

使用 Cary 3500 紫外-可见分光光度计 进行核酸热稳定性测量的最佳操作 规程

使用快速、准确的温控型紫外-可见分光光度计进行 热解链 (T_m) 分析

Cary 3500 温控型 UV-Vis 系统具备通过温度控制获取紫外-可见光谱并分析生物和其他分子的热稳定性和温度曲线的能力。

紫外-可见分光光度计利用核酸在 260 nm 处有最大吸光度的特点，已经被广泛应用于核酸样品的定量和产品的质量控制在^[1]。使用 260 nm 处的吸光度和确定的吸收系数可以轻松计算核酸的浓度。通常还需进行背景校正，例如使用不含核酸基质的空白溶液来采集基线，或在核酸不吸收的波长处测定吸光度。

双链核酸由碱基对之间的氢键连接。双链核酸变性为单链的温度取决于：

- 核酸的序列和长度
- pH 值和缓冲液条件
- 两条链之间碱基对的任意错配

因此，解链温度是一种非常有用的分析工具，可以通过监测 260 nm 处的吸光度随着温度的升高或降低而产生的变化来进行研究。随着温度升高，链之间的氢键断裂，双链核酸解离成两条单链。当链解离时，260 nm 处的吸光度增加。此时吸光度的最大值与最小值的中点称为“解链温度” (T_m)^[1]。

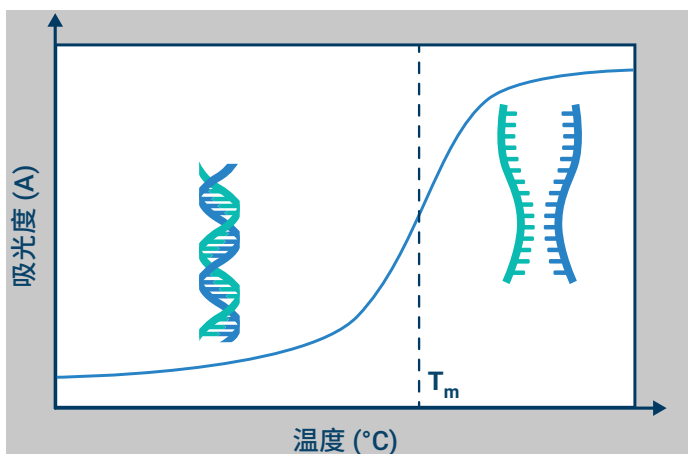


图 1. DNA 样品的热解链曲线

其他分子/化合物的热解链曲线也可以使用紫外-可见光谱分析，包括聚合物的浊点测定、药物-蛋白质相互作用和蛋白质热变性。本文介绍了如何优化热解链测定的实验条件，以获得可靠的高质量数据。以下是我们的建议：

使用适合的比色皿

样品池的选择取决于要分析样品的体积、紫外-可见分光光度计的 z-轴高度¹ 和测试波长。紫外-可见光谱中使用较多的比色皿光程为 10 mm，体积为 3.5 mL。

热解链测定通常在紫外波长下进行，因此比色皿材质需要能透射紫外光。出于此原因，建议使用石英比色皿。应避免使用聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA)、聚苯乙烯和常规玻璃材质的比色皿，因为这些材质的比色皿仅在可见光波长范围内是透光的。

在进行测定时，应将比色皿放置在样品池架中，使透光面与光路对齐。如果只有少量样品可用，请考虑使用体积更小的比色皿，确保样品处于光路中（见表 1）。

Cary 3500 系统采用宽度小于 1.5 mm 的高聚焦光束，是检测小体积核酸样品的理想选择（见图 2）。该仪器的光学元件出厂时已校准，进行检测前无需校准可直接使用，即使同时检测多个比色皿也是如此。



图 2. Cary 3500 的高聚焦光束

如果一次检测多个样品，建议在所有样品池位置使用相同类型的比色皿。从帕尔贴加热元件到样品的热传递取决于样品池的物理参数，因此使用不同类型的样品池可能会引入不必要的变量。

表 1 介绍了不同类型的比色皿。

表 1. 可用于 Cary 3500 仪器的比色皿类型。每个比色皿的安捷伦部件号如第 1 列所示，例如 5061-3387。Cary 3500 可以使用比色皿内的温度探头（在温度控制栏中用“探头”表示）或根据样品池架的温度（用“模块”表示）来控制比色皿内样品的温度。如果使用的比色皿不能安装温度探头，则最大升温速率应设置为 ≤ 0.5 °C/min

