



Détermination du point de fusion de l'ADN et de l'ARN avec la série SPECORD®

Auteur : Alexandra Kästner, chimiste d'application en spectroscopie moléculaire, Analytik Jena AG - Tél. : +49/ 3641/ 77 70 - Fax : +49/ 3641/ 77 9279
www.analytik-jena.com -info@analytik-jena.com
Contact en France : SERLABO Technologies - Tél.: +334 9023 7720
info@serlabo.fr - www.serlabo.eu

Introduction

Les acides nucléiques constituent les molécules essentielles à la vie, car ils sont porteurs de l'information héréditaire. Constitués de bases hétérocycliques, de molécules de sucre et de groupes phosphate, ils sont présents chez presque tous les êtres vivants. Du fait de sa composition en bases azotées, l'acide désoxyribonucléique (ADN ou DNA en anglais) porte les gènes de synthèse des acides ribonucléiques (ARN ou RNA en anglais). Ceux-ci contiennent en revanche l'information sur la fabrication des protéines nécessaires au développement biologique d'un organisme et au métabolisme de la cellule et exercent directement plusieurs fonctions, dont la biosynthèse.

À l'état naturel, l'ADN est une structure hautement organisée en double hélice. Les deux brins complémentaires sont maintenus par des interactions entre leurs bases azotées. La stabilité est assurée d'une part, par l'empilement et d'autre part, par l'appariement de bases par des liaisons hydrogène. La liaison d'adénine (A) avec la thymine (T) et de la guanine (G) avec la cytosine (C) est toutefois spécifique.

Une modification du pH ou un traitement thermique entraînent des modifications de la structure de l'ADN ; provoquant la rupture des liaisons hydrogène entre les bases azotées et la séparation du double-brin en deux brins. Cette dénaturation est appelée fusion. Comme l'absorption optique augmente au cours de celle-ci (phénomène d'hyperchromicité), la spectroscopie UV permet de très bien suivre ce processus. L'enregistrement de la modification de l'absorption optique en fonction de la température est représenté par une courbe de fusion dite sigmoïde, dont le point d'inflexion permet de définir la température de fusion. La température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme de simple brin est notée point de fusion T_m .

Théorie

Du fait de leur concentration en bases aromatiques, les acides nucléiques présentent un maximum d'absorption optique à 260 nm ; les coefficients d'absorption de chacune des bases sont toutefois différents. L'absorption UV dépend ainsi de l'appariement des bases et la température de fusion est caractéristique d'une séquence d'ADN spécifique. Comme trois liaisons hydrogène sont présentes entre la guanine et la cytosine, les paires d'adénosine et de thymine sont uniquement stabilisées par deux liaisons hydrogène. La température de fusion de l'ADN est également plus élevée avec un pourcentage de base (G+C) plus élevé. En raison des interactions d'empilement entre les paires de bases successives GC, nécessitant moins d'énergie, les segments d'ADN composés de plusieurs bases G-C sont plus stables d'un point de vue thermodynamique que les séquences composées de plusieurs bases A-T. En analysant le point de fusion, il est possible a contrario de déterminer le pourcentage de base G+C d'un acide nucléique. Les analyses du point de fusion peuvent servir de critère taxonomique, en vue de la classification des bactéries, car le nombre de bases G-C présentes dans l'ADN d'un organisme correspond à une taille définie. [1]

Dans les conditions de température et d'ions appropriées, les simples brins d'ADN dénaturés peuvent être réassemblés pour former une double hélice. Ce processus est appelé renaturation. S'il

s'agit de deux acides nucléiques d'origine différente, on parle d'hybridation (par ex. ARN avec ADN). Lors d'expériences d'hybridation, l'analyse du point de fusion permet de déduire l'exactitude de l'appariement des bases et donc la parenté entre les deux organismes, puisque seules les structures d'ADN complémentaires s'hybrident. [3]

Dans le domaine de la recherche pour la santé, des mutations génétiques rares sont identifiées à l'aide de la détermination du point de fusion, car les structures d'ADN à mutations génétiques se dénaturent à basses températures en ADN « normal ». Le processus de fusion joue entre autre un rôle très important en biologie moléculaire pour l'ADN synthétique (ou oligonucléotide), pour la réaction en chaîne par polymérase (PCR), par exemple.

Analyse

L'analyse du point de fusion de l'ADN a été effectuée avec un SPECORD® 200 PLUS et un support de cuvette à thermostatisation par effet Peltier.

Le SPECORD® 200 PLUS est un photomètre à deux faisceaux pour la plage de longueur d'onde de 190 - 1100 nm. Il dispose d'une résolution spectrale définie de 1,4 nm et de deux photodiodes. [4]

Le support de cuvette à thermostatisation par effet Peltier permet la thermostatisation précise de cuvettes d'une épaisseur de couche de 10 mm. Un appareil de contrôle à part permet de régler la température dans une plage située entre 5°C et + 105°C, avec une précision de + 0,1°C (fig. 1).

