

# Determinación rápida de la temperatura de fusión térmica de los ácidos nucleicos bicatenarios mediante espectroscopía UV-vis

Datos reproducibles de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) a velocidades de rampa rápidas utilizando el sistema UV-vis Agilent Cary 3500

## **Autores**

Wesam Alwan y  
Mathieu Rault  
Agilent Technologies, Inc.

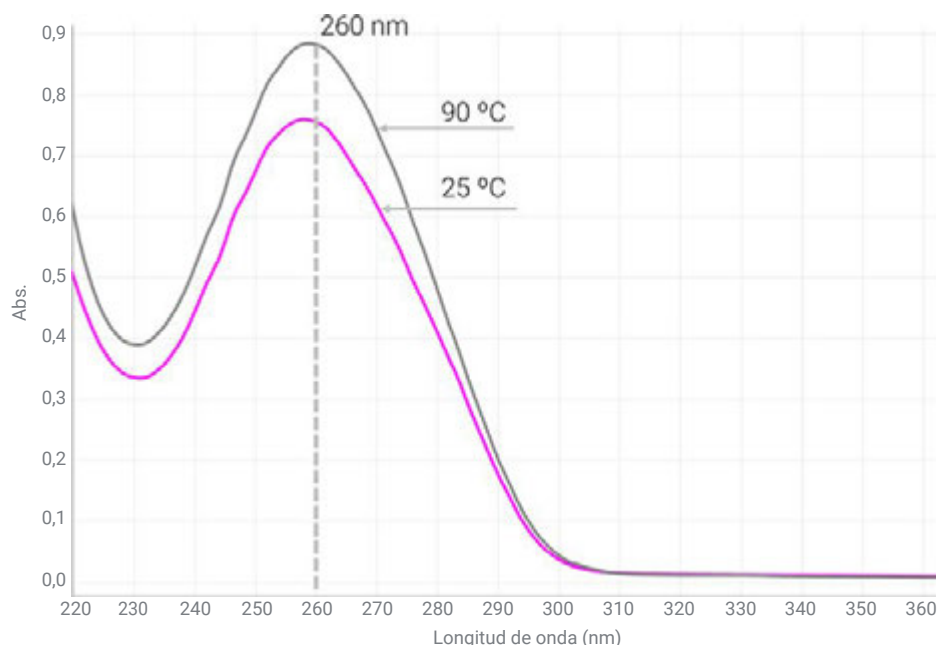


## Introducción

La separación de los ácidos nucleicos bicatenarios en cadenas simples puede inducirse aumentando la temperatura. A cierta temperatura, los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases se rompen. Un experimento de fusión térmica aprovecha la diferencia en el número de enlaces de hidrógeno entre nucleobases. Por ejemplo, los 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 guanina y citosina por otro en el caso del ARN. Como los nucleótidos G=C contienen tres enlaces de hidrógeno, la energía calorífica requerida para disociar la unión G=C es mayor que la de los pares de doble enlace. El ADN y ARN que contenga más pares G=C se fundirá a una temperatura más alta. Por lo tanto, 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.

Durante el descubrimiento, desarrollo y fabricación de fármacos de ácidos nucleicos, los investigadores y fabricantes suelen utilizar la  $T_m$  como prueba de identificación secundaria (control de calidad). El punto de fusión suele medirse por espectrofotometría UV-vis, ya que la absorbancia de los ácidos nucleicos monocatenarios es mayor que la de los bicatenarios a 260 nm, el pico máximo de absorción de los ácidos nucleicos<sup>1</sup>. Tomando como ejemplo el ADN de espermatozoides de arenque, la Figura 1 muestra que la absorbancia a 260 nm es significativamente mayor a 90 °C que a 25 °C.

Los experimentos de fusión térmica de ácidos nucleicos se realizan normalmente midiendo la absorbancia a 260 nm. La temperatura de la muestra se aumenta gradualmente en condiciones controladas de pH y fuerza iónica, normalmente utilizando una velocidad de rampa de 0,5 °C por minuto<sup>2-4</sup>. Se utiliza una baja velocidad de la rampa de temperatura para garantizar que los datos sean precisos y reproducibles.



**Figura 1.** Barrido de longitudes de onda de una muestra de ADN de esperma de arenque a 25 °C (bicatenario, morado) y 90 °C (monocatenario, gris).

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.

