

使用ThermoFisher Lumina荧光分光光度计 测量寡核苷酸的溶解温度

关键词

荧光分光光度计、热变性、寡核苷酸、溶解温度、荧光共振能量转移（FRET）

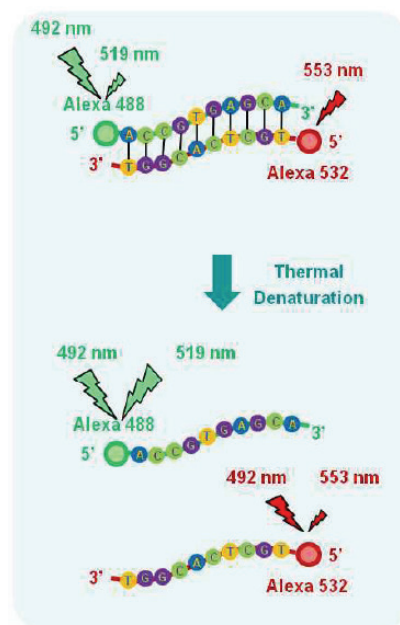
简介

在生物化学领域中，生物材料的热学性能研究是材料分析的重要组成部分。而溶解温度（ T_M ）是生物材料中应用最广泛的热学性能。¹

生物材料由许多化学键组成，随着温度的升高，材料内能增加同时化学键断裂。这种因化学键断裂而导致生物材料结构改变的现象被称作热变性。此外，最活跃时的变性温度被称为溶解温度。溶解温度是用于表征材料稳定性的指标之一。

寡核苷酸是一种遗传物质，由多组碱基构成。寡核苷酸可以很容易地和它们的互补对链接，所以常用来作为探针确定DNA或RNA的结构，经常用于基因芯片、电泳、荧光杂交等过程中。

如图1所示，我们将Alexa Fluor® 488 荧光探针标记在寡核苷酸的5'端部，将Alexa Fluor® 532 荧光探针连接在另一端。



本实验采用Thermo Fisher公司的lumina荧光分光光度计配备 Peltier 温控系统（图2）对不同温度下的荧光性能进行了测量。Peltier温控系统可快速精准地对温度进行调节，温度范围可控制在-10℃到100℃。该系统有样品除霜功能、磁力搅拌功能和温控功能。

本研究采用 Lumina 和 Peltier系统，结合荧光标记，研究了寡核苷酸荧光强度与温度的关系。最终根据一阶导数分析熔点曲线并计算出了 T_M 值。



图 2: Peltier 系统配件 (单池池架 (a)、4 联池池架 (b)、Peltier 控制模块 (c))

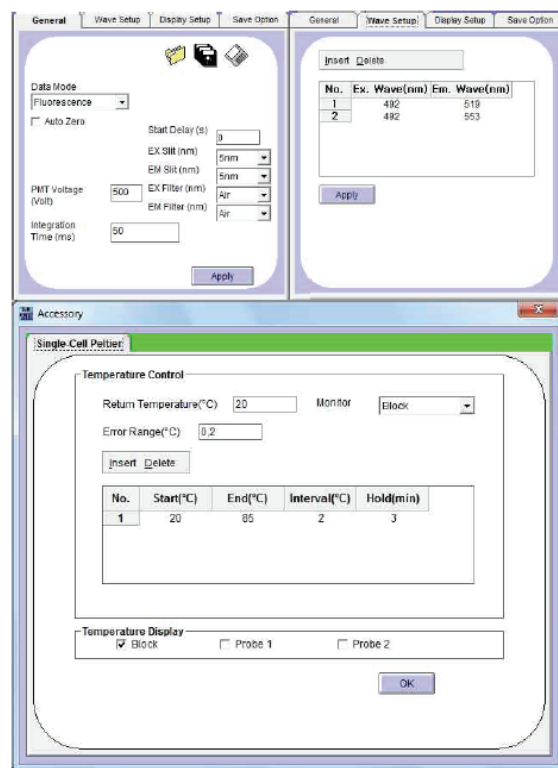
试剂和仪器

1. Lumina 荧光分光光度计
2. Peltier 控制模块、单池池架
3. 供体寡核苷酸
5' - (Alexa 488) - ACCGTGAGCA - 3'
4. 受体寡核苷酸
5' - (Alexa 532) - TGCTCACGGT - 3'
5. Tris-EDTA 缓冲液 (pH 8.0)
6. NaCl (ACS 试剂, $\geq 99.0\%$)
7. 10ml 塑料管
8. 荧光比色皿

