

T 11-56

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA**



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha 27-5-98  
ENTRADA NUM. 1916

**DETECCIÓN FLUORIMÉTRICA DE LA  
HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS  
EN MEDIOS HOMOGÉNEOS**

**TESIS DOCTORAL**

**MOUSTAFA AFKIR**  
**GRANADA**  
**1998**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA  
GRANADA  
N.º Documento 613375386  
N.º Copia i17870604

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
20 MAYO 1998  
COMISION DE DOCTORADO



La presente Memoria se ha realizado íntegramente en los laboratorios  
del Departamento de Química Física de la Facultad de Farmacia  
de la Universidad de Granada.

**El Director del Departamento**



Fdo. Dr. D. José Mª Alvarez Pez

**LOS DIRECTORES DEL TRABAJO**

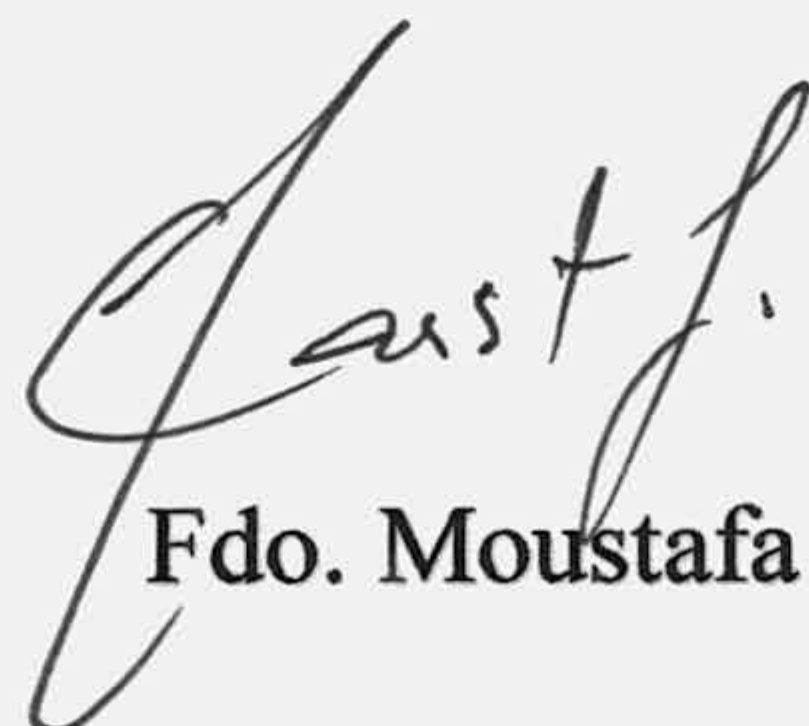


Prof. Dr. D. José Mª Alvarez pez  
Catedrático de Química Física  
Universidad de Granada



Prof. Dra. Dª Eva Mª Talavera Rodríguez  
Profesora Titular de Química Física  
Universidad de Granada

Memoria presentada por el Ldo. D. Moustafa Afkir para aspirar al Grado de  
Doctor en Químicas.



Fdo. Moustafa Afkir



Al concluir el presente trabajo quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra lo hicieron posible.

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento al Prof. Dr. D. José M<sup>a</sup> Alvarez Pez y a la Prof. Dra. D<sup>a</sup> Eva M<sup>a</sup> Talavera Rodríguez, no sólo por la propuesta del tema y su dirección, a la que han dedicado gran esfuerzo y tiempo, sino también por la confianza que han demostrado en mí y el apoyo que me han brindado, su amistad y comprensión.

Al Dr. D. Alberto Manuel Vargas Morales y al Dr. D. Rafael Salto González profesores del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, por su importante ayuda y colaboración en la parte de extracción y purificación del cADN utilizado en esta Memoria.

A mis compañeros del Departamento, por su colaboración, a los que agradezco toda la ayuda que desinteresadamente me han prestado y por su apoyo diario, haciendo que este trabajo fuera más llevadero; Redouan, Jorge, Rupe, Karim, Serafín, Indalecio, José Luis, Emilio, David, Enrique, María L.V., María Angeles, Celia, María B., Mariela, Ilu y Raquel. Especialmente quiero agradecer a Luis M.B. por su constante ayuda con la manipulación de los programas de informática.

En definitiva, gracias a todos los miembros del Departamento de Química Física por la ayuda que me han brindado.

Por último, mi gratitud a mi familia y a Ana, por soportarme con paciencia y cariño, así como el constante estímulo que me han proporcionado.



*A mis padres*



# ***ÍNDICE***



<b><u>I. INTRODUCCIÓN</u></b> .....	1
<b>I. 1.- OBJETIVOS DEL TRABAJO</b> .....	2
<b>I. 2.- BREVE HISTORIA SOBRE EL DESARROLLO DE LAS SONDAS DE ADN</b> .....	5
<b>I. 3. ETIQUETADO COVALENTE DE PROTEÍNAS Y ÁCIDOS NUCLEICOS CON FLUORÓFOROS</b> .....	12
<b>I. 3. 1. Esquemas de derivatización de polinucleótidos para su posterior marcaje</b> .....	13
<b>I. 3. 2. Tipos principales de reacciones de etiquetado con fluoróforos</b> ..	16
<b>I. 3. 3. Determinación de la extensión del etiquetado</b> .....	19
<b>I. 3. 4. Antecedentes sobre las reacciones utilizadas en esta Memoria para derivatizar los nucleótidos y etiquetarlos con fluoróforos de interés</b>	19
<b>I. 4. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA HIBRIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS EN DISOLUCIÓN</b> .....	22
<b>I. 4. 1. Aplicación de la teoría cinética de segundo orden a la reasociación de ácidos nucleicos</b> .....	23
<b>I. 4. 2. Factores que afectan a la velocidad de reacción y a la estabilidad de la doble cadena</b> .....	27
<b><i>I. 4. 2. 1. Efecto de la temperatura</i></b> .....	27
<b><i>I. 4. 2. 2. Longitud de la cadena</i></b> .....	27



I. 4. 2. 3. <i>Composición en bases</i> .....	28
I. 4. 2. 4. <i>Efectos del pH y fuerza iónica</i> .....	28
I. 4. 2. 5. <i>Efecto de la viscosidad</i> .....	29
I. 4. 2. 6. <i>Influencia de la adición de agentes desnaturizantes</i> ...	29
<b>I. 4. 3. Características de hibridación del sistema modelo utilizado</b> ....	<b>30</b>
<b>I. 4. 4. Propiedades físicas de poli (C), poli(I) y del híbrido poli (C)-poli (I)B1</b>	
<b>I. 4. 5. Formación de híbridos entre homopolímeros complementarios</b> .	<b>32</b>
<b>I. 4. 6. Efectos de la N<sup>4</sup> transaminación en la estabilidad</b> <b>térmica de la doble cadena</b> .....	<b>33</b>
<b>I. 5. PROPIEDADES ÓPTICAS DE LOS FLUORÓFOROS UTILIZADOS</b> ..	<b>35</b>
<b>I. 5. 1. Propiedades ópticas de la fluoresceína y del conjugado</b> <b>poli (C)-fluoresceína</b> .....	<b>35</b>
<b>I. 5. 2. Propiedades ópticas del pireno y derivados utilizados</b> .....	<b>37</b>
<b>I. 5. 3. Propiedades ópticas del antraceno</b> .....	<b>38</b>
<b>I. 5. 4. Propiedades ópticas del cloruro de 1-sulfonil 5-dimetilamino naftaleno</b> .....	<b>38</b>
<b>I. 5. 5. Efectos de la concentración en las propiedades ópticas</b> <b>de las etiquetas fluorescentes</b> .....	<b>38</b>

<b>I. 6. PARÁMETROS FLUORESCENTES DE INTERÉS EN EL ESTUDIO DE INTERACCIONES ENTRE BIOPOLÍMEROS EN DISOLUCIÓN</b> .....	42
<b>I. 6. 1. Eficiencia de fluorescencia</b> .....	42
<b>I. 6. 2. Tiempo de vida de fluorescencia</b> .....	45
<b>I. 6. 3. Polarización de fluorescencia. Su uso en el análisis de interacciones entre biopolímeros</b> .....	48
<b>I. 6. 4. Transferencia de energía</b> .....	53
<b><u>II. MATERIALES Y MÉTODOS</u></b> .....	55
<b>II. 1. MATERIALES</b> .....	56
<b>II. 1. 1. Reactivos</b> .....	56
<b>II. 1. 2. Instrumentación</b> .....	57
<b>II. 2. MÉTODOS EXPERIMENTALES</b> .....	62
<b>II. 2. 1. Extracción y purificación del ADN</b> .....	62
<i>II. 2. 1. 1. Extracción y purificación del ADN de Escherichia coli</i> ..	62
<i>II. 2. 1. 2. Extracción y purificación del cADN hepático</i> .....	63
<b>II. 2. 2. Modificación de los ácidos nucleicos</b> .....	64
<b>II. 2. 3. Síntesis del cloruro de <math>\gamma</math>-(piren-4-il) butirilo</b> .....	66



<b>II. 2. 4. Etiquetado de los ácidos nucleicos con los distintos flúoroforos de interés</b> .....	66
<i>II. 2. 4. 1. Etiquetado con cloruro de sulfonyl pireno y cloruro de <math>\gamma</math>-(piren-4-il)butirilo</i> .....	66
<i>II. 2. 4. 2. Etiquetado con isotiocianatos de fluoresceína y de pireno</i> .....	68
<i>II. 2. 4. 3. Etiquetado con cloruro de 1-sulfonyl 5-dimetilamino naftaleno y cloruro de sulfonyl antraceno</i> .....	68
<b>II. 2. 5. Determinación del porcentaje de marca</b> .....	68
<b>II. 2. 6. Detección fluorimétrica en estado estacionario de la hibridación de poli (C) con poli (I)</b> .....	71
<b>II. 2. 7. Medidas con fluorescencia polarizada en estado estacionario de la hibridación de poli (C) con poli (I)</b> .....	72
<b>II. 2. 8. Cálculo de los tiempos de vida de fluorescencia del conjugado pireno-poli (C)</b> .....	73
<b>II. 2. 9. Cálculo de los tiempos de vida de fluorescencia del conjugado pireno-poli(C) y pireno-poli (C)-poli (I), con fluorescencia polarizada</b> .....	74
<b>II. 2. 10. Estudios cinéticos de hibridación</b> .....	74
<i>II. 2. 10. 1. Cinética de hibridación de pireno-poli (C) con poli (I)</i> ..	74
<i>II. 2. 10. 2. Cinética de reasociación de fluoresceína-ADN de E. coli</i> ..	75
<b>II. 2. 11. Fusión de ADN de E. coli</b> .....	75
<b><u>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u></b> .....	77
<b>III. 1. MARCAJE DE ÁCIDOS NUCLEICOS CON FLUORÓFOROS</b> .....	78
<b>III. 1. 1. Transaminación de ácidos nucleicos</b> .....	78



III. 1. 2. Marcaje de ácidos nucleicos N <sup>4</sup> -aminoetilados con fluoróforos que contienen reactivos específicos de aminas .....	81
<b>III. 2. MEDIDAS DE ABSORCIÓN PARA EL CÁLCULO DE LA EXTENSIÓN DEL ETIQUETADO FLUORESCENTE .....</b>	<b>85</b>
III. 2. 1. Cálculo del coeficiente de extinción molar de los homopolinucleótidos sintéticos y de los fluoróforos empleados como etiquetas fluorescentes .	85
III. 2. 1. 1. Coeficiente de extinción molar del poli (C) .....	86
III. 2. 1. 2. Coeficiente de extinción molar del poli (I) .....	87
III. 2. 1. 3. Coeficiente de extinción molar del antraceno .....	89
III. 2. 1. 4. Coeficiente de extinción molar del cloruro de dansilo ..	91
III. 2. 1. 5. Coeficiente de extinción molar del ácido pireno butírico	94
III. 2. 2. Cálculo del porcentaje de etiquetado .....	96
<b>III. 3. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA EN ESTADO ESTACIONARIO DE LAS SONDAS OBTENIDAS .....</b>	<b>100</b>
III. 3. 1. Espectros de fluorescencia en estado estacionario de antraceno-poli (C) .....	100
III. 3. 2. Espectros de fluorescencia en estado estacionario de dansilo-poli (C) .....	101
III. 3. 3. Espectros de fluorescencia en estado estacionario de fluoresceína-poli (C) .....	103
III.3.4. Espectros de fluorescencia en estado estacionario de pireno-poli (C) .....	104



<b>III. 4. CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES FLUORESCENTES EN ESTADO ESTACIONARIO DE POLI (C) ETIQUETADO TRAS LA HIBRIDACIÓN CON POLI (I)</b> .....	110
<b>III. 4. 1. Espectros de fluorescencia en estado estacionario de antraceno-poli (C) cuando éste hibrida con poli (I)</b> .....	110
<b>III. 4. 2. Espectros de fluorescencia en estado estacionario de dansilo-poli (C) cuando éste hibrida con poli (I)</b> .....	113
<b>III. 4. 3. Espectros de fluorescencia en estado estacionario durante la hibridación de fluoresceína-poli (C) con poli (I)</b> .....	114
<b>III. 4. 4. Espectros de fluorescencia en estado estacionario de pireno-poli (C) cuando éste hibrida con poli (I)</b> .....	116
<b>III. 4. 5. Variación de la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario en la hibridación de pireno-poli (C) con poli (I)</b> .....	129
<b>III. 4. 6. Influencia de la polaridad del disolvente en la posición del espectro del cloruro de piresulfonilo</b> .....	131
<b>III. 4. 7. Influencia del brazo espaciador de la marca fluorescente en el <i>quenching</i> de la fluorescencia del pireno cuando poli (C) hibrida con poli (I)</b> .....	133
<b>III. 4. 8. Influencia de la composición de la disolución en la detección fluorescente en estado estacionario de la hibridación de pireno-poli(C) con poli(I)</b> .....	145
<i>III. 4. 8. 1. Detección fluorescente de la hibridación de pireno-poli(C) con poli(I) en presencia de formamida</i> .....	145
<i>III. 4. 8. 2. Detección fluorescente de la hibridación de pireno-poli(C) con poli(I) en presencia de cloruro de tetraetil amoniom (TEACl)</i> ....	147



<i>III. 4. 8. 3. Detección fluorescente de la hibridación de pireno-poli(C) con poli(I) en presencia de etanol</i> .....	149
<i>III. 4. 8. 4. Influencia de la temperatura en la estabilidad de la hibridación de pireno-poli(C) con poli(I) en presencia de sustancias aceleradoras</i> .....	151

**III. 5. RESOLUCIÓN TEMPORAL DE LA FLUORESCENCIA DE LA SONDA DE PIRENO-POLI (C) .....** 153

<b>III. 5. 1. Tiempo de vida de pireno-poli (C)</b> .....	153
---	-----

<b>III. 5. 2. Variación del tiempo de vida de pireno-poli (C) en la hibridación con poli(I)</b> .....	155
---	-----

<b>III. 5. 3. Tiempos de vida de pireno enlazado a poli (C) y del híbrido formado con poli (I) obtenidos con excitación y emisión polarizada</b> .....	163
--	-----

**III. 6. INTERPRETACIÓN CONJUNTA DE LOS DATOS FLUORIMÉTRICOS CON LA SONDA DE PIRENO-POLI (C) .....** 168

<b>III. 6. 1. Relación entre tiempos de vida e intensidad de fluorescencia en estado estacionario</b> .....	168
---	-----

<b>III. 6. 2. Contribución de la anisotropía en estado estacionario, a las intensidades <math>I_{VV}</math> y <math>I_{VH}</math> en estado estacionario</b> .....	171
--	-----

<b>III. 6. 3. Interpretación cualitativa del mecanismo del <i>quenching</i> observado en la hibridación de pireno-poli(C) con poli(I)</b> .....	179
---	-----

<b>III. 7. USO DEL <i>QUENCHING</i> DE FLUORESCENCIA PARA EL ESTUDIO CINÉTICO DE LA HIBRIDACIÓN DE POLI(c) CON POLI(I) .....</b>	<b>181</b>
<b>III. 8. DETECCIÓN DE LA REASOCIACIÓN DE ADN DE <i>E. COLI</i> POR FLUORIMETRÍA EN ESTADO ESTACIONARIO .....</b>	<b>193</b>
<b>III. 9. DETECCIÓN DE LA HIBRIDACIÓN DE cADN HEPÁTICO POR FLUORIMETRÍA EN ESTADO ESTACIONARIO .....</b>	<b>203</b>
<b>III. 9. 1. Ensayos con pireno-cADN .....</b>	<b>203</b>
<b>III. 9. 1. Ensayos con fluoresceína-cADN .....</b>	<b>208</b>
<b>IV. CONCLUSIONES .....</b>	<b>212</b>
<b>V. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>215</b>



# ***INTRODUCCIÓN***



## **I. 1.- OBJETIVOS DEL TRABAJO.**

Las extraordinarias propiedades fisicoquímicas del ADN y ARN, en lo que se refiere a las interacciones entre cadenas complementarias para formar la estructura híbrida, hacen de este proceso una técnica única en la identificación y localización de genes específicos o secuencias asociadas. Por este motivo, las sondas de ADN poseen gran potencial en un amplio rango de aplicaciones, entre las que se pueden destacar la detección de enfermedades infecciosas y genéticas en humanos, animales y plantas, la utilización cada vez mas extensa en medicina forense y el nuevo campo farmacéutico de ARN y ADN antisentido.

El interés que poseen las sondas de ADN ha hecho que se esté realizando un gran esfuerzo para trasladar las técnicas de hibridación desde el laboratorio de investigación hasta el clínico, al objeto de poder diagnosticar enfermedades genéticas y patógenas. Sin embargo, la aceptación de los métodos de hibridación en el laboratorio clínico no está totalmente generalizada debido a los inconvenientes que poseen las sondas radiactivas y enzimáticas, tales como su elevado costo, el escaso tiempo de vida de los reactivos y las dificultades de manejo.

En contraste, las técnicas fluorimétricas que utilizan fluoróforos enlazados a ADN pueden permitir análisis con empleo de reactivos más sencillos y baratos que, además, poseen mayor tiempo de validez reduciendo los problemas de almacenamiento. En adición, la sensibilidad de las propiedades de la emisión de un fluoróforo a los factores ambientales (rendimiento cuántico, tiempo de vida, grado de polarización y transferencia de energía) permiten la posibilidad de desarrollar los denominados análisis homogéneos, en los que se reduce en forma considerable la complejidad del procedimiento al no ser necesaria la separación, mediante tediosos lavados, del exceso de sonda añadida que no resulte hibridada con el ADN objetivo. Como ejemplo, en el inmunoensayo (Watson y col., 1976; Kobayashi y col., 1979; Jolley y col., 1981; Kronick y Grossman, 1983), que es una técnica en estado mas avanzado que las sondas de ADN, se ha demostrado que la tecnología fluorimétrica posee ventajas sobre los métodos convencionales basados en la detección radiactiva o enzimática.



Se han realizado muchas investigaciones relacionadas con el desarrollo de técnicas no radiactivas para detectar hibridaciones de polinucleótidos. De éstas, sólo unas pocas utilizan los métodos fluorescentes, exceptuando las que utilizan fluoróforos en la investigación de secuencias de ADN y en hibridaciones *in situ*, o las que usan intercaladores para observar bandas en geles de electroforesis y algunas metodologías propuestas en la detección de hibridaciones con ARN (Rayburn y Gill, 1987; Cardullo y col., 1988; Mathies y col., 1990), ya que los ácidos ribonucleicos se encuentran en mayor concentración que el ADN y se detectan mejor con las sensibilidades alcanzadas.

El trabajo de investigación llevado a cabo en esta Memoria está dirigido al desarrollo de sondas fluorescentes que posean la suficiente sensibilidad para detectar la hibridación de ácidos nucleicos y que, al mismo tiempo, sean relativamente simples y permitan el análisis en medios homogéneos sin tediosas manipulaciones que requieran de personal especializado. Nuestro mayor esfuerzo se ha dedicado, fundamentalmente, a la elucidación del mecanismo íntimo a través del cual se produce el cambio en la propiedad fluorescente, que permite la detección de la formación de la doble cadena. Finalmente, se comparan las sensibilidades alcanzadas en los múltiples cambios detectados en los mencionados parámetros fluorimétricos y se proponen las diversas actuaciones posibles según sea el fin pretendido en el análisis.

Las sondas de ADN con secuencias específicas de interés son caras y disponibles tan solo en cantidades limitadas. Para mejorar esta situación, se ha utilizado inicialmente un sistema modelo en el cual el ácido polirribocitidílico (poli(C)) se ha elegido como sonda y el ácido polirriboinosínico (poli(I)) se ha escogido como diana. Usando este sencillo sistema como modelo, se han podido examinar con relativa facilidad los procedimientos de marcaje, con distintas etiquetas fluorescentes y se ha comprobado el cambio en los parámetros fluorimétricos de las sondas etiquetadas, después de hibridar con la secuencia diana, al objeto de escoger aquellas que han evidenciado las variaciones más acusadas tras la hibridación y por tanto resultan más sensibles para la detección analítica.

Asimismo, es de destacar que con anterioridad a este trabajo, el marcaje covalente de sondas de ADN con grupos fluorescentes se ha realizado fundamentalmente mediante etiquetados en la posición 5' final, o a través del uso de mononucleótidos fluorescentes que son incorporados posteriormente dentro de la secuencia deseada con un sintetizador comercial de ADN. Estas técnicas utilizan productos químicos de elevado precio lo que



origina que la generación de sondas fluorescentes de ADN sea bastante cara. En la programación de esta investigación, se ha tenido en cuenta el anterior inconveniente por lo que hemos utilizado un etiquetado mediante un procedimiento de transaminación que puede adaptarse a los grupos citosina de las cadenas de ADN. Con este procedimiento ha sido posible etiquetar rápida y económicamente las cadenas de ADN usando productos químicos muy asequibles.



## **I. 2.- BREVE HISTORIA SOBRE EL DESARROLLO DE LAS SONDAS DE ADN.**

Los orígenes de la moderna tecnología con sondas de ADN se remonta a los trabajos iniciales sobre las propiedades mismas del ADN. Así, el potencial de la hibridación de los ácidos nucleicos se detectó por vez primera en 1961 por Hall y Spiegelman cuando demostraron que los híbridos de doble cadena de secuencias complementarias de ácidos nucleicos, se podían formar en presencia de otros ácidos nucleicos no complementarios (Hall y Spiegelman, 1961). Mas tarde se observó que la absorbancia a 260 nm de una disolución de ADN aumentaba aproximadamente un tercio de su valor después de hervida y podía volver a su valor inicial si mencionada disolución era enfriada muy lentamente, mientras que ésto no ocurría cuando el enfriamiento se realizaba de forma rápida. La aparente explicación de estos hechos fue que las cadenas de ADN, previamente separadas por el calentamiento, se vuelven a reasociar por lento enfriamiento, mientras que ésto no sucede cuando el enfriamiento es rápido. Las condiciones que controlan este proceso fueron extensamente examinadas por Marmur y Doty (1961), Britten y Khone (1968) y Wetmur y Davidson (1968). Britten y Khone hicieron sus estudios mediante un método que detecta la hibridación en disolución mediante el posterior aislamiento selectivo de los híbridos en una matriz sólida de hidroxapatito en la que se enlazan preferencialmente los ácidos nucleicos de doble cadena. Marmur y Doty y Wetmur y Davidson llevaron a cabo sus investigaciones midiendo la hipercromicidad a 260 nm.

Así, el interés de la hibridación de ácidos nucleicos como herramienta en la detección e identificación de microorganismos infecciosos se comprobó en los comienzos de la década de 1970 con estudios sobre virus cultivados en células animales. La capacidad de determinar no sólo la fracción del genoma viral presente, sino también de estimar el número de copias virales, provocó la amplia difusión del uso de esta técnica (Gelb y col., 1971). Muchos investigadores reconocieron el enorme potencial de la técnica en la determinación de relaciones genéticas y taxonómicas entre organismos, principalmente microorganismos.

La idea de inmovilizar la cadena simple que constituye una secuencia diana se debe a McCarthy y Bolton (McCarthy y Bolton, 1963; Hoyer y col., 1964), quienes mezclaron las cadenas desnaturalizadas de ADN con agar caliente y dejaron polimerizar la disolución. Posteriormente, utilizaron fragmentos de ADN radiactivamente etiquetados que pueden



difundir a través del agar y formar las estructuras híbridas. Finalmente, la sonda no hibridada se retiraba del soporte por repetidos lavados. La técnica fue sensiblemente mejorada con la utilización de membranas de nitrocelulosa para inmovilizar el ADN diana (Nygaard y Hall, 1963; Gillespie y Spiegelman, 1966; Denhardt, 1966). El uso de estas técnicas de inmovilización, primero por Grunstein y Hogness (1975) para identificar colonias de bacterias y después por Southern (1975), quien separó mediante electroforesis fragmentos de ADN y los transfirió a nitrocelulosa para detectar secuencias específicas, marcó el comienzo de lo que podemos denominar la “edad moderna” de la biología molecular. En la versátil técnica de Southern, el ADN se digiere con enzimas de restricción que dividen específicamente las moléculas de ADN hasta sus secuencias individuales de reconocimiento. Los fragmentos de ADN se separan, por electroforesis, de acuerdo a su tamaño en un gel de agarosa y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o de nylon (Meinkoth y Wahl, 1984). La electroforesis convencional puede separar fragmentos entre 100 y 30.000 pares de bases, mientras que una técnica electroforética más sofisticada, a base de campos pulsantes, puede resolver fragmentos hasta de 200.000 pares de bases (Schwartz y Cantor, 1984; Carle y Olsen, 1985; Chu y col., 1986; Clark y col., 1988). La localización en la membrana de un fragmento de restricción conteniendo un gen particular se determina por hibridación con una sonda específica etiquetada.

Tan importante como la tecnología de inmovilización, fue la producción de sondas de hibridación detectables. Inicialmente se utilizaron los ácidos nucleicos marcados radioactivamente. Estas sondas fueron creadas mediante la simple introducción *in vivo* de precursores etiquetados radiactivamente ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ). En 1970, Kelly y sus colaboradores (Kelly y col., 1970) describieron por primera vez las bases del método de “correr la muesca” (nick-translation) para preparar ADN etiquetado con  $^{32}\text{P}$ , que podía utilizarse como sonda de hibridación. Los detalles exactos del procedimiento no fueron descritos hasta 1977 (Rigby y col., 1977). El método se sigue aún usando para generar sondas de ADN etiquetadas radiactivamente, ya que los oligodeoxinucleótidos sintéticos con marca radiactiva son una clase de sondas muy importantes en la detección de la hibridación y se han sintetizado con una gran variedad de grupos reactivos tales como, aldehído y carboxilo (Kremsky y col., 1987), amino (Connolly, 1987), o sulfidrilo (Zuckermann y col., 1987). El marcaje con radioisótopos ofrece la posibilidad de incorporar varias etiquetas por cada sonda, incrementando así la sensibilidad en la detección. Entre las desventajas de los radioisótopos se pueden incluir, la molesta naturaleza de los métodos de detección, la inestabilidad isotópica, la peligrosidad de su uso, los problemas del suministro,

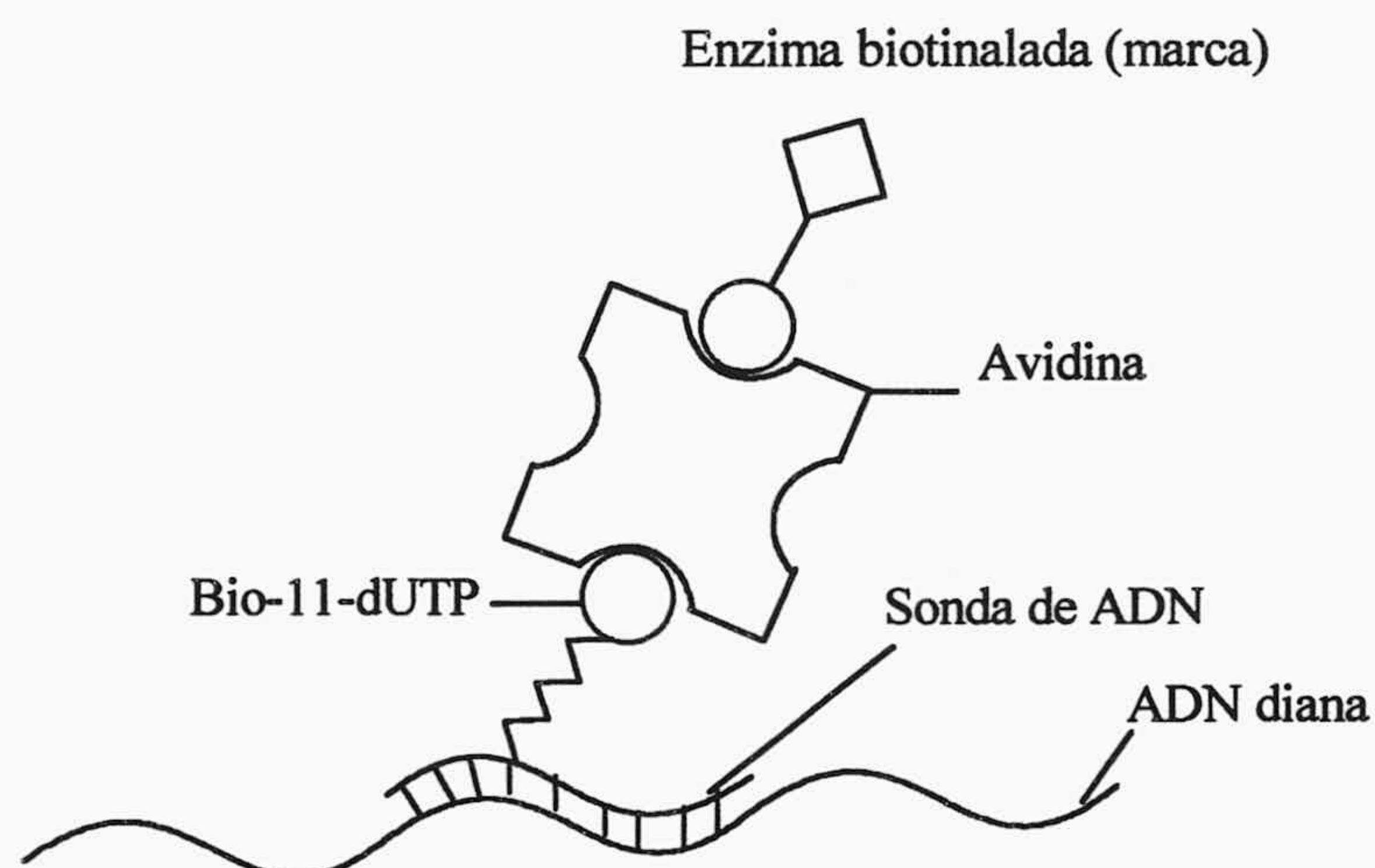


las instalaciones que se precisan y el personal especializado que debe de manipularlos.

El clásico método no radiactivo desarrollado por Ward y colaboradores (Langer y col., 1981; Leary y col., 1983) utiliza una deoxiuridina-5' trifosfato derivatizada químicamente para introducir un grupo alilamino en la posición 5 del anillo pirimidínico. Este grupo amino sirve para, posteriormente, fijar la etiqueta detectable, típicamente un grupo biotina separado del anillo por una cadena de 11 átomos (bio-11-dUTP). Bio-11-dUTP es un sustrato para ADN polimerasa y puede incorporarse en el ADN en lugar del dUTP. Las sondas biotiniladas están muy extendidas ya que mediante la interacción por afinidad, virtualmente irreversible ( $K_D=10^{-15}$ ), de la biotina con conjugados de avidina o estreptoavidina que llevan enlazados enzimas, como peroxidasa o fosfatasas ácida o alcalina, se puede conseguir una gran variedad de sondas sin más que acoplar los citados conjugados a fragmentos adecuados de ADN o a oligonucleótidos sintéticos (ver figura I.1). Ambas avidinas tienen cuatro sitios de enlace para la biotina, por lo que una simple molécula enlazada a ADN puede interactuar con adicionales moléculas de biotina etiquetada. Las enzimas también pueden acoplarse químicamente a los oligonucleotidos (Jablonski y col., 1986; Chu y Orgel, 1988). Estas técnicas permiten una detección con alta sensibilidad, mediante la acción catalítica del enzima sobre un sustrato apropiado. La acción enzimática se detecta posteriormente por la liberación de una especie coloreada o luminiscente, en disolución. Se pueden alcanzar sensibilidades similares a las conseguidas con radioisótopos complejando varias moléculas de enzima a cada sonda (Leary y col., 1983; Sheldon y col., 1986).

Hay múltiples variaciones del método clásico, algunas metodologías utilizan trifosfatos biotinilados de dCTP (Gillam y Tener, 1986) y dATP (Gebeyehu y col., 1987), que son también sustratos para la ADN polimerasa. Estos análogos difieren de los derivados de dUTP en que sus sustituyentes biotinilo están localizados en los átomos de nitrógeno involucrados en la formación de los pares de bases, lo que puede originar inconvenientes en la hibridación dependiendo del grado de sustitución en la sonda de ADN. Estos análogos son especialmente útiles para etiquetar muestras en las que el análogo al dUTP es inapropiado. El análogo al dCTP se prepara cambiando el grupo amino de dCTP por una diamina y seguidamente biotinilando el grupo diamina. Similares cambios pueden realizarse directamente en fragmentos de ADN para introducir, por ejemplo, biotinil-hidrazina (Reisfeld y col., 1987) o etilendiamina. Este residuo puede reaccionar con un éster activo de un compuesto biotinilado de cadena larga (Viscidi y col., 1986).





**Figura I.1.-** Representación esquemática del principio de actuación de una sonda biotinilada.

Otro método directo de introducir grupos biotinilados en los ácidos nucleicos, hace uso del reactivo comercializado con el nombre registrado de Fotobiotina (Forster y col., 1985). El reactivo fotoactivable combina un grupo biotínico, una mitad sensible a la luz y un grupo básico que permite la asociación con polinucleótidos en disolución. La irradiación con luz visible genera un radical altamente reactivo que enlaza covalentemente al polinucleótido.

La sensibilidad de la detección del ADN diana por métodos enzimáticos, tiende a resultar menor que con sondas radiactivas y está altamente limitada por la aparición de considerable ruido de fondo. Esta aparición no es fortuita sino que es el resultado de catálisis endógenas, o de la contaminación por reactivos enzimáticos incompletamente retirados por los lavados de la muestra. Además, la actividad específica de la sonda nucleotídica también está limitada por el espaciado de los grupos biotínico en la cadena del ADN, ya que para acomodar el diámetro de una molécula de avidina sólo se puede biotínilar un nucleótido de cada 20.

La utilización de fluoróforos también se ha extendido bastante en la detección de los híbridos, ya que aquellos representan una clase de moléculas bastante atractivas para ese fin debido a que son directamente detectables, poseen una estabilidad considerablemente alta (lo que facilita su almacenamiento) y ofrecen la oportunidad de la detección simultánea



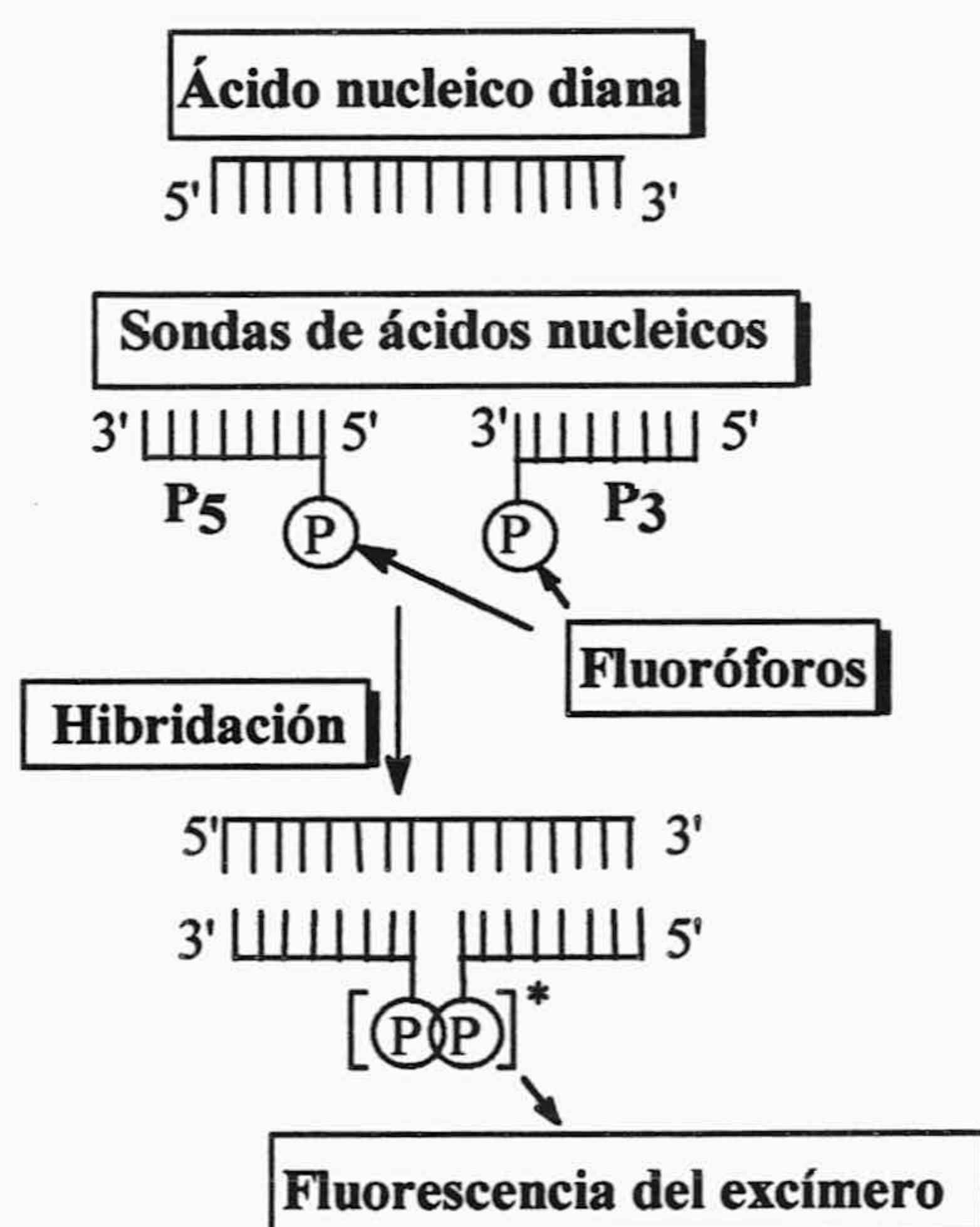
de múltiples sondas, mediante la utilización de diferentes fluoróforos con espectros de emisión discriminables. Se pueden etiquetar con moléculas fluorescentes los mismos cebadores con grupos reactivos que se utilizan en la obtención de deoxinucleótidos radiactivos (Ansorge y col., 1987; Smith y col., 1986), así como introducirlos de forma similar a los grupos biotínico, o mediante conjugados fluoróforo-avidina (Oi y col., 1982; Stryer y col., 1985). Sin embargo, parece extremadamente improbable detectar un sólo grupo fluorescente (o unos pocos), en una molécula de ADN (Mathies y col., 1990). En contraste, los sistemas enzimáticos producen un gran número de moléculas de pigmento detectable por grupo biotínico. Por este motivo, el empleo más usual de fluoróforos ha quedado casi restringido a las denominadas hibridaciones *in situ*, en las que colorantes convencionales como la fluoresceína han proporcionado resultados ventajosos respecto a otras técnicas de detección (Backer y Wichman, 1990; Ricroch y col., 1992).

Mediante el uso de microesferas de poliestireno cargadas se pueden enlazar varias moléculas fluorescentes al final de un oligonucleótido sintético (Kremsky y col., 1987). Las microesferas no tienen color y no se visualizan en el microscopio, pero retienen fluoróforos lipófilos y proporcionan polinucleótidos altamente etiquetados con el colorante fluorescente.

La introducción de fluoróforos en las sondas se puede conseguir mediante reacción química (Ruth, 1984; Smith y col., 1985; Connolly y Rider, 1985; Connolly, 1987; Kristensen y col., 1987; Haralambidis y col., 1987) o enzimáticamente (Prober y col., 1987). En general la detección de grupos orgánicos fluorescentes no es lo suficientemente sensible para aplicaciones diagnósticas de ADN, aunque la moderna introducción de los métodos de amplificación (PCR) (Saiki y col., 1985; Saiki y col., 1986; Saiki y col., 1988) como una metodología previa rutinaria, hace que la fluorescencia se considere en la actualidad como una alternativa de futuro respecto a otros métodos de detección. En contraste, la fluorescencia debida a quelatos de iones metálicos de tierras raras, tales como europio o terbio, pueden detectarse, en inmunofluoroensayos, a niveles similares a los alcanzados con enzimas (Soiri y Kojola, 1983; Diamandis, 1988; Oser y col., 1988). Debido al amplio tiempo de vida de fluorescencia de estos iones metálicos respecto a la mayoría de especies fluorescentes, la detección se puede efectuar mediante resolución temporal de la fluorescencia con la ventaja de presentar bajo ruido de fondo, ya que la fluorescencia intrínseca de cualquier especie que se encuentre en la muestra biológica, habrá decaído prácticamente a cero, mucho antes de que se detecte la señal debida a estos iones metálicos.



No obstante lo anteriormente citado, casi ningún método de interés analítico, basado en la medida directa de la fluorescencia (u otra cualquier forma de detección), ha sido propuesto para detectar la hibridación de ADN o ARN en **disoluciones homogéneas**, si excluimos unos pocos trabajos recientemente publicados, como el de Yguerabide y Ceballos (1996), que emplea la exaltación de la señal fluorescente del bromuro de etidio cuando se intercala en la doble cadena de ADN y el de Ebata y col. (1995) que utiliza como señal fluorescente detectable, la que emiten los excímeros del pireno, que se forman cuando dos cadenas simples de ADN, cada una marcada con el mencionado fluoróforo en los terminales adyacentes (ésto es en 5' y en 3'), hibridan ambas con la cadena diana complementaria (figura I.2).



**Figura I.2.-** Representación esquemática de la detección de la hibridación mediante la formación de excímeros del pireno.

El extraordinario potencial completamente reconocido de la hibridación de ácidos nucleicos, ha provocado que se hayan desarrollado, en las tres últimas décadas del siglo actual, una enorme cantidad de sondas detectables y está fuera del ámbito de esta Memoria la descripción detallada de todas las técnicas utilizadas. Excelentes descripciones se pueden encontrar en un buen número de revisiones y manuales de laboratorio como el de



Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989), el de Symons (1989), o el de Hames y Higgins (1985). La mayoría de las técnicas comercialmente disponibles y más utilizadas en la actualidad, emplean enzimas para etiquetar la sonda deseada y la detección se realiza mediante colorimetría de un sustrato apropiado. Esta profusa aparición de “kits” comerciales refleja el gran esfuerzo que se está realizando para trasladar las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos fuera del ámbito del laboratorio de investigación e introducirlas en el ámbito clínico para el diagnóstico de enfermedades patógenas y genéticas. Sin embargo, se debe destacar que la utilización de sondas enzimáticas conlleva una manipulación tediosa que necesita la presencia de personal altamente especializado, lo que implica que, actualmente, muchos laboratorios estén dedicando grandes esfuerzos en la puesta a punto de técnicas mas sencillas que permitan la mejor detección de la hibridación.



### **I. 3. ETIQUETADO COVALENTE DE PROTEÍNAS Y ÁCIDOS NUCLEICOS CON FLUORÓFOROS.**

La fluorescencia es una técnica sensible para detectar materiales biológicos. Barak y Webb han demostrado que se puede detectar una cantidad tan pequeña como 30 moléculas de colorante fluorescente, enlazadas a lipoproteínas de baja densidad (LDL) en superficies celulares, por microscopía de fluorescencia usando una vídeo cámara sensible (Barak y Webb, 1981). Con métodos mas sofisticados aún, se ha intentado detectar una sola molécula fluorescente (Dovich y col., 1984; Peck y col., 1989; Wilkerson y col., 1993). Ya que ésta sensibilidad se puede combinar con la facilidad de utilización de las técnicas fluorescentes y con el potencial empleo en el análisis de múltiples parámetros, la fluorescencia está siendo ampliamente usada en biología y medicina (Wang y Taylor, 1989; Brelje y col., 1993; Mason, 1993; Haugland, 1996). En este epígrafe se expondrán, en una forma ordenada y sintética, las estrategias que se utilizan en la actualidad para etiquetar ácidos nucleicos y proteínas con fluoróforos, sin embargo, para un mayor detalle se pueden consultar varias revisiones (dePetris, 1978; Haugland, 1983, 1996; Brinkley, 1992).

La mayor parte de los ensayos con sondas de ADN se realizan hoy en día mediante la inmovilización del material que va a ser analizado en un soporte sólido, como las membranas de nitrocelulosa o de nylon y luego se prueban las secuencias deseadas mediante la inmersión de la membrana en una disolución que contenga la sonda y otros reactivos que faciliten la formación del híbrido sonda-diana. El exceso de sonda no hibridada debe de retirarse mediante repetidos lavados que deben de eliminar también las uniones no específicas de la sonda. Si se usan métodos indirectos para la detección, se deberán realizar incubaciones adicionales con el agente secundario que contiene el material detectable. Muchas veces, los resultados se oscurecen por problemas de enlaces no específicos de la sonda, del detector secundario (si éste es usado), o por ambos a la vez. En adición, la inmovilización de la cadena diana hace mas lenta la velocidad de hibridación (lo se puede compensar añadiendo concentraciones más altas de sonda) y también reduce significativamente la cantidad de la cadena diana disponible para la hibridación.

Si bien en el epígrafe anterior han quedado ya expuestas de forma implícita, las dos categorías en que se pueden dividir las estrategias de marcaje usualmente utilizadas para obtener proteínas o ácidos nucleicos etiquetados con fluoróforos, son:



- ① Marcaje directo, mediante el cual la etiqueta detectable está unida directamente a la sonda a través de una unión directa (generalmente un enlace covalente).
- ② Marcaje indirecto, donde un hapteno está unido a la sonda y se detecta por el uso de una proteína marcada (por ejemplo biotina=hapteno; avidina=proteína marcada).

### I. 3. 1. Esquemas de derivatización de polinucleótidos para su posterior marcaje.

Las reacciones de etiquetado fluorescente más comunes utilizan grupos amino primarios en la biomolécula diana y los candidatos más usuales son los residuos lisina en proteínas y grupos alquilamino en ácidos nucleicos derivatizados. También los grupos sulfidrilo, tales como los residuos cisteína en las proteínas y tioles en ácidos nucleicos modificados, son buenos candidatos para una posterior reacción de etiquetado con iodoacetamidas, haluros orgánicos, maleimidas y a través de reacciones de intercambio disulfuro (ver figura I.4). Los grupos hidroxilo de las biomoléculas también pueden reaccionar con isotiocianatos y ésteres activos de fluoróforos adecuados, sin embargo son menos reactivos que las aminas primarias por lo que las reacciones de etiquetado deben realizarse en condiciones muy estrictas y conllevan un gran tiempo de reacción (Brinkley, 1992; Haugland, 1996).

Como se ha indicado en el párrafo anterior, los ácidos nucleicos han de ser derivatizados como paso previo al etiquetado. La mayoría de los métodos de modificación de los ácidos nucleicos proporcionan derivados de los tipos generales que se indican en la figura I.3.

- ① Derivatización terminal. Las aminas alifáticas primarias se pueden conjugar en el grupo 5'-fosfato de un oligonucleótido utilizando una reacción estándar (fosfaramidita). Los productos activados mediante la inclusión de dichas aminas están disponibles en el mercado y se expenden con espaciadores de 2, 3, 6 ó 12 átomos de carbono entre el oxígeno-5' y el grupo amino. Los tioles-5' también están disponibles comercialmente. Alternativamente, se puede realizar el marcaje en el extremo 3'. Según Jameson y Sawyer (1995), el marcaje en el extremo 5' con dansilo conectado a través de un brazo espaciador de 6 carbonos no afecta al punto de fusión ( $T_m$ ) del duplex ni al grado de hipercromicidad observado.

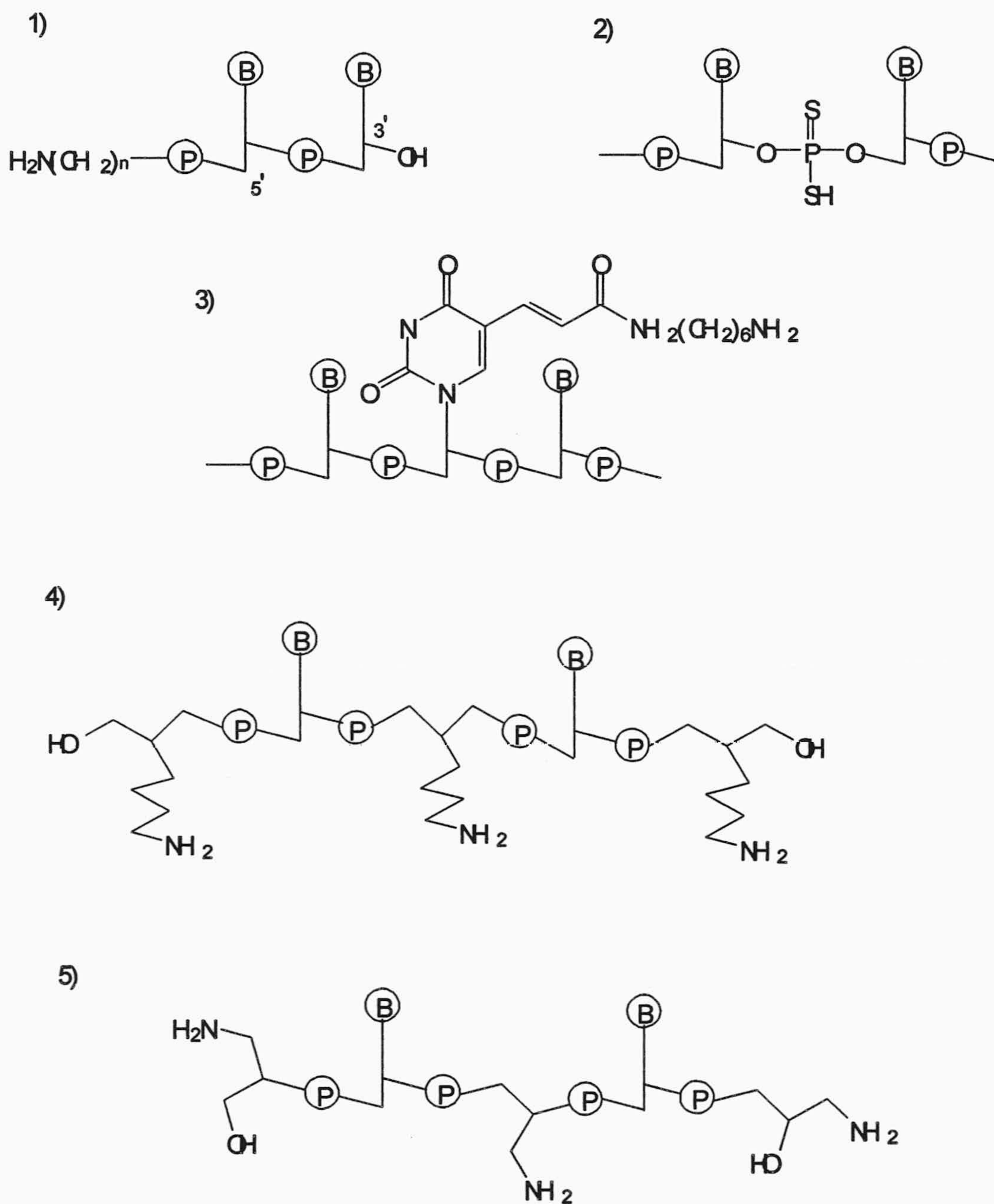


② Derivatización en el fosfato internucleótido. La síntesis de deoxinucleótidos 3'-fosforotioamidita, su incorporación en ADN utilizando un sintetizador de oligonucleótidos comercial y la subsiguiente alquilación, han sido extensamente revisados por Caruthers y col. (1995).

③ Derivatización en las propias bases. Haralambidis y col. (1987, 1990a, 1990b) han preparado deoxiuridinas sustituidas en la posición C-5 portadoras de un grupo amino alifático primario. Este tipo de modificación permite la incorporación de brazos espaciadores de variada longitud. Gibson y Benkovic (1987) han descrito la preparación de derivados fluorescentes de la 5-aminopropil deoxiuridina, que han sido empleados para estudiar la interacción del fragmento Klenow de la polimerasa I del ADN de *E. coli* con ADN (Gibson y Benkovic, 1987; Allen y Benkovic, 1989; Allen y col., 1989). Timidinas amino-modificadas, con distintos brazos espaciadores están disponibles comercialmente. Shapiro y col. (1970) han descrito y utilizado la transaminación del grupo amino en la posición N<sup>4</sup> de los residuos citosina de los ácidos nucleicos con etilendiamina, usando una reacción de intercambio catalizada por bisulfito.

④ Derivatización internucleótido. El reemplazamiento de un nucleósido por un puente de 2 ó 3 átomos de carbono entre el 3'-fosfato de un nucleótido y el 5'-fosfato del siguiente nucleótido, permite conservar la distancia interfosfato. El puente transporta un brazo aminoalquilo que puede conjugarse a una molécula fluorescente. Este método tiene la desventaja de que se reemplaza un nucleótido por un grupo extraño.





**Figura I.3.-** Tipos de modificaciones en los oligonucleótidos, para su posterior conjugación con fluoróforos: 1) Derivatización terminal en 5', 2) Derivatización en el fosfato internucleótido, 3) Derivatización en una base (timina amino-modificada) y 4) y 5) Derivatización internucleótido.



### **I. 3. 2. Tipos principales de reacciones de etiquetado con fluoróforos.**

Como antes se indicó, las reacciones de etiquetado mas comunes utilizan grupos amino primarios en la macromolécula diana, aunque muchos autores han utilizado grupos hidroxilo o sulfidrilo, presentes o introducidos previamente, en la macromolécula.

Las reacciones con ésteres activos de succinimidilo y con isotiocianatos, son relativamente específicas para grupos amino primarios, asimismo son fácilmente controlables y se completan en un periodo de unos pocos minutos (dePetris, 1978; Brinkley, 1992; Mujumdar y col., 1993; Haugland, 1996) . La reacción de etiquetado con los ésteres de succinimidilo, compite favorablemente con la hidrólisis del éster activo, aunque las velocidades de ambas reacciones dependen del pH. Así, un valor de pH alto favorece la forma R-NH<sub>2</sub> que reacciona bien con los ésteres activos de los fluoróforos. Si se disminuye el pH se origina la forma no reactiva R-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. La mayoría de las reacciones con ésteres activos, se llevan a cabo entre pH 8'5 y 9'5 y durante un periodo temporal que oscila entre unos 15 minutos y varias horas. Cuando se utilizan los derivados isotiocianato de fluoróforo como reactivo, se pueden realizar similares consideraciones sobre los intervalos de pH y tiempo, aunque en general, los ésteres reaccionan mas rápidamente que los isotiocianatos.

Los cloruros de sulfonilo también son muy reactivos con las aminas primarias (Titus y col., 1982). Los enlaces formados usando ésteres activos y cloruros de sulfonilo son muy estables y resulta absolutamente esencial que no haya ningún otro componente con grupos amino primarios en el medio de reacción. En algún caso aislado, se han utilizado también derivados diclorotriazina del fluoróforo (Blakeslee y Baines, 1976).

Los grupos hidroxilo de la macromolécula diana, son menos reactivos con ésteres de succinimidilo e isotiocianatos, aunque generalmente las reacciones se pueden llevar a cabo con éxito bajo condiciones apropiadas, que incluyen un largo tiempo de reacción. Los cloruros de sulfonilo e isotiocianatos son más reactivos con los grupos hidroxilo, que los ésteres de succinimidilo.

Los grupos sulfidrilo introducidos en los ácidos nucleicos modificados, pueden etiquetarse con iodoacetamidas, haluros orgánicos, maleimidias y a través de reacciones de intercambio disulfuro (Brinkley, 1992; Haugland, 1996). Estos compuestos reaccionan bien con los tioles en el intervalo fisiológico de pH (6'5-8'0), la reacción resulta mucho menos



efectiva con los grupos amino, que están protonados en el citado intervalo de pH. En la figura I.4 se exponen ejemplos de éstas reacciones, así como de las anteriormente mencionadas.

La reacción de intercambio disulfuro proporciona un método especialmente útil en el etiquetado de ácidos nucleicos con proteínas y ha sido utilizada recientemente por nuestro grupo de investigación para etiquetar C-ficocianina y aloficocianina (dos proteínas con alto rendimiento cuántico de fluorescencia) a polinucleótidos sintéticos (Bermejo y col., 1997).

Una vez etiquetado el polinucleótido (o la proteína), la purificación del material fluorescente se alcanza mediante simple precipitación del ácido nucleico en medio alcohólico, o de forma más general por elución cromatográfica a través de una columna de filtración por gel (Brinkley, 1992; Mujumdar y col., 1993; Talavera y col., 1997).



