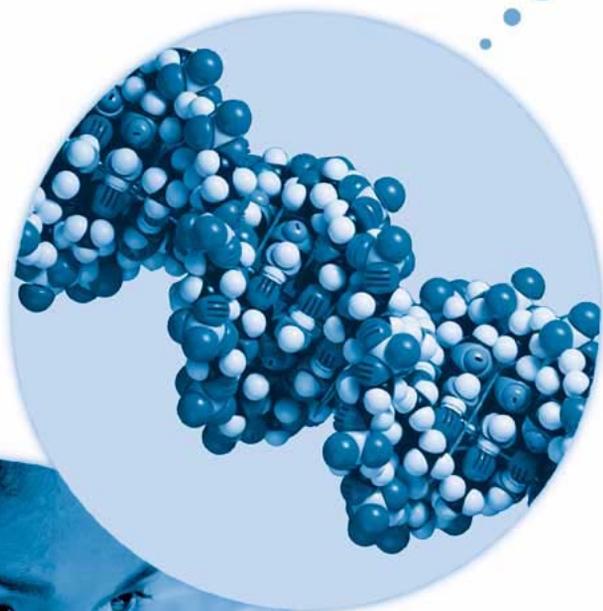




ChemStation Agilent para Espectroscopía UV-Visible



**Guía del usuario para
software de análisis
bioquímico**



Agilent Technologies

Avisos

© Agilent Technologies, Inc. 2002-2003

No se permite la reproducción de parte alguna de este manual bajo cualquier forma ni por cualquier medio (incluyendo su almacenamiento y recuperación electrónicos y la traducción a idiomas extranjeros) sin el consentimiento previo por escrito de Agilent Technologies, Inc. según lo estipulado por las leyes de derechos de autor estadounidenses e internacionales.

Número de referencia del manual

G1117-95008

Edición

10/2003

Impreso en Alemania

Agilent Technologies Deutschland GmbH
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn

Garantía

El material contenido en este documento se proporciona "tal como es" y está sujeto a modificaciones, sin previo aviso, en ediciones futuras. Además, hasta el máximo permitido por la ley aplicable, Agilent rechaza cualquier garantía, expresa o implícita, en relación con este manual y con cualquier información contenida en el mismo, incluyendo, pero no limitado a, las garantías implícitas de comercialización y adecuación a un fin determinado. En ningún caso Agilent será responsable de los errores o de los daños incidentales o consecuentes relacionados con el suministro, utilización o uso de este documento o de cualquier información contenida en el mismo. En el caso que Agilent y el usuario tengan un acuerdo escrito separado con condiciones de garantía que cubran el material de este documento y que estén en conflicto con estas condiciones, prevalecerán las condiciones de garantía del acuerdo separado.

Licencias sobre la tecnología

El hardware y/o software descritos en este documento se suministran bajo una licencia y pueden utilizarse o copiarse únicamente de acuerdo con las condiciones de tal licencia.

Avisos de seguridad

PRECAUCIÓN

Un aviso de **PRECAUCIÓN** indica un peligro. Llama la atención sobre un procedimiento de operación, una práctica o similar que, si no se realizan correctamente o no se ponen en práctica, pueden provocar daños en el producto o pérdida de datos importantes. No avance más allá de un aviso de **PRECAUCIÓN** hasta que se entiendan y se cumplan completamente las condiciones indicadas.

ADVERTENCIA

Un aviso de **ADVERTENCIA** indica un peligro. Llama la atención sobre un procedimiento de operación, una práctica o similar que, si no se realizan correctamente o no se ponen en práctica, pueden provocar daños personales o la muerte. No avance más allá de un aviso de **ADVERTENCIA** hasta que se entiendan y se cumplan completamente las condiciones indicadas.

En este manual

El software de análisis bioquímico para la ChemStation Agilent añade la modalidad cinética y la modalidad de desnaturalización térmica al software de uso general. Estas dos modalidades permiten realizar experimentos cinéticos y de desnaturalización térmica con el espectrofotómetro Agilent 8453. Incluye posibilidades para desarrollar métodos analíticos, monitorización en línea en tiempo real para visualizar la marcha de los experimentos, y herramientas para evaluar y procesar los datos experimentales.

Este manual contiene instrucciones para la instalación del software y describe los componentes de hardware necesarios para llevar a cabo experimentos cinéticos y de desnaturalización térmica. Además, contiene información sobre las funciones más importantes del software, que ayudan a resolver los problemas analíticos.

Este manual está organizado en tres capítulos que abarcan desde la instalación del software hasta la evaluación y presentación de un experimento cinético o de desnaturalización térmica.

1 Instalación y configuración

Este capítulo describe la instalación del software Agilent ChemStation y la configuración del controlador de temperatura Peltier Agilent 89090A, que es necesario para los experimentos de desnaturalización térmica.

2 Modalidad cinética

Este capítulo describe la configuración del espectrofotómetro y el sistema de muestreo, el desarrollo de un método cinético y la realización de una medida cinética, y por último la evaluación de los datos experimentales.

3 Modalidad de desnaturalización térmica

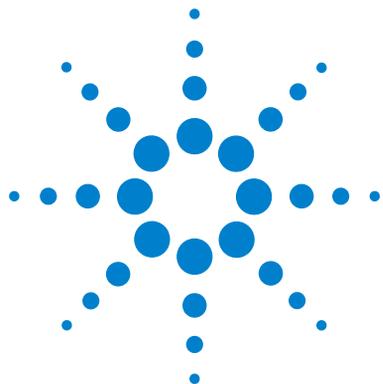
Este capítulo describe la configuración de una rampa de temperatura y un método analítico para realizar un experimento de desnaturalización térmica. Se describen la monitorización de experimentos en línea y las posibilidades de evaluación de datos que ofrece el software.

Contenido

1	Instalación y configuración	7
	Instalación del software de análisis bioquímico	8
	Configuración del controlador de temperatura Peltier Agilent 89090A	9
2	Modalidad cinética	11
	Preparación de una medida basada en el tiempo	12
	Inicio de la modalidad cinética	12
	Configuración del espectrofotómetro	13
	Configuración del sistema de muestreo	16
	Configuración de un método cinético	18
	La medida cinética	24
	Realización de una medida basada en el tiempo	24
	Evaluación de los datos cinéticos	26
	Visualización de los resultados	27
3	Modalidad de desnaturalización térmica	29
	Preparación de una medida de desnaturalización térmica	30
	Inicio de la modalidad de desnaturalización térmica	31
	Configuración del espectrofotómetro	32
	Configuración de la rampa de temperatura	32
	Configuración de un método de desnaturalización térmica	33
	El experimento de desnaturalización térmica	39
	Realización de un experimento de desnaturalización térmica	39
	Evaluación de los datos de desnaturalización térmica	40
	Visualización de los resultados	41

Contenido

Índice 43



1 Instalación y configuración

Instalación del software de análisis bioquímico 8

Configuración del controlador de temperatura Peltier Agilent 89090A 9

Antes de poder utilizar el software de análisis bioquímico, es necesario instalarlo y configurar el espectrofotómetro. En este capítulo se describen las herramientas y los procedimientos de instalación. En primer lugar se debe instalar el software de análisis bioquímico en la ChemStation Agilent.

Si se desea utilizar la modalidad de desnaturalización térmica de la ChemStation Agilent, también será necesario configurar el controlador de temperatura Peltier Agilent 89090A. Esta instalación es opcional para la modalidad cinética.



Instalación del software de análisis bioquímico

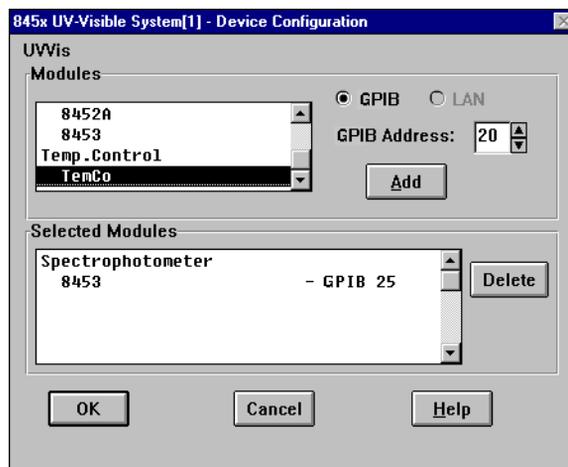
El software de análisis bioquímico (G1117A) es un módulo opcional e incluye el software de uso general (G1115A).

- 1** Introducir el CD-ROM que contiene la ChemStation Agilent.
- 2** Ejecutar `setup.exe`.
- 3** Seleccionar G1115AA “UV-VIS General Purpose ChemStation” (ChemStation de uso general UV-VIS) en Available Products (Productos disponibles) y hacer clic en Add (Agregar).
- 4** Introducir el número de licencia de G1115AA y hacer clic en Add (Agregar).
- 5** Seleccionar G1117AA “UV-VIS Biochemical Add-on mode” (Modalidad opcional bioquímica UV-VIS) en Available Products (Productos disponibles) y hacer clic en Add (Agregar).
- 6** Introducir el número de licencia de G1117AA y hacer clic en Add (Agregar).
- 7** Hacer clic en Aceptar.
- 8** Hacer clic en Install (Instalar).
- 9** Una vez realizada la instalación, ejecutar Installation Qualification (cualificación de la instalación), que está disponible en el menú Agilent ChemStation.
- 10** Si Installation Qualification (cualificación de la instalación) se ejecuta satisfactoriamente, el software de análisis bioquímico y el de uso general se habrán instalado correctamente.

