

XII RESULTADOS EXPERIMENTALES

XII.1 Señales de birrefringencia eléctrica del ADN soni- cado

Las señales de birrefringencia obtenidas al aplicar un campo eléctrico (pulso rectangular) a una solución acuosa de ADN sonificado se pueden, despreciando en primera aproximación la polidispersión de la muestra, descomponer en una suma de dos señales de birrefringencia con signos opuestos y con decaimientos exponenciales. En la Fig. XII.1 se exhibe el transitorio completo de la birrefringencia eléctrica para una solución acuosa de ADN sonificado con una concentración de 38 mg/dl en presencia de NaCl 1 mM y un pH de 6,5. El campo eléctrico aplicado es de 1 KV/cm.

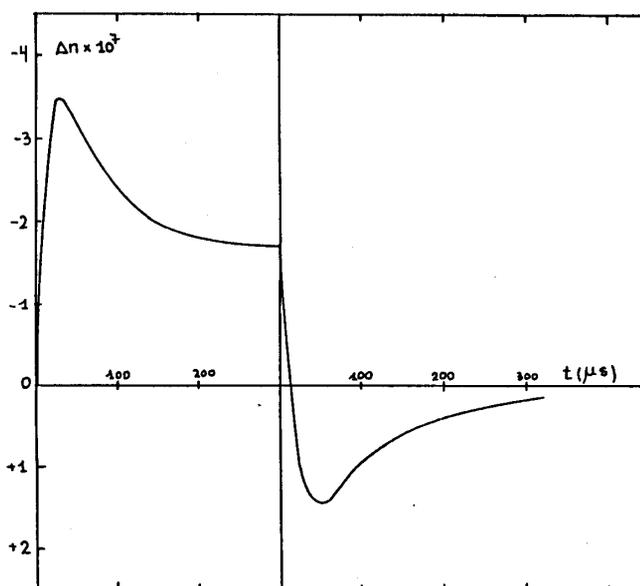


Figura XII.1

En la Fig. XII.2 se muestra el ajuste de este mismo transitorio, a partir del instante en el que se suprime el campo eléctrico, mediante la función:

$$\Delta n \cdot 10^7 = 2,55 \cdot \exp(-t/105\mu\text{s}) - 4,26 \cdot \exp(-t/17\mu\text{s})$$

Este ajuste se realiza mediante el método de los cuadrados mínimos.

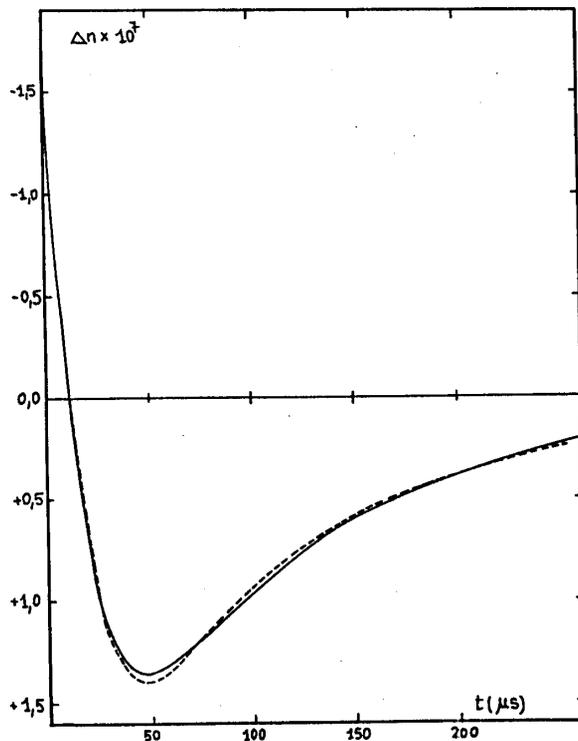


Figura XII.2

XII.2 Efecto de la concentración sobre la birrefringencia eléctrica del ADN sonificado

En la Fig. XII.3 se muestran las señales de fotocorriente obtenidas al aplicar un pulso de campo eléctrico rectangular a soluciones de ADN sonificado progresivamente diluidas desde 94 mg/dl hasta 5,9 mg/dl. En ella se puede apreciar como la componente positiva de la birrefringencia eléctrica disminuye con la dilución hasta desaparecer para una concentración en ADN de 5,9 mg/dl (foto f) para la cual la señal es

completamente negativa. Las características de la experiencia son las siguientes: Intensidad de campo eléctrico $E = 1,1 \text{ KV/cm}$. Las soluciones son acuosas, con $\text{NaCl } 1\text{mM}$ y $\text{pH } 6.5$