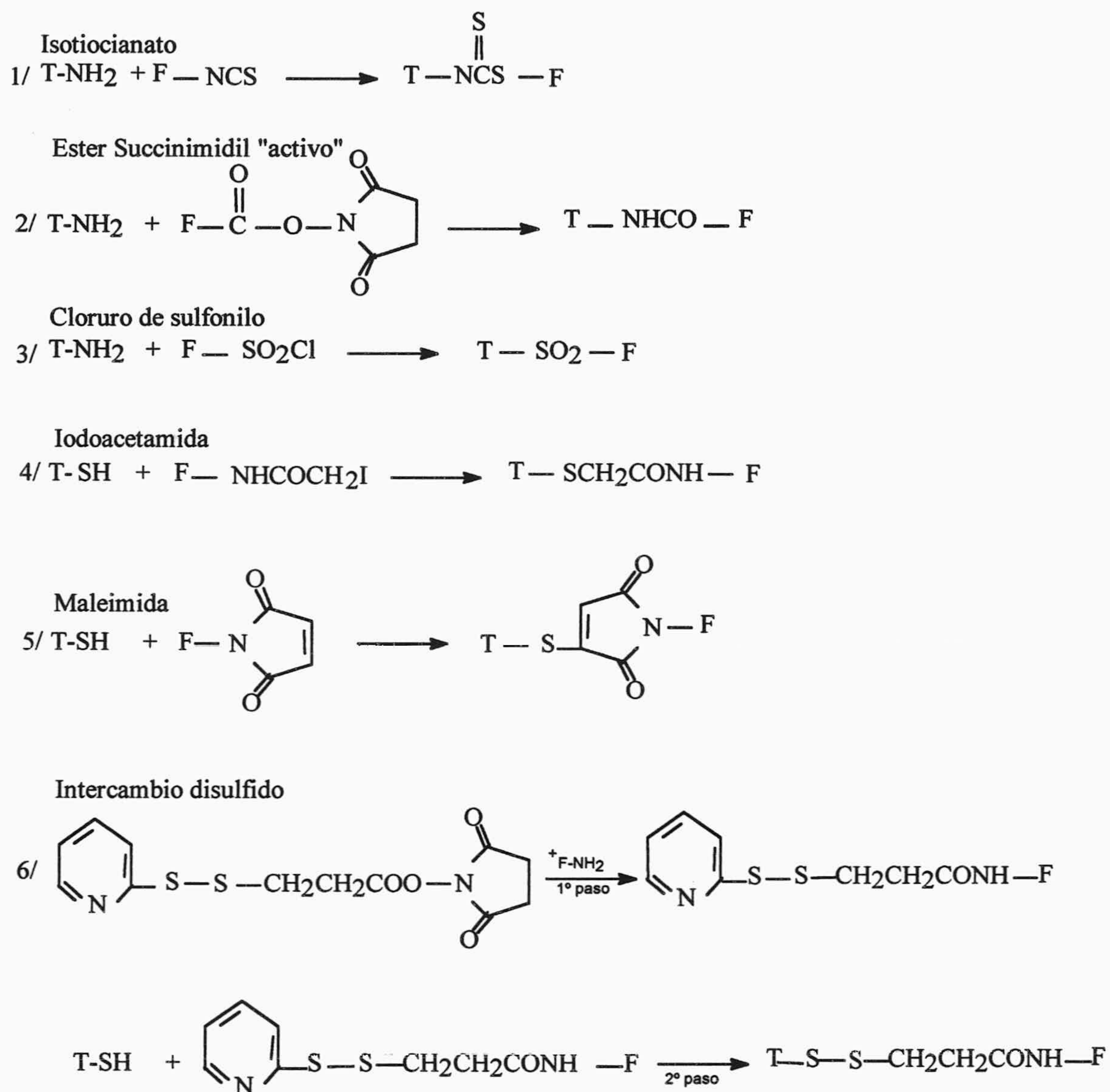


Figura I.4.- Esquemas de las reacciones de etiquetado con fluoróforos, mas usuales.



### I. 3. 3. Determinación de la extensión del etiquetado.

Bajo condiciones ideales, la medida del tanto por ciento de etiquetado se alcanza por espectroscopía de absorción UV-Vis. Para ésto se debe de conocer el coeficiente de extinción del fluoróforo a 260 nm (o 280 nm en el caso de proteínas) y a la longitud de onda de su máximo de absorción. Estos coeficientes se deben de calcular para el fluoróforo en su forma conjugada, mejor que en su forma reactiva, dado que se pueden originar cambios espectrales en la reacción de etiquetado. Si sucede ésto, se debe de recurrir a una previa hidrólisis cuantitativa del fluoróforo, seguida de la determinación de la concentración, tras una eficaz separación de la macromolécula por alguno de los métodos anteriormente comentados. Posteriormente, con estos datos se calculan los coeficientes de extinción del conjugado, que servirán para ulteriores cálculos, mediante la siguiente expresión general:

$$\% \text{ etiquetado} = \% \frac{[F]}{[N]} = \frac{A_{\max} \cdot \epsilon_{260}^N}{\epsilon_{\max}^F \cdot (A_{260} - A_{\max} \frac{\epsilon_{260}^F}{\epsilon_{\max}^F})} \cdot 100 \quad (1)$$

en donde [F] es la concentración de fluoróforo en moles·L<sup>-1</sup>, [N] es la concentración de polinucleótido expresada en moles·L<sup>-1</sup> de la base citosina, A<sub>260</sub> y A<sub>max</sub> son las absorbancias del conjugado a 260 nm y a la longitud de onda del máximo de absorción del fluoróforo, respectivamente;  $\epsilon_{260}^N$  y  $\epsilon_{260}^F$  son los coeficientes de extinción molar del ácido nucleico y fluoróforo, respectivamente, a 260 nm y  $\epsilon_{\max}^F$  es el coeficiente de extinción molar del fluoróforo a la longitud de onda de su máximo de absorción. En la ecuación (1) se ha considerado que el ácido nucleico no presenta absorción apreciable a la longitud de onda del máximo de absorción del fluoróforo y que el paso de luz a través de la célula de absorción es de 1 cm.

### I. 3. 4. Antecedentes sobre las reacciones utilizadas en esta Memoria para derivatizar los nucleótidos y etiquetarlos con fluoróforos de interés.

Para determinar la estrategia mas conveniente de etiquetar polinucleótidos con fluoróforos de interés, se han explorado los distintos esquemas de modificación, de entre los variados métodos utilizados hasta ahora por los diferentes autores y que han sido descritos en el anterior epígrafe I. 3. 1. En la revisión efectuada, nuestro criterio de elección



ha sido que el esquema de la modificación cumpla con determinados requisitos que simplifiquen el desarrollo del proyecto de investigación en que se encuadra el presente estudio, a saber: que el esquema de modificación sea simple y aplicable a todos los tipos de ácidos nucleicos; que permita el etiquetado con fluoróforos muy distintos; que se utilicen reactivos e instrumentación económicamente asequibles y muy especialmente que el fluoróforo pueda resultar afectado directamente por el ácido nucleico diana cuando se produzca la hibridación. De todas las metodologías revisadas, se ha escogido el ataque nucleofílico en el doble enlace 5-6 de la base citosina, como una modificación que cumple adecuadamente con las anteriores condiciones autoimpuestas.

Shapiro y col. (1970) han descrito que el anión bisulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) es capaz de unirse reversiblemente al doble enlace 5-6 del uracilo y de la citosina. Lo más importante de la citada reacción es que en disoluciones acuosas el aducto de citosina-bisulfito puede sufrir una desaminación y convertirse en uracilo, mediante el ajuste del pH a 10. Además, mostraron que ciertas aminas pueden competir con el agua como un nucleófilo para el aducto de citosina-bisulfito y que el grupo amino de la posición  $\text{N}^4$  puede substituirse por otras pequeñas aminas orgánicas. Hayatsu (1976) describió que la semicarbazida ( $\text{NHNHCONH}_2$ ) podía transaminar eficazmente residuos citosina en cadenas individuales de ADN y que la reacción era específica sólo para residuos de citosina no apareados. Esta modificación introduce un grupo amino libre, en donde se puede alcanzar la posterior adición de otros grupos de interés mediante el uso de reactivos específicos del grupo amino. Draper y Gold (1980) y Draper (1984), han estudiado la transaminación catalizada por bisulfito de los restos de citosina con varias aminas, mostrando que las alquildiaminas reaccionan casi completamente bajo condiciones apropiadas. Otros autores han usado la técnica de transaminación para unir grupos variados a polinucleótidos (Grunstein y Hogness, 1975; Southern, 1975; Kelly y col., 1970).

En lo que se refiere al etiquetado fluorescente de nucleótidos modificados por transaminación, Reines y Shulman (1979) mostraron que los residuos citosina modificados con carbohidrazida en tARN se pueden etiquetar con gran eficiencia mediante el empleo de isotiocianato de fluoresceína. Nosotros hemos usado un procedimiento similar para introducir fluoresceína y pireno en los residuos citosina modificados previamente por transaminación con etilendiamina.

Por otra parte, Liu y col. (1981), han descrito un sencillo método para etiquetar



inmunoglobulina A humana, IgA, con cloruro de sulfonil pireno. Anteriormente, se había utilizado esta reacción para etiquetar IgG con otros cloruros de ácido (Tumerman y col., 1972; Liu y col., 1977; Dudich y col., 1978). Esta reacción ha sido posteriormente muy utilizada para obtener sondas fluorescentes covalentemente ligadas a proteínas. Nosotros hemos utilizado una variante de esta metodología, cuando el empleo de los isotiocianatos no fue conveniente. Así, se han utilizado los cloruros de sulfonilo de fluoróforos de interés, como ha sido en el caso de pireno, antraceno y dansilo.



#### **I. 4. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA HIBRIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS EN DISOLUCIÓN.**

La hibridación de ácidos nucleicos ha sido una técnica esencial en el avance del conocimiento de la estructura y función de los genes. El análisis cuantitativo de la hibridación se viene utilizando en muchas áreas de trabajo y es importante conocer las bases teóricas y experimentales que han permitido la interpretación de la hibridación en disolución.

La reasociación de ácidos nucleicos implica la incubación de cadenas simples de nucleótidos bajo condiciones experimentales determinadas de fuerza iónica y temperatura que permiten el apareamiento de bases para formar la doble cadena del ácido nucleico. El experimento más simple que se puede realizar es la desnaturalización y subsiguiente reasociación (renaturalización) de una doble cadena perfectamente apareada. El evento inicial en la reasociación es una reacción de nucleación entre dos nucleótidos complementarios de cadenas opuestas. Antes de que se produzca el apareamiento correcto de las bases tendrán lugar muchos de tales eventos, aunque si éste ocurre la reacción continuará mediante un rápido proceso de formación de la doble cadena. El primer modelo matemático de este proceso fue desarrollado por Wetmur y Davidson (1968), demostrándose que efectivamente el paso limitante de la velocidad es la reacción inicial de nucleación y que el proceso subsiguiente de formación de la doble cadena es muy rápido.

Si las cadenas de ADN están intactas, cada nucleación correcta provocará una molécula completa de cadena doble. Sin embargo, a menos que el ADN a reasociar se haya obtenido de un genoma relativamente pequeño, es necesario romper las moléculas hasta un tamaño que permita una renaturalización eficaz. Cuando reasocian las moléculas de ADN rotas al azar, se formarán dobles cadenas con tallos de cadenas simples. Estos tallos, a su vez, podrán participar en reacciones intermoleculares lo que originará grandes moléculas formando una especie de malla. La presencia de tallos simples es un factor importante a tener en cuenta y limita la técnica que se puede usar en la cuantificación de la hibridación, ya que algunas técnicas, como la cromatografía en hidroxapatito, mide como molécula reasociada completa, la que incluye los mencionados tallos simples.



Si el ADN ha sido roto al azar, la concentración de fragmentos con una secuencia particular es inversamente proporcional al tamaño del genoma. Una consecuencia importante de esto es que la velocidad de la reacción de reasociación entre tales cadenas es inversamente proporcional al tamaño del genoma. Esto fue observado por Wetmur y Davidson (1968) y Britten y Kohne (1968), quienes encontraron que la reasociación en ADN de células eucarióticas era multicomponente, debido a la presencia de secuencias repetidas. En orden a simplificar la interpretación de experimentos de reasociación de ADN, Wetmur y Davidson (1968) introdujeron la noción de complejidad en la secuencia de bases, que es el número total de pares de bases en secuencias no repetitivas del ADN. Así, en el caso de virus o bacterias, para los que parece que hay pocas secuencias repetidas, la complejidad es el número de pares de bases en el cromosoma viral o bacteriano. La relación entre la complejidad en secuencia de bases y velocidad de reacción, es fundamental tanto en la reasociación como en la hibridación. El propósito de muchos experimentos de reasociación de ácidos nucleicos ha sido determinar la complejidad en la secuencia de bases, por comparación de la velocidad de reacción de los ácidos nucleicos de interés con la de un ácido nucleico de complejidad conocida en su secuencia de bases.

Al objeto de interpretar correctamente los datos experimentales, es necesario construir un modelo matemático de la reasociación de ácidos nucleicos. La aproximación mas simple es usar la cinética de segundo orden que describe una reacción bimolecular entre dos componentes, en este caso las dos cadenas complementarias que forman la doble hélice.

#### **I. 4. 1. Aplicación de la teoría cinética de segundo orden a la reasociación de ácidos nucleicos.**

Consideremos en primer lugar la reacción bimolecular irreversible entre dos componentes que se denotan por R y D, que reaccionan para formar un producto denotado por H, esto es:



En una reacción bimolecular la velocidad de formación del producto es:

$$\frac{d[H]}{dt} = k \cdot [R] \cdot [D] \quad (2)$$



Al comienzo de la reacción,  $t=0$ , los componentes tienen la concentración  $[R]_0$  y  $[D]_0$  mientras que al tiempo  $t$  la concentración será,  $[R]=[R]_0-[H]$  y  $[D]=[D]_0-[H]$ . Sustituyendo en la ecuación (2) y reordenando,

$$\int \frac{d[H]}{([R]_0 - [H])([D]_0 - [H])} = \int k \cdot dt + Q \quad (3)$$

en donde  $Q$  es la constante de integración.

Resolviendo la integral de la ecuación (3) podremos expresar  $[H]$  como una función del tiempo:

$$[H] = \frac{[R]_0[D]_0(1 - e^{([D]_0 - [R]_0)kt})}{[R]_0 - [D]_0 \cdot e^{([D]_0 - [R]_0)kt}} \quad (4)$$

La forma general de la reacción de segundo orden descrita por la ecuación (4) es aplicable a la hibridación en general de los ácidos nucleicos, pero se pueden hacer dos simplificaciones. En primer lugar cuando se realiza un experimento de hibridación entre ARN y ADN, uno de los componentes suele estar en gran exceso sobre el otro (usualmente el ARN). La otra simplificación se alcanza en el caso de que la aplicación se haga a la reasociación de ácidos nucleicos, o simplemente, que las dos concentraciones de las cadenas complementarias sean iguales.

① Si uno de los componentes está en gran exceso sobre el otro, por ejemplo:  $[R]_0 \gg [D]_0$ , la ecuación (4) se reduce a:

$$[H] = [D]_0(1 - e^{-k[R]_0 t}) \quad (5)$$

que corresponde a una reacción de pseudo primer orden y describe adecuadamente cualquier proceso de segundo orden, cuando la concentración de un componente es 20 veces o más, que la del otro. En la figura I.5-a se ilustra el curso de una reacción típica con el tiempo, según la ecuación (5). Se trata de una representación semi-logarítmica que permite visualizar la formación del %H, en función del  $\log([R]_0 \cdot t)$  y resulta muy conveniente en reacciones de hibridación, ya que de esta forma se eliminan las diferencias en la velocidad de reacción debidas a las diferentes concentraciones iniciales de  $[R]$ . De hecho, este tipo de



reacciones se caracterizan usualmente por el término  $[R]_0 \cdot t_{1/2}$ , que es igual al valor de  $[R]_0 \cdot t$  cuando ha transcurrido el 50% de la reacción. Como se puede observar, de la ecuación (5) se deduce que  $[R]_0 \cdot t_{1/2} = \ln 2/k$ , por lo que una medida de  $[R]_0 \cdot t_{1/2}$  es una medida de la constante de velocidad  $k$ .

② Si las concentraciones iniciales de ambos componentes son iguales, como sucede en las reacciones de reasociación, la ecuación de velocidad es:

$$\frac{d[H]}{dt} = k \cdot ([D]_0 - [H])^2 \quad (6)$$

en donde se ha representado por  $[D]_0$ , la concentración inicial de ambos componentes. La integración de la ecuación (6), proporciona:

$$[H] = [D]_0 \frac{k[D]_0 t}{k[D]_0 t + 1} \quad (7)$$

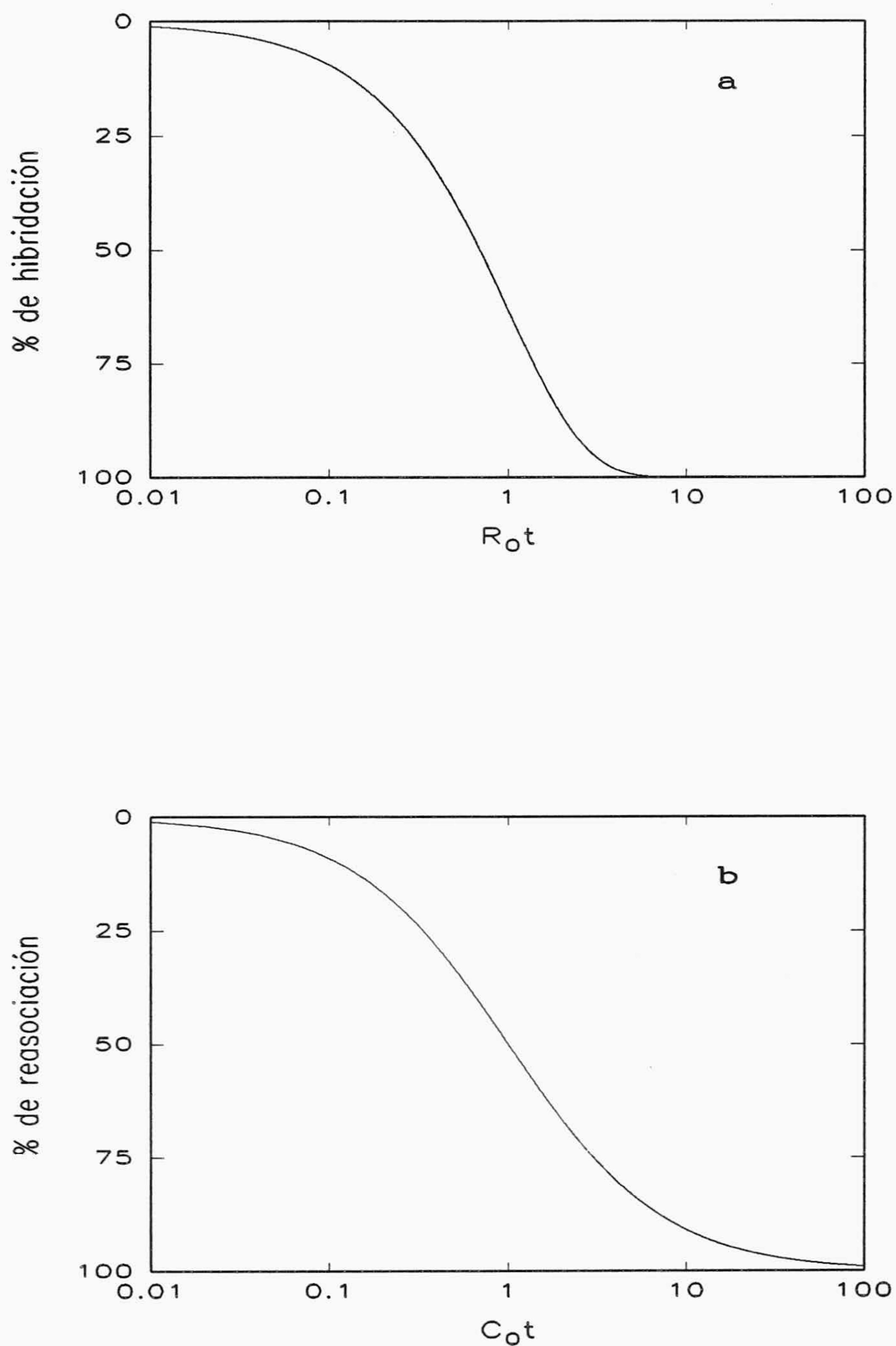
Usualmente, este caso especial de ecuación de segundo orden, se aplica a la reasociación de ADN, ya que entonces está asegurado que la concentración inicial de las dos cadenas es la misma, si procedían de ADN en su forma nativa.

Tradicionalmente, se sigue el convenio adoptado por Britten y Kohne (1968), en el que se representa por  $C_0$  la concentración total de ADN (que coincide con la inicial de cada cadena simple) y la concentración de moléculas de cadena simple por  $C$ , con lo que la ecuación (7) se reduce a:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + kC_0 t} \quad (8)$$

Así, las reacciones de reasociación se caracterizan frecuentemente mediante el término  $C_0 t_{1/2}$ , que es el valor de  $C_0 t$  para el 50% de la reacción. Típicamente, en reacciones de reasociación, el 80% de la misma ocurre alrededor de dos intervalos de  $\log C_0 t$  (Britten y Kohne, 1968). En la figura I.5-b se ilustra el curso de una reacción de reasociación con el tiempo, según la ecuación (8), en ella se observa que el perfil de la reacción es simétrico, lo que contrasta con la de pseudo primer orden, cuyo perfil resulta asimétrico (figura 5-a).





**Figura I.5.-** Representaciones semilogarítmicas típicas de reacciones de hibridación.  
a) reacción de pseudo primer orden, originada cuando uno de los componentes está en gran exceso. b) reacción de segundo orden, con iguales concentraciones iniciales de ambos componentes.



#### **I. 4. 2. Factores que afectan a la velocidad de reacción y a la estabilidad de la doble cadena.**

La velocidad a la que las cadenas simples complementarias forman la doble cadena estable, depende de varios factores. Los más importantes son, la temperatura, la longitud de los fragmentos, la composición de éstos en bases nucleotídicas, la fuerza iónica, la viscosidad y la presencia de agentes desnaturizantes.

##### *I. 4. 2. 1. Efecto de la temperatura.*

El efecto de la temperatura fue estudiado por Marmur y Doty (1961), Ross y Sturtevant (1962), Nygaard y Hall (1964), Britten y Kohne (1966) y revisado por Marmur y col. (1963). Los tratamientos teóricos fueron expuestos por varios autores (Saunders y Ross, 1960; Flory, 1961; Kallenbach y col., 1963). Todas las experiencias muestran una dependencia de la velocidad con la temperatura muy bien definida, con una región de máxima velocidad de reasociación a una temperatura entre 20 y 30°C por debajo de la temperatura de fusión de la doble cadena,  $T_m$  ( $T_m$  es la temperatura para un 50% de desnaturización). El amplio margen de este máximo, implica que puede haber alguna variación en la elección de la temperatura, por lo que se ha convertido en usual llevar a cabo las experiencias a  $(T_m - 25)^\circ\text{C}$ .

##### *I. 4. 2. 2. Longitud de la cadena.*

Las consideraciones teóricas de Wetmur y Davidson (1968) predicen que la velocidad de reasociación de ADN debería ser proporcional a la longitud de los fragmentos,  $L$ . Sin embargo sus experiencias demostraron que la velocidad resulta proporcional a la raíz cuadrada de  $L$ . Los autores atribuyen esta diferencia a un efecto de impedimento estérico, ya que cuanto más larga sea la cadena más difícil es, para una segunda cadena, interpenetrar y encontrar sitios complementarios para la nucleación y posterior reasociación.

En la mayoría de experimentos con ADN, la longitud media de las cadenas complementarias es la misma, ya que el ADN se sonica y rompe al azar cuando está en su forma nativa, es decir, antes de desnaturizarlo. En otros experimentos en que se han



reasociado fragmentos de ADN con diferente longitud, se ha observado que la velocidad de la reacción es proporcional a la raíz cuadrada de la longitud del fragmento más corto (Wetmur, 1971). Posteriormente, Hutton y Wetmur (1973) establecieron claramente la anterior observación en la hibridación de ADN con ARN transcrito con polimerasa de *E. coli*.

#### I. 4. 2. 3. Composición en bases.

Han existido algunas discrepancias en el efecto de la composición en bases nucleotídicas, sobre la velocidad de reasociación. Birnsteil y col. (1972) habían encontrado que hay pequeñas diferencias en las velocidades de hibridación de diferentes ácidos nucleicos y esas diferencias las asignaron a la diferente composición en bases. Sin embargo, Bishop (1972) comparó reacciones de hibridación en disolución, entre ADN de *E. coli* (50% G + C) y su cARN y entre ADN de *P. mirabilis* (38% G + C) y su cARN, observando igual velocidad de hibridación en ambos casos. Hutton y Wetmur (1973), posteriormente, demostraron que si se tiene en cuenta el tamaño del genoma y el peso molecular de los fragmentos de ADN, los bacteriofagos ADN T2 (34% G + C) y ADN T7 (50% G + C) tienen la misma constante de velocidad de reasociación. Es decir, parece demostrado que la composición en bases de los ácidos nucleicos tienen poco efecto en las velocidades de los procesos de hibridación y reasociación.

#### I. 4. 2. 4. Efectos del pH y fuerza iónica.

Desde un punto de vista práctico, el efecto más importante encontrado es que, dentro del intervalo de pH entre 5 y 9, la velocidad de renaturalización en disolución 0'4 M en ión sodio, es independiente del pH (Wetmur y Davidson, 1968). Estos autores también mostraron que cuando el pH es lo suficientemente alcalino como para disminuir la  $T_m$ , la velocidad de reasociación decrece, incluso a valor constante de  $T_m - T_r$  ( $T_r$ , es la temperatura de reacción).

El efecto de la fuerza iónica en la velocidad de reasociación se estudió por primera vez por Marmur y Lane (1960) y Britten y Kohne (1966). Al igual que sucede con la temperatura de fusión, por encima de 0'4 M de cloruro sódico, hay sólo un pequeño



aumento de la velocidad de reasociación con el incremento de la concentración salina. Sin embargo, hasta 0'4 M, la velocidad de renaturalización aumenta mucho con el incremento de la fuerza iónica. Este efecto refleja los cambios en las interacciones electrostáticas entre las dos cadenas en disolución. Posteriormente, Wetmur y Davidson (1968) llegaron a una conclusión similar, mostrando que la velocidad depende fuertemente de la concentración de ión sodio hasta 0'4 M y sigue dependiendo de la misma, aunque menos acusadamente, al menos hasta 3'2 M. A concentraciones hasta 0'2 M, aproximadamente, la velocidad parece que es proporcional al cubo de la fuerza iónica (Studier, 1969).

#### *I. 4. 2. 5. Efecto de la viscosidad.*

Subirana y Doty (1966) y Thrower y Peacocke (1966) han observado que el aumento de la viscosidad, mediante la adición de sacarosa a la disolución, decrece la velocidad de renaturalización. Wetmur y Davidson (1968) extendieron estos estudios con otros agentes que aumentan la viscosidad, ya que la adición de tales agentes también cambian la  $T_m$ . En todos los casos, la constante de velocidad de renaturalización resulta inversamente proporcional a  $\eta/T$ .

En otra serie de experiencias en que se han adicionado polímeros como Ficoll o sulfatos de dextrano, la velocidad de reasociación aumenta sensiblemente con la concentración de polímero. Así, la velocidad de renaturalización del fago ADN T2 aumenta unas 4 veces, a pesar de que la viscosidad se incrementa unas 6 veces. Este aumento en la velocidad de reacción es atribuido a la exclusión de un volumen sustancial de disolución por parte del polímero adicionado, lo que provoca un aumento en la concentración efectiva de ADN (Chang y col., 1974).

#### *I. 4. 2. 6. Influencia de la adición de agentes desnaturalizantes.*

La adición de agentes desnaturalizantes, tales como formamida, desestabilizan la doble cadena de los ácidos nucleicos. Así, un aumento del 1% en la concentración de formamida, disminuye la  $T_m$  de ADN nativo en 0'72°C. Este efecto es muy interesante debido a que en la mayoría de casos, la posibilidad de disminuir la temperatura de hibridación resulta beneficiosa. Sin embargo, la adición de estos agentes provoca una



disminución concomitante de la velocidad de reacción. Hay por tanto que decidir entre el beneficio de una menor temperatura de reasociación o la desventaja de una menor velocidad.

Aunque la formamida es el reactivo más popular para reducir la temperatura de reacción (McConaughy y col., 1969; Schmeckpeper y Smith, 1972), existe una variedad amplia de otros agentes desnaturalizantes que se utilizan con los mismos efectos, tales como etilenglicol (Wetmur y Davidson, 1968), perclorato sódico (Chang y col., 1974), cloruro de tetrametilamonio o de tetraetilamonio (Chang y col., 1974) y urea (Britten y col., 1974; Hutton, 1977). El estudio más sistemático del efecto de la formamida en la velocidad de reasociación de ADN ha sido realizado por Hutton (1977), quien demostró que la dependencia de la velocidad de reasociación con la temperatura, se mantiene en disoluciones con formamida.

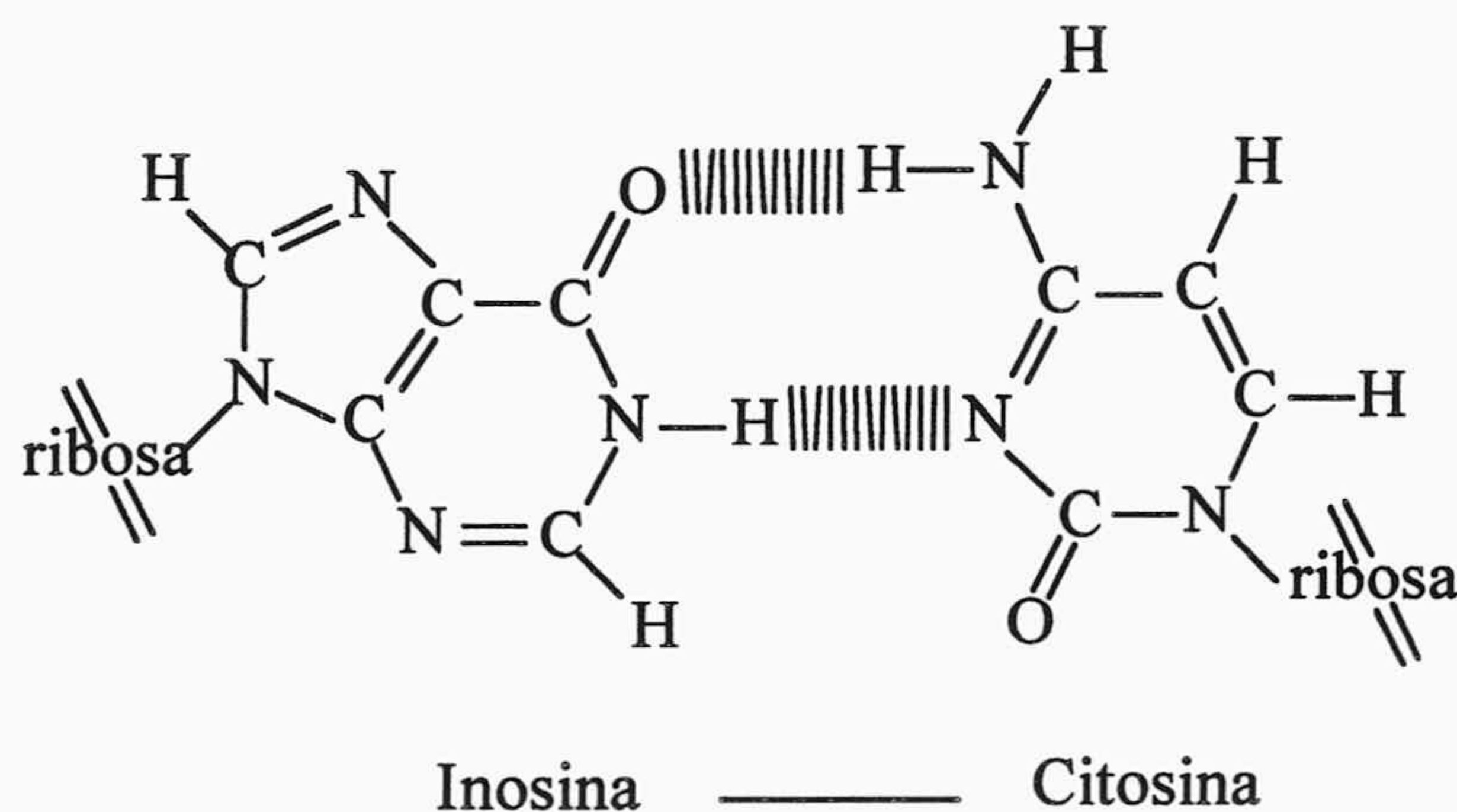
#### I. 4. 3. Características de hibridación del sistema modelo utilizado.

En nuestros estudios hemos utilizado, en primer lugar, un sistema modelo a base de ácido polirribocitidílico, poli (C), etiquetado con diversos fluoróforos, que actúa como sonda y ácido polirribinosínico, poli (I), que es la diana. Este sencillo sistema nos ha servido para desarrollar y verificar diferentes técnicas de detección de la hibridación de los ácidos nucleicos, con relativa rapidez y economía, ya que estos polinucleótidos son fáciles de manejar y se adquieren con facilidad a precios muy asequibles. Además, por tratarse de homopolímeros complementarios, poli (C) y poli (I) hibridan rápidamente en disolución y tienen una baja temperatura de fusión,  $T_m \approx 65^\circ\text{C}$ , lo que facilita estudios rápidos y detallados, necesarios en este tipo de investigaciones, tales como la posible alteración del proceso de hibridación por la extensión del marcaje de la sonda, el cálculo de  $T_m$  una vez modificado el nucleótido (o después de etiquetado), o la cinética de hibridación y la influencia de la concentración salina en la velocidad de la reacción.

Se ha escogido poli (I), como la cadena complementaria del poli (C) para nuestros estudios debido a que el híbrido poli (C)-poli (I) pierde sus características alrededor de los  $65^\circ\text{C}$ , mostrando típicos efectos de hipercromicidad a 260 nm, mientras que una doble hélice de poli (C)-poli (G) (ácido polirriboguanílico) tiene mucha menos estabilidad térmica. Además, a pH neutro el poli (G) puede agregarse, lo cual supone problemas adicionales



para nuestros estudios (Lipsett, 1964; Pochon y Michelson, 1965). La estructura química de poli (I) es la misma que la de poli (G), menos el grupo N<sup>2</sup>-amino. El típico par de bases entre citosina e inosina se muestra en la figura I.6.



**Figura I.6.-** Formación del par citosina-inosina.

#### I. 4. 4. Propiedades físicas de poli (C), poli(I) y del híbrido poli (C)-poli (I).

A pH neutro y a concentración salina milimolar, poli (C) forma un complejo 1:1 con poli (I) (Chamberlin y Patterson, 1965). Poli (C)-poli (I) forman una estructura bihelicoidal con apareamientos Watson-Crick entre los restos citosina de una cadena y los residuos hipoxantina de la otra (Arnott y col., 1973). Los datos de difracción de rayos-X, muestran que el híbrido Poli (C)-poli (I) es una hélice de 11 vueltas del tipo A-ARN que puede experimentar una transición inducida por fuerza iónica, a una hélice de doce pliegues del tipo A'-ARN (Arnott y col., 1973). La principal diferencia entre estas dos hélices es la reducción en la inclinación de las bases. De otro modo, las formas A' y A del ARN son muy similares al A-ADN con cadenas antiparalelas formadas por pares de bases distanciados unos 4 Å del eje de la hélice. Chamberlin y Paterson (1965) estudiaron las series I-C (tanto ribo como desoxirribopolímeros) y encontraron que las estructuras de la doble cadena se forman entre ribo y desoxirribopolímeros con las siguientes estabilidades térmicas (rI)-(rC) > (rI)-(dC) > (dI)-(dC) > (dI)-(rC).



Tanto poli (C) como poli (I) existen como cadenas individuales, presentando estructuras ordenadas en disoluciones a pH neutro y a concentraciones moderadas de sal (100 a 300 mM), con las bases apiladas formando una hélice similar a aquella en la que una cadena individual tiene una estructura de doble cadena (Felsenfeld y Miles, 1967), aunque también se ha propuesto un modelo alternativo para poli (C) en disolución (Broido y Kearns, 1982). Una imagen razonable de las estructuras de estos homopolímeros en disolución podría ser aquella en la que las bases no están rígidamente enlazadas en la cadena polinucleotídica, sino más bien conectadas por muelles que experimentan oscilaciones de torsión, de compresión y de extensión (Bloomfield y col., 1974). A pH menor de 6, poli (C) puede formar una doble hélice consigo mismo, con cadenas paralelas que se enlazan juntas por grupos de uniones de tres enlaces de hidrógeno, cada uno, entre las bases de citosina poli (C)-poli (C<sup>+</sup>). Para que pueda ocurrir este tipo de interacciones, uno de los dos anillos citosina debe de protonarse (pK<sub>a</sub>=4'5) (Hartman y Rich, 1965). En adición, tras titulación ácida, el híbrido poli (C)-poli (I) puede desprotonarse a poli (I)-poli (C)-poli (C<sup>+</sup>) y luego a poli (I)-poli (C<sup>+</sup>) conforme se disminuye el pH de la disolución (Thiele y Guschlbauer, 1969a; Thiele y Guschlbauer, 1969b; Thiele y Guschlbauer, 1969c). Estas estructuras más complejas se favorecen a fuerzas iónicas altas (>0'5M).

#### I. 4. 5. Formación de híbridos entre homopolímeros complementarios.

Como se comentó anteriormente, este sistema de homopolímeros fue escogido como sistema experimental por muchas de sus atractivas características. La formación de un híbrido entre homopolímeros complementarios se puede describir por la simple reacción:



donde A, A' y H representan poli (C), poli (I) y el híbrido poli (C)-poli (I) respectivamente. Los estudios cinéticos indican que se trata de una reacción bimolecular de segundo orden, similar a la de la reasociación del ADN en disolución (Wetmur y Davidson, 1968; Kohne, 1970). Si se cumplen las condiciones de que los polímeros tengan mas de 50 bases y que la concentración salina sea mayor de 20 mM, la formación del híbrido es esencialmente irreversible, si la temperatura se mantiene por debajo de la T<sub>m</sub>.

Si la concentración de los dos polinucleótidos complementarios es la misma, denominando por C a la concentración de cada homopolímero de cadena sencilla (en moles de bases nucleotídicas por litro) y como t al tiempo en segundos; entonces se puede aplicar



la ecuación (8), tomando como condición inicial  $C=C_0$ . Es decir, a  $t = 0$ , todos los polinucleótidos están en forma de cadenas simples, por lo que  $C_0$  es igual a la concentración total de homopolímeros hibridados. Las velocidades de asociación de los homopolímeros son mucho mayores que las que presentan los ácidos nucleicos, ya que éstos son mucho más complejos.

Como ya se ha indicado, el análisis de la cinética de hibridación de los polinucleótidos se realiza frecuentemente mediante la construcción de las curvas " $C_0t$ ", donde la fracción remanente de nucleótidos de cadena simple se representa como una función del producto de la concentración inicial total de nucleótidos y del tiempo transcurrido (Britten y Kohne, 1968). Típicamente, para reacciones ideales de segundo orden, el 80% de las mismas ocurren alrededor de dos intervalos de  $\log C_0t$  (Britten y Kohne, 1968). Los homopolímeros representan el sistema menos complejo posible para el estudio de la asociación de cadenas simples complementarias y este proceso sucede con bastante rapidez. Comparado con la mayoría de los ácidos nucleicos, como ADN de *E. coli*, la velocidad de asociación es varios órdenes de magnitud superior para los homopolímeros. Así, éstos proporcionan un sistema experimental muy simple, con el que se puede calcular rápida y fácilmente el efecto de las modificaciones químicas (por ej. el enlace con etiquetas fluorescentes) sobre la capacidad del polinucleótido de formar la estructura híbrida con su cadena complementaria.

#### **I. 4. 6. Efectos de la $N^4$ transaminación en la estabilidad térmica de la doble cadena entre homopolinucleótidos.**

Como es conocido, la  $T_m$  de la estructura helicoidal se utiliza como medida de la estabilidad de las estructuras híbridas de doble cadena. El método convencional utiliza la medida espectral de la absorbancia en el intervalo entre 240 y 260 nm, como procedimiento analítico más simple en el estudio de la desnaturalización y renaturalización de los ácidos nucleicos. Para la mayoría de los ácidos nucleicos hibridados, la absorción se incrementa en el intervalo entre 240 y 260 nm cuando se funden mediante el aumento de la temperatura. Este efecto de hipercromicidad es una medida de la desnaturalización y es el resultado de la ruptura de los enlaces de hidrógeno y la consecuente separación de las bases asociadas a las cadenas polinucleotídicas.



Esta simple medida óptica se puede usar en el estudio de los efectos que tiene la modificación por N<sup>4</sup>-transaminación en las propiedades de hibridación del poli (C) modificado. Jackson e Yguerabide (1991) han estudiado tal aspecto, tanto por hipercromicidad a 260 nm como usando la exaltación de la fluorescencia del bromuro de etidio cuando se intercala en la doble cadena formada por el híbrido de poli (C)-modificado con poli (I). Con ambos métodos, han observado que la estabilidad del híbrido disminuye conforme se aumenta el porcentaje de N<sup>4</sup>-aminoetilación en los residuos citosina del poli (C). El subsiguiente enlace de moléculas fluorescentes en estos grupos, provoca una disminución adicional de la estabilidad térmica del híbrido. No obstante, la principal conclusión alcanzada por estos autores es que la modificación química realizada y el enlace posterior de fluoróforos, no provocan efectos significativos en la hibridación, si el porcentaje resultante del etiquetado fluorescente, es menor del 5% de los residuos citosina del poli (C). Estos datos resultan concordantes con otros en el mismo sentido, aunque realizados con poli (C) modificado por un proceso de metilación de los residuos citosina para originar N<sup>4</sup>-metilcitosina (Brimacombe y Reese, 1966).

La cinética de hibridación de poli (C) modificado con poli (I) también ha sido estudiada por Jackson e Yguerabide (1991) usando bromuro de etidio como intercalador fluorescente, llegando a la conclusión de que un porcentaje de etiqueta fluorescente del 5%, no afecta sensiblemente a la velocidad de la reacción, aunque porcentajes mayores al 10% afectan drásticamente a la mencionada velocidad e incluso a la proporción del híbrido formado.



## I. 5. PROPIEDADES ÓPTICAS DE LOS FLUORÓFOROS UTILIZADOS.

En este epígrafe se van a describir las propiedades ópticas más relevantes de los fluoróforos utilizados en nuestros estudios sobre la detección de la hibridación de ácidos nucleicos, así como las correspondientes a los derivados de aquellos, que se han usado en la reacción de etiquetado, cuando son sensiblemente distintas a las de los colorantes sin derivar. En el caso de que mencionadas propiedades fueran ya conocidas para los colorantes enlazados covalentemente a los ácidos nucleicos, la descripción se hará también extensiva a estos conjugados.

### I. 5. 1. Propiedades ópticas de la fluoresceína y del conjugado poli (C)-fluoresceína.

La fluoresceína es probablemente el fluoróforo más empleado en el estudio por técnicas fluorescentes de sistemas biológicos en general. Su alto coeficiente de extinción molar, su también alto rendimiento cuántico, sus ventajosas características de excitación y emisión en el intervalo espectral del visible, y la relativa insensibilidad a la polaridad del disolvente y al blanqueamiento fotónico, hacen que sea el colorante más útil en la investigación de una amplia variedad de sistemas biológicos, para estudiar diferentes tipos de fenómenos que abarcan un gran intervalo de aplicaciones. En el "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals" (Haugland, 1996), se puede encontrar una amplia lista de citas bibliográficas sobre su uso, así como un listado de todos los derivados comercialmente disponibles.

En disolución acuosa, la fluoresceína puede existir en forma de catión, forma neutra, como monoanión o como dianión y las concentraciones de cada forma dependen del pH de la disolución (Diehl y Horchack-Morris, 1987; Diehl, 1989). Los valores de los  $pK_a$  de las distintas formas prototrópicas implican que solo el monoanión y dianión tienen importancia en el intervalo de pH de interés biológico (pH = 6'5 a 8'0).

El espectro de absorción de la fluoresceína varía significativamente con el pH a causa de los cambios en las concentraciones de sus diferentes formas prototrópicas. En el intervalo neutro de pH, 6-8, el espectro de absorción refleja el equilibrio entre las formas monoanión y dianión. La forma dianiónica presenta un máximo de absorbancia alrededor



de los 495 nm, mientras que el máximo de absorción del monoanión se sitúa en 437 nm. Las propiedades fluorescentes de la fluoresceína también dependen del estado de ionización de la molécula (Rozwadowski, 1961; Leonhardt y col., 1971) y de la concentración de tampón que se encuentra presente en la disolución (Yguerabide y col., 1994). Estos aspectos son de una gran importancia pues la emisión del dianión es muy intensa, mientras que la correspondiente al monoanión es más difícil de detectar. Ambos espectros poseen un máximo a 515 nm, que decrece de forma aproximada a una gaussiana en el caso del dianión. Por el contrario, la emisión del monoanión presenta un hombro en la región situada sobre los 550 nm (Yguerabide y col., 1994). Como resultado de la baja intensidad fluorescente del monoanión, aunque el espectro de absorción de la fluoresceína cambia con el pH, el perfil del espectro de emisión no resulta demasiado afectado.

En la Tabla 2 se indican los coeficientes de extinción molar de las dos especies iónicas de interés, a las longitudes de onda características y de importancia práctica en nuestro estudio, según Ballesteros y col. (1998).

Cuando se usa fluoresceína como etiqueta fluorescente de ácidos nucleicos, el conjugado fluoresceína-poli (C) posee un coeficiente de extinción molar a 495 nm, sensiblemente disminuido respecto al que posee la fluoresceína en disolución, a la misma longitud de onda. Así, Reines y Schulman (1979) reportan un  $\epsilon_{495} = 4'25 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para fluoresceína ligada mediante un grupo carbohidrazida a tARN en disolución de pH 7'0. Jackson e Yguerabide (1991) han encontrado un valor de  $\epsilon_{495} = 4'30 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para fluoresceína enlazada a poli (C) a pH 7'0. La diferencia observada entre los coeficientes de extinción molar de la fluoresceína libre en disolución y la fluoresceína enlazada a una cadena de ácidos nucleicos, ha sido explicada por Jackson e Yguerabide (1991) en fluoresceína enlazada a poli (C) y corroborada por Talavera y col. (1997) para fluoresceína enlazada a fragmentos de ADN de *Escherichia coli*, en base al desplazamiento observado hacia mayores valores, del  $\text{pK}_a$  aparente correspondiente al equilibrio mono-dianión. Según estos autores, a pH 7'5, la forma predominante de la fluoresceína libre es la dianiónica, sin embargo, el aumento aparente del  $\text{pK}_a$ , cuando el colorante se enlaza al ácido nucleico provoca que, al anterior pH, haya una mayor cantidad fraccional de monoanión. Dado que el monoanión posee menor coeficiente de extinción molar que el dianión, a la longitud de onda de 495 nm, la combinación de ambas formas protónicas disminuye el valor de  $\epsilon_{495}$  cuanto mayor sea la cantidad fraccional de monoanión.



### **I. 5. 2. Propiedades ópticas del pireno y derivados utilizados.**

El pireno es una molécula hidrofóbica que ha sido extensamente estudiada como sonda de polaridad debido a que los efectos ambientales afectan a las intensidades de las bandas vibracionales del espectro de emisión del monómero (Kalyanasundaram y Thomas, 1977). Su largo tiempo de vida (sobre los 400 ns, dependiendo del disolvente y de la aireación del mismo) y su excelente rendimiento cuántico, hacen que este fluoróforo haya sido utilizado en múltiples estudios fundamentales y aplicativos.

Dado que nuestra investigación se ha realizado en disolución acuosa, en donde el pireno es insoluble, merece mayor atención en esta Memoria destacar algunas de las propiedades y parámetros fundamentales del ácido pireno-butírico, un derivado del pireno ligeramente soluble en agua y que usualmente ha sido utilizado como sistema modelo del pireno en disoluciones acuosas. El ácido pireno-butírico disuelto en agua, posee un espectro de absorción con dos bandas bastante estructuradas, una con el máximo más pronunciado sobre los 275 nm y otra en el UV próximo con máximos a 315, 325 y 343 nm. El espectro de emisión también resulta bastante estructurado y tiene simetría especular con el de absorción, presentando máximos a 375, 397 y otro más pequeño a 420 nm. Su tiempo de vida está en el intervalo entre 100 y 50 ns y depende de la temperatura y de la concentración de oxígeno presente. Este largo tiempo de vida permite discriminar la señal fluorescente del colorante y la autofluorescencia de la muestra cuando se conjuga a una biomolécula, por lo que ha sido utilizado en inmunoensayos.

El cloruro de 1-sulfonil pireno, uno de los derivados del pireno utilizados por nosotros para etiquetar ácidos nucleicos, reacciona con las aminas formando pirenosulfonamidas, que suelen conservar tiempos de vida relativamente altos, en contraste con el isotiocianato de pireno, también usado por nosotros, pero que presenta un tiempo de vida bastante corto, lo que provoca, según las investigaciones efectuadas por nosotros y que posteriormente se indican, que no tenga demasiada utilidad en la detección de la hibridación de ácidos nucleicos en medios homogéneos.



### **I. 5. 3. Propiedades ópticas del antraceno.**

El antraceno es una molécula hidrofóbica que exhibe una fuerte absorción UV, con un coeficiente de extinción molar, a 250 nm, superior a  $50.000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ . Un derivado de éste, el cloruro de 2-sulfonil antraceno, es un buen reactivo de aminas, aunque no se ha utilizado demasiado en aplicaciones biológicas. Este derivado ha sido especialmente útil en la derivatización de diversos compuestos para su posterior detección en separaciones por cromatografía líquida de alta resolución.

### **I. 5. 4. Propiedades ópticas del cloruro de 1-sulfonil 5-dimetilamino naftaleno.**

Desde su descripción por Weber (Weber, 1951), el cloruro de 1-sulfonil 5-dimetilamino naftaleno (cloruro de dansilo) se ha utilizado extensamente en la determinación de residuos N-terminales de proteínas y en la preparación de derivados fluorescentes de aminoácidos, oligonucleótidos, proteínas y otras biomoléculas.

El cloruro de dansilo es un compuesto no fluorescente que, al reaccionar con aminas, forma dansilamidas fluorescentes con máximos de emisión y rendimientos cuánticos muy dependientes de la polaridad del ambiente que rodea al fluoróforo. En adición, sus espectros de emisión presentan considerables desplazamientos de Stokes. Todo esto hace que el cloruro de dansilo haya resultado ser una sonda de polaridad muy útil, capaz de detectar los cambios de solvatación que ocurren a causa del enlace de ligandos a proteínas o en la desnaturalización de las mismas.

A pesar de que su coeficiente de absorción no es demasiado alto,  $\epsilon \approx 4.000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$  a 330-340 nm, y de su moderado rendimiento cuántico, el cloruro de dansilo se ha empleado también en la detección de biomoléculas por métodos cromatográficos.

### **I. 5. 5. Efectos de la concentración en las propiedades ópticas de las etiquetas fluorescentes.**

Es obvio que para desarrollar análisis de alta sensibilidad, las sondas deben ser muy fluorescentes. En principio, se pueden obtener sondas muy fluorescentes mediante la unión

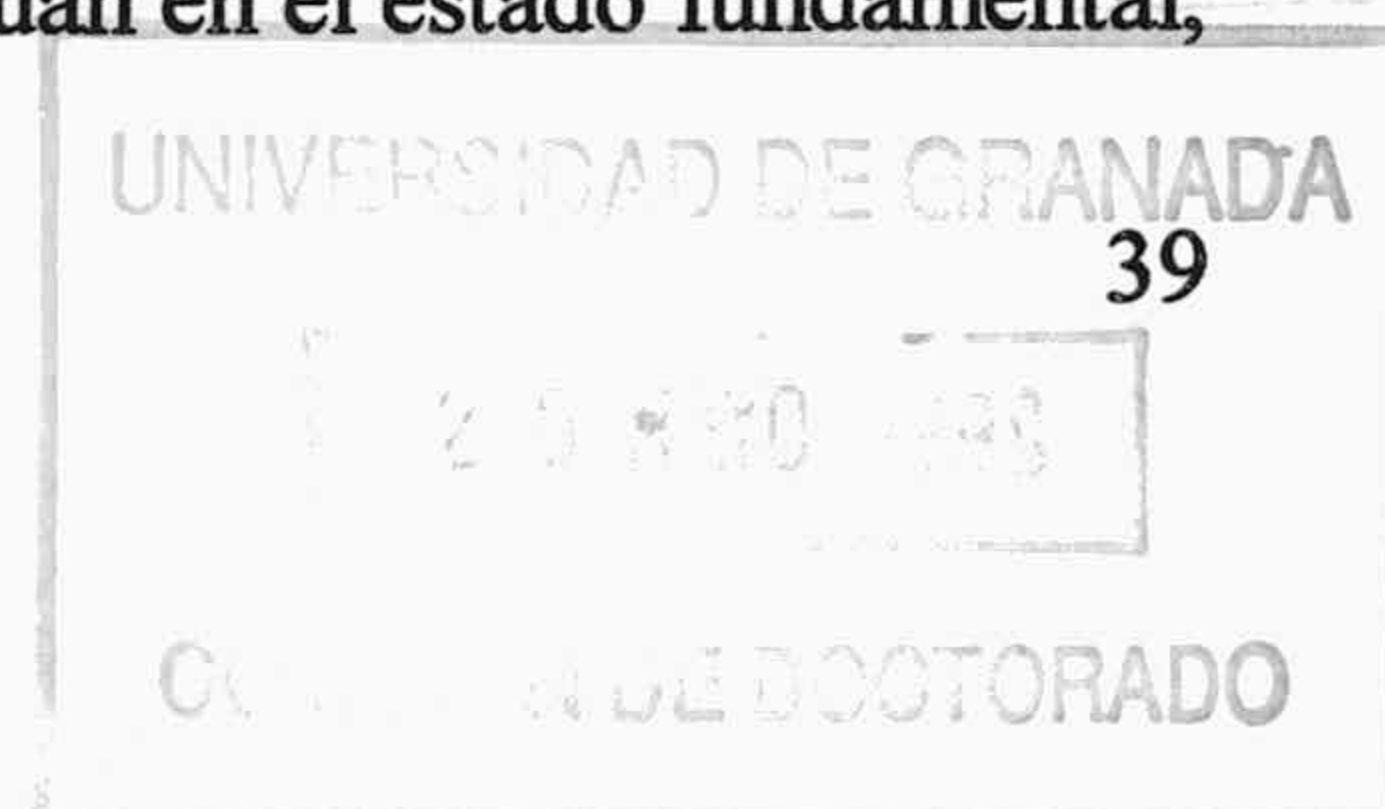


de varios grupos fluorescentes por molécula de sonda. Sin embargo, en la práctica, el número de grupos fluorescentes que pueden unirse por molécula de sonda está limitado por el "autoquenching" de los fluoróforos y por los efectos del incremento de marcaje en las propiedades de hibridación de la sonda (Jackson e Yguerabide, 1991). Los resultados obtenidos por estos autores con fluoresceína y rodamina como etiquetas fluorescentes de poli (C) , proporcionan una idea básica de los mecanismos que afectan a la eficiencia de fluorescencia en polinucleótidos etiquetados.

Es bien conocido que para algunos componentes orgánicos, el rendimiento cuántico relativo de fluorescencia y la anisotropía, decrecen con el incremento de la concentración del fluoróforo a concentraciones  $>10^{-4}$  M en disolución (*autoquenching* y despolarización por concentración) (Pringsheim, 1965). Estos cambios son normalmente debidos a la formación de dímeros en el estado fundamental, a la formación de excímeros, o ambos a la vez. Los excímeros se originan a través de una interacción específica entre el monómero excitado y un monómero en estado fundamental, por lo que adicionalmente a la fluorescencia emitida desde el estado excitado del monómero, se produce la emisión del dímero en estado excitado.

Un mecanismo puro de *autoquenching* por dímeros en el estado fundamental, se distingue de un mecanismo puro por excímeros, por el hecho de que los dímeros en estado fundamental producen cambios en el espectro de absorción con el incremento de la concentración del fluoróforo, mientras que los excímeros no. La causa de esto último es que tanto los monómeros como los excímeros tienen el mismo origen, la absorción ultravioleta por un estado fundamental no complejado. Sin embargo, ambos mecanismos pueden originar la aparición de una nueva banda en el espectro de fluorescencia cuando se incrementa la concentración, si sus estados excitados son fluorescentes. A concentraciones de *autoquenching*, el espectro de absorción de la fluoresceína muestra un desplazamiento hacia longitudes de onda menores, mientras que el perfil del espectro de emisión no resulta muy afectado, por lo que la pérdida de fluorescencia ha sido atribuida a la formación de dímeros en el estado fundamental (Pringsheim, 1965).

