

DETERMINACION DEL TENSOR POLARIZABILIDAD OPTICA DEL ADN TIPO VARILLA

J. A. Bertolotto*, M. V. Perez Reale y M. D. Bergonzi Rodriguez

Departamento de Física - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad Nacional de La Pampa
Uruguay 151 - (6300) - Santa Rosa (LP) - Argentina.
e-mail: jbertolotto@unlpam.edu.ar

Se determinan las polarizabilidades ópticas en las direcciones paralelas y perpendicular al eje longitudinal, de fragmentos de ADN tipo varilla. Las muestras se obtienen sonicando ADN de timo de ternera. Las polarizabilidades ópticas se calculan a partir de la medición de dos parámetros físicos: la birrefringencia eléctrica de saturación (a campo eléctrico infinito) y el incremento de índice de refracción, respecto al solvente. Para la determinación de birrefringencia de saturación se mide la birrefringencia eléctrica a campos elevados (mayores de 15 kV/cm) y se extrapola a campo eléctrico infinito. Para la medida del incremento de índice de refracción se emplea un refractómetro diferencial tipo doble prisma.

We determine the parallel and perpendicular optical polarizability, to the symmetric axis of rodlike deoxyribonucleic acid (DNA) fragments. Experimental measures of two physical parameters compute the optical tensor: the saturated electric birefringence at infinite electric field and the refractive index increment respect to the solvent. The saturated birefringence was determined by electric birefringence measures at high field strengths (greater than 15 kV/cm) extrapolating to infinite field strength. A double prism type differential refractometer was used to determine the refractive index increment value.

I. INTRODUCCIÓN

La aplicación de un campo eléctrico rectangular a una solución de macromoléculas la vuelve birrefringente. Si la duración del pulso se elige adecuadamente se llega a un estado estacionario, con un valor de la birrefringencia eléctrica Δn dependiente del campo eléctrico aplicado y de las propiedades eléctricas y ópticas (tensores polarizabilidades eléctrica y óptica). Cuando se suprime el campo eléctrico se produce el decaimiento $\Delta n(t)$, que depende de la forma y tamaño (tensor de difusión rotatoria) y propiedades ópticas (tensor polarizabilidad óptica) de las moléculas⁽¹⁾.

Para moléculas con simetría cilíndrica las mediciones de la birrefringencia eléctrica permiten determinar la anisotropía de la polarizabilidad óptica $\Delta\alpha^0 = \alpha^0_{33} - \alpha^0_{11}$. Donde α^0_{33} y α^0_{11} son las polarizabilidades ópticas paralela y perpendicular al eje de simetría respectivamente.

El objetivo de este trabajo es encontrar los términos de polarizabilidad óptica α^0_{33} y α^0_{11} en forma independiente para fragmentos de ADN tipo varilla. Estos parámetros se encuentran efectuando mediciones de la birrefringencia eléctrica de saturación a campo E infinito para soluciones acuosas de ADN sonicado y del incremento del índice de refracción respecto al solvente de las mismas.

En la molécula de ADN la anisotropía óptica es debida casi completamente a los electrones π de los anillos heterocíclicos de las bases. Estos anillos tienen su mayor polarizabilidad óptica en sus planos y muy débil en la dirección perpendicular, por lo tanto, en las doble hélices de ADN la polarizabilidad es mucho mayor en la

dirección paralela a los planos de las bases que en la dirección paralela al eje largo de la molécula. En la transición $\pi \rightarrow \pi^*$, la principal repartición de carga electrónica es un corrimiento paralelo al plano molecular de las bases y el momento de transición es también paralelo al plano. Las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ están asociadas con débiles momentos dipolares eléctricos de transición y sus contribuciones al espectro de absorción parecen despreciables. La polarizabilidad óptica de una molécula de ADN se origina en las transiciones electrónicas responsables de las bandas de absorción en un rango espectral en el ultravioleta no demasiado lejano. Las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ dan lugar a dos fuertes bandas de absorción, los máximos de las cuales están cerca de 260 nm y 185 nm en los derivados de ácidos nucleicos.

