

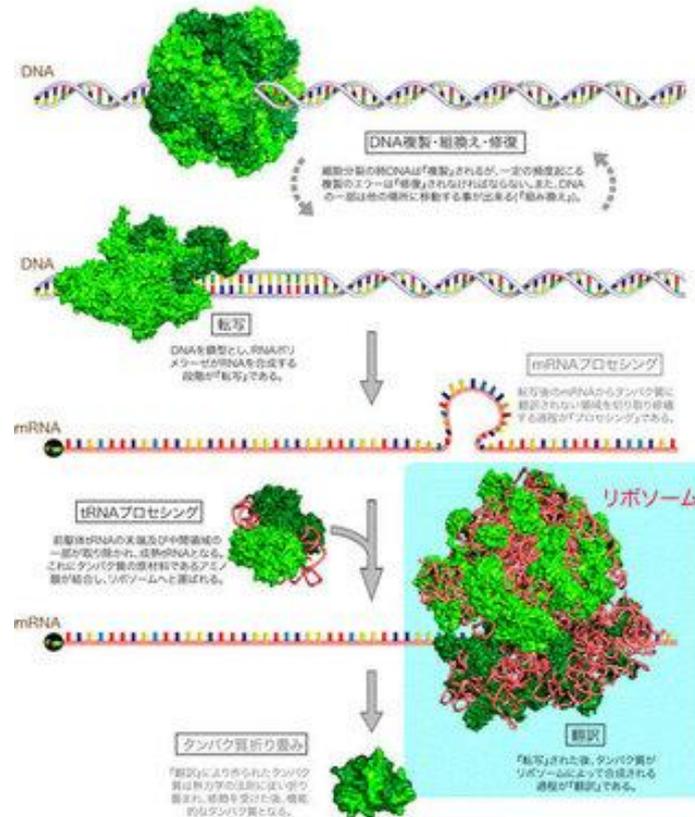
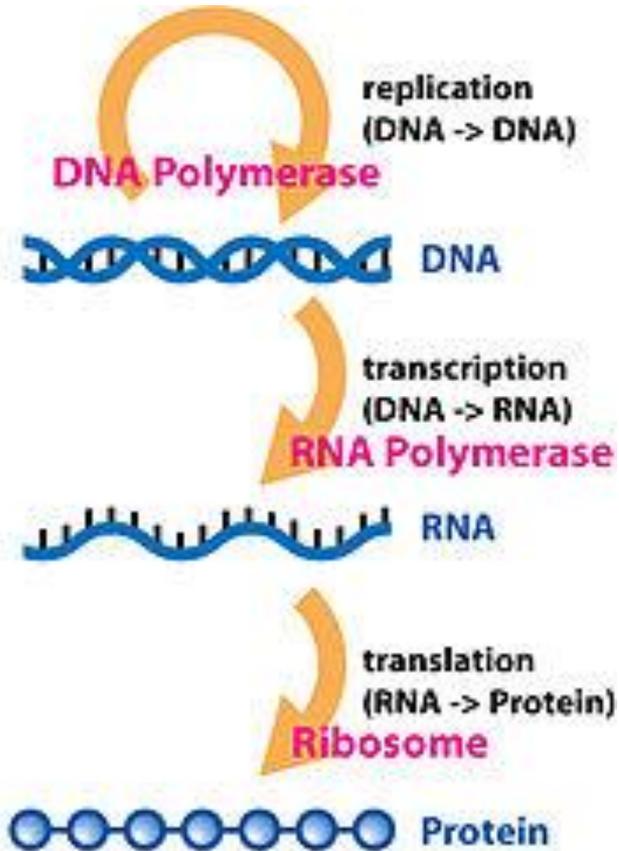
バイオ分析化学特論(4)

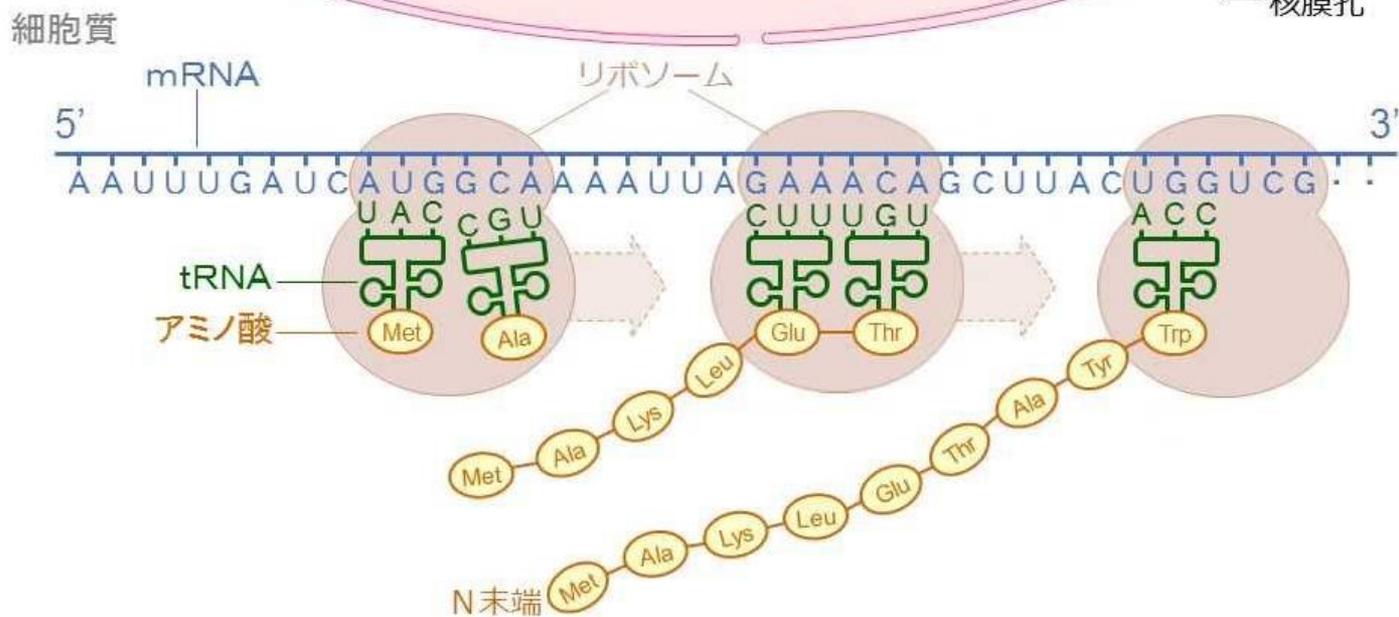
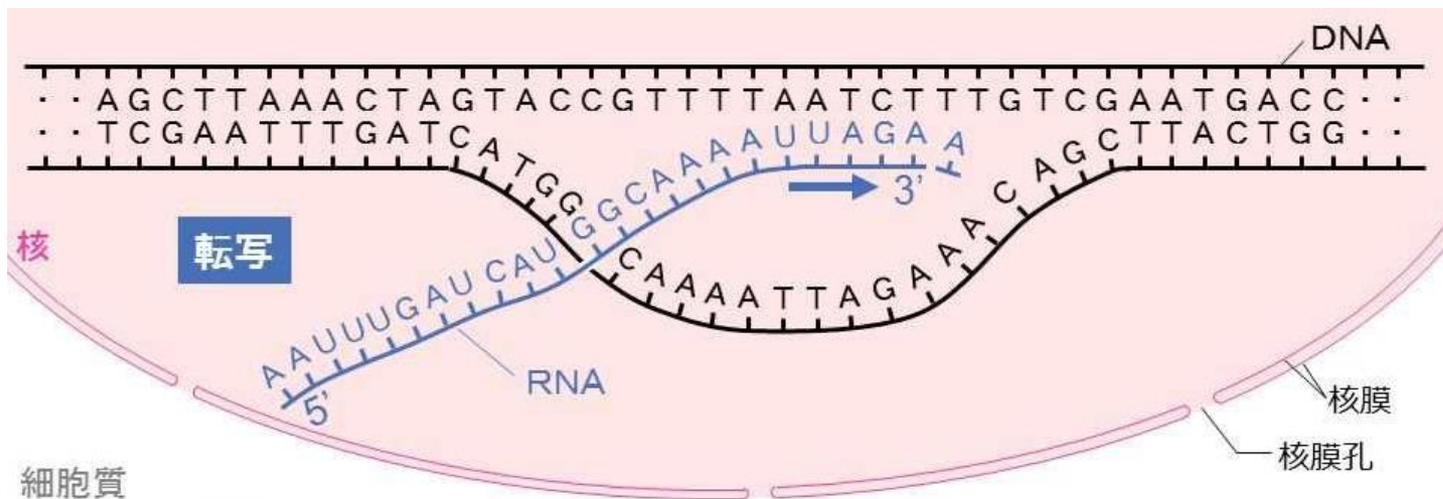
融解温度 T_m 測定

