
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

MARIO AGENO

**La denaturazione alcalina del DNA come transizione
di fase**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 46 (1969), n.3, p. 261–264.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1969_8_46_3_261_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/>

SEZIONE II

(Fisica, chimica, geologia, paleontologia e mineralogia)

Biofisica. — *La denaturazione alcalina del DNA come transizione di fase*^(*). Nota^(**) del Corrisp. MARIO AGENO^(***).

SUMMARY. — Alkaline Denaturation of DNA as a Phase Transition. As demonstrated in previous papers by Ageno, Dore and Frontali, the process of alkaline denaturation results in a deprotonation of the hydrogen bridges between complementary bases. In this paper the equilibrium of the deprotonation reaction is considered at a pH lower than that of denaturation. A simple formula is derived which gives the denaturation pH as a function of the temperature and ionic strength of the solutions. The width of transition is of the order of $1/N$, N being the total number of deprotonable sites in a DNA molecule.

Le molecole di DNA in soluzione acquosa possono, com'è ben noto, venir denaturate, cioè le due eliche avvolte insieme, che costituiscono ciascuna molecola, possono venir separate, sia elevando convenientemente la temperatura della soluzione, sia alterandone il pH fino a valori sufficientemente lontani dalla neutralità.

Il fenomeno della denaturazione viene di solito assimilato ad una fusione. Presenta infatti almeno alcuni tra i più evidenti caratteri di una transizione di fase: si verifica ad una temperatura, o ad un pH, ben determinati e caratteristici della composizione in basi del DNA che si considera e la larghezza naturale della transizione è così piccola da non essere apprezzabile sperimentalmente. Le larghezze osservate sono sempre attribuibili per intero a disomogeneità del materiale sotto esame [1]. Scopo della presente Nota è il far vedere come sia possibile con un semplice ragionamento statistico render ragione della nettezza della transizione nel caso della denaturazione alcalina, tenendo conto solo del fatto che tale denaturazione comporta, in ogni caso, un numero molto elevato di processi elementari.

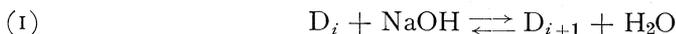
In lavori precedenti [2-5] è stato dimostrato sperimentalmente che la denaturazione alcalina consiste in una deprotonazione dei ponti a idrogeno che congiungono le basi complementari. Consideriamo quindi una soluzione acquosa di DNA, portata ad un certo valore del pH mediante aggiunta di una quantità conveniente di idrato sodico. Supponiamo che il pH non sia tale da provocare la completa separazione delle due eliche di ciascuna molecola di DNA. Si stabilirà tuttavia nella soluzione un equilibrio statistico, in cui

(*) 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.

(**) Presentata nella seduta dell'8 marzo 1969.

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

continuamente dei protoni verranno sottratti ai rispettivi ponti a idrogeno, e dei protoni verranno catturati in posizioni molecolari precedentemente deprotonate. Avverranno cioè in seno alla soluzione continuamente e con eguale velocità nei due sensi reazioni del tipo:



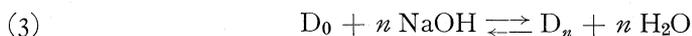
dove con D_i si è indicata una generica molecola di DNA, deprotonata in i posizioni distinte le cui cariche negative residue sono neutralizzate da altrettanti ioni positivi Na^+ situati in prossimità di esse. Adottando questa notazione, consideriamo automaticamente equivalenti tra loro tutti i possibili siti di deprotonazione, a qualunque coppia di basi appartengano e qualunque sia la loro posizione relativa lungo il polimero. Trascuriamo in altre parole tutti quegli effetti cooperativi, indubbiamente esistenti, che molti ritengono giochino un ruolo essenziale nel processo di denaturazione.

L'equilibrio corrispondente alla (1) sarà caratterizzato dall'equazione:

$$(2) \quad \frac{[D_{i+1}] [\text{H}_2\text{O}]}{[D_i] [\text{NaOH}] f} = K_i$$

dove le concentrazioni delle varie sostanze si suppongono misurate in moli l^{-1} e con f si è indicato il coefficiente di attività della soda (i coefficienti di attività delle altre sostanze si assumono uguali ad uno).

La (1) e la (2) valgono per ogni valore di i , che non superi naturalmente il numero N dei siti di possibile deprotonazione delle molecole del DNA che si considera. Immaginiamo di scrivere le (1) per tutti i valori di i , fino ad un certo valore n , dell'ordine di N . Sommandole membro a membro, otteniamo:



Moltiplicando tra loro membro a membro le corrispondenti equazioni dell'equilibrio (2), viene:

$$(4) \quad \frac{[D_n] [\text{H}_2\text{O}]^n}{[D_0] [\text{NaOH}]^n f^n} = K_0 K_1 \cdots K_{n-1}$$

