

# Lograr velocidades de rampa más rápidas para los experimentos de fusión térmica

Con la ayuda del espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500, se logra el mismo resultado independientemente de la velocidad de rampa



## Autores

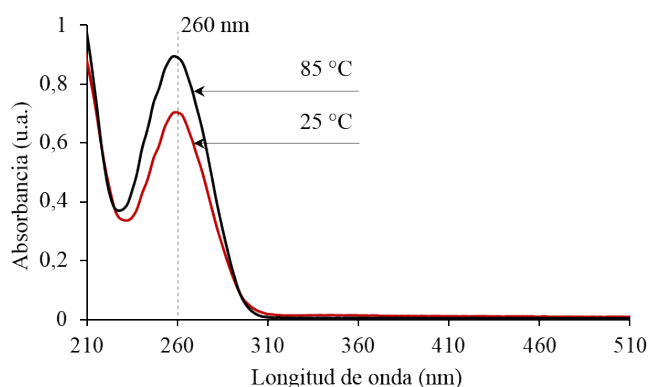
Kevin Grant y Matt Quinn

Agilent Technologies,  
Australia

## Introducción

La separación de los ácidos nucleicos de doble cadena en cadenas simples puede inducirse aumentando la temperatura. A cierta temperatura, los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases se rompen. Los experimentos de fusión térmica aprovechan la diferencia en el número de enlaces de hidrógeno entre los nucleótidos adenosina y timina (A=T) por un lado y guanina y citosina (G=C) por otro en el caso del ADN o entre adenosina y uracilo (A=U) por un lado y G y C por otro en el caso del ARN. Como los nucleótidos G=C contienen tres enlaces de hidrógeno, la energía calorífica requerida para disociarse es mayor que la de los pares de doble enlace. Esto implica que el ADN y ARN que contenga más pares G=C se fundirá a una temperatura más alta. La temperatura de fusión ( $T_m$ ) da una indicación exacta de la composición de base (relación entre G=C y A=T/U=T) en la muestra.

El punto de fusión se mide mediante espectrofotometría UV-Vis, aprovechando que la absorbancia de los ácidos nucleicos de cadena simple es superior a la de los ácidos nucleicos de cadena doble a 260 nm (1). La Figura 1 muestra un ejemplo de ello utilizando una muestra de ARN interferente pequeño (ARNip); la absorbancia a 260 nm es significativamente mayor a 85 °C que a 25 °C.



**Figura 1.** Barrido de longitud de onda de una muestra de ARNip a 25 °C (rojo) y 85 °C (negro).

Los experimentos de fusión térmica se realizan normalmente midiendo la absorbancia a 260 nm. La temperatura de la muestra se aumenta entonces gradualmente bajo condiciones controladas de pH y fuerza iónica. La temperatura suele aumentarse en 0,5 °C por minuto (2, 3, 4). Esta velocidad de rampa de temperatura tan lenta es necesaria para asegurar la exactitud y reproducibilidad de los datos. Desafortunadamente, la baja velocidad de la rampa de temperatura también supone que los experimentos duran mucho tiempo. Por ejemplo, cambiar la temperatura de 20 a 95 °C a 0,5 °C por minuto requiere 2,5 horas. Los laboratorios suelen repetir estas medidas para garantizar resultados reproducibles, por lo que un experimento completo de fusión térmica puede requerir una cantidad de tiempo considerable.

Existen varios planteamientos para reducir el tiempo necesario para la medida de la fusión térmica. Por ejemplo, algunos instrumentos permiten dividir un experimento en etapas, cada una de las cuales utiliza una velocidad de rampa de temperatura diferente. Se puede utilizar una velocidad de rampa rápida en las etapas inicial y final, con una velocidad más lenta en el rango de temperatura en el que la muestra se desnaturaliza.

Los recientes avances en la instrumentación espectrofotométrica ofrecen reducciones importantes en los tiempos transcurridos para las medidas de fusión térmica, así como una precisión en la temperatura más alta de lo que era posible anteriormente.

El espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 3500 Multizone utiliza sondas de temperatura integradas en la cubeta para controlar con precisión la temperatura de las soluciones durante el experimento. El soporte multicelda está integrado en el instrumento y utiliza Peltiers refrigerados por aire y sin agua para controlar la temperatura de las muestras entre 0 y 110 °C.

En este estudio se ha evaluado el impacto del aumento de la velocidad de la rampa de temperatura en la temperatura de fusión ( $T_m$ ) calculada de una muestra de ARNip, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500 Multizone.