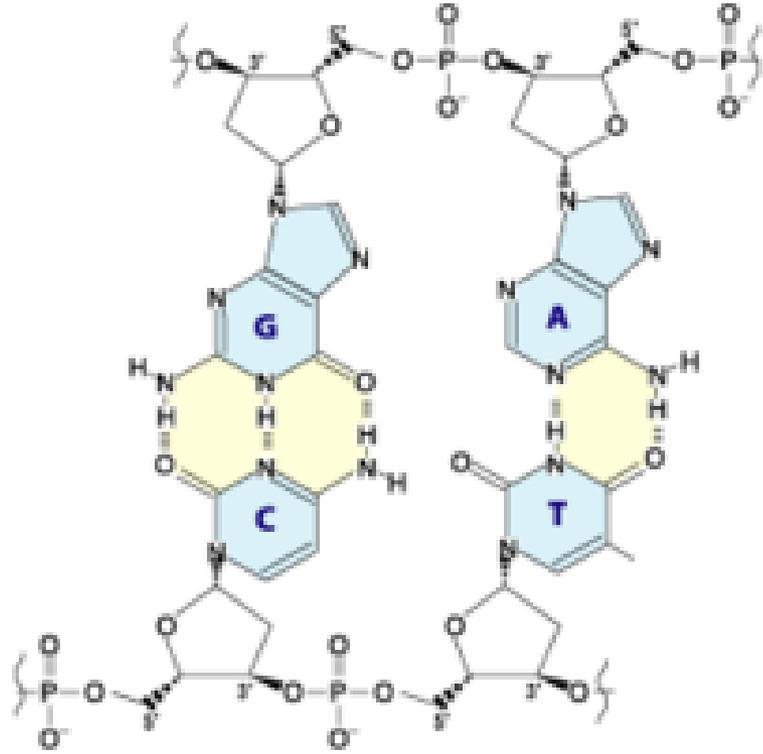
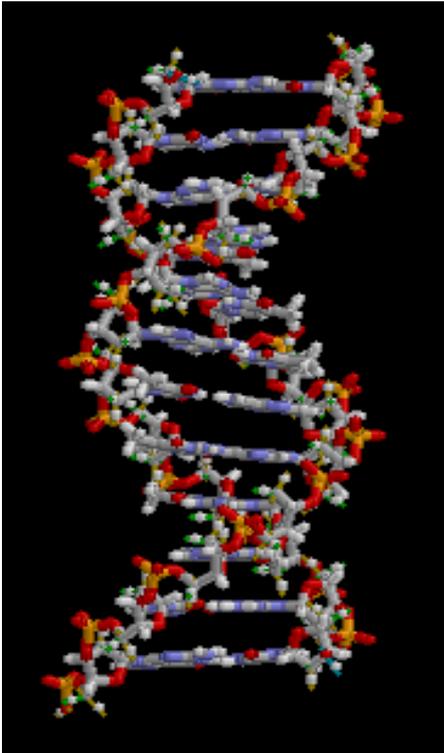
竹中繁織

九州工業大学 物質工学研究系 応用化学部門

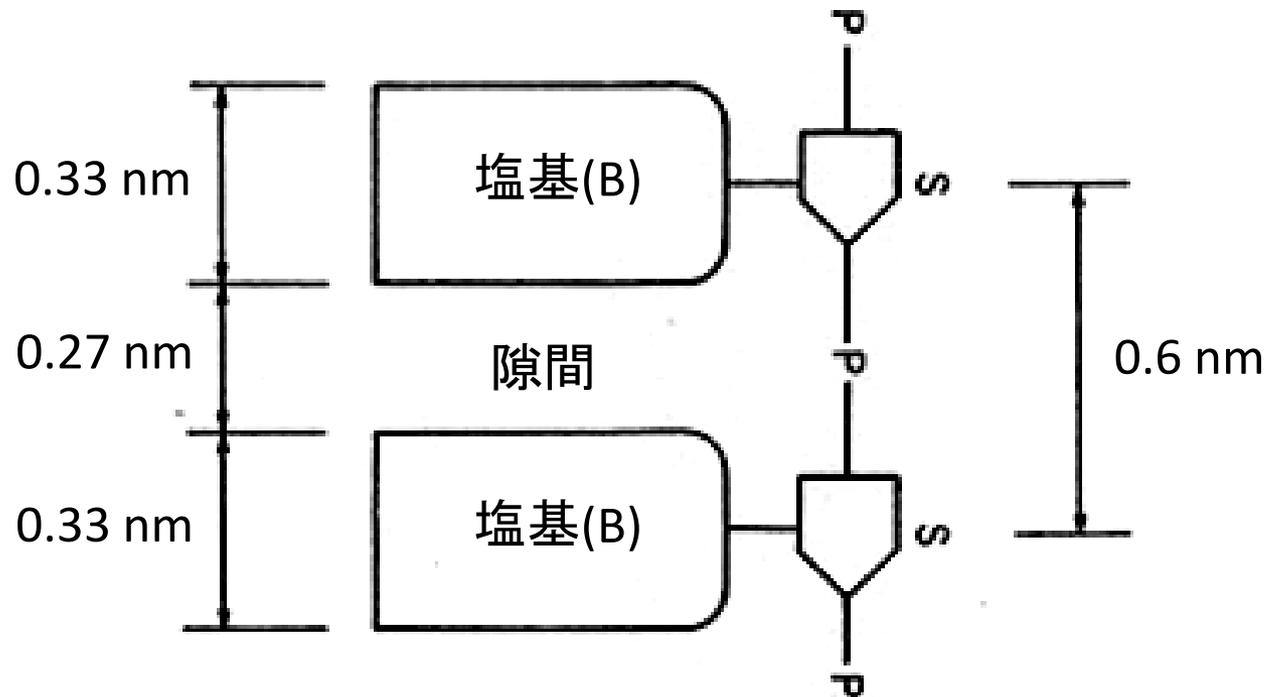
セントラルドグマ(central dogma)