Un capteur de mesure sert de capteur de contrôle et se trouve au niveau de l'angle inférieur extérieur du bloc de cuvette. Le support de cuvette dispose également de deux autres capteurs de mesure, destinés respectivement à enregistrer la température interne du support ou de la cuvette. Un capteur de mesure spécifique aux cuvettes ultra micro, pouvant rester dans la cuvette lors de mesures optiques, sert à contrôler directement la température interne des cuvettes (fig. 2). [5]

Échantillon

La détermination du point de fusion a été réalisée sur deux échantillons d'ADN différents.

Le premier échantillon est un ADN plasmidique du phage lambda. Les plasmides sont des molécules d'ADN double brins circulaires extrachromosomiques pouvant être présentes dans les bactéries, non intégrées dans le chromosome bactérien.

Le second échantillon à analyser est un ADN d'origine animal, provenant d'un thymus de veau.

Pour l'analyse de l'ADN plasmidique, une dilution est préparée à partir d'une solution de base d'ADN et de l'eau, avec un maximum d'absorption situé entre 0,1 et 1. Afin de vérifier la plage d'absorption, un spectre d'échantillon d'ADN a été enregistré dans la plage de 220 nm - 300 nm, et le maximum du pic défini (fig. 3). 100 µl de solution d'ADN et une cuvette ultra micro ont été utilisés pour la mesure ; et de l'eau exempte de DNase et RNase comme solution de référence.

L'analyse correspondante du point de fusion a été réalisée à 260 nm en mode « simultané » à partir d'une température initiale de 25°C et une température finale de 70°C. L'échantillon est chauffé à une vitesse de montée en température de 1°C par minute. Une valeur mesurée est enregistrée tous les 1°C.

L'échantillon d'ADN de thymus de veau est préparé et son spectre d'absorption est enregistré de la même manière que pour l'échantillon d'ADN plasmidique.

La détermination du point de fusion a été réalisée en mode « cyclique » avec une température initiale de



Une
meilleure vision que
Les Experts !



Améliorez vos performances
GC/MS et LC/MS avec le GERSTEL
MultiPurpose Sampler MPS:

- Préparation d'échantillons liquides
- SPE et SPE dispersive (DPX)
- Espace de tête dynamique (DHS), HS et SPME
- Twister (SBSE), Désorption Thermique et PYRO
- Injection Liquide et Injection Large Volume
- Logiciel de pilotage intégré et intuitif

Le support technique et scientifique
du RIC et les solutions GERSTEL -
toujours à votre service

GERSTEL



RIC

Research Institute
for Chromatography

www.richrom.com





- Ci-dessus (Fig.1) : SPECORD® PLUS avec support de cuvette à thermostatisation par effet Peltier et échangeur thermique externe

- Ci-contre (Fig.2) : Capteur de mesure pour cuvettes

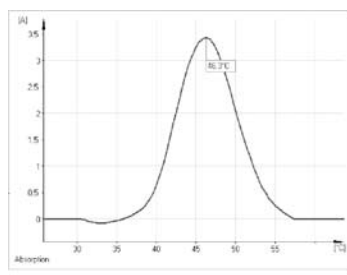
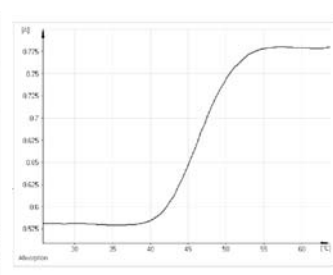
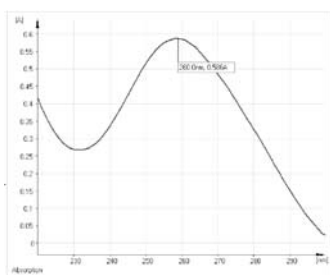
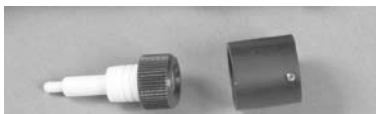


Fig. 3: Spectre d'ADN plasmidique

Fig. 4: Courbe de fusion de l'ADN plasmidique

Fig. 5: Point de fusion de l'ADN plasmidique

Fig. 3 à 7 : mesure de l'ADN de thymus

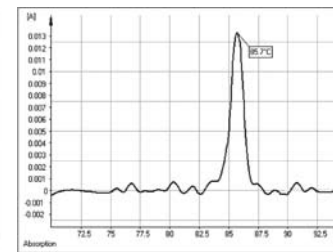
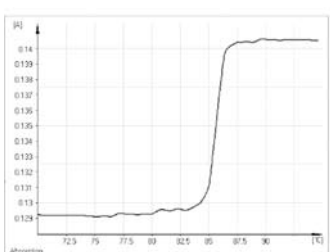


Fig. 6: Courbe de fusion de l'ADN de thymus

Fig. 7: Point de fusion de l'ADN de thymus

70°C et une température finale de 95°C. La mesure optique a été effectuée ainsi de 70°C à 80°C tous les 0,2°C ; de 80°C à 90°C tous les 0,1°C et de 90°C à 95°C également tous les 0,2°C. La température a été définie avec une précision de 0,1°C.