## Experimento

### Muestras

La división de soluciones para ácidos nucleicos de Agilent proporcionó una muestra de ARNip. Se preparó una solución de  $\approx 0,3$  mg/ml de ARNip en una disolución tampón que era 100 mM de NaCl, 0,1 mM de EDTA y 10 mM de fosfato de sodio, ajustada a pH 7,0.

Se utilizaron cubetas de cuarzo estándar de 3,5 ml de volumen y 10 mm de longitud del camino óptico. Como solución de referencia se utilizó un tampón fosfato puro.

### Instrumentación y método

Para todas las medidas se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500 Multizone. Los parámetros del método se muestran en la Tabla 1.

El único parámetro que se modificó durante el estudio fue la velocidad de la rampa de temperatura. Se utilizó un total de ocho velocidades de rampa: 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 °C por minuto.

Todas las medidas emplearon al menos tres alícuotas de la muestra, medidas de forma simultánea, en condiciones idénticas. Cada cubeta de muestra se emparejó con una referencia y se colocó en el soporte multicelda de ocho posiciones. Se insertó una sonda de temperatura dentro de cada cubeta de muestra (Figura 2) y se pudo utilizar para controlar la temperatura del experimento.



**Figura 2.** La sonda de temperatura en la cubeta, utilizada para controlar la temperatura del experimento durante las medidas.

Se recogieron datos cada 0,5 °C y la señal se promedió durante 1 segundo antes de registrar cada punto de datos. A una velocidad de rampa de temperatura de 30 °C por minuto, la medida requirió aproximadamente cinco minutos.

El agitador se ajustó a 500 rpm para estas pruebas a fin de garantizar una temperatura suficientemente uniforme en toda la cubeta.

**Tabla 1.** Los parámetros del método.

Parámetro	Ajuste
Longitud de onda (nm)	260
Ancho de banda espectral (nm)	5
Tiempo promedio de la señal (s)	1
Intervalo de datos (°C)	0,5
Temperatura de inicio (°C)	25
Temperatura final (°C)	86
Temperatura de retorno (°C)	25
Número de etapas	1
Tiempo de espera (min)	0,5
Velocidad de rampa de temperatura (°C/min)	Variable
Velocidad de agitación (rpm)	500
N.º de zonas de temperatura	4
Control de temperatura	Sonda de temperatura