比色皿类型		比色皿体积	最小体积	温度控制	是否可使用搅拌子
10 mm 石英比色皿 (5061-3387)		3.5 mL	使用搅拌子: 1.5 mL 不使用搅拌子: 2.0 mL	模块	是
10 mm 石英比色皿 (5061-3387), 带温度探头 (G9889-60005)		3.5 mL	使用搅拌子: 1.5 mL 不使用搅拌子: 2.0 mL	探头	是
10 mm 石英比色皿 (5062-2477)		3.0 mL	2.0 mL	模块	否
半微量比色皿 (5063-6559), 带温度探头 (G9889-60005)		1.0 mL	400 μ L	探头	否
半微量比色皿, 带 PTFE 塞 (5063-6561)		1.0 mL	800 μ L	模块	否
矩形半微量比色皿, 一对, 带 PTFE 塞 (6610012700)		900 μ L	400 μ L	探头	否
超微量比色皿, 带 PTFE 塞 (5062-2496)		50 μ L	50 μ L	模块	否
低顶空比色皿 (Starna 样品池目录 ²)		10–160 μ L	参考 Starna 样品池目录	模块	否

² https://www.starna.com/images/cell_cat_2014_v22042014.pdf

保持比色皿的清洁

保持比色皿洁净无划痕非常重要。比色皿清洁过程中应防止污染和气泡形成。应使用**碱性清洗液**³。比色皿和塞子最好都使用将用于分析的溶剂或缓冲液进行冲洗并风干。

优化缓冲液和 pH 值

为了确保分析的可靠性和重复性，并尽可能减小测量的变化，生物样品需要溶解在具有合适的 pH 值和盐含量的缓冲液中。分析任何生物样品时，建议进行缓冲液和 pH 值优化研究^[2, 3]。应在不同温度下考察最佳缓冲液条件^[2]。空白对照和样品应使用相同的缓冲液类型。缓冲液建议现配现用。

避免比色皿上发生冷凝

比色皿外部可能发生冷凝的情况：

- 当将样品的温度降低到环境温度（即室温）以下时，在比色皿外部可能会形成冷凝并干扰检测
- 通常在低温下储存的生物样品或缓冲液，直接置于室温下的比色皿中

为了防止出现冷凝，在准备样品进行检测时，请确保样品和比色皿处于室温。在检测过程中，如果需要低于环境温度测试，请用氮气吹扫样品室以去除形成的所有冷凝物。有关吹扫说明，请参阅 Cary 3500 紫外-可见分光光度计的**用户指南**⁴。

图 3 给出了冷凝条件下热解链实验的例子。图中显示的噪声和吸光度变化与样品无关。

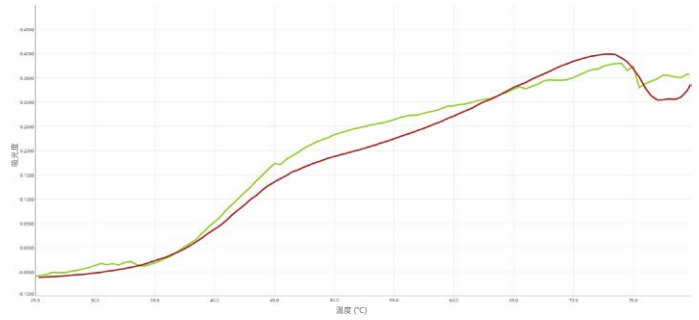


图 3. 因样品池壁上的冷凝引起的熔解曲线吸光度干扰的两个示例

优化样品浓度

如果样品浓度很高，则可能需要稀释，确保测量结果在分光光度计的线性范围内。在开始热解链实验之前，请对样品进行波长扫描，保证浓度合适并检查样品的质量。对核酸而言，260 nm 处 0.5 Abs 是一个不错的起始吸光度。随着样品变性，吸光度将增加约 15%–20%^[1]。

