

# Augmentez les vitesses de montée en température pour les expériences de fusion thermique

Obtenez des résultats fiables quelle que soit la vitesse de montée en température avec le spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500



## Auteurs

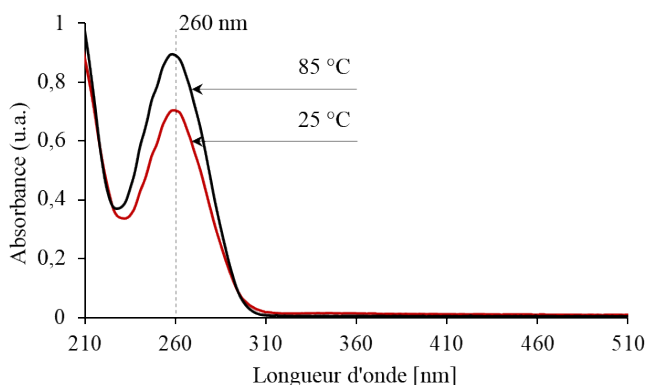
Kevin Grant et Matt Quinn

Agilent Technologies,  
Australie

## Introduction

La séparation des acides nucléiques double brin en simples brins peut être induite par une augmentation de la température. À une certaine température, les liaisons hydrogène entre les paires de bases sont rompues. Une expérience de fusion thermique exploite la différence dans le nombre de liaisons hydrogène entre les nucléotides adénosine et thymine (A=T) et entre guanine et cytosine (G≡C) pour l'ADN, ou entre l'adénosine et l'uracile (A=U) et G et C pour l'ARN. Puisque les paires de nucléotides G≡C contiennent trois liaisons hydrogène, leur dissociation requiert une énergie thermique supérieure à celle des paires à double liaison. Par conséquent, les ADN et ARN contenant un plus grand nombre de paires G≡C se séparent à des températures plus élevées. La température de fusion ( $T_m$ ) est une bonne indication de la composition en bases (le rapport entre les nombres de G≡C et de A=T / U=T) dans un échantillon.

Le point de fusion est mesuré à l'aide de la spectrophotométrie UV-Vis en tirant parti du fait que l'absorbance à 260 nm des acides nucléiques simple brin est supérieure à celle des acides nucléiques double brin (1). La figure 1 en illustre un exemple avec un échantillon de petit ARN interférent (pARNi), pour lequel l'absorbance à 260 nm est notablement plus élevée à 85 °C qu'à 25 °C.



**Figure 1.** Balayage des longueurs d'onde pour un échantillon de pARNi à 25 °C (en rouge) et à 85 °C (en noire).

Les expériences de fusion thermique sont généralement effectuées en mesurant l'absorbance à 260 nm. La température de l'échantillon est augmentée progressivement dans des conditions contrôlées de pH et de force ionique. La température est généralement augmentée de 0,5 °C par minute (2, 3, 4). L'utilisation d'une vitesse de montée en température aussi faible est nécessaire pour assurer l'exactitude et la reproductibilité des données. Mais cette lenteur de la montée en température implique également que les expériences durent longtemps. Par exemple, il faut 2,5 heures pour faire passer la température de 20 à 95 °C avec une augmentation de 0,5 °C par minute. Puisque les laboratoires répètent souvent les mesures pour assurer la reproductibilité des résultats, une expérience de fusion thermique complète peut prendre un temps considérable.

Il existe plusieurs approches pour diminuer le temps nécessaire aux mesures de fusion thermique. Par exemple, certains instruments permettent de décomposer les expériences en plusieurs étapes, avec une vitesse de montée en température différente pour chaque étape. La montée en température peut être rapide pour les étapes initiales et finales et elle peut être ralentie pour la plage de température correspondant à la dénaturation de l'échantillon.

De récentes avancées dans les instruments de spectrophotométrie permettent de réduire de façon importante la durée des mesures de fusion thermique, ainsi que d'atteindre une plus grande précision en température qu'auparavant. Le spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500 multizone permet de régler précisément la température des solutions pendant les expériences avec des sondes de température intégrées aux cuves. Le support multicuve est intégré à l'instrument et utilise des éléments Peltier refroidis à l'air, sans eau, pour régler la température entre 0 et 110 °C.

Dans cette étude, l'effet de l'augmentation de la vitesse de montée en température sur la température de fusion calculée ( $T_m$ ) a été évalué pour un échantillon de pARNi avec le spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 multizone.

