

使用紫外-可见光谱法快速测定双链核酸的解链温度

使用 Agilent Cary 3500 紫外-可见分光光度计以快速升温速率获得可重现的解链温度 (T_m) 数据

作者

Wesam Alwan 和
Mathieu Rault
安捷伦科技有限公司



前言

通过提高温度可以诱导双链核酸分离成单链。在一定温度下，碱基对之间的氢 (H) 键会断裂。热解链实验利用了核碱基之间 H 键数量的差异。例如，DNA 核苷酸的腺苷与胸腺嘧啶 (A=T) 之间以及鸟嘌呤与胞嘧啶 (G≡C) 之间的 H 键，或 RNA 中腺苷与尿嘧啶 (A=U) 和 G 与 C 碱基之间的 H 键。由于 G≡C 核苷酸含有三个氢键，解离 G≡C 所需的热能大于双键碱基对。含有更多 G≡C 对的 DNA 和 RNA 将在更高的温度下解链。因此，解链温度 (T_m) 可以准确指示样品中的碱基对组成 (G≡C 与 A = T/U = T 的比率)。

在核酸的药物发现、开发和生产过程中， T_m 通常被研究人员和制造商用作二级鉴定测试 (QC 检查)。解链温度通常通过紫外-可见分光光度法测量，因为在核酸的最大吸收峰 260 nm 处，单链核酸的吸光度高于双链核酸^[1]。以鲑鱼精子 DNA 为例，图 1 显示，与 25 °C 相比，260 nm 处的吸光度在 90 °C 时明显更高。

核酸热解链实验通常通过测量 260 nm 处吸光度的变化来进行。在受控的 pH 和离子强度条件下，样品的温度逐渐升高，通常使用每分钟 0.5 °C 的升温速率^[2-4]。使用缓慢升温速率以确保数据准确且可重现。然而，缓慢的升温速率也意味着实验需要很长时间。例如，以 0.5 °C/min 的速率将温度从 20 °C 变为 95 °C 需要

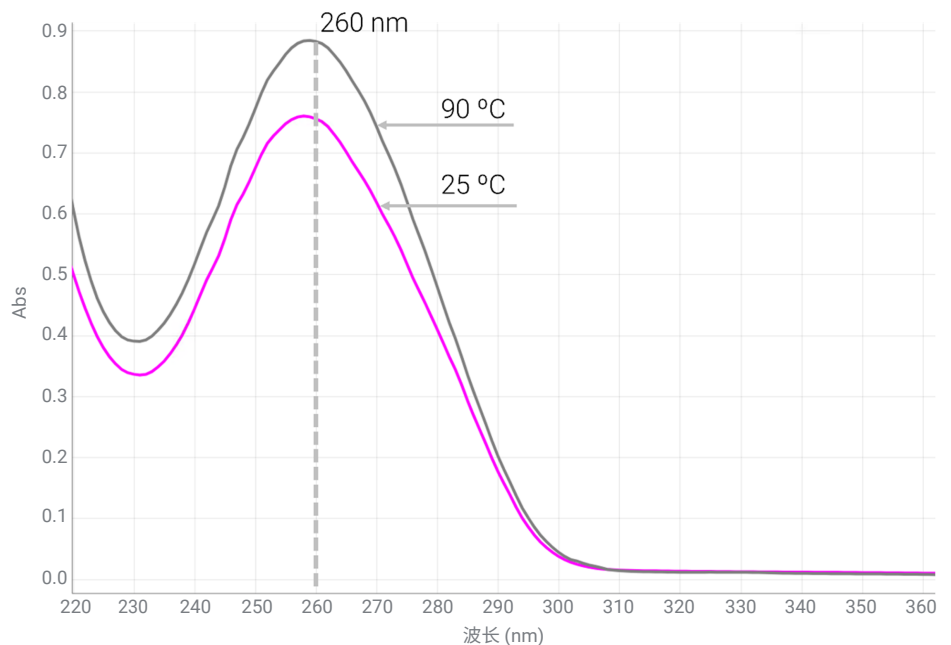


图 1. 鲑鱼精子 DNA 样品在 25 °C (双链, 紫色) 和 90 °C (单链, 灰色) 下的波长扫描

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，因此完整的热解链实验可能十分耗时。

有很多方法可以缩短热解链测量所需时间。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解链测量所需的时间，温度精度比以往更高。

