

岛津 Tm 分析系统分析核酸药物解链温度

UV-093

摘要：近年来，以核酸药物为首的功能性核酸备受关注，在研发和评价这种功能性核酸时，热稳定性是很重要的指标，它是控制结构和功能的因素。此外，热稳定在基于核酸杂交的方法（如 PCR 和 DNA 微阵列）中也是必不可少的。本文使用紫外可见分光光度计 UV-1900i 和 Tm 分析系统（TMSPC-8）进行了核酸的解链温度测试，对于核酸药物热稳定性评价起到指导作用。

关键词：UV-1900i Tm 分析系统 核酸 解链温度 (Tm)

以核酸药物为首的功能性核酸备受关注，2021 年底治疗罕见病脊髓性肌肉萎缩的反义寡核苷酸药物诺西那生钠进入中国医保，几乎同一时间，某医药公司降血脂的小干扰 RNA 药物 Leqvio 获 FDA 批准上市，据悉一年只需用药两次。寡核苷酸药物已经从罕见病过渡到了常见慢性病，并可大大降低患者用药频率。随着寡核苷酸类药物的陆续上市，核酸药物已成为当前生命科学和药物研究的热点之一。

核酸类药物又称核苷酸类药物，是各种具有不同功能的寡聚核糖核苷酸 (RNA) 或寡聚脱氧核糖核苷酸 (DNA)，主要在基因水平上发挥作用。有些核酸药

物具有双链螺旋结构，但当温度升高时，氢键断裂，双链逐渐解体，形成单链结构。这种现象称为核酸的“溶解”，将双链和单链所占比例相等的温度定义为解链温度 (Tm)。Tm 值是表征核酸热稳定性的指标，Tm 取决于碱基序列、核酸浓度、错配（非互补性碱基配对）等。核酸在 260 nm 附近有一个紫外吸收峰，吸收值在“溶解”过程中增加。Tm 分析系统测定该吸光度变化，以确定 Tm 值。

本文使用紫外可见分光光度计 UV-1900i 和 Tm 分析系统（TMSPC-8）进行了核酸的解链温度测试，对于核酸药物热稳定性评价起到指导作用。

■ 实验部分

1.1 仪器

UV-1900i、Tm 分析系统（TMSPC-8）

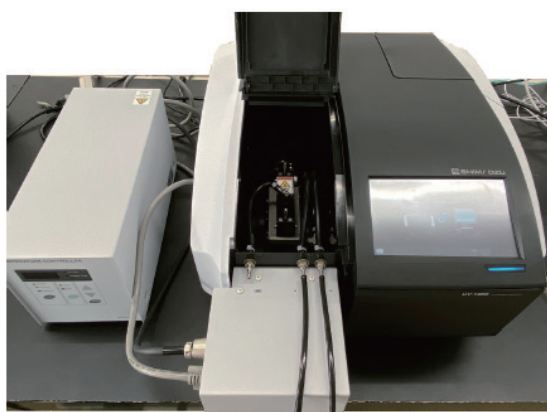


图 1 岛津 UV-1900i+Tm 分析系统

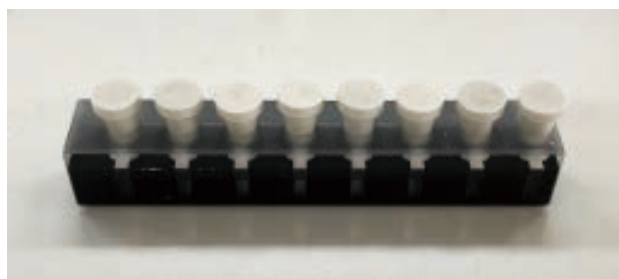


图 2 8 联微量比色皿

1.2 测试条件

表 1 测试条件

分析仪器	UV-1900i、Tm 分析系统 TMSPC-8
测定波长	260 nm
狭缝宽	1 nm
池空白校正	启用
起始温度	20°C
起始保留时间	120 s
升温速率	1.0°C /min
等待测定	30 s
测定间隔	1°C
结束温度	90°C

1.3 测试过程

将样品稀释到一定浓度，保证在 260 nm 处的吸光度为 0.1 ~ 1 Abs 之间。然后进行了样品溶液脱气的预处理（如果溶液中空气，在高温下会产生气泡，无法准确测定）。8 联微量比色皿的光程有 10 mm 和 1 mm 两种，最小样品分析体积分别为 100 μ L 和 35 μ L，可根据样品的吸光度（浓度和样品量）来选择。本文使用光程为 10 mm 的 8 联微量比色皿进行测试。

