

## Velocità di rampa più elevate per gli esperimenti di fusione termica

Lo stesso risultato ottenuto indipendentemente dalla velocità di rampa, utilizzando lo spettrofotometro UV-Vis Cary 3500



### **Autori**

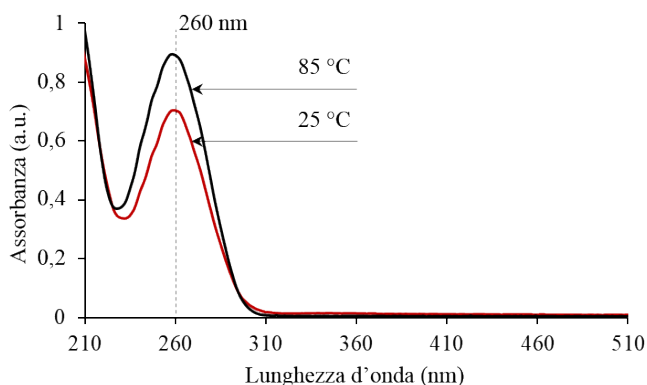
Kevin Grant e Matt Quinn

Agilent Technologies,  
Australia

### **Introduzione**

La separazione degli acidi nucleici a doppio filamento in singoli filamenti può essere indotta mediante innalzamento della temperatura. Il legame a idrogeno tra le coppie di basi si rompe a una determinata temperatura. Un esperimento di fusione termica trae vantaggio dalla differenza nel numero di legami a idrogeno presenti tra i nucleotidi adenosina e timina (A=T) e guanina e citosina (G≡C) per il DNA oppure fra adenosina e uracile (A=U) e G e C per RNA. Poiché i nucleotidi G≡C contengono tre legami a idrogeno, l'energia termica necessaria per la loro dissociazione è maggiore di quella per le coppie a doppio legame. Questo significa che la fusione del DNA e dell'RNA contenenti più coppie G≡C avverrà a una temperatura più alta. La temperatura di fusione ( $T_m$ ) fornisce un'indicazione accurata della composizione in basi (rapporto di G≡C vs A=T / U=T) nel campione.

Il punto di fusione viene misurato con la spettrofotometria UV-Vis, utilizzando il fatto che a 260 nm l'assorbanza degli acidi nucleici a filamento singolo è più elevata di quella degli acidi nucleici a doppio filamento (1). La Figura 1 mostra un esempio su un campione di piccolo RNA interferente (siRNA, short interfering RNA); l'assorbanza a 260 nm è significativamente superiore a 85 °C, rispetto a 25 °C.



**Figura 1.** Scansione delle lunghezze d'onda di un campione di siRNA a 25 °C (rosso) e 85 °C (nero).

Gli esperimenti di fusione termica tipicamente sono eseguiti misurando l'assorbanza a 260 nm. La temperatura del campione viene quindi gradualmente aumentata in condizioni controllate di pH e forza ionica. La temperatura è generalmente aumentata di 0,5 °C al minuto (2, 3, 4). La bassa velocità di rampa della temperatura è necessaria per garantire accuratezza e riproducibilità dei dati. Purtroppo, a causa delle basse velocità di rampa l'esecuzione degli esperimenti richiede molto tempo. Per esempio, la transizione da 20 a 95 °C con variazioni di 0,5 °C al minuto avviene in 2,5 ore. Per garantire la riproducibilità dei risultati, spesso i laboratori ripetono tali misure: di conseguenza un esperimento di fusione termica completo può richiedere una notevole quantità di tempo.

Esistono vari approcci per ridurre il tempo impiegato per le misurazioni di fusione termica. Per esempio, alcune strumentazioni consentono di suddividere un esperimento in più fasi, in cui per ciascuna fase viene utilizzata una velocità di rampa della temperatura diversa. Una velocità di rampa elevata viene utilizzata nelle fasi iniziali e finali, con una velocità più bassa nell'intervallo di temperatura in cui avviene la denaturazione del campione.

I recenti progressi nella strumentazione spettrofotometrica consentono riduzioni significative nei tempi impiegati per le misurazioni di fusione termica, nonché una maggiore accuratezza delle temperature mai raggiunta in precedenza. Lo spettrofotometro UV-Vis Agilent Multizone Cary 3500 utilizza sonde di temperatura integrate all'interno della cuvetta, per il controllo accurato della temperatura delle soluzioni nel corso dell'esperimento. Il supporto multicella integrato utilizza il sistema Peltier in assenza d'acqua e con raffreddamento ad aria per controllare la temperatura dei campioni da 0 a 110 °C.