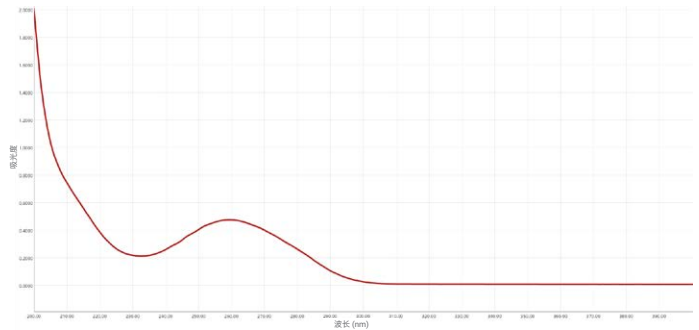


图 4. DNA 样品的波长扫描显示 260 nm 处的吸光度约为 0.5 Abs

防止样品蒸发

随着变性实验过程中温度的升高，样品可能会蒸发。随着缓冲液的蒸发，剩余溶液中核酸的浓度将增加，导致吸光度随时间增加，如图 5 所示。

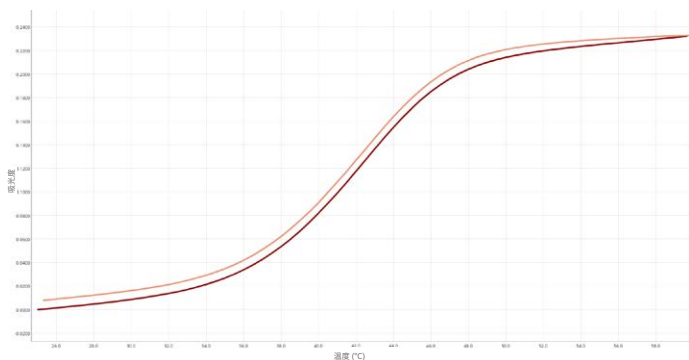


图 5. 260 nm 处的吸光度随着温度升高（深红色）和下降（棕色）的变化。由于缓冲液蒸发导致核酸浓度增加，在相同温度下，降温过程的吸光度水平略高于升温过程

此外，高浓度样品在检测过程中发生蒸发后，可能会导致比色皿壁上出现盐沉积。测完样品后，检查是否有液滴附在比色皿壁上。液滴是出现蒸发的一个迹象。使用以下方法防止样品蒸发：

- 始终使用带塞比色皿
- 加入几滴矿物油（安捷伦部件号 [FS-SM015](#)），使其在比色皿中漂浮在样品上方。不建议使用硅油等其他类型的油
- 使用低顶空比色皿减少样品表面和塞子底部之间的死体积（如表 1 所示）
- 在比色皿的顶部和塞子之间加一层封口膜

防止污染

为了避免人体皮肤上核酸酶或其他颗粒对样品的污染，建议佩戴手套和口罩。

重复测定

为确保检测的准确度，建议测定多个平行样品或重复检测同一样品。

样品脱气

样品加热时会自然脱气。这一过程将产生气泡，使穿过样品的光束受到干扰，如图 6 所示。当热解链实验中使用的温度接近溶剂沸点时，更有可能出现此问题。

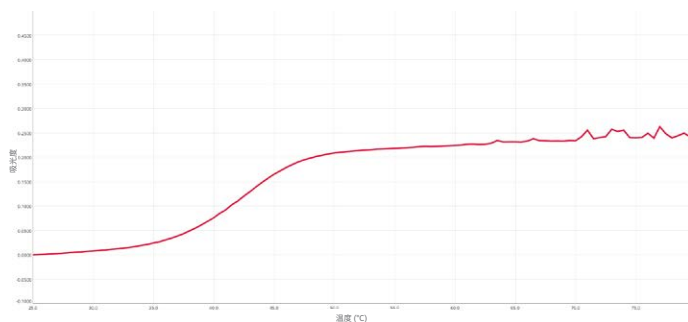
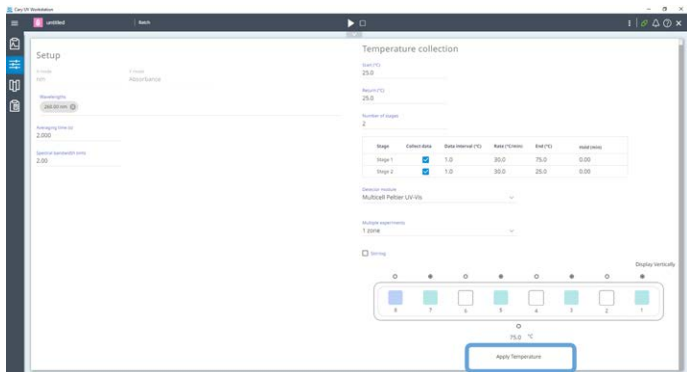