■ 测试结果

2.1 样品 1 测试曲线

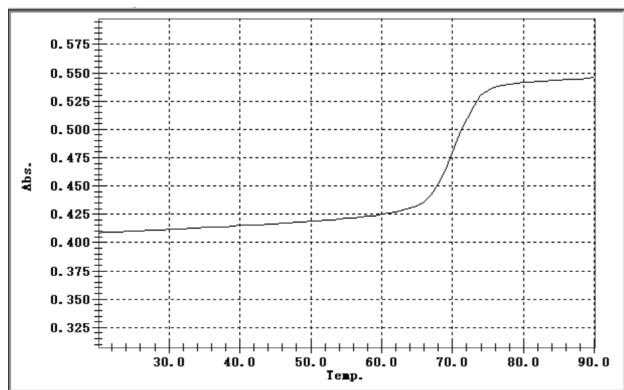


图 3 样品 1 的 Tm 曲线

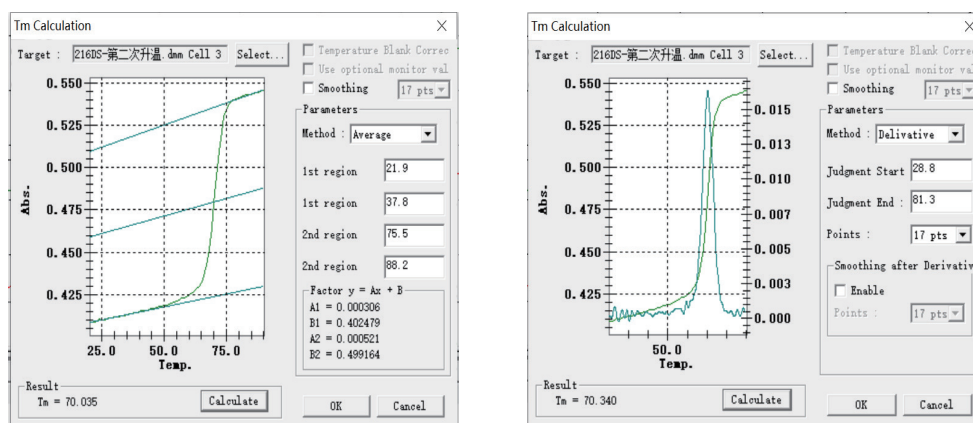


图 4 样品 1 的 Tm 计算方法（左边中线法，右边导数法）

2.2 样品 1 测试结果

表 2 样品 1 测试结果

计算方法	Tm (°C)
中线法	70.035
微分法	70.340

2.3 样品 2 测试曲线

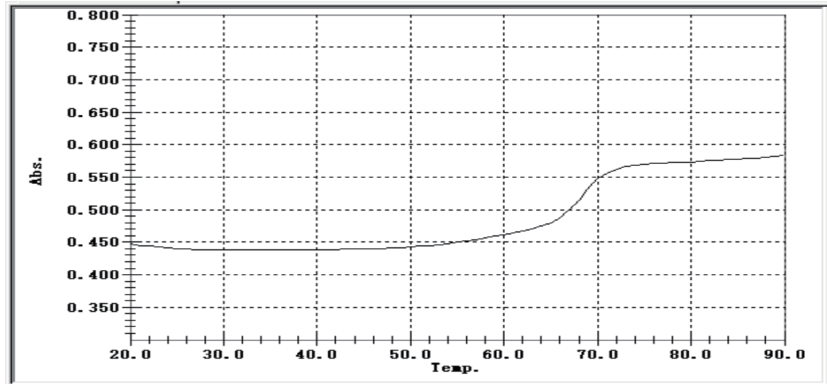


图 5 样品 2 的 Tm 曲线

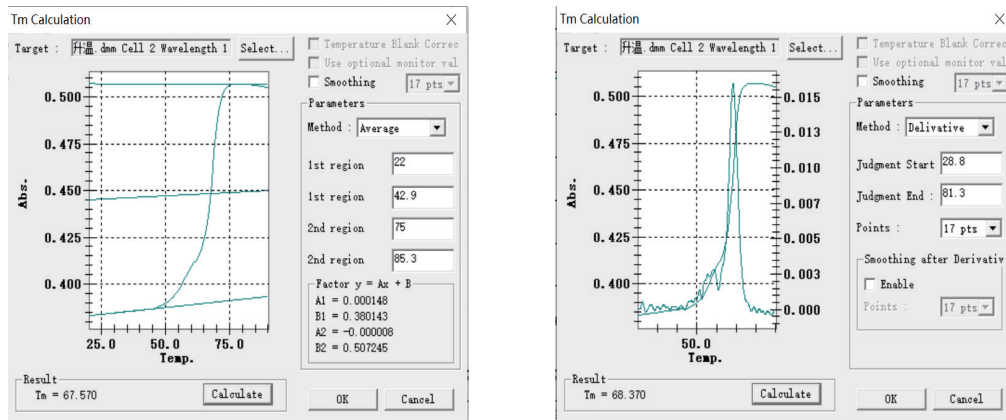


图 6 样品 1 的 Tm 计算方法 (左边中线法, 右边导数法)

2.4 样品 2 测试结果

表 3 样品 2 测试结果

计算方法	Tm (°C)
中线法	67.570
微分法	68.370

2.5 结果分析

图 3 和图 5 显示了通过 Tm 分析软件测定获得的核酸样品 Tm 曲线, 绘制 260 nm 处的吸光度对温度曲线, 显示了升温时的结果, 吸光度随温度升高而增大。

Tm 值通过中线法和微分法两种计算方法进行了计算。在中线法中, 对前跃迁区域、后跃迁区域中选择的每个区间分别绘制切线, 并计算两条切线的中线与吸光度曲线的交点作为 Tm 值 (解链温度)。在微分法中, 对设定区间内的各设定点数进行一阶微分运算, 计算显示其最大值的位置的温度作为 Tm 值 (解链温度)。

■ 结论

本文使用紫外可见分光光度计 UV-1900i 和 Tm 分析系统 (TMSPC-8) 进行了核酸的热稳定性分析 (Tm 分析), 专用 8 联微量比色皿可以同时最多测定 8 个样品。利用本系统, 测试得到 260 nm 处吸光度随温度升高的变化曲线, 通过中线法和微分法两种方法计算出 Tm 值, 对核酸药物热稳定性评价起到指导作用。

岛津应用云

