

使用 Tm 分析系统 (TMSPC™-8) 分析核酸药物的热稳定性

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,热稳定性分析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) 进行了核酸的热稳定性分析 (Tm 分析)。通过使用本系统,可以很容易地计算出核酸的 Tm 值。

A. Goto

核酸的热性质

核酸 (DNA、RNA) 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 (Melting Temperature; 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,吸收值在解链过程中增加 (图 1)。Tm 分析系统测定该吸光度变化,以确定 Tm 值。

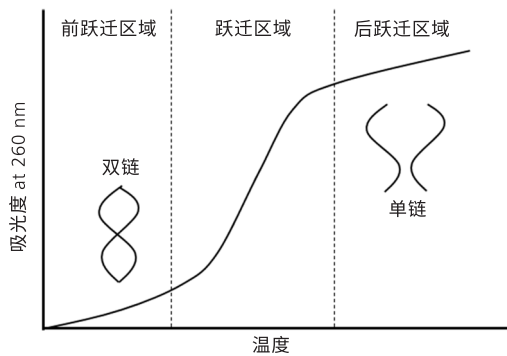


图 1 核酸的 Tm 曲线

Tm 分析系统 (TMSPC-8)

图 2 为 UV-1900i 和 Tm 分析系统 (TMSPC-8) 图片。本系统由 8 列电子冷却池支架、专用 8 列微量比色池 (光程 10 mm、1 mm)、温度控制器和 Tm 分析软件构成,最多可同时测定 8 个样品。

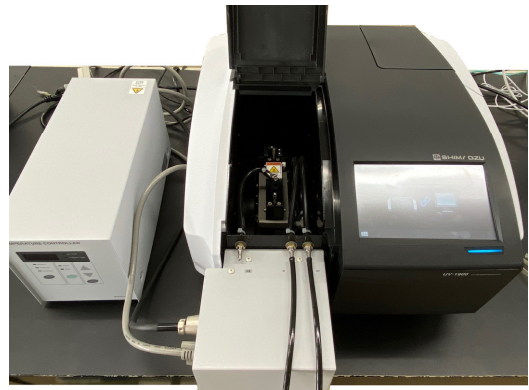


图 2 UV-1900i 和 Tm 分析系统 (TMSPC-8)

通过 TMSPC-8 进行核酸的 Tm 分析

本文使用了一种 M13-25mer 核酸作为样品。

首先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)。此外,退火是确保正义链和反义链双链结构完全形成必需的条件。这里退火条件是温度保持在 95°C 10 分钟以上,然后以 2°C/min 的速度降温。

专用 8 列微量比色池的光程有 10 mm 和 1 mm 两种,可根据样品的吸光度 (浓度) 来选择。这里配置的样品浓度,使用光程为 10 mm 的比色池 (图 3),在 260 nm 处的吸光度为 0.5 ~ 1。按照表 1 的测定条件进行了测定。

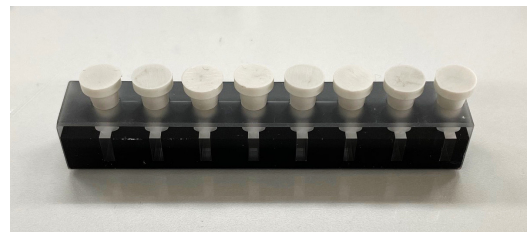


图 3 专用 8 列微量比色池 (光程 10 mm)

表 1 测定条件

分析仪器	UV-1900i、Tm 分析系统 TMSPC-8
◆测定参数	
测定波长	: 260 nm/320 nm *1
狭缝宽	: 1.0 nm
池空白校正	: 启用
◆温度参数	
起始温度	: 15 °C
起始保留时间	: 1800 秒
升温速率	: 1.0 °C / 分
等待测定	: 45 秒
测定间隔	: 0.5 °C
结束温度	: 95 °C