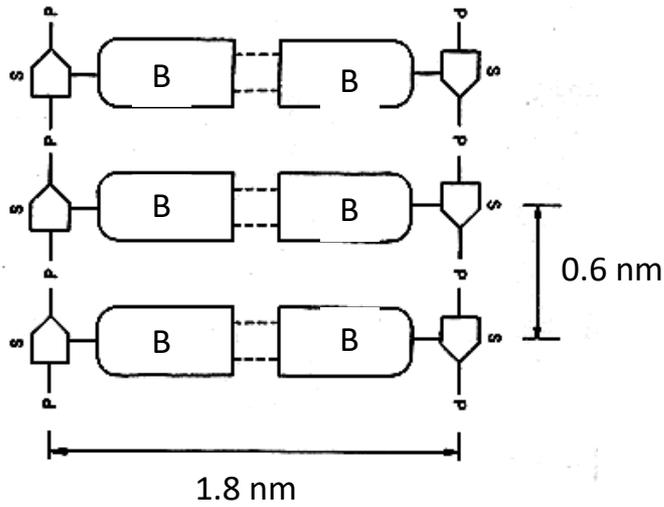




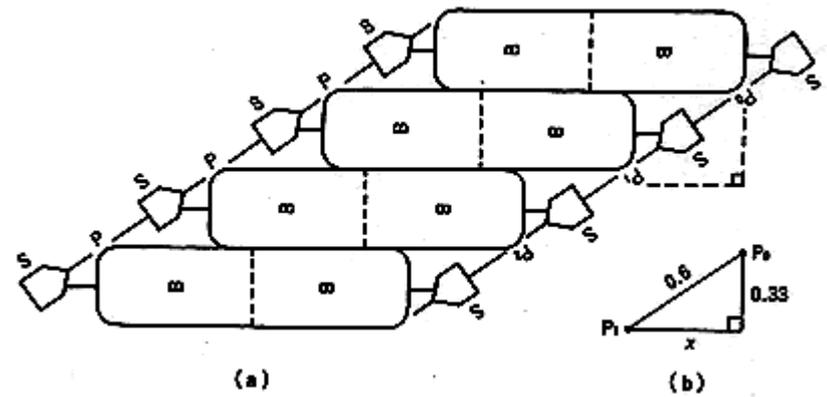


2つのヌクレオチドの大きさ

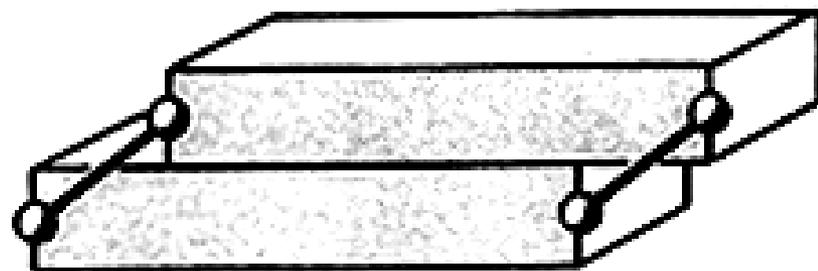




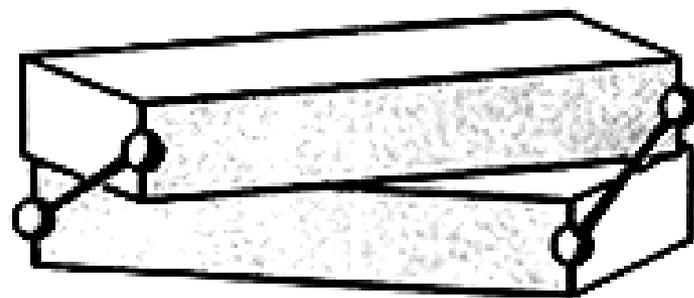
塩基が会合してできたDNAのはしご



(a)塩基対間の隙間をなくした傾いたはしご、
 (b)aのはしごから直角三角形を抜き出す。

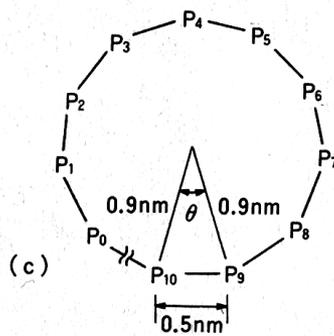
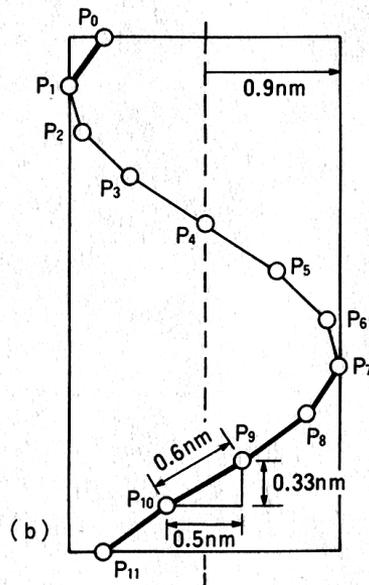
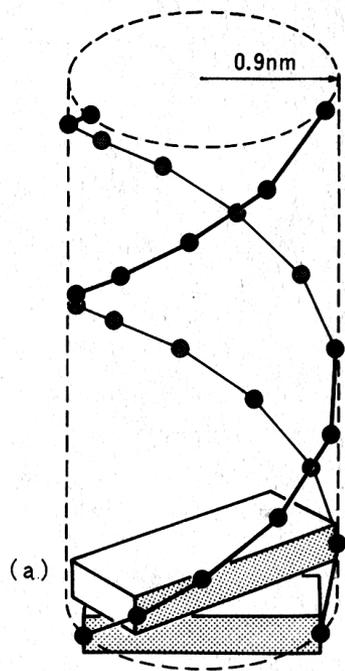


(a)



(b)

- (a) 傾いたはしごと同じ塩基対の積み重ね、
(b) ねじれらせんの型に塩基対を積み重ねたもの。



円筒まわりに糖とリン酸の鎖がらせん状に巻き付いたところ。

(a) 黒い点または灰色の点は糖を、点と点をつなぐ線はリン酸を示す。

(b) 白い点はリン酸を、線は糖を示す。

(c) 円筒を上から見下ろしたところ。

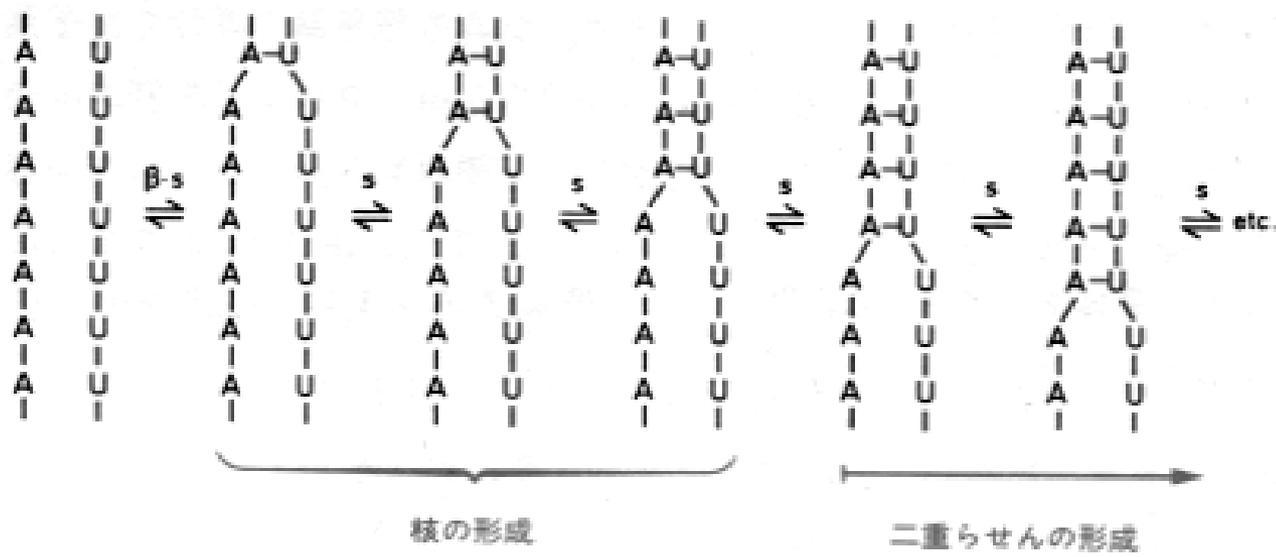
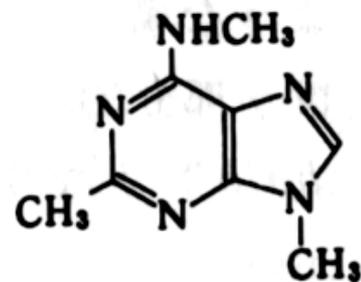
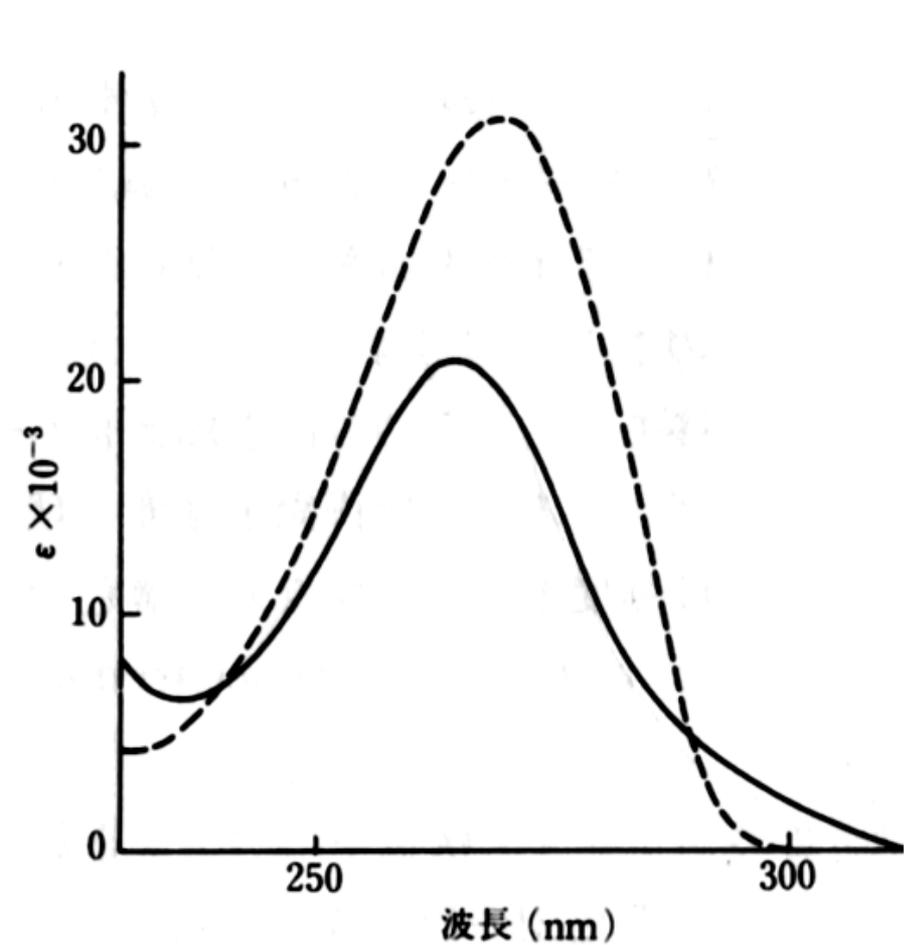
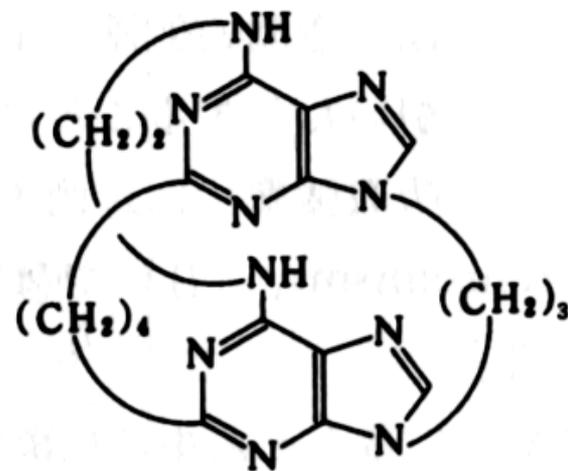


