

# ESTUDIO DEL DICROÍSMO LINEAL ELÉCTRICO DEL ADN SONICADO Y FRACCIONADO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN GEL

## STUDY OF ELECTRIC LINEAR DICHROISM OF SONICATED AND FRACTIONED DNA THROUGH GEL CHROMATOGRAPHY

J. A. Bertolotto<sup>a</sup>, K. G. Tomás<sup>a</sup>, M. G. Campo<sup>a</sup>, H. D. Bustos<sup>a</sup>, J. P. Umazano<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Exactas y Naturales–Universidad Nacional de La Pampa

Avda. Uruguay 151 – (6300) Santa Rosa – Argentina  
email: jbertolotto4@gmail.com

Recibido: 16/08/16; aceptado: 27/03/17

En este trabajo se estudia la dependencia del dicroísmo lineal eléctrico reducido (DLER) de muestras de ADN en función del campo eléctrico aplicado. Para esto se somete una solución de ADN a un proceso de sonicación, que da como resultado una muestra con un rango de tamaños de las moléculas de 100 a 1000 pares de base, aproximadamente. A los fines de obtener fracciones más monodispersas se fracciona la muestra mediante el método de cromatografía en gel, obteniéndose varias fracciones de ADN útiles para el estudio mediante técnicas electro-ópticas. Estas fracciones se caracterizan mediante electroforesis en gel para obtener la distribución de longitudes de cadena y los promedios de cada fracción. Los resultados experimentales de DLER se ajustan mediante un modelo teórico de varilla arqueada flexible con polarizabilidad eléctrica que satura con el campo eléctrico aplicado donde, además de la polarizabilidad eléctrica longitudinal, se tiene en cuenta la polarizabilidad eléctrica transversal. Los resultados de este estudio son similares a los obtenidos por otros autores mediante fragmentación de ADN por enzimas de restricción. La ventaja del método de fraccionamiento utilizado radica en que se obtienen muestras de mayor volumen para la aplicación de las técnicas electroópticas.

Palabras clave: ADN, dicroísmo lineal eléctrico

This work studies the dependence of reduced electric linear dichroism (RELD) of DNA samples as a function to the applied electric field. To do so, a DNA solution is subjected to sonication, which results in a sample whose molecular size range varies, approximately, between 100 and 1000 base pairs. In order to obtain more monodisperse fractions, the sample is fractionated using the gel chromatography method, obtaining various DNA fractions which are useful for the analysis by means of electro-optical techniques. These fractions are characterized using gel electrophoresis, so as to obtain the distribution of chain lengths and their average for each fraction. The RELD experimental results are fitted by means of a theoretical model of flexible curved rod with electric polarizability which saturates with the applied electric field, where it is taken into account not only the longitudinal electrical polarizability but also the transversal one. The results of this study are similar to the ones obtained by other authors using DNA fragmentation by restriction enzymes. The advantage of the fractionation technique used resides in the obtention of samples of larger volume to apply electrooptical techniques.

Keywords: DNA, electric linear dichroism

### I. INTRODUCCIÓN

Los efectos electro-ópticos (birrefringencia y dicroísmo eléctricos) se presentan en sistemas que experimentan la acción de un campo eléctrico. La anisotropía en las propiedades ópticas del sistema se debe a que el campo eléctrico orienta preferencialmente a las moléculas cuyas propiedades ópticas son, en general, anisotrópicas. En un experimento electro-óptico se coloca la sustancia entre dos electrodos paralelos a los que se aplica una diferencia de potencial para crear un campo eléctrico,  $E$ ; presentando la muestra dos índices de refracción,  $n_{\parallel}$  cuando la luz plano polarizada incide con su plano de polarización en la dirección del campo y  $n_{\perp}$  cuando el plano es perpendicular al mismo. La birrefringencia se define como la diferencia de índices  $\Delta n = n_{\parallel} - n_{\perp}$ . Si en lugar del índice de refracción  $n$

se emplea la absorbancia  $A$  de la muestra se puede definir el dicroísmo lineal eléctrico como  $\Delta A = A_{\parallel} - A_{\perp}$ , donde en este caso,  $A_{\parallel}$  y  $A_{\perp}$  son las absorbancias de la muestra para luz cuyo plano de polarización es paralelo al campo eléctrico y perpendicular al mismo, respectivamente. Se define como dicroísmo lineal eléctrico reducido (DLER) al cociente  $\Delta A/A$ , donde  $A$  es la absorbancia de la solución en ausencia de campo eléctrico.