Sin embargo, los experimentos de reordenación deben realizarse a un ritmo más lento para dar tiempo a la reordenación completa de los ácidos nucleicos monocatenarios.

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 los experimentos de fusión térmica. Se utilizan dispositivos Peltier 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  $T_m$  calculada de una muestra de ADN de esperma de arenque, utilizando un espectrofotómetro UV-vis Cary 3500 Multizone.

## Experimento

### Muestras

Se preparó una solución de aproximadamente 15 µg/ml de ADN de esperma de arenque (D6898) en solución salina tamponada con fosfato (tampón fosfato 0,01 M, cloruro potásico 0,0027 M y cloruro sódico 0,137 M, pH 7,4, a 25 °C). Como solución de referencia (blanco) se utilizó solución salina neta tamponada con fosfato. Se utilizaron celdas semimicro de cuarzo de Agilent (número de parte 5063-6559) con sonda de temperatura (número de parte G9889-60005), 600 µl de volumen de muestra y 10 mm de longitud de paso óptico (Figura 2). Para minimizar la evaporación de la muestra, se hicieron flotar unas gotas de aceite mineral (FS-SMO15) sobre la muestra en la cubeta.

### Instrumentos y método

Se controló un espectrofotómetro UV-vis Cary 3500 Multizone utilizando el software Agilent Cary UV Workstation. Las mediciones se realizaron utilizando los parámetros del método indicados 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 seis velocidades de rampa: 1, 5, 10, 20, 30 y 40 °C/min. 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 introdujo una sonda de temperatura en cada cubeta de muestra (Figura 2) y se utilizó la retroalimentación de la sonda para controlar la temperatura experimental.

Se recogieron datos cada 1 °C y la señal se promedió durante 0,1 segundos antes de registrar cada punto de datos. A una velocidad de rampa de temperatura de 30 °C por minuto, la medida requirió aproximadamente 10 minutos.

Tabla 1. Parámetros del método UV-vis Agilent Cary 3500.

Parámetro	Ajuste
Longitud de onda	260 nm
Tiempo promedio de la señal	0,1 s
Intervalo de datos	1 °C
Temperatura de inicio	25 °C
Temperatura final	100 °C
Temperatura de retorno	25 °C
Velocidad de la rampa de temperatura	1, 5, 10, 20, 30 y 40 °C/min
Número de etapas	1
Control de temperatura	Sonda de temperatura
Filtro de suavizado	11
Intervalo de datos de suavizado	0,5 °C
Filtro de derivada	11
Intervalo de datos de la derivada	0,5 °C



Figura 2. Celda semimicro de Agilent (1) y sonda de temperatura en la cubeta (2) utilizadas para controlar la temperatura del experimento durante las medidas.

