

UV-Vis 분광기를 이용한 이중 가닥 핵산의 신속한 열 용융 온도 측정

Agilent Cary 3500 UV-Vis를 이용하여 빠른 승온
속도에서 용융 온도(T_m) 데이터를 재현성 있게 측정

저자

Wesam Alwan,
Mathieu Rault
Agilent Technologies, Inc.



서론

이중 나선 핵산의 단일 나선 분리는 온도의 상승을 통해 유도할 수 있습니다. 염기쌍 사이의 수소(H) 결합은 특정 온도에서 끊어집니다. 열 용융 실험은 핵산 간 H 결합의 수 차이를 이용합니다. 예를 들어 DNA의 경우 adenosine 대 thymine(A=T) 및 guanine 대 cytosine(G=C) 뉴클레오타이드 사이, 그리고 RNA의 경우 adenosine 대 uracil(A=U) 및 G 대 C 염기 사이의 수소 결합 수 차이를 이용합니다. G=C 뉴클레오타이드는 세 개의 수소 결합을 포함하기 때문에 분리에 필요한 열 에너지는 이중 결합 쌍의 열 에너지보다 더 큼니다. 더 많은 G=C 쌍을 포함하고 있는 DNA와 RNA는 용융점이 더 높습니다. 따라서 용융 온도(T_m)는 시료의 염기 조성(G=C 대 A=T/U=C 비율)을 정확히 나타냅니다.

신약 발견 및 개발 과정 및 핵산 생산 과정에서 T_m 은 종종 연구자 및 생산자들에게 2차 식별 테스트(QC 확인)로 사용됩니다. 핵산의 최고 흡광 피크인 260nm에서의 흡광도가 이중 나선 핵산보다 단일 가닥일 경우에 더 높기 때문에 용융 온도는 일반적으로 UV-VIS 분광 광도계를 이용해 측정됩니다.¹ 청어 정자의 DNA를 예로 들면, 그림 1은 260nm에서의 흡광도가 90°C에서 25°C에 비해 훨씬 높다는 것을 보여줍니다.

핵산 열 용융 실험은 일반적으로 260nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 수행합니다. 시료 온도는 pH 및 이온 강도 조건이 통제되는 조건에서 분당 0.5°C의 점진적인 속도로 상승시킵니다.²⁻⁴ 느린 승온 속도는 정확하고 재현 가능한 데이터를 보장하기 위함입니다. 아쉽게도 느린 승온 속도는 실험이 오래 걸린다는 것을 의미하기도 합니다. 예를 들어 0.5°C/분의 속도로 온도가