De otra parte, la fluorescencia de los excímeros del pireno fue descrita por primera vez por Kaspar y Förster en 1954 y revisada algo después por el mismo Förster (1969) y sus propiedades han sido extensamente estudiadas por Birks (1970). Estudios efectuados en disolventes en donde las moléculas de pireno no interactúan en el estado fundamental,





han mostrado que conforme se aumenta la concentración del pireno, en lugar del esperado decrecimiento en la fluorescencia del monómero debida al *quenching* por concentración, la fluorescencia del excímero reemplaza a la del monómero, dando lugar a un tipo especial de *quenching* por concentración. Estos fluoróforos han sido muy usados, cuando se enlazan a proteínas en sitios específicos, para proporcionar información acerca de las variaciones en la proximidad entre los sitios de enlace de la proteína (Betcher-Lange y Lehrer, 1978; Lehrer, 1995).

La formación de estos excímeros se puede describir esquemáticamente mediante dos moléculas de pireno enlazadas a una cadena hidrocarbonada en un ambiente donde los pirenos no interaccionan en el estado fundamental. Tras la excitación en la banda de absorción del pireno ( $\lambda_{\text{max}} = 340\text{-}343\text{ nm}$ ) se produce un monómero excitado que, durante su extenso tiempo de vida, puede rotacionalmente difundir hasta las moléculas vecinas de pireno en estado fundamental y formar un dímero en estado excitado con una precisa configuración simétrica. El excímero emite un espectro de fluorescencia con una banda no estructurada y desplazada hacia el rojo, a causa de que se origina desde un estado excitado de menor energía que el monómero excitado.

Como anteriormente se comentó, la formación de excímeros puros no cambia el espectro de absorción. Sin embargo, en disoluciones acuosas de sistemas modelo etiquetados con al menos dos moléculas de pireno (como es el ditiotreitól-pireno) mencionada propiedad resulta alterada (Ishii y Lehrer, 1989) y lo mismo se ha postulado en estudios con tropomiosina etiquetada con pireno (Betcher-Lange y Lehrer, 1978). En ambos casos se ha observado que el espectro de excitación del excímero no es idéntico al del monómero, sino que aparece más ensanchado. Los datos indican la presencia de interacciones hidrofóbicas entre moléculas de pireno en el estado fundamental, lo que hace que dichas moléculas se apilen en aquellos lugares más hidrofóbicos que le son energéticamente más favorables. Los estudios en sistemas modelo también muestran que la fluorescencia del monómero puede resultar desactivada por la interacción pireno-pireno en el estado fundamental, por lo que no se formaría el excímero. Los datos obtenidos con proteínas etiquetadas con pireno indican la generalidad de tal *quenching*. Por otra parte, los estudios de tiempo de vida demuestran que hay sólo un pequeño retraso entre la emisión del monómero y del excímero, lo que implica que las moléculas de pireno apiladas en el estado fundamental, requieren sólo una pequeña reorientación para alcanzar la configuración del excímero (Graceffa y Lehrer, 1980). En resumen, se puede postular que



en disoluciones acuosas y debido a la diferencia entre los espectros de excitación antes mencionada, la formación de excímeros se realiza exclusivamente a través de las moléculas de pireno apiladas, mientras que la emisión del monómero proviene de moléculas no apiladas, sin embargo cada configuración de pirenos apilados puede no provocar la fluorescencia del excímero y en algunas de estas configuraciones el estado monomérico excitado resulta desactivado antes de que tenga lugar la reorientación necesaria para originar la configuración del excímero.



## I. 6. PARÁMETROS FLUORESCENTES DE INTERÉS EN EL ESTUDIO DE INTERACCIONES ENTRE BIOPOLÍMEROS EN DISOLUCIÓN.

La espectroscopía de fluorescencia es una de las técnicas disponibles más versátil en lo que se refiere a investigaciones biológicas, debido a que la fluorescencia de un compuesto se puede describir por múltiples parámetros, a saber: espectros de excitación y emisión (y su  $\lambda_{\text{max}}$  de emisión), rendimiento cuántico, grado de polarización y tiempo de vida (o el perfil de decaimiento, si éste no es monoexponencial). La alta sensibilidad de estos parámetros a los factores ambientales permiten la posibilidad de desarrollar análisis homogéneos en simple disolución, por lo que, además, se pueden llevar a cabo estudios sobre los efectos del cambio en la misma disolución, como pH, fuerza iónica y temperatura. En adición, la fluorescencia de un compuesto puede disminuirse por la acción de otras moléculas en el medio que contiene a un fluoróforo, originando decaimientos adicionales bimoleculares del estado excitado del fluoróforo. El término *quenching* se usa para designar cualquier proceso que disminuya la intensidad de fluorescencia de un determinado fluoróforo. En ocasiones, la disminución de la fluorescencia se acompaña de la aparición de una nueva emisión fluorescente de características diferentes a la anterior.

De otra parte, la relativa facilidad de incorporación de una etiqueta fluorescente a la macroestructura de interés, ha motivado el desarrollo de un amplio rango de metodologías en diagnósticos clínicos. En este epígrafe se van a describir las generalidades de los parámetros fluorescentes que se utilizan con mayor extensión para el estudio, en medios homogéneos, de las interacciones entre biopolímeros, revisando los trabajos de interés que han desarrollado y utilizado esas metodologías.

### I. 6. 1. Eficiencia de fluorescencia.

En principio, si la interacción entre biopolímeros altera la intensidad de fluorescencia, a una determinada longitud de onda, éste será el parámetro más sencillo para detectar las mencionadas interacciones. Los cambios en la intensidad de fluorescencia han sido muy utilizados en la caracterización de complejos proteína-ligando (Eftink, 1997), proteína-proteína o proteína-ácido nucleico (Kim y col., 1994; Soengas y col., 1994; Pérez-Howard y col., 1995), en lo que se refiere a su equilibrio, cinética y características



dinámicas. Recientemente han sido revisados por Hill y Royer (1997) un gran número de estudios que hacen uso de los cambios en la fluorescencia intrínseca de proteínas en su complejación con ácidos nucleicos. La fluorescencia de bases modificadas (Chabbert y col., 1991; Wittung y col., 1994; Bloom y col., 1994) y de sondas extrínsecas (Hagmar y col., 1992; Pérez-Howard y col., 1995), también han demostrado ser muy útiles en estudios de complejación proteína-ácido nucleico.

El rendimiento cuántico,  $\phi$ , de un fluoróforo se define como la relación entre fotones emitidos y fotones absorbidos:

$$\phi = \frac{k_e}{k_e + k_i} \quad (9)$$

donde  $k_e$  es la velocidad específica de la emisión luminosa desde el nivel radiativo (es decir, la suma de las velocidades específicas de todos los procesos radiativos desde el nivel emisor hasta el nivel electrónico fundamental) y  $k_i$  es la suma de las velocidades específicas de todos los procesos no radiativos que desactivan la molécula desde el nivel energético emisor y compiten con la fluorescencia en la desactivación del estado excitado. El tiempo de vida medido de fluorescencia es la relación entre la velocidad radiativa específica y el rendimiento cuántico, es decir:

$$\tau = \frac{k_e}{\phi} = \frac{1}{k_e + k_i} \quad (10)$$

Los procesos que compiten con la emisión incluyen: transferencia electrónica en el estado excitado, entrecruzamiento entre sistemas, conversión interna y conversión externa. Todos estos procesos contribuyen a  $k$  y provocan un decrecimiento en el tiempo de vida medido de fluorescencia, lo que a su vez origina un decrecimiento en la intensidad observada de fluorescencia. El *quenching* por cualquiera de estos mecanismos se denomina “dinámico” ya que sucede mediante choques entre variados compuestos (disolvente, moléculas externas o grupos funcionales intramoleculares) con el fluoróforo en el estado excitado. La pérdida de intensidad también puede originarse por un fenómeno en el estado fundamental. En unos casos por la formación de un complejo oscuro que absorbe, pero no emite, en otros casos porque la formación del complejo provoca un decrecimiento en el coeficiente de extinción molar. Ambos casos se denominan *quenching* “estático” y provocan



un decrecimiento de la intensidad de fluorescencia sin cambios en el tiempo de vida de fluorescencia. Como se puede observar, el origen de los procesos de desactivación bimolecular puede ser muy variado. Así, puede originarse por reacciones en el estado excitado, por formación de asociaciones moleculares en el estado excitado o en el fundamental, por transferencia de energía, por interacciones de van der Waals, por simples cambios en el microambiente que rodea al fluoróforo, etc.

Como ya se ha indicado el atributo más obvio que puede poseer un fluoróforo para monitorizar la complejación entre macromoléculas, es que su rendimiento cuántico sea sensible al ambiente que lo rodea (decreciendo o aumentando). La sonda debe de estar íntimamente acoplada a la macromolécula de forma que los efectos del enlace sean eficazmente transferidos al fluoróforo. También es deseable que el rendimiento cuántico del fluoróforo sea alto, al objeto de que el decrecimiento (más usual que el aumento) de la señal, sea más evidente con el progreso de la valoración. Asimismo, es preferible que la emisión sea en el rojo, pues así hay menos probabilidad de emisiones intrínsecas de la muestra biológica. Ésto es especialmente interesante en disoluciones turbias, pues la intensidad de la luz dispersa es proporcional a  $\lambda^{-4}$ , aunque los efectos de la luz dispersa pueden corregirse por sustracción de la señal de una disolución de macromolécula sin fluoróforo, a la misma concentración que en la disolución a ensayar.

Si la intensidad de fluorescencia en estado estacionario, medida a cualquier par de longitudes de onda de excitación y de emisión, cambia con la complejación a una concentración constante de macromolécula a ensayar, como una función de la concentración total de un ligando, la intensidad observada se puede expresar por la suma de las intensidades relativas de las formas libre y complejada de la macromolécula multiplicadas, cada una respectivamente, por su fracción molar. También se puede hacer el cálculo con los rendimientos cuánticos de cada especie, pero éstos podrían ser más difíciles de medir y el método no aporta ningún beneficio adicional. Como en cualquier otra valoración, se deben de corregir las señales de fluorescencia por la dilución de la muestra en cada adición del ligando, multiplicando la fluorescencia relativa no corregida por el factor  $(V_{iM} + \Sigma V_L)/V_{iM}$ . Para que los efectos de dilución no sean demasiado extensos, algunos autores aconsejan que la adición del volumen de ligando no sobrepase el 10% del volumen inicial de la disolución de macromolécula. Otros consejos de interés en este tipo de valoraciones se pueden encontrar en un reciente artículo de Eftink (1997).



### I. 6. 2. Tiempo de vida de fluorescencia.

Otro parámetro fluorescente que ha sido muy utilizado para medir el grado de enlace de una macroestructura fluorescente con un ligando u otra macromolécula, es el tiempo de decaimiento de la fluorescencia. La evolución temporal de la emisión fluorescente es una técnica químico-física de comprobada utilidad en el estudio de reacciones rápidas y de la dinámica molecular, en la escala de tiempo del nanosegundo y sub-nanosegundo. Las aplicaciones de la espectroscopía de fluorescencia de nanosegundos se pueden clasificar en: ① medidas directas del tiempo de vida, ② medidas del tiempo de vida en presencia de desactivadores por contacto directo (*quenchers*), ③ medidas del tiempo de vida en presencia de transferencia de energía y ④ resolución temporal de la anisotropía.

En el caso más simple en que el estado excitado emisor de un único fluoróforo se desexcite por varios procesos, el tiempo de vida de fluorescencia,  $\tau$ , se define por la expresión:

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (11)$$

que describe el decaimiento de la intensidad de fluorescencia  $I(t)$ , de una disolución del fluoróforo tras la excitación por un pulso de luz muy corto (pulso  $\delta$ ). El tiempo de vida se define esencialmente como el tiempo requerido para que la intensidad  $I(t)$  decaiga hasta un valor igual a  $0.37 \cdot I_0$  (es decir, hasta  $e^{-1} \cdot I_0$ ).

Usualmente, el tiempo de vida es independiente de la longitud de onda de excitación. Esto se debe a que las moléculas excitadas hasta niveles de energía altos, se desexcitan por conversión interna hasta el nivel emisor de energía en tiempos que son demasiado cortos para que se puedan detectar por un espectrofluorímetro de nanosegundos. Así resulta que el tiempo medido por el fluorímetro es el tiempo de vida de las moléculas en el nivel energético emisor de la fluorescencia. En adición a su definición experimental, el tiempo de vida puede definirse también en términos de parámetros cinéticos mediante la ecuación (10).

Las macromoléculas etiquetadas con fluoróforos, a menudo presentan cinéticas de emisión complejas, representadas por una función con varios tiempos de vida. En el caso



ideal, las medidas directas del tiempo de vida dan información acerca del número de sitios diferentes ocupados por un fluoróforo en una macromolécula etiquetada, de la extensión con que cada sitio está poblado por el fluoróforo y de los cambios que ocurren en cada sitio cuando la macromolécula cambia desde un estado funcional a otro. El tiempo de vida asociado con cada sitio de enlace refleja la polaridad del sitio y la proximidad de desactivadores al mencionado sitio. Los coeficientes de abundancia o factores preexponenciales asociados con cada tiempo de vida, proporcionan la extensión relativa de población del correspondiente sitio. Así, los cambios en coeficientes y tiempos de vida pueden utilizarse para monitorizar las variaciones que suceden en cada sitio, cuando la macromolécula cambia su estado funcional. Por este motivo, el simple cambio del tiempo de vida, es suficiente para llevar a cabo la valoración de una macromolécula fluorescente con un ligando u otra macromolécula, aunque la medida de tiempos de vida tiene el inconveniente de su menor sensibilidad con respecto al análisis por la variación de la intensidad de fluorescencia. Las medidas directas del tiempo de vida a diferentes longitudes de onda de excitación pueden usarse, también, para resolver el espectro de absorción de cada fluoróforo en una mezcla de fluoróforos que tienen diferentes tiempos de vida cada uno, mientras que las medidas del tiempo de vida a diferentes longitudes de onda de emisión pueden usarse para resolver los espectros de emisión. Finalmente, las medidas del tiempo de vida permiten obtener información sobre las velocidades de procesos en el estado excitado, tales como la velocidad de formación de excímeros, la velocidad de la conversión ácido-base conjugada en el estado excitado, la velocidad de *quenching* colisional (dinámico) y la velocidad de relajación dipolar de los alrededores de una molécula excitada.

La medida de los tiempos de vida en presencia de desactivadores externos dan información acerca de la accesibilidad de las moléculas a un sitio etiquetado, mientras que la medida de los tiempos de vida en presencia de pares dador-aceptor que exhiben transferencia de energía, proporcionan información sobre la distancia entre sitios de interés en macromoléculas, o sobre reuniones macromoleculares etiquetadas con pares dador-aceptor, así como de la variación de esas distancias en respuesta a los cambios ambientales. Finalmente, de las medidas de la evolución temporal de la anisotropía se obtiene información sobre las dimensiones, forma y flexibilidad de macromoléculas, así como de la fluidez y dinámica conformacional de membranas.

Como ya se ha indicado, las macromoléculas etiquetadas con fluoróforos a menudo presentan complejas cinéticas de emisión representadas por una función con varios tiempos



de vida. En este sentido se debe destacar que la simple asignación de los tiempos de vida a varios sitios de enlace cada uno con una conformación única o a un sólo sitio con varias conformaciones, resulta bastante dudosa. En lugar de este tipo de interpretación, las medidas del tiempo de vida se realizan, usualmente, con el ánimo de obtener información sobre los sitios de enlace, aunque hay que poner un gran cuidado en la interpretación de tal información, ya que los tiempos de vida múltiples pueden tener muy diferentes orígenes, algunos de los cuales no están directamente relacionados con la conformación del sitio de etiquetado (Yguerabide e Yguerabide, 1984). Los tiempos de vida múltiples pueden originarse mediante procesos moleculares internos o mediante procesos que involucran interacciones entre la molécula del fluoróforo y otras moléculas situadas a su alrededor. La naturaleza de estas interacciones puede clasificarse en: interacciones dipolares, interacciones electrostáticas, formación de complejos, interacciones colisionales, transferencia de energía y reacciones ácido-base. A su vez, los mecanismos que producen tiempos de vida múltiples pueden desarrollarse en el estado fundamental o en el estado excitado. Los primeros se deben, bien a la heterogeneidad en los sitios de enlace o a la existencia de un sitio simple de enlace con varias conformaciones (microheterogeneidad). Los mecanismos en el estado excitado más usuales son, la solvatación (dependiente del tiempo) en el estado excitado y las posibles reacciones (también en el estado excitado).

En los casos en que existen múltiples tiempos de vida, es de utilidad el uso del denominado “tiempo de vida promedio” que se obtiene aplicando la siguiente expresión:

$$\tau_{\text{pro}} = \sum_{i=1}^3 a_i \cdot \tau_i \quad (12)$$

en donde  $\tau_i$  se refiere a los distintos tiempos de vida y  $a_i$  son los factores preexponenciales obtenidos en el ajuste, normalizados para indicar la abundancia fraccional de cada tiempo de vida. La utilidad de esta aproximación ha sido reconocida anteriormente y permite la realización de cálculos aproximados con relativo éxito (Hanson y col., 1981), como se verá en las próximas secciones de esta Memoria.

Desde el desarrollo de los métodos fluorescentes con resolución temporal en 1970, su uso se ha ido incrementando en lo que se refiere a las aplicaciones a las ciencias de la vida en general. Así, han aparecido varias revisiones generales y monografías como las de Demas (1983), Yguerabide e Yguerabide (1984), Holzwarth (1989), o Lakowicz (1983, 1991). Una estimación aproximada del número de artículos publicados sobre la aplicación



de la evolución temporal de la fluorescencia a las ciencias de la vida, proporcionaría un resultado que fácilmente excedería los 10.000, por lo que haremos solamente especial énfasis en aquellos campos cercanos a la investigación que constituye la presente Memoria.

Entre el grupo de aplicaciones de la resolución temporal de fluorescencia en la química clínica destaca el denominado fluoroinmunoensayo, que se ha desarrollado en la última década y en algunos casos ha reemplazado al siempre problemático radioinmunoensayo (Hemmila, 1988; Morrison, 1988). El método está basado en el etiquetado de anticuerpos específicos con fluoróforos de propiedades ópticas adecuadas como quelatos de tierras raras (Diamandis y col., 1989) o ficobiliproteínas (Kronick, 1986; Morrison, 1988). La resolución temporal de la fluorescencia también se ha aplicado al estudio estructural y dinámica de ácidos nucleicos (Daniels y col., 1990; Nordlund y col., 1990), así como al reconocimiento de interacciones ácido nucleico-proteína (Millar y col., 1990). Sin embargo, no conocemos ningún artículo en donde se mencione la posibilidad del análisis de la hibridación de ácidos nucleicos en disolución, mediante la variación del tiempo de vida de etiquetas fluorescentes.

### **I. 6. 3. Polarización de fluorescencia. Su uso en el análisis de interacciones entre biopolímeros.**

Uno de los parámetros fluorescentes más útiles en la monitorización de cualquier tipo de complejación en que intervenga una macromolécula y, en general, en un gran número de investigaciones biológicas, es la espectroscopía de fluorescencia polarizada. Fue introducida por Weber (1952) y aplicada a la caracterización de un buen número de proteínas y membranas por Weber y otros (Weber, 1969; Wahl, 1969; Tao, 1969; Yguerabide, 1972; Yguerabide, 1973; Weber, 1975; Yguerabide e Yguerabide, 1984), así como utilizada en análisis clínicos (Jolley y col., 1981).

Si se excita con luz polarizada un fluoróforo que permanece inmóvil durante el intervalo de tiempo que perdura su estado excitado, la emisión resultante exhibirá la misma polarización. En contraste, cuando el fluoróforo es lo suficientemente móvil para que su orientación sea parcial o totalmente distribuida al azar, dentro de la escala temporal en que se sitúa el tiempo de vida de su estado excitado, la luz emitida tendrá una extensión menor de polarización. La explicación cualitativa de esto, puede hacerse como sigue: supongamos



que la molécula tiene un oscilador lineal, rígidamente unido al marco nuclear, responsable de la absorción y emisión de la luz. Al iluminar con luz linealmente polarizada de frecuencia apropiada un conjunto isotrópico de dichos osciladores, se excitarán selectivamente aquellos cuyo vector momento dipolar de absorción sea paralelo o tenga una componente no nula en la dirección del vector campo eléctrico del haz de excitación. Este proceso de fotoselección creará una población orientada de moléculas excitadas que, si permanece inmóvil durante su tiempo de vida, emitirá luz fluorescente polarizada. Si, por el contrario, durante el tiempo de permanencia de las moléculas en su estado excitado tienen lugar movimientos de reorientación, tales como la difusión rotacional, la orientación inicial se destruirá dando lugar a una disminución del grado de polarización de la emisión. La consecuencia inmediata es que la magnitud de la polarización va a depender de aquellos factores que afectan los movimientos de reorientación de la molécula en la escala de tiempo del nanosegundo como son la temperatura y viscosidad del disolvente por un lado y el tamaño y forma de la molécula rotante por otro. La dependencia de la polarización de la luz emitida, con el tamaño de la molécula rotante, permite el uso de las medidas de polarización de la fluorescencia en el estudio de interacciones macromoleculares, ya que los grandes complejos moleculares rotarán lentamente y durante el tiempo de vida del estado excitado, despolarizarán la luz emitida en menor extensión que aquellos complejos más pequeños que gozan de mayor movilidad.

Las medidas de polarización de fluorescencia involucran la excitación de una muestra con luz polarizada y la determinación de la extensión de la polarización de la luz emitida. Los resultados de la medida se pueden expresar cuantitativamente mediante dos parámetros:

a) Grado de polarización de fluorescencia (P), definido en 1929 por Perrin como:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (13)$$

b) Anisotropía de fluorescencia (A), introducida en 1960 por Jablonski:

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (14)$$



donde  $I_{\parallel}$  e  $I_{\perp}$  son las intensidades de la luz emitida paralela y perpendicular al plano de polarización de la excitación.

La polarización es un parámetro útil para describir una fuente de luz dirigida y detectada a lo largo de un eje particular, ya que en este caso  $I_{\parallel} + I_{\perp}$  es la intensidad total de la luz linealmente polarizada. En contraste, la radiación emitida por un fluoróforo está simétricamente distribuida alrededor del eje  $Z$  y por esta razón la intensidad total no viene dada por  $I_{\parallel} + I_{\perp}$  sino por  $I_{\parallel} + 2I_{\perp}$ . Esto es a causa de que la luz irradiada por un dipolo es distribuida igualmente a lo largo de los ejes  $X$  e  $Y$ . Desde este punto de vista el uso del parámetro polarización es inapropiado para describir la emisión fluorescente. Sin embargo el parámetro polarización fue introducido en la literatura original y la mayoría de la teoría se presentó usando este término. Hoy día ha sido casi totalmente desplazado por el uso de la anisotropía, ya que ésta describe el fenómeno fluorescente, es decir el caso particular en el que la excitación se realiza con luz polarizada (verticalmente) y la detección de la emisión se efectúa a  $90^{\circ}$  de la dirección de propagación de la excitación. La formulación matemática ha sido sustancialmente simplificada por la utilización de la anisotropía ya que  $A$  es un parámetro aditivo.

En cualquier caso, grado de polarización y anisotropía pueden interconvertirse entre sí a través de las ecuaciones:

$$\begin{aligned} P &= \frac{3A}{2+A} \\ A &= \frac{2P}{3-P} \end{aligned} \tag{15}$$

En un experimento de fluorescencia polarizada, la muestra fluorescente se excita con luz polarizada en la dirección vertical y la intensidad de luz emitida se detecta primero a través de un polarizador (analizador) orientado en la dirección vertical y seguidamente a través del analizador orientado en la dirección horizontal. Las dos intensidades medidas son designadas  $I_{VV}$  e  $I_{VH}$ , en donde según convenios internacionalmente aceptados, el primer subíndice hace referencia a la dirección de polarización de la luz excitatriz y el segundo a la dirección de polarización de la luz emitida.



Sin embargo, el conjunto del monocromador de emisión, fotomultiplicador y óptica asociada, no detecta con la misma eficiencia la luz polarizada vertical y horizontalmente. Esto es fundamentalmente debido a que los monocromadores polarizan parcialmente la luz incidente, por lo que se necesita determinar el factor G, definido como la relación de las sensibilidades del sistema de detección (canal de emisión) para la luz polarizada vertical y horizontalmente y que resulta función de la  $\lambda$  de detección. El factor G es fácilmente medible observando las componentes horizontal y vertical de una fuente de luz polarizada. Esto se puede conseguir excitando con luz horizontal una disolución fluorescente de forma que las intensidades de emisión horizontal  $I_{HH}$  y vertical  $I_{HV}$  son idénticas a causa de que ambas orientaciones son perpendiculares a la polarización de la excitación. De esta manera, la diferencia en la medida de  $I_{HV}$  e  $I_{HH}$  se deberá exclusivamente a las propiedades del sistema de detección. Si llamamos  $S_V$  y  $S_H$  a las sensibilidades, a una  $\lambda$  determinada, del canal de emisión para las componentes vertical (paralela) y horizontal (perpendicular), respectivamente. Cuando se excite la muestra con luz verticalmente polarizada, las intensidades polarizadas observadas serán:

$$I_{VV} = S_V \cdot I_{\parallel} \quad \text{e} \quad I_{VH} = S_H \cdot I_{\perp} \quad (16)$$

dividiendo ambas:

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} = \frac{S_V \cdot I_{\parallel}}{S_H \cdot I_{\perp}} = G \cdot \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} \quad (17)$$

por lo que la anisotropía vendrá dada por:

$$A = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (18)$$

Tras excitación en estado estacionario, el valor de la anisotropía para cualquier muestra depende del ángulo medio a través del cual las moléculas del fluoróforo rotan durante su tiempo de vida. Cuanto más grande es el ángulo, más pequeño es el valor de A. Más específicamente, el valor de A depende del valor de  $(\tau/\phi)$ , donde  $\tau$  es el tiempo de vida y  $\phi$  es el tiempo de correlación rotacional del fluoróforo. El valor de A decrece con el aumento de  $(\tau/\phi)$ . Para una molécula de fluoróforo libre en disolución, el valor de  $\phi$  depende del peso molecular, de la forma del fluoróforo y de la viscosidad del disolvente.



Para las moléculas fluorescentes que están unidas rígidamente a una estructura mayor, el valor de  $A$  depende del movimiento rotacional de esta estructura. El valor de  $A$  está en el intervalo comprendido entre un máximo de 0.4 (para un sistema completamente rígido para el cual  $\phi = 0$ ) y un mínimo valor de 0 (para un sistema donde  $\tau/\phi$  es superior a 1).

Como antes se indicó, las técnicas de polarización proporcionan un poderoso método para el estudio de la formación de complejos en sistemas bioquímicos. Por ejemplo, cuando una sustancia de bajo peso molecular (fluoróforo) se une a una molécula mucho mayor (macromolécula biológica), hay un gran aumento en la anisotropía de fluorescencia del fluoróforo, a causa del significativo incremento en el tiempo de correlación rotacional que, a su vez, ha sido motivado por el aumento de tamaño de la molécula rotante. Del mismo modo, la rotación de una macromolécula en disolución es más lenta cuando forma parte de un complejo macromolécula-macromolécula, que cuando está sola. Estas características, posibilitan la explotación del aumento de la anisotropía de fluorescencia que se origina tras la formación de los mencionados complejos, en el análisis de los mismos (Weber, 1952; Steiner y McAlister, 1957; Rawitch y Weber, 1972; Lakowicz, 1983; Lakowicz, 1991). Los análisis de estos complejos por anisotropía de fluorescencia han demostrado tener ventajas sobre otras formas de ensayo, como es la variación de la movilidad electroforética (Panayotou y col., 1993). Los primeros en aplicar esta aproximación al análisis de interacciones proteína-ADN por anisotropía de fluorescencia fueron Heyduk y Lee (1990). Recientemente se han publicado un gran número de trabajos sobre el estudio de estas interacciones (Heyduk y col., 1993; LeTilly y Roger, 1993; Pérez-Howard y col., 1995; Pyles y Lee, 1996; Wittmayer y Raines, 1996), así como sobre las asociaciones proteína-proteína, seguidas por anisotropía de fluorescencia (Heyduk y col., 1993; Kwok y col., 1994; Lundblad y col., 1995).

Los principales atributos que debe poseer un fluoróforo aplicable al análisis de la complejación de macromoléculas incluyen un alto rendimiento cuántico y una pequeña sensibilidad del mismo a la complejación. La primera condición permite una mayor sensibilidad y, por tanto, la investigación de concentraciones subnanomolares. Si la segunda condición no se cumple, se origina una complicación adicional en la interpretación de los datos, ya que la contribución de las distintas especies de una mezcla (macromolécula y macromolécula-ligando), a la anisotropía total de la mezcla, en estado estacionario, depende de las fracciones molares de las especies y de sus rendimientos cuánticos (Eftink, 1997).



La fluoresceína ha sido el fluoróforo más utilizado en este tipo de estudios, ya que tiene un coeficiente de extinción alto y también un considerable rendimiento cuántico de fluorescencia. En adición, las longitudes de onda características de excitación y emisión son altas, lo que minimiza la luz dispersa (ya que ésta es inversamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda) que puede originarse por la posible turbidez de la muestra biológica, que es la principal fuente general de error en las medidas de polarización de fluorescencia. El tiempo de vida del estado excitado de la fluoresceína es aproximadamente 4 ns y depende del pH y concentración del tampón (Ballesteros y col., 1998), por lo que es comparable al tiempo requerido para que una macromolécula de unos  $10^5$  Da efectúe rotaciones significativas. Adicionalmente a la fluoresceína, existen otros fluoróforos con propiedades ópticas adecuadas para análisis por anisotropía de fluorescencia de interacciones macromoleculares, como son el dansilo y el pireno. Ambos poseen mayores tiempos de vida de fluorescencia, por lo que pueden ser útiles en el análisis de macromoléculas y de complejos macromolécula-macromolécula mayores de  $10^5$  Da. Recientemente, se ha observado una anisotropía de fluorescencia muy adecuada, en ciertos complejos ligando-metal fluorescentes, lo que unido al extenso tiempo de vida de fluorescencia que presentan, permite su utilización en la medida de la rotación de biopolímeros en la escala de tiempo del microsegundo (Terpetschnig y col., 1997).

#### **I. 6. 4. Transferencia de energía.**

Aunque la transferencia de la energía de fluorescencia por resonancia no ha sido utilizada en esta Memoria para la detección de la hibridación de ácidos nucleicos, es una de las aproximaciones utilizadas con mayor extensión en estudios de complejación y caracterización de macroestructuras biológicas. La transferencia de energía, es un proceso por el cual la energía del estado excitado de una molécula fluorescente, que se denomina dador, se transfiere a una molécula no excitada, denominada aceptor, mediante un acoplamiento dipolo-dipolo. La velocidad de la transferencia de energía depende de la distancia entre el cromóforo dador y el aceptor, así como de las propiedades espectrales y de la orientación relativa de los dipolos de transición del par dador-aceptor. Förster (1949) derivó la relación entre la eficiencia de la transferencia de energía por resonancia y la distancia entre el dador y el aceptor. Desde entonces, se ha empleado esta técnica con gran profusión en la determinación de distancias en sistemas muy variados y hay un buen número de monografías y revisiones en la literatura, que describen los principios y metodología de



la transferencia de la energía de fluorescencia por resonancia, así como sus aplicaciones al estudio de diversas macroestructuras biológicas (Yguerabide, 1972; Stryer, 1978; Fairclough y Cantor, 1978; Clegg, 1992; Wu y Brand, 1994; Selvin, 1995; Yang y Millar, 1997).

En una experiencia típica, la macromolécula se etiqueta con el dador en un sitio seleccionado y se mide la intensidad y el tiempo de vida de fluorescencia del fluoróforo, en ausencia y, posteriormente, en presencia del aceptor etiquetado en otro sitio también seleccionado. Estos datos se utilizan para calcular la velocidad de la transferencia de energía por resonancia y, seguidamente, la distancia de separación entre el dador y el aceptor. En el caso de la mayoría de aplicaciones analíticas, las experiencias son más sencillas y se basan en la simple detección de la asociación o ruptura de una macroestructura, mediante la aparición o desaparición del espectro de emisión característico del aceptor. Así, la transferencia de la energía de fluorescencia por resonancia, se ha empleado en análisis de tipo clínico, como el inmunoensayo, para detectar la asociación antígeno-anticuerpo (Ullman y col., 1976; Kronick y Grossman, 1983; Miller y Anderson, 1989). Los avances en la síntesis automatizada de ADN y la posibilidad de etiquetar éste en sitios bien determinados, ha renovado el interés en la aplicación del método a estudios estructurales y funcionales de ADN y ARN, como es la investigación de la formación de hélices triples de ADN (Yang y col., 1994), los estudios cinéticos de escisión de ADN catalizada por enzimas (Ghosh y col., 1994; Bjorson y col., 1994), o la hibridación entre cadenas complementarias (Cardullo y col., 1988).



***MATERIAL Y  
MÉTODOS***



## **II. 1. MATERIALES.**

Se describen a continuación, en apartados sucesivos, los reactivos y el aparataje empleados en la realización de la parte experimental de esta Memoria.

### **II. 1. 1. Reactivos.**

- Acetona. Probus.
- Acetonitrilo. Panreac.
- Ácido 4-(1-pireno) butírico. Sigma.
- Ácido clorhídrico. Panreac.
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA). Sigma.
- Ácido polirribocitidílico, poli (C). Sigma.
- Ácido polirriboinosínico, poli (I). Sigma.
- Agua destilada y bidestilada. Millipore (Milli Q).
- Benceno. Quimon.
- Bisulfito sódico. Sigma.
- Cloruro de 2-antracenosulfonilo. Molecular probes.
- Cloruro de 5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonilo (cloruro de Dansilo). Molecular probes.
- Cloruro de oxalilo. Sigma.
- Cloruro de 1-pirenosulfonilo. Molecular probes.
- Cloruro sódico. Panreac.
- Dimetilsulfoxido. Probes.
- Etanol. Panreac.
- Etilendiamina. Sigma.
- Fosfato disódico. Panreac.
- Fosfato monopotásico. Panreac.
- Hidroquinona. Sigma.
- Hepes(ácido 2-[4-(2-hidroxietyl)-piperazinil-(1)]-etansulfónico). Merck.
- Isotiocianato de pireno. Sigma.
- Sephadex G-25. Sigma.
- Tris-base. Sigma.



Los disolventes fueron utilizados sin purificación adicional después de comprobar la ausencia de emisión fluorescente. Los productos químicos fueron de pureza grado analítico o bioquímico.

También se ha utilizado en la diálisis del material, membranas de 1'8/32 pulgadas. El cierre hermético de dichas membranas se ha conseguido mediante unas pinzas suministradas por Medicell International LTD.

## **II. 1. 2. Instrumentación.**

Para los estudios realizados mediante espectroscopía de absorción UV-VIS se han empleado **espectrofotómetros** Perkin-Elmer, modelos Lambda 5 y Lambda 16, ambos de doble haz. El primero posee un sistema óptico constituido por un monocromador conteniendo una red holográfica de 1440 líneas/nm que permite la medida en el margen de 190 a 900 nm, con rendijas variables entre 0'25 y 4 nm. Consta además de microprocesador provisto de vídeo cuyos programas permiten seleccionar entre tres métodos de operación, así como el control de parámetros instrumentales y el registro de datos numéricos. Acoplado a la unidad principal, dispone de un printer-plotter para el registro gráfico. El espectrofotómetro va acoplado a un equipo de termostatación (Frigomix 1450 B) Braum con sistema de circulación de agua para el control de la temperatura, alcanzando una precisión de  $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ . El modelo Lambda 16, además de las características ya indicadas para el modelo Lambda 5, posee control por vía externa a través de ordenador personal con software UV Data Manager, con opción de registro mediante a una impresora o a un plotter. El sistema óptico tiene también un premonocromador con una red holográfica cóncava (600 líneas/mm). Para las medidas de absorción UV-Visible se emplearon **células de cuarzo** con tapón de teflón de distintas capacidades, aunque todas con 1'0 cm de paso de luz (suministradas por la casa Starna).

Las medidas de fluorescencia en estado estacionario se han realizado con un **espectrofluorímetro** Shimadzu RF-5001. La fuente de luz es una lámpara de xenon de 150W. El sistema óptico está constituido por monocromadores de excitación y emisión, ambos automáticos, con red holográfica cóncava de 1300 líneas/mm. La anchura de rendija es variable entre 1'5 y 30 nm. El sistema de detección es un fotomultiplicador R452-01. Consta también de microprocesador para el almacenamiento y proceso de datos. El



espectrofluorímetro va provisto de un equipo de termostatación Julabo F10 de precisión de  $\pm 0.1^\circ\text{C}$ , con sistema de circulación de agua para el control de la temperatura. Para las medidas de fluorescencia se emplearon **células de cuarzo** con tapón de teflón de distintas capacidades y paso de luz (suministradas por la casa Starna).

Las medidas de los tiempos de vida de fluorescencia se han efectuado en un **fluorímetro de nanosegundos** EEY-Scientific, cuyo funcionamiento se basa en el conteo de fotones correlacionado con el tiempo. Básicamente, este aparato consta de una lámpara de descarga de recorrido libre que utiliza gas hidrógeno a la presión de 10 atm. Esta lámpara opera normalmente a una frecuencia de 30 KHz originando pulsos de FWHM igual a 2.2 ns. La línea de parada de señal en el convertidor tiempo-amplitud (TAC) está formada por un fotomultiplicador 1P28, un preamplificador modelo 9305 de Ortec y un discriminador de fracción constante modelo 584 de la misma marca. Por otro lado, la línea de arranque está formada por un dispositivo "pickoff" de EEY, un discriminador de fracción constante modelo 9305 y un módulo de retardo modelo 425A ambos de Ortec. El módulo de conversión tiempo-amplitud es modelo 56 de Ortec. Los datos son recogidos por un analizador multicanal de altura de pulsos modelo 7150 también de Ortec, con una interface RS232C con conexión a un ordenador Rival 286 plus de Arche.

El fin que se persigue en un experimento de fluorescencia de nanosegundos es determinar la expresión analítica o ley de decaimiento,  $i(t)$ , para la emisión de una muestra fluorescente y evaluar los parámetros de la expresión, tales como tiempos de vida y coeficientes de abundancia. En general, un sistema presenta una ley caracterizada por una suma de términos exponenciales (decaimiento multiexponencial):

$$i(t) = \sum a_i e^{-t/\tau_i} \quad (19)$$

en donde  $a_i$  son los coeficientes de abundancia o factores preexponenciales y  $\tau_i$  son los tiempos de vida de fluorescencia.

El análisis de las curvas de decaimiento de fluorescencia en términos de una supuesta ley  $i(t)$  implica dos operaciones básicas. La primera es la eliminación de las distorsiones introducidas por la duración finita del pulso de luz de excitación y la respuesta del sistema de detección; la segunda es la evaluación de los parámetros. Usualmente, estas dos operaciones se llevan a cabo de forma simultánea mediante la técnica de deconvolución,



que está basada en la integral de convolución:

$$I(t) = \int_0^t L(T) i(t-T) dT \quad (20)$$

que relaciona la ley de decaimiento supuesta  $i(t)$ , con la emisión de la muestra medida experimentalmente  $I(t)$  y el perfil de la lámpara de excitación  $L(T)$ . Este perfil se mide con una disolución dispersora situada en el compartimento de la muestra, en lugar de la disolución de fluoróforo y sin el filtro de emisión.  $T$  es la variable de integración y  $t$  el tiempo real (se puede encontrar la derivación de la integral de convolución en Yguerabide, 1972). La ley de decaimiento se denomina a menudo “ley de emisión instantánea”, ya que sería la emisión de nanosegundos que se produciría por un pulso de luz infinitamente pequeño. Los métodos de deconvolución utilizan  $i(t)$ ,  $I(t)$ ,  $L(T)$  y la ecuación (20) para evaluar los coeficientes y tiempos de vida en  $i(t)$ .

Los métodos de deconvolución que han sido utilizados por nosotros en el análisis de datos de fluorescencia de nanosegundos son, el método de mínimos cuadrados no lineal (Grinvald y Steinberg, 1974; Grinvald, 1976) y el método de los momentos (Isenberg y Dyson, 1969; Yguerabide, 1972). Estos métodos de análisis se denominan métodos paramétricos, porque esencialmente evalúan los parámetros de una supuesta ley de decaimiento. Los métodos paramétricos pueden clasificarse en los que ajustan una curva y los que no ajustan la curva y sus ejemplos respectivos son, el método de mínimos cuadrados no lineal y el método de los momentos.

En el método de mínimos cuadrados no lineal, la validez de una función de ajuste dada,  $i(t)$ , y el conjunto de valores para los parámetros  $a_i$  y  $\tau_i$  se establece comprobando la bondad del ajuste entre estos valores y la gráfica de emisión experimental  $I_e(t)$ . En este test, los valores de  $a_i$  y  $\tau_i$  bajo consideración se utilizan para calcular la gráfica teórica  $I_c(t)$  con la integral de convolución:

$$I_c(t) = \int_0^t L(T) i(t-T) dT \quad (21)$$

y la función de ajuste que es la ecuación (19). Seguidamente,  $I_c(t)$  se compara con la emisión experimental  $I_e(t)$  para determinar la bondad del ajuste entre ambas (los subíndices de  $I$  se utilizan para distinguir entre las funciones  $I(t)$ , experimental y calculada). Esta



bondad del ajuste se establece de acuerdo con el valor de  $\chi^2$  reducido,  $\chi^2/N$ . Se considera que los valores de los parámetros ajustan bien con los datos experimentales, si el asociado  $\chi^2$  reducido tiene un valor alrededor de 1, y serán considerados los mejores valores si, comparados con otros valores, proporcionan un valor mínimo del  $\chi^2$  reducido (Bevington, 1969). Este valor se define por:

$$\frac{\chi^2}{N} = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^N \frac{1}{\sigma_i^2} [I_e(t_i) - I_c(t_i)]^2 \quad (22)$$

donde  $\sigma_i$  es la desviación estándar de  $I_e(t_i)$  debida al ruido,  $N$  es el número total de datos (número de valores de  $I_e(t_i)$ ) y  $n$  el número de parámetros a ajustar. El término  $(N-n)$  da el número de grados de libertad. Según la teoría, si el tipo de ruido presente en la muestra ha sido repartido al azar, lo que implica valores correctos de  $\sigma_i$ , el ajuste será estadísticamente fiable (Bevington, 1969).

Una desventaja de esta técnica de ajuste es que los valores de los parámetros ajustan  $i(t)$  no sólo a la emisión de nanosegundos de la muestra, sino también al ruido no distribuido al azar, que puede estar presente en  $I_e(t)$ . Así, si entrase luz dispersa en la toma de datos, un método de ajuste de la curva, introducirá en  $i(t)$  un componente exponencial, correspondiente a la luz dispersa, que posee un tiempo de vida muy pequeño y un preexponencial negativo. Por otra parte, un valor alto de cuentas oscuras, introducirá un tiempo de vida muy grande. A pesar de estas desventajas, el método de mínimos cuadrados no lineal, suele proporcionar excelentes concordancias o ajustes entre las gráficas experimental y calculada (Isenberg, 1973).

Los métodos que no ajustan la curva experimental, como el método de los momentos, proporcionan valores de los parámetros que ajustan  $i(t)$  solamente a la emisión del fluoróforo y no al ruido no distribuido al azar, que puede estar presente en  $I_e(t)$  (Isenberg, 1973). La principal desventaja es que no hay un método práctico para determinar la fiabilidad de los valores numéricos de los parámetros obtenidos del análisis, ya que la expresión de  $i(t)$  y los valores obtenidos para los parámetros característicos, no contienen el ruido no distribuido al azar y, por lo tanto, no se puede comparar la gráfica experimental con la calculada,  $I_e(t)$ . Esto es, convolucionando  $i(t)$  obtenido por el método de los momentos, con  $L(T)$  proporciona una gráfica para  $I_e(t)$  que no concuerda con  $I_e(t)$  si en ésta hay ruido no distribuido al azar.



Nosotros hemos utilizado el método de los momentos, sólo para obtener una función de ajuste aproximada que nos sirviera como función de partida en un ajuste posterior por el método de mínimos cuadrados no lineal. En los casos en que, en este segundo análisis, apareció un tiempo de vida corto con un preexponencial negativo debido a la luz dispersa, se tomaron datos en las mismas condiciones experimentales que la muestra (incluido el tiempo de toma de datos), con una disolución de ácidos nucleicos sin etiquetar de la misma concentración que la de la muestra. Posteriormente, esta colección de datos se restó a los obtenidos con la muestra fluorescente, y la colección resultante se utilizó en un nuevo ajuste. Los resultados obtenidos carecieron del tiempo de vida corto con el preexponencial negativo y dieron un valor de  $\chi^2$  cercano a 1. En otras experiencias de comprobación de los resultados anteriores, se usaron filtros de corte en el canal de emisión de mayor longitud de onda, lo que evitó, en gran parte, la aparición de luz dispersa (aunque aumentó el tiempo de toma de datos, ya que la emisión fué menos intensa) (Yguerabide, comunicación personal). Los valores obtenidos con ambos métodos fueron sensiblemente similares. La disolución dispersora fue una suspensión de glucógeno en agua bidestilada en concentración suficiente como para poner el perfil de la almpara en un par de minutos.

Las medidas de pH se han realizado con un **potenciómetro** Radiometer pH M64 con un electrodo combinado GK2401C. Para su calibración se han usado tampones de referencia de la casa Crison. Otra instrumentación que también han sido utilizada es: una **balanza** analítica electrónica Sartorius modelo A-120 S, provista de sistema de calibración interno y externo, con desviación estándar  $\leq \pm 0'1$  mg y tiempo de respuesta 3 s. Un **generador de ondas ultrasónicas** Ultrason Selecta P, con generador de 150 W, que produce ondas sonoras de 40 KHz, posee temporizador sincronizado con lámpara de señalización. Una **microcentrífuga** analítica Sigma, modelo 112, con cabezal angular para 12 tubos eppendorf, que alcanza una velocidad de 13.000 rpm y dotada de controlador de tiempo y mecanismo de cierre de seguridad. Una **centrífuga** Homef LC-30, de 3.000 rpm, con rotor de capacidad para ocho tubos, y Un **rotavapor** Büchi Re111, provisto de baño termostático Büchi 461.

## **II. 2. MÉTODOS EXPERIMENTALES.**

En los siguientes apartados se van a describir las metodologías empleadas en la realización de la parte experimental de esta Memoria.



## **II. 2. 1. Extracción y purificación del ADN.**

En este epígrafe se describen los métodos utilizados en la extracción y purificación del ADN de *E. coli* y cADN hepático que se han empleado en las experiencias finales de la presente Memoria. Aunque ambas muestras de ADN me han sido gentilmente facilitadas por otros investigadores, se indicarán aquí brevemente las metodologías seguidas por éstos.

### *II. 2. 1. 1. Extracción y purificación del ADN de Escherichia coli.*

El ADN de *E. coli* fue obtenido por los directores de esta Tesis Doctoral, en el laboratorio del Prof. Juan Yguerabide del Departamento de Biología de la Universidad de California en San Diego, siguiendo un protocolo facilitado por el Dr. David E. Kohne.

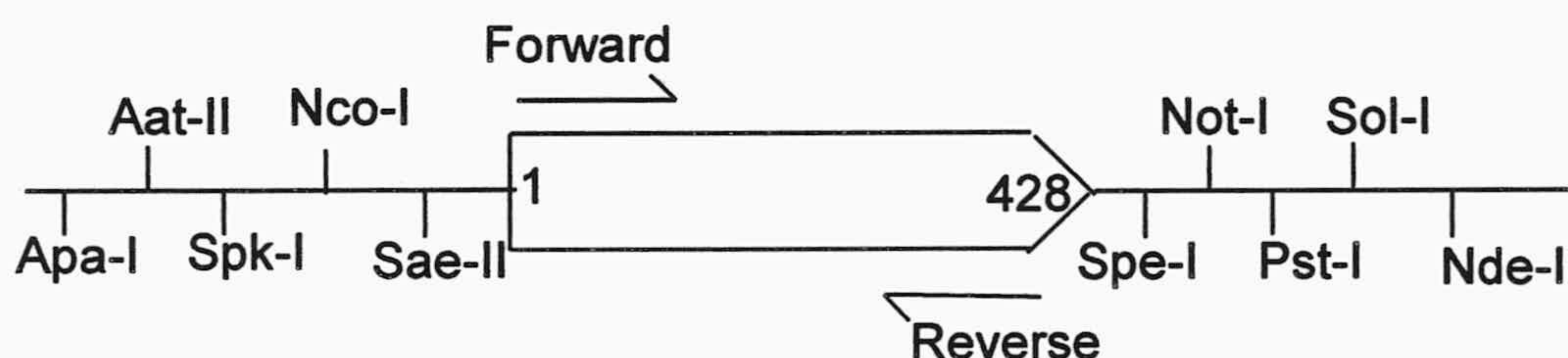
Se crecieron cultivos liofilizados de *E. coli* en un medio apropiado y las células se colectaron en una centrífuga refrigerada, con un rendimiento de unos 2 g por litro de cultivo. Las células en suspensión fueron lisadas por adición de dodecil sulfato sódico e incubadas con pronasa para romper las moléculas de proteínas. A continuación, los ácidos nucleicos fueron fragmentados al azar mediante pasos sucesivos de la suspensión por una jeringa con una aguja de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup> de sección. La disolución acuosa fue entonces extraída con fenol y, seguidamente, con una mezcla de fenol-cloroformo. Tras precipitación con etanol y NaCl 0'4 M, el precipitado, que contiene una mezcla de ADN y ARN, fue resuspendido en tampón Tris-HCl 0'1 M, AEDT 1 mM, pH 7'5. El siguiente paso fue la separación de ARN y ADN, para lo que se usó el método del LiCl (Sambrook y col., 1989) por su capacidad de recuperar ambas clases de ácidos nucleicos.

### *II. 2. 1. 2. Síntesis y purificación de ADN de cadena doble y sencilla (procedente de hígado de rata).*

La síntesis de ADN de cadena doble y sencilla se ha realizado mediante una reacción de amplificación basada en la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) utilizando como molde un fragmento del gen de la Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa de rata. Este fragmento se encuentra clonado en un plásmido, pRS3, que es el que ha servido de molde para la amplificación.



El fragmento del gen de la Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa se ha obtenido a partir de una genoteca de cADN  $\lambda$ gt11 de hígado de rata. Esta genoteca se ha utilizado para llevar a cabo una amplificación utilizando dos oligonucleótidos como cebadores de una reacción de PCR. Los oligonucleótidos utilizados corresponden a fragmentos de la secuencia descrita para el gen de la Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa humana (Science 269: 549-552 (1995)). El producto amplificado de 428 pares de bases de longitud ha sido clonado en el vector pGEM-T (promega) y al plásmido resultante se ha denominado pRS3 (figura II.1).



**GAPDH-Forward:**

5'-CCCACGGCAAGTTCAACGG-3'

**GAPDH-Reverse:**

5'-CTTTCCAGAGGGGCCATCCA-3'

**Figura II.1.** Esquema de los cebadores utilizados en la PCR.

A partir del plásmido pRS3 se han llevado a cabo amplificaciones del inserto. Para obtener el producto de amplificación correspondiente al fragmento de 428 de doble cadena se ha realizado un PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos *GAPDH-Forward* y *GAPDH-Reverse* (figura II.1). Para la obtención de los fragmentos de ADN de hebra sencilla se han llevado a cabo PCR asimétricos en los que se ha utilizado como molde el plásmido pRS3 linealizado con el enzima de restricción *Pst-I* (hebra codificante) o *Apa-I* (hebra no codificante) y un único oligonucleótido como cebador. En el caso de la hebra codificante el oligonucleótido empleado ha sido el *GAPDH-Forward*, mientras que en el caso la hebra no codificante el oligonucleótido utilizado ha sido el *GAPDH-Reverse*.



Las condiciones de amplificación utilizadas tanto en el caso de los fragmentos de cadenas dobles como los de cadena sencilla han sido 45 ciclos de amplificación con una temperatura de desnaturalización de 91°C durante un minuto, una temperatura de hibridación de 55°C durante un minuto y una temperatura de extensión de 72°C durante un minuto. En todos los casos, los productos amplicados se han separado mediante electroforesis en agarosa al 1% y se han purificado mediante electroelución de acuerdo con las técnicas descritas (Sambrock y col., 1989).

## **II. 2. 2. Modificación de los ácidos nucleicos.**

El procedimiento experimental seguido para modificar el ácido polirribocitídílico, poli (C), y el ADN (tanto de *E. coli* como el cADN hepático de rata), que se han utilizado en las posteriores experiencias, se ha llevado a cabo en dos etapas. En la primera de ellas, se ha reemplazado el grupo amino en la posición N<sup>4</sup> de una pequeña fracción de los residuos citosina de los ácidos nucleicos con etilendiamina, usando la reacción de intercambio catalizada por bisulfito descrita por Shapiro y col. (1970). En la segunda etapa se ha provocado la reacción entre el grupo amino libre de los ácidos nucleicos modificados con etilendiamina y un fluoróforo con un grupo reactivo específico de aminas. En este epígrafe se describe el procedimiento experimental seguido en la primera de las dos etapas mencionadas, mientras que la metodología correspondiente a la segunda etapa se describirá en el epígrafe II. 2. 4.

Así, la primera etapa de transaminación de los ácidos nucleicos, se llevó a cabo con una disolución acuosa que contiene etilendiamina 3 M y bisulfito sódico 1 M. La mencionada disolución se preparó de la siguiente manera: en un recipiente lleno de hielo picado, se situó un tubo de ensayo con 1 ml de agua bidestilada y 1 ml de ácido clorhídrico (12 N), a esta mezcla agua-ácido se le añadió 1 ml de etilendiamina gota a gota. A continuación se disolvieron 0'475g de bisulfito sódico (algo del bisulfito sódico no se disuelve bien, por lo que se aconseja agitar continuamente con un agitador magnético hasta el final de la reacción) y se ajustó el pH de la disolución obtenida hasta pH = 6, con ácido clorhídrico (12 N) (esta adición debe efectuarse también gota a gota porque en caso contrario hay liberación de SO<sub>2</sub>). Todas estas operaciones se tienen que realizar en campana de gases, para prevenir eventuales emanaciones tóxicas. Una vez alcanzado el pH deseado,



se llevó la disolución hasta un volumen de 5 ml con agua bidestilada. La disolución suele presentar un leve color amarillo.

Cuando se modificó poli (C), se preparó una disolución de éste de concentración 10 mg/ml, en Tris-HCl 10mM, AEDT 1mM, pH = 7'5 y otra de hidroquinona en etanol del 96%, con una concentración de 200 mg/ml. Seguidamente se mezclaron 200  $\mu$ L de la disolución de poli (C), con nueve volúmenes del aducto etilendiamina-bisulfito sódico (1800  $\mu$ L) y 50  $\mu$ L de hidroquinona (esta última sirve para eliminar los radicales libres generados) y se dejó reaccionar la mezcla durante 20-25 minutos a 42°C al objeto de modificar un 5%, aproximadamente, de los restos citosina (Jackson e Yguerabide, 1991). Cuando se modificó ADN, la concentración de la disolución de ácidos nucleicos fue sensiblemente menor, debido a la escasa disponibilidad de éstos. Además, el tiempo de reacción se aumentó hasta 60 min. En el caso particular de la modificación de ADN de *E. coli*, antes de proceder a ésta, se calentó el ADN a 95°C durante 5 min. e, inmediatamente, se enfrió en un baño de hielo picado, al objeto de que el ADN quede desnaturalizado, formando cadenas simples.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, ésta se detuvo situando el tubo de ensayo en hielo picado y añadiendo 100  $\mu$ L de tampón Hepes 1 M, pH 10. Para eliminar el exceso de reactivos y productos de bajo peso molecular presentes en la disolución, se dializó la mezcla frente a tampón fosfato 20 mM, pH  $\geq$  8'5, durante toda la noche con agitación continua, teniendo la precaución de que el pH no baje de 7'7, lo que implica el cambio de tampón unas 3 ó 4 veces durante la operación de diálisis. Después de ésta, los ácidos nucleicos modificados se precipitaron con un volumen 2'5 veces superior de etanol del 96 % y a la disolución resultante se le añadió cloruro sódico, hasta una concentración 0'4 M.

### **II. 2. 3. Síntesis del cloruro de $\gamma$ -(piren-4-il) butirilo.**

La síntesis del cloruro de ácido correspondiente al ácido 4-(1-pireno) butírico, consiste en la sustitución del grupo hidroxilo del mencionado ácido por un cloruro, lo que se ha realizado siguiendo las indicaciones de Kao y col. (1978). Para esta sustitución se preparó una disolución de 2'3 g de ácido 4-(1-pireno) butírico en 50 ml de benceno, que contiene 2 gotas de piridina como catalizador. A esta disolución se añadieron 5 ml de cloruro de oxalilo, gota a gota, y se llevó a un baño de ultrasonidos durante 30 minutos, lo



que genera suficiente energía para la reacción. Una vez transcurrido este tiempo, se eliminó el exceso de cloruro de oxalilo y de benceno, por destilación a presión reducida en un rotavapor. El producto obtenido se almacenó en un desecador, bajo atmósfera inerte para evitar su hidrólisis, hasta su utilización.

#### **II. 2. 4. Etiquetado de los ácidos nucleicos con los distintos fluoróforos de interés.**

Los ácidos nucleicos modificados según la metodología descrita en el epígrafe II. 2. 1, se han etiquetado con distintos derivados reactivos del grupo amino, correspondientes a los variados fluoróforos de interés que se han utilizado en nuestros estudios.