Configuración del controlador de temperatura Peltier Agilent 89090A

Si se tiene previsto utilizar la modalidad de desnaturalización térmica del software de análisis bioquímico, también será necesario configurar el controlador de temperatura Peltier Agilent 89090A.

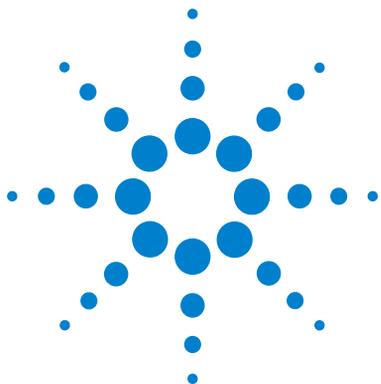
- 1 Iniciar el editor de configuración UV-Vis Configuration Editor desde el menú Agilent ChemStations.



- 2 Si todavía no se ha configurado un instrumento Agilent 8453, agregar un instrumento nuevo (New Instrument) de la manera descrita en el *Manual del Operador del Sistema de Espectroscopía UV-Visible Agilent 8453*.
- 3 Seleccionar Instruments... (Instrumentos...) en el menú Configure (Configurar).
- 4 Introducir el nombre del instrumento en Instrument Name, elegir el tamaño inicial de la ventana en Initial Screen Window Size y hacer clic en Aceptar.
- 5 Seleccionar TemCo.
- 6 Elegir una dirección GPIB 20.

1 Instalación y configuración

- 7** Hacer clic en Add (Agregar) para aceptar la configuración.
- 8** Hacer clic en Aceptar para cerrar el cuadro de diálogo Device Configuration (Configuración de dispositivos).
- 9** Cerrar el editor de configuración (Configuration Editor).



2 Modalidad cinética

Preparación de una medida basada en el tiempo 12
La medida cinética 24

En este capítulo se describen las tareas más importantes de la modalidad cinética del software de análisis bioquímico. Puesto que una correcta preparación es esencial para realizar una medida cinética, el primer apartado, [“Preparación de una medida basada en el tiempo”](#) en la página 12, contiene información sobre los pasos que se deben seguir antes de realizar la medida cinética. Se explica cómo configurar el espectrofotómetro, el sistema de muestreo y un método analítico.

En el segundo apartado, [“La medida cinética”](#) en la página 24, se describe la medida basada en el tiempo y las posibilidades de procesamiento de datos, así como la evaluación de los datos con el software Agilent ChemStation.



Preparación de una medida basada en el tiempo

Antes de realizar una medida basada en el tiempo es necesario configurar el sistema de acuerdo con la aplicación utilizada. En este apartado se explica cómo configurar el espectrofotómetro, seleccionar y configurar un sistema de muestreo, y desarrollar un método cinético. Ello permitirá utilizar las funciones del software de análisis bioquímico con el fin de encontrar la mejor solución para la medida cinética.

Inicio de la modalidad cinética

Para iniciar la modalidad cinética del software de análisis bioquímico, elegir Kinetics (Cinética) en el menú Mode (Modalidad) o en el cuadro desplegable Mode (Modalidad) de la interfase gráfica de usuario.

En la [Figura 1](#) se muestra la interfase gráfica de usuario para la modalidad cinética del software Agilent ChemStation. La modalidad actual aparece en el cuadro desplegable Mode (Modalidad) en la barra de herramientas. La barra de herramientas también incluye el campo del nombre del método, donde aparece el nombre del método analítico actual. Las letras Mod que aparecen al lado del campo del nombre del método indican que este método se ha modificado y que estos cambios todavía no se han guardado. La barra de herramientas también incluye varios botones de método abreviado, que se describen detalladamente en la *Guía del Usuario del Sistema de Espectroscopía UV-Visible Agilent 8453*.

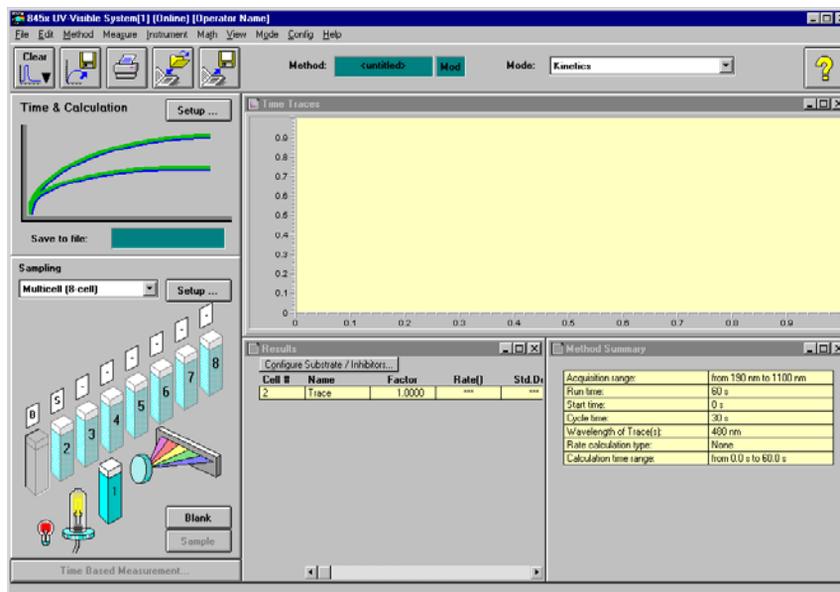


Figura 1 La interfase gráfica de usuario de la modalidad cinética

La barra lateral está dividida en dos partes. El panel analítico (superior) incluye un botón Setup... (Configuración...) que abre el cuadro de diálogo Method (Método). Este cuadro de diálogo incluye los parámetros más importantes de los métodos. En el panel del instrumento (inferior) se puede seleccionar el sistema de muestreo, y encender y apagar las lámparas del espectrofotómetro.

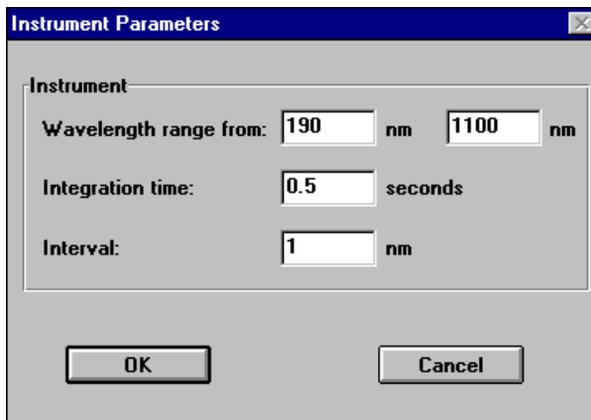
La interfase gráfica de usuario por defecto de la modalidad cinética contiene la ventana Time Trace (Trazo de tiempo), la ventana Results (Resultados) y la ventana Method Summary (Resumen del método). En estas ventanas aparecen las trazas de tiempo cinéticas, los datos cinéticos evaluados y los parámetros principales del método después de realizarse la medida.

Configuración del espectrofotómetro

Seleccionar el menú Instrument (Instrumento) del software de análisis bioquímico para configurar el espectrofotómetro Agilent 8453 con el fin de realizar una medida basada en el tiempo.

2 Modalidad cinética

Elegir Setup Spectrophotometer... (Configurar espectrofotómetro) para mostrar el cuadro de diálogo Instrument Parameters (Parámetros del instrumento), que permite definir los parámetros de tiempo de ejecución del espectrofotómetro. En este cuadro de diálogo se pueden definir los siguientes parámetros.



- Pueden utilizarse los campos para especificar los límites inferior y superior del rango necesario para el análisis. El campo From (De) define el límite inferior del rango, y el campo To (A) define el límite superior del rango. Los valores por defecto son los límites del rango de longitudes de onda del espectrofotómetro configurado.

NOTA

Se recomienda utilizar el rango máximo de longitudes de onda del espectrofotómetro. Esto permite aprovechar al máximo las posibilidades del espectrofotómetro provisto de matriz de diodos, como por ejemplo evaluación post-análisis de los datos a distintas longitudes de onda.

- El valor del campo Integration Time (Tiempo de integración) es el tiempo, en segundos, durante el cual se recoge y se integra la señal. El tiempo de integración debe estar comprendido entre 0,1 y 25,5 segundos; el valor por defecto es 0,5 segundo. Los tiempos de integración mayores mejoran la relación señal-ruido, ya que la señal se acumula mientras que el ruido se promedia. El tiempo de integración seleccionado influye directamente en el tiempo de ciclo mínimo de una medida cinética. El tiempo de ciclo mínimo no puede ser menor que el tiempo de integración. Por tanto, podrá ser necesario reducir el tiempo de integración para realizar medidas cinéticas rápidas.
- El número mostrado en el campo Interval (Intervalo) define el intervalo de medida de la longitud de onda. El intervalo mínimo es de 1 nm, que corresponde a la resolución más alta..

