

## VII. PREPARACION Y CARACTERIZACION DE LAS MUESTRAS

### VII.1 Preparación del ácido desoxirribonucleico y la desoxirribonucleohistona

El ADN de timo de ternera se prepara con el método de KAY y otros (56). También se emplea el ADN comercial marca Sigma, tipo I, cat. D 1501. Ambas muestras presentan características electroópticas similares y pueden considerarse equivalentes para este trabajo.

La desoxirribonucleohistona (DNH) se prepara con el método de FREDERICQ (57).

### VII.2 Degradación de las muestras por la acción del ultrasonido

Se emplea un generador ultrasónico marca Mullard de 60 W con una frecuencia de 20 KHz y otro marca Lab Line Ultratip de la misma frecuencia que el anterior.

Las soluciones de ADN y DNH, con concentraciones comprendidas entre 25 y 120 mg/dl, se colocan en un recipiente de vidrio enfriado con hielo. El volumen de la solución es de 25 ml. El transmisor de ultrasonido se introduce en la solución 2 mm.

La degradación ultrasónica se realiza durante el tiempo necesario para llegar al límite de menor peso molecular, que es de  $1,5 \times 10^5$  Dalton para el ADN y  $5,5 \times 10^5$  Dalton para la DNH (58).

Para estimar el peso molecular de las muestras degradadas de ADN se realizan medidas de viscosidad intrínseca a 25 °C empleando viscosímetros de Ostwald con gradientes de velocidad del orden de 150 (1/s) y usando la relación:  $(\eta) = 1,05 \times 10^{-7} M^{1,32}$ , donde  $(\eta)$  es la viscosidad intrínseca y M es el peso molecular (59). Esta expresión es válida hasta pesos moleculares de  $2 \times 10^6$  Dalton en soluciones acuosas con NaCl 0,2 M.

### VII.3 Filtración en gel

Para realizar las experiencias de cromatografía en gel se emplea una columna de 50 cm de altura y 2,6 cm de diámetro marca Pharmacia, llena con gel de agarosa, Sepharose 4B de la misma marca. El volumen inicial de la muestra es de 10 a 25 ml. El tiempo de elución se mantiene aproximadamente en 22 ml por hora. Las condiciones particulares de cada experiencia se detallan en la secciones XII.5 y XII.6.

### VII.4 Obtención de los complejos ADN-Histonas

Las distintas fracciones de histonas de la nucleohistona sonicada se disocian mediante el agregado de NaCl con concentraciones 0,6; 2,1; 1,6 y 2 M. En cada caso se separan los complejos ADN-Histonas de las histonas disociadas realizando cromatografías en columna con gel. Los complejos así obtenidos se dializan contra una solución acuosa de NaCl 1mM con un Ph de 6,5.

### VII.5 Determinación de la concentración de las soluciones de ADN y de DNH:

Las concentraciones en g/dl de las soluciones de ADN y DNH se encuentran midiendo la absorbancia de las mismas a 260 nm y en un trayecto óptico de 1 cm. Se emplean los coeficientes de extinción  $E = 200 \text{ dl}/(\text{g}\cdot\text{cm})$  para el ADN y  $215 \text{ dl}/(\text{g}\cdot\text{cm})$  para la DNH.

Las mediciones de absorbancia se realizan con los espectrofotómetros Shimadzu QV 50 y Metrolab UV 250.

### VII.6 Dosaje de proteínas:

Tanto las proteínas residuales del ADN como la razón en peso Proteína/ADN de la DNH y de los complejos ADN-Histonas se determinan con el método de FOLIN-LOWRY (80).