Según la teoría cuántica, la polarizabilidad óptica está vinculada a los momentos de las transiciones electrónicas. Si μ_i es el momento total para una transición desde el estado cuántico 0 hasta el estado cuántico i las polarizabilidades ópticas en las direcciones paralela y perpendicular al eje longitudinal del ADN se pueden expresar de la siguiente manera⁽¹⁾:

$$\alpha^0_{33} = \frac{2}{3h} \sum v_i \mu_{i\parallel}^2 / (v_i^2 - \nu^2) \quad (1)$$

$$\alpha^0_{11} = \frac{2}{3h} \sum v_i \mu_{i\perp}^2 / (v_i^2 - \nu^2) \quad (2)$$

donde $\mu_{i\parallel}$ y $\mu_{i\perp}$ son las componentes del momento de transición en las direcciones paralela y perpendicular al eje de longitudinal del ADN.

La atribución de bandas de absorción a las diversas transiciones (electrónicas) de los grupos cromóforos y el

* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia.

conocimiento de la dirección de polarización de sus momentos de transición necesita de los recursos de varios métodos espectroscópicos (dicroísmo lineal, polarización de la fluorescencia y dicroísmo circular). El análisis se complica por la presencia de transiciones superpuestas en el espectro de absorción ultravioleta del ADN y las ambigüedades referentes a las direcciones de algunos momentos de transición $\pi \rightarrow \pi^*$. Además se encuentra sin resolver el tema de el grado de contribución significativa de las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ fuera del plano de las bases⁽²⁾.

La determinación de α_{33}^o y α_{11}^o en forma independiente puede contribuir a arrojar luz sobre estas cuestiones ya que son, como se muestra en las ecs. (1) y (2), magnitudes estrechamente vinculadas con las componentes de los momentos de transición μ_{\parallel} y μ_{\perp} e introducen una información adicional. Además servirán para dilucidar la contribución de las diferentes transiciones electrónicas a la polarizabilidad óptica del ADN.

En este trabajo se utilizó ADN sonificado, con el fin de obtener muestras de un peso molecular menor, que permite aplicar, como una primera aproximación, un modelo de varilla rígida⁽⁵⁾.

I. MARCO TEORICO

Birrefringencia Eléctrica en el estado estacionario

Para determinar la birrefringencia eléctrica de macromoléculas en solución se coloca la misma entre dos electrodos planos paralelos a los que se aplica una diferencia de potencial para crear un campo eléctrico orientador E; presentando la muestra dos índices de refracción, n_{\parallel} en la dirección del eje óptico y n_{\perp} en la dirección perpendicular al mismo. La birrefringencia se define como la diferencia de índices de refracción $\Delta n = n_{\parallel} - n_{\perp}$.

Con el fin de relacionar la birrefringencia eléctrica con los parámetros moleculares empleamos la teoría desarrollada por O'Konski *et al.*⁽³⁾ que considera moléculas con simetría cilíndrica para sus propiedades eléctricas y ópticas. Estas son las siguientes: $\alpha_{33}^{E,O}$ y $\alpha_{11}^{E,O}$ las polarizabilidades eléctricas (ópticas) paralela y perpendicular al eje de simetría respectivamente, $\Delta\alpha^{E,O} = \alpha_{33}^{E,O} - \alpha_{11}^{E,O}$ la anisotropía de la polarizabilidad eléctrica (óptica), y μ_p el momento permanente en la dirección del eje de simetría. A estas polarizabilidades de las partículas en solución se las debe considerar como incrementos de las polarizabilidades del soluto con respecto al solvente ($\alpha_{\text{soluto}} - \alpha_{\text{solvente}}$).

Función de orientación

La birrefringencia eléctrica en soluciones diluidas de macromoléculas esta dada por la ecuación:

$$\Delta n = \Delta n_s \Phi \quad (3)$$

donde Δn_s es la birrefringencia de la solución con las moléculas completamente orientadas en un campo eléctrico infinito y Φ es el factor de orientación. Para el modelo de molécula polarizable no polar, la birrefringencia de saturación vale:

$$\Delta n_s = \left[\frac{2\pi c_1}{n} (\alpha_{33}^o - \alpha_{11}^o) \right] \quad (4)$$

donde n es el índice de refracción de la solución sin orientación preferencial de sus moléculas (aproximadamente el índice de refracción del agua para soluciones diluidas) y c_1 es el número de macroiones por cm^3 .

