の熱安定性解析(T_m解析)は必須となっています。

以下、核酸の熱安定性解析(T_m解析)について簡単に説明します。2つの異なる一本鎖(A₁、A₂)と二重鎖(A₁A₂)の間に二状態的な平衡関係が成立し、A₁、A₂の濃度が等しいと仮定します。



二重鎖のモル分率を α 、核酸総濃度をC_tとすると、系に対する平衡定数Kは以下のように表せます。

$$K = [A_1 A_2] / ([A_1] [A_2]) = 2\alpha / ((1-\alpha)^2 C_t) \quad (2)$$

観測される260nmにおける吸光度(A_{obs})は以下になります。

$$A_{obs} = (\epsilon_{ds}\alpha + \epsilon_{ss}(1-\alpha))C_t L \quad (3)$$

ϵ_{ds} 、 ϵ_{ss} 、Lはそれぞれ二重鎖のモル分子吸光係数、一本鎖のモル分子吸光係数、光路長です。

実際の測定で得られる融解曲線では図1のように ϵ_{ds} 、 ϵ_{ss} が温度依存性を持ち、大きな吸光度変化が起こる領域(遷移領域)より低温側の前遷移領域と高温側の後遷移領域の吸光度が直線的に変化するため、 ϵ_{ds} 、 ϵ_{ss} を以下のように表します。Tは温度です。

$$\epsilon_{ds} = a_{ds} + b_{ds}T \quad (4)$$

$$\epsilon_{ss} = a_{ss} + b_{ss}T \quad (5)$$

融解曲線からT_m(融解温度)を求める場合は、 $\alpha=1/2$ のときに温度がT_mとなることを利用します。図1のように前遷移領域と後遷移領域に対してベースラインを定めます。次に、2つのベースラインの中線を引き、この中線と融解曲線が交差する温度(T_m)を求めます。

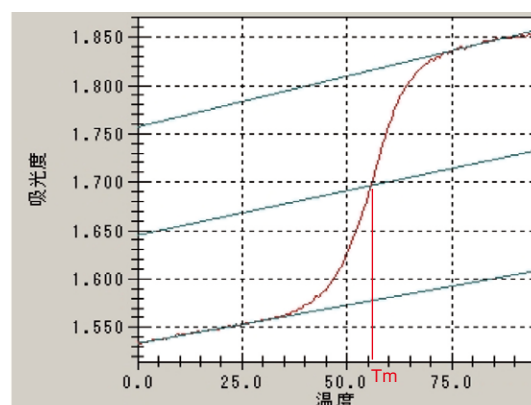


図1 融解曲線の例、T_mの決定方法

アプリケーション 核酸の熱安定性解析 (T_m解析)

二重鎖形成のGibbsの自由エネルギー変化、エンタルピー変化、エントロピー変化を ΔG 、 ΔH 、 ΔS とし、モル比熱の変化(ΔC_p)をゼロと仮定すると、下式が得られます。Rは気体定数です。

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K \quad (6)$$

(2)式を(6)式へ代入し、温度がT_mのときは $\alpha = 1/2$ により下式が得られます。

$$1/T_m = (R/\Delta H) \ln(C_t/4) + \Delta S/\Delta H \quad (7)$$

上式より種々の濃度(C_t)のサンプルを用意し、それぞれのT_mを求め、 $\ln(C_t/4)$ に対して1/T_mをプロットし、得られた直線の傾き、y切片から ΔH 、 ΔS が求まります。

弊社では核酸の熱安定性解析を実現するために、T_m解析システムをダブルビーム型紫外可視分光光度計(UV-1800/UV-2450/UV-2550等)のオプションとして販売しています。T_m解析システム(TMSPC-8)は電子冷却式8連セルホルダー、温度コントローラー、T_m解析ソフトウェア、専用8連セル(光路長10mm、1mm)などから構成されます。8連セルの採用により、同時に最大8サンプルの熱融解測定が可能になります。

T_m解析システムによるT_m測定データと熱安定性解析の例を以下に示します。

GCGAAAAGCG / CGCTTTTCGCをサンプルとして、濃度が異なる10サンプルのデータを取得しました。濃度は表1に記載しています。サンプルの吸光度に応じて、光路長10mmまたは1mmのセルを用いました。得られたデータを図2、図3に示します。測定条件を以下に示します。