##### *II. 2. 4. 1. Etiquetado con cloruro de sulfonil pireno y cloruro de $\gamma$ -(piren-4-il) butirilo.*

Una vez sintetizado el cloruro de  $\gamma$ -(piren-4-il) butirilo, se procedió al etiquetado de poli (C) con este fluoróforo, y al de poli (C) y ADN con cloruro de sulfonil pireno, haciendo uso de las indicaciones realizadas por Liu y col. (1981). En una experiencia típica, se disolvieron de 10 a 1000  $\mu\text{g}$  de ácidos nucleicos modificados por transaminación, en 200  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato sódico 5 mM, AEDT 1 mM, pH 7.5, en un tubo eppendorf. Seguidamente se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de Hepes 1 M, pH 10, para mantener el pH superior a 8, ya que la hidrólisis de los cloruros de ácido pueden disminuir significativamente el pH. Inmediatamente antes de la operación de etiquetado, se preparó una disolución de cloruro de sulfonil pireno (6 mg/ml en acetona) o de cloruro de  $\gamma$ -(piren-4-il) butirilo de igual concentración. La disolución de poli (C) o ADN se situó en un termostato a 37°C y se le añadió un volumen igual (300  $\mu\text{L}$ ) de la disolución del fluoróforo en alícuotas de 50  $\mu\text{L}$ , agitando energicamente, a intervalos de tiempo de 10 minutos hasta un tiempo total de reacción de 1 hora. La adición fraccionada de esta última disolución, evita la precipitación del poli (C) o ADN modificados, que no son muy solubles en acetona. En algunos casos en los que apareció un precipitado blanco en el fondo del tubo de reacción, se recuperó el precipitado por centrifugación y se resuspendió en 300  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato por vigorosa agitación. La parte de precipitado que no se redisolvió se desechó después de otra centrifugación. Posteriormente, se reunieron los sobrenadantes de la primera y segunda centrifugación.



Una vez etiquetados los ácidos nucleicos, se precipitaron con etanol del 96% y cloruro sódico 0'4 M, tal como se indicó en el epígrafe II. 2. 2 y, finalmente, se disolvieron en tampón Tris-HCl 10 mM, AEDT 1 mM, pH 7'5, y se almacenaron a 4°C hasta su uso. La precipitación con alcohol y cloruro sódico no suele eliminar totalmente el exceso de pireno no enlazado, ya que éste es poco soluble en agua. Por ese motivo, es necesario recurrir a una etapa cromatográfica en Sephadex G-25. Para tal fin, se rellenó una columna de 5 cm x 5 mm<sup>2</sup> con mencionado gel y se añadieron, por la cabeza de la columna, 400 µL de la disolución de ácidos nucleicos etiquetados, procedentes de la anterior precipitación. La micro-columna cromatográfica se introdujo en un tubo de centrifuga y se sometió al campo gravitatorio generado por la rotación de la centrifuga a 3.000 rpm, durante 5 min. Al cabo de este tiempo se recogieron, en el fondo del tubo, unos 400 µL de la disolución de ácidos nucleicos etiquetados, sin contaminación con el fluoróforo libre. La pureza de los ácidos nucleicos se comprobó precipitando la muestra de poli (C) o ADN recogida de la cromatografía y observando la ausencia de la emisión fluorescente del pireno en el sobrenadante. Usualmente, resulta conveniente repetir la operación cromatográfica al objeto de conseguir los ácidos nucleicos sin ningún resto de contaminación por el fluoróforo libre.

#### *II. 2. 4. 2. Etiquetado con isotiocianatos de fluoresceína y de pireno.*

El procedimiento de etiquetado con los isotiocianatos de ambos fluoróforos presenta algunas diferencias con respecto al anterior. La metodología fue descrita por primera vez por Reines y Shulman (1979) y básicamente, las diferencias con el procedimiento descrito anteriormente estriban en que el disolvente empleado para adicionar los fluoróforos fué dimetilsulfóxido (DMSO), por lo que, debido a la solubilidad de los ácidos nucleicos en DMSO, no es necesario que la adición del fluoróforo sea fraccionada, ya que no hay precipitación de los ácidos nucleicos. En lo referente al tiempo de incubación, éste puede ser más corto y la temperatura de incubación más baja. Así, es suficiente con 30 minutos a 37°C para conseguir que todos los grupos amino-modificados se etiqueten con el fluoróforo. Por último, en el caso de etiquetado con fluoresceína, la eliminación del colorante no enlazado a los ácidos nucleicos se alcanzó con repetidas precipitaciones de la muestra con etanol y cloruro sódico 0'4 M, aunque lógicamente la cromatografía en Sephadex G-25 proporciona también excelentes resultados.



*II. 2. 4. 3. Etiquetado con cloruro de 1-sulfonil 5-dimetilamino naftaleno y cloruro de sulfonil antraceno.*

En estas dos operaciones, se ha empleado la misma metodología de los epígrafes anteriores. En el caso de etiquetado con cloruro de sulfonil antraceno se utilizó DMSO, mientras que para el cloruro de 1-sulfonil 5-dimetilamino naftaleno, se empleó acetonitrilo (ACN). Debido a la solubilidad de los ácidos nucleicos en DMSO y ACN, no es necesario que la adición del fluoróforo sea fraccionada. Al igual que con isotiocianato de fluoresceína, la eliminación del colorante no enlazado a los ácidos nucleicos se alcanzó mediante repetidas precipitaciones de la muestra con etanol y cloruro sódico 0'4 M, aunque la cromatografía en Sephadex G-25 también proporcionó buenos resultados.

**II. 2. 5. Determinación del porcentaje de marca.**

El espectro de absorción de la fluoresceína, pireno, o cualquier otro fluoróforo enlazado covalentemente a los ácidos nucleicos, puede cambiar con respecto al que presenta el colorante libre. Además, a la longitud de onda en torno a los 260 nm, hay una superposición de la absorbancia de los fluoróforos y de los ácidos nucleicos, por lo que habrá de tenerse en cuenta la contribución de la absorbancia del fluoróforo en el cálculo de la concentración de poli (C) o de ADN.

Por estos motivos, en un primer estadio, se determinó la cantidad de fluoróforo incorporado a los ácidos nucleicos, por hidrólisis de poli (C) etiquetado con fluoresceína. A tal fin, se incubó el material etiquetado en NaOH 0'3 M a 37°C durante unas 16 horas, al objeto de que todo el colorante sea liberado del conjugado, una vez transcurrido este tiempo se neutralizó con HCl. Debido a que el espectro de absorción de la fluoresceína libre depende del pH (Diehl, 1989), se ajustó éste a 7'0 mediante la adición de tampón Tris-HCl 0'1 M, diluyendo adicionalmente la disolución hasta mantener una absorbancia menor de 0'5 unidades a 495 nm. Bajo tales condiciones, se midió la absorbancia a 495 nm, usándose un coeficiente de extinción molar de  $6'43 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Ballesteros y col., 1998) para calcular la concentración de fluoresceína en el hidrolizado. Seguidamente se midió la absorbancia del hidrolizado a 268 nm, que es la del máximo de absorción del poli (C), y se restó la absorbancia debida al fluoróforo a esa longitud de onda, haciendo uso del coeficiente de extinción molar de la fluoresceína a 268 nm (Ballesteros y col., 1998) y de la concentración



de colorante anteriormente calculada. Todos estos cálculos se resumen en la siguiente expresión, que ha sido la utilizada para determinar la relación colorante-nucleótido, cuando la etiqueta luminiscente fué la fluoresceína.

$$\% \text{ etiquetado} = \% \frac{[F]}{[N]} = \frac{A_{495} \cdot \epsilon_{268}^N}{\epsilon_{495}^F \cdot (A_{268} - A_{495} \frac{\epsilon_{268}^F}{\epsilon_{495}^F})} \cdot 100 \quad (23)$$

en donde [F] es la concentración de fluoresceína en moles·L<sup>-1</sup>, [N] es la concentración de polinucleótido expresada en moles·L<sup>-1</sup> de la base citosina, A<sub>268</sub> y A<sub>495</sub> son las absorbancias del hidrolizado a 268 nm y a la longitud de onda del máximo de absorción de la fluoresceína, respectivamente;  $\epsilon_{268}^N$  y  $\epsilon_{268}^F$  son los coeficientes de extinción molar del poli (C) y fluoresceína a 268 nm, respectivamente, y  $\epsilon_{495}^F$  es el coeficiente de extinción molar de la fluoresceína a la longitud de onda de su máximo de absorción (495 nm). En la ecuación (23) se ha considerado que el poli (C) no presenta absorción apreciable a 495 nm y que el paso de luz a través de la célula de absorción es de 1 cm. El coeficiente de extinción molar del poli (C) a 268 nm, se calculó aplicando la ley de Beer a disoluciones de concentración conocida, en tampón Tris-HCl 0'1 M, AEDT 1 mM, pH 7'0.

Aunque la ecuación anterior está escrita en términos de fluoresceína y poli (C), es fácil generalizarla a cualquier otro fluoróforo y ácido nucleico, sin más que sustituir los valores de las longitudes de onda por aquellos característicos de las absorciones del fluoróforo y ácido nucleico utilizados. En el correspondiente apartado de resultados, se detalla el cálculo de los coeficientes de extinción molar de los distintos colorantes y ácidos nucleicos empleados, a las longitudes de onda que se han usado para determinar el porcentaje de marca fluorescente.

La extensión del etiquetado se calculó también de una forma rápida y aproximada en conjugados intactos de fluoresceína-poli (C), por espectroscopía de absorción, mediante la utilización de la expresión (23) y el uso de un coeficiente de extinción molar a 495 nm para la fluoresceína, calculado a partir de los datos obtenidos en las anteriores experiencias de hidrólisis. Para ésto, se dividió la absorbancia a 495 nm del conjugado de poli (C)-fluoresceína, a pH 7'0, por la concentración calculada de fluoresceína después de efectuar la hidrólisis a la disolución anterior y corregir el resultado por el efecto de la dilución motivada por la adición del álcali y del tampón.



En los casos de polinucleótidos enlazados a pireno, dansilo y antraceno, se llevaron a cabo similares experiencias y cálculos que en el caso del conjugado de fluoresceína. Los coeficientes de extinción molar del pireno a 268 nm y 355 nm se calcularon aplicando la ley de Beer a las absorbancias obtenidas con disoluciones de ácido pireno butírico de concentraciones conocidas, en tampón Tris-HCl 0'1 M, AEDT 1 mM, pH 7'5. Los coeficientes de extinción molar del antraceno a 268 y 359 nm se calcularon aplicando la ley de Beer a las absorbancias obtenidas con disoluciones de cloruro de sulfonil antraceno de concentraciones conocidas, en tampón Tris-HCl 0'1 M, AEDT 1 mM, pH 7'5. Los coeficientes de extinción molar del dansilo a 268 y 313 nm se calcularon aplicando la ley de Beer a las absorbancias obtenidas con disoluciones de cloruro de 1-sulfonil 5-dimetilamino naftaleno de concentraciones conocidas, en tampón Tris-HCl 0'1 M, AEDT 1 mM, pH 7'5. En las experiencias en que se calculó la extensión del etiquetado en ADN, la longitud de onda utilizada para el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos fue 260 nm, por lo que los coeficientes de extinción molar de la fluoresceína y del pireno, que son los únicos fluoróforos con los que se ha etiquetado ADN, se calcularon también a 260 nm, con la misma metodología citada para las otras longitudes de onda.

Los porcentajes de marca empleados en nuestros estudios oscilan entre el 2 y 4%, excepto en un caso en que se etiquetó poli (C) con cloruro de sulfonil pireno en una extensión mayor, al objeto de detectar la emisión de los excímeros del mencionado fluoróforo. Dada la importancia del porcentaje de etiquetado, en los distintos apartados de la sección de resultados, se detallará éste para cada experiencia en particular.

## **II. 2. 6. Detección fluorimétrica en estado estacionario de la hibridación de poli (C) con poli (I).**

En una primera etapa, se han realizado las experiencias de detección de la hibridación de poli (C) marcado con distintos fluoróforos, mediante espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario. Todos los espectros se han obtenido en condiciones de alta sensibilidad y velocidad de barrido baja. Las longitudes de onda de excitación empleadas fueron distintas para cada fluoróforo y seleccionadas de tal modo que no haya contribución de luz dispersa, ni del Raman del agua, en la región de emisión. Por esta misma razón, las rendijas de emisión y de excitación se ajustaron a 15 Å, que es la más estrecha que permite el instrumento, ya que las concentraciones utilizadas proporcionan señales de



fluorescencia aceptables en lo referente a su medida cuantitativa, con las condiciones instrumentales descritas. La temperatura en todos los casos se ha mantenido constante a 25°C mediante circulación de agua impulsada por un baño externo termostatzado de alta precisión.

En un experimento típico, se disolvió poli (C) etiquetado, a concentración apropiada, en tampón de hibridación Tris-HCl 20 mM, AEDT 1 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5. Sobre 500  $\mu$ L de esta disolución, se añadieron sucesivos volúmenes de una disolución madre de poli (I), de concentración superior a la de poli (C), preparada igualmente en tampón de hibridación. El volumen total de poli (I) adicionado, debe proporcionar una concentración superior a la relación molar 1:1, poli (C) etiquetado/poli (I). Tras cada adición, la muestra se agitó suavemente y antes de registrar el correspondiente espectro de fluorescencia, se esperaron unos 15 minutos, que es el tiempo necesario para que se produzca totalmente la hibridación y se alcance el equilibrio térmico. Las condiciones experimentales de la hibridación para cada fluoróforo etiquetado, en lo que se refiere a la longitud de onda de excitación, intervalo de emisión y concentraciones empleadas, se describe en el correspondiente epígrafe de resultados.

## **II. 2. 7. Medidas con fluorescencia polarizada en estado estacionario de la hibridación de poli (C) con poli (I).**

Las experiencias con fluorescencia polarizada en estado estacionario se llevaron a cabo introduciendo un polarizador de calcita en los canales de excitación y de emisión del fluorímetro, por lo que la geometría utilizada en nuestras medidas fue el formato en L, que utiliza un solo canal de emisión. Esta geometría permite fácilmente restar la contribución de la luz dispersa a la medida de la anisotropía, aunque de forma secuencial.

Previamente a las medidas de anisotropía se calculó el factor G, que como se indicó en el apartado I. 6. 2 es un factor de corrección debido a que el conjunto del monocromador de emisión, fotomultiplicador y óptica asociada, no detecta con la misma eficiencia la luz polarizada vertical y horizontalmente. El factor G es la relación de sensibilidades del sistema de detección (canal de emisión) para la luz polarizada vertical y horizontalmente y resulta función de la longitud de onda de detección. Se calcula mediante la siguiente expresión:



$$G = \frac{S_V}{S_H} = \frac{S_V I_{\perp}}{S_H I_{\perp}} = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (6)$$

Donde los subíndices de  $I_{HV}$  e  $I_{HH}$  indican la orientación de los polarizadores de excitación y emisión respectivamente. Una vez obtenido el factor  $G$ , la anisotropía se calculó por la ecuación (9).

En una serie de experiencias, se ha calculado el valor de la anisotropía, en estado estacionario, cuando a una disolución de fluoróforo-poli (C) en tampón de hibridación, se adicionaron cantidades crecientes de disolución de poli (I) en el mismo tampón. Las adiciones se efectuaron en las mismas condiciones experimentales que en los estudios de hibridación sin el uso de polarizadores, tal y como se ha detallado en el epígrafe anterior. De forma similar a lo que en éste se indicó, las condiciones experimentales de cada medida, se describirán en el correspondiente apartado de resultados.

En las experiencias con pireno-poli (C), los valores de  $I_{VV}$  y de  $I_{VH}$ , en estado estacionario, de disoluciones de pireno-poli (C) sin hibridar y completamente hibridado con poli (I), han tenido un especial significado en nuestros estudios, por lo que se obtuvieron realizando 10 medidas de cada intensidad de fluorescencia y calculando, posteriormente, su media aritmética. En estas experiencias, la longitud de onda de excitación fue 350 nm y la de emisión 380 nm.

En otra serie de experiencias con fluorescencia polarizada en estado estacionario, se ha llevado a cabo un estudio de hibridación, similar a los descritos en el epígrafe anterior, con pireno-poli (C) y poli (I), pero en el que se ha recorrido el espectro de emisión, situando el polarizador de excitación en la posición vertical y el de emisión en el ángulo mágico,  $54^{\circ}7'$ . La longitud de onda de excitación fue 350 nm.

## II. 2. 8. Cálculo de los tiempos de vida de fluorescencia del conjugado pireno-poli (C).

El estudio fluorimétrico de hibridación de homopolinucleótidos marcados con pireno, se ha realizado también con resolución temporal, ya que estos datos facilitan la interpretación de los resultados obtenidos en estado estacionario. La medida de los tiempos



de vida de fluorescencia se ha efectuado con 500  $\mu\text{L}$  de una disolución de pireno-poli (C) de concentración  $10^{-4}$  M, en tampón de hibridación, a la que se adicionaron, sucesivamente, distintos volúmenes de una disolución de poli (I)  $5 \cdot 10^{-4}$  M en el mismo tampón. Tras cada adición, se alcanzaron las siguientes relaciones molares  $[\text{pireno-poli (C)}]/[\text{poli (I)}]$ , expresadas en bases nucleotídicas: 0'15, 0'29, 0'44, 0'58, 0'87, 1'02, 1'16 y 1'31. Después de cada adición se agitó suavemente la muestra y tras esperar unos 15 minutos para que la hibridación sea completa, se registró su espectro temporal en el fluorímetro de nanosegundos. En la excitación de la muestra se empleó un filtro de interferencias FT-370 de  $\lambda_{\text{max}} = 370$  nm y semiancho de 10 nm. En el canal de emisión se utilizó un filtro de corte de 420 nm. Las muestras fueron termostalizadas a 25°C. Las curvas de desactivación de fluorescencia se analizaron mediante un programa de reconvolución basado en el método de ajuste no lineal por mínimos cuadrados, que se describió en el apartado II. 1. 2. También se han obtenido los tiempos de vida de pireno-poli (C), procedente del etiquetado con isotiocianato de pireno y de este pireno-poli (C) totalmente hibridado con poli (I). Las condiciones experimentales, en lo que se refiere a las concentraciones de homopolímeros, temperatura y longitudes de onda de excitación y emisión, fueron las mismas que en las anteriores experiencias con pireno-poli (C).

## **II. 2. 9. Cálculo de los tiempos de vida de fluorescencia del conjugado pireno-poli (C) y pireno-poli (C)-poli (I), con fluorescencia polarizada.**

Para realizar estas medidas del decaimiento de la fluorescencia con luz polarizada, se incorporaron polarizadores en los canales de excitación y de emisión del fluorímetro de nanosegundos. Así, se midió el decaimiento de la fluorescencia de una disolución  $10^{-4}$  M de pireno-poli (C) en tampón de hibridación y de otra disolución de pireno-poli (C) y poli (I), ambos  $10^{-4}$  M, en el mismo tampón. El polarizador de excitación se situó en posición vertical y el de emisión en las posiciones, vertical, horizontal y 54'7°, sucesivamente. En la excitación y emisión de las muestras se emplearon los mismos filtros que en las experiencias descritas en el epígrafe anterior. Las muestras fueron termostalizadas a 25°C.



## II. 2. 10. Estudios cinéticos de hibridación.

Se han realizado diversos estudios cinéticos, encaminados fundamentalmente a determinar la influencia de la marca fluorescente en la velocidad de formación de la doble cadena. Obviamente, también se ha calculado el orden de la reacción. Los estudios se realizaron por fluorimetría en estado estacionario y se han llevado a cabo con pireno-poli (C) y con fluoresceína-ADN de *E. coli*.

### II. 2. 10. 1. Cinética de hibridación de pireno-poli (C) con poli (I).

Se han registrado las señales de fluorescencia, a la longitud de onda del máximo de emisión, en función del tiempo, de disoluciones de pireno-poli (C) con poli (I), ambos a la misma concentración inicial, en tampón Tris HCl 10 mM, AEDT 1 mM, pH 7.5, adicionado de NaCl a distintas concentraciones comprendidas en el intervalo desde 1 mM hasta 1 M. En cada experimento particular la concentración inicial de pireno-poli (C) y de poli (I) fue la misma, aunque las concentraciones absolutas de homopolinucleótidos se variaron, según fué la concentración salina adicionada. En todas las experiencias se mantuvo la temperatura constante a 25°C mediante circulación de agua impulsada por un baño termostático de gran precisión ( $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ). Durante el tiempo que duró la toma de datos, las muestras se mantuvieron bajo agitación suave. La lectura de las intensidades se tomó, de forma programada en el fluorímetro de estado estacionario, cada 10 s, aunque cuando la reacción fue muy lenta, el tiempo de lectura se amplió hasta 1 min.

### II. 2. 10. 2. Cinética de reasociación de fluoresceína-ADN de *E. coli*.

En los experimentos realizados para establecer la cinética de renaturación de ADN procedente de *E. coli*, etiquetado con fluoresceína, se ha empleado un ADN con un porcentaje de marca del 3.8%, disuelto a concentración  $7.5 \cdot 10^{-5}$  M (expresada en bases), en una mezcla formada por: tampón de fosfato sódico-disódico 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7.5 / etanol, en relación 80/20. Una vez preparada la anterior disolución, se calentó ésta hasta 80°C durante 5 min. y, rápidamente, se situó en el porta-muestras termostático del fluorímetro, que se mantuvo a 45°C durante el tiempo que duró el experimento. Seguidamente, se registró la señal de emisión, a 515 nm, con suave agitación continua. La



longitud de onda de excitación fué de 480 nm.

### **II. 2. 11. Fusión de ADN de *E. coli*.**

En los experimentos de fusión mediante la medida de la hipercromicidad, los fragmentos de ADN obtenidos según la metodología descrita en el epígrafe II. 2. 2, así como los procedentes de la transaminación y del subsiguiente etiquetado con fluoresceína, se disolvieron en tampón de fosfatos 0'1 M, AEDT 1 mM, pH 7'5 y se llevaron a un espectrofotómetro con control externo de temperatura. En casos determinados, el disolvente fue tampón de fosfatos 0'1 M, TEACl 2'4 M, AEDT 1 mM, pH 7'5. Una vez en el espectrofotómetro, se controló la temperatura a 25°C y se monitorizó la absorbancia de forma continua a la longitud de onda de 260 nm. Seguidamente se procedió al calentamiento de la muestra en etapas discontinuas de 2°C cada 5 min. Cada experimento se repitió tres veces, y con los resultados obtenidos se calculó el valor medio y la desviación estándar.

En los experimentos de fusión mediante fluorimetría, se disolvieron los fragmentos de ADN etiquetados con fluoresceína, en tampón de fosfatos 0'1 M, TEACl 2'4 M, AEDT 1 mM, pH7'5, a una concentración de  $3 \cdot 10^{-8}$  M, expresada en bases de nucleótidos. Se tomaron dos alícuotas de ADN-fluoresceína, con el 3'8% de marca, y se reasociaron mediante calentamiento a 80°C y posterior reacción a 45°C durante dos días. Una de las alícuotas se calentó a 80°C durante 5 min. e inmediatamente se enfrió en hielo, al objeto de obtener las cadenas sencillas de ADN-fluoresceína. Seguidamente, las dos alícuotas se llevaron a un espectrofluorímetro con control externo de temperatura y se calentaron tal como se ha descrito en el parágrafo anterior, registrandose sus señales de fluorescencia a 515 nm, con excitación a 480 nm. El experimento se repitió 3 veces y se calculó el valor medio del resultado así como su desviación estándar.



***RESULTADOS Y  
DISCUSIÓN***



### III. 1. MARCAJE DE ÁCIDOS NUCLEICOS CON FLUORÓFOROS.

#### III. 1. 1. Transaminación de ácidos nucleicos.

De entre los variados métodos de modificar ácidos nucleicos para etiquetarlos con diversos fluoróforos de interés que han sido utilizados hasta ahora por diferentes autores, se ha escogido el descrito en el apartado II.2.2 por cumplir con determinados requisitos que simplifican el desarrollo del proyecto de investigación en que se encuadra el presente estudio. Mencionados requisitos se pueden resumir en los siguientes: ❶ que el esquema de modificación sea simple y aplicable a todos los tipos de ácidos nucleicos; ❷ que permita el etiquetado con fluoróforos muy distintos; ❸ que se utilicen reactivos e instrumentación económicamente asequibles y ❹ que el fluoróforo pueda resultar afectado directamente por el ácido nucleico diana cuando éste hibride con la sonda.

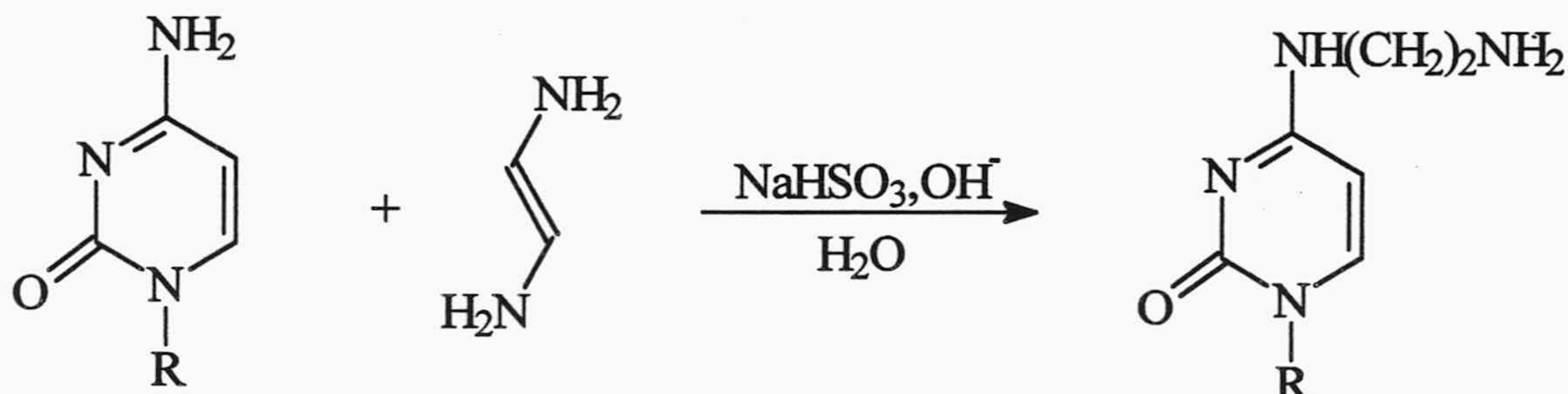


Figura III.1- Esquema de reacción para la modificación de ácidos nucleicos.

La figura III.1 muestra el esquema general de la reacción utilizada en la modificación de ácidos nucleicos que contienen restos citosina, para generar derivados transaminados. El método ha sido empleado con poli (C), ADN de *E. coli* y cADN hepático procedente de rata, con similares resultados.

Draper (1984) ha comprobado que se puede convertir el 95% de poli (C) en poli (aminoetil-C), después de someter aquel a reacción, durante 3 horas a 42 °C, en etilendiamina 3 M y bisulfito sódico 2'5 M, a pH 5'5. La extensión de la modificación depende fuertemente del pH y así, a pH < 5'0, la citosina puede sufrir una desaminación y



formar uracilo (Draper, 1984; Shapiro y col., 1970). Jackson (1991) ha demostrado que, a pH 6.0, la reacción de transaminación en poli (C) transcurre con una velocidad aceptable, de forma que hay una clara proporcionalidad entre el porcentaje de modificación y el tiempo de reacción, por lo que resulta fácil el control de la extensión del porcentaje de modificación, deteniendo la reacción mediante enfriamiento y diálisis. Sus resultados también muestran que, tras 20 minutos de reacción, se modifican, aproximadamente, el 5% de los residuos citosina. En contraste, la modificación de ADN natural aumenta proporcionalmente con el tiempo sólo en los primeros estadios de la reacción, para luego alcanzar poco a poco una meseta. Se alcanza un 15% de modificación de los residuos citosina, aproximadamente, después de transcurrida una hora de reacción.

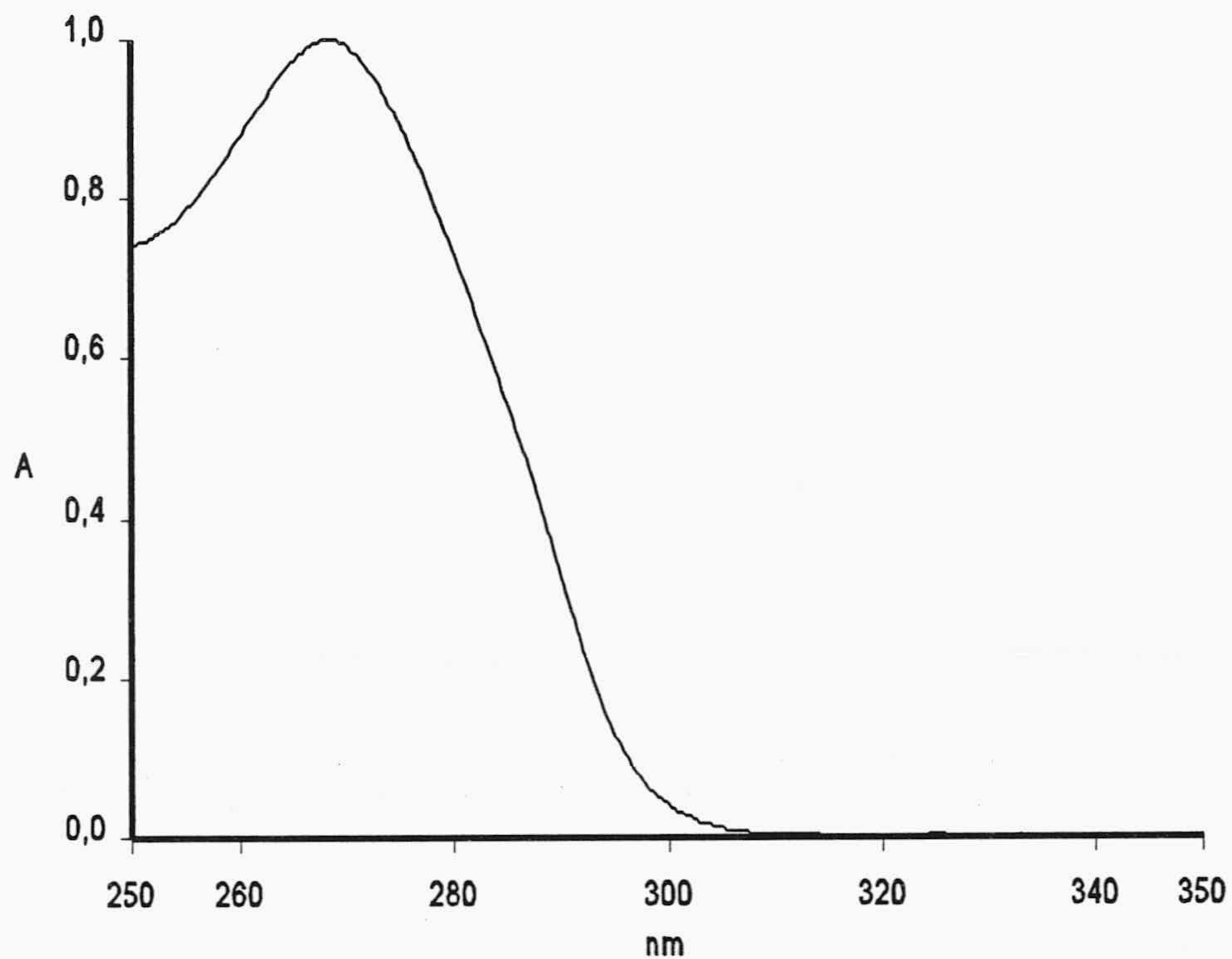
Algunos de los resultados anteriores se justifican en base a que poli (C) en disolución forma una estructura ordenada que, a pH neutro y concentración salina milimolar, no interactúa con la misma u otras cadenas (Broido y Kearns, 1982; Fasman y col., 1964). Sin embargo, en cadenas de ADN, parece que no es posible modificar cuantitativamente todos los residuos citosina en una sola etapa, debido a que la formación de estructuras secundarias y apareamiento de bases, impiden la conversión de algunos restos citosina. No obstante, nuestro principal objetivo es marcar polinucleótidos con etiquetas fluorescentes, de forma que se obtengan sondas con buenas características de hibridación y para esto se debe de modificar sólo un pequeño porcentaje del total de bases (1-5%), al objeto de que no se altere significativamente la capacidad de formar la doble cadena entre secuencias específicas (Jackson, 1991).

La figura III.2 muestra el espectro de absorción UV-Vis. normalizado, de una disolución de poli(C) modificado por N<sup>4</sup>-transaminación de concentración  $2 \cdot 10^{-4}$  M (expresada en bases citosina). La modificación de residuos citosina para obtener el derivado N<sup>4</sup>-aminoetilado no debe alterar el espectro de absorción UV-Vis. de los polinucleótidos no modificados, tal como se observa en la mencionada figura. En el presente epígrafe se han normalizado todos los espectros de absorción, al objeto de apreciar mejor el posible desplazamientos de sus máximos de absorción.

La mayor ventaja de este procedimiento de modificación es que se ha introducido un "brazo espaciador" con una amina activa en un lugar determinado, de forma que, a continuación, se puede utilizar cualquier reactivo específico de aminas para etiquetar los ácidos nucleicos aminoetilados. Este esquema de modificación química también se puede



usar para activar 5'-trifosfatos de deoxicitidina y citidina, que pueden incorporarse después a cadenas de ADN mediante nick-traslación o síntesis química automatizada.



**Figura III.2.-**Espectro de absorción UV-Visible entre 250 y 350 nm de poli(C) modificado por N-transaminación.

El procedimiento utilizado por nosotros es muy reproducible y fácil de llevar a cabo. Con él, se han modificado cantidades de ácidos nucleicos que oscilan entre 1  $\mu$ g y varios miligramos con los mismos resultados. Los tiempos de reacción para modificar poli (C) han oscilado entre 20 y 30 minutos, dependiendo de la solubilidad del fluoróforo que iba a emplearse en el subsiguiente etiquetado. En lo que se refiere a ADN, los tiempos de reacción fueron de 1 hora, al objeto de que se modificaran, aproximadamente, el 15% de las bases.



### **III. 1. 2. Marcaje de ácidos nucleicos N<sup>4</sup>-aminoetilados con fluoróforos que contienen reactivos específicos de aminas.**

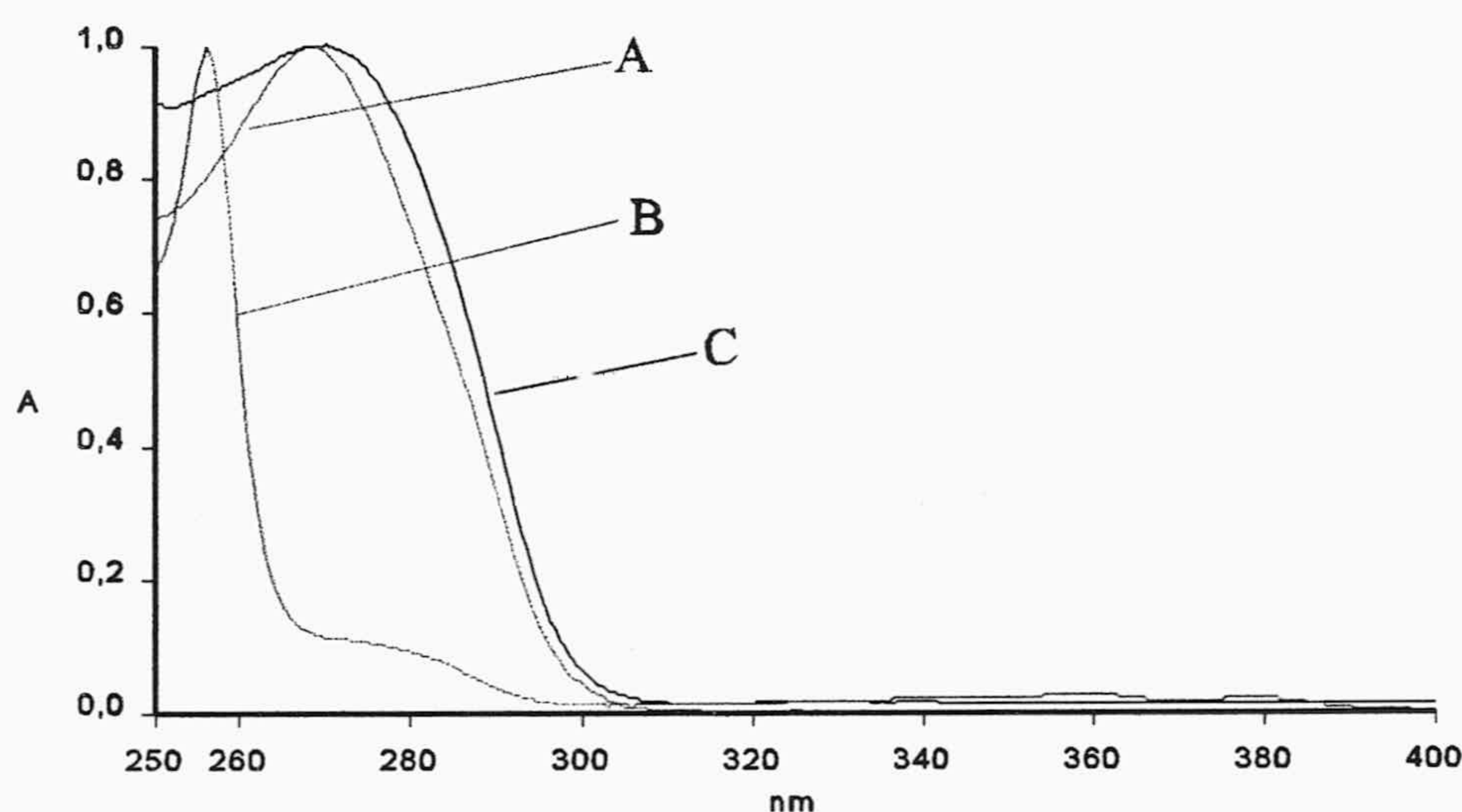
Una vez modificados los ácidos nucleicos se ha procedido a reaccionarlos con diversos fluoróforos de interés que contienen algún reactivo específico de aminas. Así se han utilizado derivados isotiocianato de fluoresceína y pireno, así como los cloruros de ácido correspondientes al antraceno, pireno, ácido pirenobutírico y dansilo. Cuando se han utilizado los derivados isotiocianato, se consigue el marcaje cuantitativo de los residuos citosina N<sup>4</sup>-aminoetilados, con todos los ácidos nucleicos, en una hora aproximadamente (Reines y Shulman, 1979). Sin embargo, cuando se han empleado los cloruros de ácido de pireno y antraceno, el etiquetado fluorescente no se produjo en todos los restos N<sup>4</sup>-aminoetilados, debido principalmente a la poca solubilidad de los derivados, bastante apolares, en los disolventes relativamente polares que es necesario emplear para que se solubilizan los ácidos nucleicos.

La purificación de los ácidos nucleicos etiquetados con los diversos fluoróforos, se ha realizado mediante repetidas precipitaciones con etanol y NaCl cuando se usó isotiocianato de fluoresceína en la reacción de marcaje, debido a la relativamente favorable solubilidad del derivado de fluoresceína en agua. Sin embargo, con fluoróforos más apolares, ha resultado beneficioso el empleo de columnas de Sephadex G-25, por su rapidez y buenos resultados. En todos los casos la última etapa se realizó por precipitación, al objeto de analizar el sobrenadante, ya que se ha utilizado como test de pureza la ausencia de señal fluorescente en el citado sobrenadante. Mientras hubo restos de fluorescencia, se volvieron a repetir las etapas cromatográficas y de precipitación.

En las figuras III.3 a III.6 se muestran los espectros de absorción UV-Vis. de poli(C) marcado con cada uno de los distintos fluoróforos empleados, después de purificados hasta que no se obtuvo señal fluorescente apreciable en el sobrenadante de la última etapa de purificación. No se muestra el espectro correspondiente al poli(C) marcado con isotiocianato de pireno, debido a que el marcado con cloruro de sulfonil pireno proporciona el mismo espectro de absorción. En todas las figuras se pueden observar bandas de absorción, que no corresponden a poli(C) y que son características de los fluoróforos empleados, aunque con ligeros desplazamientos respecto a las que presentan los fluoróforos libres en disolución.



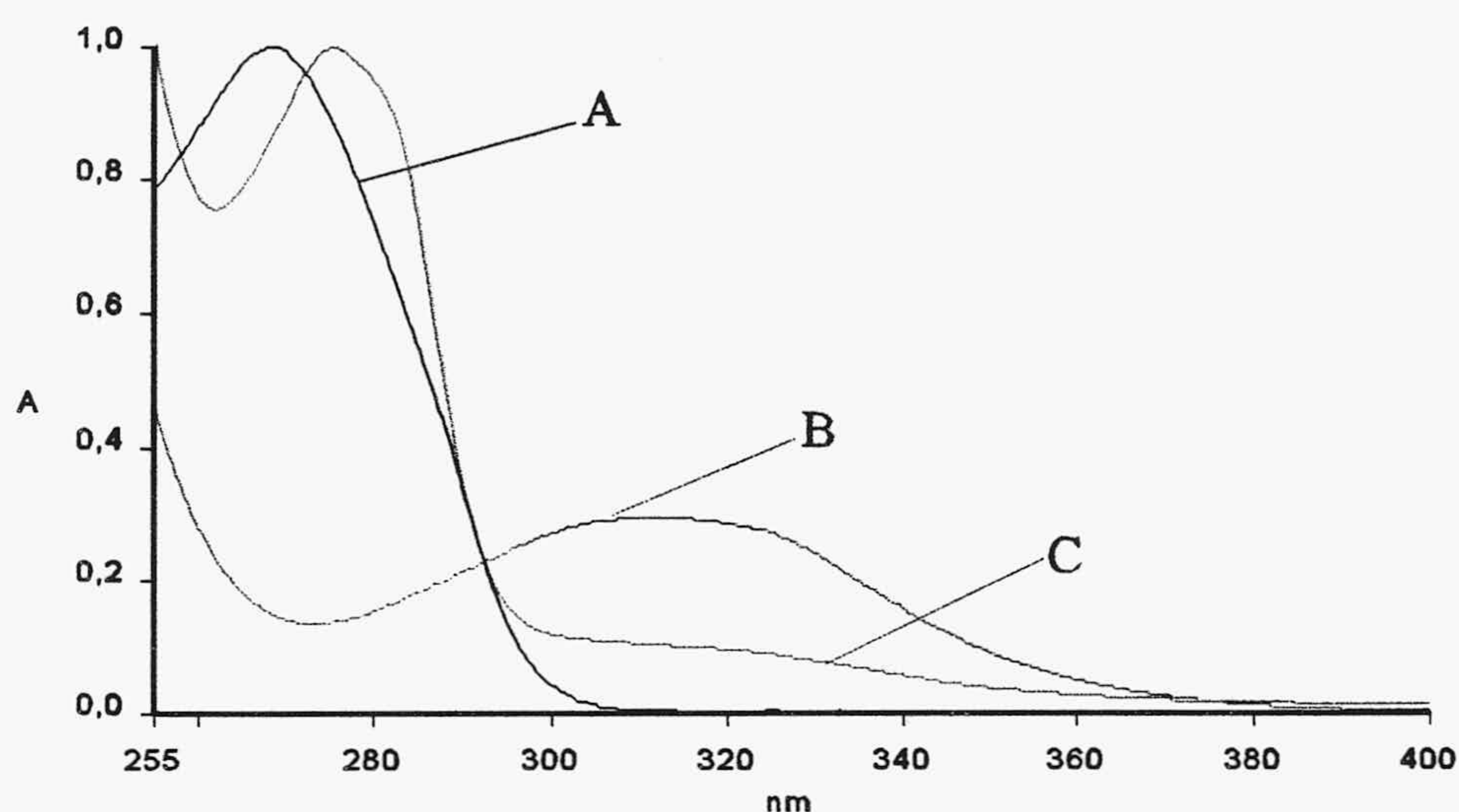
Así, en las figuras III.3 y III.4 se muestran, respectivamente, los espectros de absorción UV-Vis. normalizados, de disoluciones en tampón Tris-HCl 20 mM, AEDT 1 mM, pH 7,5, de antraceno-poli (C) ( $10^{-6}$  M) y dansilo-poli (C) ( $10^{-6}$  M), comparados, cada uno, con los de poli (C) sin marcar y el del correspondiente fluoróforo libre. En la figura III.3 la concentración del antraceno es de  $3 \cdot 10^{-5}$  M y la del poli(C) es de  $2 \cdot 10^{-4}$  M. En el caso del dansilo la concentración es de  $5 \cdot 10^{-5}$  M y la del poli(C) es la misma. En ambas figuras se observa la aparición de las bandas características de los correspondientes fluoróforos, en las cadenas de ácido polirribocitidílico etiquetado.



**Figura III.3.-** Espectros de absorción UV-Visible de: (A) poli(C), (B) antraceno y (C) poli(C)-antraceno.

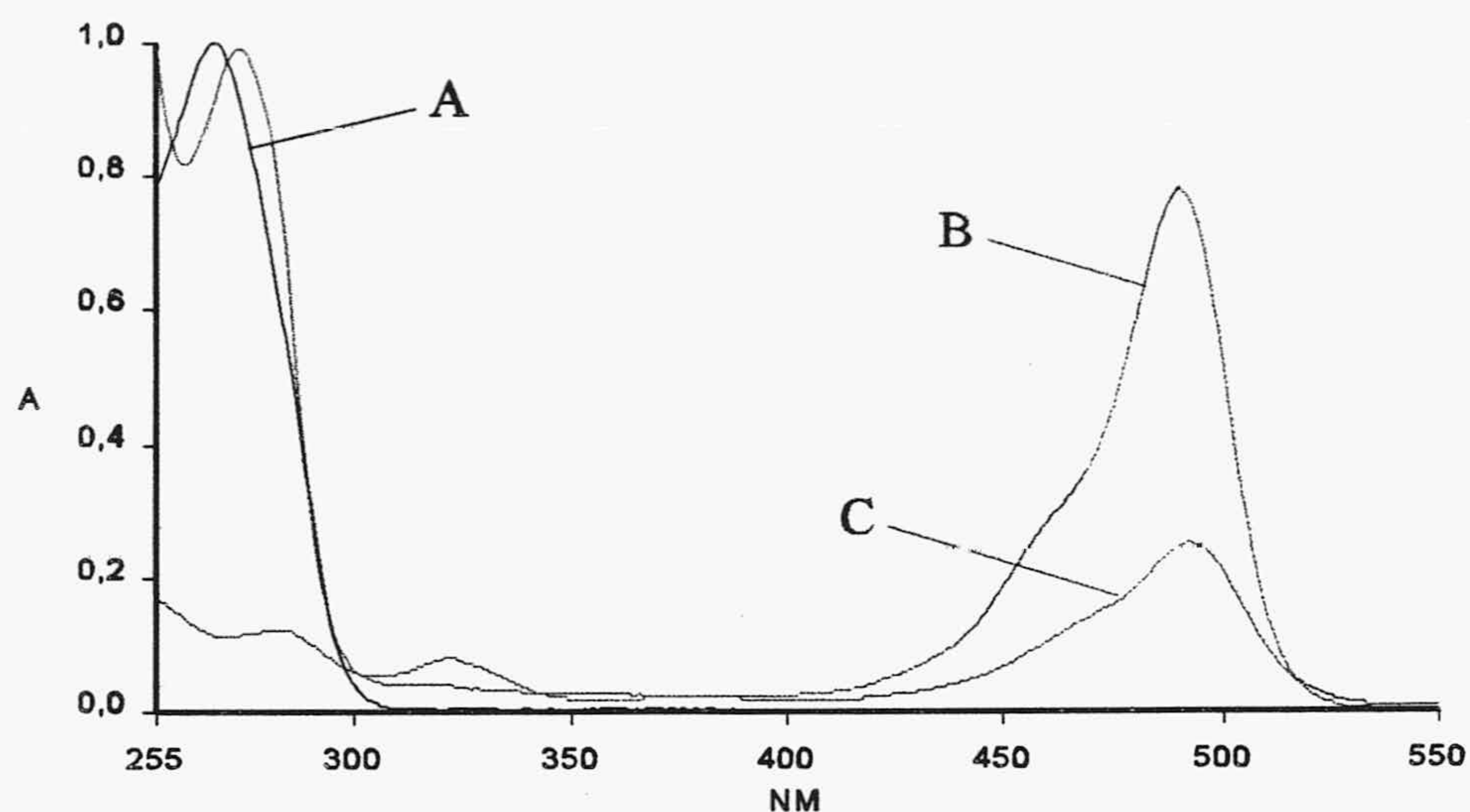
En experimentos control en los que se utilizó poli (C) sin la  $N^4$ -aminoetilación, para hacerlo reaccionar con cloruro de sulfonil antraceno, no se obtuvieron los ácidos nucleicos fluorescentemente etiquetados, como se demostró por el espectro de absorción UV-Vis., que no detectó la banda centrada en 359 nm, característica del poli (C) marcado con antraceno. Similares resultados se obtuvieron en otros experimentos control en los que, igualmente, se utilizó poli (C) sin la  $N^4$ -aminoetilación, para hacerlo reaccionar con cloruro de 1-sulfonil 5-dimetilamino naftaleno, cloruro de sulfonil pireno o con isotiocianato de fluoresceína, en ningún caso se obtuvieron los ácidos nucleicos fluorescentemente etiquetados, como se demostró por los espectros de absorción UV-Vis., que no detectaron las bandas características del poli (C) marcado con los fluoróforos mencionados.





**Figura III.4.-** Espectros de absorción UV-Vis. entre 255 y 400 nm de: (A) poli (C), (B) dansilo y (C) poli (C)-dansilo.

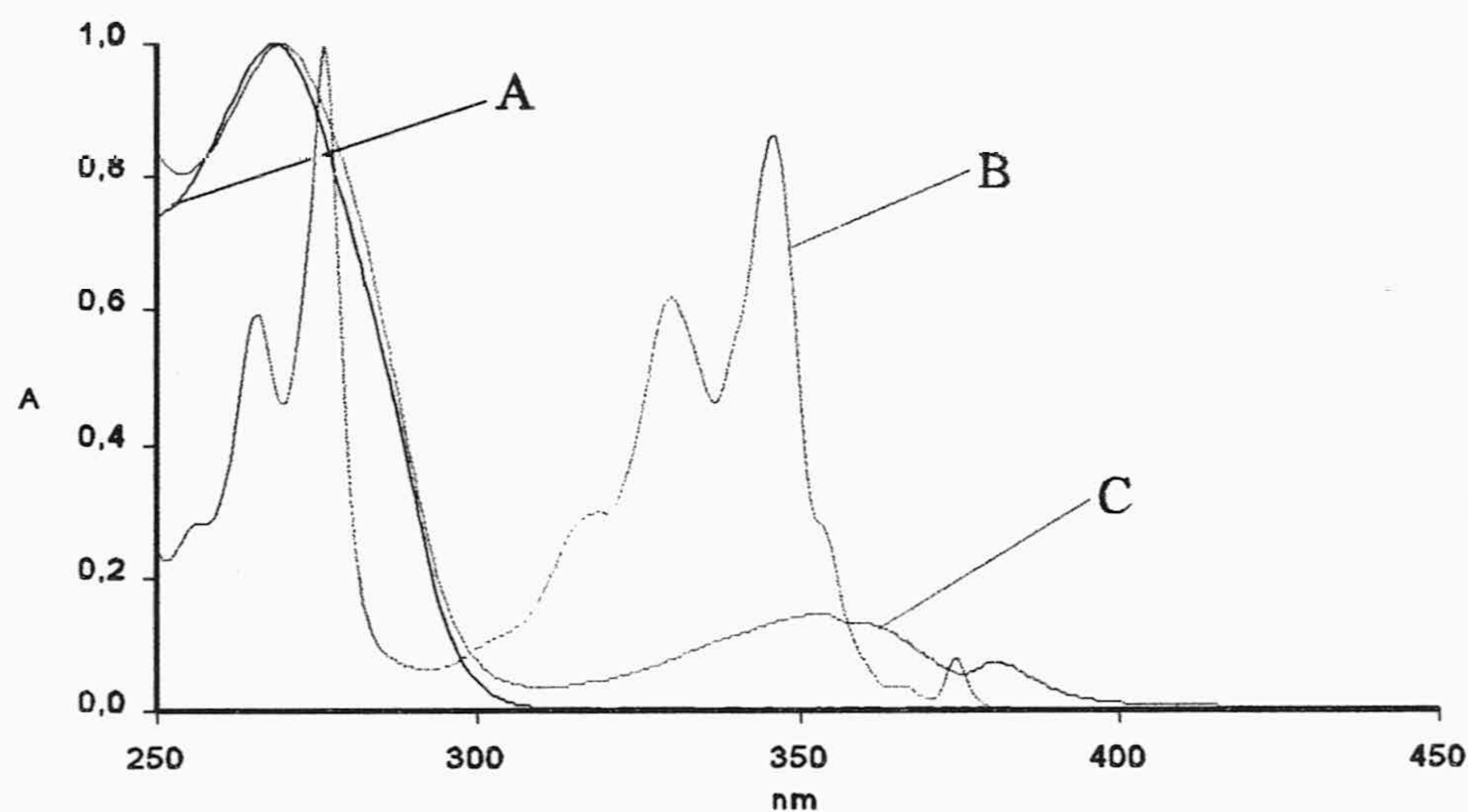
La figura III.5, presenta los espectros de absorción, registrados entre 255 y 550 nm, de fluoresceína-poli (C) ( $10^{-6}$  M), comparado con el correspondiente polinucleótido sin marcar ( $10^{-6}$  M) y con fluoresceína libre ( $5 \cdot 10^{-6}$  M), todos en el mismo disolvente, tampón Tris-HCl 20 mM, AEDT 1 mM, pH 7.5. El homopolinucleotido sintético etiquetado con fluoresceína, presenta una banda de absorción, ausente en este ácido nucleico sin marcar, que coincide aproximadamente con la banda correspondiente a la fluoresceína libre, con máximo a 494 nm.



**Figura III.5.-** Espectros de absorción UV-Visible entre 255 y 550 nm de: (A) poli (C), (B) fluoresceína y (C) poli (C)-fluoresceína.



En la figura III.6 se representan los espectros de absorción UV-Vis. registrados entre 240 y 400 nm, de disoluciones de poli (C)  $10^{-4}$  M (expresada en bases citosina), pireno-poli (C)  $1'5 \cdot 10^{-4}$  M y de ácido pirenobutírico  $2'5 \cdot 10^{-4}$  M, en tampón Tris-HCl 20 mM, AEDT 1 mM, pH 7'5. El poli (C) etiquetado muestra claramente la banda de absorción del pireno, que está ausente en poli (C) sin etiquetar. También se observa que mencionada banda se encuentra mucho menos estructurada y ligeramente desplazada hacia el rojo, con respecto a la banda correspondiente del ácido pirenobutírico. Estas características diferenciales pueden justificarse por los distintos ambientes que rodean al fluoróforo libre y al etiquetado a poli (C).



**Figura III.6.-** Espectros de absorción UV-Visible entre 250 y 450 nm de: (A) poli (C), (B) ácido pirenobutírico y (C) pireno-poli (C).



### III. 2. MEDIDAS DE ABSORCIÓN PARA EL CÁLCULO DE LA EXTENSIÓN DEL ETIQUETADO FLUORESCENTE.

La cantidad de fluoróforo incorporada a poli (C) se ha calculado mediante la ecuación (23), por medidas de absorbancia a 268 nm y en el máximo característico de cada fluoróforo en la región visible del espectro, mencionada ecuación proporciona la relación de marcaje en moles de fluoróforo por moles de bases citosina.

Previamente se han calculado los valores de los coeficientes de extinción molar de poli (C) y de los fluoróforos enlazados al ácido nucleico. Estos valores, se han determinado con los compuestos libres disueltos en el mismo medio en que se disolvieron los polinucleótidos etiquetados.

#### III. 2. 1. Cálculo del coeficiente de extinción molar de los homopolinucleótidos sintéticos y de los fluoróforos empleados como etiquetas fluorescentes.

Al objeto de poder aplicar la ecuación (23) para calcular el porcentaje de marca y de conocer de una forma sencilla la concentración de las disoluciones de polinucleótidos sintéticos que se han de utilizar en posteriores estudios, se han calculado los coeficientes de extinción molar de poli (C), poli (I), antraceno, dansilo y ácido pirenobutírico, todos ellos en tampón Tris-HCl 20 mM, AEDT 1 mM, pH 7'5.

En el caso de fluoresceína, no se han calculado los valores del coeficiente de extinción molar a las longitudes de onda de interés (260, 268 y 495 nm), debido a que los referidos cálculos han sido previamente realizados por nuestro grupo de investigación (Talavera y col., 1997). Los mencionados valores ya obtenidos, que se han utilizado en esta Memoria son:  $\epsilon_{260} \approx \epsilon_{268} = 1'74 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{495} = 6'43 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Con las restantes sustancias, se prepararon las correspondientes disoluciones de partida, se efectuaron las oportunas diluciones y se midieron sus absorbancias en el máximo característico. En las Tablas III.1 a III.8, se exponen los resultados obtenidos con cada compuesto estudiado. Con los valores de cada Tabla se ha representado la ley de Beer en las figuras III.7 a III.14.