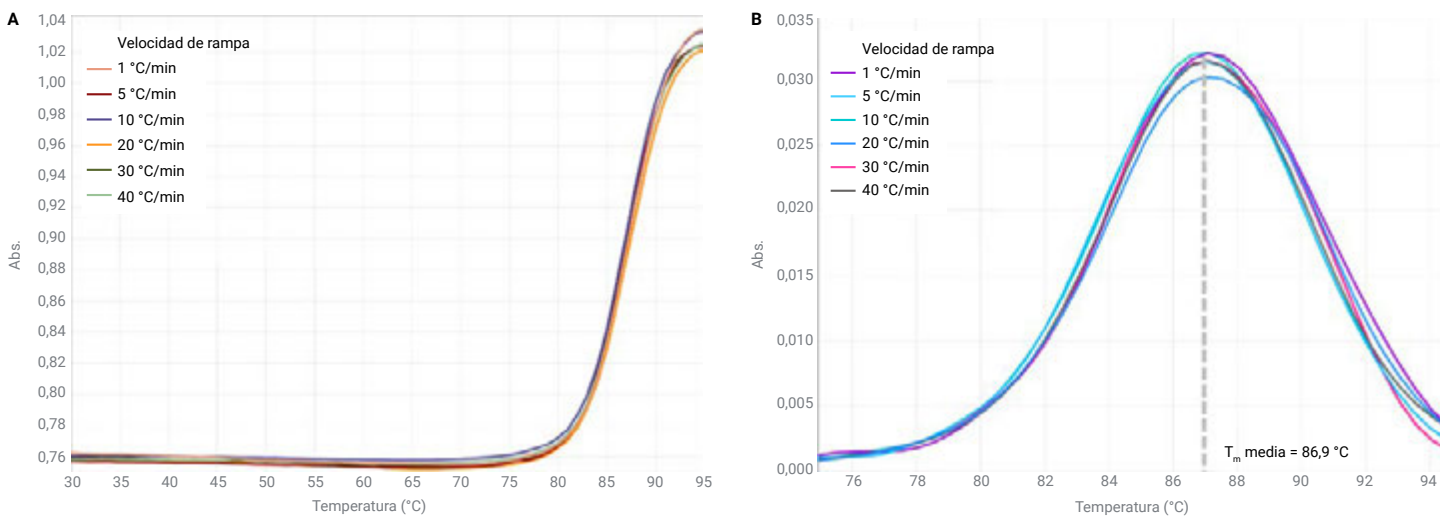
## Resultados y comentarios

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

En la Figura 3 se muestran los datos de absorbancia recogidos a las seis velocidades de rampa de temperatura (1, 5, 10, 20, 30 y 40 °C/min). Se calculó la primera derivada de cada barrido, que también se muestra en la Figura 3. El pico máximo de cada primer gráfico de derivada identifica el punto medio de la curva de fusión y, por lo tanto, el valor de  $T_m$ . Como se muestra en la Figura 3 y en la Tabla 2, los valores de  $T_m$  medidos de las muestras de ADN de esperma de arenque estaban dentro de  $\pm 0,2$  °C para las seis velocidades de rampa de temperatura utilizadas en los experimentos.

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

Entrada	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), cada velocidad de rampa	Desviación estándar $T_m$ (°C) (n = 3), cada velocidad de rampa
1	1	87,1	87,1	87,1	87,1	0,0
2	5	87,0	86,6	86,5	86,7	0,2
3	10	86,7	87,1	87,0	86,9	0,2
4	20	87,1	87,1	87,1	87,1	0,0
5	30	87,1	87,0	86,6	86,9	0,2
6	40	86,6	87,0	87,0	86,9	0,2
$T_m$ media (°C) (n = 6), todas las velocidades de rampa		86,9	87,0	86,9		
Desviación estándar $T_m$ (°C) (n = 6), todas las velocidades de rampa		0,2	0,2	0,2		



**Figura 3.** Absorbancia del ADN del esperma de arenque frente a la temperatura (A) y la correspondiente primera derivada (B) en función de la velocidad de rampa de la temperatura.

### Calculadora de suavizado y derivada incorporada en Cary UV Workstation

El software Cary UV Workstation incluye funciones de suavizado y derivada para ayudar a calcular la temperatura de fusión. El suavizado puede aplicarse para reducir las interferencias y el ruido en los espectros, mientras que la función de derivada calcula la primera derivada.

Las funciones de suavizado y derivada utilizan la técnica de Savitzky-Golay<sup>5</sup>. Ambas funciones requieren tamaños de filtro y de intervalo. El tamaño del filtro define el número de puntos que se utilizan para generar cada punto de salida. Si para el análisis de datos se utiliza un valor de intervalo distinto del intervalo de recogida, los datos calculados se ajustarán al intervalo especificado. Se recomienda hacer coincidir los intervalos de suavizado y derivada con el intervalo de recogida.

Los cálculos de suavizado y derivada se pueden guardar dentro de un método. Los cálculos se aplicarán automáticamente al final de la recogida de datos (Figura 4).

### Conclusión

Se empleó el espectrofotómetro UV-vis Agilent Cary 3500 Multizone para medir el punto de fusión ( $T_m$ ) de las muestras de ADN de esperma de arenque a seis velocidades de rampa de temperatura diferentes. Los puntos de fusión medidos en cada una de las velocidades de rampa estaban todos dentro de  $\pm 0,2$  °C. Este nivel de reproducibilidad permite que los laboratorios pueden utilizar mayores velocidades de rampa de temperatura que el protocolo estándar de  $0,5$  °C/min, lo que permite reducir significativamente los tiempos experimentales sin comprometer la calidad de los resultados. El estudio demostró que un experimento que antes duraba 2,5 horas podía medirse en aproximadamente 10 minutos utilizando el sistema UV-vis Agilent Cary 3500.