El factor de orientación, Φ , esta dado por

$$\Phi = \frac{1}{2} \left(3 \langle \cos^2 \theta \rangle_{av} - 1 \right) \quad (5)$$

$$\Phi = \frac{1}{2} \left[3 \int_0^{\pi} \cos^2 \theta f(\theta, t) 2\pi \sin \theta d\theta - 1 \right]$$

donde θ es el ángulo entre el eje de simetría de la macromolécula y la dirección del campo, $\langle \cos^2 \theta \rangle_{av}$ es el promedio estadístico del valor de $\cos^2 \theta$, y $f(\theta, t)$ es la función de distribución angular para la orientación de macromoléculas en cualquier tiempo.

Cuando el efecto de orientación debido al campo eléctrico es equilibrado por el efecto de desorientación debido al movimiento Browniano de rotación, se alcanza un estado estacionario con una función de distribución angular independiente del tiempo dada por la ley de distribución de Boltzmann siguiente

$$f(\theta) = \frac{\exp(-U/kT)}{\int_0^{\pi} (-U/kT) 2\pi \sin \theta d\theta} \quad (6)$$

donde U es la energía potencial de la macromolécula en el campo eléctrico, k la constante de Boltzmann, y T la temperatura absoluta.

La energía potencial U es la energía de interacción de la macromolécula con el campo eléctrico debido a su anisotropía de la polarizabilidad eléctrica:

$$U = -(1/2) \Delta\alpha^E E^2 \cos^2 \theta \quad (7)$$

donde E es la intensidad del campo externo, y donde se supone el momento dipolar permanente, en el eje de simetría, nulo $\mu_p = 0$.

De las ecs. (5), (6) y (7) obtenemos

$$\Phi = \frac{3 \int_{-1}^1 u^2 \exp(\gamma u^2) du}{2 \int_{-1}^1 \exp(\gamma u^2) du} - \frac{1}{2} \quad (8)$$

donde hemos introducido las notaciones $u = \cos \theta$ y $\gamma = [\Delta\alpha^E / 2kT] E^2$.

Se puede demostrar que para campos eléctricos elevados, Φ , puede expresarse de la siguiente manera

$$\Phi = \frac{\Delta n}{\Delta n_s} = 1 - \frac{3}{2} \left(\frac{2kT}{\Delta\alpha^E} \right) \frac{1}{E^2} \quad (9)$$

La ec. (9) permite obtener el valor de la birrefringencia de saturación, Δn_s , o sea la birrefringencia a campo eléctrico infinito ($E \rightarrow \infty$), extrapolando Δn vs. $1/E^2$ a $E = \infty$.

Relajación de la birrefringencia eléctrica

Para una solución monodispersa de partículas cilíndricas rígidas, la curva de disminución de la birrefringencia eléctrica, $\Delta n(t)$, después de suprimir el campo eléctrico, se expresa de la siguiente manera⁽¹⁾:

$$\Delta n = (\Delta n)_{t=0} \cdot e^{-t/\tau} \quad (10)$$

donde $(\Delta n)_{t=0}$ es la birrefringencia eléctrica a tiempo cero y τ es el tiempo de relajación de las moléculas.

Diferencia entre los índices de refracción de la solución y del solvente

La expresión para el incremento, $\delta n = n - n_0$, entre los índices de refracción de la solución, n , y del solvente, n_0 , en función de los términos principales del tensor polarizabilidad óptica de la partícula con simetría cilíndrica, resulta⁽¹⁾:

$$\delta n = \left[\frac{2\pi c_1}{n_0} (\alpha_{33}^o + 2\alpha_{11}^o) / 3 \right] \quad (11)$$

donde se empleó la aproximación $n + n_0 = 2 n_0$, válida para soluciones diluidas.