## III. 2. 1. 1. Coeficiente de extinción molar del poli (C).

El coeficiente de extinción molar de poli (C) se ha calculado a 268 nm por ser éste el único máximo de absorción que presenta en el espectro UV-Vis. Se preparó por pesada una disolución  $1'11 \cdot 10^{-4}$  M (expresada en bases de citosina) en tampón Tris-HCl 20 mM, AEDT 1 mM, pH 7'5. A partir de esta disolución se prepararon las diluciones que figuran en la Tabla III.1 y se midieron sus absorbancias (en cubeta de 1 cm de paso de luz).

TABLA III-1

Valores de absorbancia de disoluciones de poli (C) en tampón Tris-HCl 20mM, AEDT 1mM, pH=7'5.

Volumen de tampón (ml)	Volumen de poli(C) (ml)	Concentración de poli (C)·10 <sup>5</sup> (M)	Absorbancia $\lambda=268\text{nm}$
4'0	1'0	2'22	0'117
3'5	1'5	3'33	0'169
3'0	2'0	4'44	0'226
2'5	2'5	5'55	0'280
2'0	3'0	6'66	0'340
1'5	3'5	7'77	0'397
1'0	4'0	8'88	0'450
0'5	4'5	9'99	0'500

En la figura III.7 se muestra la representación de la absorbancia a 268 nm frente a la concentración molar de poli (C). Los parámetros de ajuste por regresión lineal son: ordenada en el origen =  $4'82 \cdot 10^{-3}$ ; pendiente = 5000 y  $r^2 = 1$ . La aplicación de la ley de Beer proporciona un coeficiente de extinción molar igual a  $5000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .



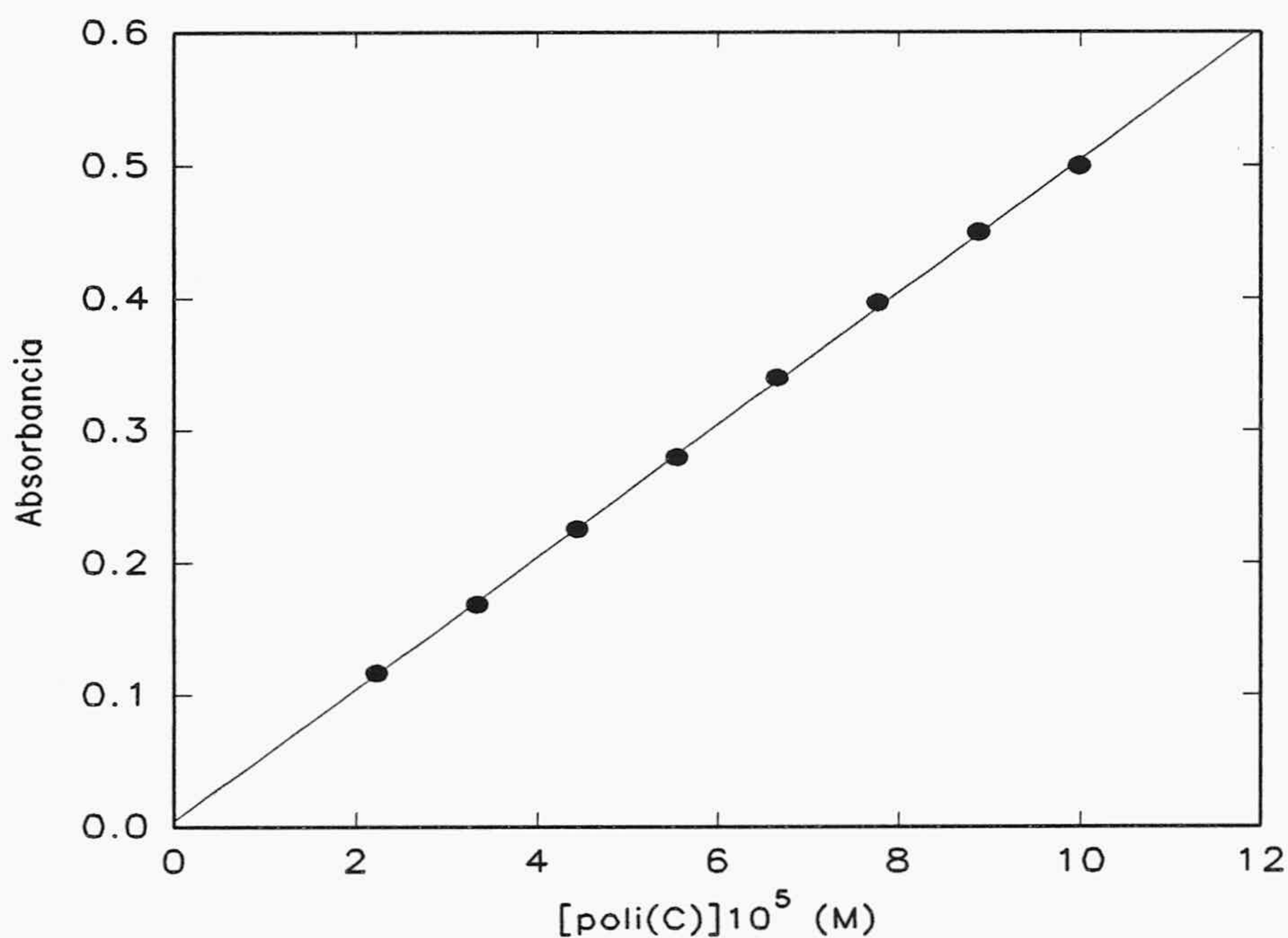


Figura III.7.- Representación de la ley de Beer para los datos de la tabla III.1.

### III. 2. 1. 2. Coeficiente de extinción molar del poli (I).

El coeficiente de extinción molar de poli (I) se ha calculado a 247 nm por ser éste el único máximo de absorción que presenta en el espectro UV-Vis. Se preparó por pesada una disolución  $1'15 \cdot 10^{-4}$  M (expresada en bases de inosina) en tampón Tris-HCl 20 mM, AEDT 1 mM, pH 7'5. A partir de esta disolución se prepararon las diluciones que figuran en la Tabla III-2 y se midieron sus absorbancias (en cubeta de 1 cm de paso de luz).



TABLA III.2

Valores de absorbancia de disoluciones de poli (I) a distintas concentraciones en tampón Tris-HCL 20 mM, AEDT 1 mM, pH=7'5.

Volumen de tampón (ml)	Volumen de poli(I) (ml)	Concentración de poli(I)·10 <sup>-5</sup> (M)	Absorbancia λ=247nm
4'0	1'0	2'29	0'208
3'5	1'5	3'44	0'311
3'0	2'0	4'59	0'414
2'5	2'5	5'74	0'507
2'0	3'0	6'88	0'613
1'5	3'5	8'03	0'706
1'0	4'0	9'18	0'813
0'5	4'5	10'30	0'909

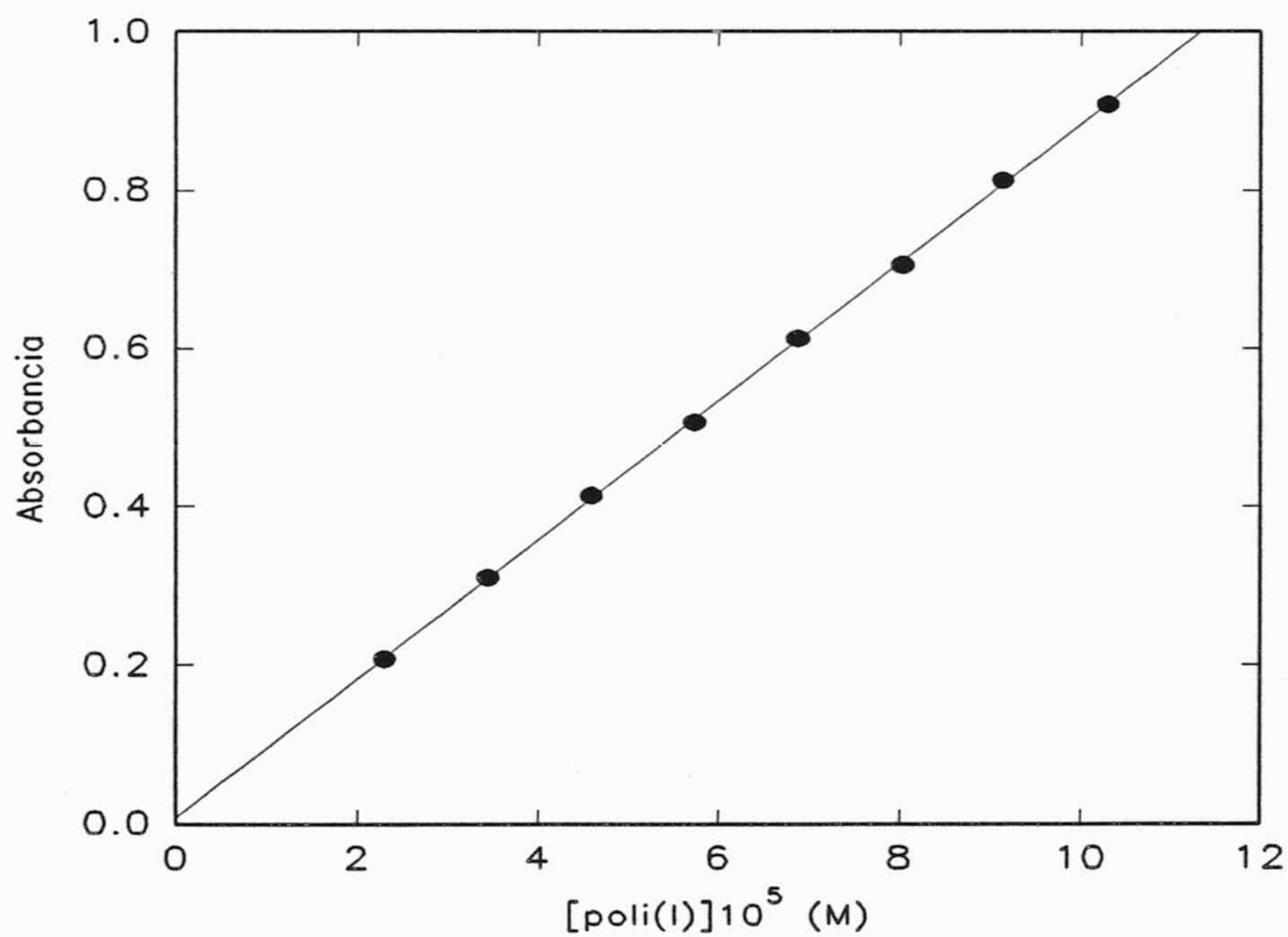


Figura III.8.- Representación de la ley de Beer para los datos de la tabla III.2.



En la figura III-8 se muestra la representación de la absorbancia a 247 nm frente a la concentración molar de poli (I). Los parámetros de ajuste por regresión lineal son: ordenada en el origen =  $8'85 \cdot 10^{-3}$ ; pendiente = 8750 y  $r^2 = 1$ . La aplicación de la ley de Beer proporciona un coeficiente de extinción molar igual a  $8750 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### III. 2. 1. 3. Coeficiente de extinción molar del antraceno.

Se ha calculado el coeficiente de extinción molar del ácido antranílico que es un derivado del antraceno soluble en agua. La determinación se ha realizado a 359 nm y a 268 nm. Se preparó por pesada una disolución  $2'17 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  de ácido antranílico en tampón Tris-HCl 20 mM, AEDT 1 mM, pH 7'5. A partir de esta disolución se prepararon las diluciones que figuran en las Tablas III.3 y III.4, midiéndose sus absorbancias a las longitudes de onda mencionadas, en cubeta de 1 cm de paso de luz.

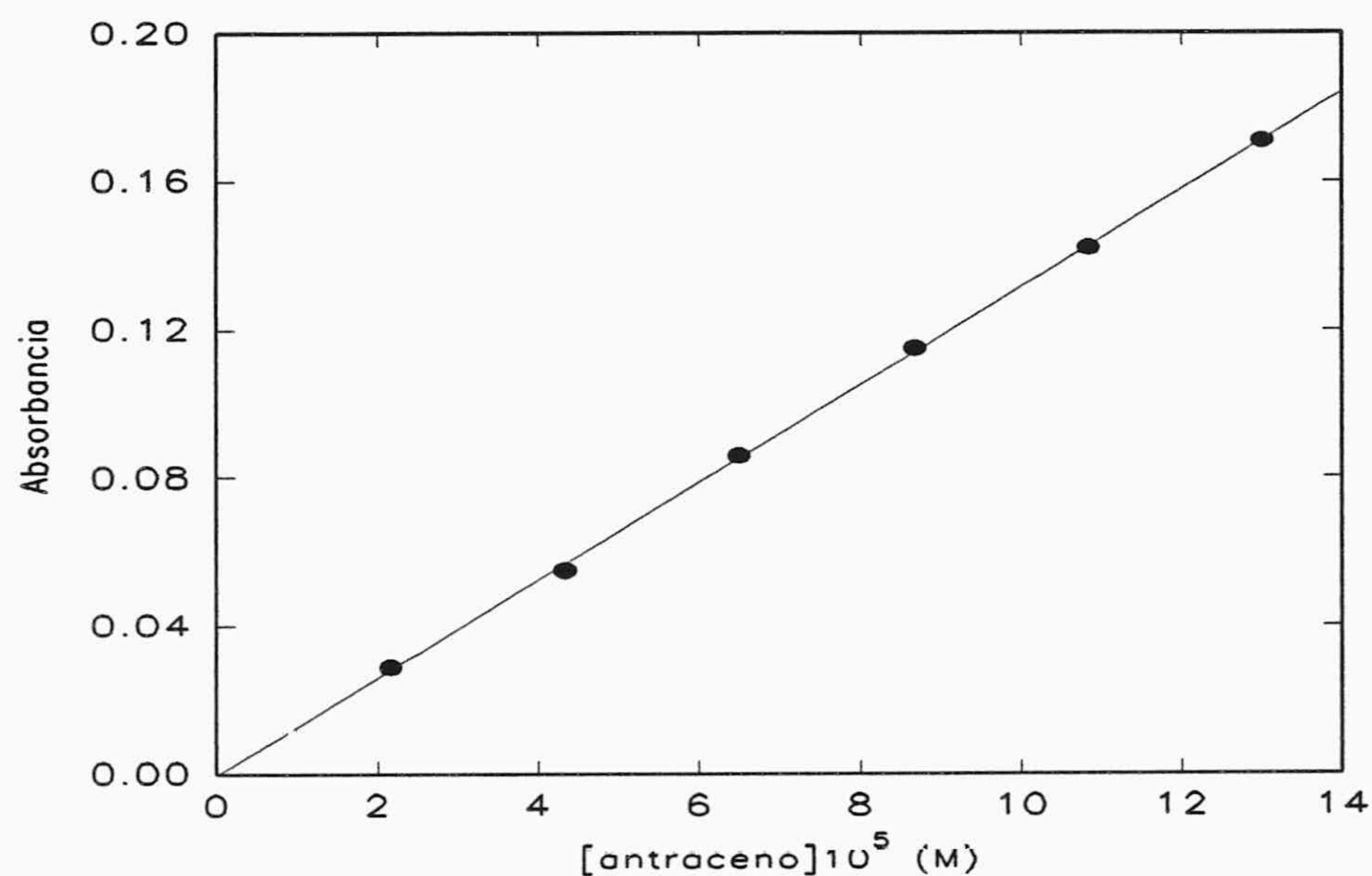
**TABLA III.3**

Valores de absorbancia de disoluciones de antraceno a distintas concentraciones en tampón Tris-HCL 20 mM, AEDT 1 mM pH=7'5.

Volumen de tampón ( $\mu\text{l}$ )	Volumen de antraceno ( $\mu\text{l}$ )	Concentración de antraceno $\cdot 10^5$ (M)	Absorbancia $\lambda=359\text{nm}$
900	100	2'17	0'029
800	200	4'34	0'055
700	300	6'50	0'086
600	400	8'67	0'115
500	500	10'84	0'142
400	600	13'01	0'171



En la figura III.9 se muestra la representación de la absorbancia a 359 nm frente a la concentración molar. Los parámetros de ajuste por regresión lineal son: ordenada en el origen =  $-3'50 \cdot 10^{-4}$ ; pendiente = 1318 y  $r^2 = 1$ . La aplicación de la ley de Beer proporciona un coeficiente de extinción molar igual a  $1318 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .



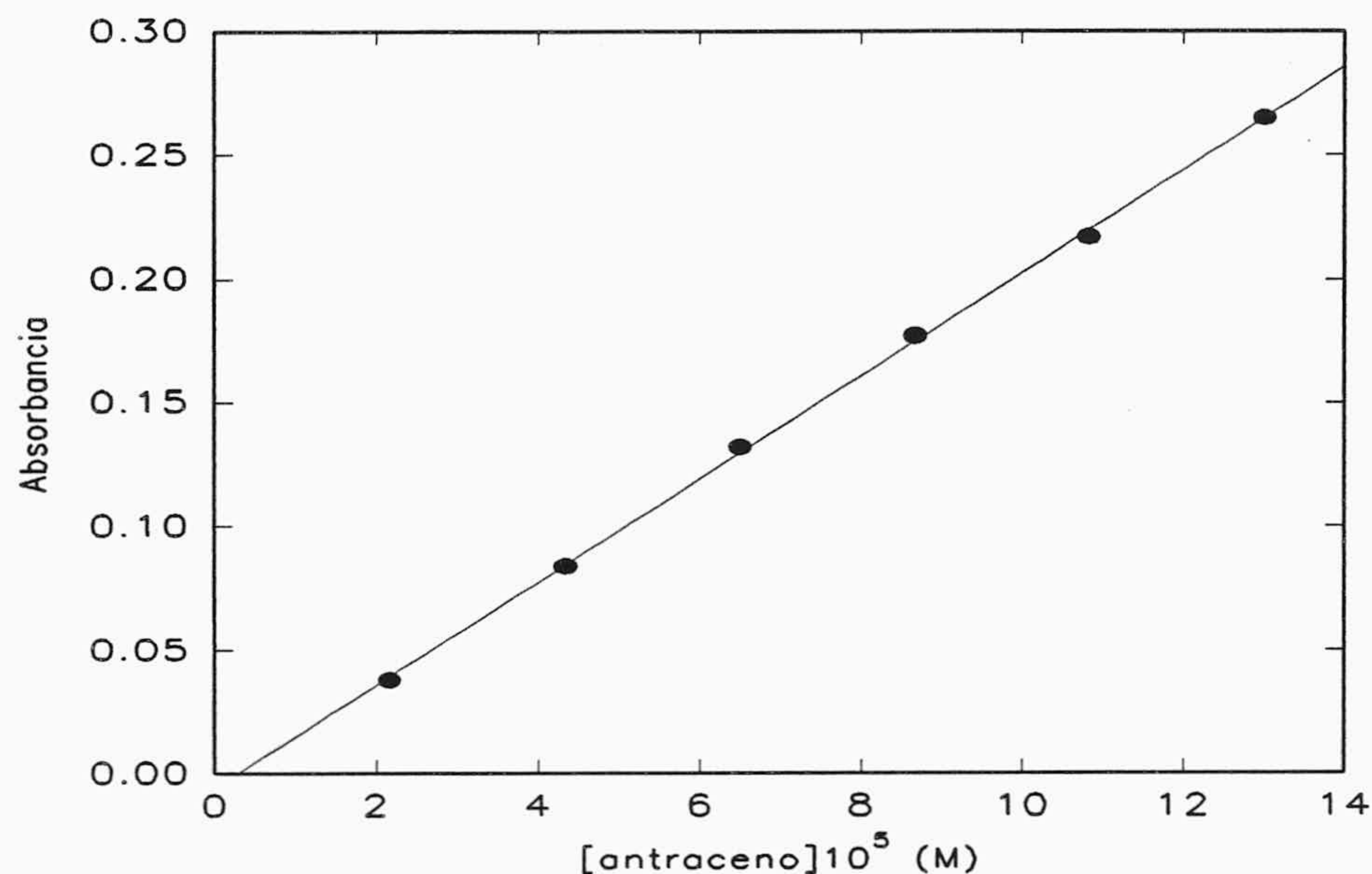
**Figura III.9.-** Representación de la ley de Beer para los datos de la tabla III.3.

**TABLA III.4**

Valores de absorbancia de disoluciones de antraceno a distintas concentraciones en tampón Tris-HCl 20 mM, AEDT 1 mM, pH=7.5.

Volumen de tampón ( $\mu\text{l}$ )	Volumen de antraceno ( $\mu\text{l}$ )	Concentración de antraceno $\cdot 10^5$ (M)	Absorbancia $\lambda=268\text{nm}$
900	100	2'17	0'038
800	200	4'34	0'084
700	300	6'50	0'132
600	400	8'67	0'177
500	500	10'84	0'217
400	600	13'01	0'265





**Figura III.10.-** Representación de la ley de Beer para los datos de la tabla III.4.

En la figura III.10 se muestra la representación de la absorbancia a 268 nm frente a la concentración molar de antraceno. Los parámetros de ajuste por regresión lineal son: ordenada en el origen =  $-5'76 \cdot 10^{-3}$ , pendiente = 2080 y  $r^2 = 1$ . La aplicación de la ley de Beer proporciona un coeficiente de extinción molar igual a  $2080 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### III. 2. 1. 4. Coeficiente de extinción molar del cloruro de dansilo.

Se han calculado los coeficientes de extinción molar del cloruro de dansilo a 313 nm y a 268 nm, que son las longitudes de onda a las que presenta los máximos de absorción característicos. Se preparó por pesada una disolución  $4'12 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  de cloruro de dansilo en tampón Tris-HCl 20 mM, AEDT 1 mM, pH 7'5. A partir de esta disolución se prepararon las diluciones que figuran en la Tabla III.5 y III.6, midiéndose sus absorbancias a las anteriores longitudes de onda, en cubeta de 1 cm de paso de luz.



TABLA III.5

Valores de absorbancia de disoluciones de dansilo a distintas concentraciones en tampón Tris-HCl 20 mM, AEDT 1 mM, pH=7.5.

Volumen de tampón( $\mu$ l)	Volumen de dansilo ( $\mu$ l)	Concentración de dansilo $\cdot 10^5$ (M)	Absorbancia $\lambda=313$ nm
970	30'0	1'23	0'059
950	50'0	2'06	0'097
930	70'0	2'88	0'131
910	90'0	3'70	0'170
890	110	4'53	0'212
870	130	5'35	0'252
850	150	6'18	0'291

En la figura III.11 se muestra la representación de la absorbancia a 313 nm frente a la concentración molar. Los parámetros de ajuste por regresión lineal son: ordenada en el origen =  $-1'32 \cdot 10^{-3}$ ; pendiente = 4710 y  $r^2 = 1$ . La aplicación de la ley de Beer proporciona un coeficiente de extinción molar igual a  $4710 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

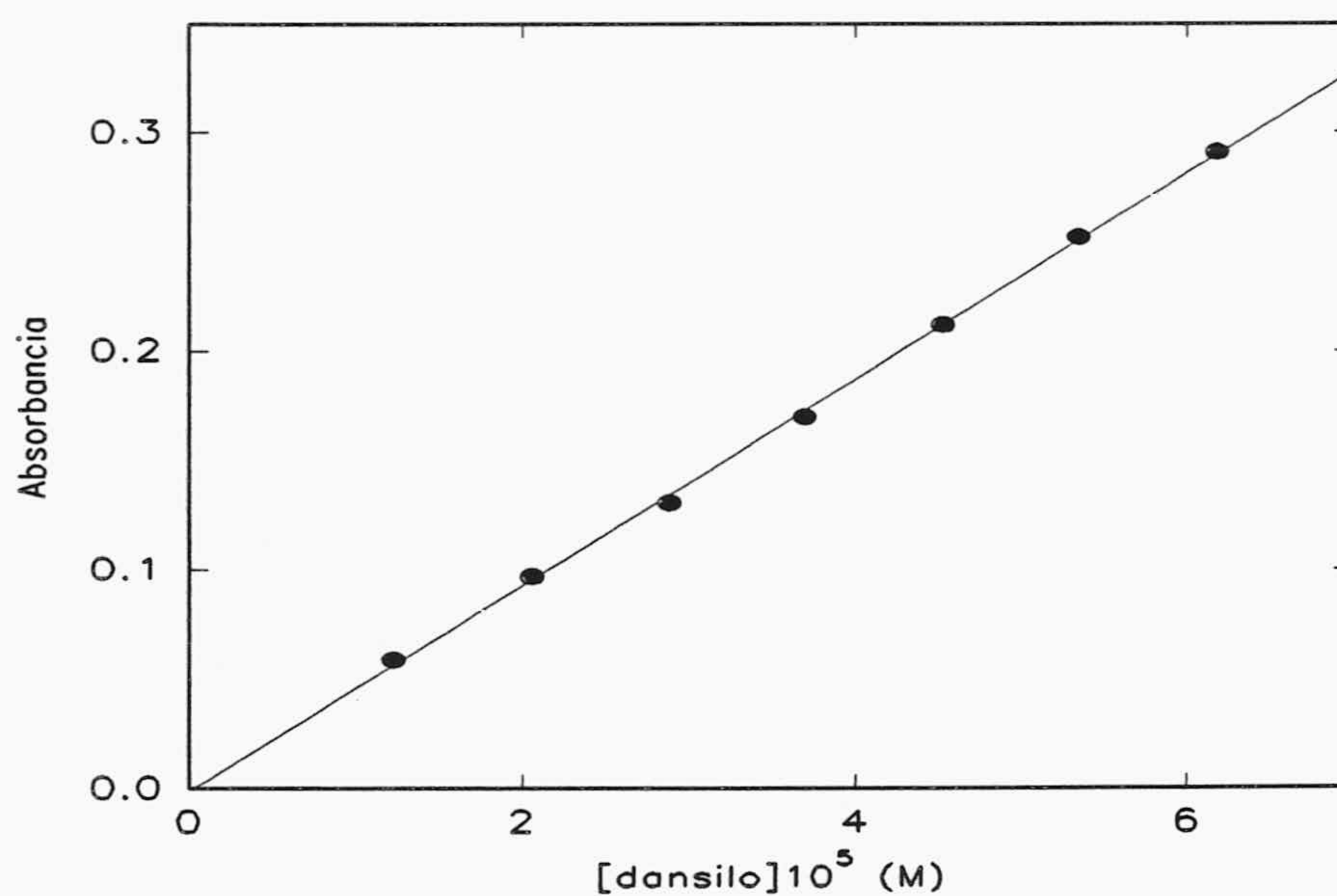


Figura III.11.- Representación de la ley de Beer para los datos de la tabla III.5.



TABLA III.6

Valores de absorbancia de disoluciones de dansilo a distintas concentraciones en tampón Tris-HCl 20 mM, AEDT 1 mM pH=7.5.

Volumen de tampón( $\mu$ l)	Volumen de dansilo ( $\mu$ l)	Concentración de dansilo $\cdot 10^5$ (M)	Absorbancia $\lambda=268\text{nm}$
970	30'0	1'23	0'022
950	50'0	2'06	0'039
930	70'0	2'88	0'053
910	90'0	3'70	0'069
890	110	4'53	0'089
870	130	5'35	0'105
850	150	6'18	0'123

En la figura III.12 se muestra la representación de la absorbancia a 268 nm frente a la concentración molar. Los parámetros de ajuste por regresión lineal son: ordenada en el origen =  $-4'16 \cdot 10^{-3}$ , pendiente = 2040 y  $r^2 = 1$ . La aplicación de la ley de Beer proporciona un coeficiente de extinción molar igual a  $2040 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

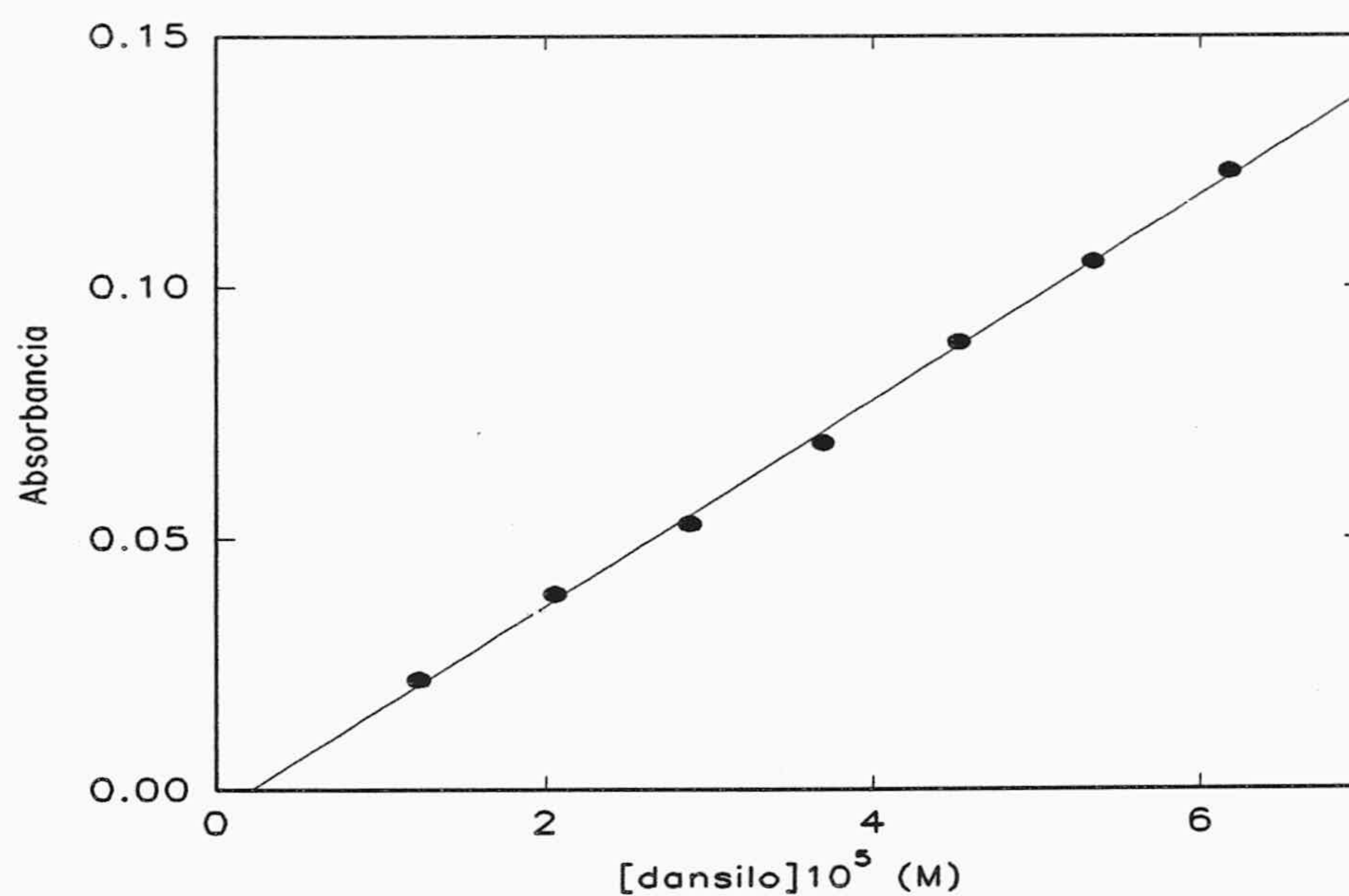


Figura III.12.- Representación de la ley de Beer para los datos de la tabla III.6.



## III. 2. 1. 5. Coeficiente de extinción molar del ácido pireno butírico.

Se ha calculado el coeficiente de extinción molar del ácido pireno butírico por ser un derivado del pireno soluble en tampón Tris-HCl 20 mM, AEDT 1 mM, pH 7.5. La determinación se ha realizado a 355 nm, que es la longitud de onda a la que presenta el máximo de absorción cuando está enlazado a poli (C) y a 268nm que es el máximo del poli(C) . Se preparó por pesada una disolución  $8.88 \cdot 10^{-6}$  M de ácido pireno butírico en tampón Tris-HCl 20 mM, AEDT 1 mM, pH 7.5. A partir de esta disolución se prepararon las diluciones que figuran en las Tablas III-7 y III-8, midiéndose sus absorbancias a 355 y 268 nm, en cubeta de 1 cm de paso de luz.

Tabla III.7

Valores de absorbancia de disoluciones de ácido pireno butírico a distintas concentraciones en tampón Tris-HCL 20 mM, AEDT 1 mM, pH=7.5.

Volumen de tampón (ml)	Volumen de pireno (ml)	Concentración de pireno $\cdot 10^6$ (M)	Absorbancia $\lambda=355\text{nm}$
1.5	1.0	3.55	0.123
1.3	1.2	4.26	0.140
1.0	1.5	5.32	0.186
0.7	1.8	6.39	0.221
0.5	2.0	7.10	0.250
0.3	2.2	7.81	0.269
0.0	2.5	8.88	0.304

En la figura III.13 se muestra la representación de la absorbancia a 355 nm frente a la concentración molar. Los parámetros de ajuste por regresión lineal son: ordenada en el origen =  $-2.28 \cdot 10^{-3}$ , pendiente = 34840 y  $r^2 = 1$ . La aplicación de la ley de Beer proporciona un coeficiente de extinción molar igual a  $34840 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .



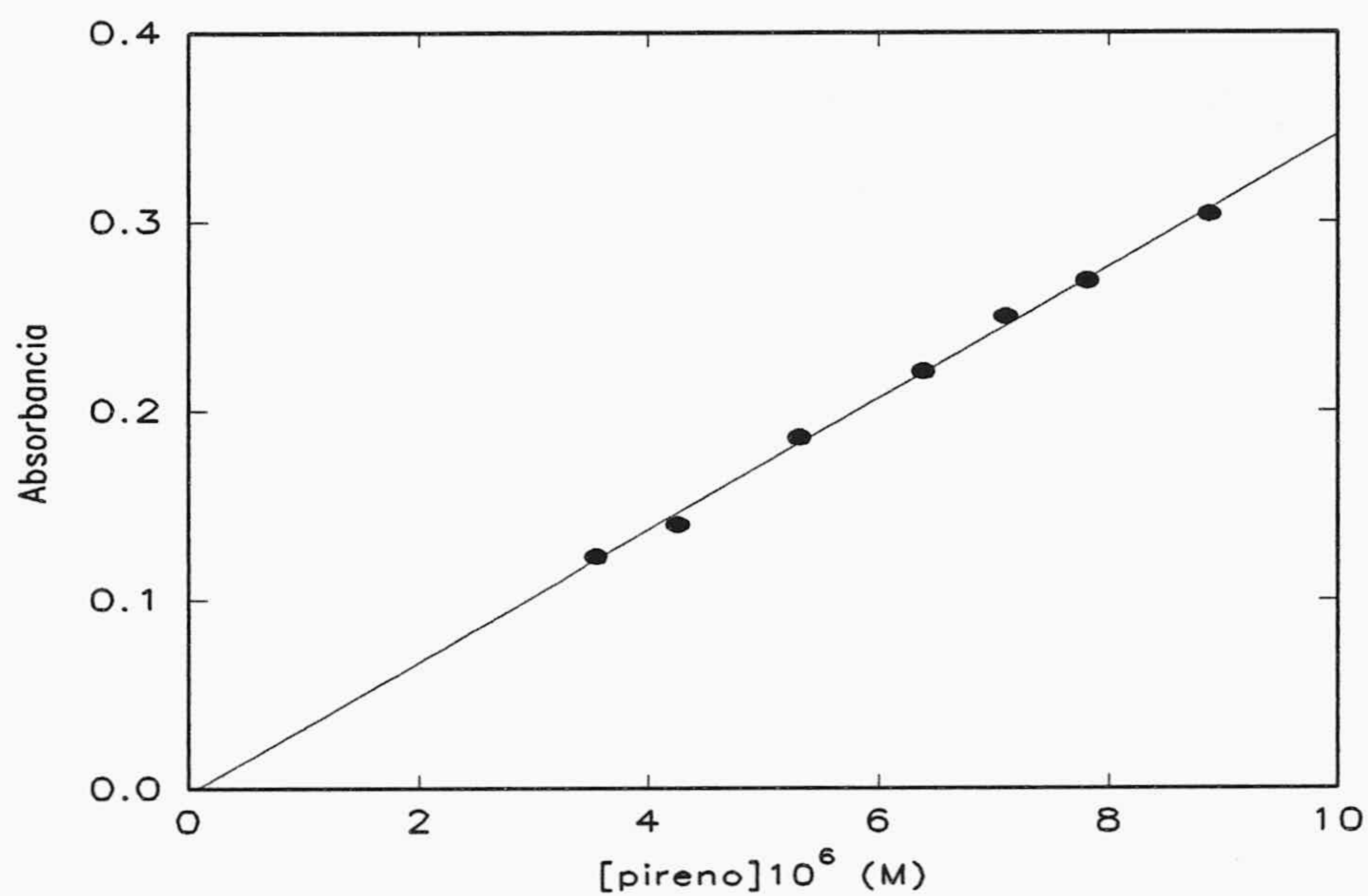


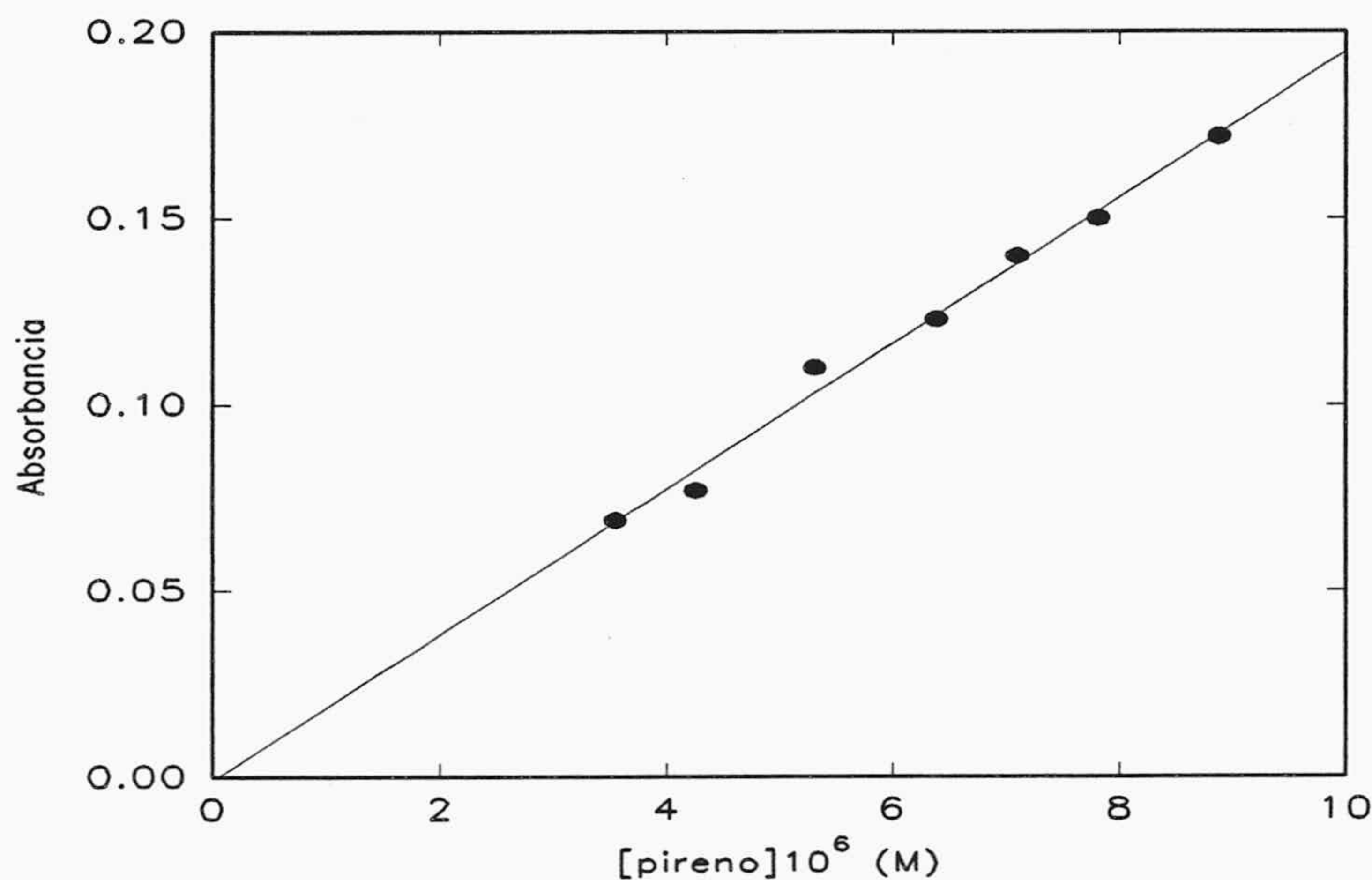
Figura III.13.- Representación de la ley de Beer para los datos de la tabla III.7.

TABLA III-8

Valores de absorbancia de disoluciones de ácido de pireno butírico en tampón  
Tris-HCl 20 mM, AEDT 1 mM pH=7'5.

Volumen de tampón (ml)	Volumen de Pireno (ml)	Concentración de Pireno·10 <sup>6</sup> (M)	Absorbancia $\lambda=268\text{nm}$
1'5	1'0	3'55	0'069
1'3	1'2	4'26	0'077
1'0	1'5	5'32	0'110
0'7	1'8	6'39	0'123
0'5	2'0	7'10	0'140
0'3	2'2	7'81	0'150
0'0	2'5	8'88	0'172





**Figura III.14.-** Representación de la ley de Beer para los datos de la tabla III.8.

En la figura III.14 se muestra la representación de la absorbancia a 268 nm frente a la concentración molar. Los parámetros de ajuste por regresión lineal son: ordenada en el origen =  $-8'14 \cdot 10^{-4}$ , pendiente = 19550 y  $r^2 = 0'99$ . La aplicación de la ley de Beer proporciona un coeficiente de extinción molar igual a  $19550 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### III. 2. 2. Cálculo del porcentaje de etiquetado.

Como ya se ha indicado, el espectro de absorción de la fluoresceína, pireno, o cualquier otro fluoróforo enlazado covalentemente a los ácidos nucleicos, puede cambiar con respecto al que presenta el colorante libre. Además, a la longitud de onda en torno a los 260 nm, hay una superposición de la absorbancia de los fluoróforos y de los ácidos nucleicos, por lo que habrá de tenerse en cuenta la contribución de la absorbancia del fluoróforo en el cálculo de la concentración de poli (C). Por estos motivos, en una primera serie de experiencias, se ha determinado la cantidad de fluoresceína y pireno incorporados a los ácidos nucleicos, por hidrólisis de los conjugados de fluoresceína-poli (C) y pireno-poli (C).



A tal fin, en un experimento típico y siguiendo la metodología descrita en el apartado II. 2. 5, se ha hidrolizado poli (C) etiquetado con fluoresceína al objeto de liberar el colorante del conjugado, se neutralizó con HCl, se ajustó el pH a 7'0 y se midió la absorbancia a 495 nm, que resultó de 0'387. Seguidamente se midió la absorbancia del hidrolizado a 268 nm, que resultó de 0'783. Mediante la aplicación de la ecuación (23) se ha obtenido un porcentaje de etiquetado del 4'46%. Los coeficientes de extinción molar para la fluoresceína, utilizados en el cálculo, han sido los referidos en el apartado III. 2. 1 y el del poli (C), el calculado en el epígrafe III. 2. 1. 1.

Una alícuota del conjugado anterior de fluoresceína-poli (C) sin hidrolizar, se ha diluido con tampón Tris-HCl 0'1 M, pH 7'0, hasta la misma proporción que el anteriormente hidrolizado y se han medido sus absorbancias a 268 nm y a 495 nm. La primera dió un valor similar al obtenido en el hidrolizado, siendo el valor de la segunda de 0'259. Esta última absorbancia dividida por la concentración de fluoresceína calculada en la alícuota hidrolizada ( $6'02 \cdot 10^{-6}$  M), proporciona un valor de  $\epsilon_{495} = 4'3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , para el conjugado de fluoresceína-poli (C) a 495 nm. Resultados similares han sido reportados por Reines y Schulman (1979) quienes han obtenido un valor de  $\epsilon_{495} = 4'25 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para fluoresceína enlazada a tARN mediante un grupo carbohidrazida, a pH 7'0.

Una explicación cualitativa de los distintos valores calculados para el coeficiente de extinción molar, a 495 nm, de la fluoresceína libre y covalentemente enlazada a poli (C), es la siguiente. A pH 7'0, la fluoresceína se encuentra predominantemente en la forma de dianión y su  $\epsilon_{495} = 6'43 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Diehl, 1989; Ballesteros y col., 1998). Sin embargo, como Jackson (1991) y Talavera y col. (1997) han demostrado, hay un aumento aparente en el  $pK_a$  de la fluoresceína etiquetada a poli (C), lo que provoca que a pH 7'0 haya una cantidad fraccional mayor del monoanión de la fluoresceína, que la existente en una disolución de fluoresceína libre al mismo pH. Dado que el monoanión posee un valor de  $\epsilon_{495}$  menor que el correspondiente al dianión, el coeficiente de extinción de la fluoresceína etiquetada resulta menor que el obtenido por Diehl.

El valor de  $\epsilon_{495} = 4'3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para el conjugado de fluoresceína-poli (C), es el que ha sido empleado posteriormente por nosotros para calcular mediante la ecuación (23), de una forma rápida y sin necesidad de hidrolizar los conjugados de fluoresceína-poli (C), el porcentaje de etiqueta fluorescente en las restantes ocasiones en que se han etiquetado los ácidos nucleicos con fluoresceína. Sin embargo, se debe de tener en cuenta



que el espectro de absorción de la fluoresceína covalentemente enlazada a poli (C), cambia de forma significativa cuando la cantidad de colorante enlazado es superior al 15 % (Jackson, 1991), por lo que sólo se ha empleado el anterior valor del coeficiente de extinción molar, cuando dicho porcentaje de marca ha resultado inferior al 5 %.

Con el conjugado de pireno-poli (C) se ha operado en forma similar a como se ha hecho con el de fluoresceína. Es decir, determinando la relación de marcaje por medidas de absorbancia en disoluciones en que el pireno ha sido liberado del poli (C) por hidrólisis y en el conjugado sin hidrolizar. Para ello, se hidrolizó una muestra de pireno-poli (C) durante 16 horas, a 37 °C en NaOH 0'3 M, se neutralizó con HCl y se midió la absorbancia de una alícuota diluida en Tris-HCl 20 mM, AEDT 1 mM, pH 7'5, a 268 y 355 nm ( $\lambda_{\max}$  del ácido pireno butírico en el visible). Con la misma muestra de pireno-poli (C) sin hidrolizar disuelta en el mismo tampón, se midieron también las absorbancias a las citadas longitudes de onda. Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

① Para la disolución hidrolizada,  $A_{268} = 0'448$ ;  $A_{355} = 0'077$ , de donde  $[\text{pireno}] = 2'21 \cdot 10^{-6}$  M y  $[\text{poli (C)}] = [0'448 - (2'27 \cdot 10^{-6} \cdot 19550)]/5000 = 8'09 \cdot 10^{-5}$  M. La relación  $[\text{pireno}]/[\text{poli (C)}] = 0'02729$ , es decir, el porcentaje de marca resulta del 2'73 %.

② Para la disolución de pireno-poli (C) sin hidrolizar,  $A_{268} = 0'693$ ;  $A_{355} = 0'113$ , de donde aplicando la ecuación (23) resulta una relación  $[\text{pireno}]/[\text{poli (C)}] = 0'02576$ , es decir, el porcentaje de marca resulta del 2'58 %.

En los cálculos efectuados se han aplicado los siguientes valores de los coeficientes de extinción molar:  $\epsilon_{268}^{\text{PC}} = 5000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{268}^{\text{Pi}} = 19550 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{355}^{\text{Pi}} = 34840 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , en donde los subíndices y superíndices tienen el significado habitual. Como se puede observar, ambos métodos proporcionan esencialmente el mismo resultado (la diferencia se puede estimar en un 5% aproximadamente), por lo que en el resto de los cálculos de porcentaje de marca, se ha aplicado la expresión (23) a las medidas de absorbancia realizadas con el conjugado sin hidrolizar, lo que simplifica considerablemente la metodología experimental. No obstante somos conscientes de que los anteriores resultados sólo demuestran la buena aproximación del método cuando se utiliza pireno como fluoróforo y con una extensión de etiquetado baja, que ha sido el único caso ensayado.



Con los dos restantes fluoróforos, antraceno y dansilo, se ha supuesto que, al igual que sucede con el pireno, no hay una variación apreciable en los coeficientes de extinción molar correspondientes al fluoróforo libre y al conjugado con poli (C), por lo que en el cálculo del porcentaje de marca, se ha aplicado la ecuación (23), con los coeficientes de extinción molar obtenidos en los epígrafes III.2.1.3 y III.2.1.4, a los datos de absorbancia medida en el conjugado sin hidrolizar disuelto en el mismo tampón en que se estudió la ley de Beer. Aunque los datos así obtenidos sean sólo aproximados, hemos prescindido de efectuar las hidrólisis correspondientes, debido a que los resultados con estos dos fluoróforos no han sido demasiado interesantes en lo que se refiere a la detección fluorescente de la hibridación en medios homogéneos.



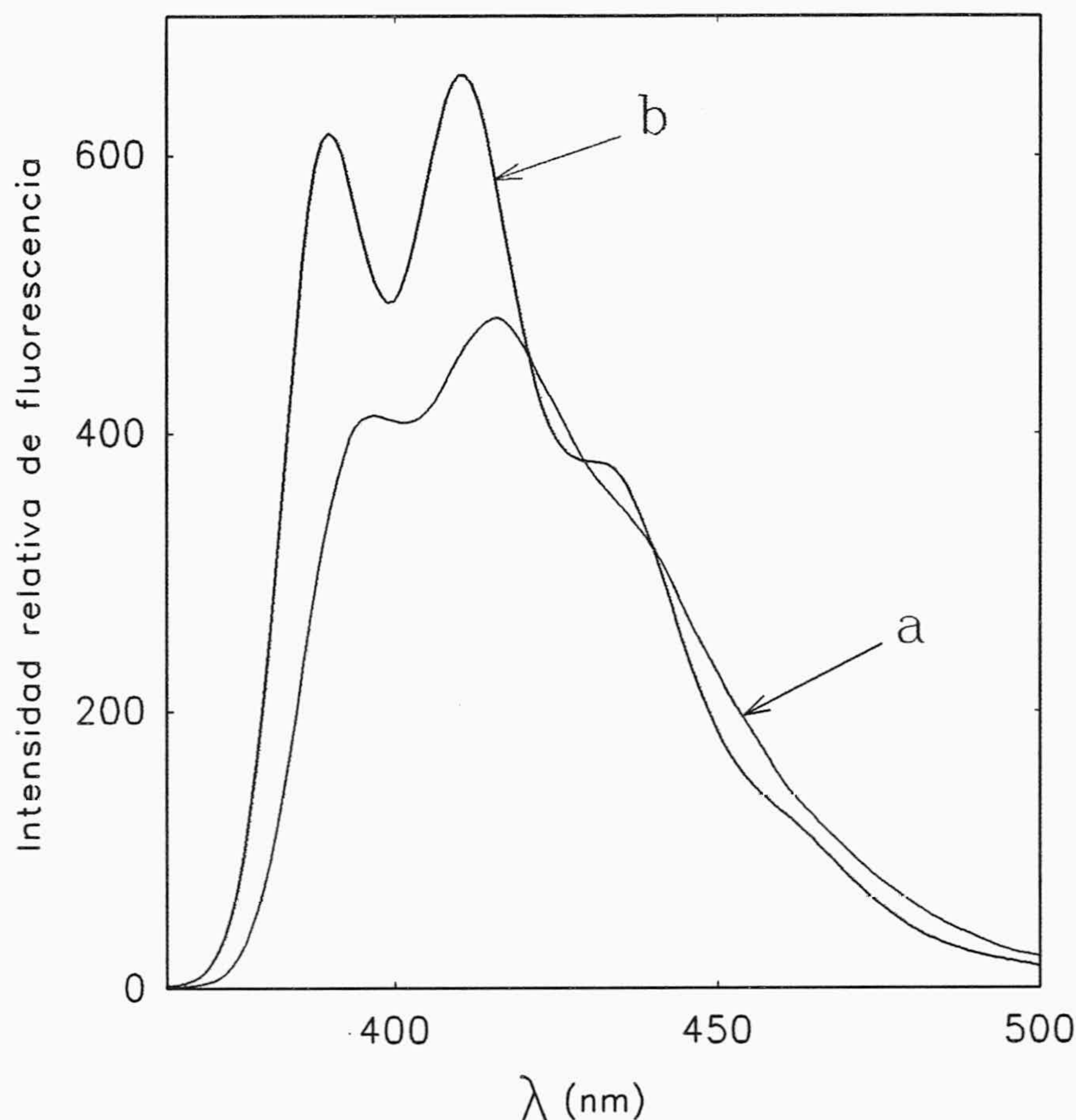
### **III. 3. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA EN ESTADO ESTACIONARIO DE LAS SONDAS OBTENIDAS.**

En esta sección se exponen los espectros de emisión obtenidos con poli (C) etiquetado con los diversos fluoróforos utilizados en nuestro estudio. No es nuestra intención en esta Memoria presentar una discusión detallada de los mecanismos responsables de las propiedades espectrales observadas, sino más bien racionalizar aquellas propiedades que tengan mayor importancia para nuestros propósitos, que no son otros que preparar sondas de ADN altamente fluorescentes y útiles en la detección de la hibridación en medios homogéneos, por lo que los espectros de emisión en estado estacionario de los polinucleótidos etiquetados se interpretarán, fundamentalmente, por comparación con las propiedades de emisión de los fluoróforos libres previamente conocidas.

#### **III. 3. 1. Espectros de fluorescencia en estado estacionario de antraceno-poli (C).**

En la figura III.15 se representan los espectros de emisión registrados entre 365 y 500 nm, obtenidos con una longitud de onda de excitación de 350 nm, de disoluciones de antraceno-poli (C)  $10^{-5}$  M y ácido antranílico  $10^{-6}$  M en tampón Tris-HCl 10 mM, AEDT 1 mM, pH 7.5. El porcentaje de marca de la sonda utilizada en esta figura ha sido del 2.1%. Como se puede observar, no hay cambios importantes en la forma y posición de los espectros, aunque el correspondiente al antraceno enlazado a poli (C), está ligeramente menos estructurado y algo desplazado hacia el rojo respecto al del ácido antranílico. Estas pequeñas diferencias se pueden atribuir a posibles efectos del enlace con el polinucleótido así como a las cercanías de los grupos cargados de éste que generan un microambiente distinto en los alrededores del fluoróforo.





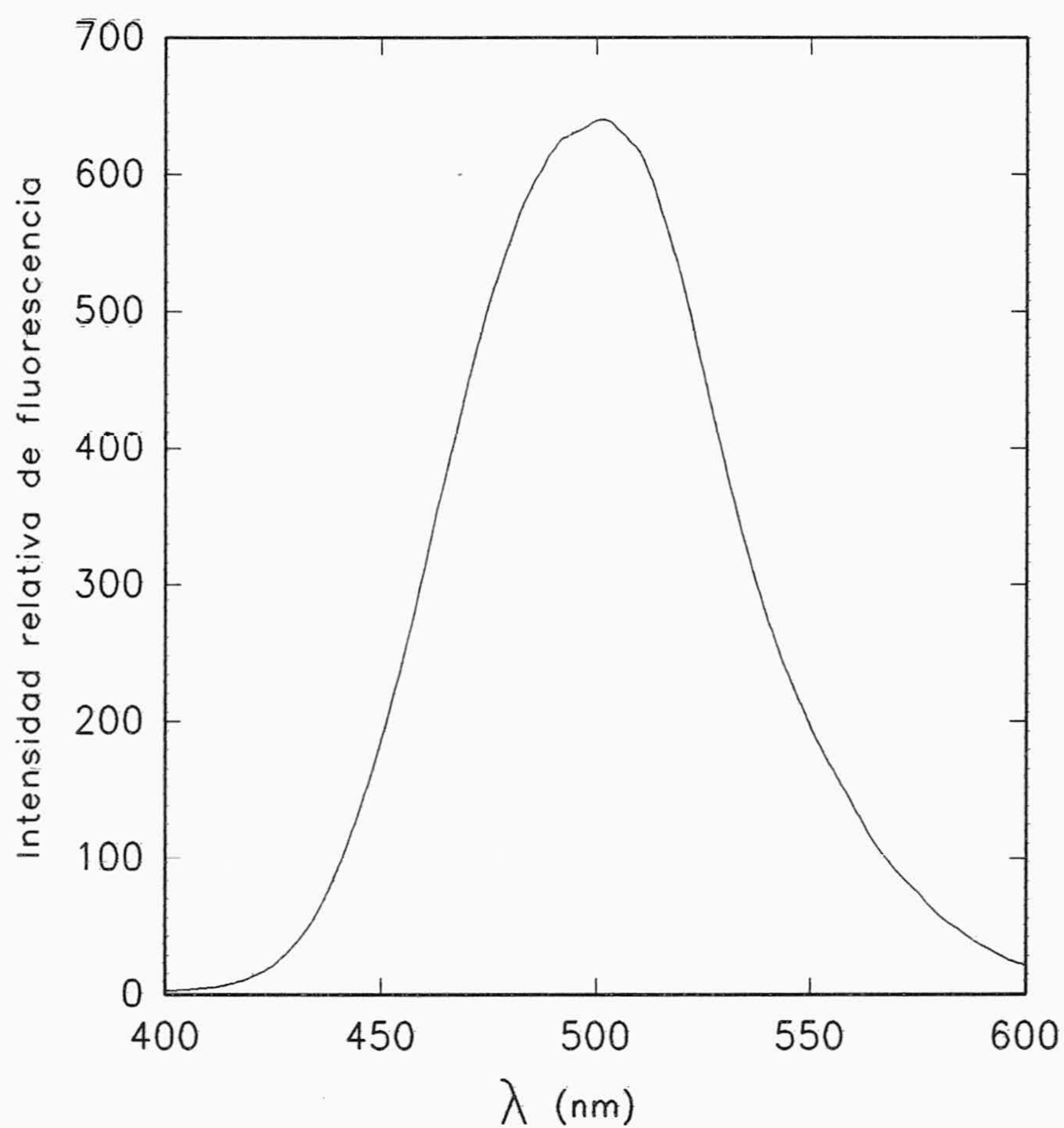
**Figura III.15.-** Espectros de emisión de fluorescencia entre 365 y 500 nm de disoluciones de: (a) antraceno-poli(C) y (b) ácido antranílico.