NOTA

Se recomienda no cambiar el valor por defecto de 1 nm para conseguir un rendimiento óptimo con el espectrofotómetro.

Seleccionar Lamp(s)... (Lámpara(s)...) para mostrar el cuadro de diálogo Lamp(s) Parameter (Parámetros de lámpara(s)). Permite definir los parámetros de las lámparas del espectrofotómetro. El formato del cuadro de diálogo Lamp(s) Parameter (Parámetros de lámpara(s)) depende del tipo de espectrofotómetro. Con el espectrofotómetro 8453, se dispone de la opción de encender (On) y apagar (Off) las lámparas de deuterio y de wolframio. Las lámparas también se pueden encender y apagar haciendo clic en los iconos de lámparas del panel del instrumento mostrado en la barra lateral de la interfase gráfica de usuario.

NOTA

Si se modifican los parámetros de las lámparas, cambiarán el método actual y el estado de las lámparas. Si se produce un fallo en una lámpara (fallo de encendido, defecto de la lámpara o portezuela de las lámparas abierta), los parámetros de la lámpara o las lámparas podrán aparecer como On (encendida), aunque la lámpara o las lámparas estén apagadas. Comprobar el estado de las lámparas en la ventana Spectrophotometer Status (Estado del espectrofotómetro) o en el panel del instrumento mostrado en la barra lateral de la interfase gráfica de usuario.

El estado del espectrofotómetro se resume en la ventana Spectrophotometer Status (Estado del espectrofotómetro). En esta ventana aparecen los valores siguientes:

Tipo de instrumento, rango de longitudes de onda, intervalo de longitud de onda, tiempo de integración, hora de encendido, estado de la lámpara o las lámparas y el estado general del espectrofotómetro Agilent 8453 (preparado/no preparado).

Configuración del sistema de muestreo

El sistema de muestreo se puede seleccionar y configurar en el menú Instrument (Instrumento) o en el panel del instrumento mostrado en la barra lateral de la interfase gráfica de usuario.

Al seleccionar Sampling System... (Sistema de muestreo...) aparece el cuadro de diálogo Sampling System (Sistema de muestreo), que permite seleccionar un funcionamiento Manual o el sistema de transporte multicelda (8 celdas) o (7 celdas). Si se desea utilizar el controlador de temperatura Peltier (Agilent 89090A nº 100), deberá seleccionarse el sistema de muestreo Manual.

PRECAUCIÓN

Cuando se cambia del muestreo Manual al sistema de transporte multicelda, se desechan los resultados de la celda actual.

Setup Sampling System... (Configurar sistema de muestreo...) muestra el cuadro de diálogo Setup (Configuración), que permite definir los parámetros de tiempo de ejecución del sistema de muestreo seleccionado.

El cuadro de diálogo Cells (Celdas) permite configurar los parámetros de tiempo de ejecución del mecanismo de transporte multicelda.

Cell	Sample	Pathlength (cm)
Cell 1:	Blank	1
Cell 2:	Sample	1
Cell 3:	NotUsed	1
Cell 4:	NotUsed	1
Cell 5:	NotUsed	1
Cell 6:	NotUsed	1
Cell 7:	NotUsed	1
Cell 8:	NotUsed	1

El cuadro de diálogo contiene las celdas utilizadas en formato de tabla con las siguientes columnas:

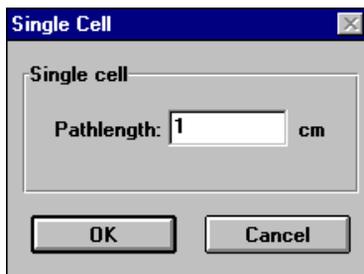
- Cell n: (Celda n:) indica las posiciones de las celdas en el mecanismo de transporte multicelda; la celda 1 es la más próxima a la parte frontal del espectrofotómetro.
- En la columna central de la tabla se describe la muestra contenida en la celda. Elegir Sample (Muestra), Blank (En blanco) o Not Used (No utilizada) en la lista desplegable.
- Los campos Path Length (Paso óptico) muestran las longitudes (en centímetros) de las celdas de muestras en cada posición del mecanismo de transporte multicelda. El valor por defecto para cada celda es 1 cm.

NOTA

Una buena práctica de medida consiste en utilizar la posición 1 para la medida Blank (En blanco). Así, el espectro de Blank (En blanco) siempre se renovará al comienzo de un ciclo de medida. Esto es especialmente importante cuando se realizan experimentos cinéticos de larga duración.

2 Modalidad cinética

El cuadro de diálogo Single Cell (Celda única) permite configurar los parámetros de tiempo de ejecución para un funcionamiento manual.



En el campo Path Length (Paso óptico) es necesario editar la longitud, en cm, de la celda de muestra que se está utilizando. El valor por defecto es 1 cm.

Seleccionar Wait for Temperature Ready (Esperar hasta que la temperatura esté preparada) para asegurar que la ChemStation Agilent espere a recibir una señal de “preparado” del accesorio de control de temperatura Peltier Agilent 89090A antes de realizar una medida. Se borrará la condición por defecto. Esta casilla de verificación sólo estará disponible si se ha configurado el controlador de temperatura Peltier Agilent 89090A.

Configuración de un método cinético

Los parámetros de los métodos se editan en el cuadro de diálogo Time & Calculation (Tiempo y cálculo) y en el cuadro de diálogo Info & Options (Información y opciones) del menú Method (Método). El cuadro de diálogo Time & Calculation (Tiempo y cálculo) también aparece cuando se pulsa el botón Setup (Configuración). Los parámetros más importantes del método aparecen en la ventana Method Summary (Resumen del método) de la interfase gráfica de usuario.

En el cuadro de diálogo Time & Calculation (Tiempo y cálculo) se pueden definir las condiciones para la medida basada en el tiempo.

Time & Calculation Parameters

Wavelengths

Use wavelength: 400 nm

Background correction: subtract average over range 550 570 nm

Online monitor

Trace monitor: Y-scaling from: 0 to: 1 AU

Monitor spectra: Last Spectrum Y-scaling from: 0 to: 1 AU

Timing

Run time: 2500 s

Start time: s

Cycle time: 125 s (min 11.9s)

Options

Increment cycle time by: 20 %

after initial time of: 1000 s

Rate calculation

Type: First order Calculation time range from: 0.0 to: 0.0 s

Multiply Rate by 1 to convert to Rate unit: s

Subtract Rate of cell from all other Rates

OK Cancel

- El campo Use Wavelength (Utilizar longitud de onda) permite definir la longitud de onda (para medidas multicelda) o un máximo de seis longitudes de onda (para medidas de celda única) de los datos procesados, de los que se extraerán los valores de amplitud para el resultado de la longitud de onda. La longitud de onda por defecto es de 480 nm. Si se introducen longitudes de onda en las que no hay disponibles datos medidos (por ejemplo, valores que no sean números enteros), los valores de amplitud se calcularán mediante una interpolación lineal.
- El campo Background Correction (Corrección de fondo) permite especificar cualquier corrección de fondo que se aplique al resultado de la longitud de onda para calcular el resultado de una función. Elegir la flecha hacia abajo y seleccionar un procedimiento de corrección de fondo en la lista desplegable:

none (ninguna) – especifica que el resultado de la longitud de onda se utiliza de la manera medida, sin corrección de fondo.

single reference wavelength (longitud de onda de referencia única) – especifica que la absorbancia a una única longitud de onda se resta del resultado de la longitud de onda. En el campo se especifica la longitud de onda de fondo.

subtract average over a range (restar promedio de un rango) – especifica que la absorbancia media de un rango de longitudes de onda se resta del resultado de la longitud de onda. En los campos se especifican los límites inferior y superior del rango de longitudes de onda de fondo.

three-point drop-line (línea vertical de tres puntos) – especifica que una absorbancia de fondo calculada mediante una línea vertical de tres puntos se resta del resultado de la longitud de onda. Los límites superior e inferior del rango de longitudes de onda de fondo utilizado para el cálculo del fondo se especifican en los campos adyacentes de la izquierda (inferior) y la derecha (superior).

- El monitor de trazas (Trace Monitor) es una traza de tiempo actualizada continuamente que muestra el cambio de absorbancia a la longitud de onda especificada en el campo Use Wavelength (Utilizar longitud de onda) con el paso del tiempo. Definir la escala del eje de absorbancia (y) introduciendo los límites inferior y superior en los campos “Y scaling from:” (escala de Y de:) y “to:” (a:).
- Se puede monitorizar el último espectro adquirido o los espectros de una celda específica. Elegir la flecha hacia abajo y seleccionar Last Spectrum (Último espectro), Cell n (Celda n) (para medidas multicelda) o All Spectra (Todos los espectros) (para medidas de celda única). Definir la escala del eje de absorbancia (y) introduciendo los límites inferior y superior en los campos “Y scaling from:” (escala de Y desde:) y “to:” (a:).
- El tiempo de ejecución (Run Time) es la duración total del análisis. El rango máximo del tiempo de ejecución (Run Time) es de 999.999 segundos (11,5 días). El tiempo de ejecución (Run Time) debe ser mayor que el tiempo de ciclo (Cycle Time) más el tiempo de inicio (Start Time).
- El tiempo de inicio (Start Time) es el periodo que transcurre entre el inicio de la medida y el comienzo propiamente dicho de la medida, y es opcional. El valor por defecto es 0,0.

