

Достижение повышенной скорости изменения температуры в эксперименте по тепловой трансформации ДНК

Спектрофотометр видимого и ультрафиолетового диапазона Cary 3500 позволяет получить одинаковые результаты независимо от скорости изменения температуры



Авторы

Kevin Grant и Matt Quinn
Agilent Technologies,
Австралия

Введение

Разделить двойную цепочку ДНК на одинарные можно повышением температуры. Определенная температура вызывает разрыв водородных связей, которые соединяют между собой пары нуклеотидов. Эксперимент по тепловой трансформации ДНК использует разницу в числе водородных связей между нуклеотидными парами аденозин-тимин (A=T) и гуанин-цитозин (G≡C) для ДНК, или аденозин-урацил (A=U) и гуанин-цитозин для РНК. Так как гуанин и цитозин соединены тремя водородными связями, для их разрушения требуется больше тепловой энергии, чем для разрушения двух водородных связей между парами оснований с двойной связью. Это значит, что молекулы ДНК и РНК с большим числом пар гуанин-цитозин будет трансформироваться при более высокой температуре. Температура трансформации (T_m) позволяет точно определить нуклеотидный состав (соотношение между парами G≡C и A=T / U=T) в пробе.

Температуру трансформации измеряют методом спектрофотометрии в видимом и ультрафиолетовом диапазоне за счет того, что оптическая плотность одноцепочечной ДНК на длине волны 260 нм выше, чем для двухцепочечной (I). На рис. 1 показан пример малой интерферирующей РНК (миРНК). Оптическая плотность на длине волны 260 нм при температуре 85 °С значительно выше, чем при 25 °С.

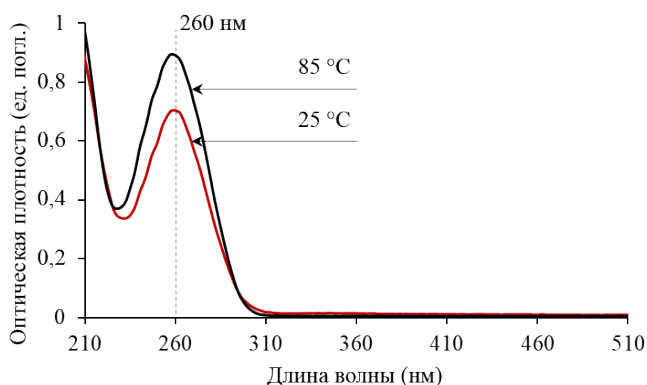


Рисунок 1. Спектр поглощения пробы миРНК при температуре 25 °С (красная линия) и 85 °С (черная линия).

Эксперимент по тепловой трансформации ДНК, как правило, проводится измерением оптической плотности на длине волны 260 нм. В этом эксперименте температура пробы плавно увеличивается в условиях контролируемого значения рН и ионной силы раствора. Как правило, температура повышается со скоростью 0,5 °С/мин (2, 3, 4). Такое медленное повышение температуры необходимо для получения точных и воспроизводимых результатов. К сожалению, это означает, что эксперимент занимает продолжительное время. Например, для того чтобы со скоростью 0,5 °С/мин поднять температуру с 20 до 95 °С, необходимо 2,5 часа. Для повышения воспроизводимости лаборатории зачастую повторяют измерение несколько раз, поэтому весь эксперимент тепловой трансформации ДНК может занять значительное время.

Для того чтобы ускорить этот эксперимент, применяются различные подходы. Например, некоторые приборы позволяют разбить эксперимент на отдельные этапы, для каждого из которых задается своя скорость изменения температуры. В начале и конце эксперимента эта скорость может быть увеличена по сравнению с диапазоном температур, в котором образец будет денатурироваться.

Последние разработки в области спектрофотометрического оборудования позволяют значительно сократить продолжительность эксперимента тепловой трансформации ДНК и контролировать температуру намного точнее, чем это было возможно ранее. Спектрофотометр видимого и ультрафиолетового диапазона Agilent Cary 3500 Multizone со встроенными термодатчиками, погружаемыми в кюветы, позволяет точно контролировать температуру раствора в ходе эксперимента. Встроенный многокюветный держатель прибора поддерживает температуру проб в диапазоне от 0 до 110 °С с помощью элемента Пельтье без охлаждающей жидкости, но с воздушным охлаждением.

В данном исследовании изучается влияние увеличенной скорости изменения температуры на значение температуры трансформации T_m образца миРНК, полученное с использованием УФ-Вид спектрофотометра Cary 3500 Multizone.