Determinación de los términos α_{33}^o y α_{11}^o del tensor de polarizabilidad óptica

Empleando las ecs. (4) y (11) se obtienen las siguientes expresiones para los términos principales del tensor polarizabilidad óptica α_{33}^o , α_{11}^o

$$\alpha_{11}^o = \left(\frac{n_0}{2\pi c_1} \right) \left[\delta n - \frac{1}{3} \Delta n_s \right] \quad (12)$$

$$\alpha_{33}^o = \left(\frac{n_0}{2\pi c_1} \right) \left[\delta n + \frac{2}{3} \Delta n_s \right] \quad (13)$$

donde se usó que $n_0 \approx n$, válida para soluciones diluidas. En ellas, la concentración c_1 (numero de macroiones por cm^3) se relaciona con la concentración c , expresada en mg/dl , de la siguiente manera $c_1 = N_A c 10^{-5} / (\text{PM})$, donde (PM) es el peso molecular expresado en Dalton.

II. MATERIALES Y METODOS EXPERIMENTALES

Birrefringencia Eléctrica

Para realizar la medición de las propiedades electro-ópticas (birrefringencia y dicroísmo eléctricos) se utilizó un equipo diseñado y construido por Bertolotto *et. al.*⁽⁴⁾, que consta de una fuente de luz monocromática y plano-polarizada, generador de pulsos marca Velonex con el cual se generan campos eléctricos de hasta 21 kV/cm , con una duración del orden de $100 \mu\text{s}$, celda de Kerr con $0,15 \text{ cm}$ entre placas y 1 cm de camino óptico, lámina $1/4$ de onda, analizador, fotomultiplicador, y osciloscopio conectado a una computadora mediante interfase.

Se utilizó una muestra de ADN nativo de timo de ternera altamente polimerizado (SIGMA, Tipo I cat. D1501), con una concentración de 70 mg/dl . en solución acuosa de 1 mM de NaCl . Las soluciones de ADN fueron sonicadas en un generador ultrasónico modelo Conet con una frecuencia de 20 kHz a 25 W de potencia.

La concentración de la solución se determinó mediante un espectrofotómetro UV-VIS marca METROLAB (RC250 UV) empleando como coeficiente de extinción para el ADN, $\epsilon_{\text{ADN}} = 200 \text{ dl}/(\text{g}\cdot\text{cm})$ a una longitud de onda de 260 nm . La concentración se obtiene al aplicar a las medidas de absorción la Ley de Lambert y Beer.

El peso molecular de la muestra se obtuvo a través del tiempo de relajación de las moléculas⁽⁵⁾.

Refractometría diferencial

Para determinar el incremento del índice de refracción de una solución con respecto al del solvente, $\delta n = n - n_0$, se construyó un refractómetro diferencial similar al presentado por Brice y Halmer⁽⁶⁾. En la Figura 1 se exhibe un esquema de este instrumento, que se compone de los siguientes elementos: FL: Fuente luminosa (lámpara de sodio), L: Lente condensadora, R: Rendija, CD: Celda diferencial del tipo "doble prisma", P: Lente proyectora, C: Catetómetro colocado para medir desplazamientos horizontales d .

Los autores mencionados demuestran que el incremento δn es proporcional al desplazamiento d del haz luminoso en un plano transversal al mismo, es decir $\delta n = k \Delta d$.

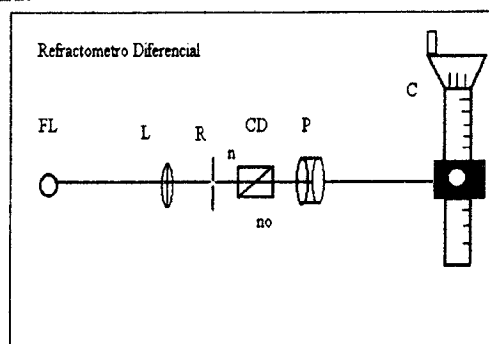


Figura 1: Montaje experimental del Refractómetro Diferencial.

III. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Se obtuvo el tiempo de relajación de las moléculas realizando un ajuste exponencial del decaimiento $\Delta n(t)$ como se muestra en la Figura 2. El resultado fue $\tau = (31 \pm 1) \mu\text{s}$. Para el peso molecular de las muestras, se utilizaron valores tabulados previamente e interpretados desde un gráfico log-log de la dependencia del peso molecular con los tiempos de relajación dados por Houssier⁽⁵⁾. El peso molecular promedio de la muestra de ADN sonicado encontrado fue de 270.110 Dalton correspondiente a una longitud de cadena de $L = 1350 \text{ \AA}$. En esta experiencia se aplicó un campo eléctrico de $18,7 \text{ kV/cm}$.

