

1 目的

以前の実験で調整したプラスミド DNA について、溶液の pH や温度を変化させた際の紫外吸収スペクトルを測定することにより、DNA の物理化学的な性質を理解する。

2 原理

DNA は 2 本鎖で安定な二重らせん構造を形成している。この構造には塩基対があり、アデニン、チミン、シトシン、グアニンからなる。温度を上げたり、pH を変化させたりすることで DNA は 1 本鎖に変性するが、グアニンとシトシンが 3 つの水素結合を持っているのに対し、アデニンとチミンは 2 つの水素結合を持っているため、グアニンとシトシンの結合より弱く、変性しやすい。この特性から、グアニンとシトシンの結合の割合が分かれば変性のしやすさもわかる。

3 実験操作

3.1 使用器具、機器

- ・ サンプルチューブ(1.5mL)
- ・ 分光光度計
- ・ アルミブロック
- ・ グラフ用紙
- ・ ピペットマン(20 μ L、200 μ L、1000 μ L)
- ・ ピペットマン用イエローチップ(20 μ L、200 μ L)、ブルーチップ(1000 μ L)
- ・ 卓上遠心分離機
- ・ 石英キュベット
- ・ pH 試験紙
- ・ ピペットマンチップ回収用ビーカー

3.2 試薬

- ・ NaCl-クエン酸ナトリウム水溶液
150mM NaCl
15mM クエン酸ナトリウム(pH7.0)
- ・ 塩酸溶液
1M 塩酸
- ・ 水酸化ナトリウム
1M 水酸化ナトリウム

3.3 DNA 紫外吸収スペクトルの pH 変化測定の実験操作

- ①DNA 溶液を $5\mu\text{L}$ ずつサンプルチューブ 3 本に移し、NaCl-クエン酸ナトリウム溶液を $995\mu\text{L}$ で希釈した。
- ②DNA 溶液が残り $10\mu\text{L}$ もなかったため、DNA 溶液が入っているサンプルチューブに NaCl-クエン酸ナトリウム溶液を $990\mu\text{L}$ 加え、希釈した。
- ③3 本のサンプルチューブそれぞれに塩酸溶液、NaCl-クエン酸ナトリウム溶液、水酸化ナトリウム溶液を $100\mu\text{L}$ ずつ入れた。
- ④各サンプルチューブから $20\mu\text{L}$ ずつとり、pH を pH 試験紙を用いて確認した。
- ⑤各サンプルを石英キュベットに 1mL 入れ、紫外吸収スペクトルを $320\text{nm}\sim 240\text{nm}$ の範囲で測定した。

3.4 DNA 紫外吸収スペクトルの温度依存測定の実験操作

- ⑥②で作成した DNA サンプルを石英キュベットに移して密閉し、まず室温での A_{260} を測定した。
- ⑦キュベットを 50°C のアルミブロックに 3 分以上置いた後、 A_{260} と A_{320} を測定した。
- ⑧キュベットをアルミブロックに戻して 60°C になるまで加熱し、 60°C で 3 分置いた後、 A_{260} と A_{320} を測定した。
- ⑨同様に 70°C 、 80°C 、 90°C 、 100°C 、 110°C でも測定を行った。
- ⑩キュベットを室温になるまで放置した後、 A_{260} と A_{320} を測定した。
- ⑪熱処理前の DNA 溶液の $(A_{260} - A_{320})$ を 1 とし、熱処理後 DNA 溶液の $(A_{260} - A_{320})$ の変化を温度に対してプロットし、熱変性の温度 T_m を求めた。

