
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARIO AGENO, ELISABETTA DORE, CLARA FRONTALI

Sul processo di rinaturazione termica dell'acido desossiribonucleico

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 41 (1966), n.5, p. 234–240.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_41_5_234_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)*

SIMAI & UMI

<http://www.bdim.eu/>

Biofisica. — *Sul processo di rinaturazione termica dell'acido desossiribonucleico* (*). Nota di MARIO AGENO, ELISABETTA DORE e CLARA FRONTALI (**), presentata (***) dal Corrisp. M. AGENO.

SUMMARY. — In the existing works on the kinetics of renaturation of DNA, this process is always followed, in the course of time, by measuring the drop in U.V. absorbancy at 260 $m\mu$. This kind of measurement does not allow a separation of the contributions due to molecules in different stages of renaturation. In the present work on the contrary, the renaturation has been studied by means of the density spectra of the DNA solutions under examination, as obtained with the analytical ultracentrifuge in CsCl density gradient. It was thus possible to demonstrate that the first stage of the renaturation process (that in which two complementary strands come in contact) follows second order kinetics. Conditions necessary for obtaining reliable measurements of the activation energy for the renaturation process and for studying the kinetics of the second stage of the process (that in which the bonds between complementary base pairs are ordinarily re-established along the two strands already in contact) are discussed and clarified.

Lo studio del processo di denaturazione alcalina del DNA *in vitro*, sui risultati del quale abbiamo riferito in alcune note precedenti [1-5], ci ha più volte indotti a considerare il problema di eventuali correzioni da apportare ai risultati, per tener conto della spontanea riassociazione nel corso dell'esperimento delle due eliche di cui è costituita la molecola (rinaturazione). D'altra parte, lo studio accurato e quantitativo del processo di rinaturazione non è certo meno importante, ai fini della comprensione delle modificazioni strutturali che il DNA subisce e della natura delle forze in gioco, di quello della denaturazione alcalina.

Le ricerche fino ad oggi pubblicate sull'argomento [6-11] hanno quasi sempre impiegato, per seguire nel tempo il processo di rinaturazione, la tecnica spettrofotometrica, cioè la misura dell'assorbimento della soluzione a 260 $m\mu$. L'inconveniente che questa tecnica presenta è quello di non permettere di analizzare il processo nelle due fasi successive ben distinte di cui esso certamente risulta: l'incontro e il congiungimento di una coppia di eliche complementari da un lato, il progressivo ricostituirsi dei legami ordinati tra le coppie di eliche complementari ormai collegate, dall'altro. La cinetica delle due fasi è certamente molto diversa e questa è la ragione per cui gli studi fino ad oggi condotti hanno dato spesso risultati contrastanti e comunque non molto chiari, essendo in discussione perfino il carattere mono- o bi-molecolare del processo.

Scopo di questo lavoro è di rendere conto brevemente dei primi risultati da noi ottenuti nello studio della prima fase della rinaturazione: quella del-

(*) Lavoro eseguito nel quadro delle ricerche in corso presso i Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità, con l'apporto finanziario del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

(**) Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma.

(***) Nella seduta del 12 novembre 1966.

l'incontro e del congiungimento di una coppia di eliche complementari. Il materiale usato è il DNA del fago T 2 (peso molecolare 120 milioni) denaturato per via alcalina, tenendolo per 2^m a pH 12,5. La concentrazione finale della soluzione era di 20 γ /ml in NaCl 0,1 M. Per tutto il tempo intercorrente tra la fine della preparazione e la sua utilizzazione nelle varie esperienze di rinaturazione, la soluzione veniva tenuta a 0°C, essendosi riscontrato che anche a temperatura ambiente la rinaturazione procede sia pur lentamente, mentre a 0°C non vi è accenno a rinaturazione anche su lunghi periodi.

La rinaturazione veniva prodotta mantenendo la soluzione di DNA in termostato a temperatura prefissata, per un determinato intervallo di tempo.