Muchos trabajos aplican las técnicas de la birrefringencia eléctrica (EB) y el dicroísmo lineal eléctrico reducido (DLER) para estudiar las propiedades físico-químicas de los fragmentos de ADN.

Los trabajos experimentales que emplearon las técnicas de birrefringencia eléctrica y dicroísmo lineal eléctrico

comenzaron con soluciones de ADN nativo [1]. Luego se emplearon soluciones de ADN sometidos a la acción del ultrasonido para obtener fragmentos de menor longitud de cadena, si bien con una polidispersión importante [2]. Posteriormente se fraccionaron las muestra de ADN sonicado mediante el método de precipitaciones sucesivas en acetona [3]. Con estas muestras se realizaron estudios electro-ópticos a través de medidas de dicroísmo lineal eléctrico [4] y de birrefringencia eléctrica [5]. Finalmente, la técnica que emplea enzimas de restricción para cortar las cadenas del ADN en sitios específicos permitió obtener muestra monodispersas. Con ellas se realizaron mediciones de birrefringencia eléctrica y se determinaron parámetros electro-ópticos de fragmentos de ADN de varias longitudes de cadena. En particular, Elias et al. [6] y Stellwagen [7] estudiaron la polarizabilidad eléctrica del ADN. Diekmann et al. [8, 9] realizaron mediciones de dicroísmo lineal eléctrico de fragmentos de ADN obtenidos mediante encimas de restricción y estudiaron los mecanismo de orientación de las moléculas con el campo eléctrico.

En un principio se desarrollaron teorías de la birrefringencia y dicroísmo electricos de moléculas de forma elipsoida o varillas cilíndricas rígidas en solución. Las interacciones entre las moléculas y el campo eléctrico se producian a través de momentos dipolares inducidos y/o permanentes. Los momentos dipolares inducidos se consideraban crecientes linealmente con el campo eléctrico para cualquier intensidad [10, 11]. Posteriormente se introdujeron procesos de orientación en los que intervenian momentos dipolares inducidos que saturaban cuando el campo eléctrico sobrepasa un determinado valor crítico. Sin embargo, las moléculas se seguian considerando rígidas [12, 13, 14]. Diekmann et al. [8, 9] interpretaron las medidas de RELD de fragmentos de restricción de ADN basandose en moléculas rígidas tipo varilla con momento dipolar inducido saturante. Porschke [15] introdujo en la teoría del DLER la flexibilidad de las moleculas de ADN. Este autor considera un cilindro flexible originalmente recto que se puede doblar en forma de un arco circular. Las propiedades ópticas de las moléculas son descriptas por Porschke [15] considerando grupos cromóforos fijos a lo largo del arco, mientras que las propiedades eléctricas son descritas con un modelo de dipolo inducido y otro modelo de dipolo inducido saturable, ambos originados por la acumulación de cargas eléctricas en los extremos del arco. Por lo tanto, el trabajo citado no tiene en cuenta la polarización en la dirección transversal al eje del macroion. Las propiedades eléctricas se consideran con simetría cilíndrica e independiente de la flexión del ADN. Bertolotto y otro [16] desarrollan la teoría del DLER con un modelo de varilla arqueada flexible con un dipolo inducido saturante. Las innovaciones respecto del trabajo de Porschke [15] son la inclusión de la polarizabilidad eléctrica transversal saturable con el campo eléctrico, la descripción de las propiedades eléctricas con un tensor de polarizabilidad eléctrica dependiente del ángulo de flexión y el uso de un modelo de arco originalmente arqueado. En este trabajo estudiamos la dependencia del dicroísmo lineal

eléctrico reducido (DLER) de muestras de ADN en función del campo eléctrico aplicado. Para esto se emplean muestras de ADN sonicado fraccionado mediante cromatografía en gel, obteniéndose varias fracciones de ADN útiles para el estudio mediante técnicas de electro-ópticas. Se caracterizan estas fracciones mediante electroforesis en gel, para obtener la distribución de longitudes de cadena. Los resultados experimentales de DLER se ajustan mediante la teoría desarrollada en la referencia [16].