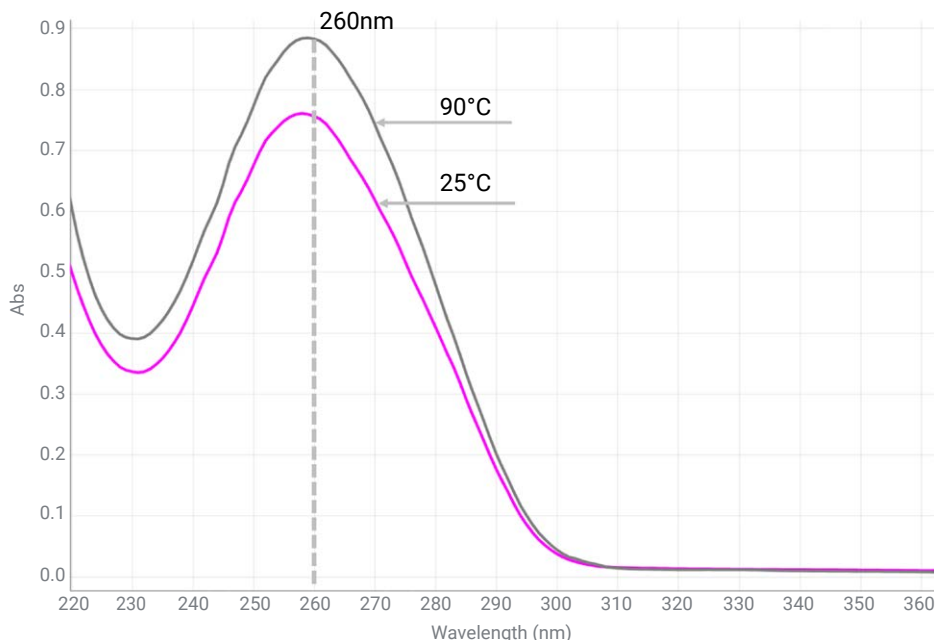


그림 1. 25°C에서 청어 정자 DNA 시료의 파장 스캔(이중 나선, 보라색), 90°C에서의 파장 스캔(단일 가닥, 회색).

20°C에서 95°C까지 올라가려면 2.5시간 걸립니다. 실험실에서는 재현성 있는 결과를 보장하기 위해 종종 이런 측정을 반복하는데, 이렇게 되면 완전한 열 용융 실험에 상당히 많은 시간이 걸릴 수 있습니다.

열 용융 실험 시간을 줄이는 다양한 방법이 있습니다. 예를 들어 일부 기기는 실험을 여러 단계로 나눠 각 단계에 서로 다른 승온 속도를 적용합니다. 시작 및 종료 단계에서 빠른 승온 속도를 적용하고 시료가 변성되는 온도 범위에서는 느린 램핑 속도를 적용할 수 있습니다. 최근 분광 광도법 측정 장비의 발전으로 인해 열 용융 측정 경과 시간이 크게 줄었을 뿐만 아니라 온도 정확도가 이전보다 더 높아졌습니다.

그러나 제어닐링 실험은 단일 가닥 핵산의 제어닐링 완료를 위해 보다 느린 속도에서 수행되어야 합니다.

Agilent Cary 3500 Multizone UV-Vis 분광 광도계는 열 용융 실험 중 용액의 온도를 정확히 제어하기 위해 통합 in-cuvette 온도 프로브를 사용합니다. 시료 온도를 0~110°C에서 제어하기 위해서는 물이 없는 공랭식 Peltier 장치가 사용됩니다.

이 연구에서는 Cary 3500 Multizone UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 청어 정자 DNA의 계산된 T_m 에 승온 속도가 미치는 영향을 평가했습니다.

실험

시료

청어 정자 DNA(D6898) 용액 ~15µg/mL를 인산염 완충 생리식염수(0.01M 인산염 완충액, 0.0027M 염화 포타슘, 0.137M 염화소듐, pH 7.4, 25°C)에서 전처리했습니다. 순수 인산염 완충액을 참조(블랭크) 용액으로 사용했습니다. 온도 프로브(제품 번호 G9889-60005)를 갖춘 Agilent quartz semimicro cells (제품 번호 5063-6559), 시료 부피 600µL, 10mm의 광학 경로 길이가 사용되었습니다(그림 2). 시료 증발을 최소화하기 위해 미네랄 오일(FS-SMO15) 몇 방울을 큐벳 내 시료 위쪽에 떨어뜨렸습니다.

기기 및 분석법

Cary 3500 Multizone UV-Vis 분광 광도계의 제어에는 Agilent Cary UV Workstation 소프트웨어가 사용되었습니다. 측정에는 표 1에 나타낸 분석법 파라미터를 사용하여 수행했습니다. 연구 중에 변경된 유일한 파라미터는 승온 속도였습니다. 1, 5, 10, 20, 30, 40°C/분의 총 6가지 승온 속도가 적용되었습니다. 모든 측정에서는 동일한 조건 하에 최소 3개의 시료 분취를 사용하였습니다. 각 시료 큐벳은 참조 용액을 결하하였으며 8-위치 멀티셀 홀더에 올려놓았습니다. in-cuvette 온도 프로브를 각 시료 큐벳에 삽입하였고(그림 2), 프로브의 피드백은 실험 온도 제어를 위해 사용되었습니다.