*1 320 nm 不是核酸吸收波长，作为基线减去此处的吸光度。可减少不同比色池的偏差，获得偏差较小的数据。

图 4 显示了通过 Tm 软件测定获得的 TM 曲线（绘制 260 nm 处的吸光度对温度曲线）显示了升温时和降温时的结果。从图 4 可以看出，吸光度随温度升高而增大。此外，溶解曲线按照温度升序排列可分为三个区域，即前跃迁区域、跃迁区域和后跃迁区域。前跃迁区域、后跃迁区域中，双链和单链分别过量存在。

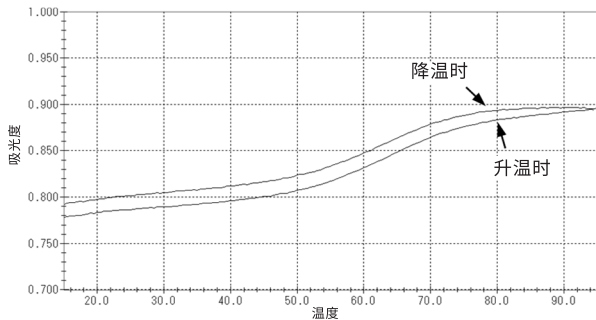


图 4 样品的 TM 曲线

Tm 值通过中线法和微分法两种计算方法进行了计算。表 2 结果为通过两种分析所得到的 Tm 值的结果。升温时和降温时得到了等效的结果。

表 2 Tm 分析的结果

计算方法	Tm 值 (°C)	
	升温	降温
中线法	63.58	63.56
微分法	63.68	64.10

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）。如图 5 所示，任意设置前跃迁区域和后跃迁区域，得出 Tm 值。

另一方面，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作为 Tm 值（解链温度）。如图 6 所示，任意设置判定区域，得出 Tm 值。

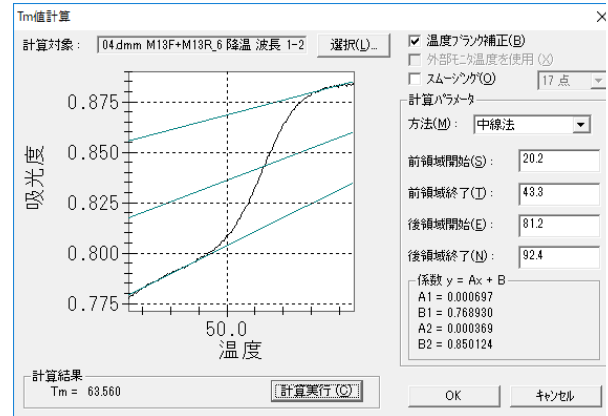


图 5 基于中线法的分析

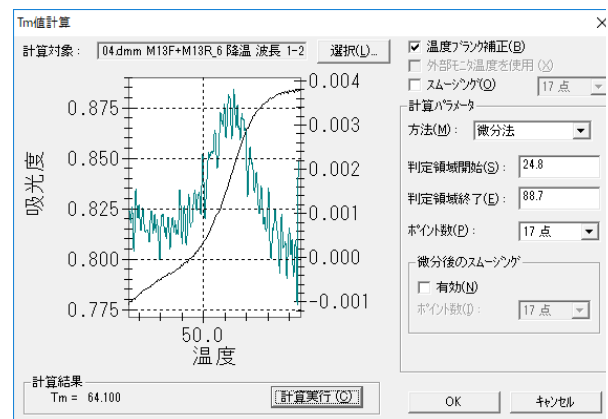


图 6 基于微分法的分析

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)。利用本系统，通过测定 260 nm 处吸光度随温度升高的变化来计算了 Tm 值。此外，使用专用 8 列微量比色池可以同时最多测定 8 个样品。

根据测定得到的 TM 曲线，通过中线法和微分法两种计算方法计算出 Tm 值。

TMSPC 为岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2020 年 4 月