## II. MÉTODOS

### Sonicación del ADN

Se sonica una solución acuosa de ADN de timo de ternera, (Sigma Aldrich D1501, Tipo 1) en 1 mM de NaCl con un generador ultrasónico, Kontes de 50 W y 20 kHz con sonda de titanio de 6 mm de diámetro. Se sonica un volumen de 12 ml de solución de ADN con una concentración de 126 mg/dl en NaCl 1 mM. Se refrigera con hielo. Se realizan 30 ciclos de 60 segundos de sonicado más 30 segundos de descanso, cumpliendo un tiempo neto de sonicado de 30 minutos.

### Cromatografía en gel

La solución de ADN sonicado se fracciona mediante el filtrado a través del gel Sepharose 4B, empleando como solvente NaCl 1 mM. El gel está contenido en una columna construida con un tubo de Acrílico de 0,9 m de largo y 2,6 cm de diámetro interno. El tubo posee en sus extremos tapas roscadas donde se conectan catéteres para el ingreso y el egreso de sustancias. Estas tapas tienen cribas de acrílico que soportan filtros para contener al gel dentro de la columna. El sistema recolector de fracciones consiste en un carrusel portador de cuarenta tubos de ensayo, que dispone de un sensor luminoso que detecta cuando un tubo se llena hasta determinada altura para girar y pasar al siguiente tubo. El sistema completo compuesto de un recipiente con solvente, la columna de cromatografía y el equipo recolector de fracciones se coloca dentro de una heladera exhibidora a una temperatura de 5° C. Se siembran 7 ml de ADN sonicado sobre el gel en el extremo superior de la columna. El tiempo de recolección en un tubo de ensayo de una fracción de 10 ml es de aproximadamente 20 minutos. El tiempo total del proceso de filtrado es de aproximadamente 12 horas.

La concentración de la muestra de ADN sonicado y de las diferentes fracciones se obtuvieron midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro UV-Visible, empleando una longitud de onda de 260 nm, y utilizando la ley de Beer-Lambert con un coeficiente de extinción de 200 cm<sup>2</sup>/g.

### Electroforesis en gel

Para determinar la longitud de cadena de las moléculas de cada fracción se realizaron experiencias de electroforesis en gel de agarosa. El equipo para realizar electroforesis en gel se compone de: una cuba de electroforesis horizontal,

Enduro 7.10; fuente de alimentación, Enduro 300 V, transiluminador UV, Enduro 302 nm/365 nm. Para realizar la electroforesis se emplea el tampón TBE que es una solución acuosa de Tris, ácido bórico y EDTA. Se prepara una solución stock TBE10x de PH 8,3 (en un litro de agua destilada 54,0 gr de Tris[hidroximetil] aminometano, 27,5 gr de ácido bórico, y 7,44 gr de Na<sub>2</sub>EDTA). El tampón de TBE1x es utilizado para preparar el gel, y luego para llenar la cubeta donde se llevará a cabo la electroforesis. Los geles de agarosa se obtienen por suspensión de agarosa seca en polvo, Sigma Aldrich en tampón TBE1x, mezcla que luego se lleva a 85 °C, temperatura a la cual la agarosa se funde y se convierte en una solución transparente. A continuación, se vierte esta solución en un molde para gel con un peine adecuado para formar los pocillos donde se siembra las muestras dentro del gel y se deja enfriar a temperatura ambiente hasta que se forma el gel. Por otro lado, el ADN se localiza en el gel tiñéndolo con una concentración de 10 mg/ml de bromuro de etidio, Sigma Aldrich 95 % HPLC, que es un agente intercalante fluorescente que se utiliza como colorante. Para el rango de tamaños del ADN sonificado (100 pb – 1000 pb) se utiliza una concentración de agarosa de un 1 %.

Antes de sembrar las fracciones de ADN se mezclan con un tampón de carga, ThermoScientific, que contiene colorantes para visualizar el avance de las bandas de ADN durante la electroforesis y para aumentar la densidad de las muestras para que las gotas de ADN se depositen en el fondo del pocillo simplificando el proceso de carga. Para las corridas de electroforesis cada fracción de ADN obtenida por cromatografía se lleva a una concentración de 5 mg/dl. Para el sembrado se coloca en cada orificio del gel 10 µl de la muestra de ADN, junto con 1,7 µl de Tampón de Carga.