然而，复退实验应以较慢的速度进行，以便有时间完全复退单链核酸。

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，在热解链实验期间精确控制溶液的温度。无水风冷帕尔贴装置用于将样品温度控制在 0 °C 至 110 °C 之间。

本研究评估了使用 Cary 3500 多区控温紫外-可见分光光度计提高升温速率对计算的鲑鱼精子 DNA T_m 的影响。

实验部分

样品

在磷酸盐缓冲盐水（0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液，0.0027 mol/L 氯化钾和 0.137 mol/L 氯化钠，pH 7.4，25 °C）中制备约 15 µg/mL 鲑鱼精子 DNA (D6898) 的溶液。使用纯磷酸盐缓冲盐水作为参比（空白）溶液。使用带有温度探头（货号 G9889-60005）、600 µL 样品体积和 10 mm 光程的安捷伦石英半微量池（部件号 5063-6559）（图 2）。为了尽量减少样品蒸发，将几滴矿物油 (FS-SMO15) 漂浮在比色皿中的样品顶部。

仪器和方法

Cary 3500 多区控温紫外-可见分光光度计使用 Agilent Cary UV Workstation 软件进行控制。使用表 1 所示的方法参数进行检测。研究期间唯一改变的参数是升温速率。总共使用了六种升温速率：1、5、10、20、30 和 40 °C/min。所有测量都使用至少三个等分样品，在相同条件下同时测量。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（图 2），并使用探头的反馈来控制实验温度。

每 1 °C 收集一次数据，并在记录每个数据点之前将信号平均为 0.1 秒。在 30 °C/min 的升温速率下，测量大约需要 10 分钟。

表 1. Agilent Cary 3500 紫外-可见分光光度法参数

参数	设置
波长	260 nm
信号平均时间	0.1 s
数据间隔	1 °C
起始温度	25 °C
结束温度	100 °C
回复温度	25 °C
升温速率	1、5、10、20、30 和 40 °C/min
阶段数	1
温度控制	温度探头
平滑滤波器	11
平滑数据间隔	0.5 °C
导数滤波器	11
导数数据间隔	0.5 °C



图 2. 安捷伦半微量池 (1) 和比色皿内温度探头 (2) 用于在测量过程中控制实验温度

结果与讨论

不同升温速率下的 T_m 值

在六种升温速率 (1、5、10、20、30 和 40 °C/min) 下收集的吸光度数据如图 3 所示。计算每次扫描的一阶导数, 如图 3 所示。每个一阶导数图的最大峰值为热解链曲线的中点, 因此也就是 T_m 值。如图 3 和表 2 所示, 对于实验中使用的所有六种升温速率, 鲟鱼精子 DNA 样品的测量 T_m 值都在 ± 0.2 °C 以内。

表 2. 在每个升温速率下测量的鲟鱼精子 DNA 样品的 T_m 值

条目	升温速率 (°C/min)	重复 1 T_m (°C)	重复 2 T_m (°C)	重复 3 T_m (°C)	平均 T_m (°C) (n = 3), 每个升温速率	标准偏差 T_m (°C) (n = 3), 每个升温速率
1	1	87.1	87.1	87.1	87.1	0.0
2	5	87.0	86.6	86.5	86.7	0.2
3	10	86.7	87.1	87.0	86.9	0.2
4	20	87.1	87.1	87.1	87.1	0.0
5	30	87.1	87.0	86.6	86.9	0.2
6	40	86.6	87.0	87.0	86.9	0.2
平均 T_m (°C) (n = 6), 所有升温速率		86.9	87.0	86.9		
标准偏差 T_m (°C) (n = 6), 所有升温速率		0.2	0.2	0.2		