图 6. 在高温下，热解链曲线因样品脱气而出现小峰

为了减少这种现象，如果样品容易随着温度升高而脱气，建议在室温下对样品进行预热或真空脱气^[3, 4]。有两种方式进行预热：

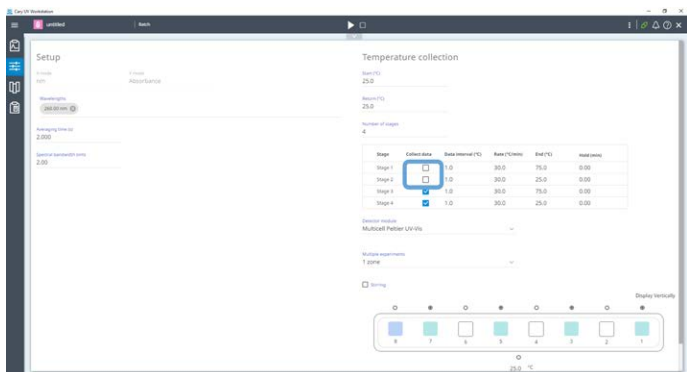
脱气选项 1

在实验的最高温度下保持样品 5 分钟后再开始数据采集。使用软件中的“应用温度”控制（见下图中突出显示的部分）执行此操作。



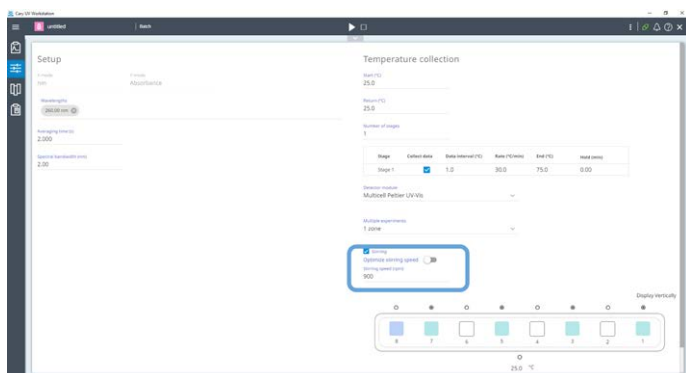
脱气选项 2

在未勾选“采集数据”框的情况下，使用将用于检测的最高温度设置，对样品进行升温 and 降温。（见下图中突出显示的部分）。而检测将在后续勾选了“采集数据”框的阶段中完成。



去除气泡

对于标准的 3.5 mL 比色皿，在装有与水粘度相似的液体时，约 900 rpm 的搅拌速度可实现更出色的温度均一性。对于标准比色皿（安捷伦部件号 [5061-3387](#)），建议使用星型搅拌子（安捷伦部件号 7418000400）。不建议使用棒状搅拌子，因为它们会产生和/或捕获气泡。气泡会干扰通过比色皿和样品的光线，导致紫外-可见光检测中出现小峰或其他异常。搅拌样品时，气泡可能在样品池中四处移动，在光路中反复进出。为去除搅拌子上的气泡，建议在开始检测之前就搅拌样品，并对样品池进行目视检查，确保没有气泡残留。使用 Cary 3500 时，可以通过 Cary UV Workstation 软件中的“优化搅拌速度”选项来完成，该软件可在数据采集之前开启搅拌（请参阅下面的屏幕截图）。



根据样品粘度设置搅拌速度

检测粘性较大的样品时，应提高搅拌速度。通常气泡会聚集在比色皿的内表面，因为溶解气体在高温下溶解度较低。为确保检测的准确性，在盖上盖子的情况下，在实验台上轻敲比色皿底部。该操作可去除气泡。

在降温曲线过程中搅拌也是有帮助的。搅拌将增加单链核苷酸的相互作用，以便重新结合。如果样品没有搅拌，特别是使用标准比色皿（体积相对较大）时，升温曲线过程中的热解链温度可能比降温曲线过程中的热解链温度更高。这是由于单链核苷酸在较冷溶液中的缓慢扩散引起的。

了解和温度相关的检测参数

Cary 3500 紫外-可见分光光度计有三种不同的控温配置可选：

- Cary 3500 双池控温
- Cary 3500 多池控温
- Cary 3500 多温区

Cary 3500 双池控温采用一个控温模块，提供 2 个比色皿位置（一个参比通道；一个样品通道）。可以使用温度探头通过比色皿内的样品温度进行控制，也可以通过样品池架的温度传感器控制温度。不同通道下的单选按钮代表池架控温模式。通道上方的单选按钮代表可通过温度探头测试池内温度模式。

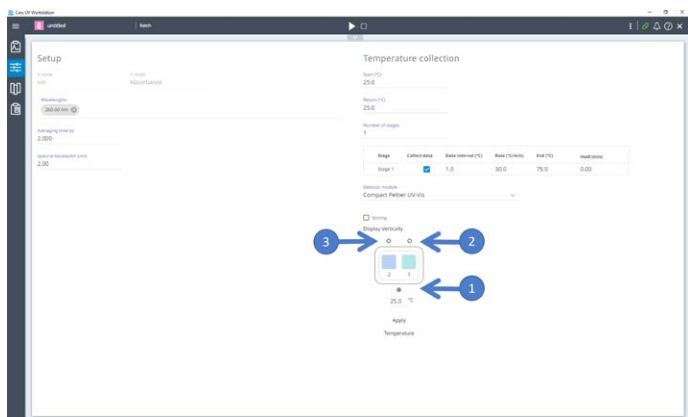


图 7. Cary 3500 双池控温附件中 Cary UV Workstation 软件中的“热力学”应用程序界面。所选的单选按钮代表了温度控制模式。如果选择标为 (1) 的按钮，则通过池架温度进行温度控制。如果选择标为 (2) 的按钮，则通过样品通道内样品的实际温度进行控制。如果选择标为 (3) 的按钮，则通过参比通道内的样品温度进行控制