Como referencia para determinar la longitud de cadena de las fracciones obtenidas por cromatografía se emplea un ADN patrón, denominado Ladder, que contiene un número determinado de segmentos de ADN de longitudes de cadena conocidas. Se sitúan en las ranuras primera y última del gel. En nuestras experiencias empleamos un Ladder 100 pb, GenbioTech que posee fragmentos de 100 pb, 200 pb, ..., 900 pb, 1000 pb, 1200 pb, 1500 pb, 2000 pb, 2500 pb y 3000 pb.

### Mediciones de dicroísmo lineal eléctrico

El dicroísmo lineal eléctrico se midió empleando el equipo descrito por Bertolotto et al. [17] al que posteriormente se le realizaron algunas mejoras. El equipo consta de una fuente de luz monocromática, polarizador de Glan-Taylor, Oriel, celda de Kerr con placas paralelas de platino a 0,15 cm de distancia y un camino óptico de 1 cm. Se dispone de un generador de pulsos Velonex modelo 360, con el cual se aplican pulsos de potencial rectangular de hasta 3000 V con corrientes de hasta 10 A, lo que produce campos eléctricos en la celda de Kerr de hasta 20 kV/cm con duración ajustable entre 1 µs-10 ms. El sistema se

completa con un fotomultiplicador y un osciloscopio con interfaz para registrar los campos eléctricos aplicados a la muestra y las señales de fotocorriente producidas. Estas se registran y analizan mediante una computadora con el software adecuado. Para realizar medidas de dicroísmo eléctrico se coloca el polarizador de manera que la orientación del plano de polarización coincida con la dirección del campo eléctrico en la celda de Kerr. Se aplica un campo eléctrico a la solución y se mide el cambio de intensidad luminosa ( $\Delta I$ ) en el osciloscopio. El dicroísmo lineal eléctrico reducido se calcula mediante la relación

$$\Delta A/A = (-1.5/A) \times \log [1 + (\Delta I/I)]$$

donde  $A$  e  $I$  son la absorbancia y la intensidad de luz transmitida por la solución respectivamente, ambas en ausencia de campo eléctrico aplicado.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la cromatografía en gel se obtienen las fracciones numeradas de 12 a 35, cuyas concentraciones de ADN se muestran en la Figura 1.

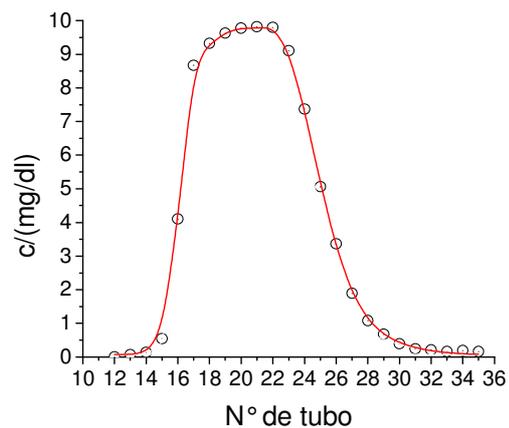


Figura 1: Concentración de la solución de ADN versus el número de tubo (fracción).

Se toman las 9 fracciones con concentraciones  $c \geq 5$  mg/dl y se llevan a 5 mg/dl. Se caracterizan estas fracciones mediante electroforesis en gel. En la Figura 2 se observa la imagen del gel después de haber realizado una de las electroforesis. Ésta muestra las corridas del ladder en las dos filas extremas y las corridas de algunas de las distintas fracciones en las filas intermedias. Con las fotos del gel obtenidas se realiza, mediante el software ImageJ, densitometrías del ADN patrón (Ladder) y de cada una de las fracciones obtenidas por cromatografía. Se identifican en las gráficas de la densitometría los picos correspondientes a las longitudes de cadena contenidas en el ADN patrón. Estos picos fueron ajustados con gaussianas.

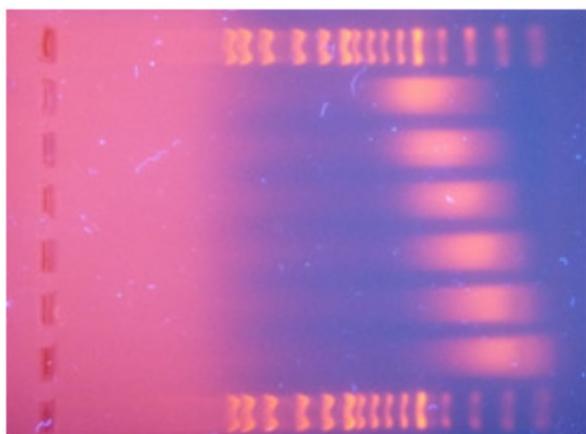


Figura 2: Imagen del gel después de realizada la electroforesis de las fracciones 17 a 22.