図 6.11 oligo(A)・oligo(U)の場合の、二重らせん形成の図解。この系では、らせん成長パラメータ s は 0°C で約 10 であり、融解温度で 1 である。核形成パラメータ β は 10^{-3}l/mole で、安定化定数 $K = \beta \cdot s$ で表される最初の塩基対形成を不安定にするが、それ以上の塩基のスタッキングには影響せず、スタッキングは協同的に $K = s$ で形成され、線形 Ising 模型にしたがう。塩基のスタッキングに対するイソデスミックモデル (図 6.9) では各段階は互いに独立しているのに対し、Ising 模型で記述される協同的過程では、塩基対の形成とスタッキングはごく最初の塩基-塩基会合の場合以外は、隣の塩基対の影響を受ける。[544]より。



68a



68

図 3.46 **68** の淡色効果 (実線). 破線は **68a** (**68** の 2 倍量). エタノール中

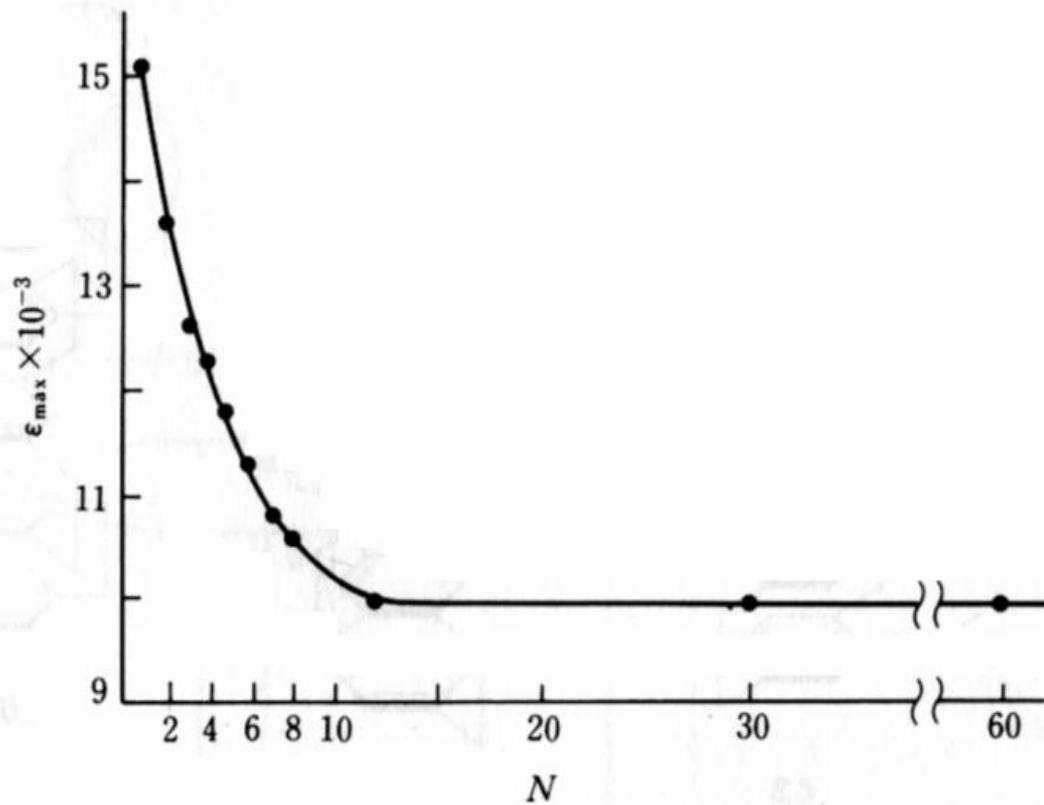
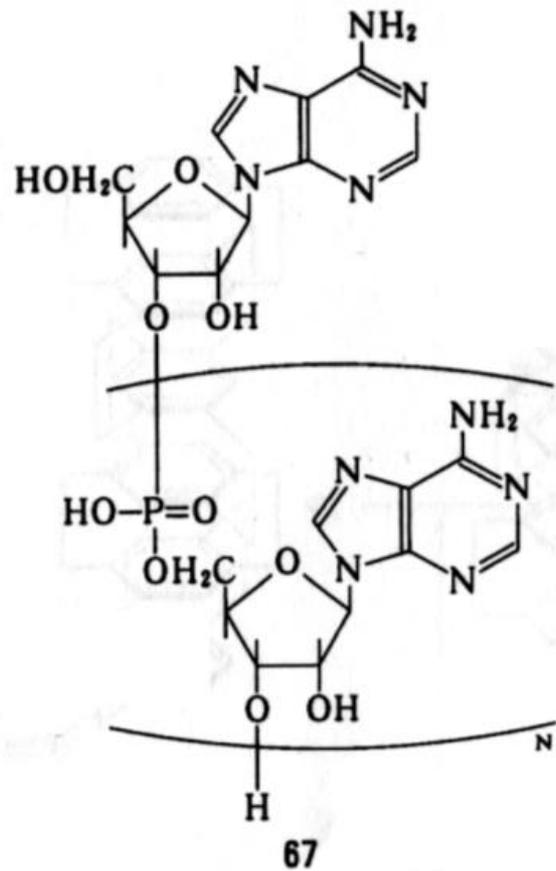