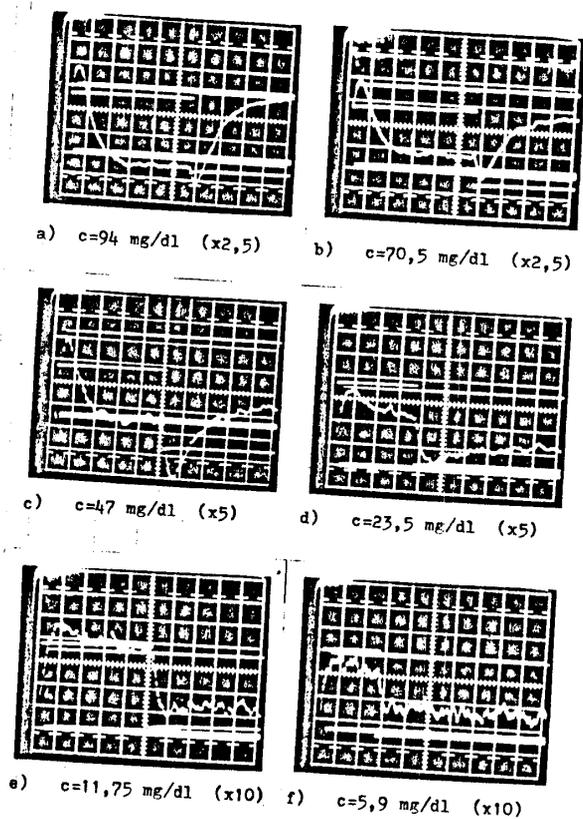


Figura XII.3

Debajo de cada foto figura la concentración del ADN en las soluciones. La base de tiempo es de $0,1 \text{ ms/cm}$ para todas las fotos menos para la foto f que es de $0,2 \text{ ms/cm}$. El número entre paréntesis en cada foto corresponde al factor de amplificación de la escala vertical, respecto de la referencia I_{α} , que se adoptó en cada registro de señal. El ángulo α en el sistema óptico es de 5 grados.

En la Fig. XII.4 se representa la birrefringencia eléctrica en el estado estacionario, Δn , de soluciones de ADN sonificado progresivamente diluidas en función del cuadrado de la intensidad del campo eléctrico. Son soluciones acuosas

con NaCl 1mM y pH 6,5. Las concentraciones en mg/dl del ADN en las soluciones son las siguientes: (○) 37,7; (●) 55,5; (□) 73,6; (■) 92,0; (△) 115,0.

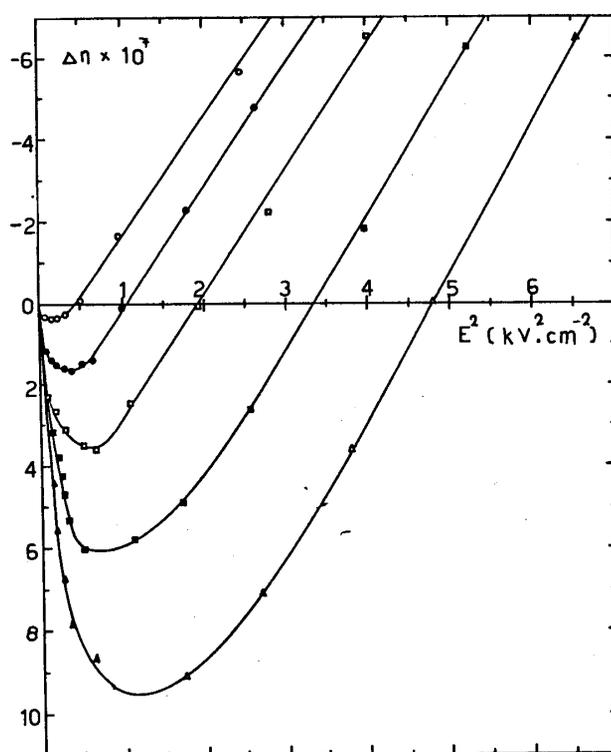


Figura XII.4

En la Fig. XII.5 se grafican los valores máximos de la birrefringencia eléctrica en el estado estacionario, Δn_m , en función del cuadrado de la concentración, correspondientes a las gráficas Δn vs. E^2 de la Fig. XII.4. Se observa una dependencia aproximadamente lineal entre estas dos magnitudes.

El valor de saturación de la birrefringencia eléctrica, Δn_s , se obtiene extrapolando a intensidad de campo eléctrico infinito empleando un gráfico de Δn en función de $(1/E^2)$ como en la Fig. XII.6. En ella las concentraciones, en mg/dl, del ADN en las soluciones son las siguiente: (▲) 18,4; (○) 37,7; (●) 55,5; (□) 73,6; (■) 92,0; (△) 115.