In questo studio è stato valutato l'impatto dell'aumento della velocità di rampa sulla temperatura di fusione calcolata ( $T_M$ ) di un campione di siRNA, utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis Multizone Cary 3500.

## Condizioni sperimentali

### Campioni

Un campione di siRNA è stato fornito dalla Divisione Agilent Soluzioni per gli acidi nucleici. Una soluzione di  $\approx 0,3$  mg/mL di siRNA è stata preparata in una soluzione tampone contenente 100 mM di NaCl, 0,1 nM EDTA e 10 mM di fosfato di sodio, portata a pH 7,0.

Si sono utilizzate cuvette in quarzo standard, da 3,5 mL, con lunghezza del percorso ottico di 10 mm. Il tampone fosfato puro è stato utilizzato come soluzione di riferimento.

### Strumentazione e metodo

Per tutte le misurazioni è stato usato uno spettrofotometro UV-Vis Multizone Cary 3500. I parametri del metodo sono riportati nella Tabella 1.

La velocità di rampa della temperatura è l'unico parametro che è stato modificato durante lo studio. Complessivamente sono state utilizzate otto velocità di rampa: 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, e 30 °C al minuto.

Per tutte le misurazioni sono state usate almeno tre aliquote del campione, misurate simultaneamente, in condizioni identiche. Ciascuna cuvetta del campione è stata accoppiata a una cuvetta standard e collocata nel supporto multicella a otto posizioni. Una sonda di temperatura è stata inserita in ciascuna cuvetta campione (Figura 2) e utilizzata per controllare la temperatura sperimentale.



**Figura 2.** La sonda di temperatura all'interno della cuvetta, utilizzata per controllare la temperatura sperimentale durante le misurazioni.

I dati sono stati raccolti ogni 0,5 °C e la media del segnale è stata calcolata per 1 secondo, prima di passare alla registrazione di ciascun dato. A una velocità di rampa della temperatura di 30 °C al minuto, la misurazione è avvenuta in circa cinque minuti.

Per queste prove, l'agitazione è stata impostata a 500 rpm in modo da garantire una temperatura nella cuvetta sufficientemente uniforme.

**Tabella 1.** I parametri del metodo.

Parametro	Impostazione
Lunghezza d'onda (nm)	260
Larghezza dello spettro (nm)	5
Tempo per la media del segnale (s)	1
Intervallo dati (°C)	0,5
Temperatura iniziale (°C)	25
Temperatura finale (°C)	86
Temperatura di ritorno (°C)	25
Numero di fasi	1
Tempo di mantenimento (min)	0,5
Velocità di rampa della temperatura (°C/min)	Variabile
Velocità di agitazione (rpm)	500
Numero delle zone di temperatura	4
Controllo della temperatura	Sonda di temperatura