図 3.45 ポリアデニル酸 **67** における重合度 N と淡色効果との関係

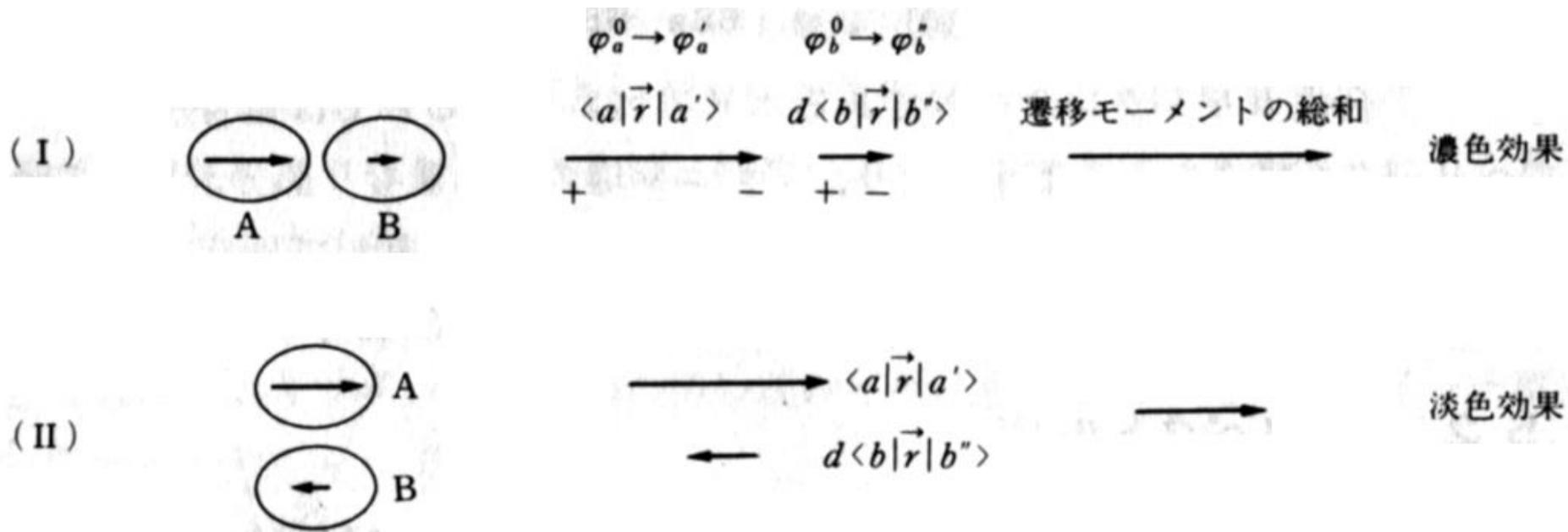


図 3.44 発色団の空間配置と濃色 (I), 淡色 (II) 効果

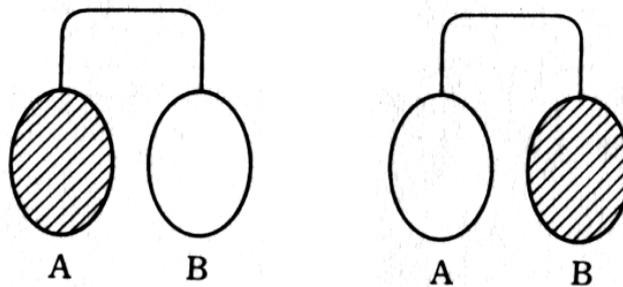


図 3.41 分子集合体の励起状態の概念図

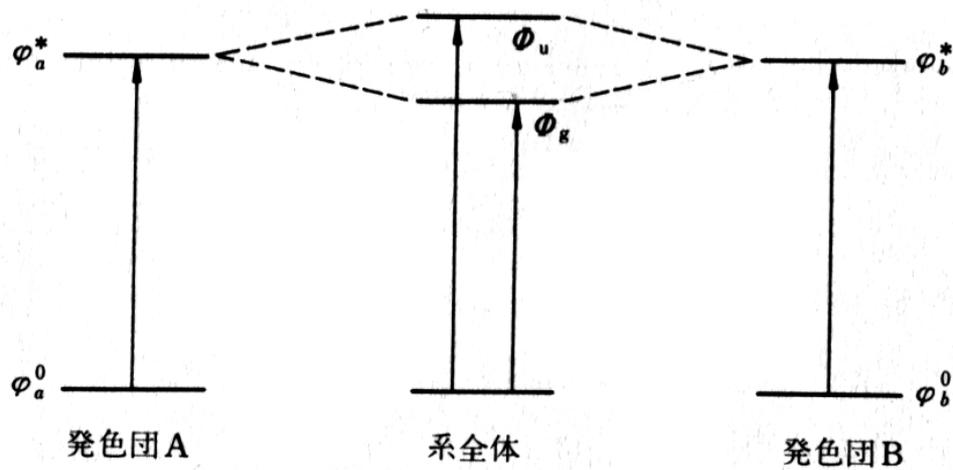
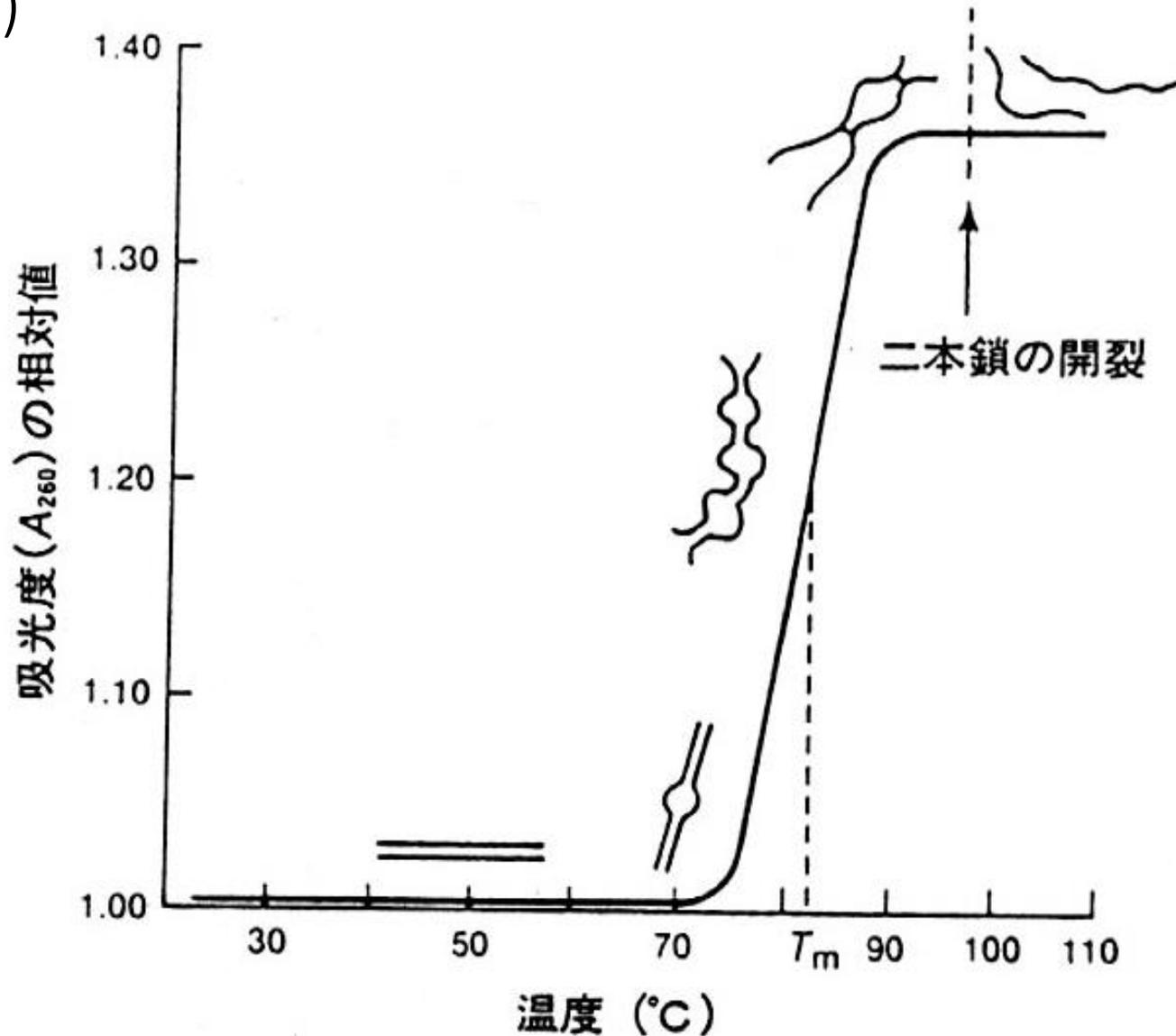