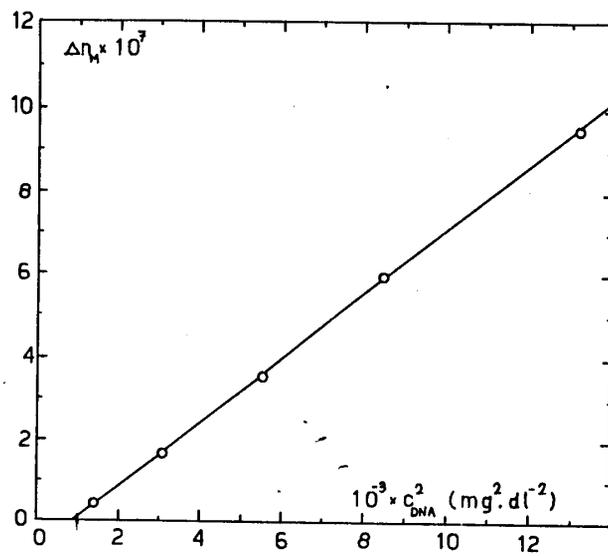


Figura XII.5

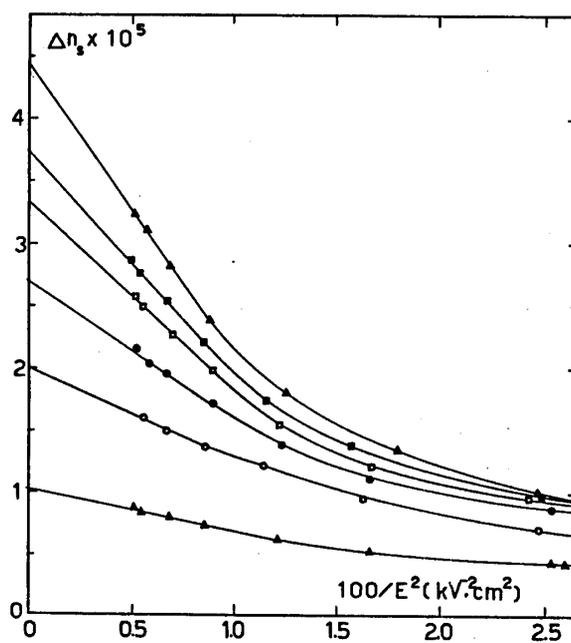


Figura XII.6

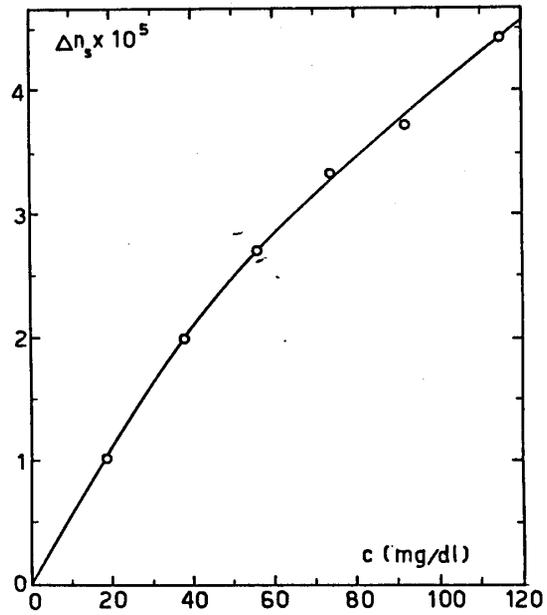


Figura XII.7

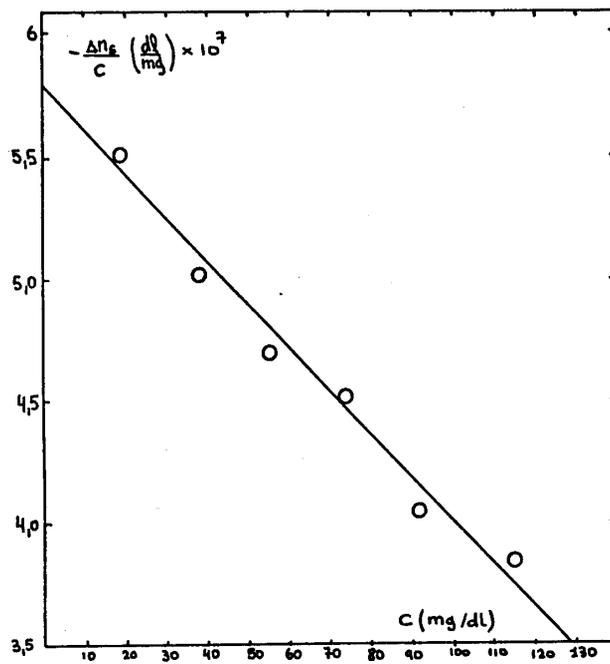


Figura XII.8

La Fig. XII.7 muestra la dependencia entre Δn_e y la concentración c . De una manera empírica se determina el valor de $(\Delta n_e/c)$ para c tendiendo a 0, dado que la relación entre la birrefringencia eléctrica de saturación por unidad de concentración $(\Delta n_e/c)$ y la concentración c es lineal. Del gráfico de la Fig. XII.8 se obtiene $(\Delta n_e/c)_{c \rightarrow 0} = -5,8$ dl/mg.

XII.3 Efecto del $MgCl_2$ sobre la birrefringencia eléctrica del ADN sonificado

La componente positiva de la birrefringencia eléctrica de soluciones acuosas de ADN sonificado desaparece con el agregado de $MgCl_2$. Esto puede verse en la Fig. XII.9 donde se