Экспериментальная часть

Пробы

Образец миРНК был предоставлен отделом растворов нуклеиновых кислот компании Agilent. Для изучения готовился раствор миРНК с концентрацией $\approx 0,3$ мг/мл в буферном растворе, содержащем 100 ммоль/л хлорида натрия, 0,1 ммоль/л ЭДТА и 10 ммоль/л ортофосфата натрия, со значением рН, приведенным к 7,0.

Для измерения использовались стандартные кварцевые кюветы объемом 3,5 мл с длиной оптического пути 10 мм. В качестве раствора сравнения использовался исходный раствор фосфатного буфера.

Оборудование и методика выполнения эксперимента

Все измерения проводились на спектрофотометре видимого и ультрафиолетового диапазона Cary 3500 Multizone. Параметры методики приведены в табл. 1.

Единственный параметр, который изменялся в ходе эксперимента — скорость изменения температуры. Были проведены эксперименты при восьми различных скоростях: 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25 и 30 °С/мин.

В каждом эксперименте одновременно и в одинаковых условиях измерялись как минимум три аликвоты пробы. Каждая кювета с пробой помещалась со своим соответствующим раствором сравнения в восьмипозиционный многокюветный держатель. Для контроля температуры в ходе эксперимента в каждую кювету с пробой погружался температурный зонд (рис. 2).



Рисунок 2. Погружной температурный зонд, с помощью которого контролировалась температура в ходе эксперимента.

Оптическая плотность раствора измерялась через каждые 0,5 °С, и данные каждой записанной точки усреднялись в течение 1 с. При скорости изменения температуры 30 °С/мин весь эксперимент занял около пяти минут.

Для того чтобы обеспечить достаточно равномерную температуру по всей кювете, ее содержимое перемешивалось со скоростью 500 об/мин.

Таблица 1. Параметры методики исследования.

Параметр	Установленное значение
Длина волны (нм)	260
Ширина полосы спектра (нм)	5
Время усреднения сигнала (с)	1
Интервал измерения (°С)	0,5
Начальная температура (°С)	25
Конечная температура (°С)	86
Возвратная температура (°С)	25
Число этапов	1
Продолжительность удержания температуры (мин)	0,5
Скорость изменения температуры (°С/мин)	Изменялась
Скорость вращения мешалки (об/мин)	500
Число температурных режимов	4
Контроль температуры	Погружной зонд

Результаты и обсуждение

Значения T_m при различных скоростях изменения температуры

Данные анализировались с помощью ПО другого производителя. Данные оптической плотности, собранные при восьми различных скоростях изменения температуры, приведены на рис. 3. Для наглядности кривые нормализованы от 0 до 1 единицы поглощения и размещены друг над другом. Также на рисунке приведена первая производная каждой кривой. Пик на кривой первой производной указывает на центральную точку кривой трансформации и, таким образом, на значение T_m .

Таблица 2. Полученные значения T_m для пробы мРНК при каждом значении скорости изменения температуры.

	Скорость изменения температуры (°С/мин)	Повторение 1 T_m °С	Повторение 2 T_m °С	Повторение 3 T_m °С	Среднее значение T_m (°С) (n = 3)
Эксперимент 1	0,5	78,5	78,5	78,5	78,50
Эксперимент 2	1	78,5	78,5	78,0	78,33
Эксперимент 3	5	77,5	78,0	77,5	77,67
Эксперимент 4	10	78,0	77,5	77,9	77,80
Эксперимент 5	15	78,4	78,5	77,9	78,27
Эксперимент 6	20	78,4	78,3	78,5	78,40
Эксперимент 7	25	78,7	77,8	78,3	78,27
Эксперимент 8	30	79,0	78,9	78,2	78,70