온도가 1°C씩 올라갈 때마다 데이터를 수집하였고, 신호는 각 데이터 포인트가 기록되기 전에 0.1초간 평균화 시켰습니다. 30°C/분의 승온 속도에서, 측정 시간은 약 10분이 소요되었습니다.

표 1. Agilent Cary 3500 UV-Vis 분석법 파라미터.

파라미터	설정
파장	260nm
신호 평균화 시간	0.1초
데이터 간격	1°C
시작 온도	25°C
종료 온도	100°C
리턴(Return) 온도(°C)	25°C
승온 속도	1, 5, 10, 20, 30, 40°C/분
단계 수	1
온도 제어	온도 프로브
평활화 필터	11
평활화 데이터 간격	0.5°C
미분 필터	11
미분 데이터 간격	0.5°C



그림 2. 측정 동안에 실험 온도를 제어하기 위해 사용된 Agilent semimicro cell(1) 및 in-cuvette 온도 프로브(2).

결과 및 토의

서로 다른 승온 속도에서의 T_m 값

6가지 승온 속도(1, 5, 10, 20, 30, 40°C/분)에서 수집된 흡광도 데이터는 그림 3에 나와 있습니다. 각 스캔의 첫 번째 미분 계산 결과 역시 그림 3에 나타나 있습니다. 각 1차 도함수 플롯의 최대 피크는 용융 곡선의 중간 지점, 즉 T_m 값을 나타냅니다. 그림 3과 표 2에 나와 있는 것처럼, 실험에서 사용된 6가지 승온 속도에서 측정된 청어 정자 DNA 시료의 T_m 값은 $\pm 0.2^\circ\text{C}$ 내에 있습니다.

표 2. 각 승온 속도에서 측정된 청어 정자 DNA 시료의 T_m 값.

항목	승온 속도 (°C/분)	반복 1 T_m (°C)	반복 2 T_m (°C)	반복 3 T_m (°C)	평균 T_m (°C) (n = 3), 각 상승 속도	표준 편차 T_m (°C) (n = 3), 각 상승 속도
1	1	87.1	87.1	87.1	87.1	0.0
2	5	87.0	86.6	86.5	86.7	0.2
3	10	86.7	87.1	87.0	86.9	0.2
4	20	87.1	87.1	87.1	87.1	0.0
5	30	87.1	87.0	86.6	86.9	0.2
6	40	86.6	87.0	87.0	86.9	0.2
평균 T_m (°C) (n = 6), 모든 승온 속도		86.9	87.0	86.9		
표준 편차 T_m (°C) (n = 6), 모든 승온 속도		0.2	0.2	0.2		

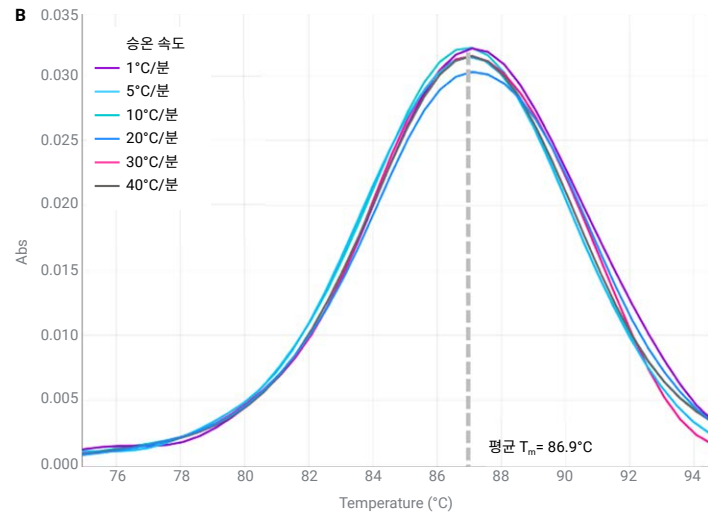
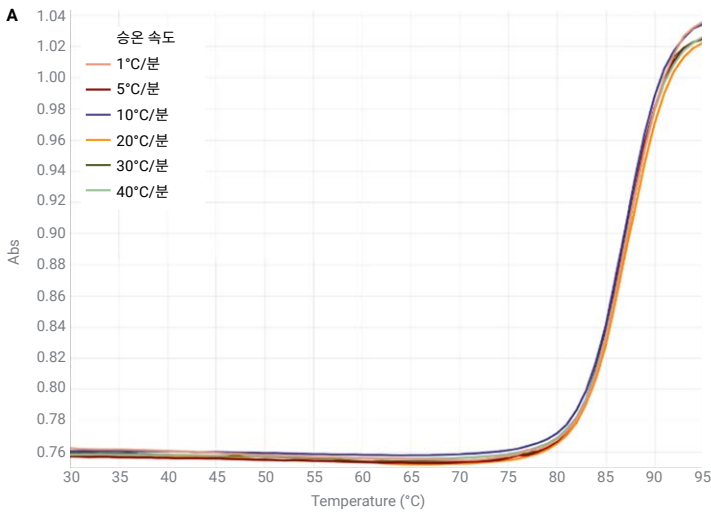