Tabla 1

Concentración de ADN (mg/dl)	$\delta n \times 10^4$
70	1,2600
52,5	0,9502
35	0,6155
17,5	0,2293

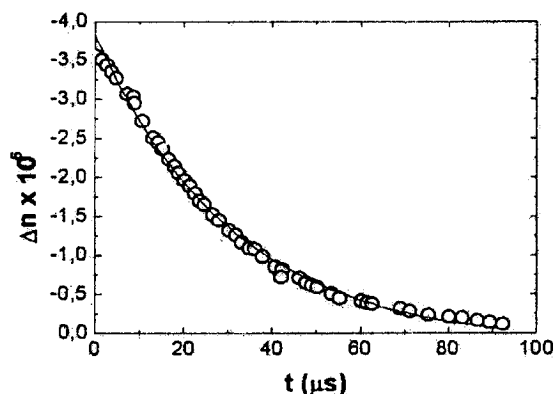


Figura 2: Oscilograma del decaimiento de la birrefringencia eléctrica.

Basándonos en la ec. (9) se obtuvo el valor de la birrefringencia eléctrica de saturación, Δn_s , extrapolando Δn a intensidad de campo eléctrico infinito, empleando un gráfico de Δn en función de $1/E^2$ como se muestra en la Figura 3. En ella la concentración de ADN, en mg/dl, es de 7 mg/dl. El valor de Δn_s obtenido es $\Delta n_s = -4.51 \times 10^{-6}$.

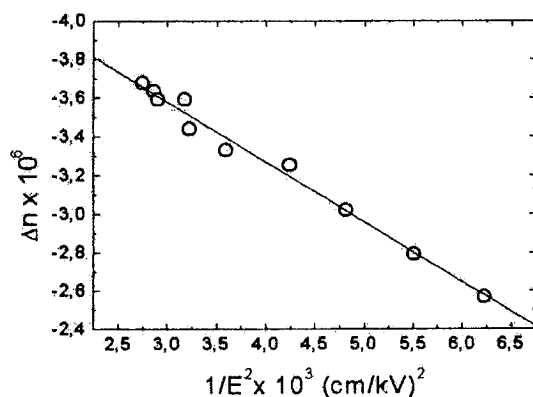


Figura 3: Birrefringencia de saturación

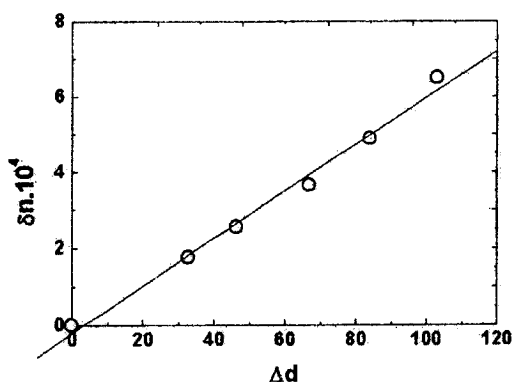


Figura 4: Gráfica de calibración del refractómetro diferencial.

En la Figura 4 se muestra la gráfica de calibración del refractómetro diferencial, que se realizó mediante soluciones de sacarosa a $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ para las cuales $(\delta n/c) = 0.1436 \text{ ml/g}$. El valor de la constante k obtenida de la gráfica es de $6.197 \times 10^{-6} (1/division)$.

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

Un ajuste lineal de la gráfica δn vs. c (Figura 5) permite conocer el valor del incremento de índice de refracción para la misma concentración usada en la determinación de la birrefringencia de saturación Δn_s , $c=7 \text{ mg/dl}$, que resulta $\delta n = 1,25 \times 10^{-5} \pm 0,04 \times 10^{-5}$.