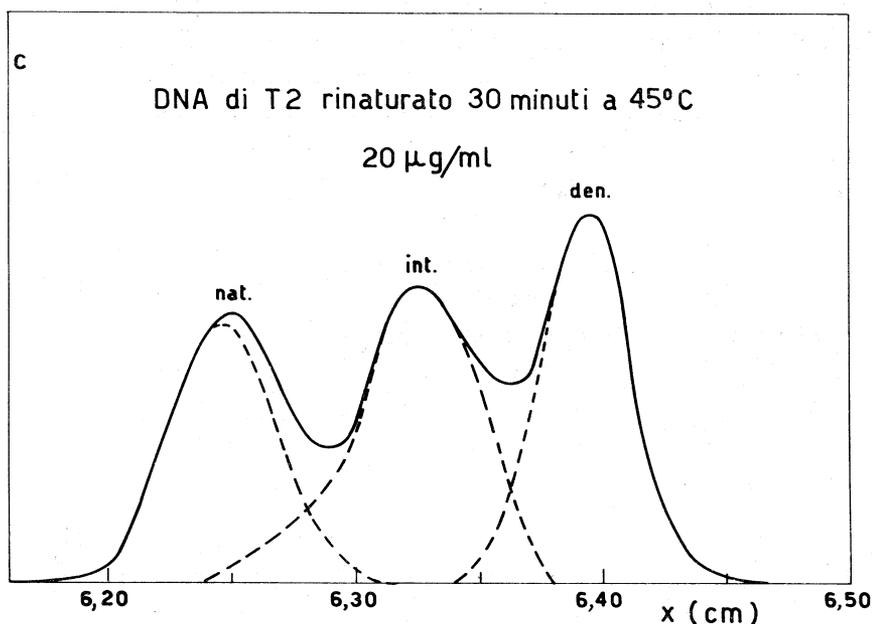


Fig. 1.

Veniva quindi fatto lo spettro di densità della soluzione esaminando questa in ultracentrifuga analitica, in gradiente di densità di cloruro di cesio. Tale metodo ha il vantaggio di permettere di distinguere direttamente la frazione di DNA completamente rinaturata, da quella denaturata residua e dal materiale di densità intermedia, costituito da molecole nelle quali la riassociazione delle due eliche complementari è solo parziale. Di ciascuno spettro di densità veniva eseguita una densitometria, col densitometro Joyce-Loebl e il grafico così ottenuto veniva quindi decomposto, facendo uso del calcolatore elettronico IBM 7040 dei nostri laboratori e del programma Orango Strip [12], in due bande di forma gaussiana alla densità del nativo e del denaturato rispettivamente e in una terza banda, di forma generalmente irregolare, comprendente il materiale di densità intermedia. La fig. 1 mostra, a titolo di esempio, uno degli spettri di densità ottenuti, con la relativa decomposizione in tre bande.

Mantenendo sempre fissa la concentrazione iniziale della soluzione (20 γ /ml), abbiamo prima di tutto determinato l'andamento della rinaturazione in funzione del tempo, a varie temperature. Volendo studiare la cinetica della prima fase del processo, abbiamo considerato «rinaturato» tutto il materiale compreso sia nella banda del nativo sia nella banda intermedia. Il grafico della figura 2 porta infatti in ordinate la quantità:

$$(1) \quad \frac{C(0) - C(t)}{C(t)}$$

essendo $C(t)$ la concentrazione del solo denaturato al tempo t , in funzione del tempo t posto in ascisse. Tutte le concentrazioni sono state ricavate dalle aree delle varie bande, nella densitometria dello spettro di densità, tenendo conto del fatto che la fotografia è presa in U.V. e che il nativo e il denaturato assorbono diversamente in questa zona spettrale. In una reazione bimolecolare l'andamento del rapporto (1) in funzione del tempo è rettilineo. La fig. 2 mostra

