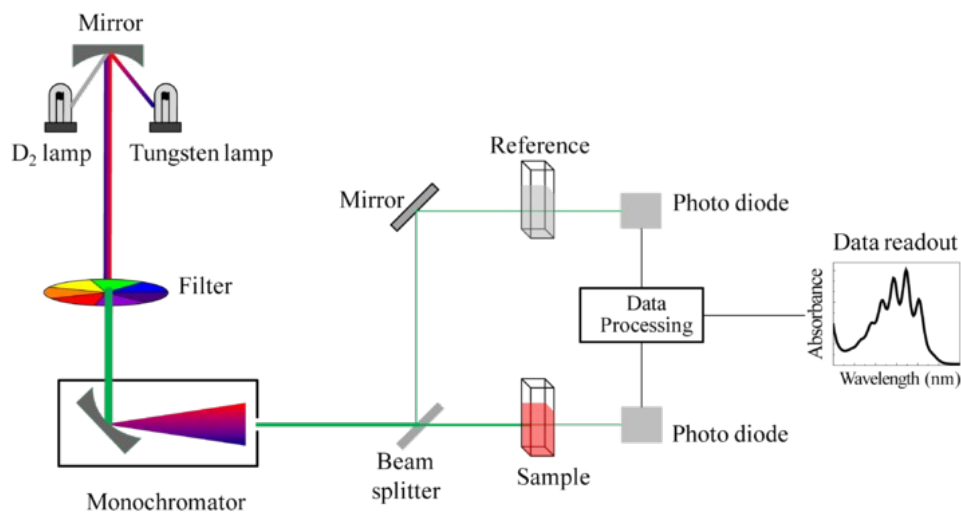


Esperienza sulla stabilità termica del DNA: Melting

Abstract

L'esperienza è finalizzata a studiare la stabilità termica di DNA in forma B con l'osservazione progressiva del melting, cioè unfolding termico della doppia elica, tramite l'assorbanza spettrale nell'intervallo dei raggi UV. Inoltre si è verificato che il DNA fosse veramente in forma B e chirale attraverso la tecnica del dicroismo circolare.

Introduzione



(Fig. 1)

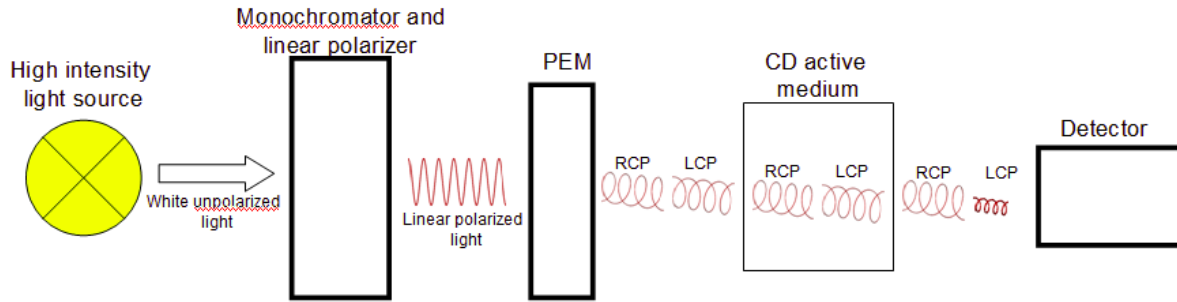
Lo spettrografo utilizzato nell'esperienza può essere schematizzato tramite quello in Fig.1; ovvero è fondamentalmente formato da una sorgente di radiazione elettromagnetica che passa attraverso un filtro il quale seleziona un certo intervallo di lunghezza d'onda (nel nostro caso raggi UV [190nm, 320nm], che sono quelli maggiormente assorbiti dal DNA) e poi un monocromatore che seleziona una lunghezza d'onda con un certo errore (solitamente dell'ordine del nanometro, ma in generale dipende dalla regolarità del reticolo di cui è formato). Tale radiazione investe poi il campione da esaminare che ne assorbirà una parte e la restante verrà quindi trasmessa, quest'ultima sarà rilevata da un fotodiodo. Infine il dispositivo darà come risultato un grafico che ha sull'asse delle ascisse la lunghezza d'onda in nm, e su quello delle ordinate l'assorbanza, cioè il logaritmo, in base 10, del rapporto fra l'intensità della radiazione incidente e l'intensità trasmessa, o equivalentemente il logaritmo cambiato di segno, in base 10, della trasmittanza.