Cary 3500 多池控温具有 4 个独立的控温模块，提供七个样品通道和一个参比通道。每对比色皿（比色皿 1 和 2、比色皿 3 和 4、比色皿 5 和 6 以及比色皿 7 和 8）都位于其各自独立的控温模块中。温度完全由各个控温模块的热传感器来控制。只能在位置 8 使用温度探头读取该位置的温度。该探头不能控制系统运行的温度。

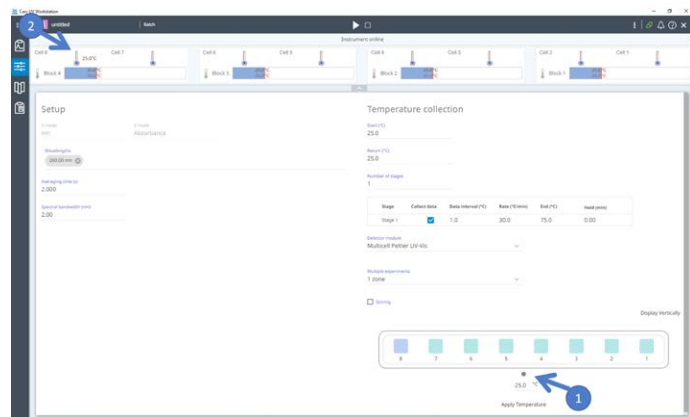


图 8. Cary 3500 多池控温附件中 Cary UV Workstation 软件中的“热力学”应用程序界面。温度控制模式由选中的单选按钮表示，这里 (1) 被选中，表示由 Peltier 模块来进行温度控制控制。标注 (2) 的位置表示连接到参比通道的温度探头的读数

Cary 3500 多温区控温附件的软件可直接监测样品温度。与 Cary 3500 多池控温附件配置一样，该系统也采用 4 个独立的控温模块，但可以通过温度探头控制各个控温模块内样品的温度。

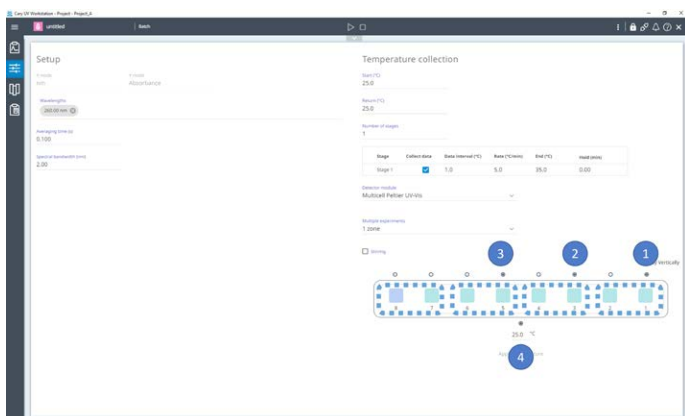


图 9. Cary 3500 多温区控温附件中 Cary UV Workstation 软件中的“热力学”应用程序界面。各个独立的控温模块用蓝色虚线框表示，可以通过温度探头或控温模块独立控制。从右到左，前三个控温模块（1、2、3）通过选中的单选按钮使用温度探头进行监测。最左边的控温模块未选择温度探头（未选中相应单选按钮），这意味着它由所选中的单选按钮代表的控温模块热传感器（4）进行驱动

注：可以对四个控温模块分别进行单独控制，即通过控温模块内置的温度传感器，或连至控温模块内其中一个位置的温度探头进行控制。两个温度探头不能连至同一个控温模块。

Cary 3500 可用于静态温度实验（即动力学应用）或升温实验。对于静态温度实验，多温区控温附件的软件支持将不同温区的比色皿设置为不同的温度。如果不同的实验使用了不同的缓冲液，针对不同的静态温度，可通过该方式将仪器设置为使用两个或四个温区。这些实验可以同时进行。

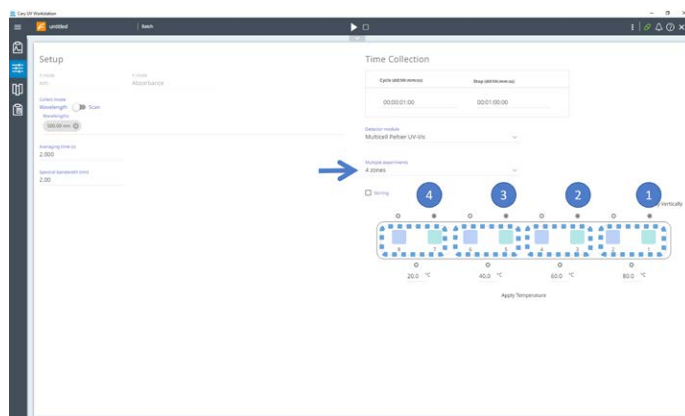


图 10. Cary 3500 多温区控温附件中 Cary UV Workstation 软件中的“动力学”应用程序界面。该系统已设置为使用 4 个独立温区（蓝色箭头）。将在四个不同的温度设置下（1、2、3、4）同时开展动力学实验

