

# Erzielung schnellerer Anstiegsraten für thermische Schmelzexperimente

Das gleiche Ergebnis wurde mit dem Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometer unabhängig von der Anstiegsrate erzielt



## Autoren

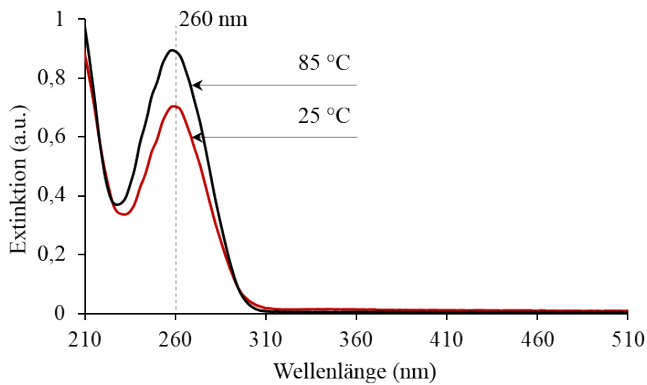
Kevin Grant und Matt Quinn

Agilent Technologies,  
Australien

## Einleitung

Die Trennung doppelsträngiger Nucleinsäuren in ihre Einzelstränge kann durch die Erhöhung der Temperatur induziert werden. Ab einer gewissen Temperatur bricht die Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Basenpaaren. Ein thermisches Schmelzexperiment nutzt den Unterschied in der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenosin zu Thymin (A=T) und Guanin zu Cytosin (G=C) Nucleotiden bei DNA oder zwischen Adenosin zu Uracil (A=U) und G zu C bei RNA. Da die G=C-Nucleotide drei Wasserstoffbrückenbindungen enthalten, ist die zur Dissoziation erforderliche Wärmeenergie größer als die der doppelt gebundenen Paare. Das bedeutet, dass DNA und RNA mit mehr G=C-Paaren bei höheren Temperaturen schmelzen. Die Schmelztemperatur (melting temperature,  $T_m$ ) liefert einen genauen Hinweis auf die Basenzusammensetzung (Verhältnis von G=C zu A=T / U=T) in der Probe.

Der Schmelzpunkt wird mittels UV-Vis-Spektralphotometrie gemessen, wobei ausgenutzt wird, dass bei 260 nm die Extinktion von Nucleinsäure-Einzelsträngen höher ist als für doppelsträngige Nucleinsäuren (1). Abbildung 1 zeigt als Beispiel hierfür die Probe einer kurzen interferierenden RNA (siRNA): Die Extinktion bei 260 nm ist bei 85 °C deutlich höher als bei 25 °C.



**Abbildung 1.** UV-Spektren einer siRNA-Probe bei 25 °C (rot) und 85 °C (schwarz).

Thermische Schmelzexperimente werden typischerweise durchgeführt, indem die Extinktion bei 260 nm gemessen wird. Die Temperatur der Probe wird dann allmählich unter kontrollierten Bedingungen für pH-Wert und Ionenstärke erhöht. Die Temperatur wird in der Regel um 0,5 °C pro Minute erhöht (2, 3, 4). Diese sehr langsame Anstiegsrate der Temperatur ist erforderlich, um genaue und reproduzierbare Daten sicherzustellen. Leider bedeutet die langsame Anstiegsrate der Temperatur auch, dass die Experimente lange dauern. Um die Temperatur mit 0,5 °C pro Minute von 20 auf 95 °C zu erhöhen, benötigt man beispielsweise 2,5 Stunden. Diese Messungen werden häufig wiederholt, um reproduzierbare Ergebnisse sicherzustellen, sodass ein vollständiges wärmeinduziertes Schmelzexperiment einen erheblichen Zeitaufwand bedeuten kann.