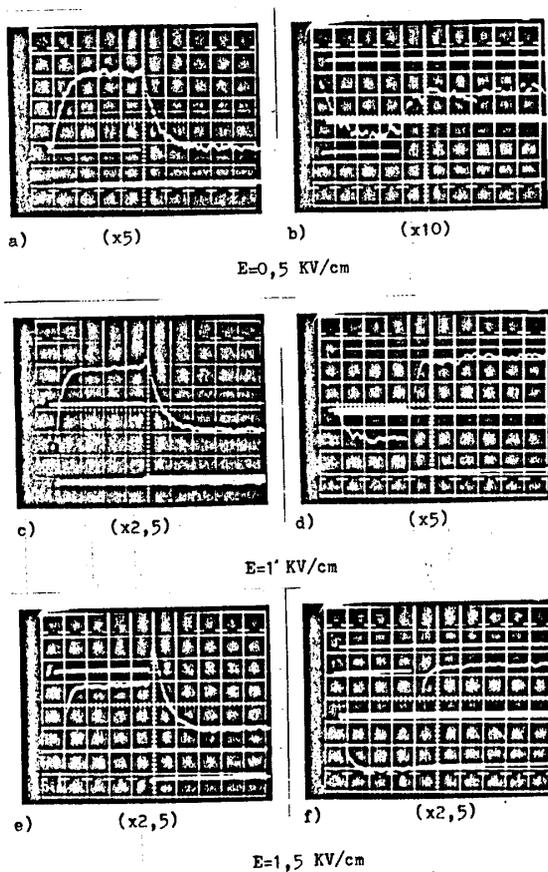


Figura XII.9

muestran las señales de fotocorriente correspondientes a soluciones de ADN sonicado, para tres intensidades de campo eléctrico diferentes, con y sin presencia de $MgCl_2$. Las características de las mediciones son las siguientes: La concentración del ADN es de 94,0 mg/dl para todos los casos. Las soluciones son acuosas con $NaCl$ 1 mM y pH 6,5. Las soluciones correspondientes a las fotos b, d y f tienen además $MgCl_2$ 1 mM. La intensidad del campo eléctrico es de 0,5 KV/cm para las fotos a y b, 1 KV/cm para las fotos c y d y 1,5 KV/cm para las fotos e y f. La base de tiempo es de 0,2 ms/cm para las fotos a, c y e y 0,1 ms/cm para las fotos b, d y f. El número entre paréntesis debajo de cada foto corresponde al factor de amplificación de la escala vertical, respecto de la referencia I_α , que se adoptó en cada registro de señal. El ángulo α en el sistema óptico es de 5 grados.

La Fig. XII.10 muestra la birrefringencia eléctrica en el

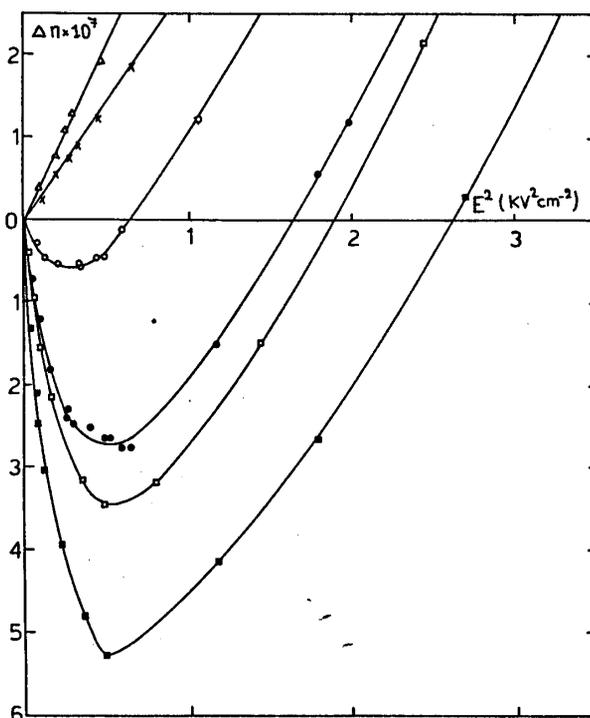


Figura XII.10

estado estacionario Δn para soluciones de ADN sonificado con diferentes concentraciones de $MgCl_2$ en función del cuadrado de la intensidad de campo eléctrico E . En todos los casos las soluciones son acuosas, con una concentración de ADN de 71 mg/dl y con $NaCl$ 1mM. El pH es de 6,5. Las concentraciones, en moles por litro, del $MgCl_2$ correspondientes a las distintas gráficas son las siguientes: (■) 0,0; (□) 5×10^{-5} ; (●) 1×10^{-4} ; (○) $2,5 \times 10^{-4}$; (×) 5×10^{-4} ; (△) 1×10^{-4}

Se observa que el valor máximo Δn_m de la birrefringencia eléctrica en el estado estacionario disminuye con el incremento de la concentración de $MgCl_2$ y no ocurre la inversión de su signo para una concentración de $MgCl_2$ mayor que 3×10^{-4} M.

XII.4 Birrefringencia eléctrica de los complejos ADN-Histonas

Las soluciones de nucleohistona sonificada presentan una birrefringencia eléctrica negativa aún para campos eléctricos pequeños. Se estudia aquí el efecto sobre la birrefringencia eléctrica de ir extrayendo progresivamente las histonas de la nucleohistona. Se disocian distintas fracciones de histonas de la nucleohistona sonificada mediante el agregado de $NaCl$ en concentraciones 0,6; 1,2; 1,6 y 2 M. En cada caso se separan los complejos ADN-histonas de las histonas disociadas mediante cromatografías en columna con gel de agarosa (Sephrose 4B de Pharmacia). Los complejos así obtenidos se dializan siempre contra una solución acuosa de $NaCl$ 1mM/l con un pH de 6,5.

La Fig. XII.11 muestra la birrefringencia eléctrica en el estado estacionario Δn y para los complejos ADN-histonas en función del cuadrado de la intensidad de campo eléctrico. El número que precede al símbolo DNH (desoxirribonucleohistona) indica la concentración molar de $NaCl$ empleada para disociar la DNH. Las concentraciones, en mg/dl, correspondientes a las gráficas de la Fig. XII.11 son las siguientes: 0,6DNH (○) 108.9; 1,2DNH (•) 78,3; 1,6DNH (△) 68.9 y 2DNH (□) 26.5.

La componente positiva de la birrefringencia eléctrica no se manifiesta en los complejos 0,6DNH y 1,2DNH mientras que se observan en los complejos 1,6DNH y 2DNH. La tabla siguiente muestra la razón en peso Proteína/ADN para los distintos complejos ADN-Histonas.