- El tiempo de ciclo (Cycle Time) es el periodo que transcurre entre el comienzo de una medida y el comienzo de la siguiente; el valor por defecto es 5,0 segundos para el funcionamiento multicelda, y 0,5 segundo para el funcionamiento con una única celda (valores mínimos aceptables).
- El tiempo de ciclo mínimo depende del hardware, y el valor dado es tan sólo una aproximación. Para evitar la pérdida de datos, debe determinarse experimentalmente el tiempo de ciclo mínimo para la configuración. El tiempo de ciclo mínimo depende del sistema de muestreo (número de medidas por ciclo), el tiempo de integración (definido en el cuadro de diálogo Setup Spectrophotometer... (Configurar espectrofotómetro...)) y la corrección de dispersión luminosa (definida en el cuadro de diálogo Info & Options (Información y opciones)).
- Seleccionar Increment Cycle Time (Incrementar tiempo de ciclo) para activar el aumento del tiempo de ciclo. Especificar el porcentaje de incremento en el campo % y un intervalo de tiempo (en segundos) en el campo "After initial time of:" (Después del tiempo inicial de:).
- Se puede elegir de entre cinco tipos de evaluación cinética diferentes. Elegir la flecha hacia abajo y seleccionar el tipo de cálculo en la lista desplegable:

None (Ninguno) – especifica que no se ha realizado ningún cálculo de velocidad.

Initial rate (Velocidad inicial) – especifica que se realiza un ajuste cuadrático de acuerdo con la ecuación $a+bt+ct^2$, donde b es la constante de la velocidad inicial.

Zero order (Orden cero) – especifica que se realiza un ajuste lineal de acuerdo con la ecuación $a + bt$, donde b es la constante de velocidad en UA/s.

First order (Primer orden) – especifica que se realiza un ajuste exponencial de acuerdo con la ecuación $a+b\exp(-kt)$, donde k es la constante de velocidad en 1/s.

Delta AU – especifica que la absorbancia inicial se resta de la absorbancia final:

$$\text{Abs}_{t(\text{final})} - \text{Abs}_{t(\text{inicial})}$$

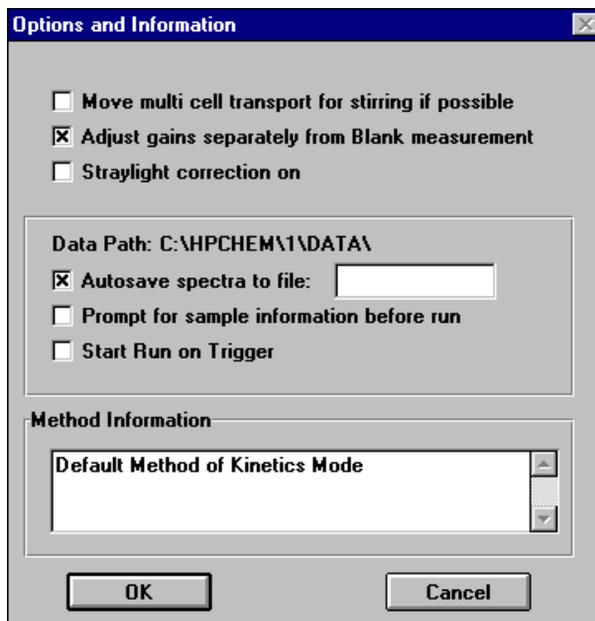
- Se puede especificar que el cálculo de la velocidad se realice a lo largo de un rango temporal limitado. Escribir el tiempo de inicio del cálculo en el campo "from:" (de:) y el tiempo de finalización en el campo "to:" (a:).

2 Modalidad cinética

- Seleccionar Multiply Rate (Multiplicar velocidad) si se desea activar un factor de conversión para el resultado de la velocidad. Especificar el factor y las nuevas unidades en el campo “To convert to Rate unit.” (Convertir a unidad de velocidad:).

Seleccionar Subtract Rate of Cell (Restar velocidad de celda) para restar el resultado de una celda de referencia de los resultados de la velocidad de todas las demás celdas. Elegir la flecha hacia abajo y seleccionar la celda de referencia en la lista desplegable. Esta opción sólo estará disponible si se ha configurado una medida multicelda.

En el cuadro de diálogo Options & Information (Opciones e información) se pueden definir las condiciones de adquisición para el experimento cinético.



- Al mover el mecanismo de transporte multicelda (si es posible) para mezclar su contenido, se moverá la celda actual a su posición para mezclar la muestra durante el tiempo de inactividad entre dos ciclos, si el tiempo de ciclo es suficientemente largo (aproximadamente el tiempo de ciclo mínimo más 4 segundos por cada celda configurada). Esta casilla sólo estará disponible si se selecciona un sistema de transporte multicelda.

- Adjust gains separately from blank measurement (Ajustar ganancias independientemente de la medida en blanco) añade el comando Set Gains (Definir ganancias) al menú Measure (Medir). Set Gains (Definir ganancias) realiza un ajuste de la ganancia, una referencia y una medida; el comando Blank (En blanco) sólo realiza una referencia y una medida. El ajuste independiente de la ganancia en un medio en blanco con elevada transmisión (por ejemplo, agua o una sustancia tampón) ajusta las ganancias a un valor inferior para evitar un desbordamiento del convertidor A/D y datos no válidos debido a trazas de tiempo con pendientes negativas.
- Straylight Correction On (Corrección de dispersión luminosa activada) activa la opción de corrección de dispersión luminosa. Cuando está activada, se realiza una segunda medida con el filtro de dispersión luminosa instalado y se corrige la dispersión luminosa del espectro de la muestra utilizando este espectro. La corrección de la dispersión luminosa incrementa el tiempo de ciclo mínimo, añadiendo el tiempo de integración (definido en el cuadro de diálogo Instrument Parameters (Parámetros del instrumento) más 2 segundos.
- Activar “Autosave spectra to file” (Guardar automáticamente el espectro en un fichero) para guardar en disco todos los espectros adquiridos. Escribir un nombre para el archivo en el campo adyacente. Los espectros se almacenan en el directorio por defecto (HPCHEM\n\DATA) con la extensión .KD. El directorio por defecto se puede cambiar en el menú Config.
- Prompt for sample information before run (Mostrar información de la muestra con anterioridad al análisis) mostrará el cuadro de diálogo Sample Information (Información de la muestra) antes de iniciar las medidas.
- Seleccionar Start Run on Trigger (Iniciar análisis en el momento del disparo) para iniciar la adquisición de datos utilizando el cierre de los contactos 13 y 15 de la interfase GPIO. De esta manera se asegura que transcurra un tiempo mínimo (aproximadamente 0,12 segundo) entre la acción de disparo y el comienzo de la adquisición de datos; tiene como finalidad utilizarse con medidas cinéticas de reacción rápida.
- Se puede escribir una descripción del método en el campo Method Information (Información del método). Este campo acepta cualquier carácter alfanumérico y la descripción puede tener una longitud cualquiera. El texto pasa automáticamente de una línea a otra. Se puede editar una descripción existente mediante cualquiera de los procedimientos estándar de tratamiento de textos (por ejemplo, Copiar, Cortar y Pegar).

La medida cinética

Realización de una medida basada en el tiempo

Las medidas se pueden iniciar utilizando el menú Measure (Medir) de la barra de menús, pulsando los botones Blank (En blanco), Sample (Muestra) y Time Based Measurement (Medida basada en el tiempo) de la barra lateral de la interfase gráfica de usuario, o utilizando determinadas teclas F.

Si ha seleccionado la opción “Adjust gains separately from blank measurement” (Ajustar ganancias independientemente de la medida en blanco) en el cuadro de diálogo Options & Info... (Opciones e información...), Set Gains (Definir ganancias) estará incluido en el menú Measure (Medir). El ajuste independiente de la ganancia en un medio en blanco con elevada transmisión (por ejemplo, agua o una sustancia tampón) ajusta las ganancias a un valor inferior y evita un desbordamiento del convertidor A/D. Esto contribuye a evitar datos no válidos debido a trazas de tiempo con pendientes negativas.

- 1 Introducir en el soporte una celda llena de agua u otro medio de baja absorbancia.
- 2 Mover el mecanismo de transporte multicelda a la posición correcta.
- 3 Hacer clic en Set Gains (Definir ganancias) en el menú Measure (Medir).

Con un sistema de muestreo multicelda se recomienda medir los espectros mediante Zero Cells (Poner a cero las celdas) para corregir las propiedades ópticas ligeramente diferentes de las celdas de medida. Se debe inicializar el mecanismo de transporte multicelda con un medio en blanco idéntico en todas las celdas. El comando Zero Cells... (Poner a cero las celdas...) mide un verdadero espectro en blanco para la celda 1 y a continuación mide los espectros para las celdas restantes. La diferencia entre los espectros se obtiene restando el espectro en blanco de los espectros de las celdas individuales y seguidamente se resta el resultado automáticamente de todos los espectros sucesivos medidos para corregir las diferencias ópticas que puedan existir entre las celdas.