若使用 Cary 3500 多温区配置开展升温实验，升温速率可设置为 0.1–40 °C/min。各个控温模块将采用相同的升温速率升温。为了保证出色的准确性和精密度，将温度探头直接插入样品，用于控制温度变化（Cary 3500 双池控温和 Cary 3500 多温区配置均支持该功能。Cary 3500 多池控温不支持通过探头控制温度，只能控制样品池架的温度）。由于温度探头在接近检测位置的地方监测样品温度，因此可提供更准确的温度测量结果。



图 11. Cary 比色皿内温度探头具有低质量、大表面积和超快速反馈回路的特点

注：当在 Cary 3500 多温区附件中使用温度探头控制样品温度进行快速升温速率时，建议将样品放置在将使用温度探头的池位处。让同温区的另一个池位空着。下图展示了如何设置 1、3、5 及 7 号位置的样品，以及如何关闭 2、4、6 号位置的样品。将鼠标悬停在每个池位上，选择“样品”或“未使用”进行设置。

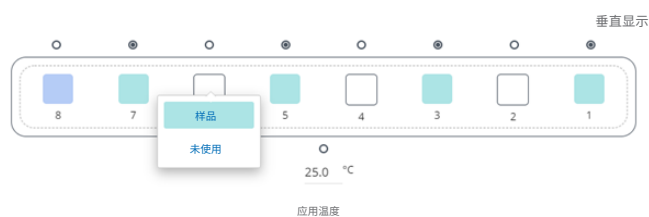


图 12. Cary 3500 多温区配置界面。温度探头位于 1、3、5、7 位置处，由所选的单选按钮表示。将 2、4、6 池位设置为“未使用”

注：Cary 3500 多池/多温区配置支持同时检测所有样品位置。这与常见的紫外-可见分光光度计多池附件不同，后者按顺序检测每个样品，有可能在读数间隔丢失重要数据点。

此外，也可使用模块控温模式进行温度控制。在这种情况下，建议进行预实验，从而确定给定样品的最佳升温速率。通常，温度变化速率（例如，0.1–0.5 °C/min）越慢，热解链实验的准确性越高。较慢的温度变化速率可改善比色皿内的样品温度滞后于比色皿所在的控温模块的这一情况。

根据软件中定义的数据间隔，获取吸光度读数。如果不同温度的吸光度出现较大变化，建议使用较小的数据间隔，以便在整个温度变化过程中捕获更多数据点。

使用 Cary 3500 仪器开展热解链实验时，最多可设置 10 个阶段。各个阶段均包括：

1. 最终温度
2. 数据间隔
3. 温度变化速率
4. 保持时间

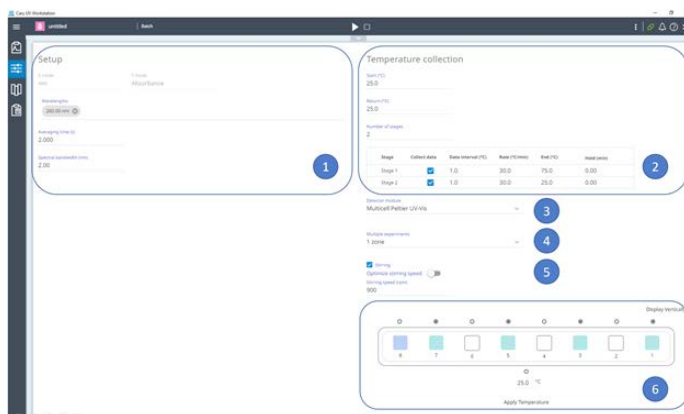
保持时间决定了开始下一阶段之前，样品在最终温度下保持的时长。如果保持时间较长，则必须考虑样品蒸发的情况。参阅[“防止样品蒸发”](#)。