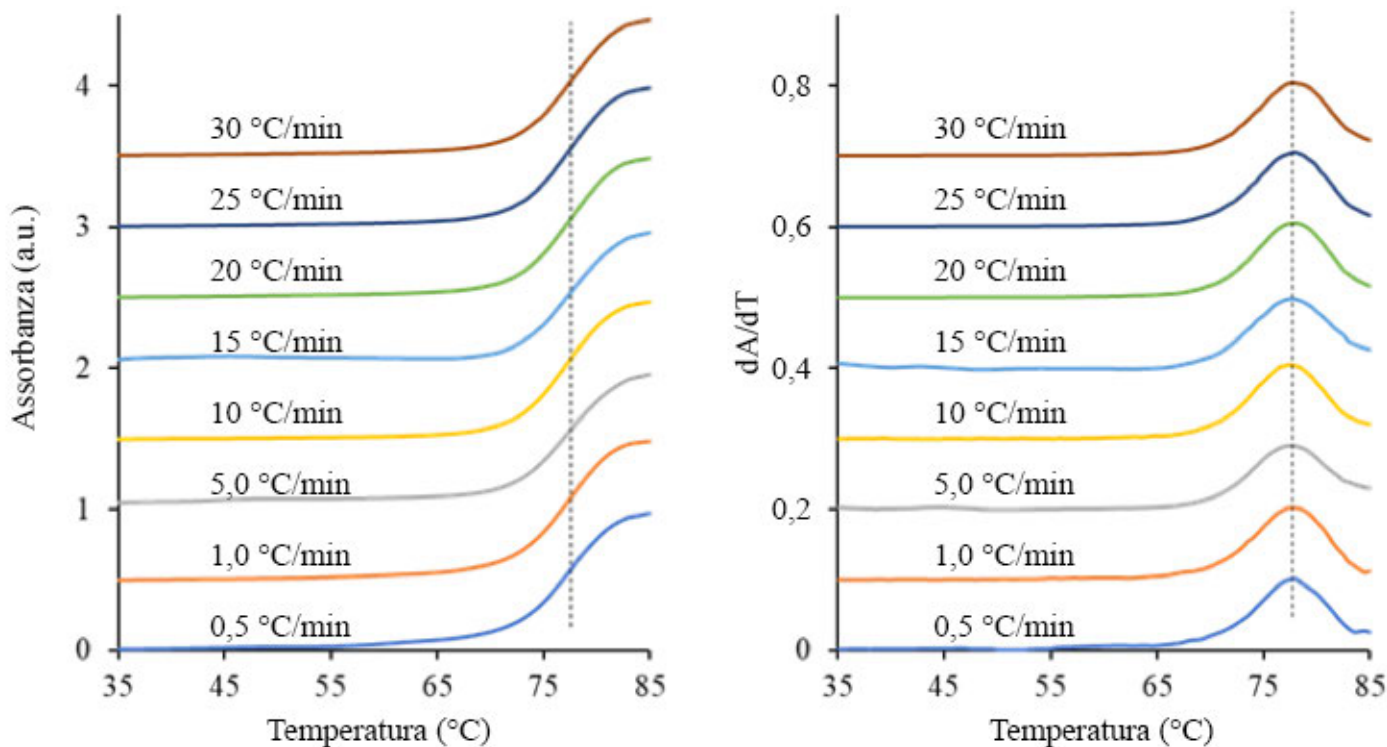
## Risultati e discussione

### Valori di $T_m$ a diverse velocità di rampa della temperatura

L'analisi dei dati è stata eseguita con un pacchetto software di terze parti. I dati di assorbanza raccolti alle otto velocità di rampa della temperatura sono mostrati in Figura 3. I dati sono stati normalizzati da 0 a 1 unità di assorbanza e sovrapposti per facilitarne la visualizzazione. Inoltre è stata calcolata la derivata prima di ciascuna temperatura come mostrato in figura. Il picco di ciascuna curva nel grafico delle derivate identifica il punto centrale della curva di fusione e quindi il valore di  $T_m$ .

**Tabella 2.** I valori misurati di  $T_m$  per il campione di siRNA a ciascuna velocità di rampa della temperatura.

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



**Figura 3.** Assorbanza dell'SiRNA (a sinistra) in funzione della temperatura e (a destra) la derivata prima corrispondente in funzione della velocità di rampa della temperatura.

Come mostrato in Figura 3 e in Tabella 2, il valore misurato di  $T_m$  dei campioni di siRNA era compreso tra  $\pm 1$  °C per le otto velocità di rampa della temperatura utilizzate negli esperimenti.

## Conclusioni

Lo spettrofotometro UV-Vis Multizone Cary 3500 è stato usato per misurare il punto di fusione dello stesso campione di siRNA a otto diverse velocità di rampa della temperatura. I punti di fusione misurati in corrispondenza di ciascuna delle velocità di rampa erano tutti compresi tra  $\pm 1$  °C. Questo significa che i laboratori possono utilizzare velocità di rampa della temperatura più alte rispetto al comune protocollo di 0,5 °C/min. È possibile ridurre significativamente la durata degli esperimenti utilizzando una velocità di rampa più alta senza compromettere il risultato. Questo studio ha dimostrato che un esperimento, che in passato richiedeva 2,5 ore, potrebbe essere completato in circa cinque minuti utilizzando Cary 3500. Anche la misurazione simultanea di almeno tre replicati del campione contribuisce a un ulteriore e notevole risparmio di tempo.

Alte velocità di rampa della temperatura possono essere adottate anche in altre misurazioni dell'assorbanza nello spettro UV-Vis in funzione della temperatura, offrendo notevoli vantaggi in termini di produttività per i laboratori che effettuano esperimenti a temperatura controllata. Il fatto di poter di misurare tutte le otto posizioni delle cuvette contemporaneamente offre ulteriori miglioramenti della produttività per i laboratori interessati nello studio della risposta di campioni liquidi alle variazioni di temperatura.

## Bibliografia

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

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.