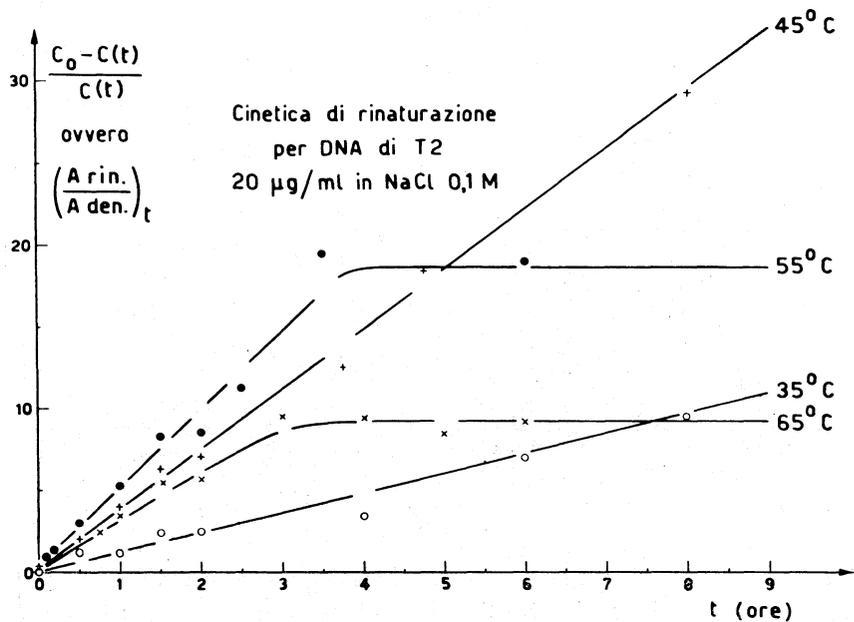


Fig. 2.

delle marcate deviazioni da tale andamento alle più elevate temperature sperimentate: la rinaturazione, che procede linearmente, come previsto, all'inizio del processo, si arresta a un certo punto, a un livello sempre più basso quanto più elevata è la temperatura. Ciò significa che, a questa temperatura, o si raggiunge un equilibrio statistico in cui una determinata frazione dei legami a idrogeno tra le coppie di basi complementari è sempre rotta; oppure vi sono regioni del DNA per le quali il punto di fusione è sensibilmente più basso che per altre. La pendenza iniziale delle curve di rinaturazione va costantemente crescendo dalla temperatura ambiente fino a circa 55°C per poi diminuire

nuovamente a temperature ancora superiori. Ciò si accorda con l'interpretazione statistica del plateau che si osserva a queste ultime temperature.

È da mettere in rilievo che, a parte questo effetto di saturazione alle temperature più elevate, la cinetica di rinaturazione, nella prima fase del processo (incontro delle coppie di eliche e loro associazione), è con ottima approssimazione una cinetica del secondo ordine. È anche da osservare che la rinaturazione procede, sia pure lentamente ma con ritmo non trascurabile, a temperatura ambiente. Ciò spiega come nel DNA denaturato, esaminato in gradiente di densità di cloruro di cesio si trovi sempre di solito una piccola traccia di nativo. Non si tratta, a quanto sembra, di una piccola frazione di DNA resistente alla denaturazione, ma di una piccola frazione di rinaturato che si produce nel periodo di almeno 24^h necessario alla formazione del gradiente di cloruro di cesio.

Nessun tentativo abbiamo fatto finora di dedurre dalle pendenze iniziali delle curve della fig. 2 l'energia di attivazione per la rinaturazione. Ci proponiamo di farlo in base a una nuova serie di misure più completa e più precisa, attualmente in corso.