降温曲线采集过程中温度变化速率至关重要，温度下降过快可能导致反应不完全^[7]。

了解仪器参数设置

Cary 3500 控温配置的软件程序界面支持控制多个参数，包括：

- 分析波长
- 信号采集平均时间
- 光谱带宽
- 开始和最终温度
- 温度阶段数量
- 温区数量（取决于仪器类型）
- 搅拌
- 温度控制方法



这些参数如右图所示，更多内容请参阅表 2。

表 2. Cary UV Workstation 软件热力学应用参数和设置

编号	参数说明
1.	选择分析波长、信号采集平均时间和光谱带宽。见表 3。
2.	定义热力学参数：开始和最终温度以及阶段数。各个阶段均需确定：数据间隔、升温速率、最终温度和保持时间。参阅“ 了解基于温度的检测参数 ”
3.	选择仪器模块：双池控温或多池控温。
4.	<p>仅针对 Cary 3500 多温区配置，定义温区的数量（所有温区的温度将采用相同的升温速率）。系统可以使用一个温区，即一个参比通道和七个样品。也可将系统分为两个温区（两对，各一个参比通道和三个样品）或四个温区（四对，各一个参比通道和一个样品通道）。参比位置在下图中以蓝色标出</p> <p>单温区配置</p> <p>双温区配置</p> <p>四温区配置</p>
5.	如有需要，选择搅拌功能。参阅“ 根据样品粘度设置搅拌速度 ”
6.	定义温度控制方法：温度探头或模块。前面图中所选的单选按钮表示选择了控温模块。请参阅“ 选择要使用的温度读数 ”

优化仪器参数

使用紫外-可见光谱法进行热解链实验时，应优化表 3 中汇总的参数。

表 3. 热解链实验推荐参数

参数	建议	优化方法
光谱带宽 (SBW) ⁵	1–2 nm	如果需要更高的信号通量，应增加光谱带宽，因为更宽的带宽会增加通过样品的光量。当 SBW 超过一定值（通常约为 2 nm）后，分辨率降低，最大值处的吸光度可能会下降。建议采用不同的光谱带宽设置进行实验，从而确定给定样品的最佳设置。对于大多数生物样品，理想的设置为 1–2 nm。
信号采集平均时间 (SAT)	> 2 秒	此设置确定了移动到下一个数据点之前的信号平均时间。一般来说，较长的 SAT 可降低背景噪声，平滑信号，从而提高信噪比 (SNR)。针对热解链实验，2 到 3 秒的平均时间是一个不错的初始选择。该参数应与升温速率同时优化。
升温速率	模块控制：≤ 0.5 °C/min 探头控制：≤ 40 °C/min	此设置表示系统在给定阶段的升温速度。升温速度越快，系统达到该阶段最终温度的速度也越快。
数据间隔	≤ 1 °C	此参数用于定义系统采集数据的频率。例如，1 °C 的数据间隔意味着每摄氏度采集一个数据点。较小的数据间隔通常可以保证更高的结果质量。一项简单的解链实验可以通过一个阶段进行升温或降温。更复杂的解链实验可以分多个阶段开展。例如，升温可分为 3 个阶段：转变前的稳定阶段、转变阶段、第二个稳定阶段。由于转变前后的稳定阶段吸光度变化缓慢，可以使用较大的数据间隔。在转变阶段，由于吸光度快速变化，应缩小数据间隔。
探头控制： 样品的温度反馈	多温区和双池控温附件支持	使用温度探头进行控制，可确保在比色皿内进行温度瞬时读数。 请参阅“选择要使用的温度读数”。
模块控制： 控温模块的温度反馈	所有控温模块均支持	如果使用比色皿所在的控温模块报告的温度，则采用缓慢的升温速率，从而保证通过比色皿的热传递足以确保样品在预期温度下实现温度平衡。推荐的速率为 ≤ 0.5 °C/min。如果样品体积较大，需要优化升温速率，从而确保控温模块和样品之间的热平衡。搅拌有助于更快达到温度平衡。
搅拌	使用 3.5 mL 样品池时可用	Cary 3500 的搅拌功能适用于星型搅拌子（直径 = 9.5 mm，高度 = 9.5 mm）。搅拌有助于在样品中实现更好的温度平衡。

⁵ https://www.agilent.com/cs/library/posters/public/Optimum_Parameters_Poster_38x25_5994-0399EN.pdf

选择要使用的温度读数

Cary 3500 多温区配置的温度可使用以下任一读数进行控制：

- 样品池所在的温度模块控温
- 温度探头控温

使用控温模块控制实验时，样品温度可能滞后于“模块”温度，尤其是在升温速率较快时。

表 4 介绍了在软件中为这三种配置设置温度控制模式的方法。

表 4. 针对三种 Cary 3500 配置的软件温度控制选项

系统配置	温度控制选项
Cary 3500 双池控温	 <p>控温模块控制</p>
	 <p>位置 1 的温度探头控制</p>
Cary 3500 多池控温	 <p>控温模块控制</p>
Cary 3500 多温区	 <p>各个池位均采用控温模块控制</p>
	 <p>分别在位置 1、3、5 和 7 对各个控温模块提供温度探头控制</p>