- 1 Llenar todas las celdas de medida con el mismo medio en blanco (por ejemplo, agua).
- 2 Asegurarse de que no haya burbujas ni partículas flotantes en las celdas.

- 3 Realizar una medida en blanco seleccionando Blank (En blanco) en el menú de medida, haciendo clic en el botón Blank (En blanco) de la barra lateral de la interfase gráfica de usuario, o utilizando la tecla F4.
- 4 Iniciar la medida Zero Cells (Poner a cero las celdas) desde el menú Measure (Medir).

Los espectros de las celdas puestas a cero aparecen en la ventana Zero Cells Spectra (Espectros de celdas puestas a cero), que se puede activar en el menú View (Ver). Asegurarse de no cambiar las celdas después de realizar la medida Zero Cell (Poner a cero las celdas).

Para medir un único espectro de la solución contenida en la celda y mostrarlo en la ventana Sample Spectra (Espectros de la muestra), seleccionar Sample (Single Spectrum) (Muestra (Espectro único)) en el menú Measure (Medir). También se puede medir un único espectro pulsando la tecla F5 o haciendo clic en el botón Sample (Muestra) de la barra lateral de la interfase gráfica de usuario.

Si se pulsa la tecla F7 y se selecciona la medida basada en el tiempo en el menú Measure (Medir) o en la barra lateral de la interfase gráfica de usuario, se preparará el software para iniciar la medida basada en el tiempo. Aparecerán entonces las ventanas Time Trace (Traza de tiempo) y Sample Spectra (Espectros de la muestra). Elegir Start (Iniciar) en la nueva barra de menús para iniciar la adquisición, o Abort (Interrumpir) para cancelar la adquisición en curso.

Durante la medida basada en el tiempo se puede observar en tiempo real la adquisición de los espectros y las trazas de tiempo en la ventana Time Trace (Traza de tiempo) y en la ventana Sample Spectra (Espectros de la muestra). Hacer doble clic con el botón izquierdo del ratón en la ventana Time Trace (Traza de tiempo) o en la ventana Sample Spectra (Espectros de la muestra) para ajustar automáticamente la escala del eje de ordenadas "y".

Una vez que la medida basada en el tiempo haya finalizado o haya sido interrumpida por el usuario, los datos cinéticos se almacenarán de la manera especificada en el cuadro de diálogo Options & Info... (Opciones e información). Las trazas de tiempo se evalúan por tipo de velocidad, que se define en el cuadro de diálogo Time & Calculation (Tiempo y cálculo). Estos resultados aparecen en la ventana Results (Resultados).

Evaluación de los datos cinéticos

Una vez que haya finalizado la medida basada en el tiempo, existe la posibilidad de volver a evaluar los datos cinéticos. Puesto que todos los espectros se han adquirido durante la medida, se pueden modificar los parámetros de los campos Wavelength (Longitud de onda) y Rate Calculation (Cálculo de velocidad) del cuadro de diálogo Time & Calculation (Tiempo y cálculo). Hacer clic en Aceptar para activar los cambios. Los nuevos resultados aparecen en la ventana Results (Resultados). Si se han modificado los parámetros del método, el indicador de modificación Mod aparecerá en la interfase gráfica de usuario.

Si se ha configurado un sistema de muestreo manual, podrá elegirse Edit Sample Information (Editar información de la muestra) en la ventana Results (Resultados) para mostrar el cuadro de diálogo Sample Information (Información de la muestra). Permite incluir información de la muestra con los resultados. El cuadro de diálogo Sample Information (Información de la muestra) contiene los siguientes parámetros:

- El nombre de la muestra.
- Un comentario (por ejemplo, una descripción de la muestra).
- La concentración de un sustrato en el campo [S](mg/ml); este campo sólo aparecerá si se ha seleccionado [S] o [S][I] en el cuadro de diálogo Configure Substrate, Inhibitors (Configurar sustrato, Inhibidores).
- La concentración de un inhibidor en el campo [I](mg/ml); este campo sólo aparecerá si se ha seleccionado [S][I] en el cuadro de diálogo Configure Substrate, Inhibitors (Configurar sustrato, Inhibidores).
- La concentración del primero de dos sustratos en el campo [A](mg/ml); este campo sólo aparecerá si se ha seleccionado [A][B] en el cuadro de diálogo Configure Substrate, Inhibitors (Configurar sustrato, Inhibidores).
- La concentración del segundo de dos sustratos en el campo [B](mg/ml); este campo sólo aparecerá si se ha seleccionado [A][B] en el cuadro de diálogo Configure Substrate, Inhibitors (Configurar sustrato, Inhibidores).

Si se ha configurado un sistema de muestreo con mecanismo de transporte multicelda, podrá elegirse Configure Substrate/Inhibitors (Configurar sustrato/Inhibidores) en la ventana Results (Resultados) para mostrar el cuadro de diálogo Configure Substrate, Inhibitors (Configurar sustrato, Inhibidores). Permite incluir información de los sustratos y los inhibidores con los resultados. También se puede seleccionar el cuadro de diálogo Configure Substrate/Inhibitors (Configurar sustrato/Inhibidores) haciendo

clic en el botón del cuadro de diálogo Edit Sample Information (Editar información de la muestra). El cuadro de diálogo Configure Substrate, Inhibitors (Configurar sustrato, Inhibidores) contiene los siguientes parámetros:

- None (Ninguno) especifica que no se han incluido sustratos ni inhibidores.
- [S] especifica que se ha incluido un sustrato.
- [S][I] especifica que se ha incluido un sustrato y un inhibidor.
- [A][B] especifica que se han incluido dos sustratos.

Introducir las unidades de concentración de los sustratos y los inhibidores en el campo Unit (Unidad).

NOTA

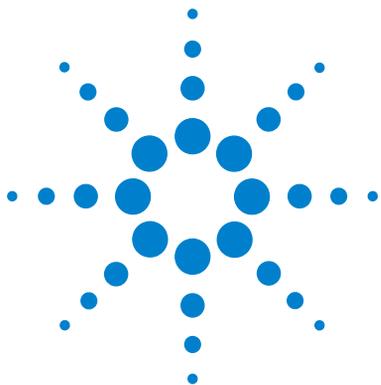
Para cargar y evaluar datos antiguos generados por el software HP 89532K, elegir Import from *.MKD... (Importar desde *.MKD...) en el menú File (Archivo)

Visualización de los resultados

Hay varias opciones para mostrar los datos adquiridos y procesados, así como los resultados tabulados. Seleccionar el menú View (Ver), que contiene:

- All spectra (Todos los espectros) muestra todos los espectros adquiridos en la ventana Sample Spectra (Espectros de la muestra).
- Spectra of Cell (Espectros de la celda) muestra los espectros de una determinada celda en la ventana Sample Spectra (Espectros de la muestra). El número de la celda se selecciona en el submenú.
- Traces and Results (Trazas y resultados) muestra la ventana Time Traces (Trazas de tiempo), la ventana Results (Resultados) y la tabla Method Summary (Resumen del método).
- Measured Single Spectra (Espectro único medido) muestra un espectro medido en la ventana Single Spectra (Espectros únicos).
- Last Blank Spectrum (Último espectro en blanco) muestra la ventana Last Blank Spectrum (Último espectro en blanco).
- Zero Cell Spectra (Espectros de celdas puestas a cero) se incluye en el menú View (Ver) cuando se ha configurado un sistema de transporte multicelda. Muestra la ventana Zero Cell Spectra (Espectros de celdas puestas a cero).
- Math Results (Resultados matemáticos) muestra la ventana Math Result (Resultado matemático).

- **Tabulate Selected Spectrum/Trace** (Tabular espectro/traza seleccionado) muestra la tabla **Tabular Data of Spectra** (Datos tabulares de espectros) del espectro seleccionado, o la tabla **Tabular Data of Time Traces** (Datos tabulares de trazas de tiempo) de la traza de tiempo seleccionada. Estas tablas también aparecen automáticamente cuando se hace doble clic con el botón izquierdo del ratón en un espectro/traza de tiempo en una ventana gráfica, o cuando se pulsa la tecla Intro mientras se utiliza el cursor. El título de la tabla indica el tipo de espectro (por ejemplo, **Sample** (Muestra), **Standard** (Estándar) con el número del espectro/traza de tiempo mostrado en la ventana entre corchetes, por ejemplo, [1].
- **Logbooks** (Historiales) muestra el cuadro de diálogo **Logbooks** (Historiales), donde se puede seleccionar un historial para mostrarlo o imprimirlo.
- **Load Logbook** (Cargar historial) muestra el cuadro de diálogo **Load Logbook** (Cargar historial), donde se puede seleccionar un historial almacenado previamente para cargarlo.
- **Next Window** (Ventana siguiente) muestra la siguiente ventana de la serie. Si la ventana está oculta detrás de otras ventanas, **Next Window** (Ventana siguiente) la muestra en primer plano. Si la ventana está minimizada en forma de icono, **Next Window** (Ventana siguiente) la muestra con su tamaño y posición por defecto. Pulsar la tecla F11 del teclado equivale a elegir **Next Window** (Ventana siguiente).
- **Previous Window** (Ventana anterior) muestra la ventana anterior de la serie. Si la ventana está oculta detrás de otras ventanas, **Previous Window** (Ventana anterior) la muestra en primer plano. Si la ventana está minimizada en forma de icono, **Previous Window** (Ventana anterior) la muestra con su tamaño y posición por defecto.
- **Reset Current View** (Restaurar vista actual) restaura todas las ventanas de la vista actual a sus tamaños y posiciones por defecto.