La température des deux solutions d'ADN a été contrôlée en continu par le capteur de mesure intégré à la cuvette pendant l'ensemble de la mesure.

Résultats et interprétation

La fusion des échantillons d'ADN est très bien représentée avec les deux programmes de mesure (fig. 4). En raison de l'empilement des bases, le changement des phases de l'ADN s'effectue dans un intervalle de température très court en vue d'une rupture brève de la structure à double hélice à partir d'une certaine température et ainsi d'une hausse de l'absorption rapide. En mode de mesure « cyclique », il est possible de déterminer divers intervalles de mesure pour chacune des plages de température, de manière à ce que la distance entre les points de mesure puisse être définie en conséquence plus courte dans la phase de hausse d'absorption rapide. Le tracé sigmoïde de la courbe de fusion peut être représenté avec encore plus de précision avec l'ADN de thymus (fig. 6).

Le point de fusion T_m des deux échantillons d'ADN a été défini selon le maximum du pic de la première dérivée des courbes de fusion. La hausse d'absorption des ADN de bactéries a eu lieu à des températures nettement plus faibles en comparaison à l'ADN de thymus de veau. La température de fusion a été définie ici sur 46,3°C (fig. 5), celle de l'ADN du thymus de veau sur 85,7°C (fig. 7).

L'ADN naturel a un point de fusion très élevé, souvent supérieur à 85°C ; celui de l'ADN humain est de par ex. 86°C. Pour les ADN synthétiques, le point de fusion peut être évalué selon l'appariement des bases et la longueur de chaîne. Le faible point

de fusion de l'ADN plasmidique résulte de la courte longueur des chaînes de molécule pour laquelle 48,5 paires de bases (pb) étaient indiquées. L'ADN de thymus à structure complexe a en revanche un poids moléculaire nettement plus élevé, de 13 kilo paires de base (kpb), et par conséquent également un point de fusion supérieur.

En plus de l'appariement des bases (pourcentage de base G+C) et la longueur de chaîne de l'acide nucléique, le point de fusion T_m est influencé par d'autres facteurs, tels que la nature chimique de l'hybride formé, la concentration saline de la solution et l'ajout de certains solvants apolaires déstabilisants. De plus, un pourcentage plus élevé d'appariements de bases incorrects (« inadéquations ») réduit de même le point de fusion de l'acide nucléique.

Résumé

Les acides nucléiques enregistrent l'information sur le plan de construction de la vie. Il est possible de déterminer le point de fusion par spectroscopie UV grâce au phénomène d'hyperchromicité apparaissant en cas de hausse de la température lors de la rupture des double-brins d'ADN. L'utilisation du SPECORD® PLUS et des accessoires à thermostatisation par effet Peltier permet d'effectuer des analyses de point de fusion avec une précision supérieure. Selon les échantillons d'ADN utilisés et les exigences associées, les températures peuvent être définies en conséquence sur une large plage, à l'aide de divers modes de mesure. L'utilisation d'une cuvette ultra micro permet en outre de travailler avec des volumes d'échantillons de l'ordre du microlitre. Le capteur de mesure permet de contrôler la température de l'échantillon avec précision, de manière à ce que les températures définies correspondent également à celles de la température interne.

Bibliographie

- [1] Allgemeine Mikrobiologie, Georg Fuchs, Hans Günther Schlegel, 8. Auflage, Thieme Verlag
- [2] Peter Yakovchuk, Ekaterina Protozanova and Maxim D. Frank-Kamenetskii. *Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix.* Nucleic Acids Research 2006
- [3] Genetik, Jochen Graw, 4. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2006
- [4] Manuel d'utilisation du SPECORD® PLUS, de Analytik Jena
- [5] Manuel d'utilisation du SPECORD® PLUS Zubehör Handbuch, de Analytik Jena

Le nouveau sens de la flamme
schuett phoenix II: les bcs Bunsen du futur

Je parle votre langue. Je garantis une sécurité maximale.
Je vous rends rapide et flexible.

schuett-biotec.de

schuett-biotec GmbH
Rudolf-Wissell-Straße 13
D-37079 Göttingen, Germany
Fon +49 (0) 55115 04 10-0
info@schuett-biotec.de