Osserviamo ora che per tutte le concentrazioni di DNA praticamente realizzabili, la concentrazione dell'acqua non viene sensibilmente alterata dalla deprotonazione o riprotonazione delle molecole del polimero. Inoltre, in armonia con la nostra schematizzazione iniziale, secondo cui tutti i possibili siti di deprotonazione sono ai fini dell'equilibrio perfettamente equivalenti e indipendenti gli uni dagli altri, potremo assumere tra loro uguali le varie costanti di equilibrio. Porremo quindi

$$(5) \quad \frac{K_i}{[\text{H}_2\text{O}]} = K \quad \text{per ogni } i$$

con che la (4) diventa:

$$\frac{[D_n]}{[D_0]} = \{K f [\text{NaOH}]\}^n$$

che conviene scrivere nella forma:

$$(6) \quad \frac{[D_n]}{[D_0]} = 10^{nx} \quad , \quad x = \log K + \log f + pH - 14$$

Il numero n , che abbiamo supposto dell'ordine di N , numero dei possibili siti di deprotonazione del DNA, è in ogni caso un numero molto grande. Il DNA del fago T2 di *E. coli*, tanto per fare un esempio, contiene 200.000 coppie di nucleotidi e quindi per esso è $N \sim 5 \cdot 10^5$. Ne segue che se il fattore x che compare all'esponente nel secondo membro della (6) è negativo, anche se molto piccolo in valore assoluto, risulta per ogni $n \sim N$:

$$[D_n] \sim 0$$

e nessuna molecola può in pratica arrivare alla denaturazione. Se, viceversa, x è positivo, anche se molto piccolo in valore assoluto, il secondo membro della (6) assume valori estremamente grandi per $n \sim N$. Poiché, quando una molecola è totalmente deprotonata, le due eliche si separano fisicamente e la reazione non può più regredire, ciò significa che per $x > 0$ la totalità delle molecole passa allo stato denaturato e non si ha più equilibrio. La soglia di denaturazione è dunque caratterizzata dalla condizione:

$$(7) \quad x = 0$$

ossia:

$$(8) \quad pH^* = 14 - \log K - \log f$$

equazione questa che esprime il valore del pH di denaturazione, in funzione della temperatura (che compare implicitamente attraverso la costante di equilibrio K) e della forza ionica (che compare implicitamente attraverso il coefficiente di attività dell'idrato di sodio).

In altra sede verrà esaminato entro che limiti la (8) può trovare un accordo coi dati sperimentali. Misure sistematiche a questo scopo sono in corso. Qui mi limiterò ad osservare che un valore di K dell'ordine di 10^2 sembra accordarsi «grosso modo» con il modello qui presentato. È poi molto facile vedere che la larghezza della transizione rappresentata dalla (6) è, come deve, estremamente piccola. Vediamo infatti di determinare, a temperatura e forza ionica costanti, l'intervallo di pH entro cui la frazione di molecole deprotonate in n siti, passa dal 10% di $[D_0]$ alla denaturazione completa. Si ha dalla (6) per i due estremi x_1 e x_2 di questo intervallo:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{[D_n]}{[D_0]} = 10^{nx_1} = 0,1 \\ x_2 = 0 \end{array} \right.$$

da cui

$$\Delta x = \frac{1}{n}$$

la larghezza naturale della transizione risulta dunque dell'ordine di $1/N$ e può, evidentemente, essere messa in evidenza solo facendo uso di oligonucleo-

tidi artificiali con N non superiore a 100. Si osservi, incidentalmente, che quello da noi considerato non è in realtà mai un vero equilibrio. Per ogni valore di x , vi è sempre una probabilità, per quanto piccola, non nulla che qualche molecola venga deprotonata in N siti e quindi denaturati. Tuttavia, per ogni $x < 0$, tale probabilità è così piccola che il calcolo precedente conserva la sua validità.

Vogliamo infine mettere ancora una volta in rilievo come la presente trattazione, pur nella sua rozza approssimazione, sia sufficiente a mostrare come la rapidità di una transizione di fase possa benissimo non essere necessariamente legata all'esistenza di fenomeni cooperativi. Il tipo di ragionamento qui impiegato può inoltre molto probabilmente essere esteso anche a casi di transizione di fase diversi da quello della denaturazione alcalina del DNA.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] F. PODO, *Rapporti dei Laboratori di Fisica dell'Ist. Sup. Sanità ISS*, 68/2, Roma 1968.
- [2] M. AGENO, E. DORE e C. FRONTALI, « *Atti Accad. Naz. Lincei, Rend. classe sci. fis. mat. nat.* », 40, 346 (1966); 40, 540 (1966); 40, 740 (1966); 41, 234 (1966); 42, 580 (1967); 44, 91 (1968); 44, 249 (1968).
- [3] M. AGENO, E. DORE e C. FRONTALI, « *Annali Ist. Sup. Sanità* », 2, 629 (1966).
- [4] M. AGENO, *Accad. Naz. Linc.* « *Problemi attuali di scienze e di cultura* » Quaderno N. 102 (1967).
- [5] M. AGENO, E. DORE e C. FRONTALI, *Rapporti dei Laboratori di Fisica dell'Istituto Sup. Sanità ISS*, 68/9, Roma 1968.