図 3.42 Davidov 分裂の概念図

DNAの変性(融解)曲線(Melting curve)と融解温度(T_m)



T_mとは？

DNAは通常、二本鎖らせん構造を取っています。

センス鎖、アンチセンス鎖の相補的塩基(アデニンとチミン、シトシンとグアニン)は水素結合によって対をなしています。

二本鎖DNAの溶液を加熱すると、この水素結合が切断され一本鎖となります。

この現象を核酸の融解(Melting)と呼び、DNA分子の50%が変性して一本鎖となる温度が融解温度、すなわちT_m(Melting Temperature、融解温度)です。

T_mでは、二本鎖と一本鎖の存在する割合が等しくなります

核酸の場合、T_mとなる温度は配列や溶媒をはじめとする周囲の環境によって変わります。一般的にT_mの数値(T_m値)は、以下のように変化します。

塩濃度が高いとT_m値は上がる

核酸の濃度が高いとT_m値は下がる

配列のGC含量が高いとT_m値は上がる(アデニン／チミン間の水素結合は2本、シトシン／グアニン間の水素結合は3本)

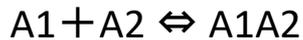
変性剤(ホルムアミド、DMSOなど)存在下ではT_m値は下がる

Tm値と各熱力学パラメーターの関係

核酸の熱安定性については、Tm値の他、エンタルピー変化(ΔH)、エントロピー変化(ΔS)、自由エネルギー変化(ΔG)で評価されます。熱力学において自由エネルギー変化(ΔG)は、温度T(絶対温度)を用い、以下のように定義されています。

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

核酸溶液中では、2つの異なる一本鎖(A1, A2)と二本鎖(A1A2)の間には平衡関係が成立しており、A1、A2の濃度は等しいと仮定します。



二本鎖の状態と一本鎖の状態の2つの状態のみで系が構成されており、温度の上昇に伴ってこの2つの状態の自由エネルギー差が変化し、1種類の平衡定数のみが存在することになります。

二本鎖の状態と二本鎖の状態の間の自由エネルギー変化(ΔG)は以下の式によって表すことができます。

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K \dots (1)$$

(R: 気体定数、ln: 自然対数、K: 平衡定数)

平衡定数は、系の平衡状態を物質の存在比で表したものですので、二本鎖の状態が核酸分子全体に占める比率を[N]、一本鎖の状態が占める比率を[D]とすると、平衡定数Kは以下のように表すことができます。

$$K = [D]/[N] \dots (2)$$

ここで、二本鎖のモル分率を α 、核酸の総濃度をCtとすると平衡定数Kは以下のように表すことができます。

$$K = [D]/[N] = 2\alpha / ((1-\alpha)^2 \times Ct) \dots (3)$$

Tm値では二本鎖と一本鎖の占める割合が等しくなり、この温度では二本鎖のモル分率 α は1/2になりますので、(3)式を(1)式に代入し、 $\alpha=1/2$ を適用すると以下の式を得ることができます。

$$1/T_m = (R/\Delta H) \ln(Ct/4) + \Delta S/\Delta H$$

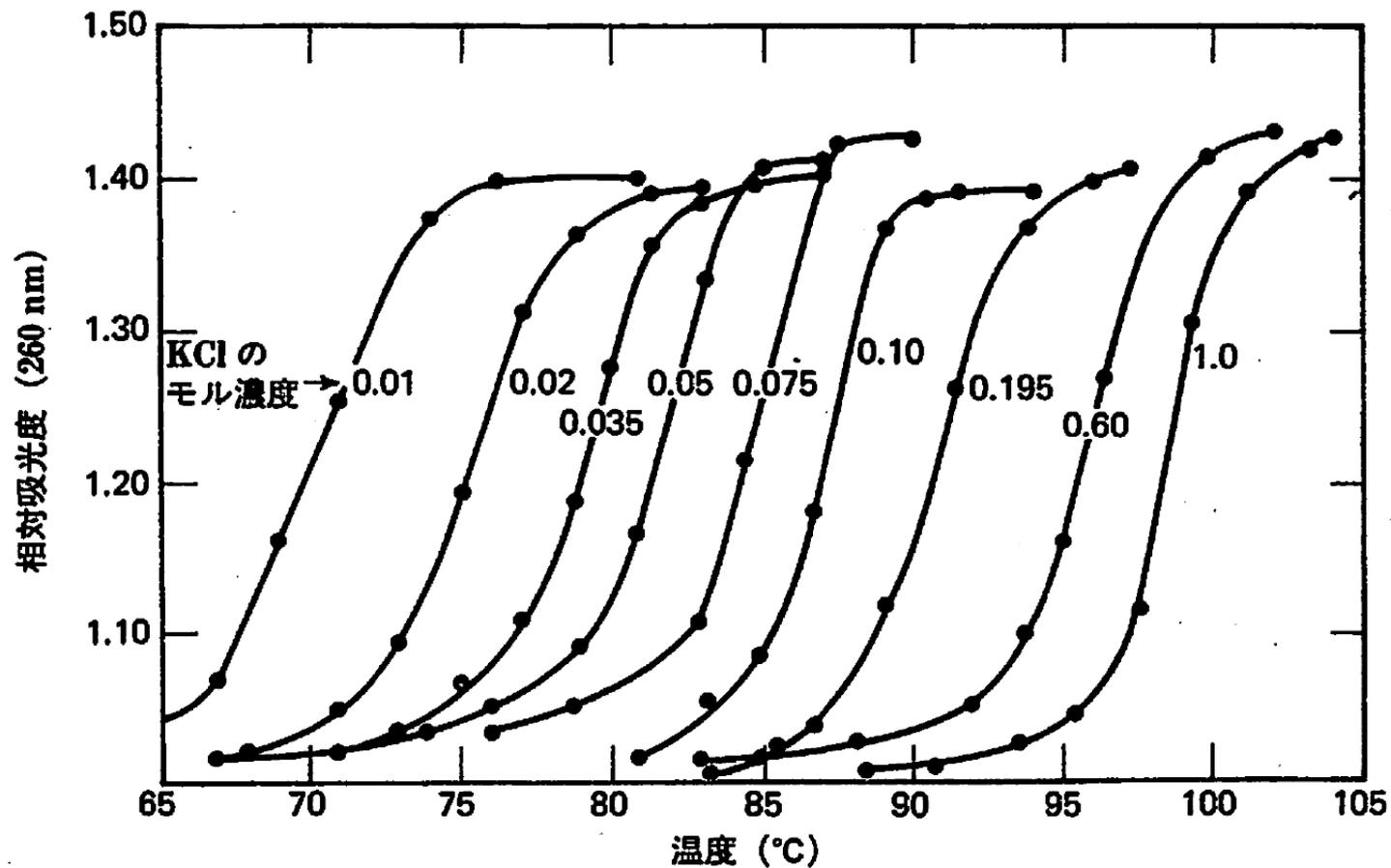


図 6.16 *D. pneumonia* (R-36A) DNA の熱変性のイオン強度依存性. クエン酸緩衝液 pH 7.0 で KCl 濃度を
 変化させてある. [549]より.