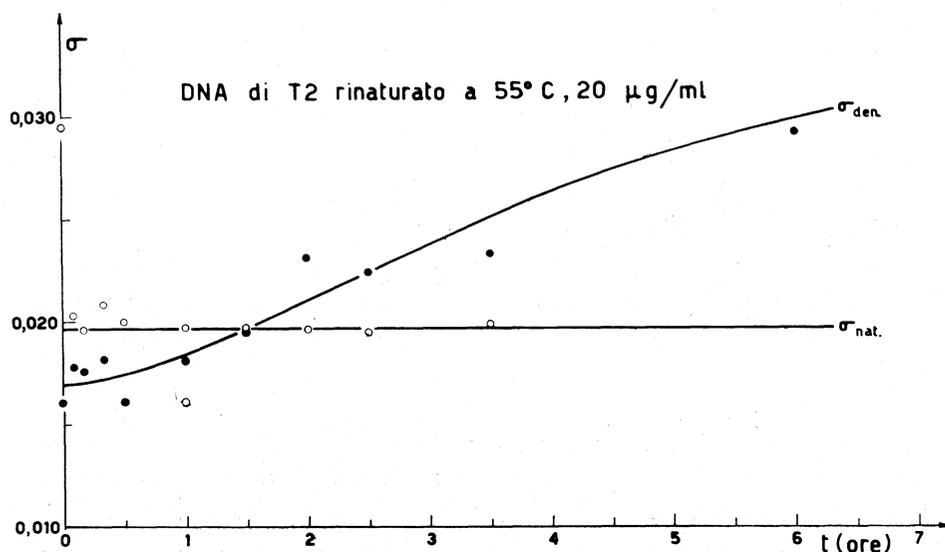


Fig. 3.

È interessante osservare come variano in funzione del tempo la semiampiezza delle due bande gaussiane del DNA denaturato e del DNA rinaturato. Ciò è mostrato nella fig. 3 che presenta, a titolo di esempio, i risultati ottenuti a 55° C. Mentre la semiampiezza della banda del rinaturato si mantiene sempre costante via via che procede nel tempo il processo di rinaturazione, la semiampiezza della banda del denaturato va sensibilmente aumentando col tempo, fino a moltiplicarsi per quasi un fattore due. Ciò sembra indicare che le eliche integre, o quanto meno i frammenti di peso molecolare più elevato, rinaturano assai più rapidamente dei frammenti di peso molecolare più basso. È pertanto

necessario, per ottenere dei dati significativi relativamente alle costanti di rinaturazione alle varie temperature e quindi all'energia di attivazione, partire da DNA il più possibile integro. La costanza in funzione del tempo della semiampiezza della banda del denaturato costituirà a questo proposito un sensibile test della attendibilità dei risultati. Non è tuttavia escluso che alle temperature più elevate l'aumento della semiampiezza della banda del denaturato sia, in parte, da attribuirsi a rotture prodotte dalla permanenza a tali temperature.

È anche interessante osservare come varia in funzione del tempo di rinaturazione la cosiddetta banda intermedia. Uno studio accurato del suo comportamento deve fornire i dati necessari a determinare i caratteri della cinetica

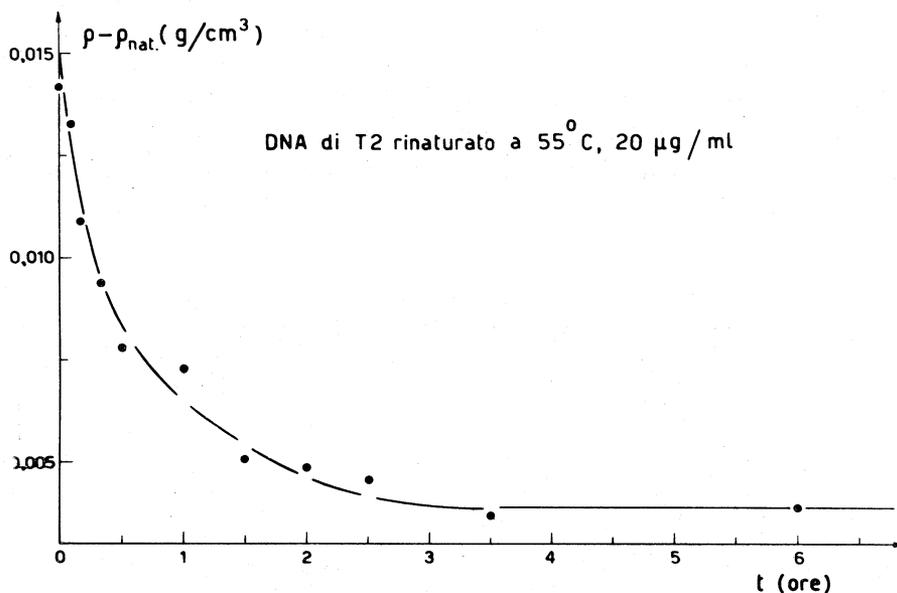


Fig. 4.