实验步骤

1. 添加 10ml 的 Tris-EDTA 缓冲液 (pH 8.0) 到两根塑料管中, 形成浓度分别为 172mM (供体) 和 190mM (受体) 的 NaCl 溶液。
2. 在上述缓冲液中溶解供体/受体寡核苷酸, 使浓度变为 900nM。
3. 混合已制备的供体试剂和受体试剂, 然后在室温下培养 5 分钟。
4. 将 Peltier 系统安装在 Lumina 上。
5. 打开 Luminous 的 Thermal 软件, 如图 3 输入预定参数。使用软件 (Excel®, Origin® 等) 根据供体各测量点数据计算一阶导数, 并在测量后查看 T_M 值。

仪器参数



实验结果

FRET 现象是供体到受体的一种能量转移现象, 这是由于荧光物质受热前荧光探针间距离较短造成的。因此, 在供体激发波长 519nm 处发出较弱的荧光, 在受体的激发波长 553nm 处发出较强的荧光。² 另一方面, 随着受热产生的热变性现象, 与 FRET 现象相反。换句话说, 荧光在 519nm 时较强, 而在 553nm 时较弱 (图 4)。³

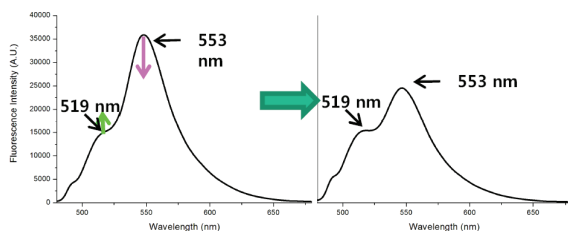


图4: 受热前 (左图, 25°C)、受热后 (右图, 55°C) 热变性荧光强度

如图5所示, 我们绘制了供体、受体荧光强度与温度的关系。可以确认, 供体和受体上发生的荧光强度逆转的情况是由于 FRET 现象消失导致的。

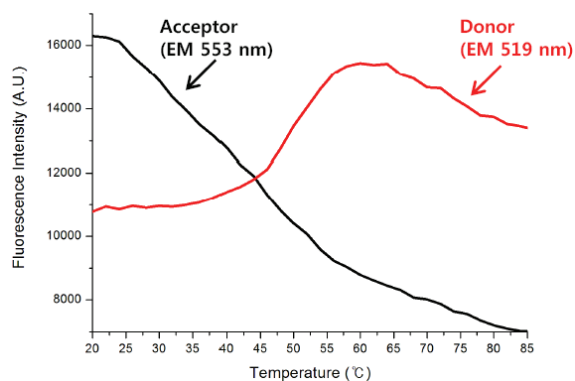


图5: 供体、受体荧光强度与温度的关系

目前有多种方法可以确定 T_M 值, 本实验中我们通过一阶导数的峰值来确定 T_M 值。本次试验所用寡核苷酸的 T_M 值为 49°C。(图6)

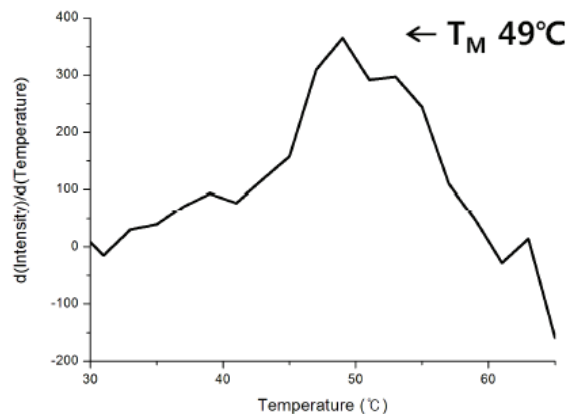


图6: 荧光强度随温度而改变

实验结论

本研究中, 使用 Thermo Fisher 公司 Lumina 荧光分光光度计和 Peltier 温控系统, 研究了温度变化对寡核苷酸荧光强度的影响。此外, 根据实验数据计算出代表材料安全性的 T_M 值。

参考文献

1. Frank H Niesen, et al., Nature Protocols, 2, 2212 (2007).
2. Scinco, Application Note, FS2-AN002 (2011)
3. Brian A Pollok, Rogger Heim, Trend in cell biology, 9, 57 (1999).

©2014赛默飞世尔科技。版权所有。所有商标属于赛默飞世尔科技及其子公司。规格、条款和定价或按情况改变。不是所有的国家都能购买到所有的产品。欲知详情，请咨询您当地的销售代表。

赛默飞世尔科技

热线电话：
800 810 5118
400 650 5118
sales.china@thermofisher.com
www.thermofisher.cn

Thermo
S C I E N T I F I C
Part of Thermo Fisher Scientific