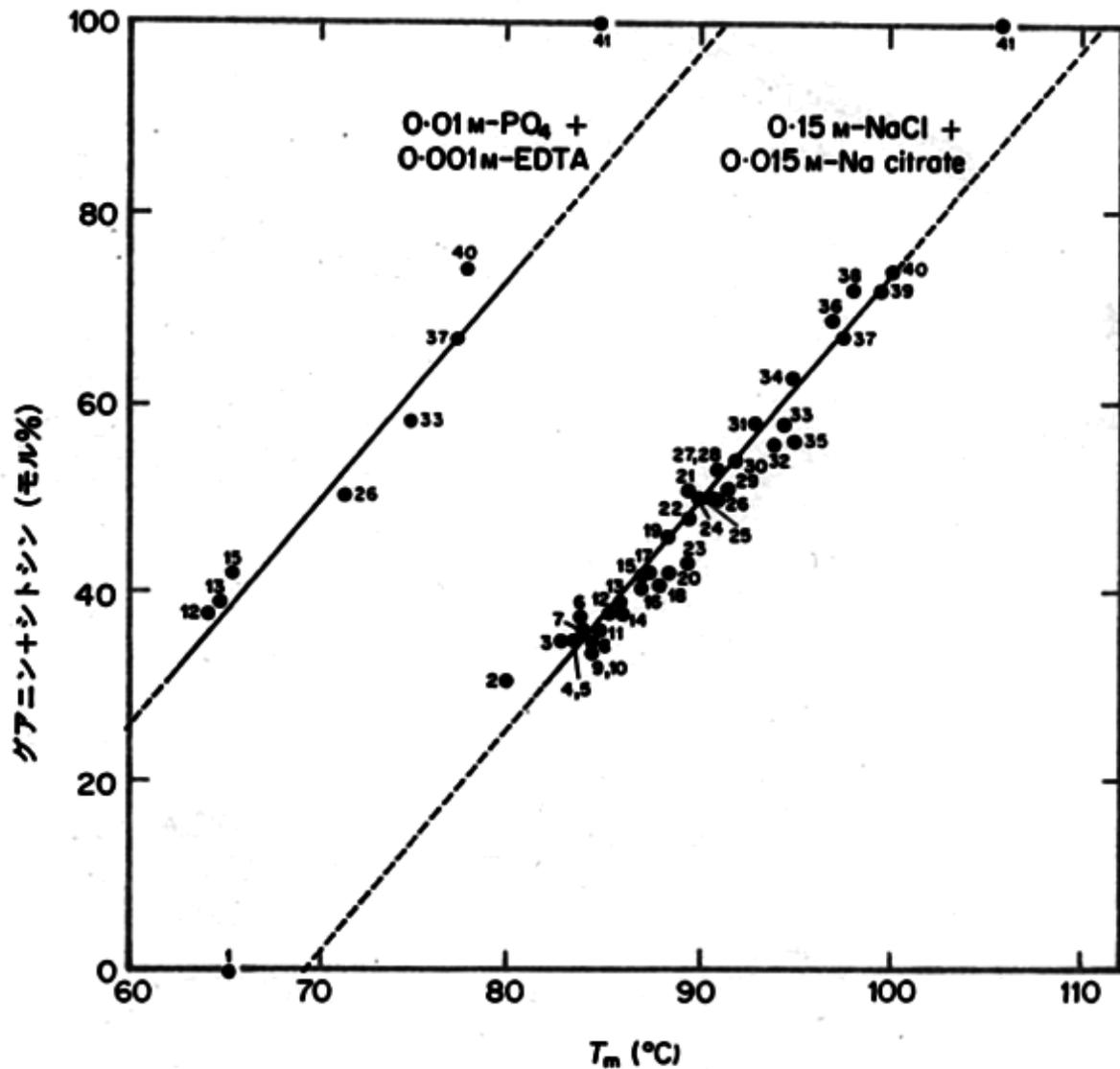


図6.17 いろいろな種から得たDNAのグアニン+シトシン (G+C) 含量に対する融解温度 T_m の依存性。DNAは0.15 M NaCl + 0.015 M Na-クエン酸 pH 7.0 に溶けている。点1は poly(dA-dT), 点41は poly(dG-dC) であり、解析的に $T_m = 69.3 + 0.41 (\% \text{GC})$ で示される最小2乗法の線からはずれている。[549]より。

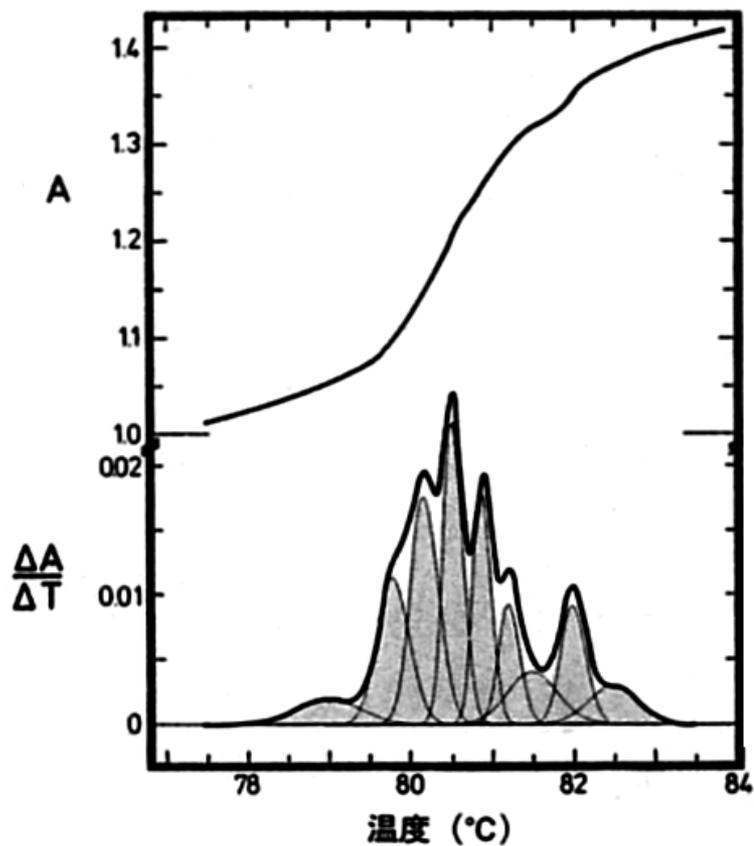


図 6.19 DNA の融解曲線(上)とその一次微分 dA/dT (下).
 微分曲線は, 温度, 強度, 幅で特徴づけられる 9 つのピーク
 に分けられている. A は 260 nm の UV 吸収を示し, dA/dT
 すなわち $\Delta A/\Delta T$ は, 温度差 T に関する 1 次微分であ
 る. ピークの曲線は計算により得られている. 具体的なデー
 タについては [557] を見よ.

表 6.9 塩基配列から予測された DNA 二重らせんの安定性 ([555] より)

(A) B-DNA 構造での塩基対ジククレオチド中の隣接スタッキングの安定性行列^a

5'	3'			
	A	T	G	C
T	36.73	54.50	54.71	86.44
A	54.50	57.02	58.42	97.73
C	54.71	58.42	72.55	85.97
G	86.44	97.73	85.97	136.12