Es gibt verschiedene Ansätze, um die Dauer für die wärmeinduzierten Schmelzmessungen zu verkürzen. Manche Geräte ermöglichen beispielsweise, dass ein Experiment in mehrere Phasen aufgeteilt wird, wobei für jede Phase eine andere Anstiegsrate für die Temperatur verwendet wird. Eine schnelle Anstiegsrate kann für die Phasen zu Beginn und am Ende verwendet werden und eine langsamere Anstiegsrate in dem Temperaturbereich, in dem die Probe denaturiert.

Neueste Entwicklungen spektrophotometrischer Geräte bieten eine erhebliche Zeitersparnis für wärmeinduzierte Schmelzmessungen sowie eine höhere Präzision der Temperatur, als dies zuvor möglich war. Das Agilent Cary 3500 Multizonen-UV-Vis-Spektralphotometer verwendet in die Küvetten integrierte Temperatursonden, um die Temperatur der Lösungen während des Experiments genau zu steuern. Die Multizellen-Halterung ist in das Gerät eingebaut und verwendet wasserfreie, luftgekühlte Peltier-Elemente zur Steuerung der Proben temperaturen zwischen 0 und 110 °C.

Diese Studie untersuchte mit dem Cary 3500 Multizonen-UV-Vis-Spektralphotometer den Einfluss, den die Erhöhung der Anstiegsrate der Temperatur auf die berechnete Schmelztemperatur ( $T_m$ ) einer siRNA-Probe hat.

## Experimentelles

### Proben

Eine siRNA-Probe wurde von der Agilent Nucleic Acid Solutions Division zur Verfügung gestellt. Eine Lösung von  $\approx 0,3$  mg/ml siRNA in einer Pufferlösung mit 100 mM NaCl, 0,1 nM EDTA und 10 mM Natriumphosphat wurde hergestellt und auf pH 7,0 eingestellt.

Es wurden Standard-Quarzküvetten (3,5 ml) mit einer optischen Schichtdicke von 10 mm verwendet. Als Referenzlösung wurde reiner Phosphatpuffer verwendet.

### Geräte und Methode

Für alle Messungen wurde ein Cary 3500 Multizonen-UV-Vis-Spektralphotometer verwendet. Die Methodenparameter sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Der einzige Parameter, der während der Untersuchung verändert wurde, war die Anstiegsrate der Temperatur. Es wurden insgesamt acht Anstiegsraten verwendet: 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 °C pro Minute.

Alle Messungen verwendeten mindestens drei Aliquote der Probe, die unter identischen Bedingungen gleichzeitig gemessen wurden. Jede Probenküvette wurde zusammen mit einer Referenzküvette in die Multizellen-Halterung mit acht Positionen gestellt. Eine Temperatursonde zur Verwendung in den Küvetten wurde in jede Probenküvette eingeführt (Abbildung 2) und konnte zur Steuerung der Temperatur während des Experiments verwendet werden.



**Abbildung 2.** Temperatursonde zur Verwendung in den Küvetten: wird zur Steuerung der Temperatur während der Messungen verwendet.

Daten wurden alle 0,5 °C aufgenommen; das Signal wurde 1 Sekunde lang gemittelt, bevor jeder Datenpunkt aufgezeichnet wurde. Bei einer Anstiegsrate der Temperatur von 30 °C pro Minute dauerte die Messung ungefähr fünf Minuten.

Der Rührer wurde für diese Untersuchungen auf 500 U/min eingestellt, um eine ausreichende Einheitlichkeit der Temperatur in der Küvette sicherzustellen.

**Tabelle 1.** Methodenparameter.

Parameter	Einstellung
Wellenlänge (nm)	260
Spektrale Bandbreite (nm)	5
Signalmittlungszeit (s)	1
Datenintervall (°C)	0,5
Starttemperatur (°C)	25
Endtemperatur (°C)	86
Rückkehrtemperatur (°C)	25
Anzahl der Phasen	1
Wartezeit (min)	0,5
Anstiegsrate der Temperatur (°C/min)	Unterschiedlich
Rührgeschwindigkeit (U/min)	500
Anzahl der Temperaturzonen	4
Temperatursteuerung	Temperatursonde