Los máximos de las gaussianas determinan las posiciones  $X$  de cada componente del Ladder. El logaritmo decimal de los pesos moleculares (o longitudes de cadena  $S$ ) es una función lineal decreciente de la distancia recorrida  $X$  [18].

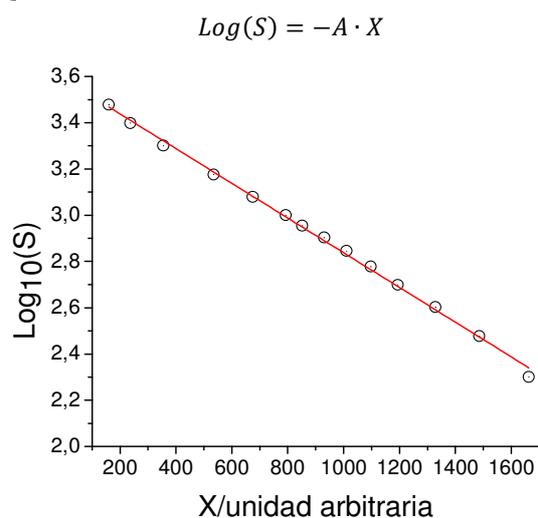


Figura 3: Logaritmo decimal de  $S$  versus la posición  $X$  para el ladder.

La electroforesis del ADN patrón permite obtener la constante  $A$ , determinando las posiciones  $X$  de longitudes de cadenas  $S$  conocidas. En la Figura 3 se observa la relación lineal experimental de  $\text{Log}(S)$  versus  $X$ . De la densitometría para cada fracción se obtuvieron, mediante el mismo método de ajuste con gaussianas, las correspondientes posiciones en el eje  $X$  de dichas fracciones.

En la Tabla 1 se muestran las longitudes de cadena correspondientes al máximo de la distribución de tamaños para cada fracción y los correspondientes anchos a media altura,  $\Delta$ .

TABLA 1: LONGITUD  $S$  Y DISPERSIÓN  $\Delta$

Fracción	$S$ / pb	$\Delta$ /pb
17	455	339
18	377	295
19	325	255
20	259.4	211
21	226	174
22	203	155
23	181.4	108
24	171	111
25	155	108

Se midió el microísmo lineal de las fracciones F18, F22, F23, F24 y F25 en una longitud de onda de 260 nm. En la Figura 4 muestra la gráfica del DLER versus  $E$  de esas fracciones.

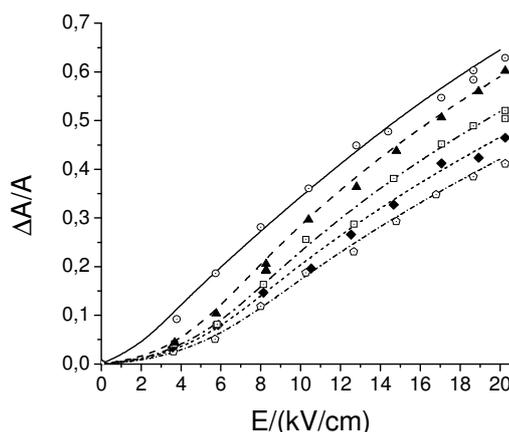


Figura 4: DLER versus  $E$ , donde los puntos experimentales de las distintas fracciones se indican con círculo (F18), triángulo (F22), cuadrado (F23), rombo (F24), pentágono (F25); éstos se corresponden con las curvas teóricas de líneas continua, guión, guión-punto, guión corto, guión corto-punto, respectivamente. Los parámetros de las moléculas figuran en el texto y la Tabla 2