Complejo	Proteína/ADN.
0,6DNH	1,55
1,2DNH	1,11
1,6DNH	0,40
2DNH	0,05

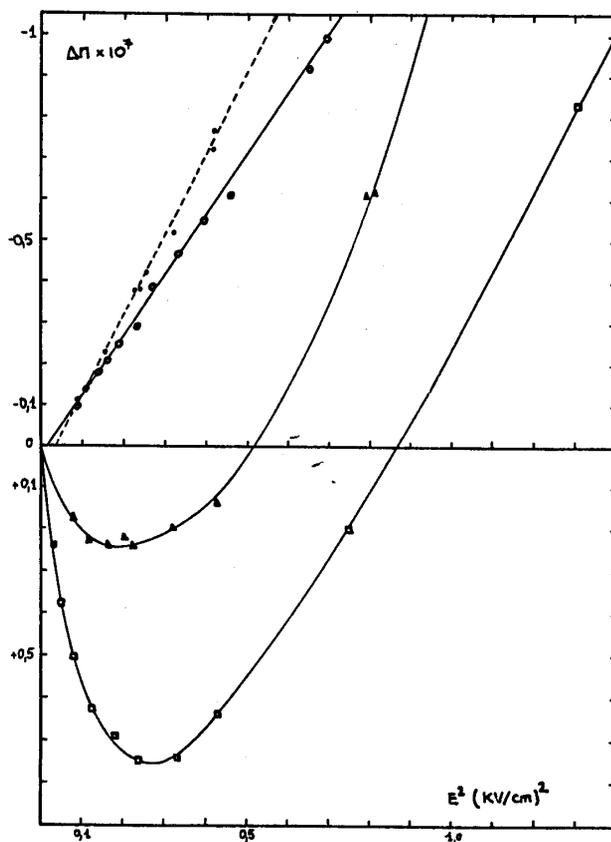


Figura XII.11

XII.5 Birrefringencia eléctrica de soluciones de ADN sonificado previamente filtradas en columna con gel

A una solución acuosa de ADN sonificado con NaCl 1mM se cromatografía en una columna con gel de agarosa (Sephacrose 4B de Pharmacia). La elución se realiza con una solución acuosa de NaCl 1mM con un pH de 6,5. La concentración inicial de la muestra de ADN es de 105,6 mg/dl. La gráfica siguiente (Fig. XII.12) muestra la absorbancia, medida con luz de 260 nm de longitud de onda y en un camino óptico de 10 mm, en función del número de tubos recogidos. Cada tubo contiene 6 ml de muestra.

Se efectúa una mezcla de los tubos 13 a 20. La muestra así obtenida se denomina "cromatografiada". Se realizan mediciones de birrefringencia eléctrica de esta muestra y la "original" sin cromatografiar llevada a la misma concentración.

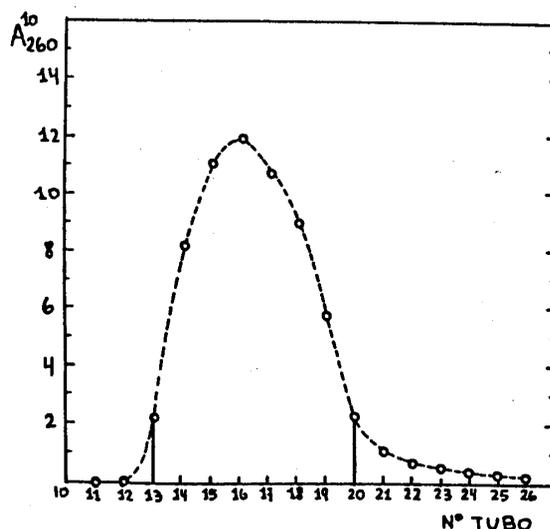


Figura XII.12

La muestra "cromatografiada" no presenta una inversión en el signo de la birrefringencia eléctrica, en el dominio de campos eléctricos pequeños, ni señales de fotocorriente con alguna componente positiva de la birrefringencia.

En la Fig. XII.13 se exhiben las señales de fotocorriente producidas al aplicar dos pulsos de tensión rectangulares consecutivos y de polaridad opuesta (inversión del campo eléctrico) a la solución "original" (a) y a la "cromatografiada" (b). Esta última no presenta cambio apreciable de la birrefringencia cuando se invierte el campo eléctrico. Ambas soluciones tienen una concentración en ADN de 38 mg/dl, poseen NaCl 1 mM y un pH de 6,5. El campo eléctrico en estas experiencias (cada pulso) es de 0,57 KV/cm con una duración de 0,7 ms en la foto a y 1 ms para la foto b. El número entre paréntesis en cada foto corresponde al factor de amplificación de la escala vertical, respecto de la referencia I que se adoptó en cada registro de señal. El ángulo α en el sistema óptico es de 5 grados.

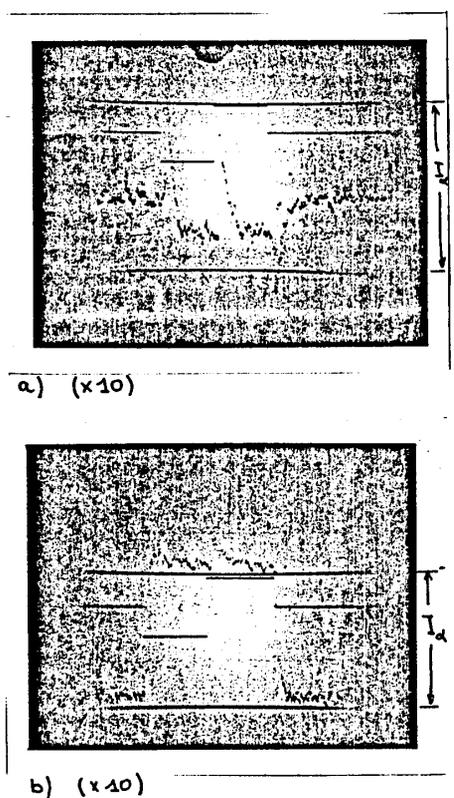


Figura XII.13

La Fig. XII.14 muestra la birrefringencia eléctrica en función del cuadrado de la intensidad de campo eléctrico para las muestras "cromatografiada" (a) y la "original" (b). Se observa que la muestra "cromatografiada" verifica la ley de Kerr.