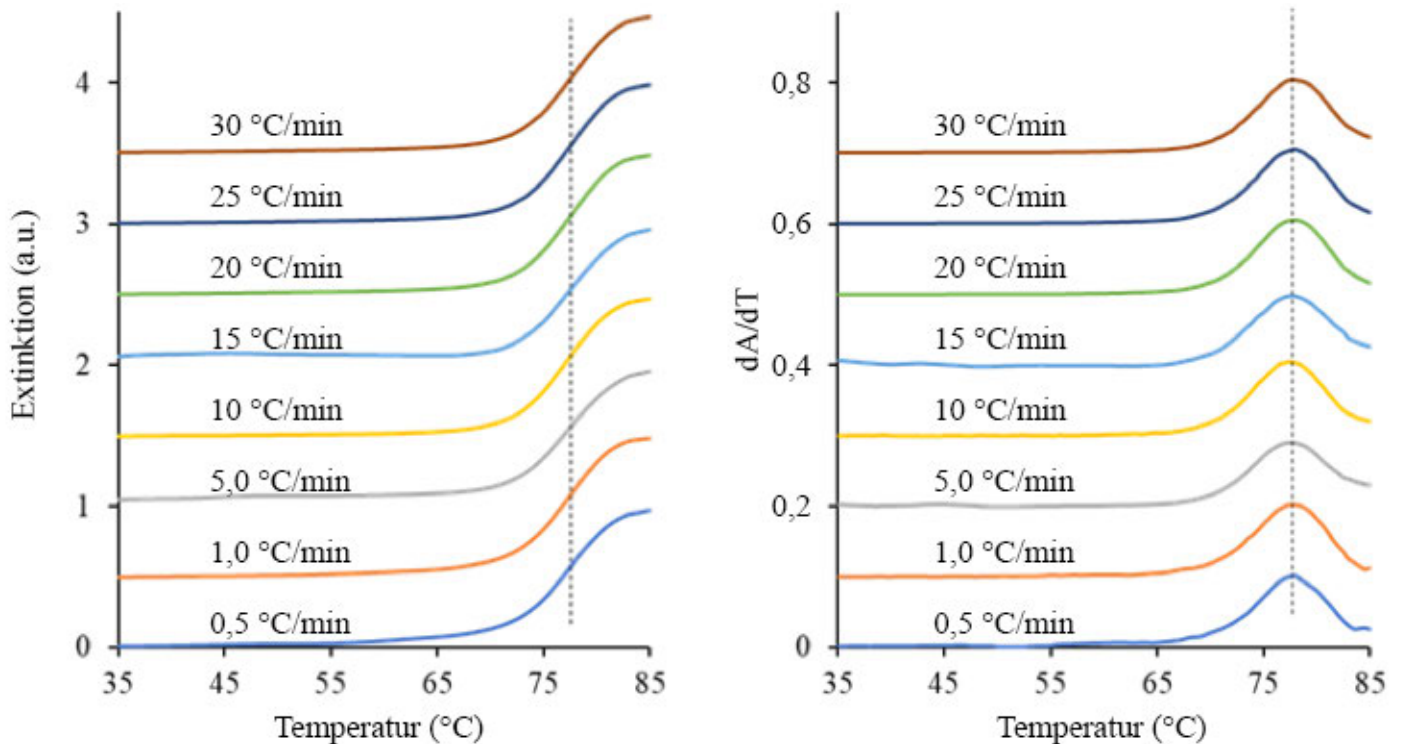
## Ergebnisse und Diskussion

### T<sub>m</sub>-Werte bei verschiedenen Anstiegsraten der Temperatur

Die Datenanalyse wurde mit einem Softwarepaket eines Drittanbieters durchgeführt. Die Extinktionsdaten, die während der acht Temperaturrampenraten gesammelt wurden, sind in Abbildung 3 dargestellt. Die Daten wurden normalisiert auf 0 bis 1 Extinktionseinheiten und zur Übersichtlichkeit gestaffelt dargestellt. Die Ableitung jeder Kurve wurde berechnet und ist ebenfalls abgebildet. Der Peak jedes Plots der ersten Ableitung identifiziert den Mittelpunkt der Schmelzkurve und damit den T<sub>m</sub>-Wert.