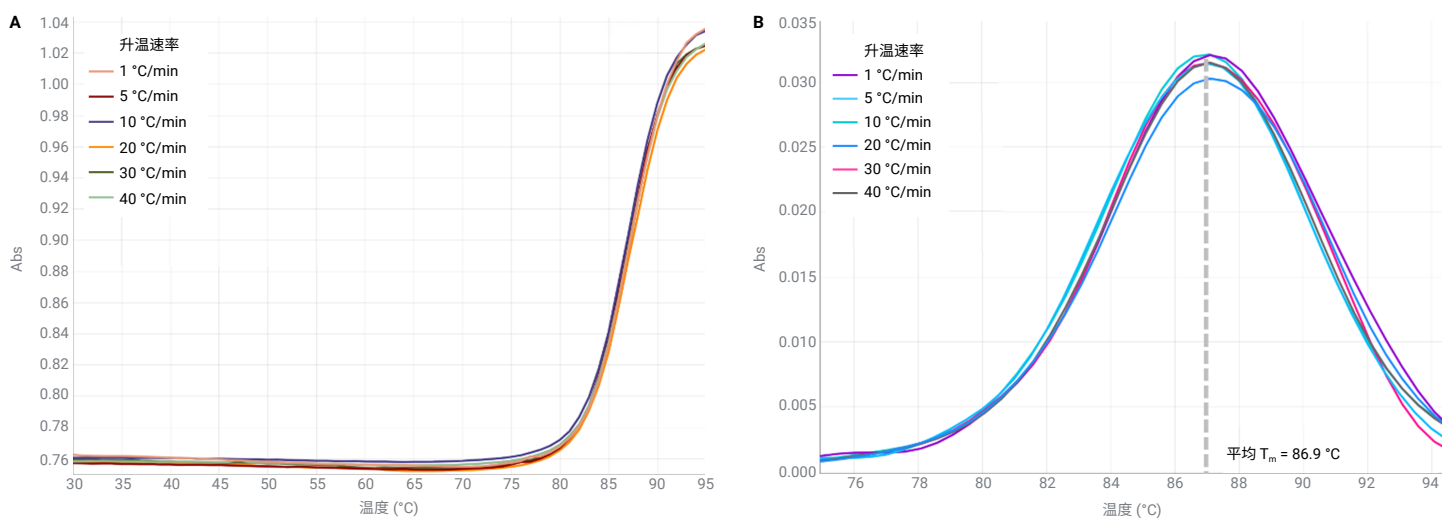


图 3. 鲟鱼精子 DNA 吸光度与温度 (A) 和相应的一阶导数 (B) 作为升温速率的函数

Cary UV Workstation 内置平滑和导数计算器

Cary UV Workstation 软件包括平滑和导数函数，可帮助计算解链温度。可以应用平滑来减少光谱中的干扰和噪声，导数函数计算一阶导数。

平滑函数和导数函数使用 Savitzky-Golay 技术^[5]。这两个函数都需要定义过滤值和间隔大小。过滤值大小定义用于生成每个输出点的点数。如果数据分析使用的间隔值与收集间隔不同，则计算的数据将设置为指定的间隔。建议将平滑和导数间隔与收集间隔相匹配。

平滑和导数计算可以保存在方法中。数据采集结束时将自动计算（图 4）。

结论

Agilent Cary 3500 多区控温紫外-可见分光光度计用于测量六种不同升温速率下鲑鱼精子 DNA 样品的解链温度 (T_m)。在每种升温速率下测得的解链温度误差均在 ± 0.2 °C 以内。这种可重复性水平意味着实验室可以使用比 0.5 °C/min 的标准方案更快的升温速率，从而在不影响结果质量的情况下显著减少实验时间。该研究表明，以前需要 2.5 小时完成的实验，使用 Cary 3500 紫外-可见分光光度计只需要大约 10 分钟。