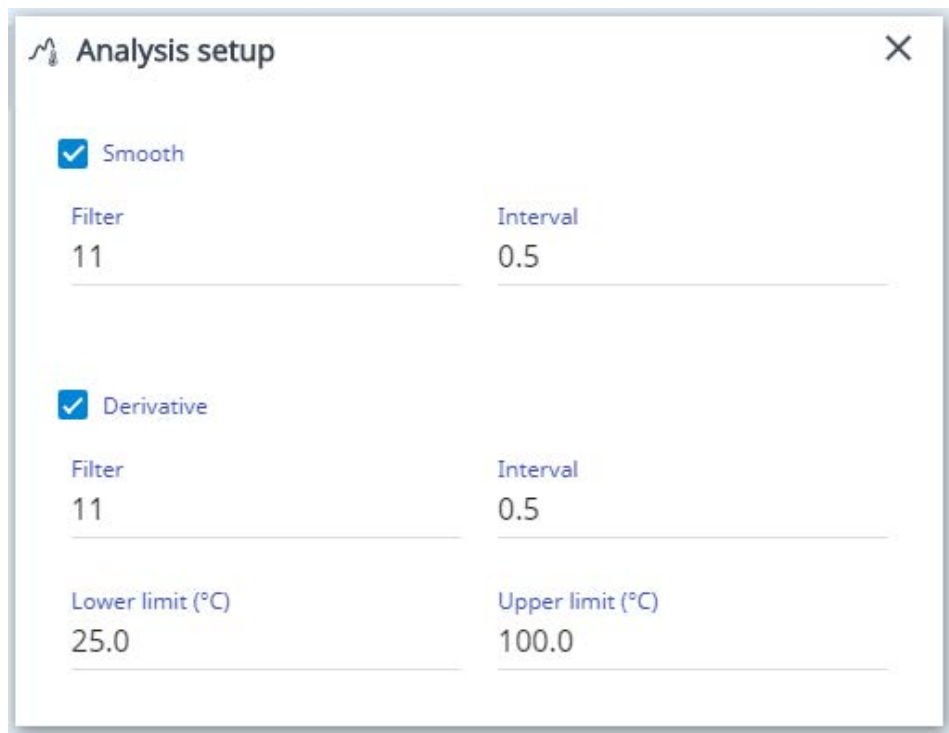


Figura 4. Calculadora de suavizado y derivada incorporada en Agilent Cary UV Workstation.

La multicelda de ocho posiciones del espectrofotómetro UV-vis Cary 3500 permitió la medición simultánea de al menos tres réplicas de muestra y referencia, lo que también redujo los tiempos totales de medición experimental.

El software Agilent Cary UV Workstation incluye funciones integradas para los cálculos de la temperatura de fusión del ADN (suavizado y derivada) que proporcionan rápidamente resultados procesables. Los cálculos, que pueden guardarse dentro de un método, se aplican automáticamente y se muestran tras la recogida de datos.

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 sin otras variables experimentales.

El software Cary UV Workstation también puede integrarse con el software Agilent OpenLab. OpenLab proporciona controles técnicos para adquirir, procesar, informar y almacenar datos de forma segura. Estos controles son necesarios en laboratorios que deben seguir las directrices de conformidad con la Parte 11 del Título 21 del Código de Reglamentos Federales (CFR) de la FDA estadounidense, el Anexo 11 de la UE y GAMP5, así como con ISO/IEC 17025 y la Parte 160 del Título 40 del CFR de la EPA estadounidense.

## Referencias

1. Shen, C-H. *Diagnostic Molecular Biology*, Chapter 7 - Detection and Analysis of Nucleic Acids, Academic Press: 2019; pág. 167–185.
2. Chetana, P. R. *et al.* New Ternary Copper(II) Complexes of L-Alanine and Heterocyclic Bases: DNA Binding and Oxidative DNA Cleavage Activity. *Inorganica Chimica Acta* **2009**, 362, 4692–4698.
3. Rao, R.; Patra, A. K.; Chetana, P. R. Synthesis, Structure, DNA Binding and Oxidative Cleavage Activity of Ternary (L-leucine/isoleucine) Copper(II) Complexes of Heterocyclic Bases. *Polyhedron* **2008**, 27, 1343–1352.
4. Davis, T. M. *et al.* Melting of a DNA Hairpin Without Hyperchromism. *Biochem.* **1998**, 37(19), 6975–6978.
5. Savitzky, A.; Golay, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedure. *Anal. Chem.* **1964**, 36, 1627–39.

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE80572371

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2022  
Impreso en EE. UU., 15 de agosto de 2022  
5994-0384ES