### III. 3. 2. Espectros de fluorescencia en estado estacionario de dansilo-poli (C).

En la figura III.16 se representan el espectro de emisión registrado entre 400 y 600nm, obtenido con una longitud de onda de excitación de 325 nm, de una disolución de dansilo-poli (C)  $10^{-5}$  M, en tampón Tris-HCl 10 mM, AEDT 1 mM, pH 7.5. El porcentaje de marca de la sonda utilizada en esta figura ha sido del 3.5 %. En esta figura no se ha podido representar el espectro del cloruro de sulfonil dansilo porque, como es conocido, no fluoresce en disolución acuosa (Haugland, 1996). El dansilo es una sonda ampliamente utilizada en la investigación de la polaridad del microambiente en macromoléculas biológicas, que no fluoresce cuando no está enlazado a una macroestructura (Haugland,



1996). El espectro obtenido tras su conjugación a poli (C), presenta un máximo a 500 nm. Ha sido muy empleado en el estudio de polaridades en macroestructuras biológicas, en unión a la ecuación de Lippert (1957) y podría aplicarse en la estimación del microambiente en polinucleótidos etiquetados, aunque en la presente Memoria no hemos abordado ese extremo.

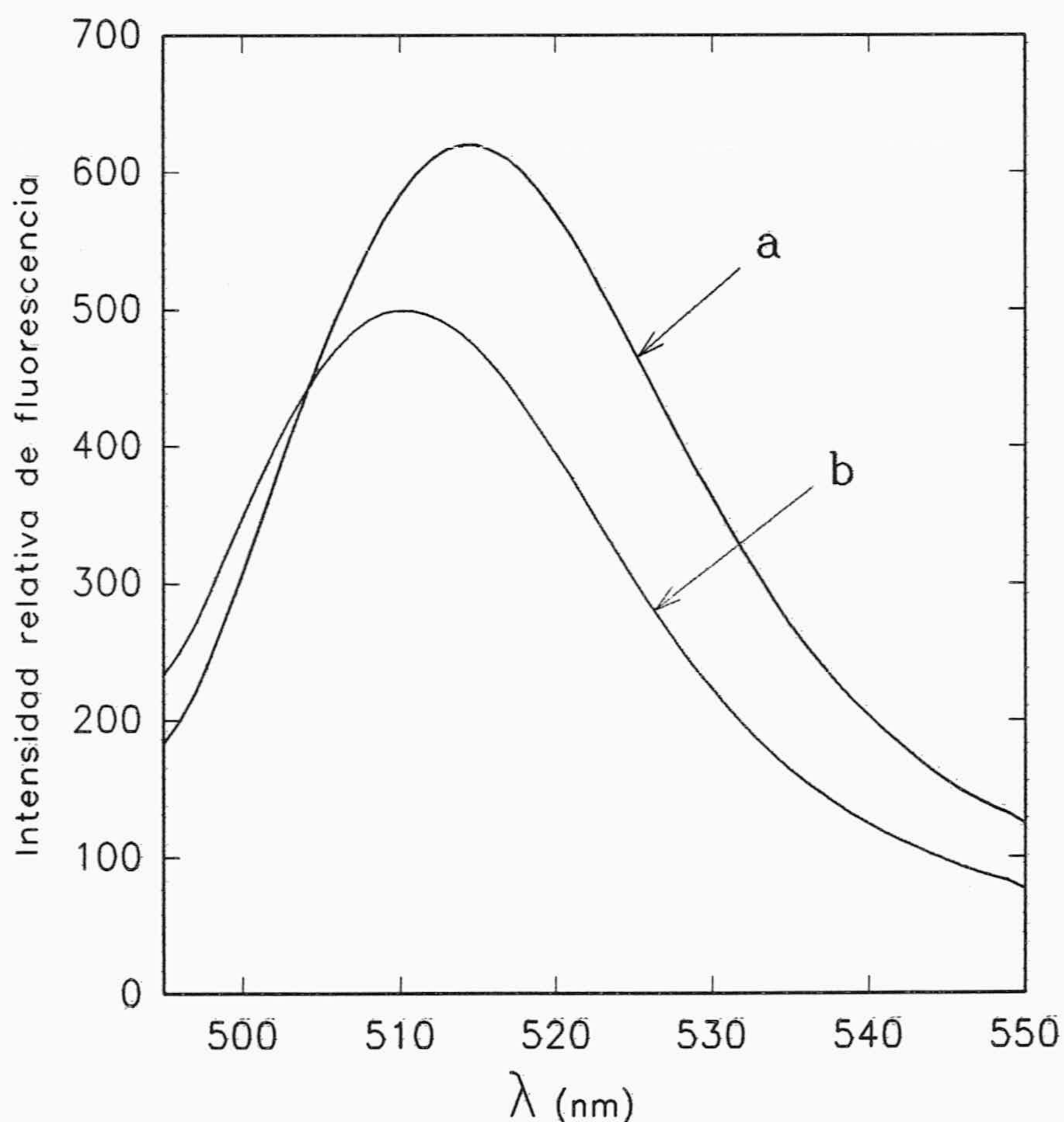


**Figura III.16.-** Espectro de emisión de fluorescencia entre 400 y 600 nm de una disolución de dansilo-poli (C).



### III. 3. 3. Espectros de fluorescencia en estado estacionario de fluoresceína-poli (C).

En la figura III.17 se representan los espectros de emisión, registrados entre 495 y 550 nm y obtenidos con excitación a 480 nm, de disoluciones de fluoresceína-poli (C)  $5 \cdot 10^{-6}$  M y fluoresceína libre  $10^{-7}$  M, ambos en tampón Tris-HCl 10 mM, AEDT 1 mM, pH 7.5. El porcentaje de marca de la sonda utilizada en esta figura ha sido del 3'6 %. Como se puede observar, no hay cambios importantes en la forma de los espectros, aunque la posición del correspondiente a fluoresceína enlazada a poli (C), está algo desplazada hacia el rojo, respecto al de fluoresceína libre. Como en el caso del antraceno, este desplazamiento se puede atribuir a posibles efectos ambientales.

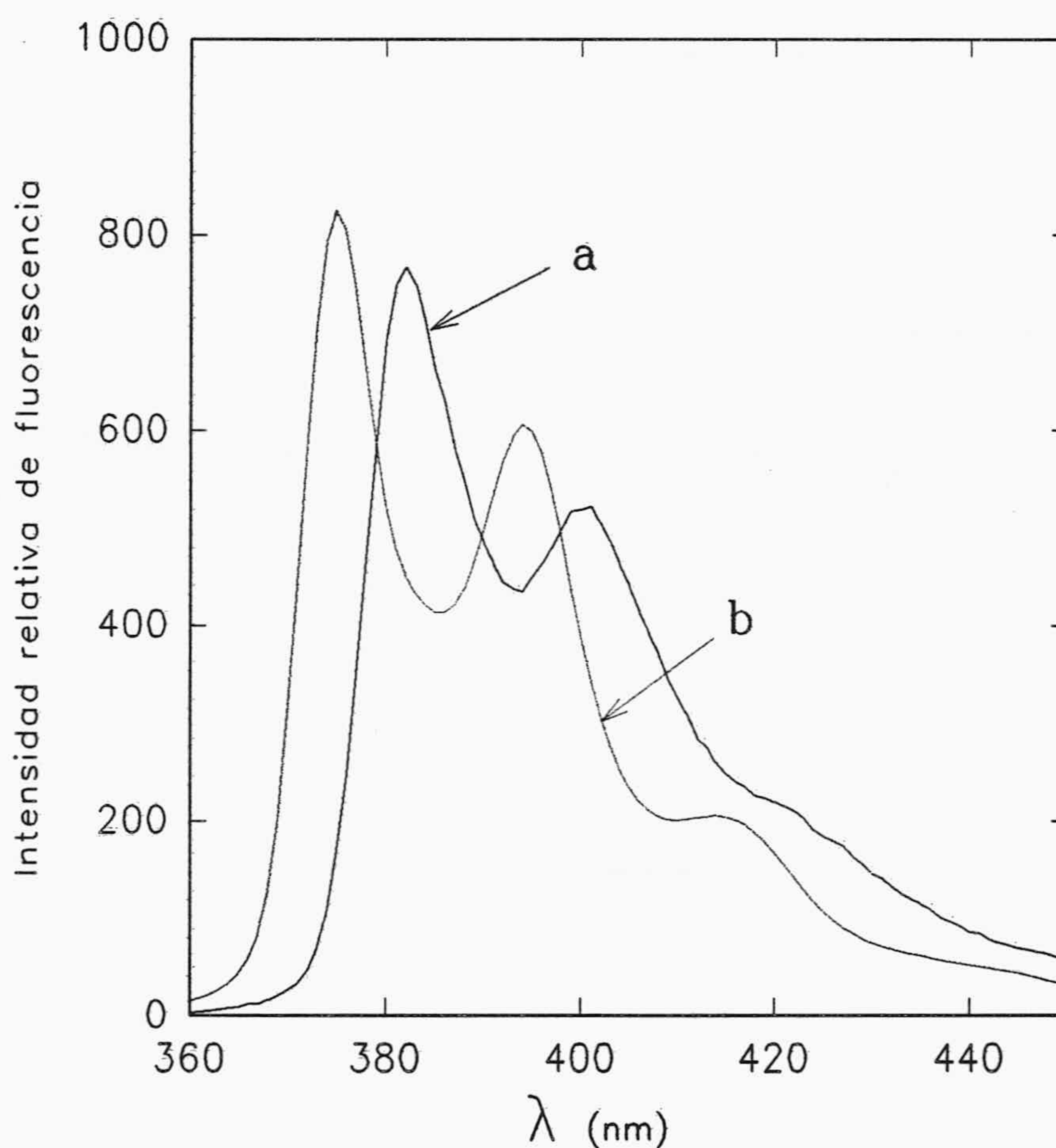


**Figura III-17** Espectro de emisión de fluorescencia en estado estacionario entre 495 y 550 nm de disoluciones de: (a) fluoresceína-poli (C) y (b) fluoresceína libre.



**III.3.4. Espectros de fluorescencia en estado estacionario de pireno-poli (C).**

En la figura III.18 se representan los espectros de emisión registrados entre 360 y 450 nm, obtenidos con una longitud de onda de excitación de 352 nm, de disoluciones de pireno-poli (C)  $2 \cdot 10^{-4}$  M y ácido pireno butírico  $5 \cdot 10^{-6}$  M en tampón Tris-HCl 10 mM, AEDT 1 mM, pH 7.5. El porcentaje de marca de la sonda utilizada en esta figura ha sido del 2.4 %.



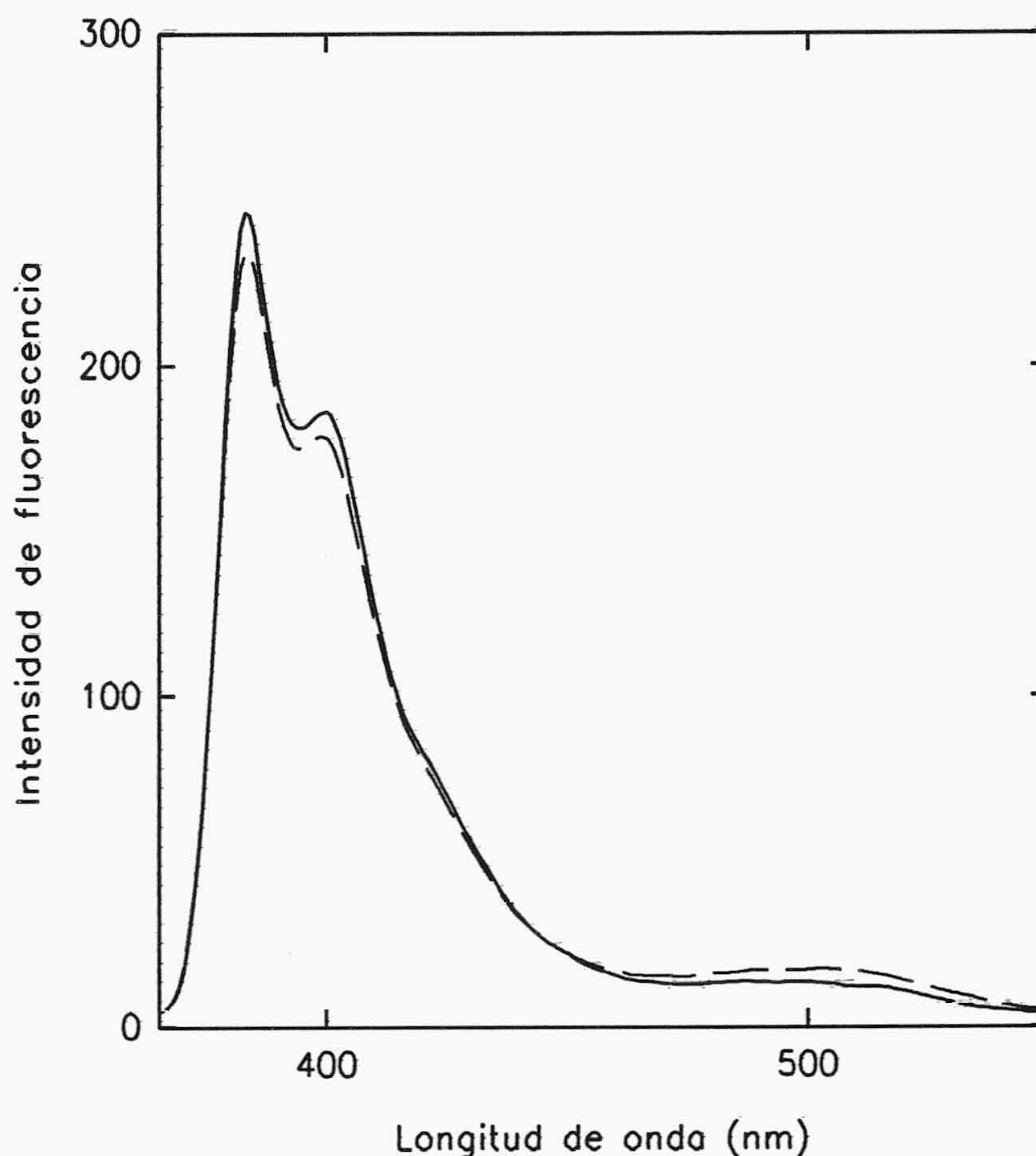
**Figura III.18.-**Espectros de emisión de fluorescencia entre 360 y 450 nm de disoluciones de: (a) pireno-poli (C) y (b) ácido pireno butírico.



Como se observa, no hay variaciones importantes en el perfil de los espectros, aunque el correspondiente al pireno enlazado a poli (C), está ligeramente menos estructurado y algo desplazado hacia el rojo respecto al del ácido pireno butírico. Estas pequeñas diferencias pueden atribuirse, al igual que con el antraceno, a posibles efectos del enlace con el polinucleótido así como a las cercanías de los grupos cargados de éste que generan un microambiente distinto en los alrededores del fluoróforo.

Como se ha indicado previamente, se ha procurado marcar los ácidos nucleicos en una extensión menor al 4 % al objeto de que las sondas presenten prácticamente inalteradas sus propiedades de hibridación (Jackson, 1991; Talavera y col., 1997). Utilizando pireno como etiqueta fluorescente, se han realizado experiencias en las que se ha modificado poli (C) en mayor extensión que la correspondiente a los anteriores espectros, con lo que se ha conseguido un porcentaje de marca del 5'7 %. En la figura III-19 se representan los espectros de emisión obtenidos por excitación a 352 nm y registrados entre 365 y 550 nm, de disoluciones  $10^{-4}$  M y  $10^{-5}$  M de la sonda anterior, en tampón Tris-HCl 10 mM, AEDT 1 mM, pH 7'5. En esta figura se observa con claridad la presencia en ambos espectros de una nueva banda de emisión con máximo a 505 nm, que es característica del excímero de pireno (Förster, 1969). La disminución de la concentración de la sonda hasta  $10^{-5}$  M (expresada en bases de citosina), no cambia la forma del espectro, aunque, como es natural, disminuye la intensidad de fluorescencia por lo que se tuvieron que aumentar las rendijas de entrada y salida de luz, en el registro de este último espectro.



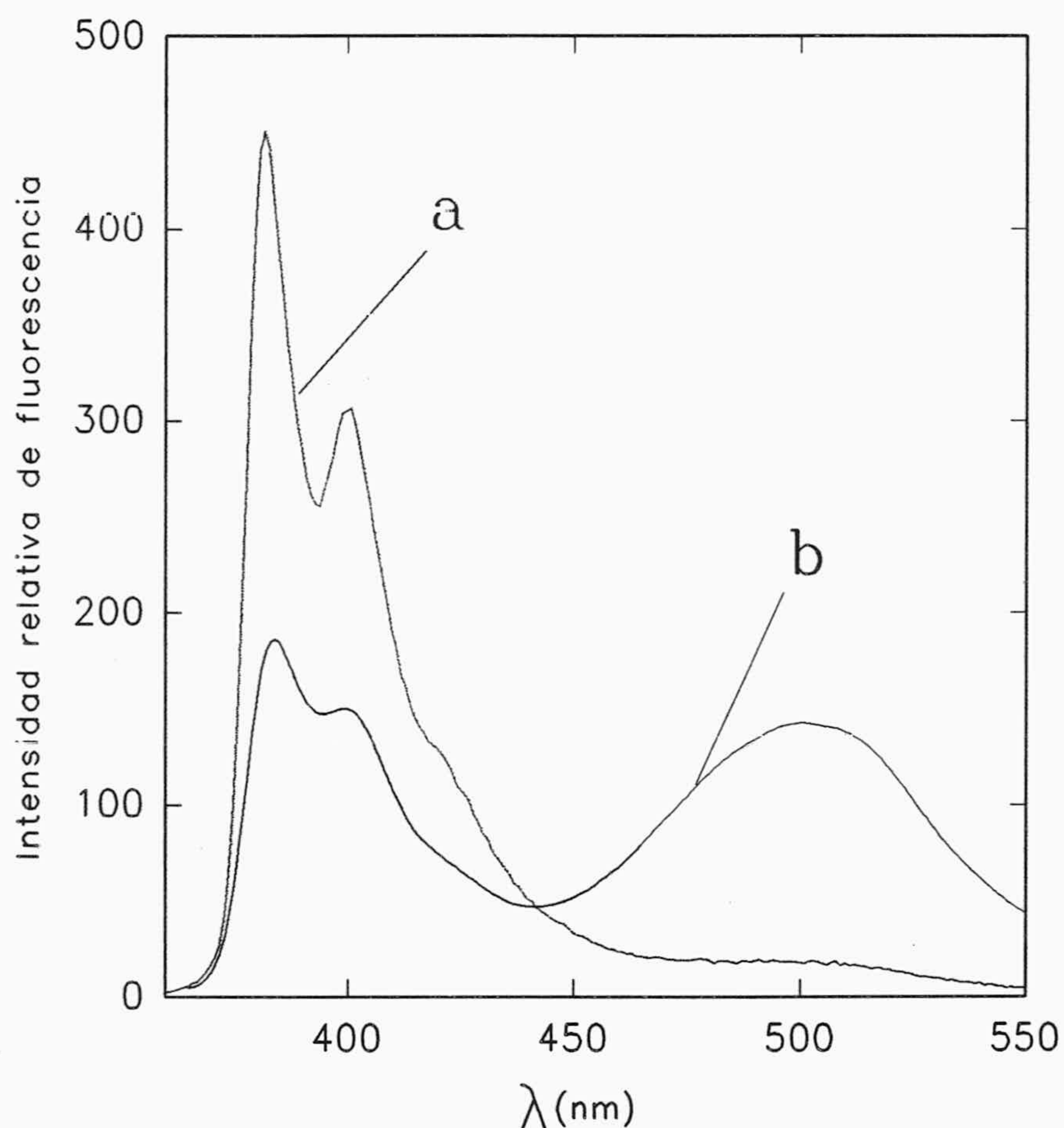


**Figura III.19.-**Espectros de emisión de fluorescencia entre 360 y 550 nm de disoluciones de pireno-poli(C) a distintas concentraciones: (—)  $10^{-4}M$  y (---)  $10^{-5}M$ .

En la figura III.20 se comparan los espectros de emisión, obtenidos en idénticas condiciones de  $\lambda_{ex}$ ,  $\Delta\lambda_{ex}$  y  $\Delta\lambda_{em}$ , de disoluciones de igual concentración expresada en bases de citosina,  $10^{-5} M$  de pireno-poli (C), pero con diferentes niveles de conjugación, 2'4 y 5'7 %, ambas en el mismo tampón. Como se puede observar, aunque la sonda marcada en una extensión del 5'7 % tiene mayor cantidad de fluoróforo, su espectro de emisión presenta una disminución de la intensidad de fluorescencia en el máximo a 384 nm. Al mismo tiempo, aparece una banda con máximo centrado a 505 nm, característica del excímero del pireno. Por lo tanto, en contraste con los pequeños cambios observados en los perfiles de emisión



de polinucleótidos marcados con pireno, se observan cambios mucho más drásticos en los espectros de fluorescencia cuando se incrementa el porcentaje de marca de las sondas y así, los datos experimentales muestran que el rendimiento relativo de fluorescencia por molécula de pireno es bastante sensible al número de etiquetas fluorescentes por cadena. Ya que las moléculas individuales de pireno están conjugadas a la misma cadena de polinucleótido, es probable que muchas de ellas estén suficientemente cercanas entre sí como para que se originen interacciones entre ellas que den lugar a la formación de excímeros, por lo que la pérdida aparente de intensidad de fluorescencia observada a 384 nm será debida, principalmente, a la formación de excímeros de pireno.



**Figura III.20.**-Espectros de emisión de fluorescencia entre 365 y 550 nm de disoluciones de pireno-poli (C) con distintos porcentajes de marca: (a) 2'4% y (b) 5'7%.



Desde hace tiempo se conoce que el rendimiento cuántico relativo de fluorescencia del pireno en disolución decrece con el incremento en la concentración del mismo (Förster, 1969). En una cadena de un homopolinucleótido marcada con pireno, la libertad de los grupos etiquetados está altamente restringida, en el sentido de que la posición de todas las moléculas fluorescentes están fijas en el mencionado polímero repetitivo. Se han propuesto dos tipos de estructuras para las cadenas sencillas de poli (C) en disolución. Según los datos de difracción de rayos X (Arnott y col., 1973) poli (C) parece ser un polinucleótido del tipo A con 3'1 Å por paso y una elevación de 18'6 Å, mientras que en disolución, los datos de RMN indican que aparece una clase nueva de hélice con un *rise* axial de 2'9 Å por residuo y una elevación de 23'2 Å (Broido y Kearns, 1982).

Un porcentaje de marca del 5'7 % significa que por término medio, hay una molécula de pireno cada 18 bases. Con este dato y si suponemos una cadena lineal para la estructura del poli (C), las bases citosina etiquetadas estarían separadas aproximadamente unos 60 Å (como distancia media). Si sustraemos la longitud del brazo espaciador y del grupo sulfonilo para cada molécula de pireno, quedaría una distancia de unos 40 Å sin tener en cuenta el tamaño planar de las moléculas de fluoróforo, por lo que no parece posible el contacto del tipo de van der Waals para formar un dímero. Sin embargo, en poli (C) etiquetado con pireno, no conocemos la localización exacta de cada base etiquetada ni como están realmente orientados los fluoróforos, aunque se puede esperar que el brazo espaciador aminoetilo en el que las moléculas de pireno han sido fijadas, permita la rotación de éstas. Si en algunos casos la distancia entre dos bases etiquetadas fuera solamente de 6-7 citosinas, las moléculas de pireno estarían separadas sólo 1-2 Å (sustrayendo la longitud del brazo espaciador y del grupo sulfonilo para cada molécula de pireno), lo que haría estéricamente posible la formación del excímero. Teniendo en cuenta que hay poca fluorescencia debida a la formación de excímeros en nuestra sonda, las pocas moléculas dimerizadas deben de corresponderse con la probabilidad que existe de que en la cadena se marquen consecutivamente citosinas separadas por 6-7 bases o menos. Las apreciaciones cualitativas aproximadas que se acaban de realizar permiten la justificación de la formación de dímeros incluso a baja conjugación.

La formación de dímeros en polinucleótidos con etiquetas fluorescentes ha sido señalada con anterioridad. Así, Jackson (1991) con poli (C) marcado con fluoresceína a distintos niveles de conjugación, ha observado que el incremento del porcentaje de marca, produce un desplazamiento del máximo de absorción de la sonda hacia menores longitudes



de onda, al tiempo que decrece la señal de fluorescencia, aunque sin cambios en el perfil del espectro de emisión. Estos dímeros se habían obtenido anteriormente con lisina disustituida con fluoresceína en las posiciones  $\alpha$  y  $\gamma$  (Pringsheim, 1965). Sin embargo, dado que los dímeros de fluoresceína no varían la forma del espectro de emisión y además originan *auto-quenching*, su detección ha de hacerse mediante la forma del espectro de absorción, lo que resulta de menor sensibilidad que en nuestro caso. Probablemente por esta razón se concluyó que, a una densidad de marca del 15 % o mayor, existe una población significativa de dímeros, mientras que nosotros los hemos podido observar con pireno como fluoróforo, a un porcentaje sensiblemente inferior.

De los resultados anteriormente discutidos se puede concluir que el *auto-quenching* por formación de dímeros, limita la extensión de la fluorescencia que puede poseer una sonda, ya que el rendimiento cuántico relativo decrece con el incremento de la relación fluoróforo/base. Parece pues conveniente que el porcentaje de marca no supere el 3-4 %, aproximadamente, al objeto de que las moléculas estén separadas por distancias lo suficientemente grandes como para impedir la dimerización de los fluoróforos. Una mayor extensión en el marcaje supone la formación de excímeros, con la pérdida concomitante de la señal de fluorescencia en el máximo a 384nm. Además, como ya se ha indicado y posteriormente se verificará con ADN de *E. coli*, los altos porcentajes de marca perturban las buenas características de hibridación de las sondas.

Por otra parte, también se ha etiquetado poli (C) con isotocianato de pireno. Las características de emisión, en lo que se refiere al número y posición de las bandas de fluorescencia son aproximadamente similares a las anteriormente referidas para la sonda de pireno-poli (C) obtenida con el correspondiente cloruro de ácido, por lo que no se ha considerado de interés la inclusión del espectro.



### III. 4. CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES FLUORESCENTES EN ESTADO ESTACIONARIO DE POLI (C) ETIQUETADO TRAS LA HIBRIDACIÓN CON POLI (I).

Brimacombe y Reese (1966) han estudiado como se afectan las características de hibridación en poli (C) por la modificación de grupos que intervienen en la formación de los enlaces de hidrógeno, concluyendo que la metilación de residuos citosina en la posición N<sup>4</sup> disminuye en 0'5 °C la temperatura de fusión de la doble cadena poli (metil-C)-poli (I), por cada 1 % de modificación. Asimismo, el efecto específico que la transaminación y marcaje con fluoresceína y rodamina en poli (C), tiene sobre las características de hibridación de éste con poli (I), ha sido determinado por Jackson (1991), quién estudió la desnaturalización térmica de los híbridos poli (C)-poli (I) mediante espectroscopía de absorción UV, así como por intensificación de la fluorescencia del bromuro de etidio para detectar la formación de los mencionados híbridos. La conclusión alcanzada es que la estabilidad de la asociación de fluoresceína-poli (C) con poli (I) es muy similar a la que presenta poli (C) sin modificar, cuando la relación fluoresceína/poli (C) es menor del 5 %. Este resultado será corroborado más adelante por nosotros, mediante el estudio de la cinética de hibridación de pireno-poli (C)-poli (I) y el estudio de la reasociación de ADN de *E. coli* modificado por transaminación y subsiguientemente etiquetado con fluoresceína. A estas conclusiones se debe añadir la alcanzada anteriormente sobre la conveniencia de un bajo porcentaje de marca para que no se generen excímeros.

Así, con homopolinucleótidos sintéticos de citosina modificada y marcada con los cuatro fluoróforos que se estudian en esta Memoria, en una extensión inferior a la anteriormente mencionada del 5 %, se ha investigado la variación que se produce en los espectros de emisión obtenidos en estado estacionario, cuando las cuatro sondas obtenidas hibridan con su cadena complementaria, poli (I).

#### III. 4. 1. Espectros de fluorescencia en estado estacionario de antraceno-poli (C) cuando éste hibrida con poli (I).

La figura III.21 muestra los espectros de emisión de antraceno-poli (C) en una experiencia típica de hibridación. En este caso, a 350 µl de una disolución  $2'11 \cdot 10^{-3}$  M de antraceno-poli (C) en tampón de hibridación, se han añadido 5 alícuotas de 100 µl de una



disolución de poli (I)  $2'02 \cdot 10^{-3}$  M en el mismo tampón, hasta alcanzar una concentración final de poli (I) de  $1'19 \cdot 10^{-3}$  M. Si se tiene en cuenta que el efecto de dilución provoca que la concentración final de antraceno-poli (C) sea de  $8'69 \cdot 10^{-4}$  M, se debe suponer la total hibridación de éste con el poli (I) añadido. Los datos obtenidos muestran que la señal de fluorescencia de antraceno-poli (C), si se corrige el efecto de dilución, disminuye continuamente con el aumento de la concentración de poli (I), hasta que, a un valor determinado de [poli (I)], se registra un espectro que ya no se modifica, aunque se aumente la concentración de éste.

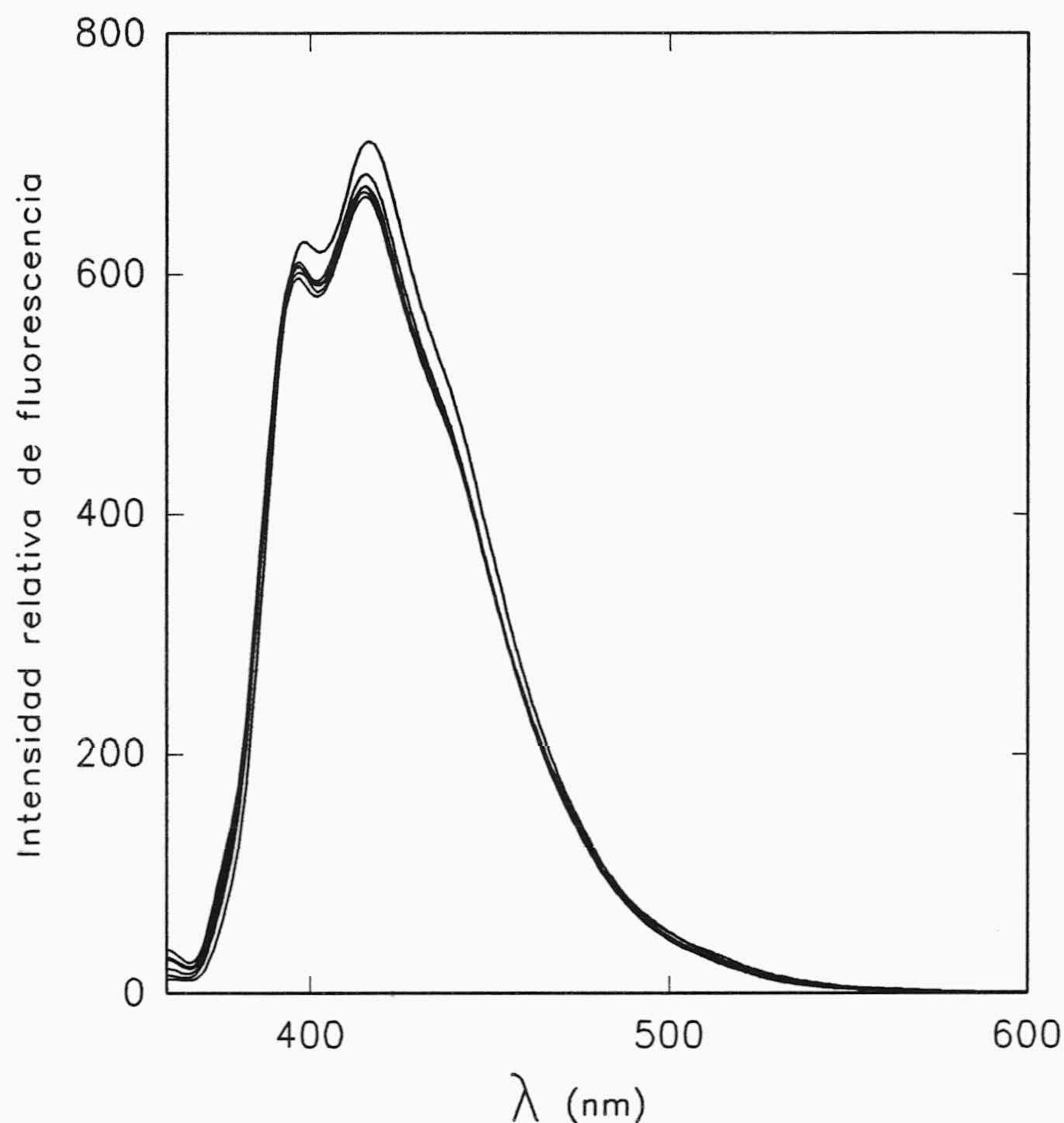
En la tabla III.9 figuran los datos obtenidos en esta experiencia así como los corregidos por el efecto de dilución.

**Tabla III.9**

Resultados obtenidos en la hibridación de antraceno-poli(C) con poli(I)  
( $r = [\text{poli(I)}]/[\text{antraceno-poli(C)}]$ ).

Volumen de poli(I) ( $\mu\text{L}$ )	[poli(I)] (M)	[poli(C)] (M)	$I_f$	$I_f$ corregida	$I_f$ normalizada	r
0	0	$2'11 \cdot 10^{-3}$	710'2	710'2	100	0'00
100	$4'45 \cdot 10^{-4}$	$1'64 \cdot 10^{-3}$	531'3	682'7	92'1	0'27
200	$7'34 \cdot 10^{-4}$	$1'34 \cdot 10^{-3}$	428'3	673'1	94'8	0'54
300	$9'32 \cdot 10^{-4}$	$1'14 \cdot 10^{-3}$	365'6	678'9	95'6	0'82
400	$1'08 \cdot 10^{-3}$	$9'85 \cdot 10^{-4}$	343'9	668'8	94'2	1'10
500	$1'19 \cdot 10^{-3}$	$8'69 \cdot 10^{-4}$	314'0	664'5	93'6	1'37





**Figura III.21.**-Espectros de emisión fluorescente entre 360 y 600 nm de una disolución de antraceno-poli (C) a distintas concentraciones de poli (I).

Es conocido que a pH 7'0 y concentración salina decimolar, poli (I) forma una doble cadena por apareamiento de sus bases con las de poli (C), a una relación de concentraciones molares expresadas en bases nucleotídicas igual a la unidad (Chamberlin y Patterson, 1965; Arnott y col., 1973). Si se supone que la hibridación sucede en las condiciones de nuestra experiencia, los resultados espectrales obtenidos, indican que se puede utilizar el decrecimiento de la señal de fluorescencia, en la detección de la hibridación de poli (C) con poli (I), sin necesidad de efectuar separaciones entre la sonda hibridada y la que queda sin hibridar, ésto es, en disoluciones homogéneas de ácidos nucleicos. Sin embargo, el pequeño

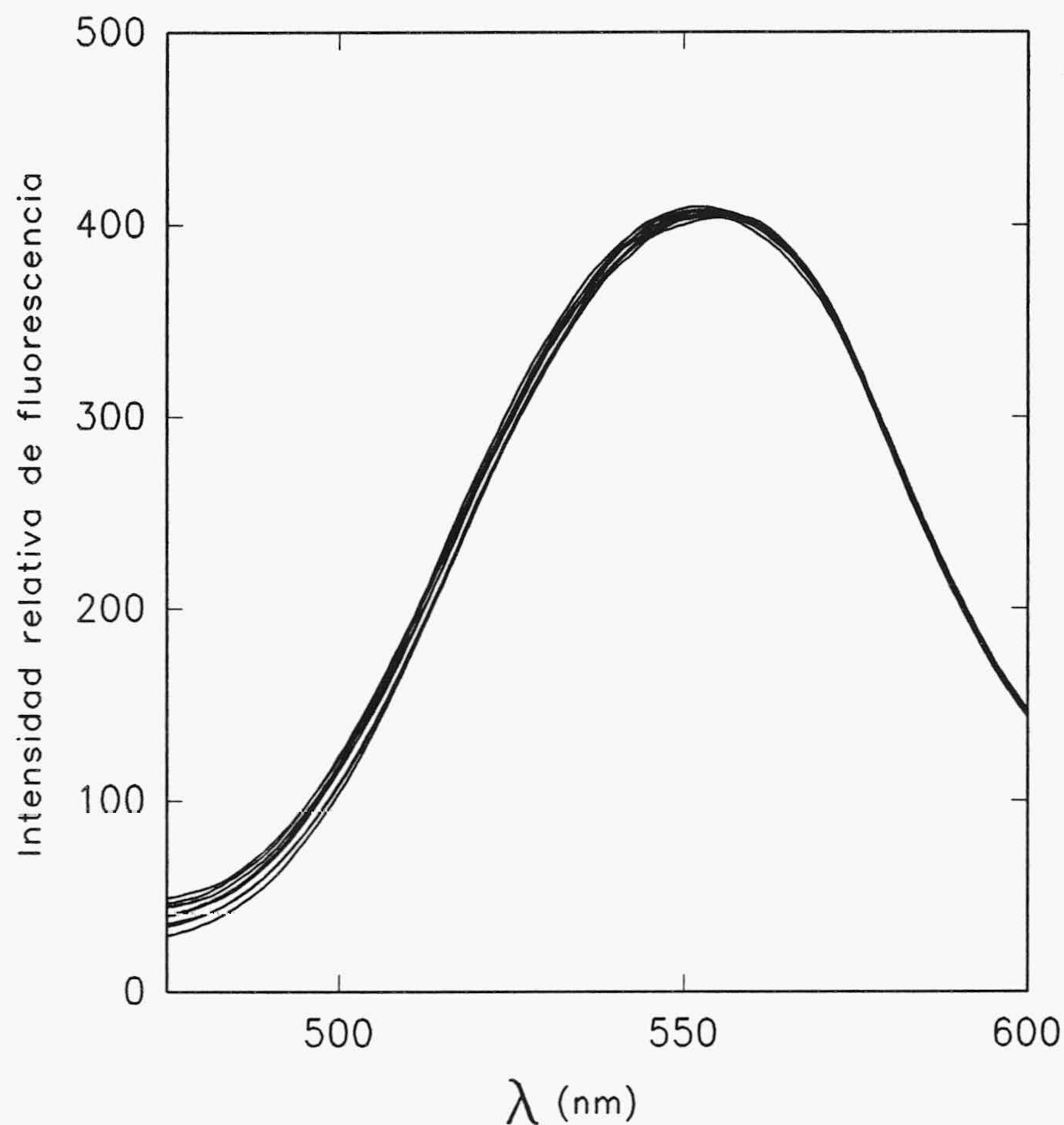


decrecimiento obtenido en la señal de fluorescencia del conjugado antraceno-poli (C), cuando se produce la hibridación, provoca que la detección de ésta sea muy poco sensible y dificulta cualquier interpretación cuantitativa, por lo que nos debemos remitir a posteriores resultados que se han obtenido cuando se utilizan pireno o fluoresceína como etiquetas fluorescentes, para lograr una comprobación más clara de la utilidad de nuestras sondas en la detección de la hibridación de ácidos nucleicos en medios homogéneos.

#### **III. 4. 2. Espectros de fluorescencia en estado estacionario de dansilo-poli (C) cuando éste hibrida con poli (I).**

La figura III.22 muestra los espectros de emisión de dansilo-poli (C) en una experiencia típica de hibridación. En este caso, a 400  $\mu\text{l}$  de una disolución  $2'84 \cdot 10^{-4}$  M de dansilo-poli (C) en tampón de hibridación, se han añadido 8 alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  de poli (I)  $5'17 \cdot 10^{-4}$  M en el mismo tampón, hasta alcanzar una concentración final de poli (I) =  $3'45 \cdot 10^{-4}$  M. Si se tiene en cuenta que el efecto de dilución provoca que la concentración final de dansilo-poli (C) sea de  $9'47 \cdot 10^{-5}$  M, se debe suponer la total hibridación de éste con el poli (I) añadido. Los datos obtenidos muestran que el espectro de fluorescencia de dansilo-poli (C) permanece prácticamente inalterado con el aumento de la concentración de poli (I), si se corrige el efecto de dilución, lo que demuestra que no se puede utilizar este fluoróforo para la detección de la hibridación de ácidos nucleicos en medios homogéneos, por fluorescencia en estado estacionario.





**Figura III.22.-** Espectros de emisión de fluorescencia entre 475 y 600 nm de una disolución de dansilo-poli (C) a distintas concentraciones de poli (I).

### **III. 4. 3. Espectros de fluorescencia en estado estacionario durante la hibridación de fluoresceína-poli (C) con poli (I).**

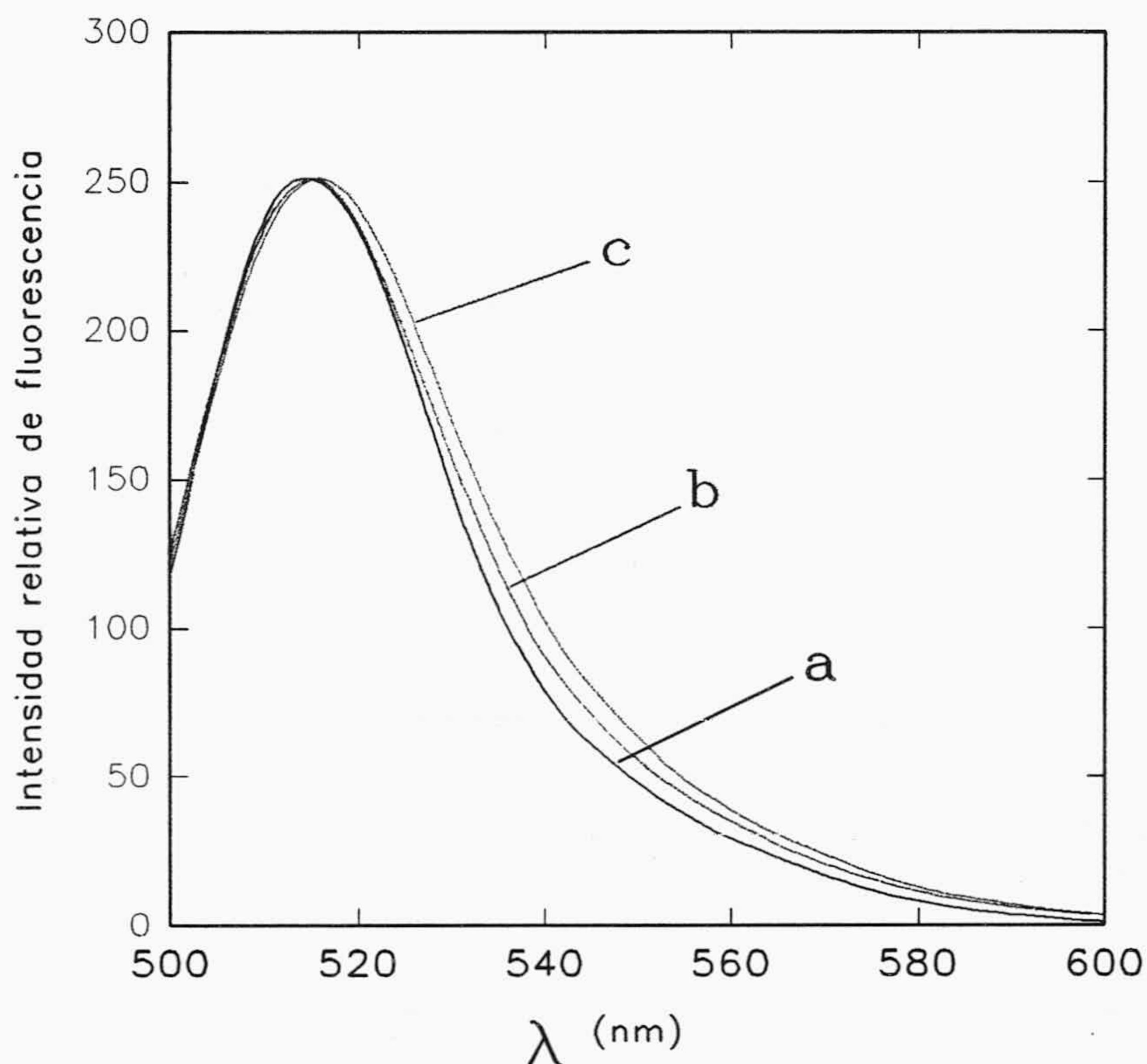
Debido a que el estudio a que se refiere el título del actual epígrafe ha sido llevado a cabo anteriormente por Jackson (1991), estrictamente no es un objetivo de nuestra investigación. Sin embargo, la sensible disminución de la señal de fluorescencia en estado estacionario, que se produce cuando el conjugado de fluoresceína-poli (C) hibrida con poli (I), en disolución a pH fisiológico, ha sido aplicado en esta Memoria para la detección de la renaturalización de ADN de *E. coli* y en la detección fluorimétrica de la hibridación de



cadenas complementarias de ADN hepático. Por lo tanto, es conveniente recordar que la principal conclusión, previamente alcanzada por Jackson (1991) respecto al *quenching* que se produce en la fluorescencia de esta sonda cuando poli (I) hibrida con fluoresceína-poli (C), es que hay un aumento del  $pK_a$  aparente del conjugado de fluoresceína cuando éste hibrida con poli (I), lo que provoca la aparición de una mayor cantidad fraccional de monoanión (de menor rendimiento cuántico) tras la hibridación y la concomitante disminución en la señal de fluorescencia.

Para corroborar los cambios que aparentemente se producen en el mencionado equilibrio mono-dianión, se ha realizado una experiencia que no ha sido descrita anteriormente. Para ello se han registrado los espectros de emisión de disoluciones de fluoresceína libre, fluoresceína-poli (C) y fluoresceína-poli (C)-poli (I), situando el monocromador de excitación a la longitud de onda de 347 nm. A esta longitud de onda la absorbancia del monoanión es mayor que la del dianión, lo que nos ha permitido excitar el monoanión de forma preferencial. La emisión del monoanión se caracteriza por un máximo de emisión a 515 nm, la misma longitud de onda que el dianión, pero de menor rendimiento cuántico y por un hombro en la región alrededor de 550 nm que no lo presenta el dianión (Yguerabide y col., 1994). En la figura III.23 se muestran los registros normalizados a 515 nm de la fluorescencia de disoluciones de fluoresceína libre  $10^{-6}$  M, fluoresceína-poli (C)  $2 \cdot 10^{-6}$  M y fluoresceína-poli (C)-poli (I)  $2 \cdot 10^{-6}$  M, en tampón de hibridación. En la figura se puede observar que la intensidad de emisión alrededor de 550 nm aumenta, en relación a la que corresponde al máximo a 515 nm, cuando la fluoresceína está unida al poli (C) y se incrementa otra vez cuando éste hibrida con poli (I). Estos resultados significan que, en disolución a pH 7.5, la hibridación con poli (I) aumenta el  $pK_a$  aparente del conjugado de fluoresceína, provocando un aumento en la cantidad fraccional de monoanión y consecuentemente en la emisión a 550 nm. También permite explicar el bajo valor del coeficiente de extinción molar anteriormente encontrado en la fluoresceína enlazada con poli (C) a 495 nm y pH alrededor de 7.0, ya que el coeficiente de extinción molar del monoanión de fluoresceína es menor que el correspondiente al dianión (Diehl, 1989; Ballesteros y col., 1998). Se debe destacar que, en la figura III.23, se ha trasladado el espectro de la fluoresceína libre hacia mayores longitudes de onda, haciendo coincidir su máximo de emisión con los correspondientes a fluoresceína-poli (C) y al híbrido fluoresceína-poli (C)/poli (I), al objeto de poder observar las diferencias en emisión a 550 nm.





**Figura III.23.-** Espectros de emisión fluorescente entre 500 y 600 nm de: (a) fluoresceína libre, (b) fluoresceína-poli(C) y (c) fluoresceína-poli(C)-poli(I).

#### III. 4. 4. Espectros de fluorescencia en estado estacionario de pireno-poli (C) cuando éste hibrida con poli (I).

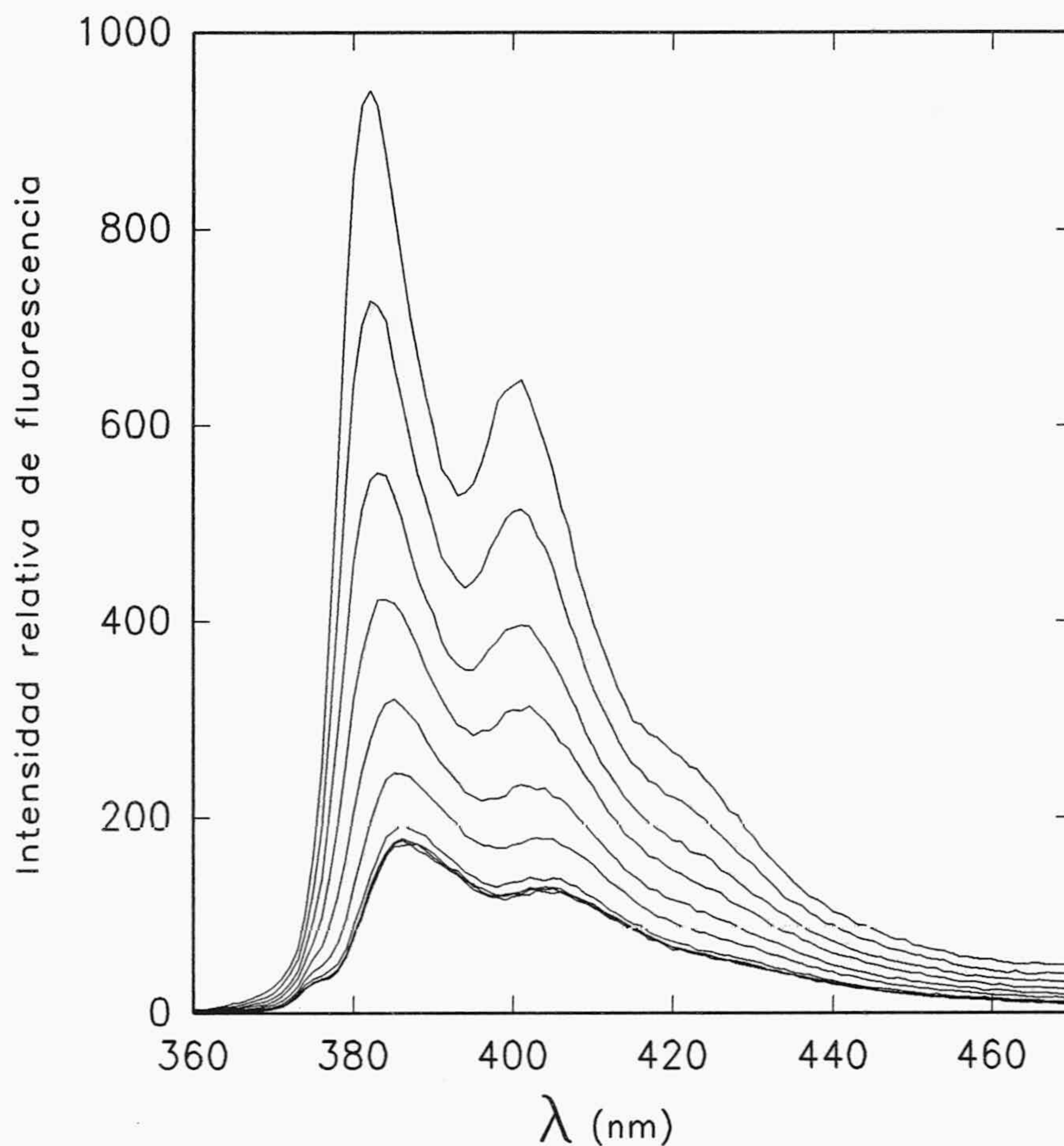
En experiencias preliminares realizadas por nuestro grupo de investigación, se ha marcado poli (C) con isotiocianato de pireno, ITCpireno-poli (C), siguiendo la metodología descrita en el apartado II.2.4.2. Con esta sonda, se realizaron tres experiencias típicas de hibridación en las que se añadió la cantidad necesaria de poli (I) para hibridar por completo al ITCpireno-poli (C), los datos obtenidos mostraron que la señal de fluorescencia en estado estacionario, una vez corregido el efecto de dilución, disminuye aproximadamente sólo un



30% del valor de la intensidad inicial. Adicionalmente, se pudo comprobar que la saturación del efecto comentado, se consiguió con una relación [poli (I)/ITCpireno-poli (C)]  $\approx 0'6$  (Yguerabide y col., 1996). Estos resultados, junto a los que se describen más adelante en los apartados III.5.1 y III.5.2, que tratan de las experiencias realizadas mediante fluorescencia resuelta en el tiempo, nos han llevado a ensayar otra sonda de pireno con la que se pueda conseguir una mayor sensibilidad en la detección de la hibridación.

Así, se etiquetó poli (C) con cloruro de sulfonil pireno, siguiendo la metodología descrita en el apartado II.2.4.1. La figura III.24-a muestra los espectros de emisión de pireno-poli (C) en una experiencia típica de hibridación. En este caso, a 450  $\mu\text{l}$  de una disolución  $7'1 \cdot 10^{-4}$  M de pireno-poli (C) en tampón de hibridación, se han añadido 9 alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  de una disolución de poli (I)  $1 \cdot 10^{-3}$  M en el mismo tampón, hasta alcanzar una concentración final de poli (I) de  $5 \cdot 10^{-4}$  M. Si se tiene en cuenta que el efecto de dilución provoca que la concentración final de pireno-poli (C) sea de  $3'5 \cdot 10^{-4}$  M, se debe suponer que la hibridación de éste ha sido total con el poli (I) añadido. Los datos obtenidos muestran que la señal de fluorescencia de pireno-poli (C) disminuye continuamente y que el espectro se desplaza hacia mayores longitudes de onda, con el aumento de la concentración de poli (I), hasta que, a un valor determinado de [poli (I)], se registra un espectro que ya no se modifica aunque se aumente la concentración de éste si se corrige el efecto de dilución. Los espectros se registraron sin polarizadores en los canales de excitación y emisión.





**Figura III.24.a-** Espectros de emisión fluorescente entre 360 y 470 nm de la valoración de hibridación de pireno-poli(C) con poli(I).

Los valores de la intensidad de fluorescencia correspondientes a la figura III.24-a, se han corregido por el efecto de dilución y se han normalizado respecto a la de partida. Asimismo, se han corregido por el efecto de dilución, las concentraciones de poli (C) y de poli (I), en la disolución que se está valorando, tras cada adición de este último. Todos estos valores, junto a los datos originales, se han incluido en la Tabla III.10.