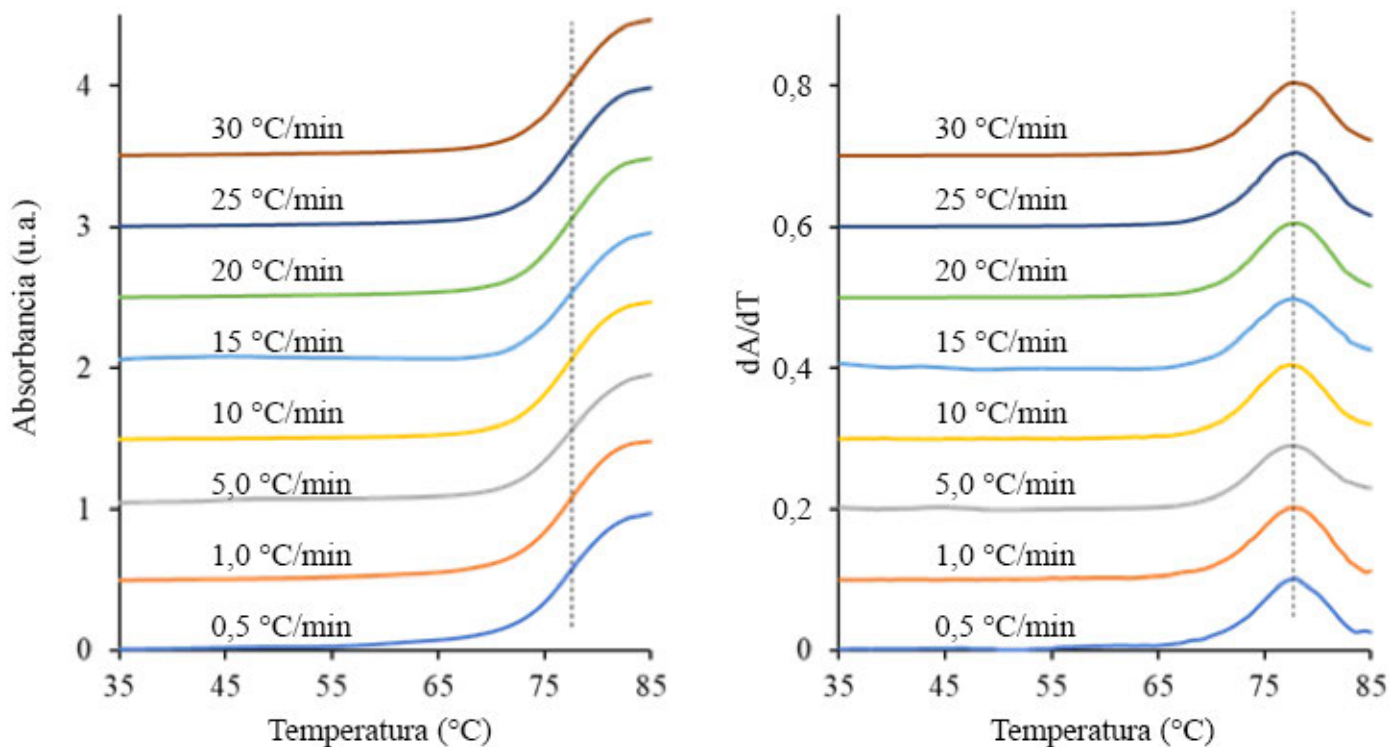
## Resultados y comentarios

### Valores de $T_m$ a diferentes velocidades de rampa de temperatura

Se realizó un análisis de datos en un paquete de software de terceros. Los datos de absorbancia recogidos durante las ocho velocidades de rampa de temperatura se muestran en la Figura 3. Los datos se normalizaron de 0 a 1 unidades de absorbancia y se superpusieron para facilitar su visualización. Se calculó la primera derivada de cada uno, que también se muestra. El pico de cada primer gráfico de derivada identifica el punto medio de la curva de fusión y, por lo tanto, el valor de  $T_m$ .

**Tabla 2.** Los valores de  $T_m$  medidos para la muestra de ARNip en cada velocidad de rampa de temperatura.

	Velocidad de rampa (°C/min)	Réplica 1 $T_m$ °C	Réplica 2 $T_m$ °C	Réplica 3 $T_m$ °C	$T_m$ media (°C) (n=3)
Experimento 1	0,5	78,5	78,5	78,5	78,50
Experimento 2	1	78,5	78,5	78,0	78,33
Experimento 3	5	77,5	78,0	77,5	77,67
Experimento 4	10	78,0	77,5	77,9	77,80
Experimento 5	15	78,4	78,5	77,9	78,27
Experimento 6	20	78,4	78,3	78,5	78,40
Experimento 7	25	78,7	77,8	78,3	78,27
Experimento 8	30	79,0	78,9	78,2	78,70



**Figura 3.** ARNip (izquierda) absorbancia frente a temperatura y (derecha) la primera derivada correspondiente como función de la velocidad de rampa de temperatura.

Como se muestra en la Figura 3 y en la Tabla 2, el valor de  $T_m$  medido de las muestras de ARNip estaba dentro de  $\pm 1$  °C para las ocho velocidades de rampa de temperatura utilizadas en los experimentos.

## Conclusiones

El espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500 Multizone se utilizó para medir el punto de fusión de la misma muestra de ARNip a ocho velocidades de rampa de temperatura diferentes. Los puntos de fusión medidos en cada una de las velocidades de rampa estaban todos dentro de  $\pm 1$  °C. Esto significa que los laboratorios podrían utilizar velocidades de rampa de temperatura más rápidas que el protocolo habitual de 0,5 °C/min. El tiempo de los experimentos puede reducirse considerablemente utilizando una velocidad de rampa más alta sin comprometer el resultado. Este estudio demostró que un experimento que antes duraba 2,5 horas podía medirse en aproximadamente cinco minutos utilizando el sistema Cary 3500. La medida simultánea de al menos tres réplicas de la muestra también representa un ahorro de tiempo considerable.

El uso de rampas rápidas de temperatura se extiende a otras medidas de la absorbancia UV-Vis en función de la temperatura, lo que ofrece importantes beneficios en términos de productividad para los laboratorios que llevan a cabo experimentos con control de temperatura. La capacidad de medir las ocho posiciones de cubetas de forma simultánea ofrece nuevas mejoras de productividad para los laboratorios interesados en estudiar la respuesta de las muestras líquidas a los cambios de temperatura.

## Referencias

1. Thomas, R. Sur l'existence, dans la molécule des acides nucléiques, d'une structure secondaire à liaisons labiles. *Experientia*. **1951**;7(261–262).
2. P.R. Chetana, Ramakrishna Rao, Mithun Roy, Ashis K. Patra, *Inorganica Chimica Acta*, 362, **2009**, pp 4692–4698
3. Ramakrishna Rao, Ashis K. Patra, P.R. Chetana, *Polyhedron*, 27, **2008**, pp 1343–1352
4. Tina M. Davis, Lori McFail-Isom, Elaine Keane y Loren Dean Williams, *Biochemistry*, **1998**, 37, pp 6975-6978

[www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis](http://www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis)

DE44381.8766087963

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.