## Données expérimentales

### Échantillons

Un échantillon de pARNi a été fourni par la Division de solutions Agilent pour les acides nucléiques. Une solution de  $\approx 0,3$  mg/mL de pARNi a été préparée avec une solution tampon contenant 100 mM de NaCl, 0,1 nM d'EDTA et 10 mM de phosphate de sodium. Le pH a été ajusté à 7,0.

Des cuves standard en quartz de 3,5 mL de volume et de 10 mm de trajet optique ont été utilisées. Un tampon phosphate pur a été utilisé comme solution de référence.

### Instrumentation et méthode

Toutes les mesures ont été réalisées sur un spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 multizone. Les paramètres de la méthode sont indiqués dans le tableau 1.

La vitesse de montée en température est le seul paramètre à avoir été modifié durant l'étude. Un nombre total de huit vitesses de montée en température a été utilisé : 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25 et 30 °C par minute.

Au moins trois aliquotes de l'échantillon mesurées simultanément et dans des conditions identiques ont été utilisées pour toutes les expériences. Chaque cuve d'échantillon était placée avec une cuve de solution de référence dans le support multicuve à huit positions. Chaque cuve d'échantillon contenait une sonde de température interne (figure 2) qui pouvait être utilisée pour régler la température expérimentale.



**Figure 2.** Sonde de température interne utilisée dans chaque cuve pour régler la température expérimentale pendant les mesures.

Les données ont été collectées tous les 0,5 °C et la moyenne du signal a été effectuée sur 1 seconde avant l'enregistrement de chaque point de données. Avec une vitesse de montée en température de 30 °C par minute, les mesures prenaient environ 5 minutes.

Les tests ont été effectués avec une agitation de 500 tr/min afin de garantir une homogénéité de la température suffisante dans l'ensemble de la cuve.

**Tableau 1.** Paramètres de la méthode.

Paramètre	Valeur
Longueur d'onde (nm)	260
Bande passante spectrale (nm)	5
Durée d'intégration du signal (s)	1
Intervalle d'échantillonnage (°C)	0,5
Température initiale (°C)	25
Température finale (°C)	86
Température de retour (°C)	25
Nombre d'étapes	1
Durée du palier (min)	0,5
Vitesse de montée en température (°C/min)	Variable
Vitesse d'agitation (tr/min)	500
Nombre de zones de température	4
Régulation de la température	Sonde de température