그림 3. 청어 정자 DNA 시료의 흡광도 대 온도(A) 및 상응하는 승온 속도의 1차 도함수(B).

Cary UV Workstation 내장 평활화 및 미분 계산기

Cary UV Workstation 소프트웨어에는 평활화 및 미분 기능이 포함되어 있어 용융점 계산을 돕습니다. 평활화는 스펙트럼 내 간섭과 노이즈 감소를 위해 적용할 수 있으며, 미분 함수는 첫 번째 미분을 계산합니다.

평활화 및 미분 기능은 Savitzky-Golay 기법을 사용합니다.⁵ 두 함수에는 모두 필터와 간격 크기가 필요합니다. 필터 크기는 각 포인트를 생성하는 데 사용되는 포인트의 수를 정의합니다. 데이터 분석에 사용되는 간격 값이 수집 간격과 다르면, 계산된 데이터는 특정 간격으로 설정될 것입니다. 평활화 및 미분 계산을 수집 간격과 일치시킬 것을 권장합니다.

평활화 및 미분 계산은 분석법 내에 저장 가능합니다. 그 후 계산은 데이터 수집 막판에 자동으로 진행됩니다(그림 4).

결론

Agilent Cary 3500 Multizone UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 6가지의 서로 다른 승온 속도로 동일한 청어 정자 DNA 시료의 용융점(T_m)을 측정했습니다. 각 온도 상승에서 측정된 용융점은 모두 $\pm 0.2^\circ\text{C}$ 이내였습니다. 이 수준의 재현성은 실험실이 $0.5^\circ\text{C}/\text{분}$ 의 표준 프로토콜보다 빠른 승온 속도를 사용할 수 있으며, 이를 통해 결과 품질의 저하 없이 실험 시간을 현저하게 단축할 수 있음을 의미합니다. 연구는 이전에 2.5시간 걸렸던 실험이 Cary 3500 UV-Vis을 사용할 경우 약 10분만에 측정될 수 있음을 증명하였습니다.