3 Modalidad de desnaturalización térmica

Preparación de una medida de desnaturalización térmica 30

El experimento de desnaturalización térmica 39

En este capítulo se describen las herramientas esenciales para desarrollar un método de desnaturalización térmica, y adquirir y evaluar los datos mediante la modalidad de desnaturalización térmica del software de análisis bioquímico. El primer apartado, "[Preparación de una medida de desnaturalización térmica](#)" en la página 30, contiene información sobre los pasos que se deben seguir antes de realizar la medida. Se explica cómo configurar el espectrofotómetro, definir la rampa de temperatura para el controlador de temperatura Peltier y elegir una de las diversas opciones de evaluación analítica.

En el segundo apartado, "[El experimento de desnaturalización térmica](#)" en la página 39, se describe la medida térmica real, la monitorización en línea en tiempo real y las posibilidades de proceso de datos con el software Agilent ChemStation.



Preparación de una medida de desnaturalización térmica

Antes de realizar una medida de desnaturalización térmica es necesario configurar el sistema de acuerdo con la aplicación utilizada. En este apartado se explica cómo configurar el espectrofotómetro y la rampa de temperatura con un controlador de temperatura Peltier, y se describe cómo desarrollar un método de desnaturalización térmica para analizar una muestra de DNA o de proteína.

NOTA

El controlador de temperatura Peltier Agilent 89090A se debe configurar antes de iniciar la modalidad de desnaturalización térmica.

Inicio de la modalidad de desnaturalización térmica

Para iniciar la modalidad de desnaturalización térmica del software de análisis bioquímico, elegir Thermal Denaturation (Desnaturalización térmica) en el menú Mode (Modalidad) o en el cuadro desplegable Mode (Modalidad) de la interfase gráfica de usuario.

En la [Figura 2](#) se muestra la interfase gráfica de usuario para la modalidad de desnaturalización térmica del software Agilent ChemStation. La modalidad actual aparece en el cuadro desplegable Mode (Modalidad) en la barra de herramientas. La barra de herramientas también incluye el campo del nombre del método, donde aparece el nombre del método analítico actual, y varios botones de método abreviado que se describen en la *Guía del usuario del Sistema de Espectroscopía UV-Visible Agilent 8453*.

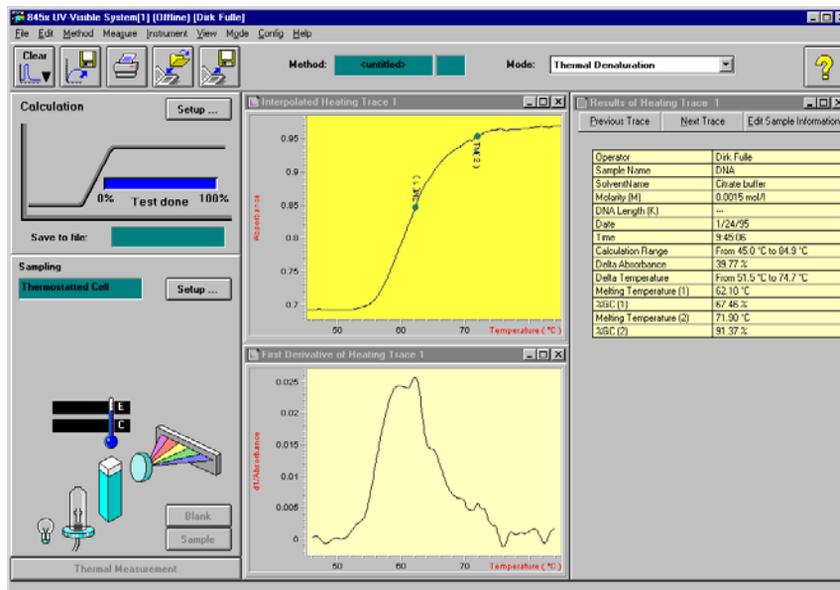


Figura 2 La interfase gráfica de usuario de la modalidad de desnaturalización térmica

El panel analítico superior incluye un botón de método abreviado que abre el cuadro de diálogo Calculation Parameters (Parámetros del cálculo). La barra de estado de color azul muestra el desarrollo de la medida de

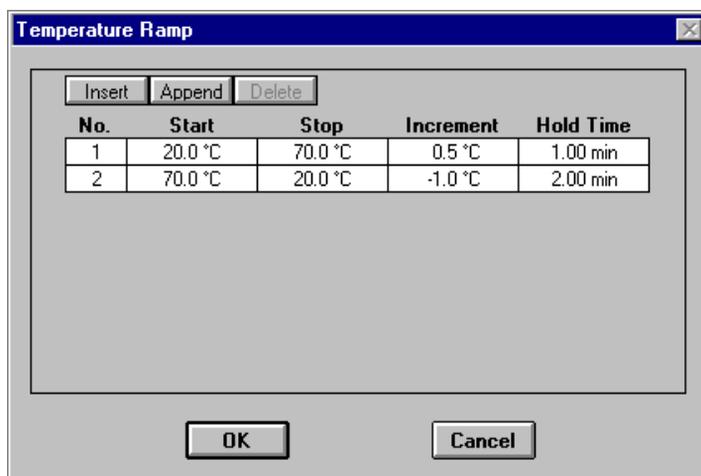
desnaturalización térmica. El panel de muestreo contiene un botón de método abreviado que abre el cuadro de diálogo Temperature Ramp (Rampa de temperatura) y muestra la temperatura actual.

Configuración del espectrofotómetro

Seleccionar el menú Instrument (Instrumento) del software de análisis bioquímico para configurar el espectrofotómetro Agilent 8453 con el fin de realizar una medida de desnaturalización térmica. La configuración de los principales parámetros del espectrofotómetro es idéntica a la descrita para la modalidad cinética de la ChemStation Agilent (véase “Configuración del espectrofotómetro” en la página 13).

Configuración de la rampa de temperatura

En la modalidad de desnaturalización térmica se debe definir el controlador de temperatura Peltier como sistema de muestreo, que aparece como Thermostatable Cell (Celda provista de termostato) en el campo Sampling (Muestreo) del panel del instrumento. Pulsar el botón Setup (Configuración) situado al lado del campo Sampling (Muestreo) para abrir el cuadro de diálogo Temperature Ramp (Rampa de temperatura), que permite configurar el programa de temperatura para el experimento de desnaturalización térmica.



Cada línea de este cuadro de diálogo define una rampa de temperatura.

- La columna No. (N^o) contiene el número de la rampa de temperatura; las rampas de temperatura se numeran en orden.
- La columna Start (Inicio) contiene la temperatura inicial de la rampa. Cuando se añade una rampa, la temperatura de inicio por defecto es la temperatura de parada de la rampa anterior.
- La columna Stop (Parada) contiene la temperatura final de la rampa. Cuando se añade una rampa al programa, la temperatura final no está definida. La temperatura de parada máxima es de 100 °C.
- La columna Increment (Incremento) contiene el valor utilizado para incrementar paso a paso la temperatura. El incremento por defecto es de 0,5 °C.
- La columna Hold Time (Tiempo de retención) contiene el tiempo que se debe mantener cada paso de temperatura. El tiempo de retención por defecto es de 1,00 minuto.

Configuración de un método de desnaturalización térmica

Para editar los parámetros analíticos del método de desnaturalización térmica, seleccionar Calculation (Cálculo) en el menú Method (Método), o pulsar el botón Setup (Configurar) del panel analítico de la interfase gráfica de usuario. Se abrirá el cuadro de diálogo Calculation Parameters (Parámetros del cálculo).

3 Modalidad de desnaturalización térmica

Calculation Parameters

Wavelength
Use wavelength at : 260 nm
Background correction : subtract average over range 500 nm 550 nm

Temperature
Use temperature from : Internal sensor

Set calculation range **Absorbance ratio**
From : °C to : °C Normalize at temperature : °C

TM calculation
 Average (mean value)
 Derivative Filterlength : 21 Sensitivity :

Equation
%GC = 2.44*(TM-81.5-16.66*log(M))

Equation for thermal expansion
 Volume correction
Volume (T) = 0.99829+104.5E-6*T+3.5E-6*SQR(T)

OK Cancel

El campo Use Wavelength at: (Utilizar longitud de onda a:) permite definir la longitud de onda de los datos procesados a partir de los cuales se extraen los valores de amplitud para el resultado de la longitud de onda. La longitud de onda por defecto es de 260 nm. Si se introduce una longitud de onda en la que no hay disponible ninguna medida (por ejemplo, un valor que no sea un número entero), los valores de amplitud se calcularán mediante una interpolación lineal.

El campo Background Correction (Corrección de fondo) permite especificar cualquier corrección de fondo que se aplique al resultado de la longitud de onda para calcular el resultado de una función. Elegir la flecha hacia abajo y seleccionar un procedimiento de corrección de fondo en la lista desplegable. Las opciones disponibles son idénticas a las de los procedimientos de la modalidad cinética.