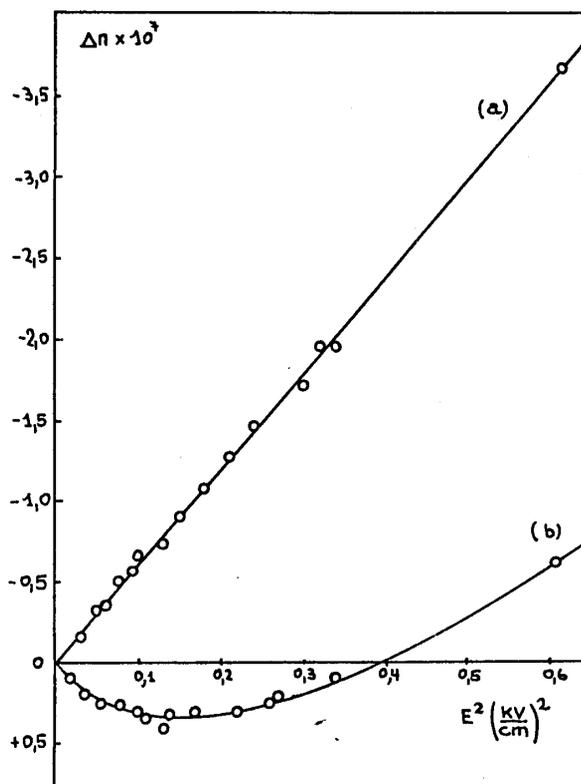


Figura XII.14

El ADN sonificado "cromatografiado" vuelve a presentar un componente positivo de la birrefringencia eléctrica al ser actuado por concentraciones elevadas de NaCl. La solución "cromatografiada" se lleva a una concentración 2 M en NaCl y a las 8 horas se dializa contra una solución acuosa de NaCl 1mM. La solución así obtenida presenta señales de fotocorriente como la exhibida en la Fig. XII.15, que corresponde a una concentración en ADN de 29,5 mg/dl, a una intensidad de campo eléctrico de 0,97 KV/cm con una duración de

0,8 ms. El número debajo de la foto corresponde al factor de amplificación de la escala vertical, respecto de la referencia I_{α} , que se adoptó al registrar la señal. El ángulo α en el sistema óptico es de 5 grados.

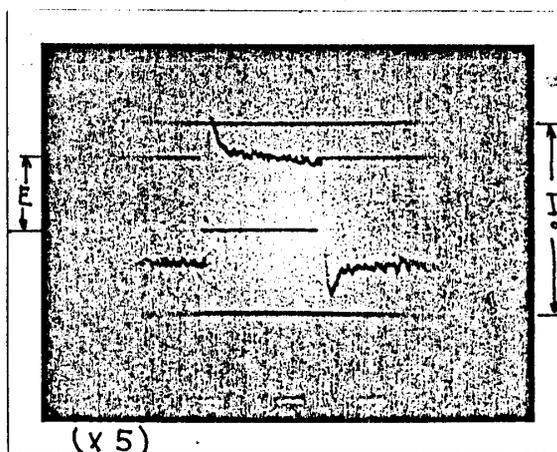


Figura XII.15

XII.6 Birrefringencia eléctrica del ADN sonificado obtenido a partir de ADN nativo previamente filtrado a través de gel de agarosa

El proceso de obtención de la muestra es el siguiente: Se realiza una cromatografía del ADN nativo en columna con gel de agarosa (Sephacrose 4B de Pharmacia). La elución se efectúa con una solución acuosa de NaCl 1 mM con un pH de 6,5. Se mezclan las fracciones extraídas de mayor concentración. La muestra así obtenida se concentra de 5 mg/dl a 26 mg/dl, se dializa luego contra una solución acuosa de NaCl con una concentración 1 mM y finalmente se somete a la acción del ultrasonido. La solución obtenida de esta manera no presenta un componente positiva de la birrefringencia eléctrica. Además al aplicar a la solución dos pulsos de tensión rectangulares consecutivos y de polaridad opuesta (inversión del campo eléctrico) no hay cambio apreciable de la birrefringencia eléctrica cuando se produce la inversión. La foto de la Fig. XII.16 corresponde a una concentración de ADN de

26,1 mg/dl, una intensidad de campo eléctrico $E=0,57$ KV/cm y una duración de 0,6 ms (cada pulso). En esta experiencia $\alpha=5$ grados.