Cary 3500 UV-Vis의 8개 포지션 멀티셀은 최소 3개의 복제 시료 및 참조 시료를

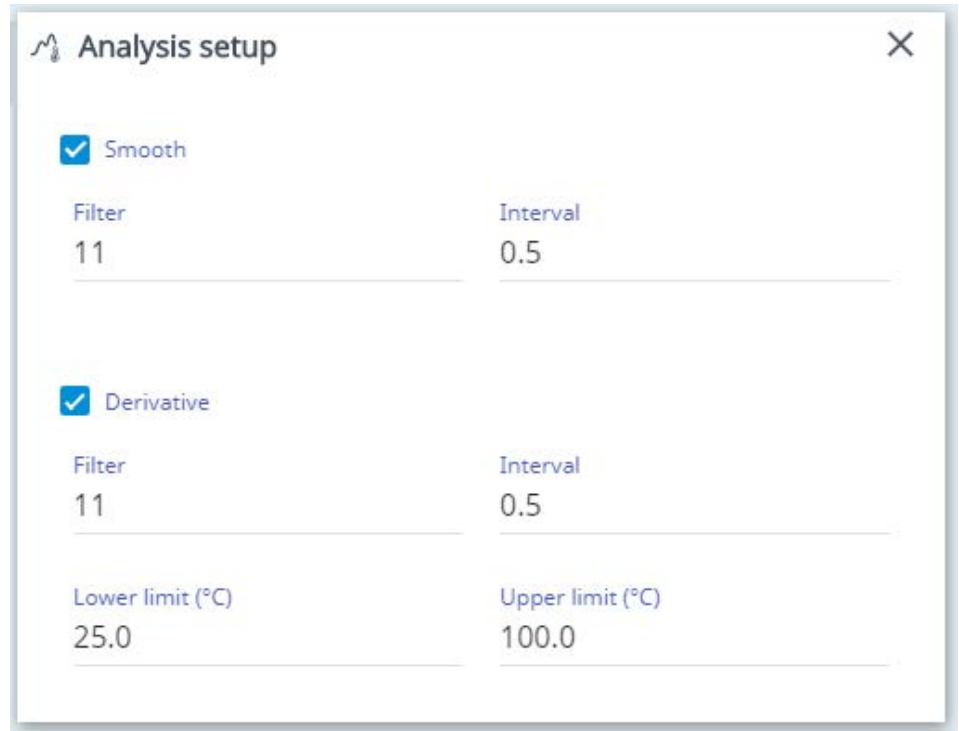


그림 4. Agilent Cary UV Workstation 내장 평활화 및 미분 계산기.

동시에 측정할 수 있도록 하였으며, 이 또한 전체 실험적 측정 시간을 단축하는 효과를 가져왔습니다.

Agilent Cary UV Workstation 소프트웨어에는 DNA 용융점 계산을 위한 내장 기능(평활화 및 미분)이 있으며, 이는 실행 가능 결과를 빠르게 제공합니다. 분석법에 저장 가능한 이러한 계산은 데이터 수집 후에 자동으로 적용되고 표시됩니다.

빠른 승온 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 기능은 다른 실험적 변수가 없는 온도 변화에 대한 액체 시료의 반응 연구에 대해, 이에 관심 있는 실험실의 생산력을 추가로 향상시킵니다.

Cary UV Workstation 소프트웨어는 또한 Agilent OpenLab 소프트웨어와 통합이 가능합니다. OpenLab은 데이터 수집, 처리, 보고, 저장을 안전하게 할 수 있는 기술적 제어를 제공합니다. 이러한 제어는 FDA 21 CFR 파트 11, EU Annex 11, GAMP5, 그리고 ISO/IEC 17025 및 EPA 40 CFR 파트 160의 규제를 준수해야 하는 실험실에 반드시 필요합니다.

참고 문헌

1. Shen, C-H. *Diagnostic Molecular Biology*, Chapter 7 - Detection and Analysis of Nucleic Acids, Academic Press: 2019; pp 167–185.
2. Chetana, P. R. *et al.* New Ternary Copper(II) Complexes of L-Alanine and Heterocyclic Bases: DNA Binding and Oxidative DNA Cleavage Activity. *Inorganica Chimica Acta* **2009**, *362*, 4692–4698.
3. Rao, R.; Patra, A. K.; Chetana, P. R. Synthesis, Structure, DNA Binding and Oxidative Cleavage Activity of Ternary (L-leucine/isoleucine) Copper(II) Complexes of Heterocyclic Bases. *Polyhedron* **2008**, *27*, 1343–1352.
4. Davis, T. M. *et al.* Melting of a DNA Hairpin Without Hyperchromism. *Biochem.* **1998**, *37(19)*, 6975–6978.
5. Savitzky, A.; Golay, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedure. *Anal. Chem.* **1964**, *36*, 1627-39.

www.agilent.com

DE80572371

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
2022년 8월 15일, 한국에서 발행
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