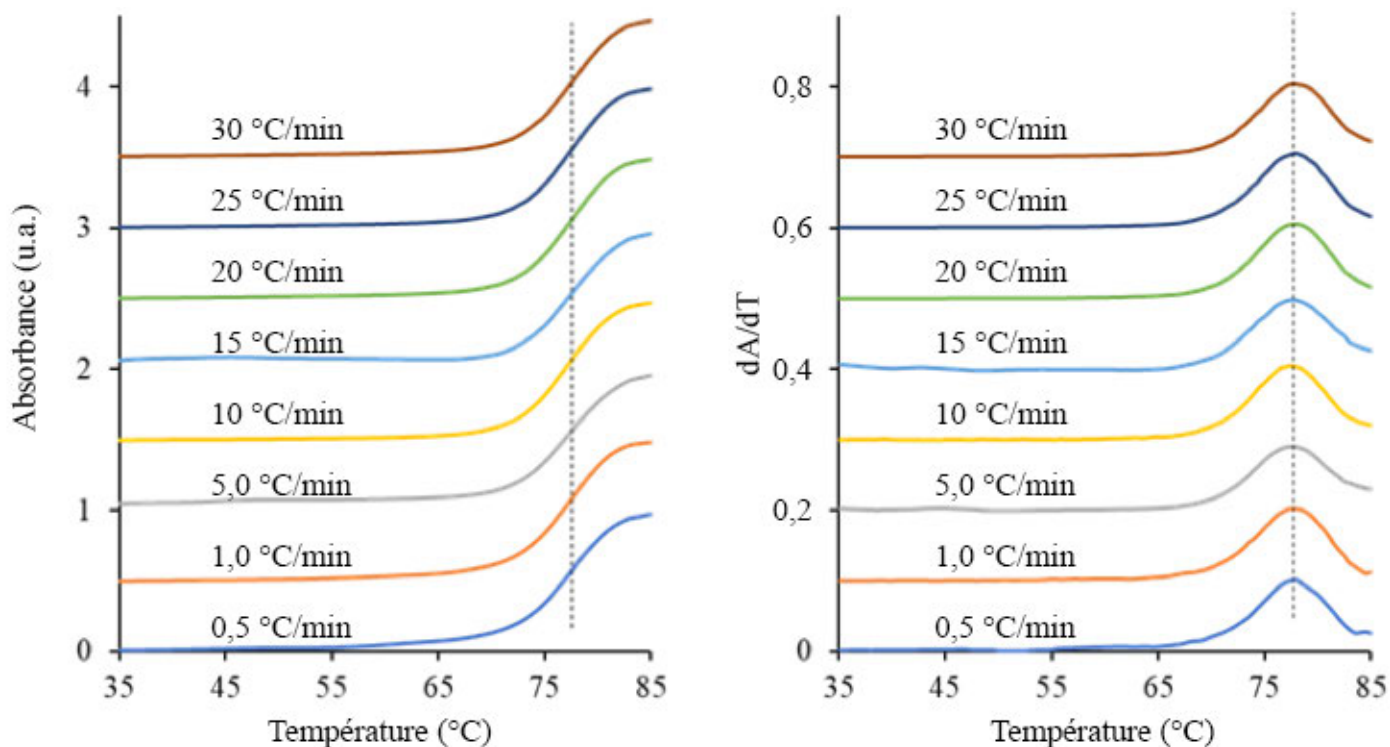
## Résultats et discussion

### Valeurs de $T_m$ pour différentes vitesses de montée en température

L'analyse des données a été réalisée dans des logiciels tiers. Les données d'absorbance collectées pour les huit vitesses de montée en température sont illustrées dans la figure 3. Les données ont été normalisées de 0 à 1 unité d'absorbance et empilées pour en faciliter la visualisation. La dérivée première a été calculée pour chaque expérience et est également représentée. Le pic de chaque dérivée première correspond au point intermédiaire de la courbe de fusion et donc à la valeur de  $T_m$ .

**Tableau 2.** Valeurs de  $T_m$  de l'échantillon de pARNi mesurées pour chaque vitesse de montée en température.

	Vitesse de montée en température (°C/min)	Réplicat 1 $T_m$ °C	Réplicat 2 $T_m$ °C	Réplicat 3 $T_m$ °C	$T_m$ moyenne (°C) (n=3)
Expérience 1	0,5	78,5	78,5	78,5	78,50
Expérience 2	1	78,5	78,5	78,0	78,33
Expérience 3	5	77,5	78,0	77,5	77,67
Expérience 4	10	78,0	77,5	77,9	77,80
Expérience 5	15	78,4	78,5	77,9	78,27
Expérience 6	20	78,4	78,3	78,5	78,40
Expérience 7	25	78,7	77,8	78,3	78,27
Expérience 8	30	79,0	78,9	78,2	78,70



**Figure 3.** Absorbance du pARNi par rapport à la température (à gauche) et dérivée première correspondante (à droite) en fonction de la vitesse de montée en température.

Comme illustré dans la figure 3 et dans le tableau 2, les valeurs de  $T_m$  de l'échantillon de pARNi n'ont pas différé de plus de  $\pm 1$  °C pour les huit vitesses de montée en température utilisées dans les expériences.

## Conclusions

Le spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 multizone a été utilisé pour mesurer le point de fusion du même échantillon de pARNi avec huit vitesses de montée en température différentes. Les points de fusion pour chaque vitesse de montée en température n'ont pas différé de plus de  $\pm 1$  °C. Les laboratoires peuvent donc utiliser des vitesses de montée en température plus rapides que la vitesse de 0,5 °C/min des protocoles courants. La durée des expériences a pu être réduite considérablement à l'aide d'une plus grande vitesse de montée en température, sans compromis sur la qualité des résultats. Cette étude a démontré qu'une expérience qui prenait 2,5 heures auparavant peut désormais être réalisée en environ 5 minutes avec le Cary 3500. La mesure simultanée d'au moins trois réplicats de l'échantillon représente également un gain de temps important.

L'utilisation de vitesses de montée en température rapides peut s'appliquer à d'autres mesures d'absorbance UV-Vis en fonction de la température, offrant d'importants gains de productivité pour les laboratoires qui effectuent des expériences à température régulée. La possibilité de mesurer les huit positions de cuves simultanément permet encore d'améliorer la productivité pour les laboratoires étudiant les effets des variations de la température sur les échantillons liquides.

## Références

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, and Loren Dean Williams, *Biochemistry*, **1998**, 37, pp 6975-6978

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

DE44381.8766087963

Ces informations peuvent être soumises à des modifications sans préavis.