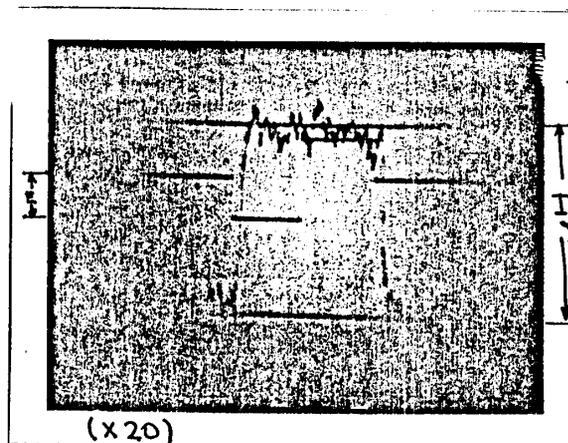


Figura XII.16

XII.7 Tiempo de relajación de la birrefringencia eléctrica positiva del ADN sonificado

-Tiempo de relajación de la birrefringencia eléctrica Δn en función de la concentración de ADN para un campo eléctrico de 228 V/cm :

Puede considerarse constante e igual a 200 μ s, dentro de un error experimental del 10 %, para las siguientes concentraciones de ADN: 37,7; 55,5; 73,5; 92 y 115 mg/dl. Las soluciones son acuosas con NaCl 1 mM/l y pH 6,5.

-Efecto del $MgCl_2$ sobre el tiempo de relajación de la birrefringencia eléctrica positiva del ADN sonificado:

A una solución de ADN sonificado con una concentración de 71,4 mg/dl en NaCl 1 mM y pH 6,5 se le agrega distintas cantidades de $MgCl_2$.

El campo eléctrico empleado en la experiencia es de 228 V/cm.

Los resultados se muestran en la tabla siguientes.

Tabla 1

Concentración molar de $MgCl_2$	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}	0
Tiempo de relajación (μs)	140	160	184	200

Con un error del 10 %.

XII.8 Transitorio de la birrefringencia eléctrica positiva del ADN sonificado después de invertir el campo eléctrico.

Las mediciones se realizaron con un campo eléctrico de 228 V/m para el cual la birrefringencia eléctrica del ADN sonificado es completamente positiva.

El transitorio de la birrefringencia eléctrica después de invertir el campo presenta un mínimo Δn_{\min} tal que el cociente $[\Delta n_{\min} / \Delta n_e]$, donde Δn_e representa la birrefringencia en el estado estacionario antes de invertir el campo eléctrico, vale 0,5 con un error del 10 % para una concentración en ADN de 37.5 mg/dl.

El tiempo transcurrido entre el momento de invertir el campo eléctrico y el instante en que la birrefringencia toma su valor mínimo es de 230 μs para la misma concentración de ADN mencionada arriba (error del 10%).

XII.9 Refractometría diferencial de soluciones de ADN sonificado

En la Fig. XII.17 se exhibe la gráfica de calibración del refractómetro diferencial descrito en la sección (XI), que relaciona los incrementos de índice de refracción con los desplazamientos $\delta n = K \cdot \Delta d$. Esta calibración se realizó con soluciones de sacarosa a $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ para las cuales: $(\delta n/c) = 0,1436 \text{ ml/g}$. El valor de la constante K obtenido de la gráfica es de $2,333 \times 10^{-6}$ (1/división).

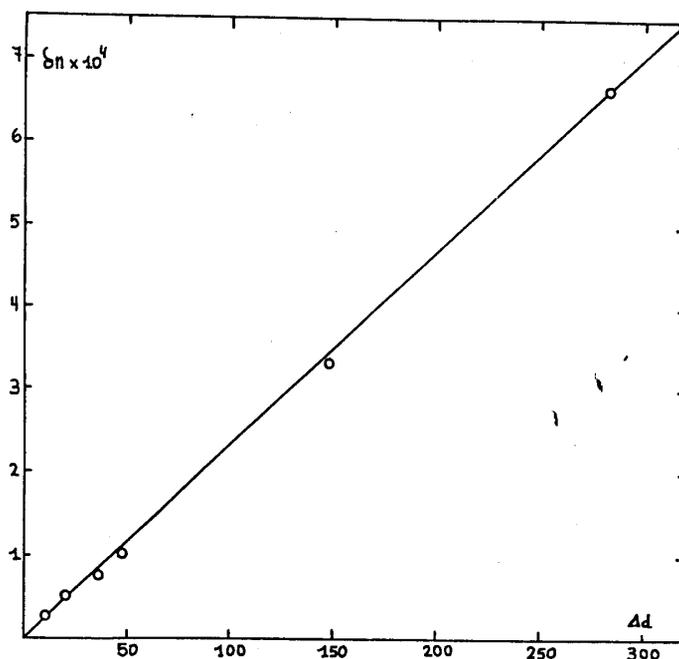


Figura XII.17

En la tabla 2 se indican los valores de δn obtenidos para soluciones de ADN sonicado con distintas concentraciones. Las mismas son acuosas con NaCl 1 mM y pH 6,5.