将温度探头插入适当深度

图 13 显示了 Cary 温度探头的主要部件以及如何将其紧靠样品池壁放置，以避免阻挡光束。

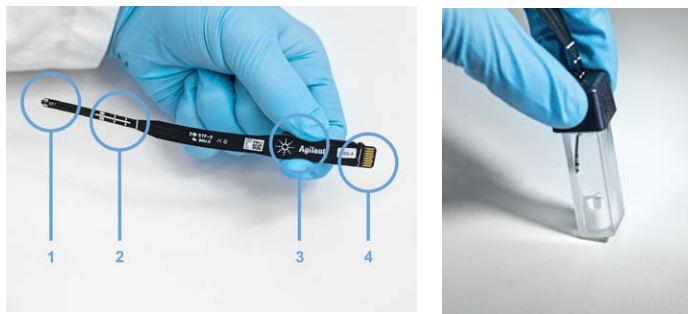


图 13. (左) Cary 温度探头 - (1) 传感器, (2) 高度指示, (3) 把手, (4) 接头。
(右) 温度探头放置于比色皿中, 比色皿底部有一个星型搅拌子

通过盖子上的狭槽轻轻滑动探头, 可以调整温度探头的高度。使用 3.5 mL 比色皿时, 温度探头的推荐深度为探头上的位置 2 标记刚好出现在样品池盖的顶部 (见图 14)。该深度可使探头尖端位于靠近光束中心的位置。探头紧靠在比色皿磨砂面的内壁上, 从而保证探头不会阻挡通过比色皿的光束。采用这种方式放置温度探头可确保温度探头检测的溶液区域尽可能靠近光束穿过的溶液区域。这种设计可保证结果的高准确性。

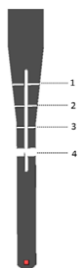


图 14. 标明不同深度的温度探头示意图

图 15 显示了温度探头与仪器的连接方式。



图 15. 将温度探头接头插入仪器

温度探头的建议最小浸入深度为液体表面以下 5 mm, 适合所有样品体积。如果使用搅拌子, 探头底部和搅拌子顶部之间的最小距离应为 3 mm。如果在 3.5 mL 比色皿中使用搅拌子, 温度探头的位置不得低于探头深度指示上的位置 2。该位置可确保探头不会干扰搅拌子。采用 900 rpm 的搅拌速度, 可确保整个样品池中温度的均一性。

计算热解链温度

在对热解链温度曲线进行导数之前, 可先进行平滑处理以减少干扰和噪声。平滑和导数计算都使用 Savitzky-Golay 技术。两个函数中都包含两个参数, 分别为过滤值和间隔值。

过滤值规定了用于生成平滑曲线中的每个点的点数。Savitzky-Golay 算法需要一个奇数作为过滤值。过滤器值太大会导致曲线中的数据点太少。Savitzky-Golay 算法也需要指定一个数据间隔。建议与曲线采集时的数据间隔值保持一致。

Cary UV Workstation 软件热力学应用程序中的起始温度和停止温度（图 16 中标记为 3）用于规定进行热解链温度计算的 温度范围。单击软件中的“重新计算”按钮，可生成热力学计算表、 T_m 值和热解链曲线光谱的导数图。

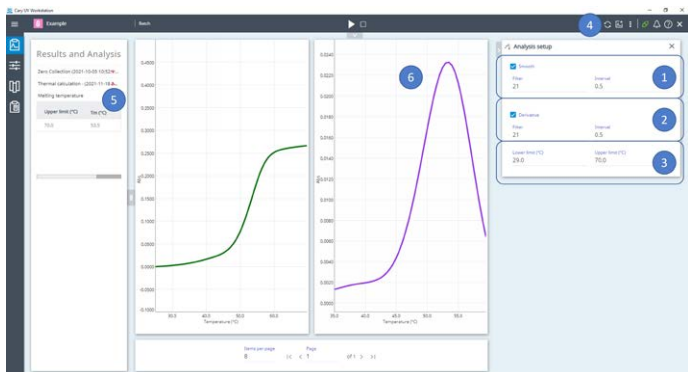


图 16. Cary UV Workstation 软件热力学应用程序结果页面包含平滑参数 (1)、导数功能参数 (2) 和热解链温度计算限值 (3)。(4) 为“重新计算”按钮。热力学计算表中的计算结果以及计算的热解链温度 (5) 和导数图 (6)

参考文献

1. Mergny JL, Lacroix L. Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides*. **2003**;13(6):515-37
2. Hans Bisswanger, Enzyme Assays, *Perspectives in Science*, Vol 1, Issues 1-6, **2014**, pp 41-55
3. Good, N.E., et al. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry*. **1966**, 5(2): 467–77
4. Good, N.E. and Izawa, S. Hydrogen Ion Buffers. *Methods Enzymol*. **1972**; 24: 53-68

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

www.agilent.com/chem/pharma

DE50410706

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, 2022
2022年8月15日, 中国出版
5994-4028ZHCN