

为热熔实验提供更快的升温速率

使用 Cary 3500 紫外-可见分光光度计在任意升温速率下获得相同结果

作者

Kevin Grant 和 Matt Quinn
安捷伦科技公司，澳大利亚



前言

升高温度可诱导双链核酸分离为单链。在一定温度下，碱基对之间的氢键发生断裂。热熔实验利用了 DNA 腺嘌呤-胸腺嘧啶 (A=T) 与鸟嘌呤-胞嘧啶 (G=C) 或 RNA 腺嘌呤-尿嘧啶 (A=U) 和鸟嘌呤-胞嘧啶核苷酸之间氢键数的差异。由于 G=C 核苷酸含有三个氢键，解离所需热能大于双键对所需的热能。这表示含有更多 G=C 对的 DNA 和 RNA 要在更高的温度下才能熔解。熔解温度 (T_m) 可指示样品中的碱基组成 (G=C 与 A=T/U=T 的比例)。

使用紫外-可见分光光度法测定熔点，利用的是单链核酸在 260 nm 处的吸光度高于双链核酸的原理^[1]。图 1 显示了使用小干扰 RNA (siRNA) 样品的示例，与 25 °C 相比，85 °C 下 260 nm 处的吸光度明显更高。

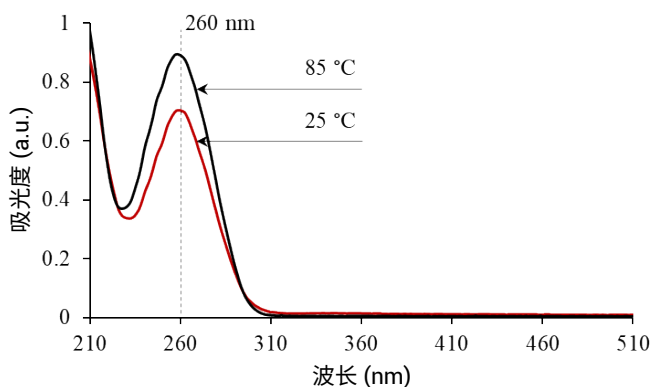


图 1. siRNA 样品在 25 °C（红色）和 85 °C（黑色）下的波长扫描

通常通过测定 260 nm 处的吸光度来进行热熔实验。然后在受控 pH 和离子强度条件下逐渐升高样品温度。通常以每分钟 0.5 °C 的速率升温^[2, 3, 4]。需要非常慢的升温速率才能确保准确且可重现的数据。然而，缓慢的升温速率也意味着实验需要很长时间。例如，以每分钟 0.5 °C 的速率将温度从 20 °C 升至 95 °C 需要 2.5 小时。实验室通常需要重复这些测量以确保可重现的结果，因此完整的热熔实验可能十分耗时。

有很多方法可以缩短热熔测量所需时间。例如，一些仪器能够将实验分成几个阶段，每个阶段使用不同的升温速率。可以在开始和结束阶段使用快速升温速率，在样品变性的温度范围内使用较慢的升温速率。

分光光度仪器的最新进展大大缩短了热熔测量所需的时间，温度精度比以往更高。Agilent Cary 3500 多区控温紫外-可见分光光度计使用集成的比色皿内温度探头，可在实验过程中准确控制溶液温度。多池支架内置于仪器中，使用无水、风冷的帕尔帖控温模块将样品温度控制在 0–110 °C 之间。

本研究使用 Cary 3500 多区控温紫外-可见分光光度计评估升温速率对 siRNA 样品熔解温度 (T_m) 计算值的影响。

实验部分

样品

siRNA 样品由安捷伦核酸解决方案事业部提供。使用含 100 mmol/L NaCl、0.1 mmol/L EDTA 和 10 mmol/L 磷酸钠的缓冲溶液配制 ≈ 0.3 mg/mL 的 siRNA 溶液，调节至 pH 7.0。

使用标准 3.5 mL 体积、10 mm 光程的石英比色皿。使用纯磷酸盐缓冲液作为参比溶液。

仪器和方法

所有测量均采用 Cary 3500 多区控温紫外-可见分光光度计。方法参数见表 1。

研究期间改变的唯一参数是升温速率。共使用了八个升温速率：0.5、1、5、10、15、20、25 和 30 °C/min。

所有测量均使用至少三个平行样品在相同条件下同步进行测量。将每个样品比色皿与参比样配对放置在八位多池支架中。将比色皿内温度探头插入每个样品比色皿中（图 2），该探头可用于控制实验温度。