Empleando las ecs. (12) y (13) con los valores de Δn_s y δn indicados arriba se encuentran para los términos del tensor polarizabilidad óptica:

$$\alpha_{11}^0 = (1,9 \pm 0,1) \times 10^{-20} \text{ cm}^3$$

$$\alpha_{22}^0 = \alpha_{11}^0$$

$$\alpha_{33}^0 = (1,3 \pm 0,1) \times 10^{-20} \text{ cm}^3$$

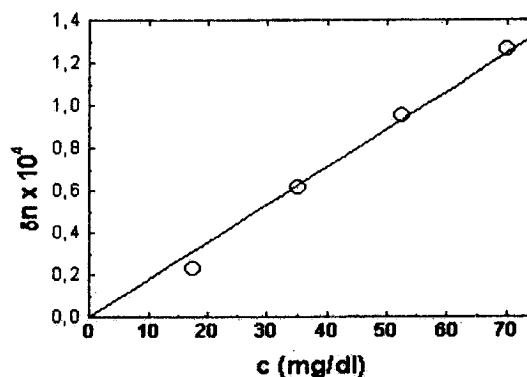


Figura 5: Incremento del índice de refracción del ADN con respecto al solvente vs. Concentración.

IV. DISCUSIÓN

Si bien los macroiones de ADN se comportan como varillas rígidas para longitudes menores que $600 \text{ \AA}^{(5)}$, en este experimento, la teoría para partículas rígidas aplicada para hallar α_{33}^0 y α_{11}^0 sigue siendo válida a pesar de que el ADN utilizado tiene una longitud promedio de 1350 \AA para la cual la molécula se hace semiflexible. Aún para el caso de partículas semiflexibles, puede aplicarse el método experimental y la teoría usados en este trabajo.

Un modelo simple y adecuado para describir el comportamiento electro-óptico de partículas semiflexibles y de longitudes de hasta 2000 \AA , es el modelo "macroión varilla quebrada" (MVQ) compuesto de dos brazos rígidos de longitud L y con un ángulo χ entre ellos, presentando un potencial elástico en la bisagra⁽⁷⁾⁽⁸⁾.

Si se calcula el tensor polarizabilidad óptica del MVQ suponiendo que las polarizabilidades de cada brazo son aditivas, y si se calcula su correspondiente incremento de índice de refracción con respecto al del solvente, δn , se obtiene la misma expresión (ec. (11)) correspondiente a una partícula rígida.

Por otra parte, para obtener la birrefringencia eléctrica de saturación se emplean campos eléctricos muy elevados que estiran la partícula y la llevan a adoptar una forma cilíndrica. Esto se explica porque los campos eléctricos aplicados inducen una polarización de la atmósfera iónica alrededor del ADN, que conduce a un exceso de cargas efectivas en los extremos de la doble hélice. El campo eléctrico actúa sobre estas cargas produciendo un

estiramiento de la doble hélice⁽⁹⁾. De esta manera la ec. (9) empleada para calcular el Δn , es válida.

En futuros trabajos se buscarán ajustes cuantitativos entre los valores de la polarizabilidad óptica determinados experimentalmente y los valores de los momentos de transición electrónicas de la molécula de ADN, vinculados por las ecs. (1) y (2).

V. REFERENCIAS

1. Fredericq, E., Houssier, C., "Electric Dichroism and Electric Birefringence", Clarendon Press, Oxford, 1973.
2. Norden, B., Kubista, M., Kurucsev, T., Q. Rev. Biophys, **25**, 51 (1992).
3. O'Konski, Yoshioka K. Y Orttug W. H., J. Phys. Chem., **63**, 1558 (1959).
4. Bertolotto, J. A.; Willging, P. A.; Pugnali, L. A. y Bustos, H. D. Anales AFA, **5**, 486 (1993).

5. Houssier, C. En: Molecular Electrooptics, Electro optics Properties of Macromolecules and Colloids in solution (ed. Sonja Krause), p.363. Plenum press, N.Y (1981).
6. Brice, B. A. and Halmer, M. J. Opt. Soc. Am. **41**. 1033 (1951).
7. Bertolotto, J. A., Campo, M. G., Mesuraca, F. V., y Baez, L. A., "Dependencia con el campo eléctrico de la birrefringencia eléctrica del ADN. Modelo de varilla quebrada", Anales AFA, 1999. Presentado para su publicación.
8. Bertolotto, J. A., Campo, M. G., "Decaimiento de la birrefringencia eléctrica de un macroión tipo varilla quebrada" (trabajo en preparación).
9. Poršchke, D., Biopolymers, **28**, 1386 (1989).