El grupo Temperature (Temperatura) permite seleccionar la fuente de la medida. Elegir la flecha hacia abajo y seleccionar la fuente de temperatura en la lista desplegable. Si se elige un sensor interno, se utilizará la temperatura del soporte de celda provista de termostato (que se mide mediante el controlador de temperatura Peltier) para la evaluación de los datos. Si se elige un sensor externo, se utilizará la temperatura de la muestra (que se mide mediante el sensor de temperatura externo) para la evaluación de los datos.

El grupo Set Calculation Range (Definir rango del cálculo) permite limitar el cálculo de los resultados en todas las trazas a un rango de temperatura especificado. En los campos From (De) y To (A) se especifican los límites inferior y superior del rango de temperatura.

El grupo Absorbance Ratio (Relación de absorbancia) permite especificar una temperatura a la que se normalizan las absorbancias; la traza de temperatura se divide por el valor de absorbancia a la temperatura especificada. Seleccionar “Normalize at temperature” (Normalizar a temperatura) para activar la normalización, y especificar la temperatura de normalización en el campo adyacente.

El grupo Tm Calculation (Cálculo de Tf) permite seleccionar el método de cálculo para la temperatura de fusión.

- Elegir Average (Promedio) (valor medio) para calcular la temperatura de fusión como la temperatura en el valor medio de la absorbancia al inicio del rango de cálculo y al final del rango de cálculo.
- Elegir Derivative (Derivada) para calcular la temperatura de fusión utilizando la primera derivada de la traza de temperatura. En los campos adyacentes, introducir una longitud de filtro (Filter Length) para el cálculo de la derivada y una sensibilidad (Sensitivity) para presentar los valores de Tm (Tf).
- El valor del campo Filter Length (Longitud de filtro) define el número de datos que se utilizan para calcular cada punto de la traza de la derivada. El valor debe ser un número impar comprendido entre 5 y 749; el valor por defecto es 21. Al incrementar el número de puntos aumenta el grado de suavizado de la traza resultante.
- Sólo se presentan los máximos y mínimos que sean, al menos, iguales que el valor del campo Sensitivity (Sensibilidad) y que sean distintos de sus máximos o mínimos contiguos. Si se deja en blanco este campo, la sensibilidad se ajusta a 1/1.000 de la diferencia entre los valores máximos y mínimos.

3 Modalidad de desnaturalización térmica

El grupo Equation (Ecuación) permite definir la ecuación para el cálculo de un resultado.

- Escribir un nombre de parámetro para el resultado en el campo situado a la izquierda de la ecuación, e introducir la ecuación en el campo situado a la derecha. Utilizar T_m (T_f) (temperatura de fusión), M (molaridad de la muestra) y K (longitud de DNA).
- El grupo Equation for Thermal Expansion (Ecuación para expansión térmica) permite realizar una corrección del cambio de absorbancia debido a la expansión térmica de la solución al calentarse. Seleccionar Volume Correction (Corrección de volumen) para especificar que debe realizarse una corrección de la expansión térmica. Introducir la ecuación para la corrección del volumen en el campo Volume (T) = (Volumen (T) =). Pueden utilizarse los mismos operadores en la ecuación de corrección del volumen y en el grupo Equation (Ecuación). Utilizar la variable T para la temperatura de la muestra.

Seleccionar Temperature & Options (Temperatura y opciones) en el menú Method (Método) para abrir el cuadro de diálogo Temperature & Options (Temperatura y opciones). En este cuadro de diálogo se puede elegir de entre varias opciones para el experimento de desnaturalización térmica.

Temperature & Options

Temperature unit
 Celsius
 Kelvin
 Fahrenheit

Stirrer
 Off
 On
Speed : rpm

Online trace monitor
 Auto scaling
 Fixed scaling
From : to : AU

Idle temperature : °C

Ramping speed
 Slow Fast

Save spectra
 Autosave spectra to file:

Method Information
Default Method of Thermal Denaturation Mode

OK Cancel

- El grupo Temperature Unit (Unidad de temperatura) permite elegir las unidades de temperatura para fines de medida y control. Las opciones disponibles son Celsius (°C), Kelvin (°K) y Fahrenheit (°F).
- Elegir On (Encendido) en el grupo Stirrer (Mezclador) para activar el mezclador. Cuando el mezclador está encendido, se puede definir la velocidad en rpm introduciéndola en el campo Speed (Velocidad).
- En el grupo On-line Trace Monitor (Monitor de trazas en línea) se puede especificar la escala de absorbancia (eje de ordenadas “y”) del monitor de trazas en línea. Elegir Auto Scaling (Ajuste automático de escala) para permitir que ChemStation calcule la escala de absorbancia en función de las intensidades de las señales, o bien elegir Fixed Scaling (Escala fija) para definir una escala de absorbancia fija. Si se selecciona Fixed Scaling (Escala fija), se podrán definir los límites inferior y superior de la escala de absorbancia introduciéndolos en los campos From (De) y To (A).
- En el grupo Idle Temperature (Temperatura durante tiempo de inactividad) se puede editar la temperatura que se define entre experimentos de desnaturalización térmica.
- En el grupo Ramping Speed (Velocidad a rampas) se puede seleccionar la velocidad a la que se incrementa la temperatura. Elegir Slow (Lenta) para aumentar la temperatura incrementalmente con cada paso de la rampa de temperatura. Elegir Fast (Rápida) para aumentar la temperatura balísticamente con cada paso de la rampa de temperatura.

NOTA

Si los pasos son largos, existe el peligro de que la temperatura rebase los límites en la modalidad Fast (Rápida).

- Seleccionar “Autosave spectra to file” (Guardar automáticamente los espectros en un fichero) para indicar que se deben guardar los espectros adquiridos. Escribir un nombre para el fichero de datos en el campo Autosave Filename: (Nombre de fichero para guardar automáticamente:). El nombre debe seguir las convenciones de designación de ficheros del DOS (8 caracteres alfanuméricos como máximo). Si no se selecciona “Autosave spectra to file” (Guardar automáticamente los espectros en un fichero), no se guardarán los espectros.
- Se puede escribir una descripción del método en el campo Method Information (Información del método). Este campo acepta cualquier carácter alfanumérico y la descripción puede tener una longitud cualquiera. El texto pasa automáticamente de una línea a otra.

3 Modalidad de desnaturalización térmica

El cuadro de diálogo Set Individual Calculation Range (Definir rango de cálculo individual) aparece cuando se elige el comando Set Individual Calculation Range (Definir rango de cálculo individual) en el menú Method (Método). Permite definir un rango de temperatura para el cálculo de los resultados de la desnaturalización térmica en la traza mostrada en ese momento. En los campos From (De) y To (A) del cuadro de diálogo se introducen los límites inferior y superior del rango de temperatura.

El experimento de desnaturalización térmica

Una vez definida la rampa de temperatura y editados los parámetros del método, se podrá iniciar el experimento de desnaturalización térmica. En este apartado se incluye información sobre el monitor en línea en tiempo real y las funciones de la ChemStation Agilent utilizadas para procesar los datos experimentales.

Realización de un experimento de desnaturalización térmica

Las medidas se pueden iniciar utilizando el menú Measure (Medir) de la barra de menús, pulsando los botones Blank (En blanco), Sample (Muestra) y Thermal Measurement (Medida térmica) de la barra lateral de la interfase gráfica de usuario, o utilizando determinadas teclas F.

Antes de medir un espectro único o de realizar un experimento de desnaturalización térmica, es necesario medir un espectro en blanco seleccionando la opción Blank (En blanco) en el menú Measure (Medir), pulsando la tecla F4, o haciendo clic en el botón Blank (En blanco) de la barra lateral de la interfase gráfica de usuario.

Para medir un único espectro de la solución contenida en la celda y mostrarlo en la ventana Sample Spectra (Espectros de la muestra), seleccionar Sample (Single Spectrum) (Muestra (Espectro único)) en el menú Measure (Medir). También se puede medir un único espectro pulsando la tecla F5 o haciendo clic en el botón Sample (Muestra) de la barra lateral de la interfase gráfica de usuario.

Si se pulsa la tecla F7 o se selecciona Thermal Measurement (Medida térmica) en el menú Measure (Medir) o en la barra lateral de la interfase gráfica de usuario, aparecerá el cuadro de diálogo Sample Information (Información de la muestra).

- Introducir un nombre de muestra en el campo Sample Name (Nombre de la muestra). El nombre de la muestra se incluye en la tabla y en los informes.
- Introducir un nombre de disolvente en el campo Solvent (Disolvente). Los detalles del disolvente se incluyen en la tabla Results of Trace (Resultados de la traza) y en los informes.

- En el campo Molarity (M) (Molaridad (M)), introducir la molaridad de la muestra en mol/l. La molaridad se incluye en la tabla Results of Trace (Resultados de la traza) y en los informes, y se utiliza en el cálculo de %G-C.
- Introducir la longitud del DNA de la muestra en parejas base (pb) en el campo DNA Length (K) (Longitud del DNA (K)). La longitud del DNA se incluye en la tabla Results of Trace (Resultados de la traza) y en los informes, y se utiliza en el cálculo de %G-C.
- En el campo Comment (Comentario) se puede introducir un comentario (por ejemplo, una descripción de la muestra).