$$A_{\lambda} = \log_{10} \left(\frac{\Phi_{e,\lambda}^i}{\Phi_{e,\lambda}^t} \right) = -\log_{10} T_{\lambda},$$

Nel nostro caso il dispositivo fornirà un grafico dell'assorbanza tramite la legge di Beer, con ipotesi di uniformità della concentrazione del materiale e un coefficiente di estinzione molare tabulato $\epsilon=6600$ [cm²/mol] per la lunghezza d'onda 260nm:

{dove l è lo spessore del materiale, nostro caso 1mm}

$$A = \epsilon cl.$$



(Fig. 2)

Il dicrografo utilizzato per verificare la forma B del DNA analizzato tramite il dicroismo circolare, cioè il fenomeno di assorbimento differente di una sostanza chirale delle due componenti destra e sinistra (in cui può essere scomposta una luce polarizzata linearmente) della luce polarizzata circolarmente, è schematizzato in Fig.2. Una sorgente di luce (abbastanza potente da emettere una radiazione tale che l'intensità assorbita sia maggiore del "rumore", in quanto la differenza di assorbimento è estremamente piccola) irradia una luce bianca non polarizzata che passa per un monocromatore ed un polarizzatore lineare dal quale esce una luce in un certo intervallo di lunghezza d'onda, nel nostro caso UV [190nm, 325nm], e linearmente polarizzata. Questa radiazione viene fatta passare attraverso un cosiddetto componente PEM, un cristallo piezoelettrico, che ne separa le componenti levogira, LCP, e destrogira, RCP, con un certo sfasamento di qualche millisecondo. Se il campione, attraverso cui verrà fatta passare la radiazione scomposta, è una sostanza chirale, come lo sono le proteine e gli acidi nucleici, allora assorbirà in maniera differente l'LCP e l'RCP. Il detector infine studia l'assorbanza della componente levogira e destrogira e ne fa la differenza dalla quale si ricava l'ellitticità della polarizzazione della radiazione trasmessa:

$$CD = \Delta A = A_l - A_r$$

che poi attraverso la legge di Beer si traduce in:

$$CD = (\epsilon_l - \epsilon_r)cl$$

$$CD = \Delta\epsilon cl$$

Procedura

Innanzitutto si è preparato il campione utilizzato durante tutta l'esperienza, cioè la soluzione di DNA (di salmone) e acqua distillata, senza alcun tipo di buffer, da mettere poi in una cuvetta in quarzo suprasil, tipicamente utilizzata per esperimenti di spettroscopia alle lunghezze d'onda dell'ultravioletto e del visibile in quanto non presenta proprietà polarizzanti, dello spessore di 1mm. La cuvetta è stata pulita con dell'acqua distillata e poi pesata con una bilancia di sensibilità 0,1mg in modo tale da determinare la tara del campione. È stata preparata una quantità di soluzione prelevando una certa quantità di DNA e aggiungendovi 1cc (o equivalentemente 1mL) di acqua distillata. Il DNA è stato poi fatto sciogliere completamente tramite un agitatore, quindi è stata prelevata, ed inserita nella cuvetta, una quantità di 0,4mg/mL. Il campione è stato inserito nel dispositivo per studiare l'assorbanza (Fig.1) e farne tre misurazioni differenti:

1. l'assorbanza del DNA foldato, alla temperatura ambiente di 20C°, relativa ad un fascio di raggi UV da [190nm, 320nm];