Buffer: 100mM Sodium Phosphate, 1M NaCl, 0.5mM EDTA, pH7.0
 Wavelength: 260nm, 320nm,
 Temperature Range: 0 to 95°C,
 Ramp Rate: 1°C/min,
 Sampling Interval: 0.5°C,
 Waiting time: 30sec,
 After Annealing (95°C, 2min)

T_m解析ソフトウェアで各濃度のT_mを決定し、1/T_m、 $\ln(C_t/4)$ を計算しました。表1のデータをプロットし、図4の直線を得ました。この直線の傾き、y切片により、 ΔH 、 ΔS としてそれぞれ-74.6kcal/molならびに-202.9cal/(mol K)を得ました。

ΔH 、 ΔS を求める方法としては上記のプロット以外に、融解曲線の非線形フィッティングを実施する方法もあります。

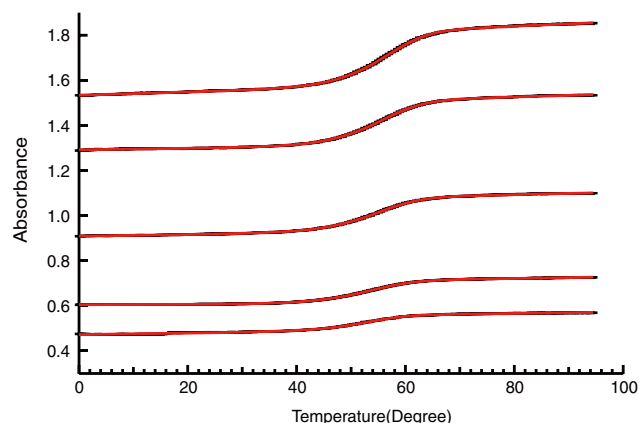


図2 光路長10mmでの測定結果

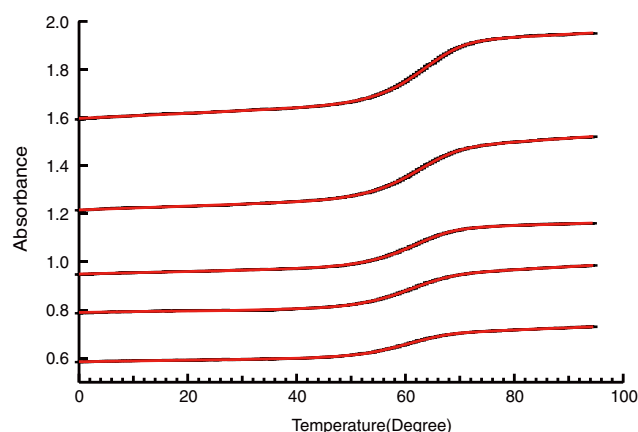


図3 光路長1mmでの測定結果

表1 各濃度での解析結果

C _t (μM)	T _m (°C)	$\ln C_t/4$	1/T _m (1/K)
196.4	62.4	-9.9217	0.002980
157.1	61.1	-10.1448	0.002992
117.8	60.8	-10.4325	0.002995
98.2	59.7	-10.6148	0.003004
78.6	58.9	-10.8379	0.003012
19.6	55.6	-12.2242	0.003042
15.7	54.2	-12.4474	0.003055
11.8	53.8	-12.7351	0.003058
7.9	52.8	-13.1405	0.003068
5.9	51.8	-13.4282	0.003077