^a 数字は 19.5 mM Na⁺中での T_m 値を℃で示してある。

(B) 一定の配列をもった合成 DNA ポリマーに対する安定性行列による T_m 値の予測

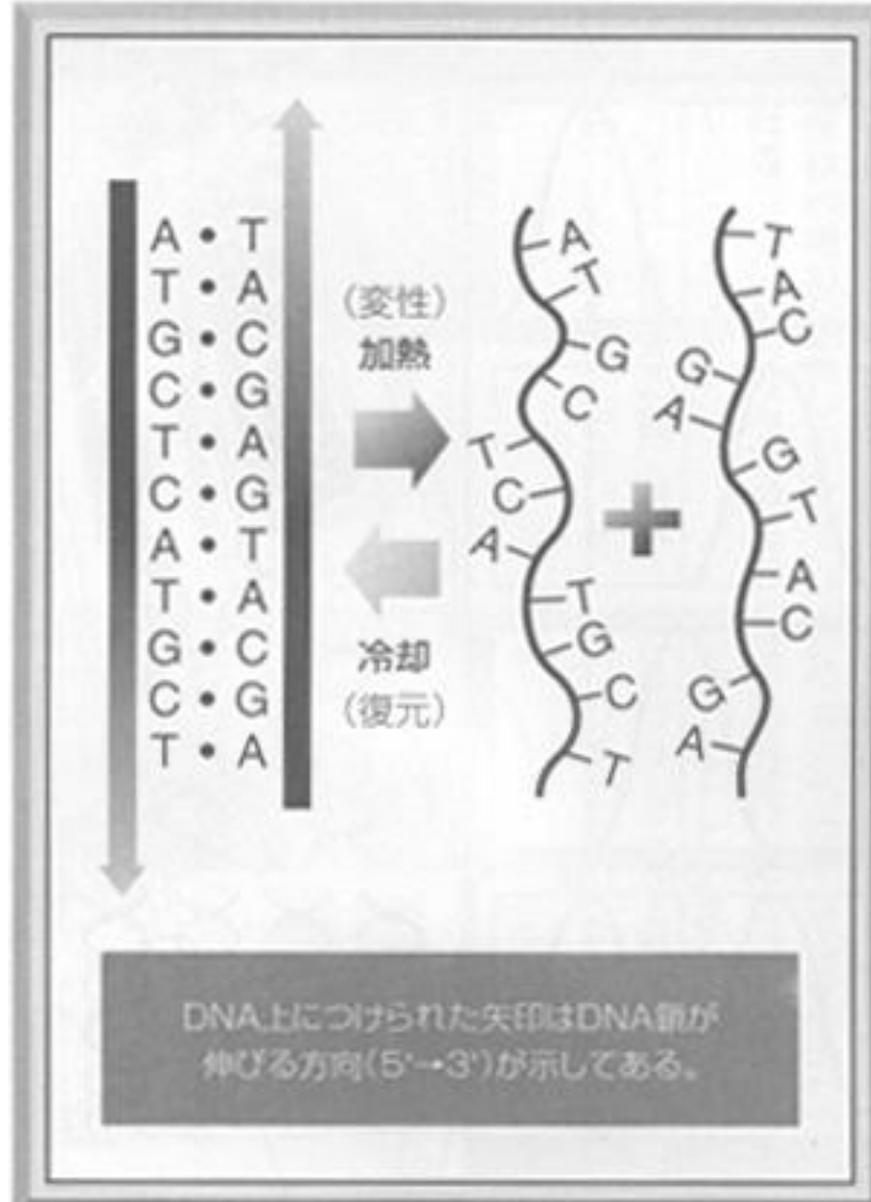
ポリヌクレオチド	T_m (°C)		
	実験値 ^a	計算値 ^b	差 ^c
Poly(dA-dT)·poly(dA-dT)	45.0	46.9	-1.9
Poly(dA-dA-dT)·poly(dA-dT-dT)	49.2	49.4	-0.2
Poly(dA)·poly(dT)	53.0	54.5	-1.5
Poly(dG-dA-dA)·poly(dT-dT-dC)	64.5	66.5	-2.0
Poly(dG-dT-dA)·poly(dT-dA-dC)	66.8	64.3	2.5
Poly(dA-dA-dC)·poly(dG-dT-dT)	70.2	69.0	1.2
Poly(dG-dA)·poly(dT-dC)	71.3	72.4	-1.1
Poly(dG-dA-dT)·poly(dA-dT-dC)	72.0	66.1	5.9
Poly(dG-dG-dA)·poly(dT-dC-dC)	76.3	76.9	-0.6
Poly(dG-dT)·poly(dA-dC)	77.4	76.2	1.2
Poly(dG)·poly(dC)	87.8	86.0	1.8
Poly(dG-dC)·poly(dG-dC)	99.2	104.3	-5.1

^a 種々のイオン強度での融解温度の実験を 19.5 mM Na⁺ に外挿した。

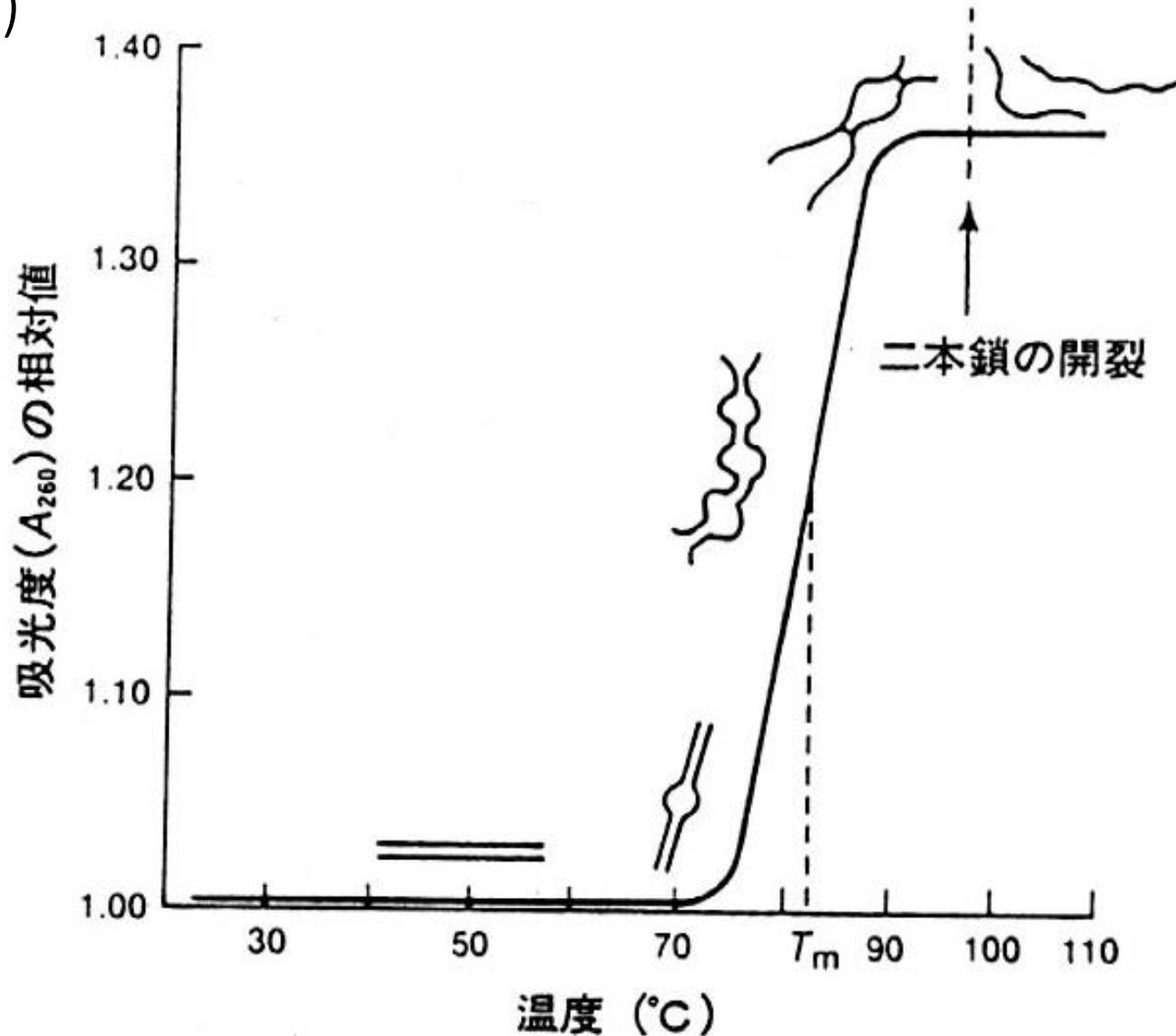
^b 各ポリマー中の隣接頻度と表 6.9 (A) の値から計算した。

^c T_m (実験値) - T_m (計算値)。

DNAの変性と復元が遺伝子検出に重要



DNAの変性(融解)曲線(Melting curve)と融解温度(T_m)



遺伝子をどのように検出するか

DNAプローブ法とハイブリダイゼーション