della seconda fase del processo di rinaturazione: quella nella quale le due eliche complementari ormai congiunte vanno ricostituendo i legami ordinati tra le coppie di basi corrispondenti. Per il momento, ci limitiamo a mostrare, nella fig. 4, come la densità corrispondente al massimo della banda intermedia si vada col passare del tempo spostando progressivamente dalla densità del denaturato a quella del nativo, e come tale spostamento, assai rapido nelle prime due ore, si trasformi successivamente in un accostamento assintotico, molto lento soprattutto alle temperature più basse.

Nella fig. 5, facciamo infine vedere come variano col tempo di rinaturazione i rapporti tra le tre frazioni, denaturata, intermedia e rinaturata. La prima mostra un residuo di circa il 5-10 % che non dà luogo a rinaturazione: si tratta evidentemente di frammenti a peso molecolare relativamente basso (circa un quarto di quello dell'elica completa, in media), che alla bassa concentrazione residua di denaturato hanno probabilità assai piccola di incontrare il frammento complementare. Le due frazioni intermedia e rinaturata hanno

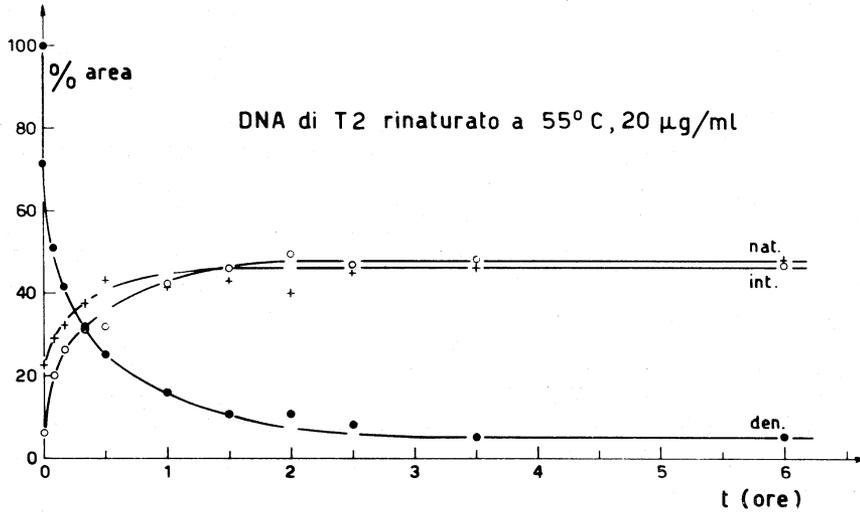


Fig. 5.

un andamento col tempo di rinaturazione assai simile e sono, in genere, di grandezza comparabile. Solo alle temperature più basse la banda intermedia raccoglie da sola quasi il 60 % del materiale. È evidente che per comprendere le relazioni tra le due bande intermedia e rinaturata è indispensabile disporre di DNA denaturato, le cui eliche singole siano per la maggior parte integre.