Con el fin de obtener los parámetros electro-ópticos de estas muestras se ajustan las curvas experimentales de DLER de las distintas fracciones versus el campo eléctrico con las curvas teóricas obtenidas mediante el modelo molecular y teoría desarrollados por Bertolotto et al. [16]. En ese trabajo se realiza un estudio teórico del estado estacionario del microísmo lineal eléctrico de fragmentos de ADN en solución acuosa. Se considera un modelo de macroion tipo varilla arqueada flexible (MVAF) de longitud  $S$ , ángulo de flexión  $\beta$  y un momento dipolar eléctrico inducido que satura. El tensor polarizabilidad eléctrica se describe con un modelo fenomenológico que verifica la dependencia cuadrática de la polarizabilidad con la longitud

de cadena para fragmentos de ADN cortos. El modelo tiene en cuenta la polarizabilidad eléctrica longitudinal y transversal al macroion. Se introduce un parámetro  $K_e$ , denominado constante de polarizabilidad eléctrica y una distancia  $2r$ , en la que pueden moverse transversalmente los contraiones. Se considera la saturación del momento dipolar eléctrico inducido en el (MVAF) generalizando el modelo de Yoshioka [12] válido para moléculas tipo varilla recta. Ese autor supone que el momento inducido varía linealmente con el campo eléctrico hasta alcanzar el valor crítico  $E_0$ . Para campos eléctricos mayores a  $E_0$  el momento dipolar inducido permanece constante en su valor de saturación. En la referencia [16] en lugar de emplear el campo de saturación  $E_0$ , se introduce la carga de saturación  $q_0$ . Se supone que la polarización longitudinal, esto es, la producida por movimientos de contraiones paralelos al eje del MVAF, produce un movimiento de las cargas eléctricas que se acumulan en los extremos. Cuando el campo eléctrico toma el valor de saturación,  $E_0$ , la carga en los extremos toman los valores de saturación  $+q_0$  y  $-q_0$ . Además, se analiza la polarizabilidad eléctrica debida al movimiento de contraiones transversal al eje del MVAF. Con este fin se definen líneas de carga con densidades lineales de carga,  $+\lambda_0$  y  $-\lambda_0$ , con forma de arco, paralelas al eje molecular del MVAF y a una distancia  $r$  del mismo. Estas líneas son inducidas por la componente del campo eléctrico perpendicular al plano del MVAF. De la misma manera las componentes del campo en el plano del MVAF inducen dos líneas arqueadas con densidades lineales de carga,  $+\lambda_0$  y  $-\lambda_0$ . La flexibilidad molecular se describe usando un potencial elástico. Para una flexión pequeña es válida la expresión para la energía de flexión  $W_E = (\sigma/2S)(\beta - \beta_0)^2$ , donde  $\sigma$  es la constante de rigidez,  $\beta$  y  $\beta_0$  son los ángulos de flexión y de mínima energía de configuración del MVAF, respectivamente. Si  $\beta_0 \neq 0$  significa que los fragmentos de ADN están originalmente arqueados con fluctuaciones de flexión en torno a un ángulo de flexión media. Para calcular el dichroísmo lineal eléctrico reducido determinamos un factor óptico teniendo en cuenta que las bases del ADN arqueado son perpendiculares al eje molecular. La función de distribución de orientación de moléculas tiene en cuenta las propiedades eléctricas anisótropas y la flexibilidad molecular.

Determinemos ahora los valores de los parámetros que figuran en el cálculo del DLER del ADN. A cada fracción le asignamos la longitud de cadena  $S$  determinada mediante electroforesis (ver Tabla 1). La constante de rigidez  $\sigma$  puede estimarse en base a la relación  $\sigma = kTP$  donde  $P$  es la longitud de persistencia del ADN [19], que toma un valor de  $824 \text{ \AA}$  para la fuerza iónica 1 mM de las soluciones en estudio [20]. El valor de la constante de rigidez resulta  $\sigma = 3,33 \times 10^{-19} \text{ erg/cm}$ . La constante de polarizabilidad eléctrica se emplea como parámetro de ajuste entre las curvas experimentales de DLER versus  $E$  con las curvas teóricas. El valor de  $K_e$  determina los valores del DLER para campos eléctricos pequeños. El mejor ajuste dió un valor de  $K_e = 0,39 \times 10^{-5} \text{ cm}$ . La distancia transversal  $2r$

se toma del orden de la distancia de Debye para la fuerza iónica de las soluciones en estudio, esto es,  $100 \text{ \AA}$ .