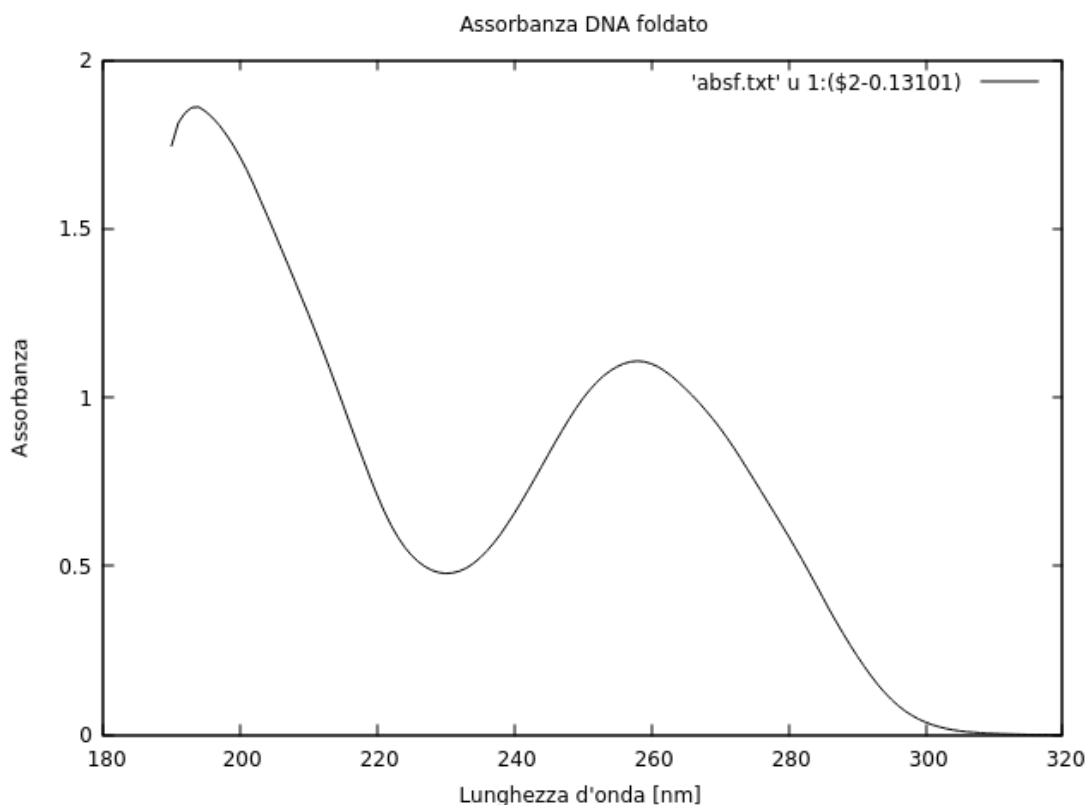
2. l'assorbanza del DNA unfoldato, alla temperatura di 80C°, relativa ad un fascio di raggi UV [190nm, 320nm];
3. l'andamento dell'assorbanza a 260nm ed a 310nm del DNA in funzione della temperatura, durante il melting da 25C° a 80C° grazie ad un bagno termico (Peltié), dispositivo che tiene conto della temperatura ambiente e di quella interna al dispositivo, di supporto, ma non di quella del campione stesso; abbiamo fatto misurazioni di assorbanza ogni 5C° supponendo che fosse il modo migliore per far arrivare il campione alla temperatura di supporto.

Lo stesso campione è stato inserito nel dicrografo (Fig.2), settato nell'intervallo di lunghezza d'onda [190nm, 325nm], per misurare la differenza fra l'assorbimento della luce polarizzata circolarmente levogira e quella destrogira, ovvero il dicroismo circolare. Ciò è stato fatto per verificare che il DNA di salmone del campione sia in forma B e che sia effettivamente chirale.