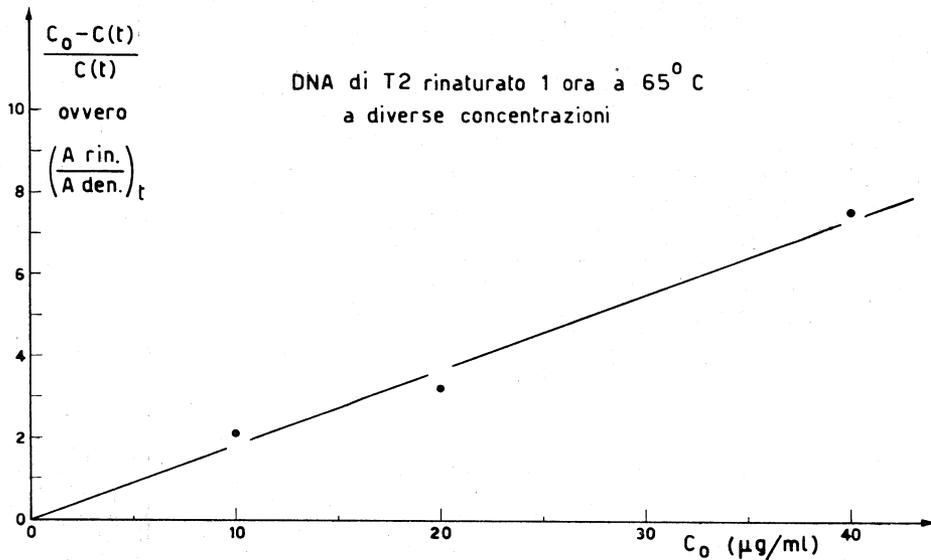


Fig. 6.

Una seconda serie di misure ci ha permesso di confermare il carattere bimolecolare della cinetica di rinaturazione. Si tratta di misure eseguite alla temperatura di 65° C, mantenendo fisso il tempo di incubazione (t^h) e variando invece la concentrazione iniziale della soluzione. Se la reazione è bimolecolare,

il rapporto (1) deve avere, in funzione della concentrazione iniziale C_0 , andamento rettilineo. È ciò che mostra la fig. 6, in cui i rapporti tra le concentrazioni sono stati calcolati nel modo già descritto, sempre intendendo per « rinaturato » tutto il materiale compreso sia nella banda rinaturata, sia nella banda intermedia. Si tratta quindi ancora della sola fase iniziale del processo: la fase d'incontro e di congiungimento delle coppie di eliche complementari.

In conclusione, nonostante il carattere ancora sotto certi aspetti preliminare delle misure presentate, possiamo affermare che questa prima fase del processo di rinaturazione mostra senza alcun dubbio, come era da attendersi, una cinetica del secondo ordine.

È nostro gradito dovere ringraziare vivamente per l'aiuto prestatoci nell'esecuzione delle esperienze descritte i tecnici dei nostri laboratori, signori A. Araco, M. Araco, A. Calicchia, M. Flamini, G. Notargiacomo, C. Ramoni, A. Rosati, P. Savini.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] M. AGENO, E. DORE e C. FRONTALI, « Rend. Accad. Naz. Lincei », 40, 346 (1966).
- [2] M. AGENO, E. DORE e C. FRONTALI, « Rend. Accad. Naz. Lincei », 40, 540 (1966).
- [3] M. AGENO, E. DORE e C. FRONTALI, « Rend. Accad. Naz. Lincei », 40, 740 (1966).
- [4] M. AGENO, E. DORE e C. FRONTALI, 3° *Convegno Nazionale di Biofisica e Biologia Molecolare - Roma, 6-9 luglio 1966*, Riassunti delle Comunicazioni, parte I, pag. 2.
- [5] M. AGENO, E. DORE e C. FRONTALI, « Annali Ist. Super. Sanità » (1966), in corso di stampa.
- [6] J. MARMUR e D. LANE, « Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. », 46, 453 (1960).
- [7] P. DOTY, J. MARMUR, J. EIGNER e C. L. SCHILDKRAUT, « Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. », 46, 461 (1960).
- [8] J. MARMUR, C. L. SCHILDKRAUT e P. DOTY, *The Molecular Basis of Neoplasia*, University of Texas, Austin, Texas 1962, pp. 9-43.
- [9] L. F. CAVALIERI, T. SMALL e N. SASKAR, « Biophys. J. », 2, 339 (1962).
- [10] J. A. SUBIRANA e P. DOTY, « Biopolymers », 41, 171 (1966).
- [11] K. J. THROWER, A. R. PEACOCKE, « Biochim. Biophys. Acta », 119, 652 (1966).
- [12] G. CORTELESSA e G. FARCHI, *Rapporti dei Laboratori di Fisica dell'Ist. Sup. Sanità*, ISS 65/10, Roma, 15 aprile 1965.