4 実験結果

4.1 DNA 紫外吸収スペクトルの pH 変化

pH 試験紙の色の変化は次の図 1、図 2 のようになった。ここから得られた、pH の値を表 1 にまとめた。

表 1. pH の値

加えた溶液	塩酸溶液	NaCl-クエン酸ナトリウム溶液	水酸化ナトリウム溶液
pH	1	6	13



図1 pH試験紙 その1



図2 pH試験紙 その2

4.2 DNA 紫外吸収スペクトルの温度依存

測定した吸光度は、次のグラフのようになった。

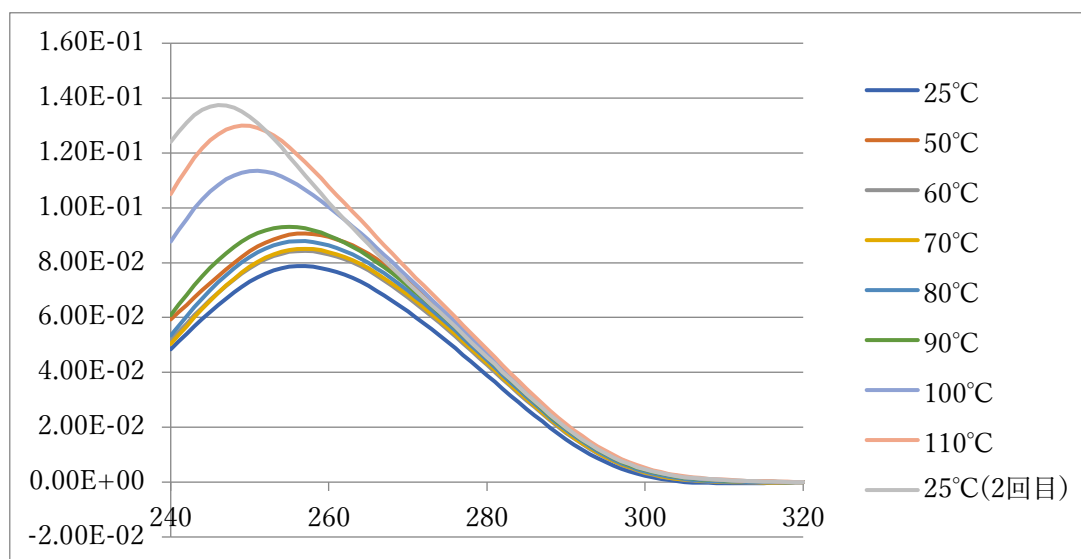


図3. 吸光度の温度変化

教員に見ていただいたところ、50°C、100°C、110°C、2回目の25°Cのデータは悪いので、これらのデータは除いて考慮した方が良いというアドバイスをいただいたので、そのようにした。

残りの25°C、60°C、70°C、80°C、90°Cの吸光度の変化を温度に対してプロットしたグラフを図4としてこのレポートの末尾に添付した。これより読み取ると、熱変性の温度 T_m は65°Cと導くことができた。

5 考察

5.1 DNA 紫外吸収スペクトルの pH 変化

酸性にしたとき、スペクトルのピークは中性のときの 257nm から 223nm へ変化し、吸光度は約 30 倍になった。塩基性にしたときは、スペクトルのピークは 257nm から 260nm に変化し、吸光度は約 2 倍になった。

これは、ウリジン(ウラシルのヌクレオチド名)、チミジン(チミンのヌクレオチド名)、グアノシン(グアニンのヌクレオチド名)の pK がアルカリ側に存在することから、pH が塩基性になると脱プロトン化がはじまり、水素結合が壊れて 1 本鎖 DNA に変性しスペクトルが変化したと考えられる。酸性化したときも同様に考えられる。

5.2 DNA 紫外吸収スペクトルの温度依存

DNA の吸光度は、温度上昇とともにあがった。これは、温度上昇によって DNA の塩基同士の水素結合がとれて一本鎖になり、これが二本鎖であるときよりも高い吸光度を示すからであると考えられる。つまり、25℃～90℃まではきちんと二本鎖が崩れ、一本鎖に変性できていたと考えられる。

調べたところ、温めた DNA 溶液を冷却して元の常温に戻すと、構造も二重らせん構造に戻るらしい。よって吸光度も元の大きさくらいに戻るはずなのであるが、そうはならなかった。原因として、90℃以降の温度上昇で DNA 構造が完全に壊れてしまったか、それとも用いた DNA の量が少なかったか、一本鎖同士でまた結合を作り二本鎖に戻ることができなかったためであると考えられる。

5.3 %GC 含量について

DNA 試料の %GC と T_m の関係は次のように表される。

$$\%GC = 2.44(T_m - 69.3)$$

実験に用いたプラスミド pBR322DNA は %GC 含量が 53.3%であるので、この式より、91.1℃と求められた。測定により導けた T_m は 65℃であった。理論値と測定値で大きな誤差がでてしまった。

原因は、5.2 でも述べたように、90℃以降の温度上昇で DNA 構造が完全に壊れてしまったか、それとも用いた DNA の量が少なかったことが考えられる。また、それぞれの温度において DNA の変性の順調具合が違ったため、また温度の読み取りに誤差があったと思われる。

6 参考 HP

- https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/8904/8904_yomoyama_2.pdf
- <http://blog.livedoor.jp/garjyusaiga/archives/52289466.html>