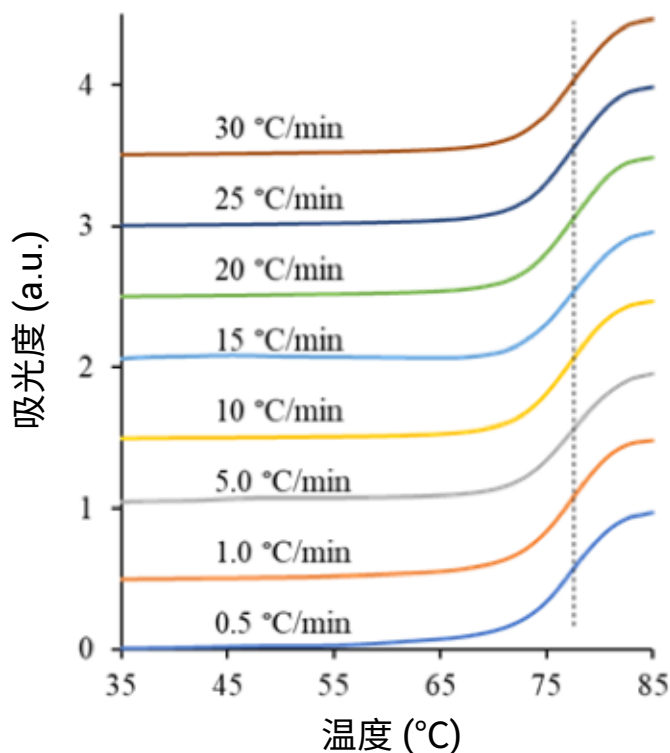
图 2. 比色皿内温度探头，用于在测量期间控制实验温度

每 0.5 °C 采集一次数据，在记录每个数据点之前将信号平均 1 秒。在每分钟 30 °C 的升温速率下，测量花费约五分钟。

对于上述检测，将搅拌速率设定为 500 rpm，以确保整个比色皿内的温度足够均一。

表 1. 方法参数

参数	设置
波长 (nm)	260
光谱带宽 (nm)	5
信号采集平均时间 (s)	1
数据间隔 (°C)	0.5
初温 (°C)	25
末温 (°C)	86
回温 (°C)	25
阶段数	1
保持时间 (min)	0.5
升温速率 (°C/min)	不定
搅拌速度 (rpm)	500
温控区域数量	4
温度控制	温度探头



结果与讨论

不同升温速率下的 T_m 值

数据分析在第三方软件包中进行。在 8 个升温速率下采集的吸光度数据如图 3 所示。将数据归一化为 0 到 1 个吸光度单位，叠加以便观察。计算每个一阶导数并列。由每个一阶导数图的峰值确定溶解曲线的中点，从而确定 T_m 值。

表 2. 每个升温速率下测得的 siRNA 样品的 T_m 值

	升温速率 (°C/min)	第 1 次重复进样 T_m °C	第 2 次重复进样 T_m °C	第 3 次重复进样 T_m °C	平均 T_m (°C) (n = 3)
实验 1	0.5	78.5	78.5	78.5	78.50
实验 2	1	78.5	78.5	78.0	78.33
实验 3	5	77.5	78.0	77.5	77.67
实验 4	10	78.0	77.5	77.9	77.80
实验 5	15	78.4	78.5	77.9	78.27
实验 6	20	78.4	78.3	78.5	78.40
实验 7	25	78.7	77.8	78.3	78.27
实验 8	30	79.0	78.9	78.2	78.70

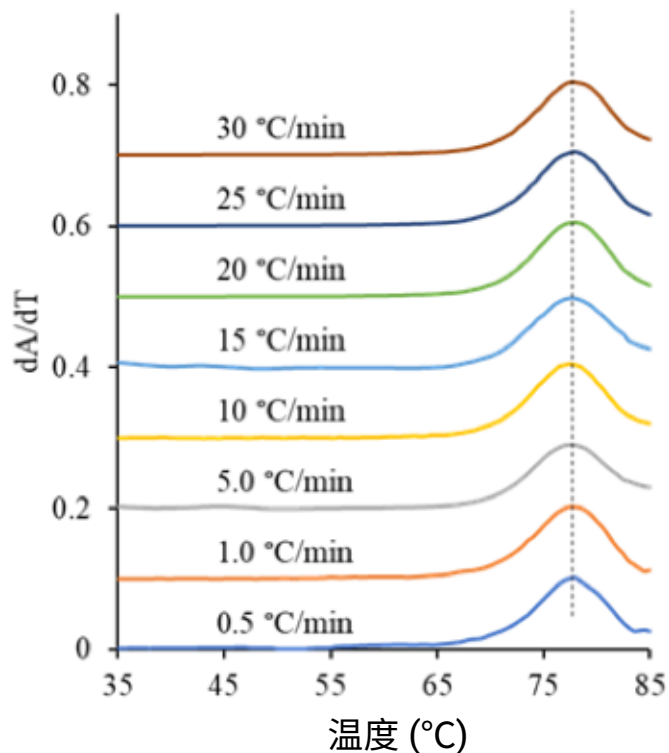


图 3. siRNA (左) 吸光度与温度的关系和 (右) 相应一阶导数作为升温速率的函数

如图 3 和表 2 所示，对于实验中使用的八个升温速率，siRNA 样品的测量 T_m 值误差均在 ± 1 °C 之内。

结论

采用 Cary 3500 多区控温紫外-可见分光光度计以八个不同的升温速率测量同一个 siRNA 样品的熔点。各个升温速率下测得的熔点误差均在 ± 1 °C 范围内，表示实验室可以使用比 0.5 °C/min 的常规方案更快的升温速率。使用更快的升温速率可以在不影响结果的前提下大大缩短实验时间。本研究表明，使用 Cary 3500 可以在约 5 分钟内测定之前需要 2.5 小时才能完成的实验。至少同步进行三次重复测定同样能够大大节省分析时间。

使用较快的升温速率可扩展到其他紫外-可见吸光度随温度变化的测量，为进行控温实验的实验室提供了显著的分析效率优势。能够同步测量所有八个比色皿位置，进一步提升了致力于研究液体样品对温度变化响应的实验室的分析效率。

参考文献

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

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2021
2021 年 7 月 2 日, 中国出版
5991-0384ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