Pulsar el botón Run (Ejecutar) en la ventana Sample (Muestra) para iniciar la adquisición y mostrar la ventana All Spectra (Todos los espectros), la ventana Trace (Traza) y la ventana Sample Information (Información de la muestra). En primer lugar, el controlador de temperatura Peltier define la temperatura de inicio en el soporte de la celda. Una vez transcurrido el tiempo de retención definido en el cuadro de diálogo Temperature Ramp (Rampa de temperatura), se mide el primer espectro y el controlador de temperatura Peltier ajusta la siguiente temperatura de la rampa.

Durante la medida térmica se puede observar en tiempo real la adquisición de los espectros y las trazas de temperatura en la ventana All Spectra (Todos los espectros) y en la ventana Trace (Traza).

Una vez que la medida térmica haya finalizado o haya sido interrumpida por el usuario, los datos se almacenarán de la manera especificada en el cuadro de diálogo Temperature & Options (Temperatura y opciones). Las trazas se evalúan mediante el procedimiento definido en el cuadro de diálogo Calculation Parameters (Parámetros del cálculo). Estos resultados aparecen en la ventana Result (Resultado).

Evaluación de los datos de desnaturalización térmica

Una vez que haya finalizado la medida de la desnaturalización térmica, existe la posibilidad de volver a evaluar los datos experimentales. Puesto que durante la medida se han adquirido espectros completos, se pueden modificar todos los parámetros del cuadro de diálogo Calculation Parameters (Parámetros del cálculo). Hacer clic en Aceptar para activar los cambios. Los nuevos resultados aparecen en la ventana Results of Heating Trace

(Resultados de la traza de calentamiento). Si se han cambiado los parámetros del método, el indicador de modificación Mod aparecerá en la barra de herramientas de la interfase gráfica de usuario.

Si se pulsa el botón Edit Sample Information (Editar información de la muestra) en la ventana Results of Heating Trace (Resultados de la traza de calentamiento), aparecerá el cuadro de diálogo Sample Information (Información de la muestra). Permite incluir información sobre las muestras que se puede utilizar en los cálculos de resultados.

Visualización de los resultados

Hay varias opciones para mostrar los datos adquiridos y procesados, así como los resultados tabulados. Seleccionar el menú View (Ver), que contiene:

- All spectra (Todos los espectros) muestra todos los espectros adquiridos en la ventana Sample Spectra (Espectros de la muestra).
- Spectra of Current Trace (Espectros de la traza actual) muestra los espectros de la traza seleccionada en ese momento en la ventana Spectra of Current Trace (Espectros de la traza actual).
- All Traces (Todas las trazas) muestra todas las trazas de temperatura en la ventana Temperature Trace (Traza de temperatura).
- Traces and Results (Trazas y resultados) muestra la ventana Time Traces (Trazas de tiempo), la ventana Results (Resultados) y la tabla Method Summary (Resumen del método).
- Measured Single Spectra (Espectro único medido) muestra un espectro medido en la ventana Single Spectra (Espectros únicos).
- Last Blank Spectrum (Último espectro en blanco) muestra la ventana Last Blank Spectrum (Último espectro en blanco).
- Tabulate Selected Spectrum/Trace (Tabular espectro/traza seleccionado) muestra la tabla Tabular Data of Spectra (Datos tabulares de espectros) del espectro seleccionado, o la tabla Tabular Data of Time Traces (Datos tabulares de trazas de tiempo) de la traza de tiempo seleccionada. Estas tablas también aparecen automáticamente cuando se hace doble clic con el botón izquierdo del ratón en un espectro/traza de tiempo en una ventana gráfica, o cuando se pulsa la tecla Intro mientras se utiliza el cursor. El título de la tabla indica el tipo de espectro (por ejemplo, Sample (Muestra), Standard (Estándar)), con el número del espectro/traza de tiempo mostrado en la ventana entre corchetes, por ejemplo, [1].

3 Modalidad de desnaturalización térmica

- Logbooks (Historiales) muestra el cuadro de diálogo Logbooks (Historiales), donde se puede seleccionar un historial para mostrarlo o imprimirlo.
- Load Logbook (Cargar historial) muestra el cuadro de diálogo Load Logbook (Cargar historial), donde se puede seleccionar un historial almacenado previamente para cargarlo.
- Next Window (Ventana siguiente) muestra la siguiente ventana de la serie. Si la ventana está oculta detrás de otras ventanas, Next Window (Ventana siguiente) la muestra en primer plano. Si la ventana está reducida en forma de icono, Next Window (Ventana siguiente) la muestra con su tamaño y posición por defecto. Pulsar la tecla F11 del teclado equivale a elegir Next Window (Ventana siguiente).
- Previous Window (Ventana anterior) muestra la ventana anterior de la serie. Si la ventana está oculta detrás de otras ventanas, Previous Window (Ventana anterior) la muestra en primer plano. Si la ventana está minimizada en forma de icono, Previous Window (Ventana anterior) la muestra con su tamaño y posición por defecto.
- Reset Current View (Restaurar vista actual) restaura todas las ventanas de la vista actual a sus tamaños y posiciones por defecto.

Índice

A

ajuste automático de escala, 25
ajustes de ganancia, 23, 24

B

barra de herramientas, 12, 31
Barra lateral, 13

C

cinética de orden cero, 21
cinética de primer orden, 21
cinética de reacción rápida, 15, 23
confirmación de la instalación, 8
Controlador de temperatura Peltier, 9, 16, 18, 32, 40
corrección de dispersión luminosa, 21, 23
corrección de fondo, 19, 34
Cuadro de diálogo Calculation Parameters (Parámetros del cálculo), 32, 33, 41
Cuadro de diálogo Instrument Parameters (Parámetros del instrumento), 14
cuadro de diálogo Options & Info (Opciones e información), 18, 22, 24
cuadro de diálogo Temperature & Options (Temperatura y opciones), 36, 40
cuadro de diálogo Time & Calculation (Tiempo y cálculo), 18, 26

D

datos no válidos, 23, 24
definir ganancias, 24
delta AU, 21
desnaturalización térmica, 31
disparo externo, 23

DNA

Contenido de GC, 40
longitud, 36, 40

E

ecuación
edición, 36
editor de configuración, 9
espectro en blanco, 27, 39, 41
espectros de celdas puestas a cero, 27
expansión térmica, 36

G

guardar automáticamente, 23, 37

H

historial, 28, 42

I

incrementar ciclo, 21
información de la muestra, 23, 26
inhibidor, 26
instalación
software, 8
interfase gráfica de usuario, 12, 31
intervalo de longitud de onda, 15

L

lámpara de deuterio, 15
lámpara de tungsteno, 15
lámparas, 15
línea vertical de tres puntos, 20
longitud de filtro, 35
longitud de ruta, 17, 18

M

mecanismo de transporte multicelda, 16, 22, 27
medida
basada en el tiempo, 13, 25
térmica, 39
medida en blanco, 25
menú
Config, 23
Instrument (Instrumento), 13, 32
Medir, 24
Método, 18
Mode (Modalidad), 12, 31
View (Ver), 27
método
desnaturalización térmica, 33
información, 23, 37
parámetros, 18, 26
MKD files, 27
monitor de trazas, 20
monitor en línea, 37
multiplicar velocidad, 22

P

poner a cero las celdas, 24

R

Rampa de temperatura, 32, 40
rango de cálculo, 21, 35
resultados matemáticos, 27

S

sistema de muestreo, 16
sustrato, 26

Índice

T

temperatura

 sensor externo, 35

 sensor interno, 35

 tiempo de inactividad, 37

 unidades, 37

temperatura de fusión, 35

 derivada, 35

 promedio, 35

 sensibilidad, 35

temperatura de inicio, 33, 40

temperatura final, 33

tiempo de ciclo, 15, 21, 23

tiempo de ciclo mínimo, 21

tiempo de ejecución, 20

tiempo de inicio, 20

tiempo de integración, 15, 23

tiempo de retención, 33

U

utilizar longitud de onda, 19, 34

V

velocidad a rampas, 37

velocidad del mezclador, 37

velocidad inicial, 21

ventana resultados, 25, 27

ventana traza de tiempo, 25

www.agilent.com

En este manual

El software de análisis bioquímico para la ChemStation Agilent añade la modalidad cinética y la modalidad de desnaturalización térmica al software de uso general. Estas dos modalidades permiten realizar experimentos cinéticos y de desnaturalización térmica con el espectrofotómetro Agilent 8453. Incluye posibilidades para desarrollar métodos analíticos, monitorización en línea en tiempo real para visualizar la marcha de los experimentos, y herramientas para evaluar y procesar los datos experimentales.

Este manual contiene instrucciones para la instalación del software y describe los componentes de hardware necesarios para llevar a cabo experimentos cinéticos y de desnaturalización térmica. Además, contiene información sobre las funciones más importantes del software, que ayudan a resolver los problemas analíticos.

© Agilent Technologies Deutschland GmbH
2002,2003

Impreso en Alemania
10/2003



G1117-95008



Agilent Technologies