Tabla 2

Concentración de ADN (mg/dl)	$\delta n \times 10^4$
94	2,33
70,5	1,89
47	1,28
23	0,68

En la Fig. XII.18 se representan los valores del incremento de índices de refracción con respecto al solvente, por unidad de concentración, en función de la concentración para las soluciones mencionadas arriba. De esta gráfica se obtie-

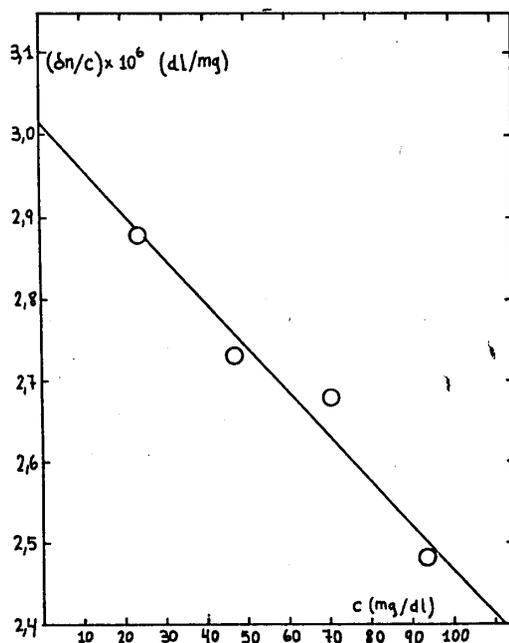


Figura XII.18

ne el valor de $(\delta n/c)$ extrapolando a concentración nula :
 $(\delta n/c) = 3,0 \times 10^{-8}$ dl/mg. Temperatura de la experiencia:
 $20^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$.

XII.10 Determinación de los coeficientes de sedimentación de muestras de ADN sonicado

La tabla 3 muestra cuatro experiencias de sedimentación realizadas con soluciones de ADN sonicado y las condiciones experimentales en las que se desarrollaron. En la última columna se indican los valores obtenidos para el coeficiente de sedimentación S en cada caso. Se observa una dependencia de S con la concentración (comparar experiencias 1 y 2) y un efecto de carga (comparar las experiencias 1 con la 3 y la 2 con la 4) presente en estas muestras. Esta variación de S con la concentración es el producto de las interacciones de las moléculas cargadas de ADN y es un fenómeno ya conocido.

Nº de experiencia	Condiciones Experimentales	Velocidad angular del rotor (rpm)		Tiempo de llegada a velocidad (s)	Tiempo primera foto (s)	Foto siguiente cada (minutos)	S (Svedberg)
1	c _{ADN} =53,5mg/dl en NaCl 1mM, PH 6,5	60.000	70	507	964	16	4,12
2	c _{ADN} =107mg/dl en NaCl 1mM, PH 6,5	60.000	70	520	1103	16	3,6
3	c _{ADN} =70mg/dl en NaCl 0,1 M, PH 6,5	60.000	60	540	956	16	6,18
4	c _{ADN} =96,3mg/dl en NaCl 1mM+MgCl ₂ 1mM	60.000	70	521	944	16	4,72

Tabla 3

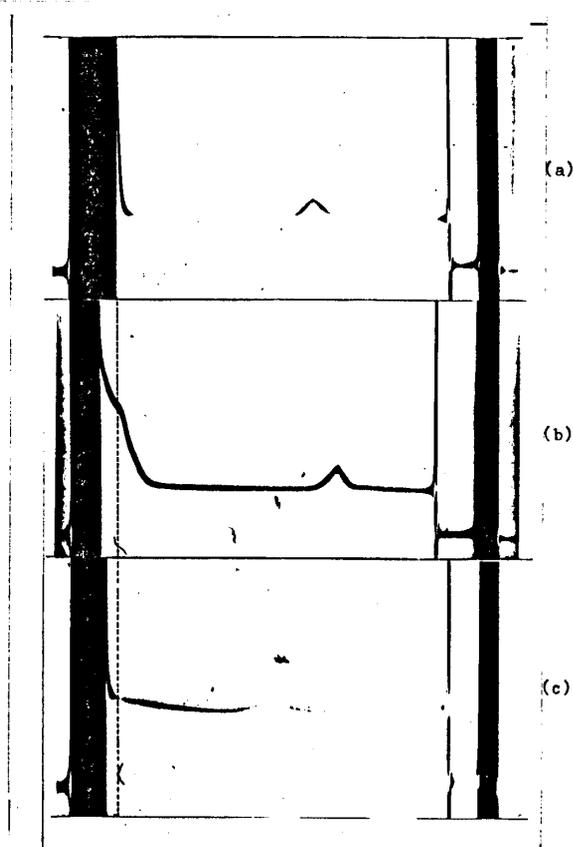


Figura XII.19

Pero estas interacciones se ponen de manifiesto además en la manera que tienen las moléculas de acumularse en el fondo de la celda. En la Fig. XII.19 se muestran los perfiles de sedimentación de las experiencias 2, 3 y 4 después de transcurridos 80 minutos de centrifugación. En dicha figura se observa que el espesor de la capa de moléculas que se acumula en el fondo de la celda disminuye al aumentar la concentración del electrolito adicionado.

La sedimentación completa de la solución indicada en la experiencia N° 1, con una concentración en ADN de 53,5 mg/dl, muestra que el volumen ocupado por todas las moléculas de ADN en el fondo de la celda es la décima parte del volumen total de la solución en la celda. Esto significa que la interacción (repulsión) de las moléculas evitan su acercamiento (volumen excluido) produciendo, en el fondo de la celda de la ultracentrífuga, una solución bastante diluida de 535 mg/dl.

XII.11 Turbiedad de las soluciones de ADN sonicado

Las soluciones concentradas de ADN sonicado con NaCl 1mM presentan una turbiedad apreciable que desaparece con el aumento de la fuerza iónica del medio.

La absorbancia medida con luz de longitud de onda de 550 nm en celdas de 1 cm de espesor es del orden de 0,1 para soluciones de ADN sonicado con una concentración de 100 mg/dl. Esta absorbancia se anula (no es medible con el espectrofotómetro) aumentando la fuerza iónica de las soluciones, por ejemplo, agregando $MgCl_2$, 1mM.