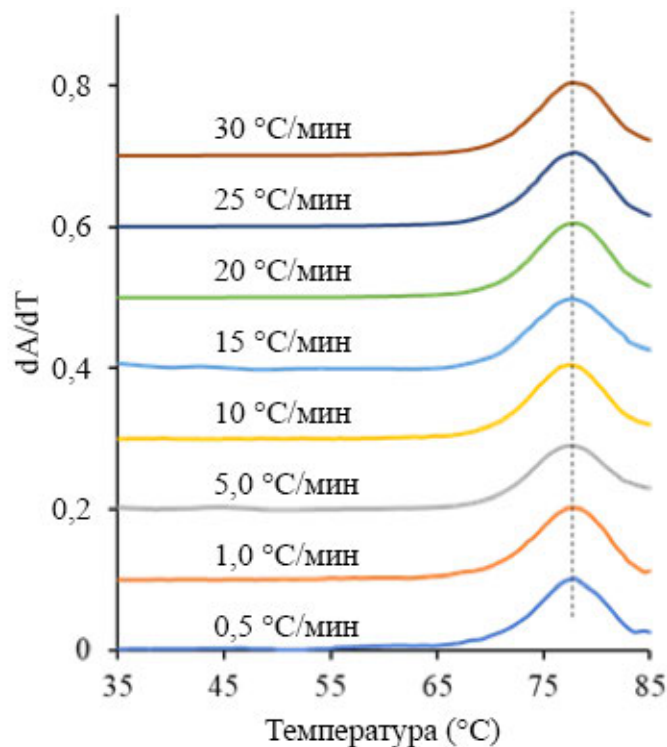
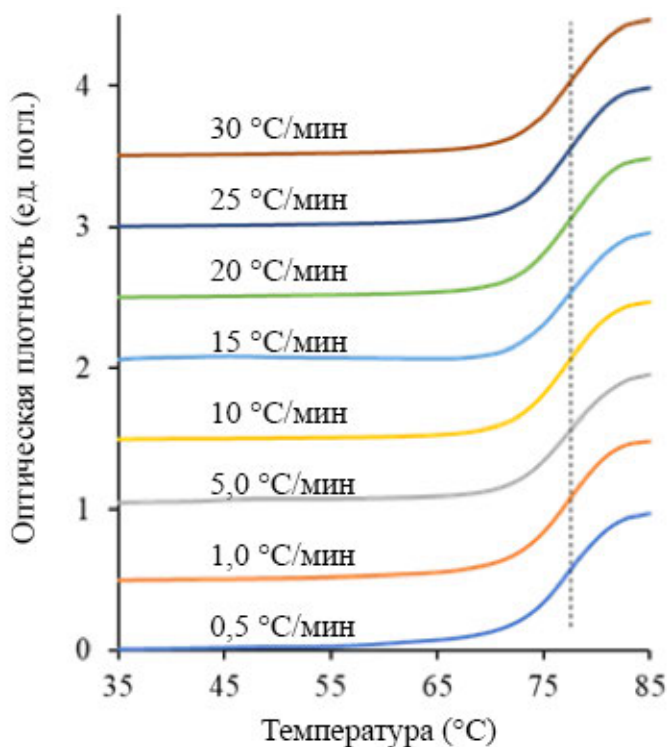


Рис. 3. Оптическая плотность раствора мРНК в зависимости от температуры (слева) и соответствующая первая производная в зависимости от скорости изменения температуры (справа).

Как показано на рис. 3 и в табл. 2, полученные значения T_m для проб мРНК для всех восьми скоростей изменения температуры в эксперименте отличаются не более чем на ± 1 °C.

Выводы

С помощью спектрофотометра видимого и ультрафиолетового диапазона Cary 3500 Multizone была измерена температура трансформации одного и того же образца мРНК при восьми различных скоростях изменения температуры. Измеренные значения температуры трансформации для каждой из скоростей изменения температуры различались не более чем на ± 1 °C. Это значит, что лаборатории могут применять для измерения скорости изменения температуры выше требуемой протоколом 0,5 °C/мин. Повышенная скорость изменения температуры может значительно сократить продолжительность эксперимента, не приводя к ухудшению результатов. Исследование показало, что спектрофотометр Cary 3500 позволяет приблизительно за пять минут выполнить эксперимент, который ранее занимал 2,5 часа. Возможность одновременно выполнить три повторения одного эксперимента также позволяет дополнительно сэкономить значительное время.

Возможность использования увеличенной скорости изменения температуры распространяется также на другие измерения оптической плотности в зависимости от температуры, что позволяет значительно увеличить производительность лабораторий, выполняющих эксперименты с контролем температуры. Возможность проведения измерений в восьми кюветах одновременно позволяет дополнительно увеличить производительность лабораторий, занимающихся изучением влияния изменений температуры на жидкие образцы.

Литература

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**, pp 4692–4698
3. Ramakrishna Rao, Ashis K. Patra, P.R. Chetana, *Polyhedron*, 27, **2008**, pp 1343–1352
4. Tina M. Davis, Lori McFail-Isom, Elaine Keane, and Loren Dean Williams, *Biochemistry*, **1998**, 37, pp 6975–6978

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

DE44381.8766087963

Информация в этом документе может быть изменена без предупреждения.