En general, en el ADN hay determinadas secuencias de nucleótidos que pueden dar lugar a interacciones de bases apiladas de un lado que, en promedio, son más intensas que en el otro. Estas interacciones asimétricas y las fluctuaciones térmicas originan que la doble hélice se doble localmente [21]. La cadena de ADN resulta en una distribución de regiones arqueadas localmente. El modelo MVAF describe la curvatura de un fragmento de ADN suponiendo una flexión uniforme de la cadena. Esta suposición se traduce en un ángulo de flexión único con un ángulo de energía configuracional mínima. Nos resulta imposible conocer la secuencia de bases de los fragmentos de ADN sonificado y fraccionado y calcular un ángulo de flexión. Por ese motivo realizamos la elección  $\beta_0 = 0$ . Esto significa que las moléculas se arquean con diferentes ángulos de flexión, pero con un valor medio  $\langle \beta \rangle = 0$ . Esto es, un ADN esencialmente recto con fluctuaciones de flexión que forma arcos hacia un lado u otro lado de la conformación recta.

Los parámetros  $q_0$  y  $\lambda_0$  también se determinan mediante el ajuste de las curvas teórica y experimental. Estas magnitudes controlan los valores del DLER para campos eléctricos grandes. La Tabla 2 muestra valores de  $q_0$  y  $\lambda_0$  obtenidos mediante el ajuste. Los valores de  $q_0$  y  $\lambda_0$  son casi constantes para las longitudes de cadena entre 155 pb y 203 pb, esto es menores que la longitud de persistencia  $P$ . Sin embargo, para  $S = 377 \text{ pb}$ , esto es, para  $S > P$  se hace imposible ajustar la curva experimental con la calculada teóricamente considerando  $\beta_0 = 0^\circ$  y dejando constantes los valores de  $q_0$  y  $\lambda_0$ . El ajuste se logra para  $\beta_0 = 150^\circ$ . Otra manera de ajustar los datos experimentales para  $S = 377 \text{ pb}$  es dejar  $\beta_0 = 0^\circ$  pero bajar el valor de  $q_0$  y  $\lambda_0$ . Pensamos que este inconveniente surge para longitudes de cadena mayores que la longitud de persistencia porque no se cumple la condición de flexión pequeña de la teoría desarrollada en la referencia [16]. De todas maneras incluimos en la Figura 4 el ajuste de la curva experimental para  $S = 377 \text{ pb}$  con los datos consignados en la Tabla 2. Todo ocurre como si para  $S > P$  las moléculas de ADN tuvieran una forma originalmente más cerrada.

TABLA 2: VALORES DE  $q_0$ ,  $\lambda_0$  Y  $\beta_0$

$S/\text{pb}$ y $(S/\text{\AA})$	$\frac{q_0 \times 10^9}{\text{estatC}}$	$\frac{\lambda_0 \times 10^5}{\text{estatC/cm}}$	$\frac{\beta_0}{\text{grados}}$
155 (527)	0,47	8,92	0
171 (581,4)	0,47	8,08	0
181.4 (616,8)	0,50	8,11	0
203 (690,2)	0,50	7,00	0
377 (1281,8)	0,486	8,00	150

El método de fraccionamiento del ADN mediante enzimas de restricción es por lejos el mejor debido a la monodispersión de las muestras obtenidas. Lamentablemente se hace muy laborioso y costoso obtener la cantidad de muestra necesaria para hacer estudios electro-ópticos. Las celdas de Kerr suelen tener una distancia entre electrodos del orden del milímetro y el volumen de las muestras es del orden del mililitro. Los métodos de sonicación y fraccionamiento por precipitación con acetona o cromatografía en gel suministran mayor cantidad de muestra si bien más polidispersa. Fukudome et al. [3] determinan mediante electroforesis en gel la distribución de peso molecular de las cuatro fracciones obtenidas aplicando el método de sonicado (con una potencia de 105 W) y precipitaciones sucesivas con acetona. Los valores máximos de las distribuciones corresponden a longitudes de cadena 291 pb, 354 pb, 400 pb y 452 pb con ancho a media altura de 155 pb, 238 pb, 265 pb y 470 pb, respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo con el método de sonicado y cromatografía en gel. Sin embargo, el método de cromatografía en gel resulta más sencillo de realizar y se puede obtener un mayor número de fracciones.