Cary 3500 紫外-可见分光光度计的八位多池能够同时测量至少三个重复样品和参比，这也减少了整体实验测量时间。

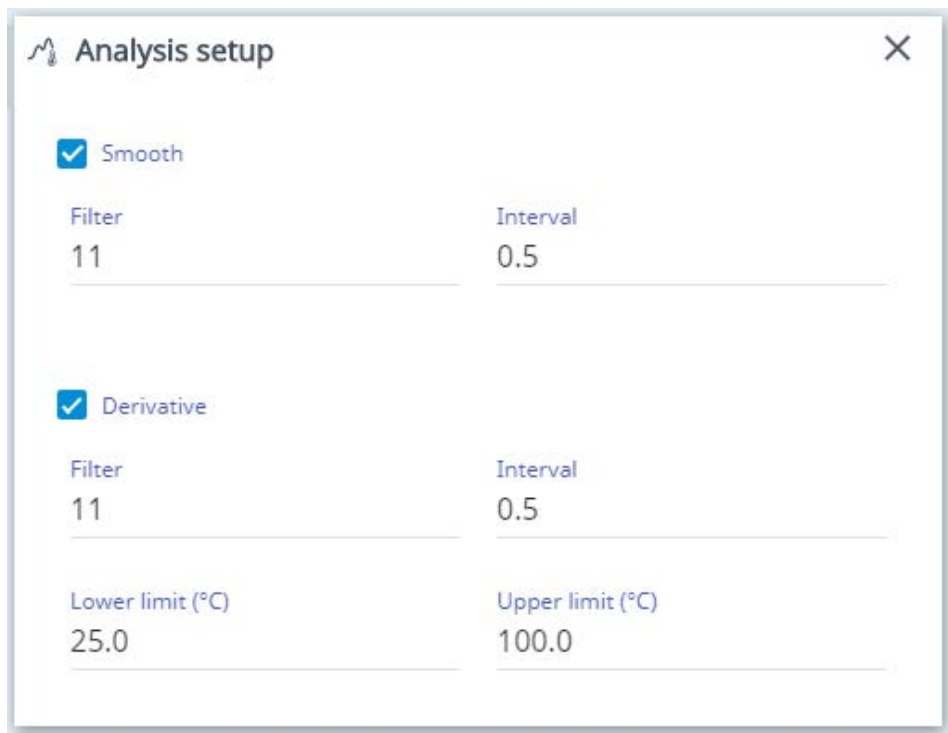


图 4. Agilent Cary UV Workstation 内置平滑和导数计算器

Agilent Cary UV Workstation 软件内置 DNA 解链温度计算（平滑和导数）函数，可快速提供可操作的结果。计算可以保存在方法中，在数据收集后会自动计算和显示。

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。同时测量所有八个比色皿位置的能力为有兴趣研究液体样品对温度变化的响应而无需其他实验变量的实验室进一步提高生产率。

Cary UV Workstation 软件也可以与 Agilent OpenLab 软件集成。OpenLab 提供技术控制来安全地获取、处理、报告和存储数据。对于必须遵循 FDA 21 CFR Part 11，欧盟附录 11，GAMP5 以及 ISO/IEC 17025 和 EPA 40 CFR Part 160 合规指南的实验室来说，这些控制是有必要的。

参考文献

1. Shen, C-H. *Diagnostic Molecular Biology*, Chapter 7 - Detection and Analysis of Nucleic Acids, Academic Press: 2019; pp 167–185
2. Chetana, P. R. et al. New Ternary Copper(II) Complexes of L-Alanine and Heterocyclic Bases: DNA Binding and Oxidative DNA Cleavage Activity. *Inorganica Chimica Acta* **2009**, 362, 4692–4698
3. Rao, R.; Patra, A. K.; Chetana, P. R. Synthesis, Structure, DNA Binding and Oxidative Cleavage Activity of Ternary (L-leucine/isoleucine) Copper(II) Complexes of Heterocyclic Bases. *Polyhedron* **2008**, 27, 1343–1352
4. Davis, T. M. et al. Melting of a DNA Hairpin Without Hyperchromism. *Biochem.* **1998**, 37(19), 6975–6978
5. Savitzky, A.; Golay, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedure. *Anal. Chem.* **1964**, 36, 1627–39

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

DE80572371

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
5994-0384ZHCN