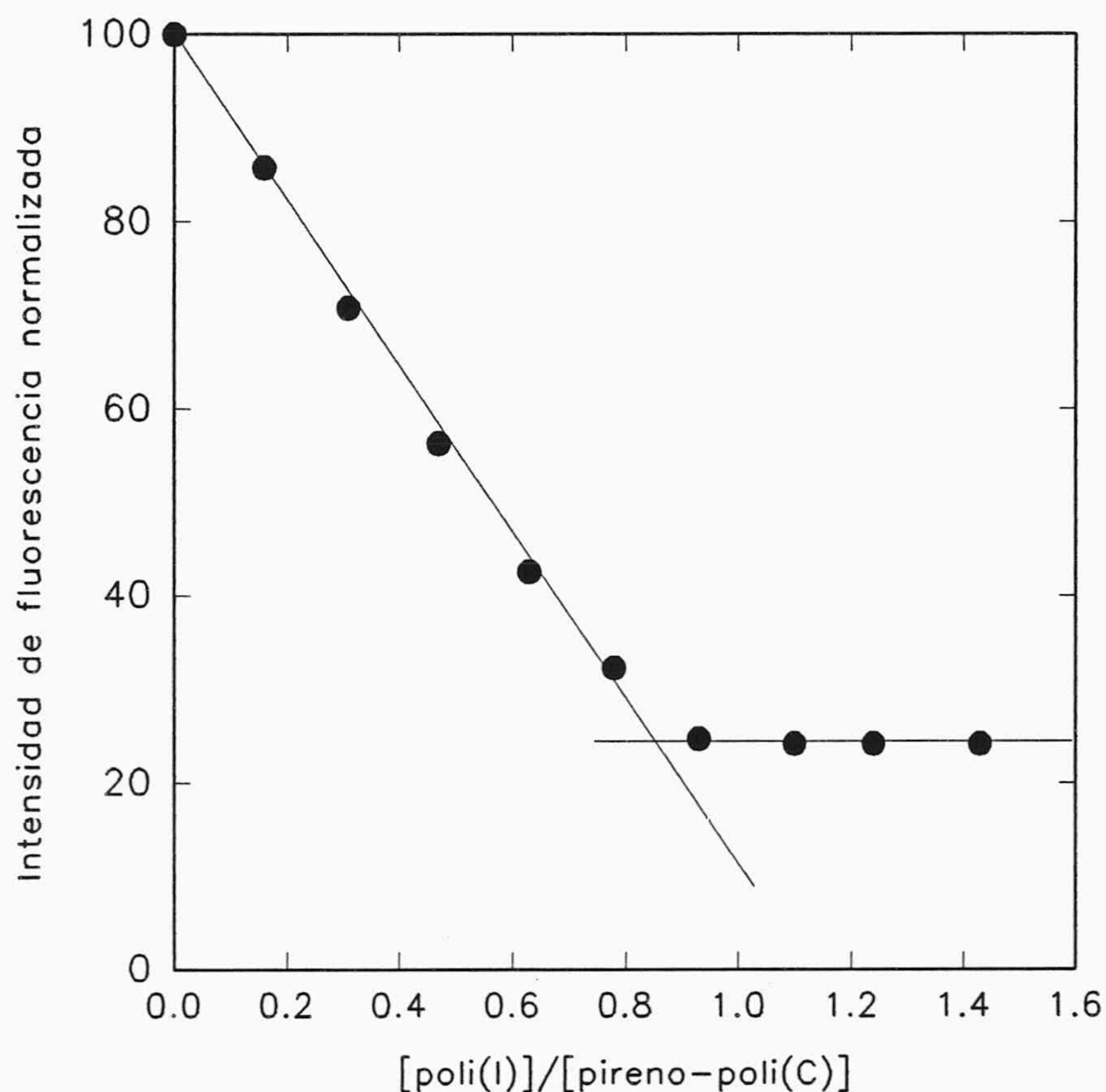
Tabla III.10

Datos correspondientes a la valoración de pireno-poli(C) con poli(I)  
 $(r = [\text{poli(I)}]/[\text{pireno-poli(C)}])$ .

Volumen de poli (I) ( $\mu\text{L}$ )	[poli(I)] (M)	[poli(C)] (M)	$I_f$	$I_f$ corregida	$I_f$ normalizada	r
0	0	$7'1 \cdot 10^{-4}$	940'8	940'8	100	0'00
50	$1'0 \cdot 10^{-4}$	$6'4 \cdot 10^{-4}$	726'8	807'5	85'8	0'16
100	$1'8 \cdot 10^{-4}$	$5'8 \cdot 10^{-4}$	545'1	666'2	70'8	0'31
150	$2'5 \cdot 10^{-4}$	$5'3 \cdot 10^{-4}$	397'6	530'2	56'3	0'47
200	$3'1 \cdot 10^{-4}$	$4'9 \cdot 10^{-4}$	276'6	399'6	42'5	0'63
250	$3'6 \cdot 10^{-4}$	$4'6 \cdot 10^{-4}$	195'2	303'7	32'3	0'78
300	$4'0 \cdot 10^{-4}$	$4'3 \cdot 10^{-4}$	139'7	232'9	24'7	0'93
350	$4'4 \cdot 10^{-4}$	$4'0 \cdot 10^{-4}$	128'2	228'0	24'2	1'10
400	$4'7 \cdot 10^{-4}$	$3'8 \cdot 10^{-4}$	123'6	227'7	24'2	1'24
450	$5'0 \cdot 10^{-4}$	$3'5 \cdot 10^{-4}$	123'6	227'7	24'2	1'43

En la figura III.24-b se muestra la correspondiente gráfica de titulación expresada como intensidad de fluorescencia vs.  $[\text{poli (I)}]/[\text{pireno-poli (C)}]$ , en la que todos los datos se han corregido por el efecto de dilución.





**Figura III.24-b.-** Gráfica de titulación de hibridación expresada en intensidad de fluorescencia vs. [poli (I)]/[pireno-poli (C)].

Como se puede observar, hay un decrecimiento lineal de la señal de fluorescencia respecto a la relación [poli (I)]/[pireno-poli (C)]. Si se tiene en consideración que, en las condiciones de nuestras experiencias, poli (I) forma una doble cadena con poli (C), mediante el apareamiento de sus bases respectivas, los resultados espectrales obtenidos parecen indicar la existencia de una proporcionalidad entre el decrecimiento de la señal de fluorescencia y la cantidad fraccional de híbrido formado. Esta proporcionalidad se ha puesto de manifiesto de forma más directa en la figura III.25, en la que se ha representado el porcentaje de pireno-poli (C) hibridado, obtenido mediante la expresión siguiente, frente a [poli (I)]/[pireno-poli (C)],

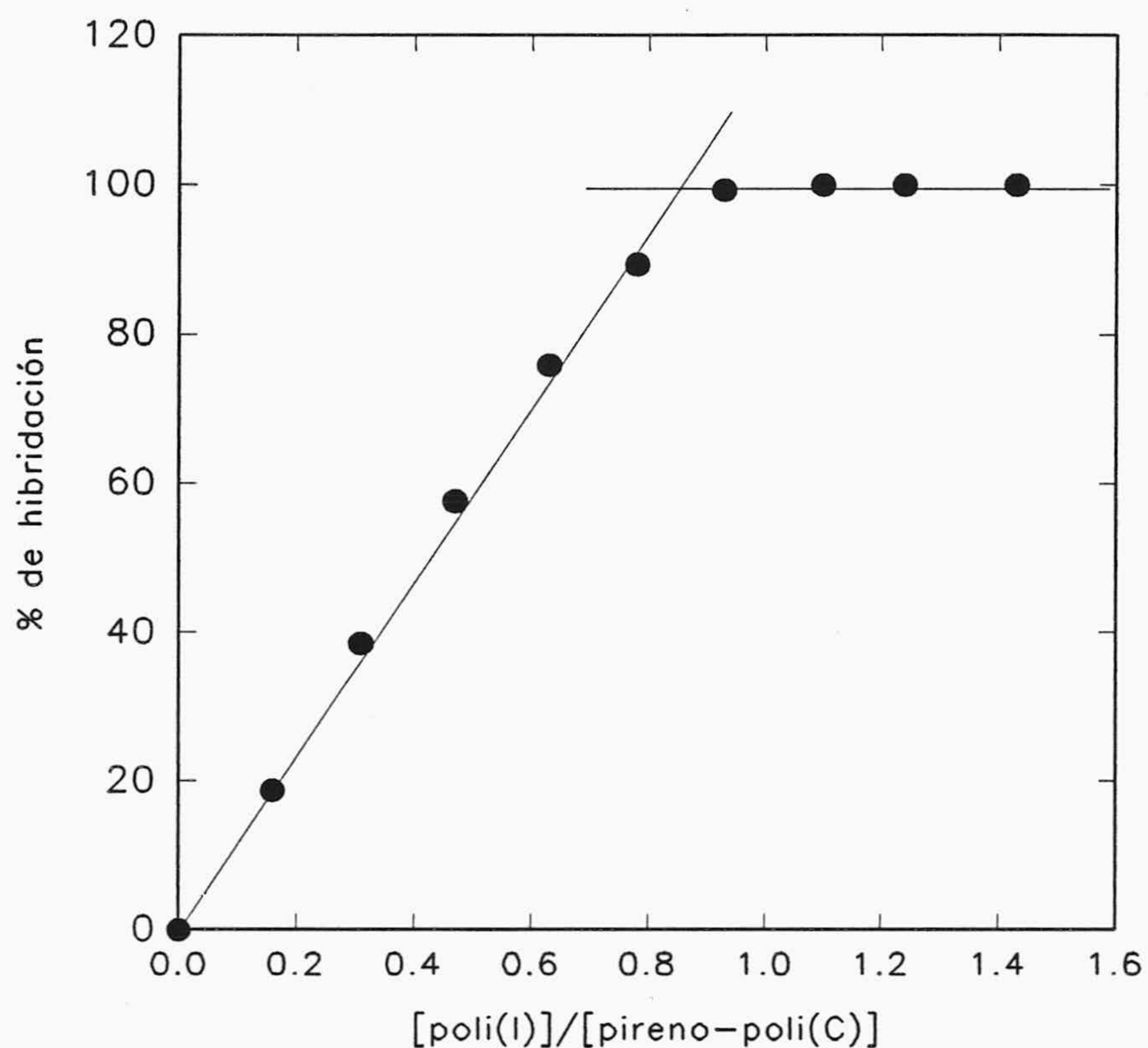


$$\%H = 100 \cdot \left( \frac{I_0 - I}{I_0 - I_\infty} \right) \quad (25)$$

en donde  $I_0$  e  $I_\infty$  son las intensidades de fluorescencia de pireno-poli (C) a concentraciones de poli (I) cero y saturante e  $I$  es la intensidad de fluorescencia a cualquier concentración intermedia de poli (I).

Para el empleo de la ecuación (25) se debe suponer que el decrecimiento que se registra en la señal de fluorescencia cuando se produce la hibridación, es proporcional a la cantidad de bases apareadas, ya que si ésto es correcto se debe esperar que el % de hibridación aumente linealmente con la relación [poli (I)]/[pireno-poli (C)], llegando a un nivel máximo cuando se alcance la saturación. Esta suposición se debe cumplir de forma bastante aproximada a causa de la alta afinidad de hibridación entre poli (C) y poli (I), que permite esperar que aquella se produzca entre todo el poli (I) añadido a la disolución de poli (C) hasta que se alcance la concentración de saturación. Sin embargo, durante la valoración de pireno-poli (C) con poli (I), se forma el apareamiento entre trozos de cadenas complementarias a bajas concentraciones de poli (I), mientras que cuando ésta es alta, las últimas cadenas añadidas se aparean con los restos de cadenas de poli (C) no hibridadas, por lo que se obtiene como resultado final la formación de redes complejas y no se conoce exactamente si en tales mallas complejas, la intensidad de fluorescencia debe decrecer linealmente con respecto a la fracción de bases nucleotídicas apareadas. No obstante, la gráfica experimental obtenida en la figura III.25 muestra que el % de hibridación, obtenido mediante la aplicación de la ecuación (25), aumenta linealmente con la concentración añadida de poli (I) (o sea, es proporcional a la cantidad de bases apareadas), llegando a un nivel máximo cuando se alcanza la saturación y produciéndose un corte bastante agudo aproximadamente a la relación molar 1:1, expresada en bases. Estos resultados soportan la idea de que la intensidad de fluorescencia disminuye linealmente con la fracción hibridada de pireno-poli (C), por lo que se puede detectar la hibridación mediante el *quenching* de fluorescencia de la sonda que hemos elaborado.





**Figura III.25.-** Grafica de valoración de hibridación expresada en porcentaje de hibridación de poli(I)-(pireno-poli(C)) vs de  $[\text{poli(I)}]/[\text{pireno-poli(C)}]$ .

Se han obtenido gráficas similares a la III.24, cuando se valoraron distintas concentraciones de partida de pireno-poli (C) (expresadas en bases) con diferentes porcentajes de marca, siempre que éstos sean inferiores al 4 % aproximadamente. En las figuras III.26 a III.28 se exponen, como ejemplos, tres valoraciones de disoluciones de pireno-poli (C) de concentraciones comprendidas en el intervalo entre  $7'1 \cdot 10^{-4}$  y  $8'36 \cdot 10^{-6}$  M y con porcentajes de marca entre 1'2 y 4 %. En los tres casos se ha obtenido un decrecimiento de la intensidad de fluorescencia a 383 nm, del 73'8, 67'4 y 66'3 %, respectivamente, en relación a la que inicialmente tenía la sonda de pireno-poli (C), lo que implica un descenso promedio del  $69'2 \pm 4'1$  % (en donde se incluye el valor de la desviación estándar). En otras valoraciones efectuadas (no mostradas) se obtuvieron descensos similares en la intensidad de fluorescencia.



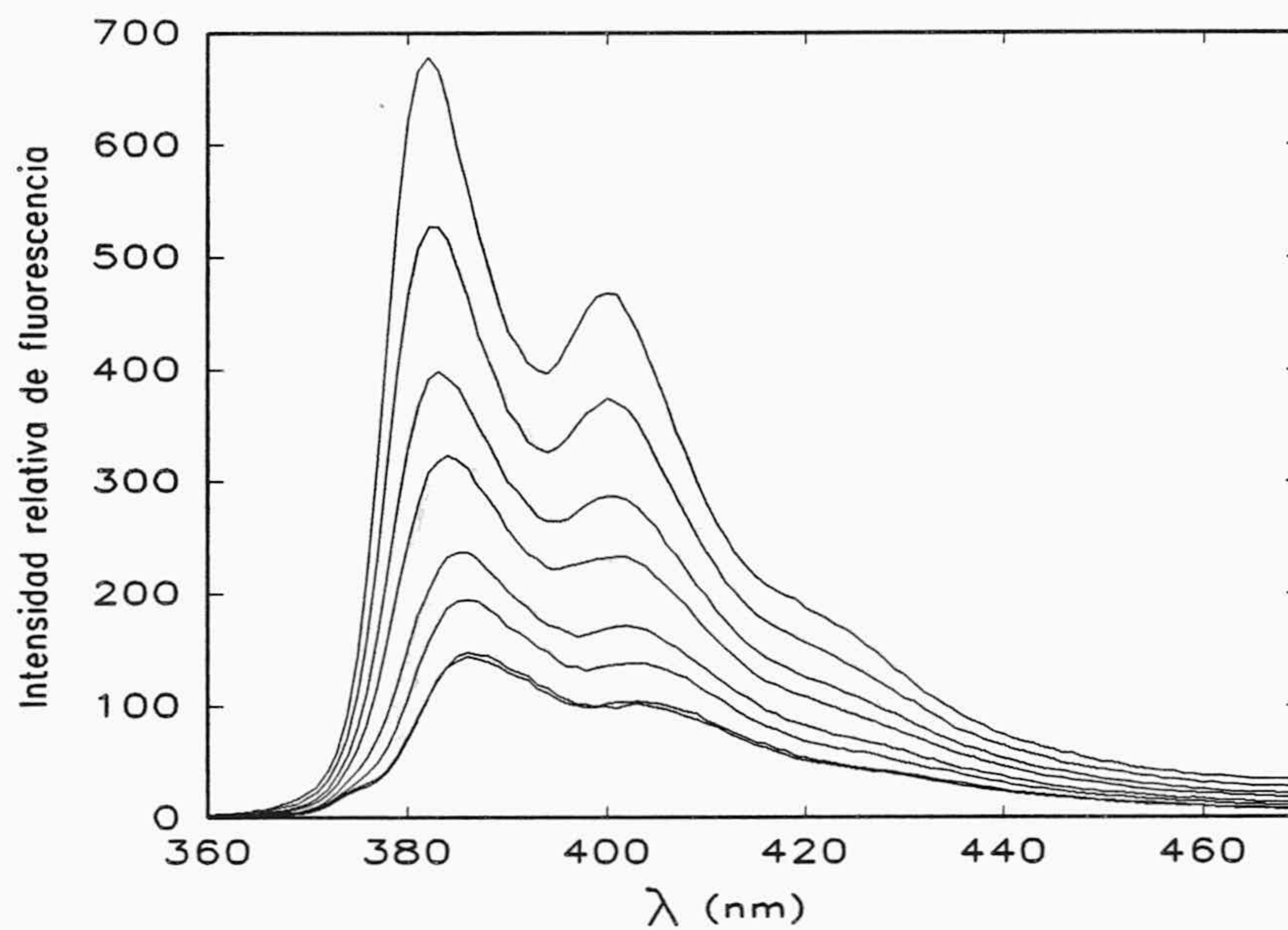


Figura III.26-a.- Espectros de hibridación de pireno-poli(C)-poli(I) de una disolución de  $[\text{pireno-poli(C)}] = 7.1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  y con un porcentaje de marca del 1'2%.

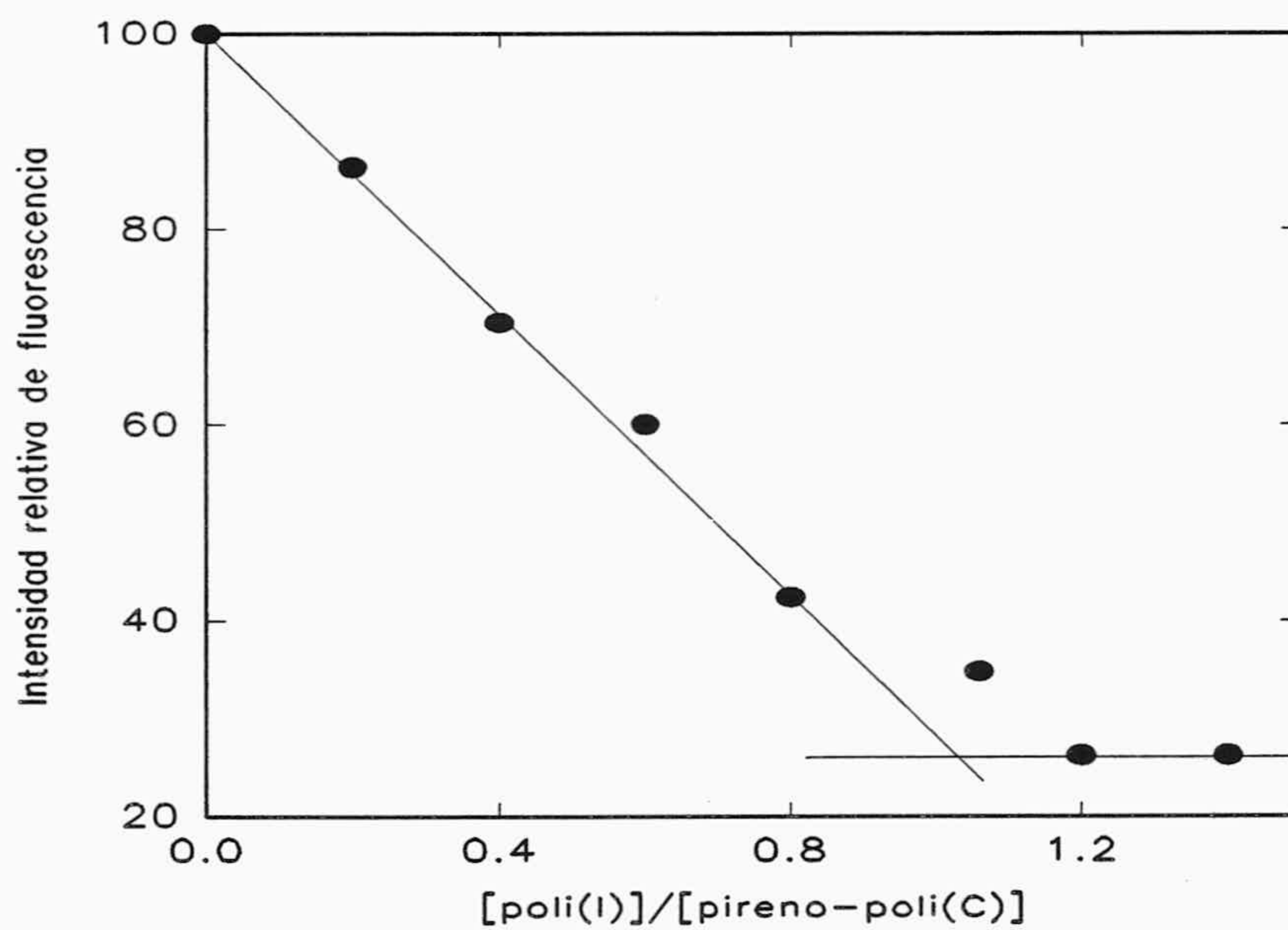


Figura III.26-b.- Grafica de titulación de hibridación correspondiente a la figura III.26-a. Se puede observar una disminución del 73'8%.



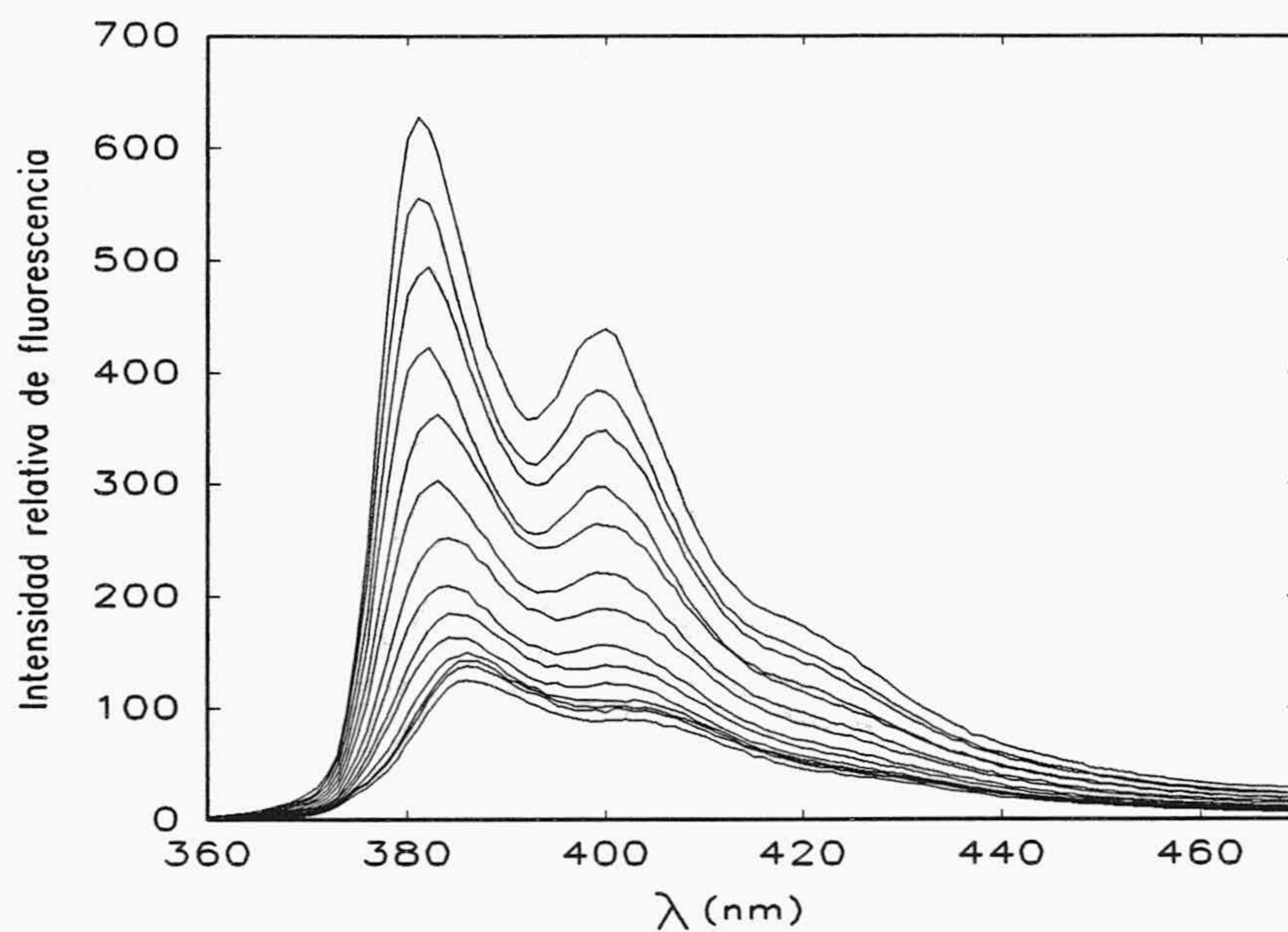


Figura-III.27-a.- Espectros de hibridación pireno-poli(C)-poli(I) de una disolución de  $[\text{pireno-poli(C)}] = 8'8 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  y con un porcentaje de marca del 2'5%.

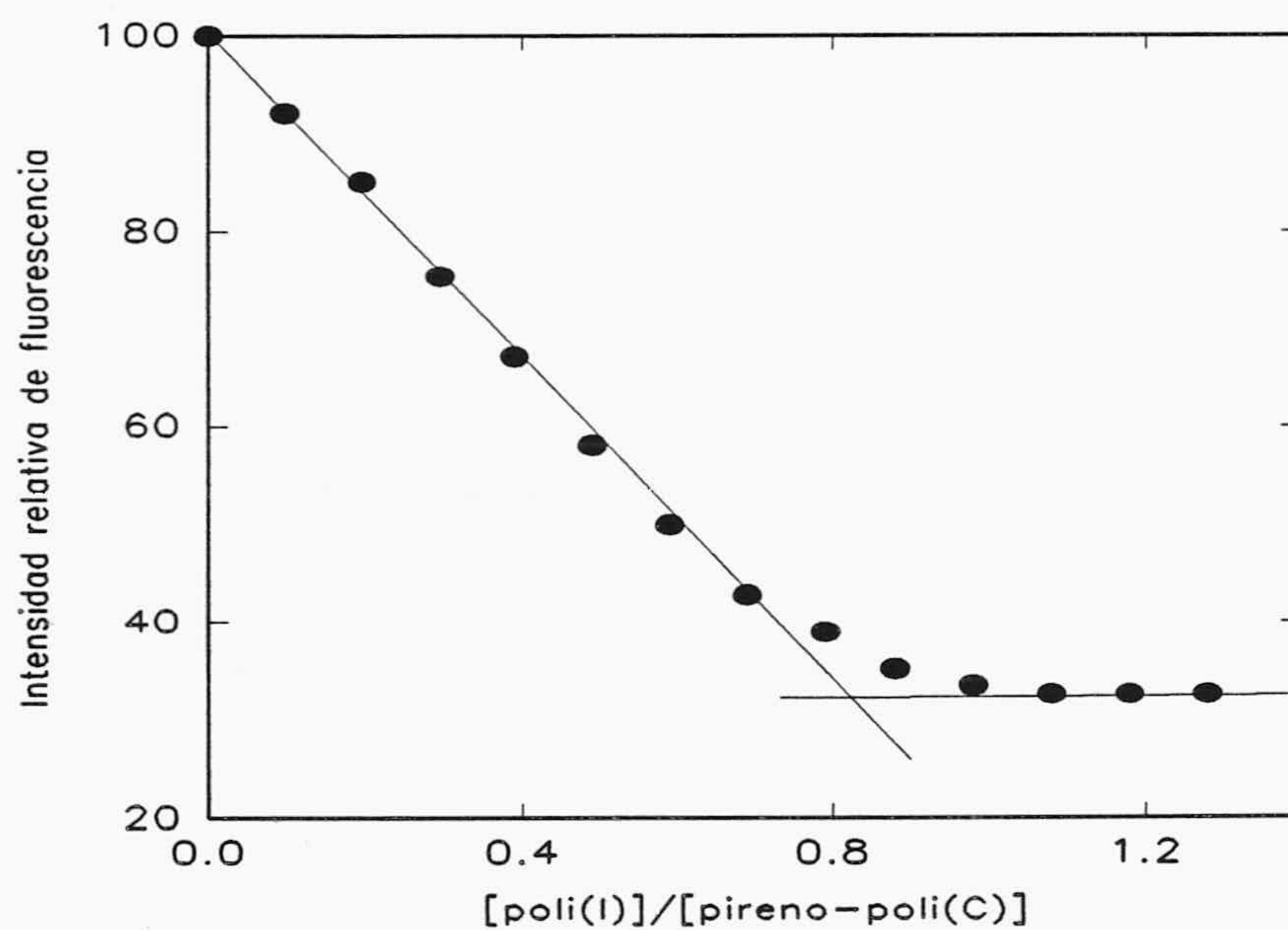
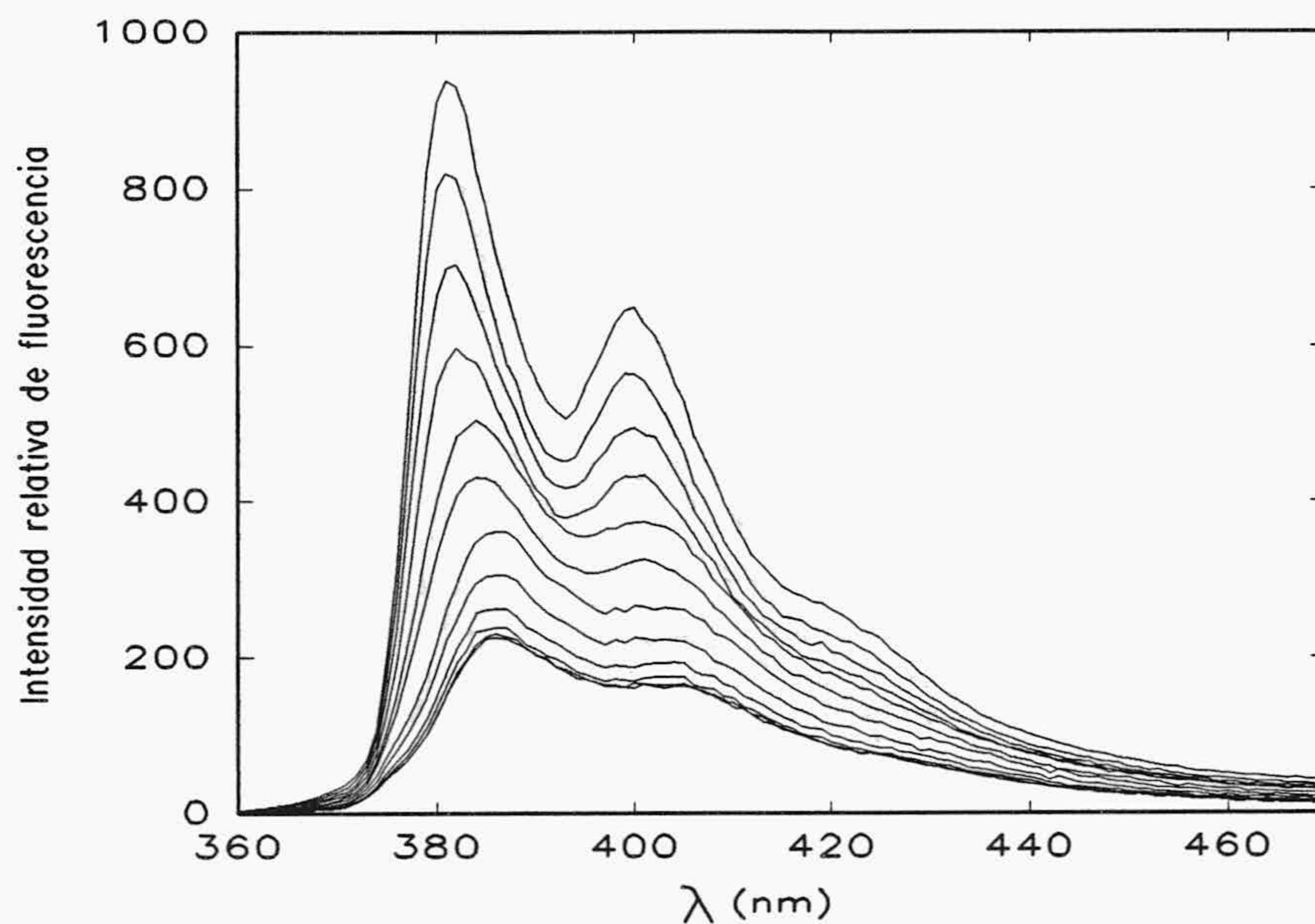
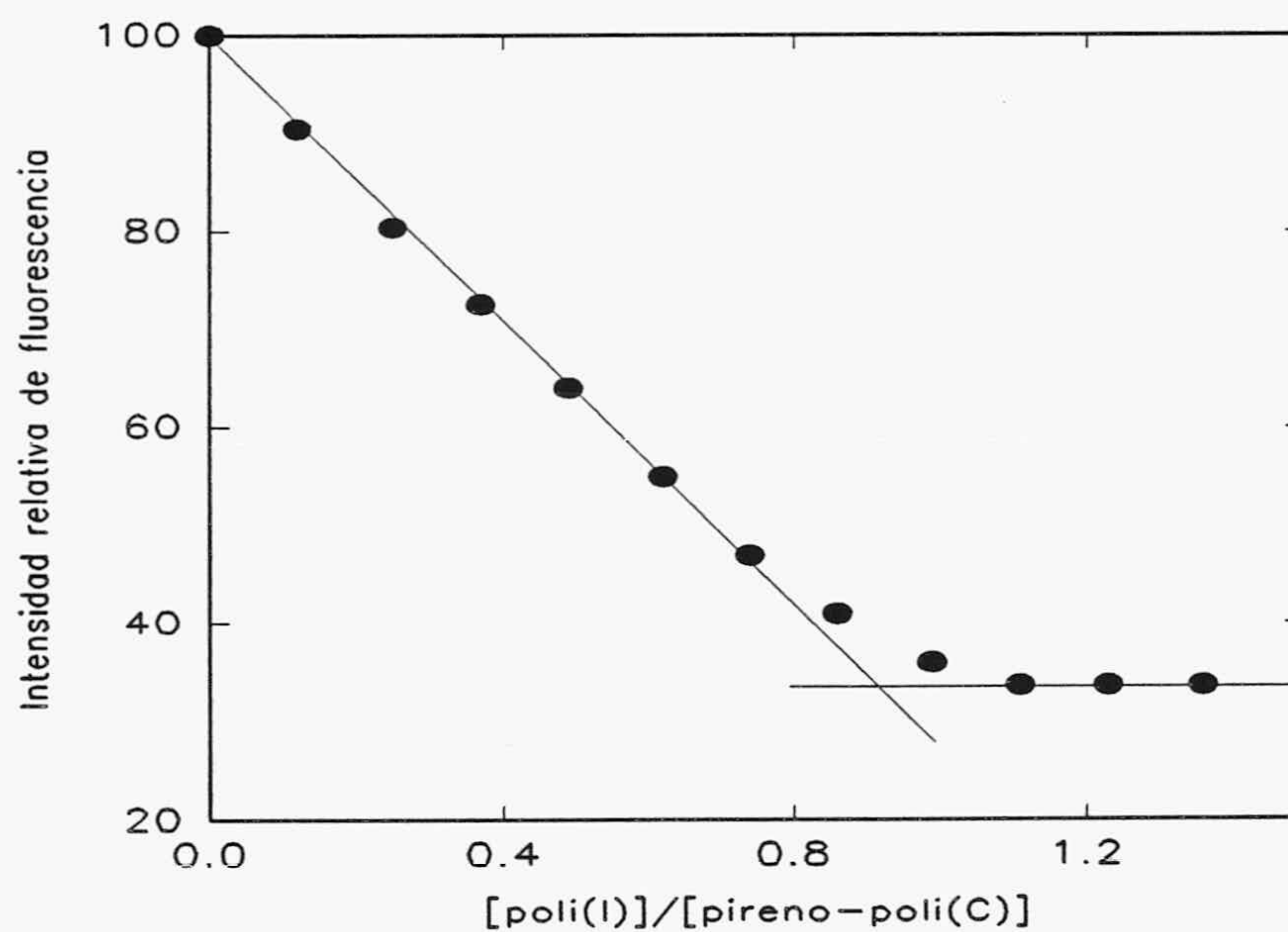


Figura III.27-b.- Gráfica de titulación de hibridación correspondiente a la figura III.27-a. Se puede observar una disminución del 67'4%.





**Figura III.28-a.-** Espectros de hibridación de pireno-poli(C)-poli(I) de una disolución de  $[\text{pireno-poli(C)}] = 8'36 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  y con un porcentaje de marca del 4%.



**Figura III.28-b.-** Grafica de titulación de hibridación correspondiente a la figura III.28-a. Se puede observar una disminución del 66'3%.



De la observación de los resultados anteriores parece deducirse que con un menor porcentaje de marca fluorescente se obtiene un mayor decrecimiento relativo de la intensidad de fluorescencia, aunque las diferencias obtenidas son bastante pequeñas y se pueden considerar casi despreciables. Se puede justificar el anterior resultado mediante la ya comentada posibilidad de formación de excímeros, lo que provocaría una menor intensidad de la fluorescencia de partida, así como un menor número de fluoróforos en estado monomérico disponibles para el *quenching*. Sin embargo, se debe de resaltar que la relación entre porcentaje de marca y disminución relativa de fluorescencia no es del todo general siempre que el mencionado porcentaje no sea superior al 4 %. Así, en las diferentes ocasiones en que se ha modificado poli (C) y aunque dicha modificación se haya realizado en una extensión similar, se han obtenido distintos porcentajes de disminución en la intensidad de fluorescencia cuando se valoró con poli (I) (no obstante, estos porcentajes siempre fueron muy similares entre sí). Por otra parte, en todos los casos en que la disminución de la señal fluorescente era algo menor, siempre fué acompañada, esta menor disminución, de una pequeña señal de fluorescencia a 500 nm, típica de los excímeros del pireno. Todos estos resultados se pueden justificar si se tiene en cuenta que el proceso de modificación del polinucleótido sintético es un proceso aleatorio, lo que implica que la transaminación en algunos de los lotes modificados de poli (C) puede haberse producido en una serie de bases citosina lo suficientemente cercanas entre sí como para permitir la posterior formación de excímeros una vez que fueron etiquetadas con la marca fluorescente, mientras que en otros casos la modificación no afectó a bases muy próximas entre sí.

Una singularidad de las figuras III.24 y III.26-III.28, es el pequeño hombro que se observa a 377 nm, en los espectros correspondientes al poli (C) completamente hibridado con poli (I). En el epígrafe III.4.6. se tendrá en cuenta tal peculiaridad para su posible relación con la polaridad del ambiente que rodea al fluoróforo.

En otra serie de experiencias se han valorado alícuotas de una muestra de pireno-poli (C) de concentración  $6 \cdot 10^{-5}$  M y un porcentaje de marca del 1'2 %, disueltas en Tris-HCl, 10 mM, AEDT 1 mM, pH 7'5 y adicionadas de diferentes concentraciones de NaCl, dentro del intervalo 0 - 1 M. Las muestras se valoraron con poli (I) disuelto en tampón de la misma concentración salina que el poli (C) que iba a valorarse. En la tabla III.11 se indican los resultados obtenidos a las distintas concentraciones salinas estudiadas. Como se puede observar, en todos los casos la fluorescencia medida a 383 nm, decrece en un porcentaje del  $67'5 \pm 3\%$ , respecto de la que inicialmente tenía la sonda de pireno-poli (C).



Tabla III.11.

Disminución de la señal fluorescente de disoluciones de pireno-poli(C)  $6 \cdot 10^{-5}$  M tras la hibridación con poli(I), a distintas concentraciones salinas (NaCl).

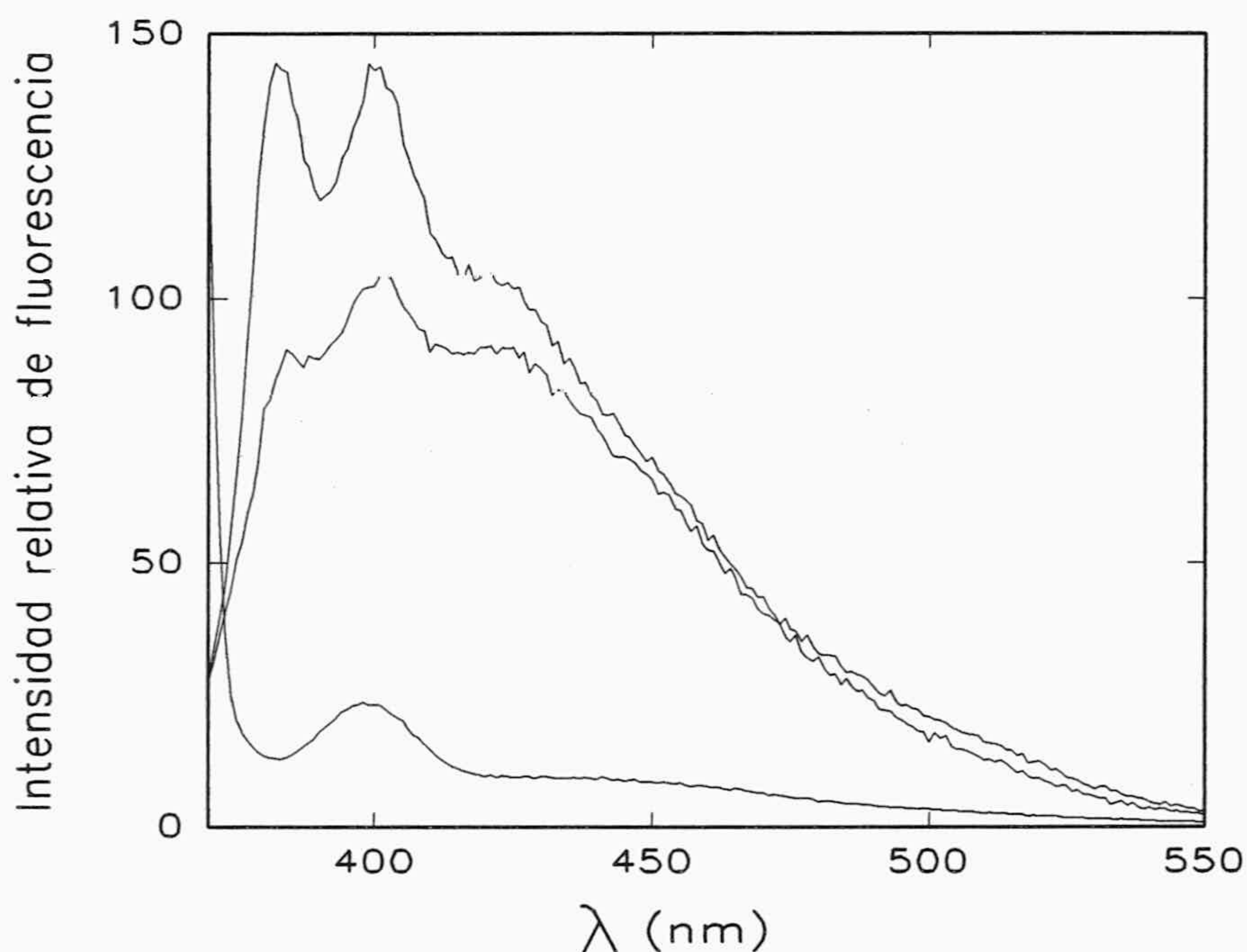
[NaCl] (mM)	Porcentaje de disminución
0	65'5
20	68'8
50	68'5
100	67'7
200	70'3
400	65'8
1000	65'7

El valor medio del descenso obtenido en esta experiencia es del  $67'47 \pm 1'86$  % y resulta concordante con los descensos anteriormente indicados en experiencias similares. El conjunto de resultados obtenidos, indica que se puede utilizar el extenso decrecimiento de la señal de fluorescencia, en la detección de la hibridación de poli (C) con poli (I), en disoluciones homogéneas de ácidos nucleicos. Además, la comentada disminución de la emisión fluorescente resulta independiente de la concentración de la sonda, de la extensión del etiquetado y de la fuerza iónica de la disolución, dentro de los intervalos anteriormente referidos para estas variables. Estos intervalos se han escogido como situaciones experimentales generales, fundamentalmente en lo que se refiere a la fuerza iónica. Asimismo, en lo relativo al porcentaje de marca, ya se ha discutido con anterioridad la conveniencia de que éste no supere el 4%, aproximadamente, al objeto de evitar la formación de excímeros.

Por otra parte y en lo que se refiere al cálculo de la sensibilidad del método, con respecto a la concentración de ácido nucleico (etiquetado con una extensión del 3%), se ha realizado un conjunto de experimentos en donde se han valorado concentraciones decrecientes de pireno-poli (C), con una sola adición de poli (I) a una concentración superior a la final de poli (C) en un 10%, para asegurar su total hibridación. La detección fluorimétrica se ha realizado a las longitudes de onda habituales, pero en condiciones de



máxima sensibilidad del fluorímetro, es decir con la rendija de excitación en 20 nm y la de emisión en 30 nm, que son los valores estandar máximos que admite nuestro instrumento. En la figura III.29 se representan los espectros obtenidos cuando la concentración de poli (C) fue de  $10^{-9}$  M, que ha sido la mínima detectable con una cierta fiabilidad. Como se puede observar, el ruido de fondo que presenta el tampón es considerable, aunque la señal fluorescente lo supera ampliamente y permite la detección. Sin embargo, la luz dispersa y la señal Raman del agua (que se presenta a 395 nm) son lo suficiente intensas a la longitud de onda de medida (383 nm) como para rebajar considerablemente la sensibilidad de detección, lo que se puede observar en la figura III.29, en donde se ha obtenido sólo un 37 % de disminución de fluorescencia tras la hibridación.



**Figura III.29.-** Espectros de pireno-poli (C), pireno-poli (C) hibridado con poli (I) y tampón de hibridación, en condiciones de máxima sensibilidad del espectrofluorímetro en estado estacionario. La concentración expresada en bases =  $10^{-9}$  M.

Por el momento, no es posible efectuar una interpretación del mecanismo del *quenching* de fluorescencia observado, con los datos actuales. Una explicación más rigurosa del *quenching* que provoca la hibridación de los ácidos nucleicos, se realizará más adelante, en base a resultados experimentales que no corresponden al actual epígrafe.



### III. 4. 5. Variación de la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario en la hibridación de pireno-poli (C) con poli (I).

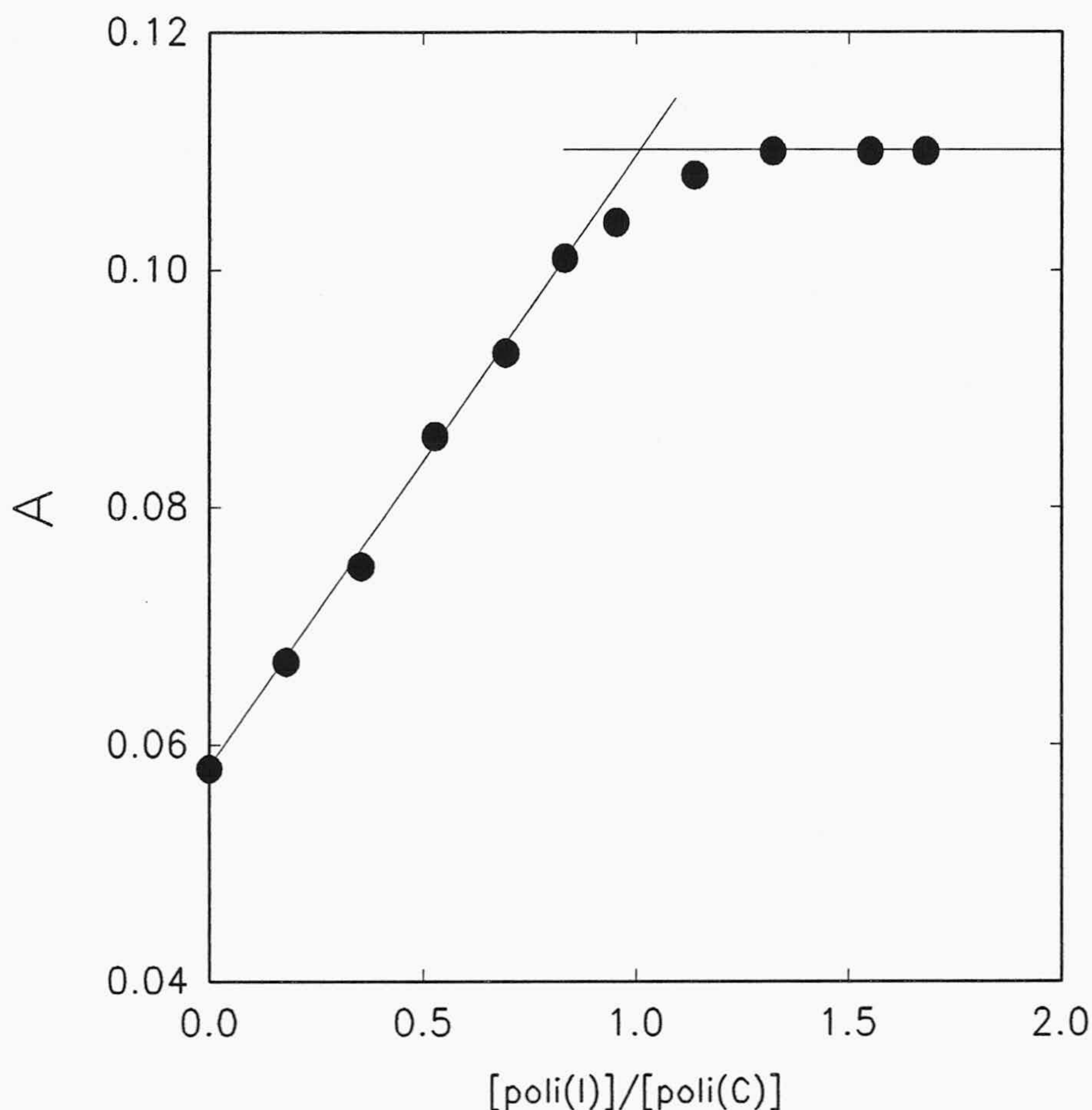
También se han realizado medidas de la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario. Siguiendo la metodología descrita en el apartado II.2.7, se ha valorado una disolución de pireno-poli (C)  $2 \cdot 10^{-5}$  M en tampón de hibridación, con cantidades crecientes de poli (I) y se ha calculado la anisotropía de fluorescencia, A, de las disoluciones resultantes, aplicando la ecuación (17). Los resultados que se indican en la Tabla III.12 son el valor de la media aritmética de cinco determinaciones. La representación gráfica de A frente a la relación  $[\text{poli (I)}]/[\text{pireno-poli (C)}]$  se ha realizado en la figura III.30, en la que se observa que la anisotropía de fluorescencia aumenta cuando pireno-poli (C) hibrida con poli (I). El factor de aumento de la anisotropía ha resultado de:  $0'11/0'058 = 1'9$ , cuando el pireno-poli (C) hibrida por completo.

Tabla III.12

Valores de la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario de una disolución de pireno-poli(C)  $2 \cdot 10^{-5}$  M valorada con cantidades crecientes de poli(I).

$r = [\text{poli(I)}]/[\text{poli(C)}]$	A	$r = [\text{poli(I)}]/[\text{poli(C)}]$	A
0'00	0'058	0'95	0'104
0'18	0'067	1'14	0'108
0'36	0'075	1'32	0'110
0'53	0'086	1'55	0'110
0'69	0'093	1'68	0'110
0'83	0'101		





**Figura III.30.-** Grafica de valoración mediante la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario(A) vs [poli (I)]/[poli (C)].  $\lambda_{ex} = 352\text{nm}$  y  $\lambda_{em} = 383\text{nm}$ .

La linealidad obtenida entre el aumento de anisotropía y la formación de los pares de bases entre poli (C) y poli (I), permite que se pueda efectuar el análisis de la hibridación por medidas de anisotropía de una forma análoga a la que se ha realizado con la eficiencia de fluorescencia en la figura III.25, es decir, suponiendo una estricta proporcionalidad entre la anisotropía y el porcentaje de hibridación. No obstante, si se tiene en cuenta la disminución de la sensibilidad de la emisión fluorescente cuando se intercalan los polarizadores en un fluorímetro y que el factor de aumento de la anisotropía es de sólo 1'9, resulta ventajoso en el análisis de la hibridación, el empleo de la disminución de la eficiencia de fluorescencia, respecto al posible uso del aumento de anisotropía.



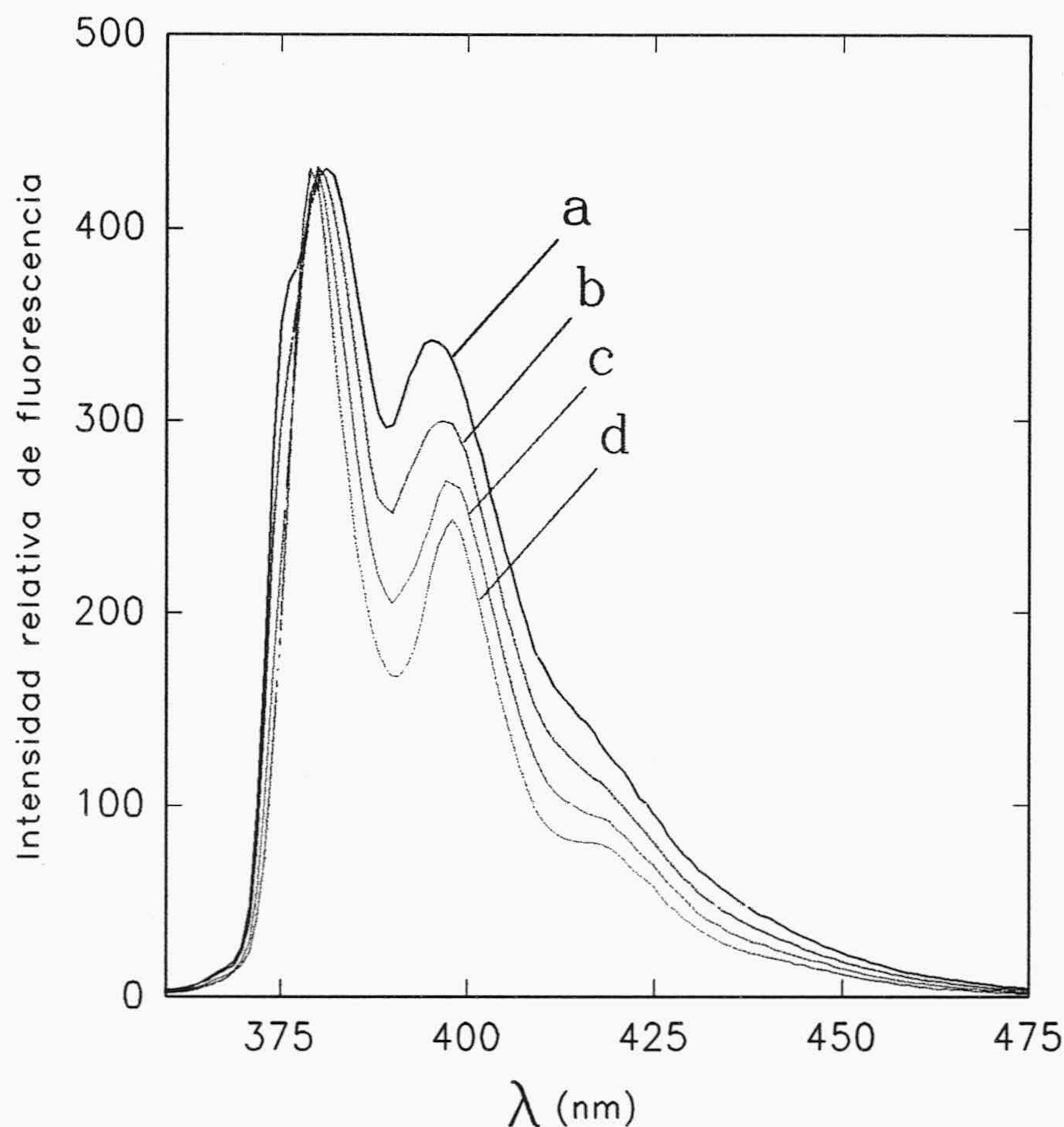
Para la excitación en estado estacionario, el valor de la anisotropía de fluorescencia de una muestra depende del ángulo medio que las moléculas del fluoróforo rotan durante su tiempo de vida. Así, cuanto mayor es el ángulo, menor es el valor de A. Más específicamente, el valor de A depende de la relación  $\tau/\phi$ , donde  $\tau$  es el tiempo de vida y  $\phi$  el tiempo de correlación rotacional del fluoróforo. Concretamente, el valor de A disminuye con el aumento de la relación  $\tau/\phi$  (Perrin, 1926). Por este motivo, como ya se indicó, las técnicas de fluorescencia polarizada proporcionan un poderoso método para el estudio de formación de complejos en los sistemas bioquímicos, ya que para una pequeña molécula de un fluoróforo que está libre en disolución, el valor de  $\phi$  depende de la masa molecular y forma del fluoróforo, así como de la viscosidad del disolvente. Sin embargo, en el caso de moléculas fluorescentes rígidamente unidas a una estructura más grande, el valor de A dependerá, fundamentalmente, del movimiento rotacional de la estructura mayor. Si la rigidez del enlace no es grande, la dependencia de A no es tan clara y el aumento de A puede ser debido al incremento en  $\phi$ , al decrecimiento de  $\tau$ , o a la combinación de los dos.

Para dilucidar lo anteriormente comentado, se deben de hacer medidas adicionales del tiempo de vida de la sonda y de la evolución temporal de la anisotropía, en un fluorímetro de nanosegundos. Los resultados obtenidos en este tipo de medidas se indican en el epígrafe III. 5.

#### **III. 4. 6. Influencia de la polaridad del disolvente en la posición del espectro del cloruro de pirenosulfonilo.**

Se ha disuelto cloruro de pireno sulfonilo en agua y se ha dejado hidrolizar durante 24 horas a 40 °C. 20  $\mu$ l de la disolución hidrolizada se han disuelto en 10 ml de metanol y de esta disolución se han tomado otros 20  $\mu$ l que se han diluido con 2 ml de metanol o con 2 ml de mezclas metanol-agua de diferente contenido alcohólico, 80/20, 60/40, 40/60 y 20/80, al objeto de obtener disoluciones de distintas polaridades. A continuación se han recogido los espectros de fluorescencia que, después de normalizados, se muestran en la figura III-31.





**Figura III.31.-** Espectros de emisión fluorescente entre 365 y 475 de una disolución de cloruro de pireno sulfonilo a distinta polaridad: a) 20/80 (metanol/agua); b) 40/60; c) 60/40; d) 80/20 y e) metanol.