Los resultados del DLER de este trabajo son comparables con aquellos que emplean como muestra fragmentos de restricción [8]. Para longitudes de cadena,  $S$ , menores que la longitud de persistencia,  $P$ , las curvas de DLER versus el campo eléctrico crecen al aumentar  $S$ . Esto es, si  $S$  aumenta también lo hace el DLER para cualquier campo eléctrico. Sin embargo hay un cambio de comportamiento cuando  $S > P$ . Las curvas de DLER versus  $E$  disminuyen con el aumento de  $S$ .

Concluimos que los métodos de sonicación y fraccionamiento mediante cromatografía en gel permiten obtener, a partir del ADN nativo, muestras de fragmentos de ADN cuyo estudio se puede abordar mediante técnicas electro-ópticas. A tal efecto, es conveniente utilizar las fracciones de menor longitud de cadena ( $S < 203$  pb), cuyo comportamiento electro-óptico se describe adecuadamente con la teoría del DLER presentada por Bertolotto et al. [16]. Para longitudes de cadena menores a la longitud de persistencia, el ajuste de las curvas experimentales de RELD versus el campo eléctrico lleva a valores casi constantes de los parámetros físicos del modelo.

Conviene destacar que los métodos de sonicación y fraccionamiento con cromatografía en gel resultan relativamente simples y de bajo costo en relación a otros, como por ejemplo la precipitación con acetona o el uso de enzimas de restricción.

Los métodos de preparación de las muestras usados en este trabajo junto con la teoría del DLER [16] permiten el estudio teórico - experimental de los cambios conformacionales del ADN producidos por agentes externos. Dichos cambios, por ejemplo aquellos debidos a la interacción droga-ADN, podrían estudiarse a través del análisis de los cambios en los parámetros electro-ópticos.

#### IV. REFERENCIAS

- [1] Fredericq, E. Houssier, C., Electric dichroism and electric birefringence, Clarendon Press, London. (1973).
- [2] Colson, P. Claude, H., Fredericq, E., Biochimica et Biophysica Acta, **340**, 244-261(1974).
- [3] Fukudome, K., Yamaoka, K., Nishikori, K., Tatehata, H., Yamamoto, O. Polymer J. **18**, 81-88 (1986).
- [4] Yamaoka, K., Fukudome, K. J. Phys. Chem. **94**, 6896-6903 (1990).
- [5] Yamaoka, K., Fukudome, K., J. Phys. Chem. **92**, 4994-5001.(1988).
- [6] Stellwagen, N. C., Biopolymers, **20**, 399-434 (1981).
- [7] Elias, J. G., Eden, D., Macromolecules, **14**, 410-419 (1981).
- [8] Diekmann, S., Hillen, W., Jung, M., Wells, R., Pörschke, D., Biophys. Chem., **15**, 157-167 (1982).
- [9] Diekmann, S., Jung, M., Teubner, M., J. Chem. Phys. **80**, 1259-1262 (1984).
- [10] O'Konski, Ch. T., Yoshioka, K., Orttung, W. H., J. Phys. Chem. **63**, 1558-1565 (1959).
- [11] Yoshioka, K., Watanabe, H in "Physical principles and techniques of protein chemistry", Leach, S. Ed., 335-367, Academic Press, New York (1969).
- [12] Yoshioka, K., J. Chem. Phys. **79**, 3482-3486 (1983).
- [13] Yamaoka, K., Fukudome, K. J. Phys. Chem. **94**, 6896-6903 (1990).
- [14] Yamaoka, K.; Fukudome, K. J. Phys. Chem. **92**, 4994-5001(1988).
- [15] Porschke, D., Biopolymers, **28**, 1383-1396 (1989).
- [16] Bertolotto, J.A., Umazano, J. P., AIP Advances **6**, 065127 (2016).
- [17] Bertolotto, J. A., Willging, P. A., Pungaloni, L. A., Bustos, H. D., Anales AFA **5**,486-488 (1993).
- [18] Zimm, B. H., Levene, S. D. , Quarterly Reviews of Biophysics **25**, 171-204 (1992).
- [19] Bertolotto, J. A., Campo, M .G.,Roston, G. B., Ascheri, M.E.,J. Colloids Surf. A, **203**, 167-183 (2002).
- [20] Baumann,Ch. G., Smith,S. B.,Bloomfield, V. A., Bustamante,C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94**, 6185-6190 (1997).
- [21] Munteanu, M. G., Vlahovicek, K., Parthasarathy, S., Simon, I., Pongor, S., Trends Biochem. Sci., **23**, 341-347 (1998).