Risultati e Conclusioni

Assorbanza DNA foldato

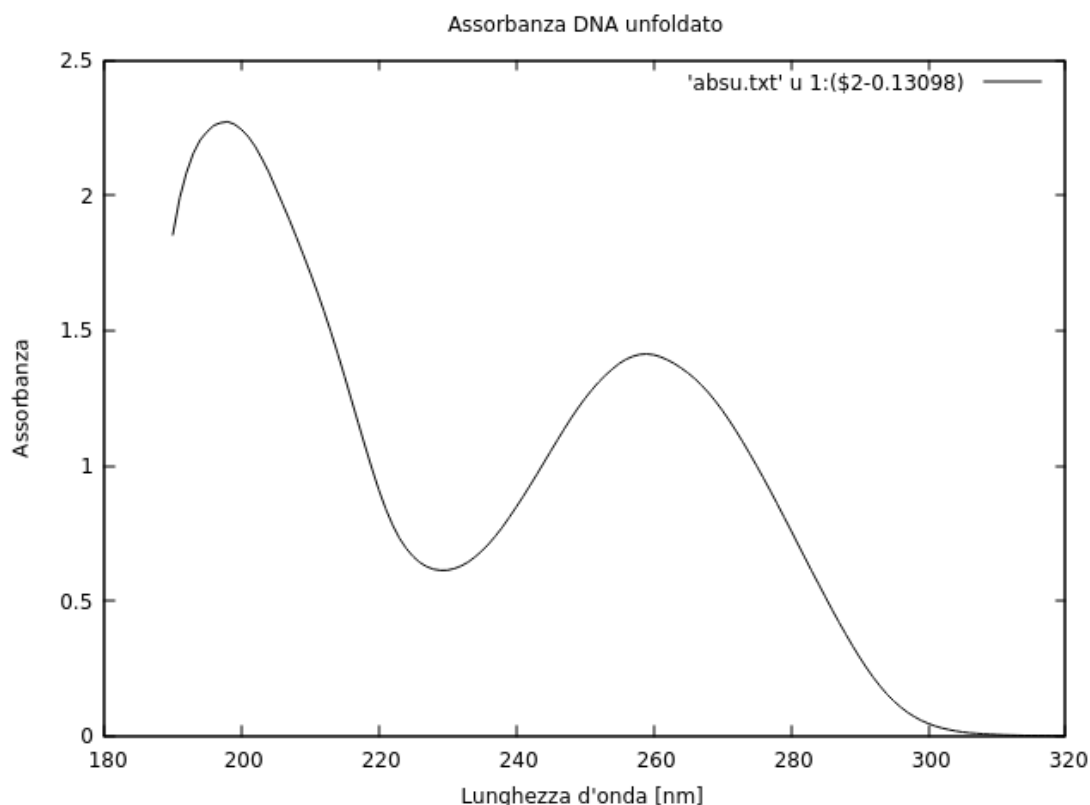
I risultati di questa misurazione sono coerenti con quello che ci si aspettava, ovvero un massimo intorno a 260nm, di assorbanza 1.99220, e un valore di 0.13101 a 320nm che è diverso da 0 in quanto c'è un fondo dovuto al solvente. Tale fondo è stato sottratto dal grafico finale per avere un'idea più fedele di quella che è l'assorbanza del solo DNA. Per evitare una tabella di 131 misurazioni diverse si riporta di seguito il grafico finale:



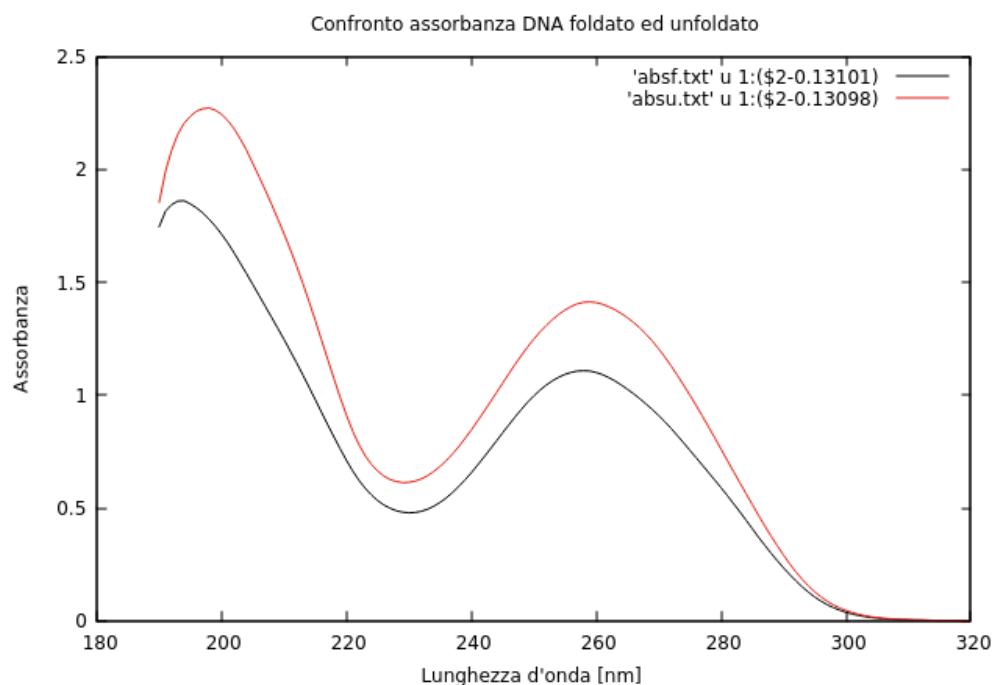
Tramite una semplice formula inversa della legge di Beer è possibile ricavare la concentrazione del soluto in modo molto più accurato della pesata con bilancia. Il risultato ci è stato dato dal dispositivo ed è $c = 1,66 \text{ millimoli di basi/cm}^3$. Non è in moli di DNA ma di basi, infatti non abbiamo una misura assoluta della lunghezza ma sappiamo che il campione utilizzato ha un massimo per la lunghezza di 3000 basi.

Assorbanza DNA unfoldato

A priori ci aspettiamo che i valori di assorbanza in questo caso siano più grandi dei rispettivi del DNA foldato in quanto l'assorbimento del DNA a filamento singolo è maggiore di quello del DNA a doppia elica, che qualitativamente può essere spiegato dal fatto che gli elettroni dei singoli filamenti sono più liberi di vibrare, rispetto a quelli della doppia elica, e quindi di assorbire. Ci si ritrova anche in questo caso con un massimo a 260nm, di valore 2.40339, e un fondo non nullo a 320nm di 0.13098, che verrà tolto nel grafico finale, che è il seguente:

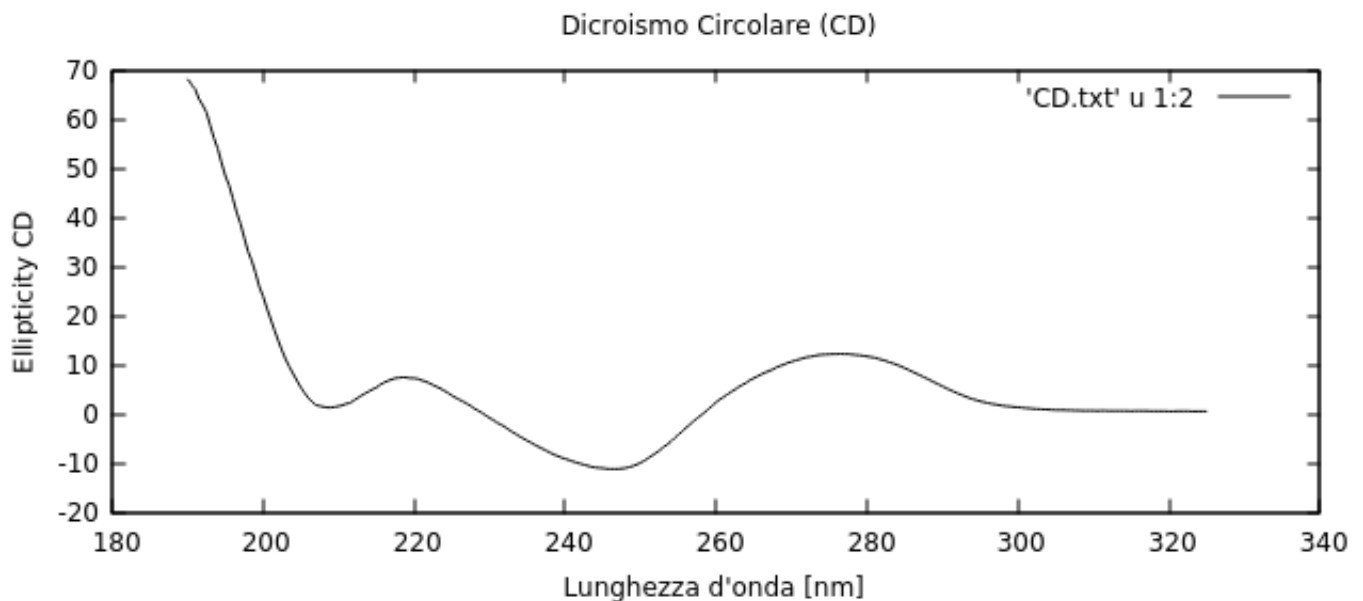


Mettendo a confronto infine i due grafici, DNA foldato in nero ed unfoldato in rosso, possiamo notare come in realtà sono della stessa forma ma il secondo è più rialzato rispetto all'altro:



Dicroismo circolare

Il grafico dei dati di questa parte dell'esperienza presenta due caratteristiche che ci aspettavamo prima della misurazione tramite dicrografo, ovvero un massimo di ellitticità, 67.93757mdeg, a circa 275nm ed un minimo, -11.18143mdeg, a circa 245nm. Inoltre il fatto che l'ellitticità sia diversa da 0 dimostra che il DNA in forma B è chirale. Il grafico finale è quello tipico del DNA in forma B, come volevasi dimostrare:

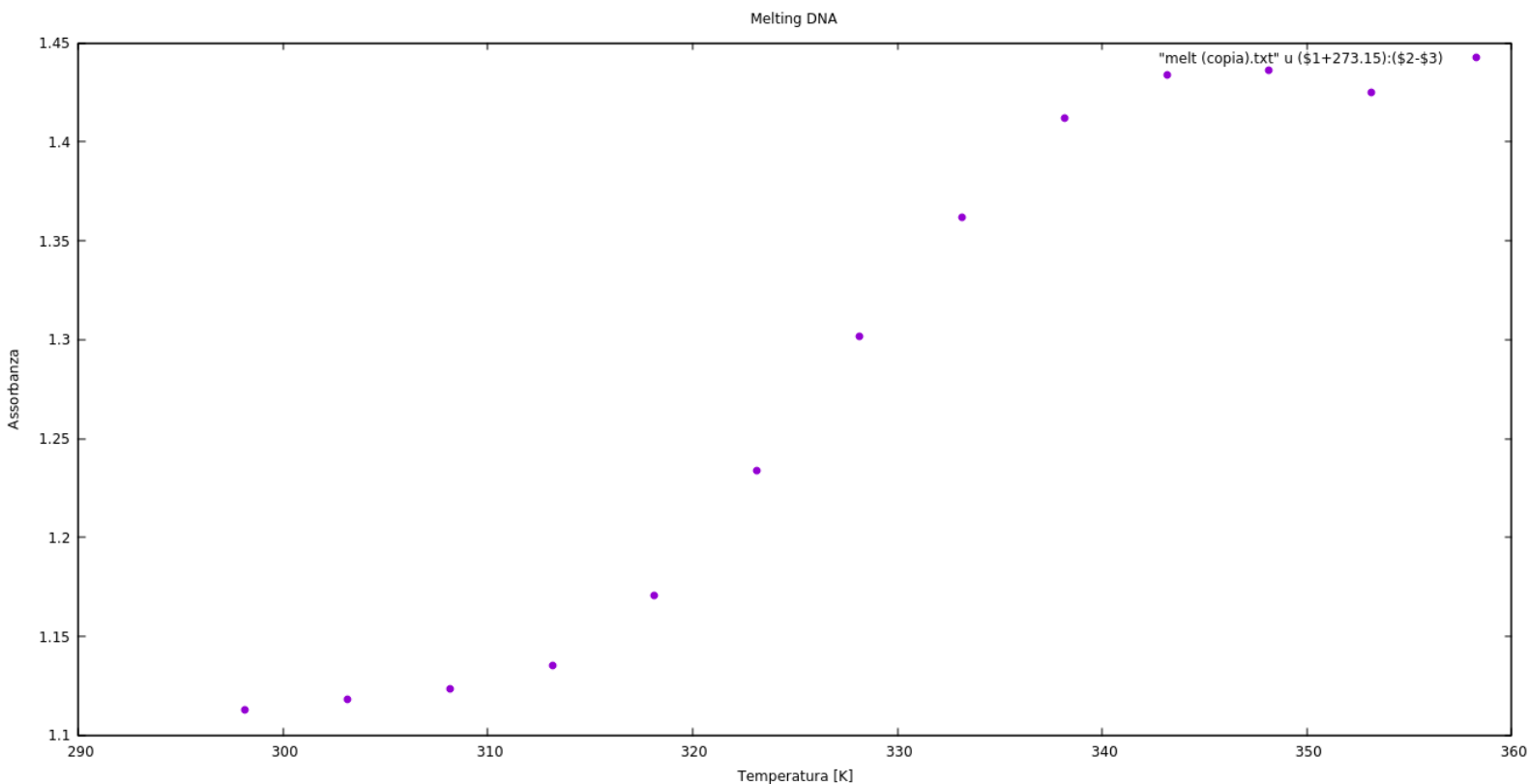


Melting DNA

L'assorbanza del campione è stata infine misurata a due lunghezze d'onda fissate, 260nm e 310nm (per eliminare il fondo del solvente anche in questo caso), variando però la temperatura e studiandone quindi l'andamento parallelamente al melting del DNA.

T [C°]	Abs (260nm)	Abs (310nm)
25	1,2462	0,1332
30	1,2509	0,133
35	1,2565	0,1331
40	1,2687	0,1335
45	1,3048	0,134
50	1,3685	0,1347
55	1,4371	0,1356
60	1,4989	0,1369
65	1,5449	0,1329
70	1,5671	0,1332
75	1,5704	0,1341
80	1,5642	0,1389

Una volta eliminato il fondo del solvente dall'assorbanza a 260nm ed essere passati dai gradi Celsius ai gradi Kelvin ($[K]=273,15+[C^{\circ}]$) i dati in tabella sono stati riportati in un grafico:



Tale grafico rispecchia in pieno tutte le previsioni teoriche riguardanti l'argomento, come può essere ad esempio il punto di flesso, che nel nostro caso è all'incirca a 42°C, tipico dell'andamento (a funzione sigmoidea) cooperativo di un processo come il melting; a questo punto corrisponde una temperatura detta di melting, o più in generale di collasso, alla quale si è in presenza del 50% di DNA foldato e del 50% di DNA unfoldato. Inoltre è possibile notare anche il fatto che la cooperatività è un processo finito, infatti dopo che il DNA è per la maggior parte in forma di doppio filamento singolo l'andamento della curva si assesta ad un determinato valore. Il fatto che l'ultimo valore di assorbanza si trovi ad un livello più basso del precedente è probabilmente dovuto all'inaffidabilità del bagno termico che non deve aver tenuto il campione alla temperatura indicata. Infine la curva del grafico è molto meno accentuata di quello che ci si aspettava, questo si può spiegare col fatto che, nonostante la maggior parte del DNA del nostro campione sia formato da 3000 basi, vi sono anche sequenze più corte, ciò implica che la cooperatività del nostro esperimento è smorzata; questo perché i fenomeni di cooperazione dipendono anche dalla grandezza del campione in esame.

Luca Pacioselli