**Tabelle 2.** Gemessene T<sub>m</sub>-Werte für die siRNA-Probe bei allen Anstiegsraten der Temperatur.

	Anstiegs- rate (°C/min)	Replik 1 T <sub>m</sub> °C	Replik 2 T <sub>m</sub> °C	Replik 3 T <sub>m</sub> °C	Mittlere T <sub>m</sub> (°C) (n = 3)
Experiment 1	0,5	78,5	78,5	78,5	78,50
Experiment 2	1	78,5	78,5	78,0	78,33
Experiment 3	5	77,5	78,0	77,5	77,67
Experiment 4	10	78,0	77,5	77,9	77,80
Experiment 5	15	78,4	78,5	77,9	78,27
Experiment 6	20	78,4	78,3	78,5	78,40
Experiment 7	25	78,7	77,8	78,3	78,27
Experiment 8	30	79,0	78,9	78,2	78,70



**Abbildung 3:** Extinktion der siRNA-Probe gegen die Temperatur aufgetragen (links) und entsprechende erste Ableitung als Funktion der Anstiegsrate der Temperatur (rechts).

Wie in Abbildung 3 und Tabelle 2 gezeigt, liegen die gemessenen  $T_m$ -Werte der siRNA-Proben innerhalb von  $\pm 1$  °C für die acht im Experiment verwendeten Anstiegsraten der Temperatur.

## Schlussfolgerungen

Das Cary 3500 Multizonen-UV-Vis-Spektralphotometer wurde zur Messung des Schmelzpunkts der gleichen siRNA-Probe bei acht verschiedenen Anstiegsraten der Temperatur verwendet. Der bei jeder Anstiegsrate gemessene Schmelzpunkt lag innerhalb eines Bereichs von  $\pm 1$  °C. Dies bedeutet, dass schnellere Anstiegsraten der Temperatur verwendet werden könnten als die üblichen 0,5 °C/min. Die Dauer des Experiments konnte durch die Verwendung einer höheren Anstiegsrate erheblich verkürzt werden, ohne das Ergebnis zu beeinträchtigen. Diese Untersuchung zeigte, dass ein Experiment, das früher 2,5 Stunden dauerte, mit dem Cary 3500 in ungefähr fünf Minuten durchgeführt werden konnte. Die gleichzeitige Messung von mindestens drei Replikaten der Probe stellt eine erhebliche, zusätzliche Zeitersparnis dar.

Die Verwendung von schnellen Anstiegsraten der Temperatur kann auch auf andere Messungen der UV-Vis-Extinktion als Funktion der Temperatur ausgeweitet werden und liefert deutliche Produktivitätsvorteile für Labore, die Experimente mit Temperatursteuerung durchführen. Die Möglichkeit, in allen acht Küvettenpositionen gleichzeitig zu messen, bietet eine weitere Steigerung der Produktivität für Labore, die die Auswirkungen von Temperaturänderungen auf flüssige Proben untersuchen wollen.

## Literatur

1. Thomas, R. Sur l'existence, dans la molécule des acides nucléiques, d'une structure secondaire à liaisons labiles. *Experientia*. **1951**;7(261–262).
2. P.R. Chetana, Ramakrishna Rao, Mithun Roy, Ashis K. Patra, *Inorganica Chimica Acta*, 362, **2009**, S. 4692–4698.
3. Ramakrishna Rao, Ashis K. Patra, P.R. Chetana, *Polyhedron*, 27, **2008**, S. 1343–1352.
4. Tina M. Davis, Lori McFail-Isom, Elaine Keane und Loren Dean Williams, *Biochemistry*, **1998**, 37, S. 6975-6978.

[www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis](http://www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis)

DE44381.8766087963

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2021  
Gedruckt in den USA, 2. Juli 2021  
5994-0384DEE