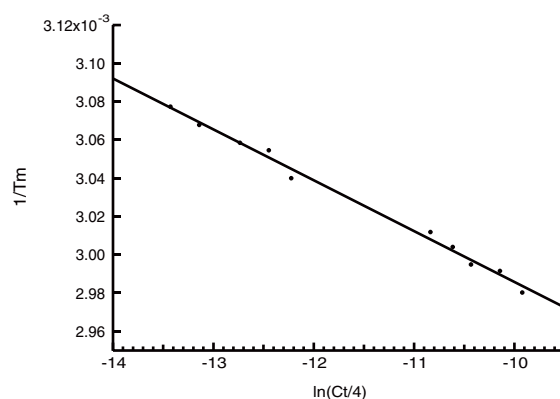


図4 $\ln(C_t/4)$ vs 1/T_m プロット

参考資料

島津アプリケーションニュース, C297-0321

島津製作所 分析計測事業部応用技術部
原田最之



タンパク質の比色定量法にはどのような方法がありますか？



タンパク質の比色定量用に多くの試薬キットが市販されています。
これらのキットに採用されている代表的な方法について述べます。

(1) Bradford (CBB: Coomassie Brilliant Blue) 法

Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) 溶液は470nm付近に吸収極大を示しますが、タンパク質との結合により吸収極大が595nm付近へシフトし、溶液の色が褐色から青色へと変化します。CBBGはタンパク質のアルギニン残基と特に強く結合しますが、トリプトファン、チロシン、ヒスチジン、フェニルアラニン残基とも結合することが知られています。Bradford法は分析操作が簡単、迅速で、妨害物質が少ないことが特長です。ただし、タンパク質の種類による発色のばらつきが大きいことや、可溶化剤、界面活性剤の妨害を受けやすい欠点があります。定量範囲は1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 1.5 mg/mL です。Bradford法はBCA法とともに頻繁に利用される方法です。

(2) Biuret 法

硫酸銅と酒石酸カリウムナトリウムを含むアルカリ溶液 (Biuret 試薬) とタンパク質溶液を混合すると、 Cu^{2+} とポリペプチド鎖の窒素原子が錯体を形成し (Biuret 反応)、溶液は紫色を呈します。Biuret 法は分析操作が簡単で、タンパク質間の発色のばらつきが小さいことが利点です。ただし、Biuret 法は分析感度が低く、 mg/mL オーダーの濃度が必要とされます。下記のLowry法、BCA法はBiuret法の改良法であり、分析感度が大幅に向上しています。

(3) Lowry 法

Lowry法では、最初にタンパク質溶液とBiuret試薬の混合により Cu^{2+} -タンパク質錯体を生成させます。この溶液とリンモリブデン酸-リントングステン酸からなるFolin-Ciocaltu試薬 (フェノール試薬) を混合すると、リンモリブデン酸-リントングステン酸がチロシン、トリプトファン、システイン残基によって還元され、最終的に溶液は青藍色を呈します。Lowry法は分析感度が高いですが、分析操作に手間がかかる、タンパク質間の発色のばらつきが大きい、妨害物質 (還元剤、界面活性剤、EDTAなど) が多いといった欠点があります。定量範囲は1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 1.5 mg/mL です。

(4) BCA (Bicinchoninic Acid) 法

BCA法では、Biuret反応により Cu^{2+} -タンパク質錯体を生成させ、チロシン、トリプトファン、システイン残基の還元によって生じる Cu^+ と二分子のBCAの間に形成される青紫色の錯体を検出します。BCA法の利点は分析操作が簡単、迅速で、分析感度が高く、タンパク質の種類による発色のばらつきが小さい、妨害物質が少ないことです。主な妨害物質は還元剤です。定量範囲は0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 1.2 mg/mL です。

参考資料

- 1) Current Protocols in Protein Science, 3.4.1-3.4.29, John Wiley & Sons (2007).
- 2) やさしい原理からはいるタンパク質実験法! タンパク質をつくる一抽出・精製と合成, 化学同人 (2008).

ライフサイエンス紫外可視分光光度計 BioSpec-nano

BioSpec-nanoはセル(キューベット)フリー光学系や画期的な自動マウント機構、自動ワイピング機構を搭載し、1~2 μ Lのサンプルの迅速、簡単な核酸分析を実現しました。1分析に要する時間は僅か15秒であり、ハイスループット分析に対応します。



ドロップ&クリック分析

サンプルを滴下位置(ターゲット)へドロップし、startボタンをクリックするだけで、核酸濃度、純度(OD比)の確認ができます。測定とワイピングは装置が自動で行います。

1~2 μ Lでの核酸定量

1 μ L(光路長0.2mm)、2 μ L(光路長0.7mm)のサンプル量で分析が可能です。

シンプル&クイック分析

ブランク測定、サンプル測定、レポートのPDF出力、CSV出力などの基本操作はボタンをクリックするだけで、シンプル&クイックに行えます。

多彩な分析に対応

核酸定量、マイクロアレイ用にラベル化された核酸の定量、OD280法によるタンパク質定量、ラベル化されたタンパク質定量に対応しています。