Como se puede observar, el aumento del contenido en agua del disolvente provoca un desplazamiento del máximo de emisión más pronunciado, hacia mayores longitudes de onda, al mismo tiempo que disminuye la relación entre las intensidades de los dos máximos,  $F_1/F_2$ . Por interpolación del valor de la relación  $F_1/F_2$  se puede calcular de forma aproximada que la polaridad del ambiente que rodea al pireno cuando éste se une a poli (C) es ligeramente inferior a la polaridad de la mezcla formada con 40% de metanol y 60% de agua. Mediante la misma aproximación, se obtiene que, cuando se produce la hibridación con poli (I), el valor de la relación  $F_1/F_2$  está situado entre los valores que presenta el



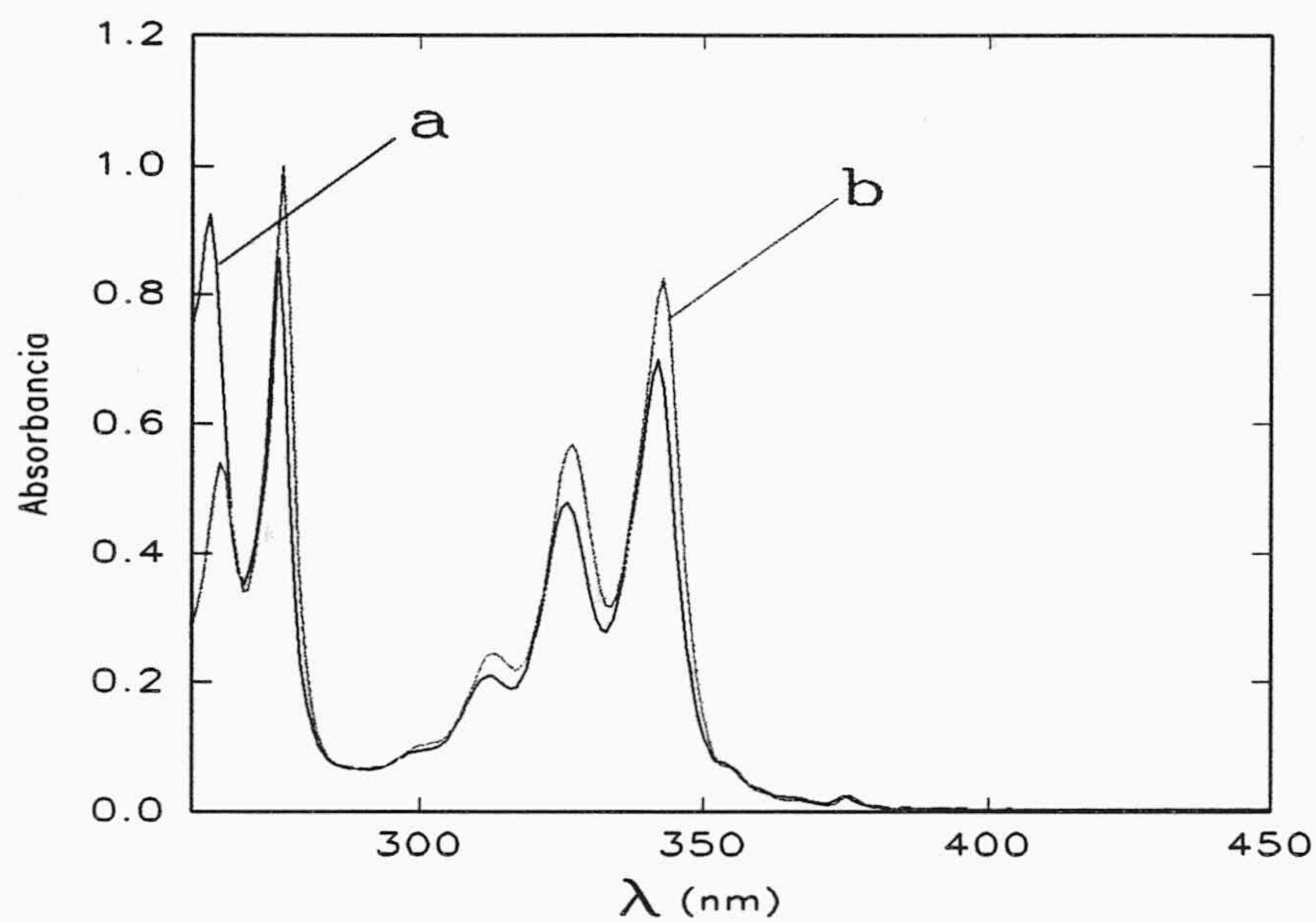
espectro de cloruro de pireno sulfonilo en las mezclas del 40:60 y 20:80. En adición, se debe de destacar que, al igual que sucede con el máximo de menor longitud de onda de la figura III.31, que se desplaza hacia mayores  $\lambda$  con la polaridad del disolvente, en la hibridación de pireno-poli (C) con poli (I) se produce también un desplazamiento hacia el rojo del máximo más energético. Otro aspecto característico del espectro obtenido en el disolvente de mayor polaridad, es la aparición de un hombro a 375 nm aproximadamente. Este hombro se ha visualizado en las figuras III.24 y III.26-III.28, que corresponden a las valoraciones de pireno-poli (C) con poli (I), cuando se alcanza una relación  $[\text{poli (C)}]/[\text{poli (I)}] \geq 1$ . Finalmente, se debe destacar que en la figura III-31 los espectros se han normalizado a la intensidad del máximo a 380 nm, al objeto de resaltar las diferencias en la posición de los mismos, por lo que no dan cuenta de la disminución de la intensidad de fluorescencia que se produce de forma concomitante con el aumento de la polaridad.

#### **III. 4. 7. Influencia del brazo espaciador de la marca fluorescente en el *quenching* de la fluorescencia en estado estacionario del pireno cuando poli (C) hibrida con poli (I).**

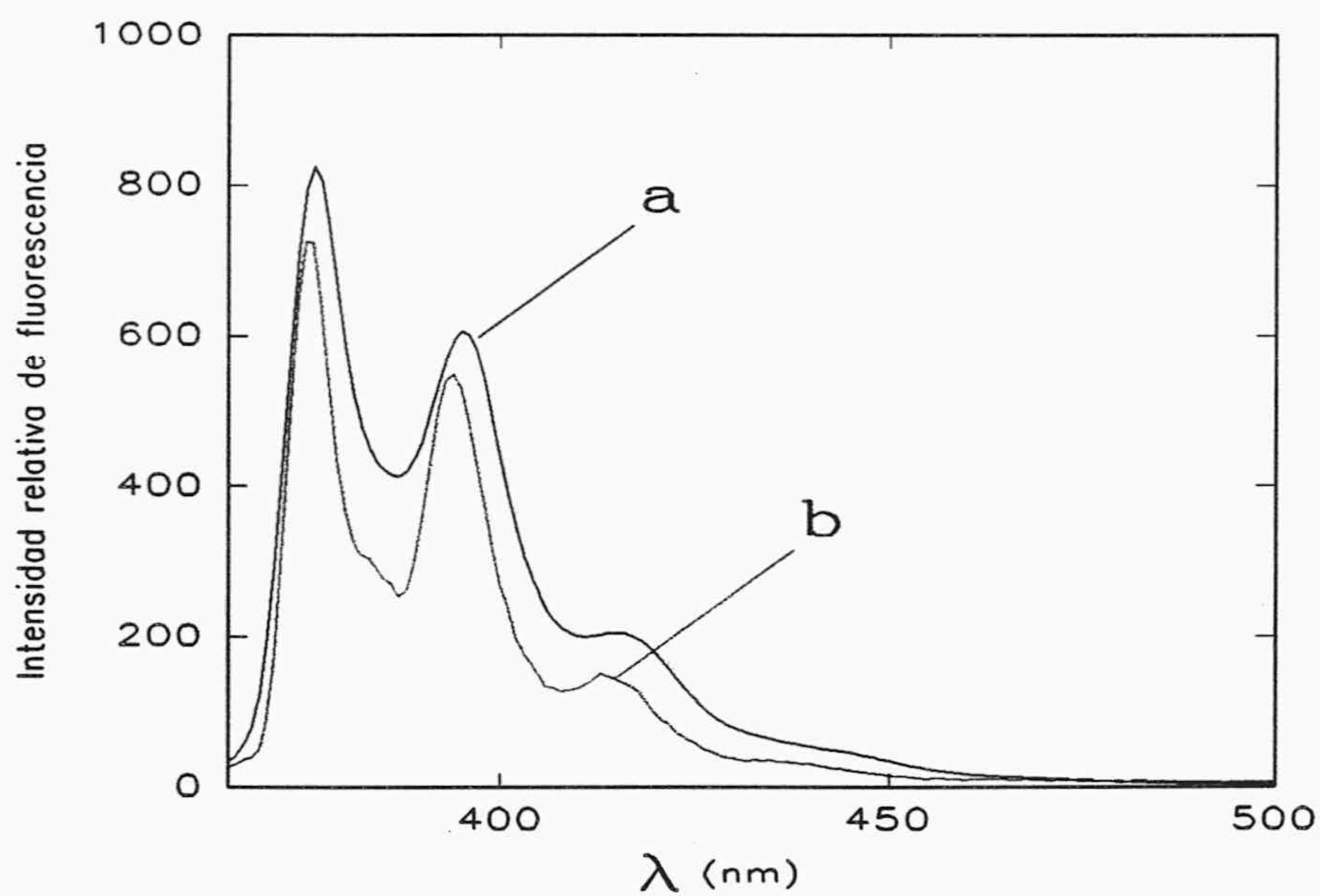
En otra serie de experiencias dirigidas a dilucidar el mecanismo de *quenching* en la hibridación, se ha sintetizado el cloruro del ácido pirenobutírico, siguiendo las indicaciones de Kao y col. (1978). Con la metodología descrita en el apartado II-3-2 se han obtenido unos pequeños cristales con los que se han realizado los correspondientes espectros de absorción UV-Vis., fluorescencia, IR y RMN, al objeto de dilucidar si la estructura de la sustancia sintetizada corresponde al compuesto deseado.

Las figuras III-32 y III-33 muestran que los espectros de absorción y de fluorescencia son esencialmente iguales a los del ácido pireno butírico, lo que significa que la formación del cloruro de ácido no afecta ni a las características absorciométricas ni a las de emisión del cromóforo, como era de esperar.





**Figura III.32.-** Espectros de absorción UV-VIS entre 260 y 450 nm de: (a) cloruro de pireno butírico y (b) del ácido de pireno butírico.



**Figura III.33.-** Espectros de emisión de fluorescencia entre 365 y 500 nm de disoluciones de cloruro de pireno butírico (a) y del ácido de pireno butírico(b).



Las figuras III-34 y III-35 corresponden a los espectros RMN, obtenidos en disolución de cloroformo deuterado, del ácido pireno butírico y del correspondiente cloruro de ácido que supuestamente se ha obtenido en esta síntesis, respectivamente. Las cuatro figuras siguientes, III-36 a III-39, corresponden a las representaciones de los mismos espectros (dos, para cada uno de ellos), aunque en una escala más amplia que permita la observación más detallada.

Los registros RMN señalados en las figuras anteriores, junto a la consulta de la bibliografía especializada (Pretsch y col., 1985), permiten hacer las siguientes asignaciones. El conjunto de señales centradas a  $\delta = 8'1$  p.p.m. que aparecen en ambos espectros, se ha atribuido a los 9 hidrógenos enlazados al núcleo aromático. A  $\delta = 3'4$  p.p.m., aparece un triplete que se puede asignar a los dos núcleos de hidrógeno del carbono  $\alpha$ , adyacente al que soporta el grupo ácido (en el caso del ácido 4-(1-pireno) butírico) o el cloruro de ácido (en el caso del supuesto cloruro de  $\gamma$ -(piren-4-il) butirilo). La señal quintuplete centrada a  $2'2$  p.p.m. y presente en ambos espectros (que es una señal muy típica de alcanos), se ha atribuido a los hidrógenos del  $\beta$ -CH<sub>2</sub>. También en ambos espectros, el triplete centrado en  $2'5$  p.p.m., se ha asignado a los núcleos de hidrógeno enlazados al carbono  $\gamma$ , adyacente al núcleo aromático del pireno. Finalmente, la señal a  $\delta = 3'75$  p.p.m. que aparece sólo en el espectro correspondiente al ácido 4-(1-pireno) butírico se ha atribuido al núcleo de hidrógeno del grupo carboxílico. Esta es una señal ancha situada en una región del espectro no demasiado característica, lo que probablemente es debido a la asociación con agua, presente como impureza del disolvente. En todas las asignaciones realizadas, son concordantes el número de núcleos de hidrógeno y las integraciones de las áreas abarcadas por la señal. Las restantes señales que aparecen en el espectro, se han atribuido a pequeños restos de disolventes.



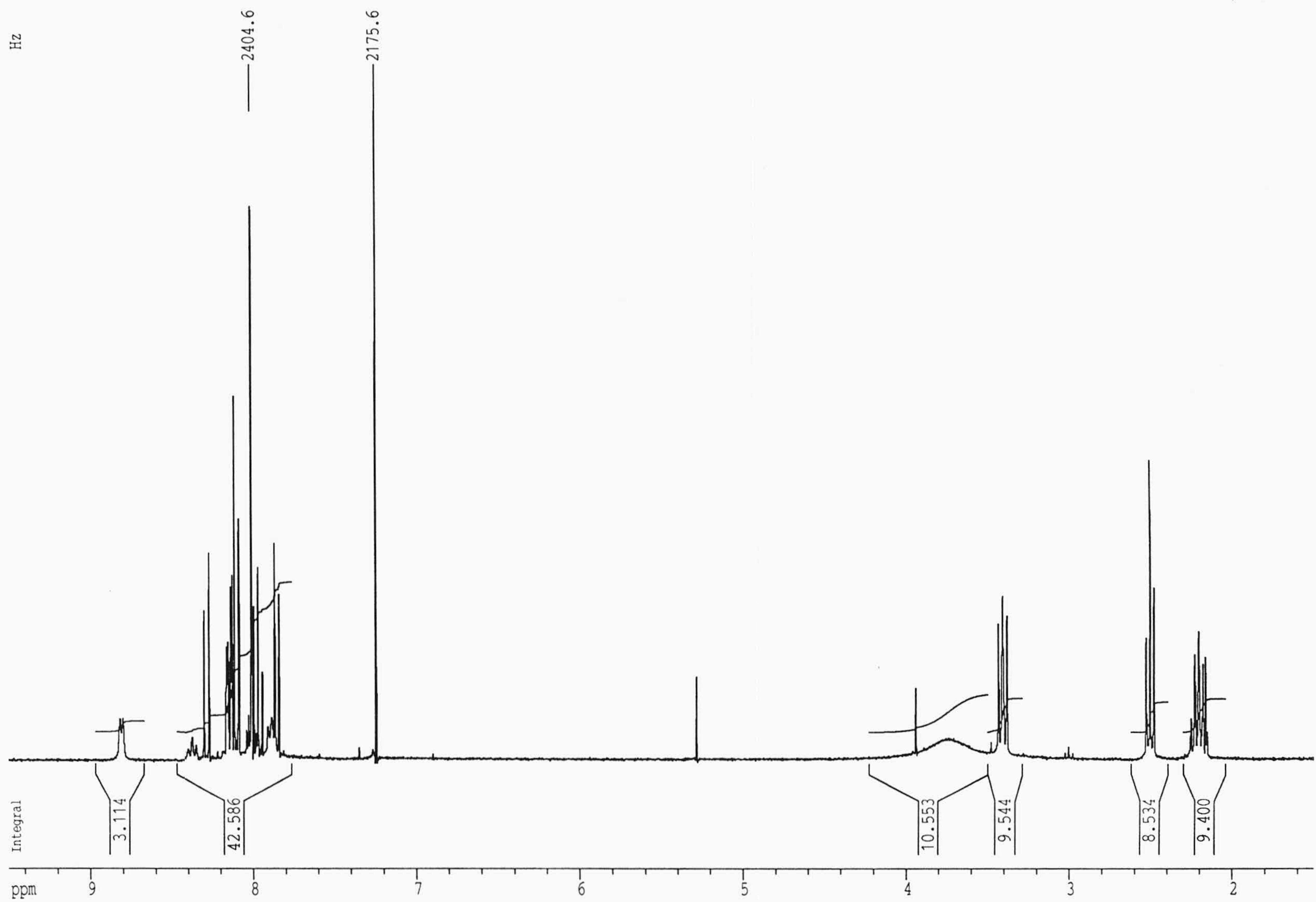
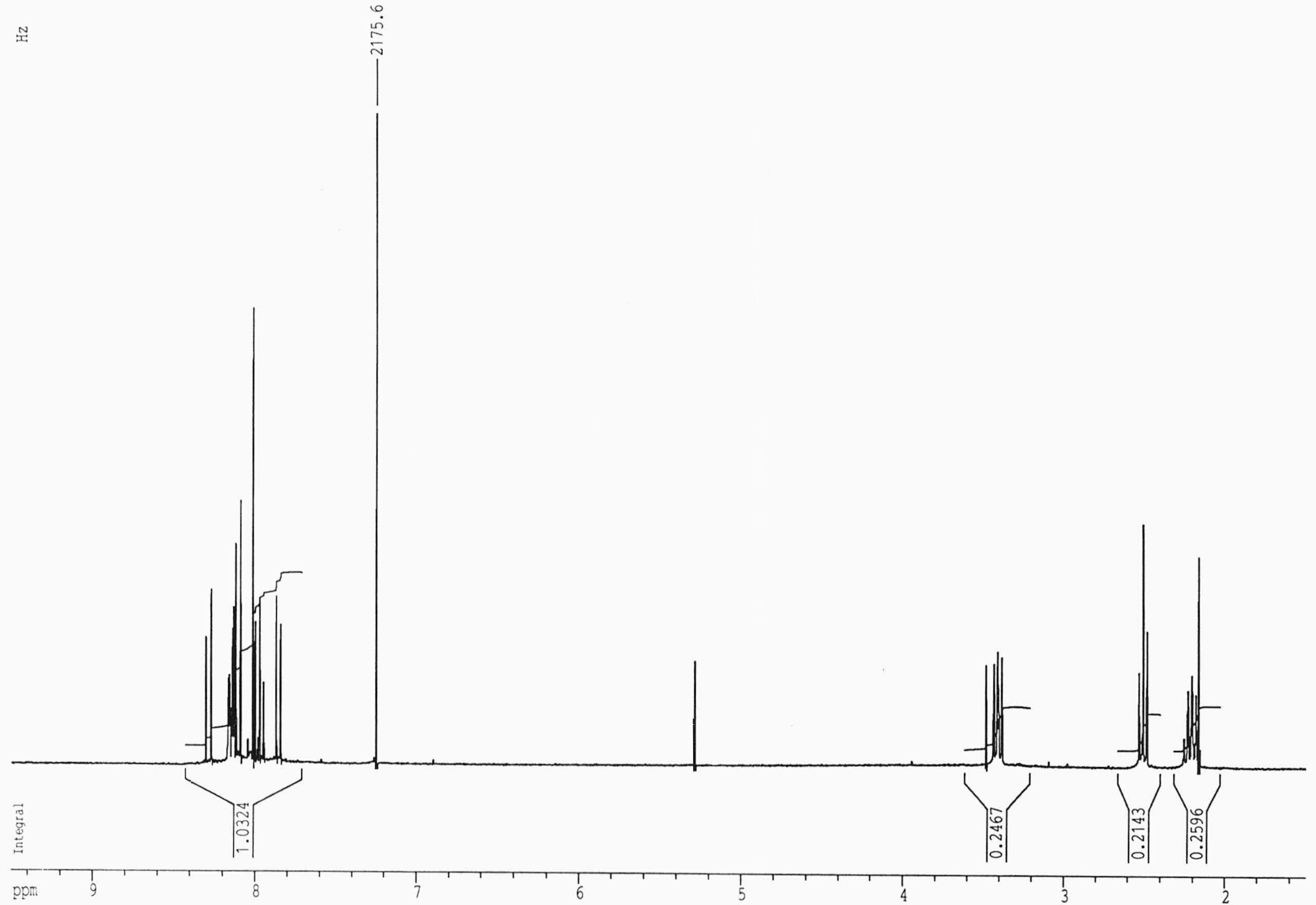


Figura III.34.- Espectro RMN correspondiente al ácido 4-(1-pireno) butírico en cloroformo deuterado





**Figura III.35.-** Espectro RMN correspondiente al cloruro de  $\gamma$ -(pireno-4-il) butírico en cloroformo deuterado



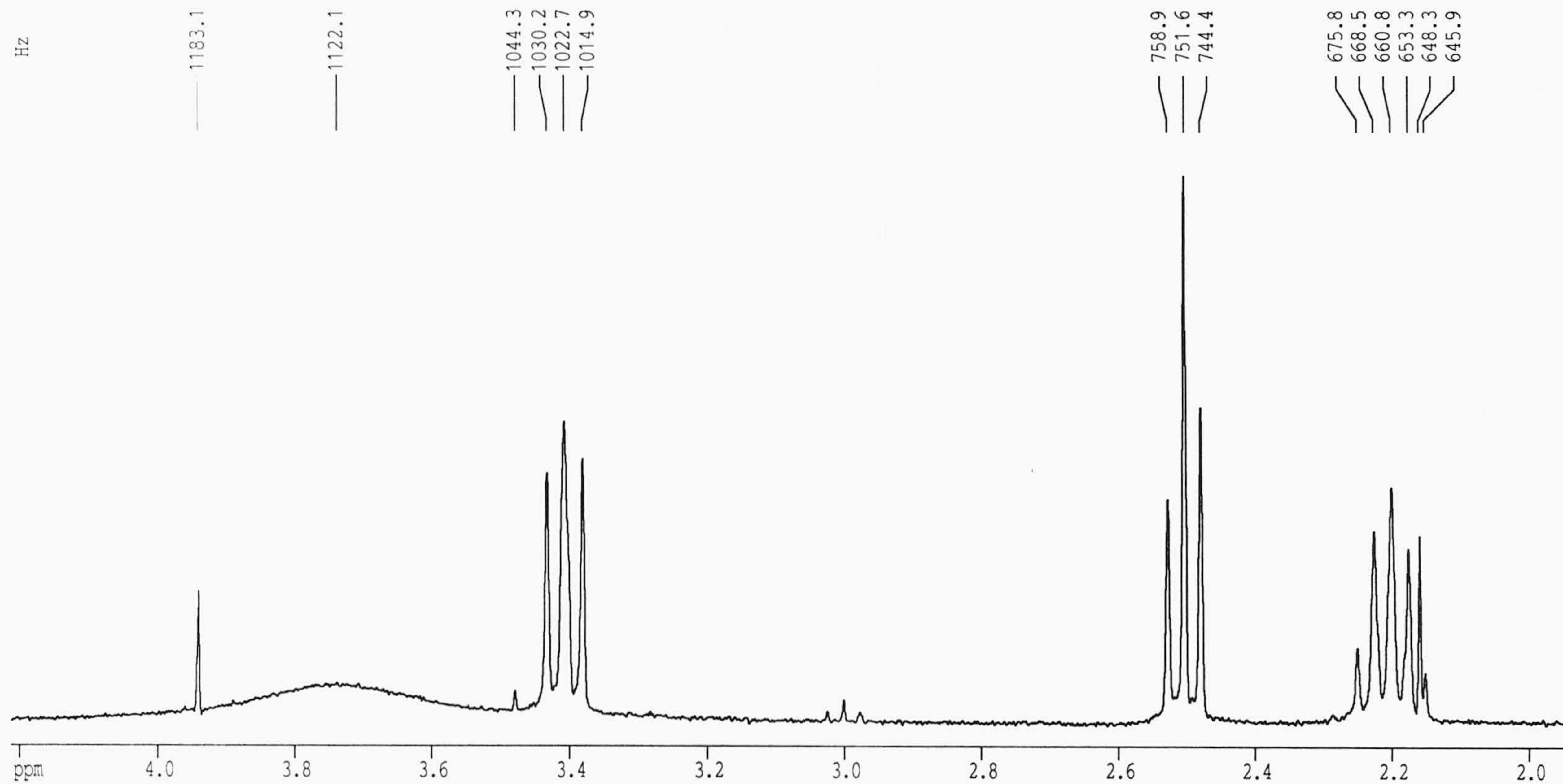
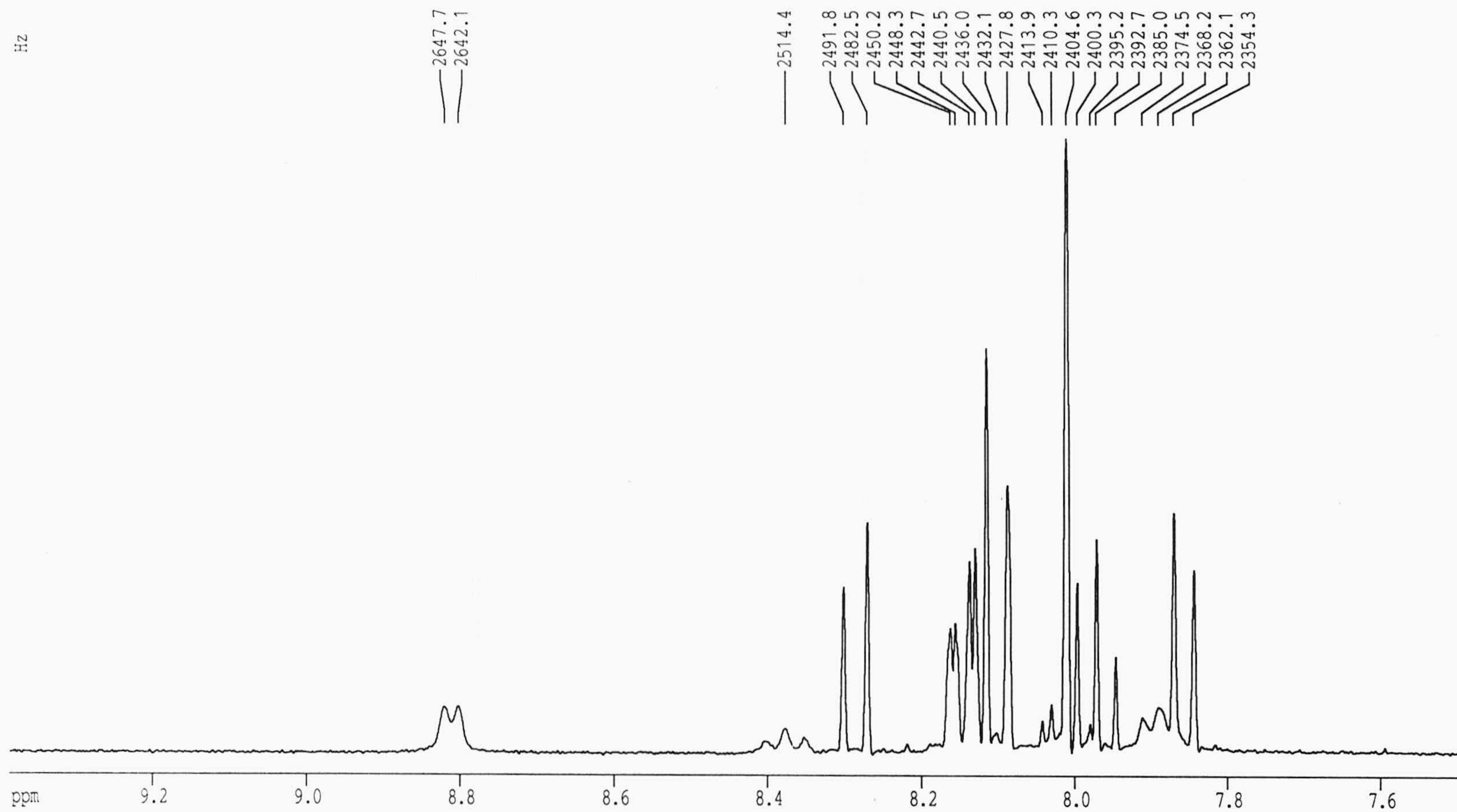


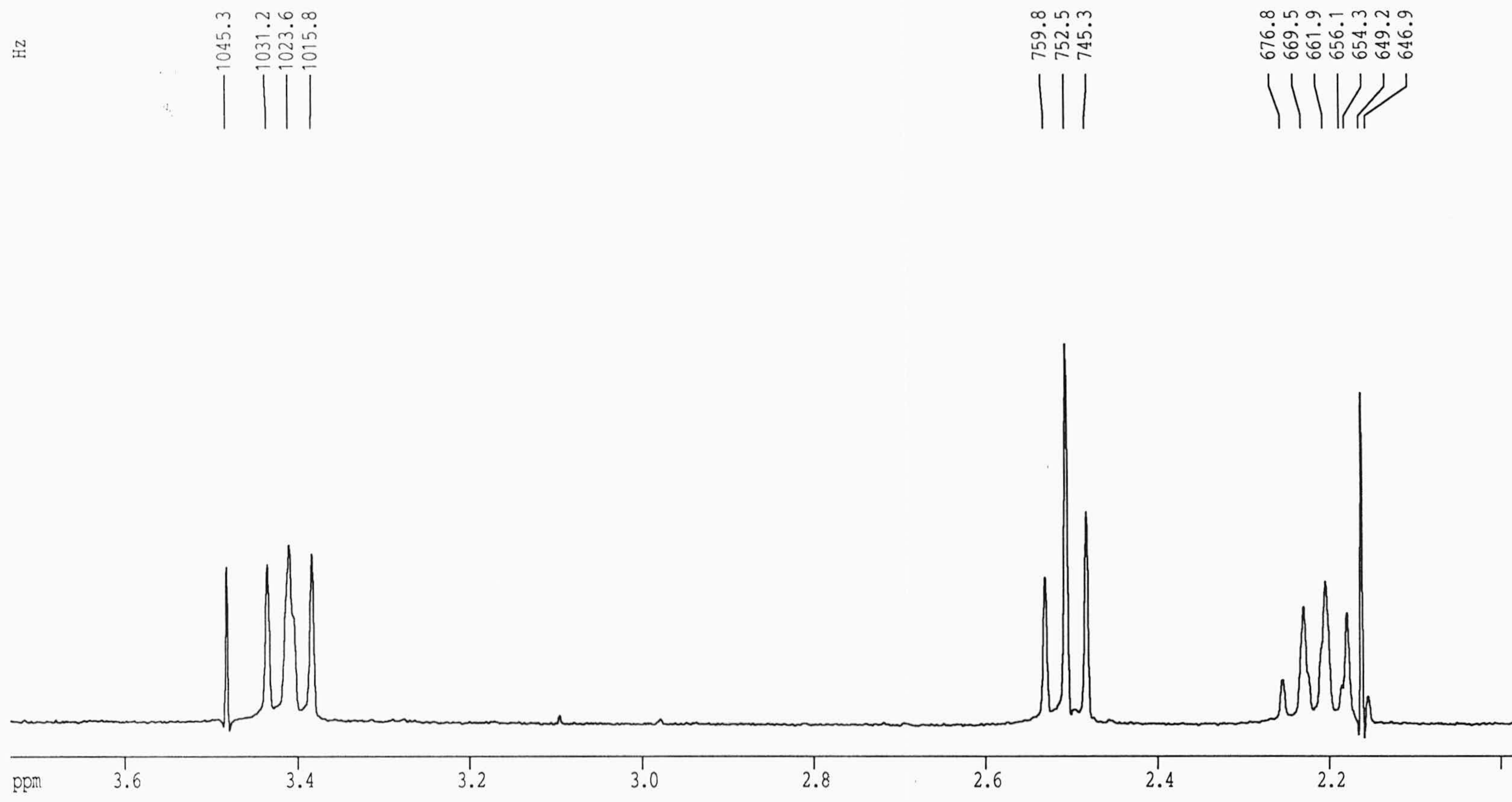
Figura III.36.- Espectro RMN entre 2 y 4 ppm correspondiente al ácido 4-(1-pireno) butírico en cloroformo deuterado





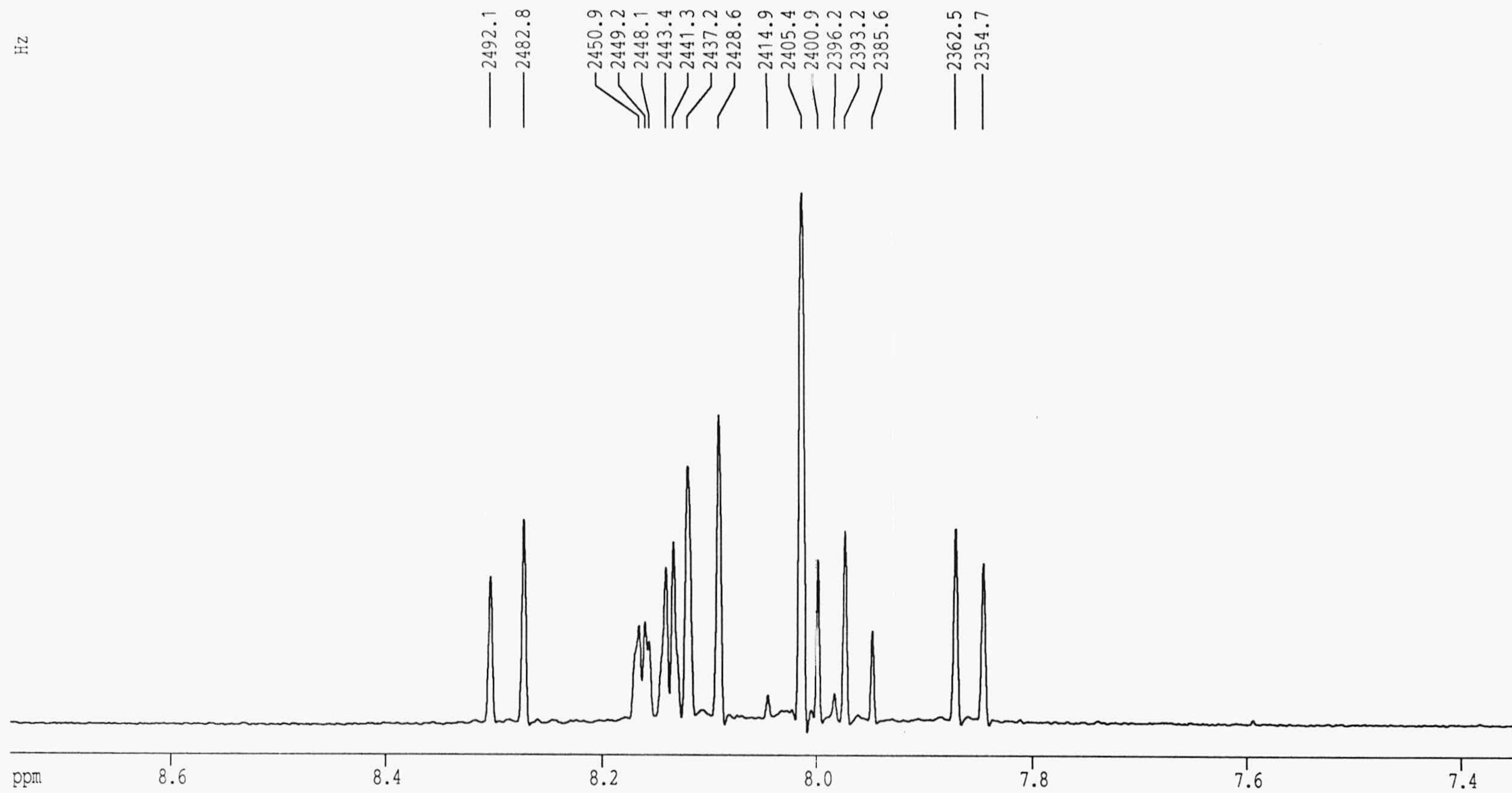
**Figura III.37.-** Espectro RMN entre 7'6 y 9'2 ppm correspondiente al ácido 4-(1-pireno) butírico en cloroformo deuterado





**Figura III.38.-** Espectro RMN entre 2 y 3'6 ppm correspondiente al cloruro de  $\gamma$ --(pireno-4-il) butírico en cloroformo deuterado





**Figura III.39.-** Espectro RMN entre 7'4 y 8'6 ppm correspondiente al cloruro de  $\gamma$ -(pireno-4-il) butírico en cloroformo deuterado



En las figuras III.40 y III.41 se exponen los espectros IR del ácido 4-(1-pireno) butírico y del supuesto cloruro de  $\gamma$ -(piren-4-il) butirilo (sin purificar), respectivamente. Como se puede observar, en el espectro correspondiente al cloruro de  $\gamma$ -(piren-4-il) butirilo, aparece con claridad un nuevo pico a  $1.805 \text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a la vibración de tensión del enlace C=O cuando en éste carbono se enlaza un átomo de cloro (Pretsch y col., 1985). Se sigue observando el pico a  $1.696$  correspondiente a la vibración de tensión del enlace C=O (carboxílico), ya que el producto de la reacción no ha sido purificado.

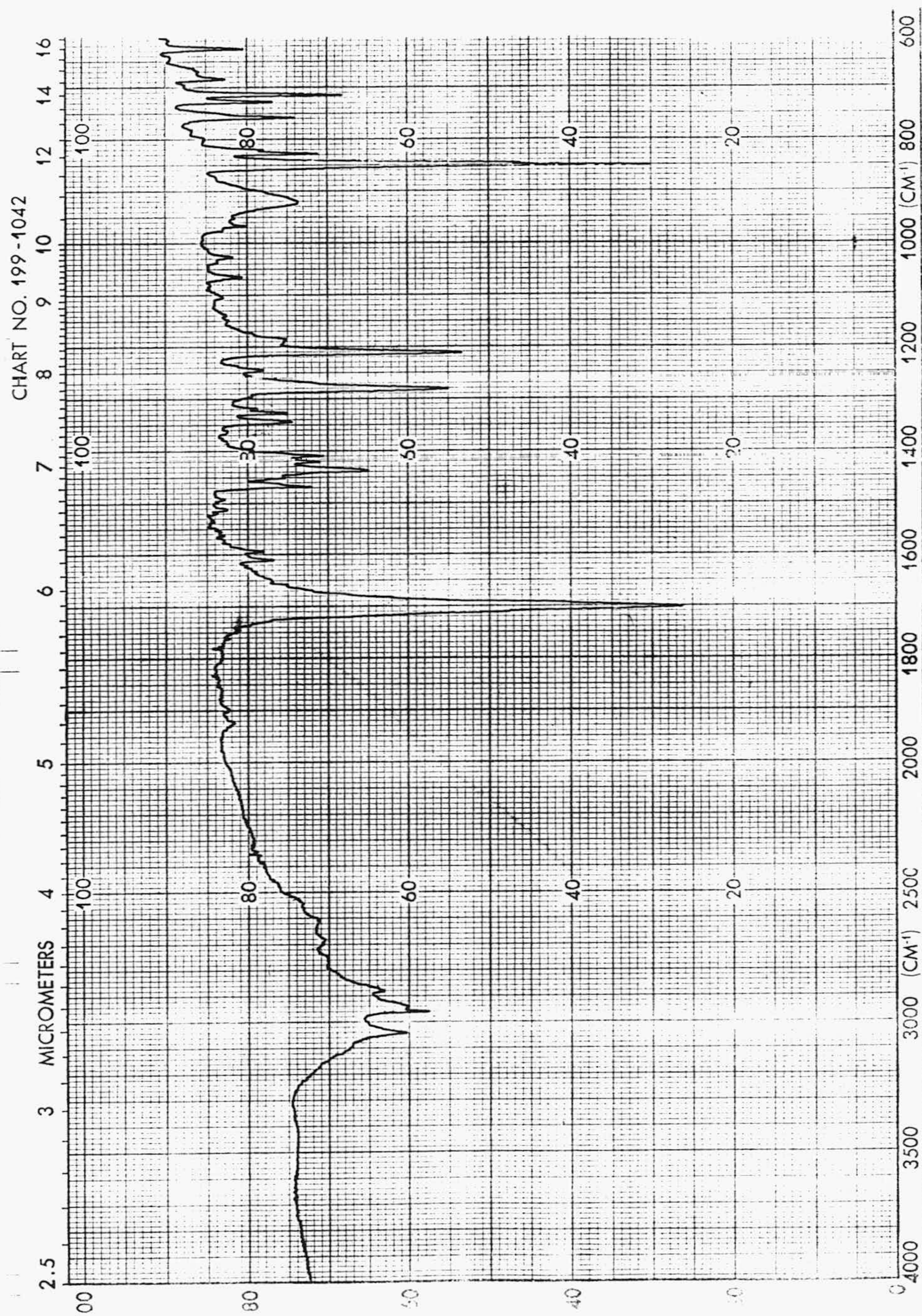


Figura III.40.- Espectro IR correspondiente al ácido 4-(1-pireno) butírico.



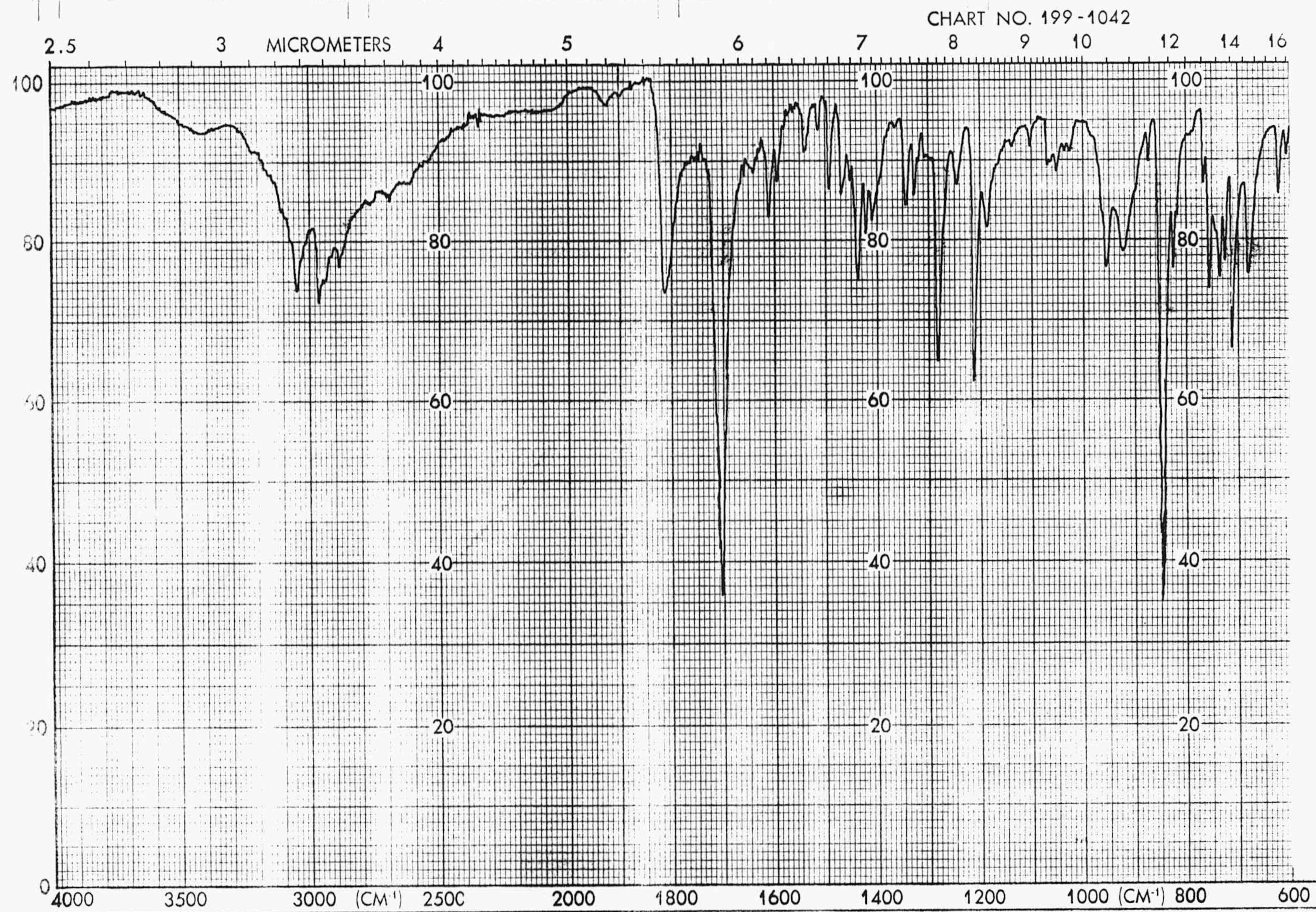
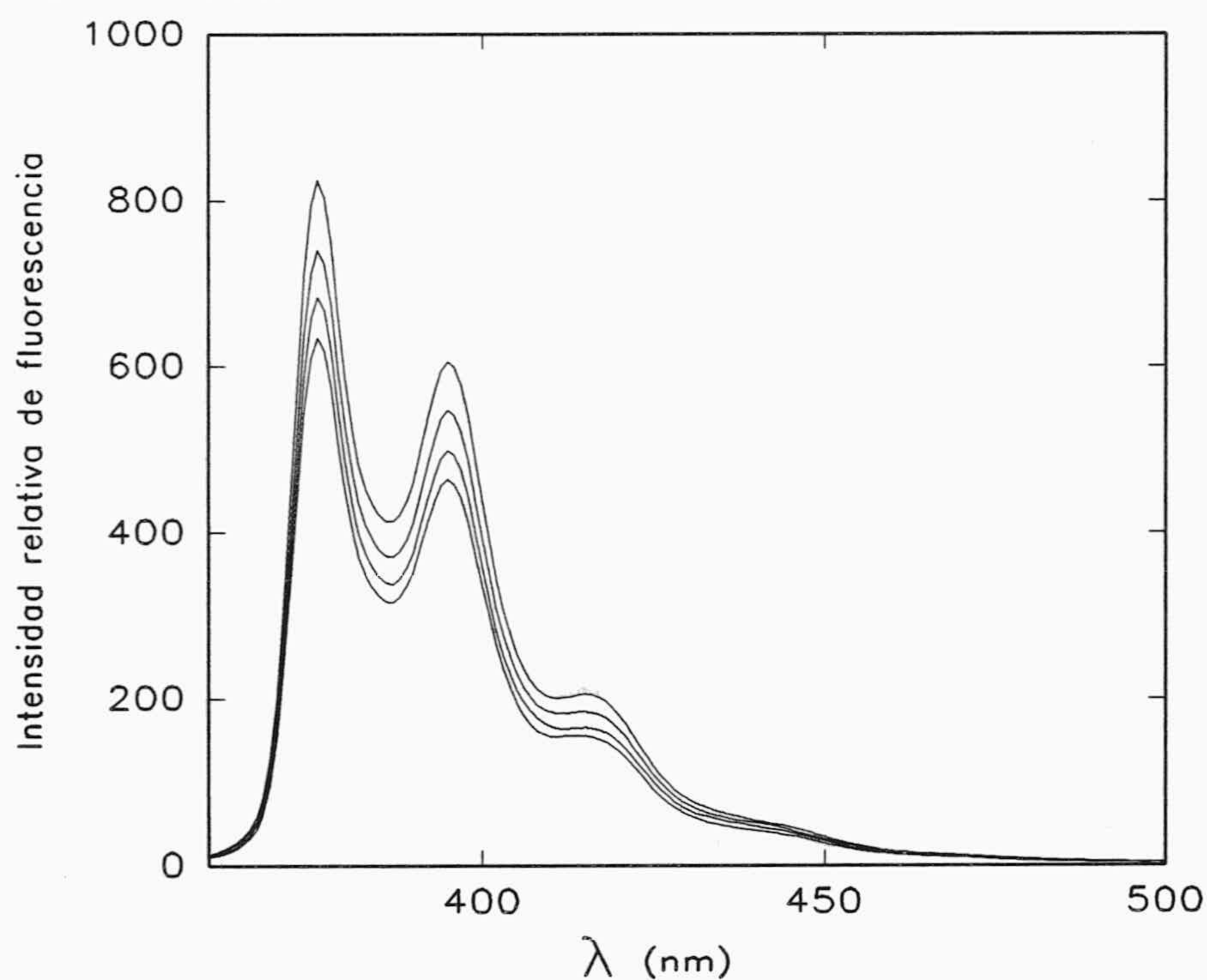


Figura III.41.- Espectro IR correspondiente al cloruro de  $\gamma$ -(piperidin-4-il) butírico.



Los espectros de absorción UV-Vis., fluorescencia, RMN e IR del compuesto sintetizado, son concordantes con la estructura del cloruro de butirilpireno, por lo que se ha procedido a usar el compuesto sintetizado por nosotros, para etiquetar poli (C) modificado por transaminación y estudiar los posibles cambios de su eficiencia de fluorescencia, en la hibridación con poli (I).

Siguiendo la metodología empleada cuando la marca fluorescente corresponde a un cloruro de ácido, se ha etiquetado poli (C) con el cloruro de butirilpireno. El porcentaje de marca obtenido, calculado de la forma habitual, ha sido del 2'4%. También siguiendo la metodología habitual en esta Memoria, se ha registrado el espectro de fluorescencia de una disolución, en tampón de hibridación, de poli (C) etiquetado,  $10^{-6}$  M (expresada en bases) y se han añadido cantidades crecientes de poli (I) hasta hibridarlo por completo. Después de 10 minutos de cada adición, se han registrado los espectros de fluorescencia de las diferentes disoluciones. En la figura III-42 se indican los resultados obtenidos.



**Figura III.42.-** Espectros de emisión de fluorescencia entre 360 y 500 nm de una disolución de poli(C) marcado con cloruro de pirenobutírico a distintas concentraciones de poli(I).



Como se puede observar, los cambios en la intensidad de fluorescencia son muy pequeños y resultan despreciables si se efectúa la correspondiente corrección por el efecto de dilución. Por lo tanto, cabe concluir que la intercalación de un brazo espaciador, formado por una cadena lineal de cuatro carbonos, entre el ácido nucleico y la marca fluorescente, evita el *quenching* de fluorescencia que se produce en la hibridación cuando no se intercala el mencionado brazo espaciador.

### III. 4. 8. Influencia de la composición de la disolución en la detección fluorescente en estado estacionario de la hibridación de pireno-poli (C) con poli (I).

Es conocido que la adición de diversas sustancias al medio donde se va a realizar la hibridación, tales como formamida (McConaughy y col., 1969), sales caotrópicas (Chang y col., 1974) o alcohol (Kohne, comunicación personal), disminuyen el  $T_m$  del ds-ADN y aceleran el proceso de formación de la doble hélice. Por estos motivos, resulta práctica habitual efectuar los estudios de hibridación o de renaturalización en presencia de tales sustancias, al objeto de alcanzar mayor rapidez de reacción, así como para no elevar demasiado la temperatura a la que previamente se ha de someter al ADN diana para desnaturalizarlo. Resulta por tanto del mayor interés la observación de la posible influencia que podría tener la presencia de estas sustancias aceleradoras, en el *quenching* de fluorescencia que, según nuestra metodología, detecta la hibridación.

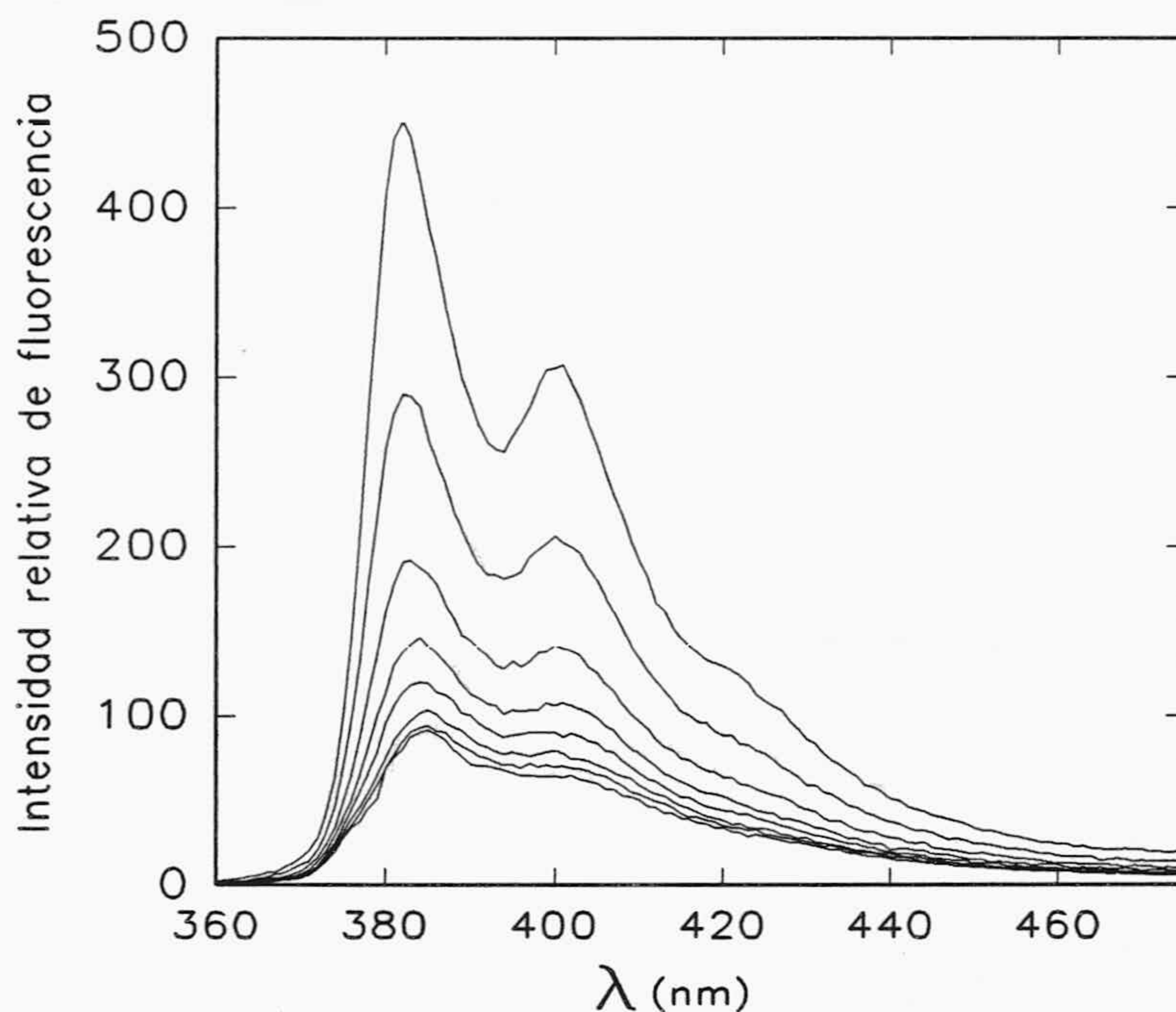
#### III. 4. 8. 1. Detección fluorescente de la hibridación de pireno-poli (C) con poli (I) en presencia de formamida.

Probablemente la formamida es el acelerador de la hibridación que ha sido empleado con mayor extensión en este tipo de estudios. La adición del 50% de formamida al tampón de hibridación disminuye el  $T_m$  y la temperatura óptima de hibridación en unos 25 °C aproximadamente. Si se tiene en cuenta que el valor de  $T_m$  en el híbrido poli (C)-poli (I) es de 59'5 °C y que la modificación y subsiguiente etiquetado con fluoróforos rebajan ligeramente este valor (Jackson, 1991), la adición de formamida provocaría una disminución de unos 25 ° en el  $T_m$ , lo que lleva consigo que la temperatura óptima de hibridación esté muy cercana a la temperatura ambiente a la que se han realizado la mayoría de los experimentos de hibridación. Por este motivo las valoraciones de pireno-poli (C) con poli



(I) en tampón de hibridación adicionado con el 50 % de formamida, se han realizado termostatazando las muestras a 20 °C.

En la figura III.43 se representan los espectros obtenidos en la valoración de una mezcla constituida por 200  $\mu\text{l}$  de una disolución  $10^{-4}$  M de pireno poli (C) en tampón de hibridación y 200  $\mu\text{l}$  de formamida, a la que se han añadido alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  de disolución de poli (I)  $8'00 \cdot 10^{-5}$  M en un disolvente formado por tampón de hibridación y formamida a partes iguales. Los espectros mostrados en la figura no han sido corregidos por el efecto de dilución. En la tabla III.13 se recogen las relaciones  $[\text{poli (I)}]/[\text{pireno-poli (C)}]$  y las correspondientes intensidades de fluorescencia, después de que ambas fueron corregidas por el efecto de dilución. La disminución de la señal de fluorescencia tras la hibridación ha sido del 67'77 %, lo que resulta en total concordancia con las disminuciones de fluorescencia obtenidas en ausencia de formamida.



**Figura III.43.-** Espectros de emisión de fluorescencia entre 360 y 475 nm obtenidos tras la valoración de una disolución de pireno-poli(C)  $5 \cdot 10^{-5}$  M con poli(I)  $8'00 \cdot 10^{-5}$  M en presencia de formamida (50 %).



Tabla III.13

Datos de la hibridación en presencia de formamida correspondiente a la figura III.43.  
(  $r = [\text{poli(I)}]/[\text{pireno-poli(C)}]$  ).

[poli(I)] (M)	[poli(C)] (M)	$I_f$ corregida	$I_f$ nomalizada	r
0	$5'00 \cdot 10^{-5}$	449'12	100	0
$8'89 \cdot 10^{-6}$	$4'44 \cdot 10^{-5}$	325'21	72'41	0'20
$1'60 \cdot 10^{-5}$	$4'00 \cdot 10^{-5}$	240'26	53'49	0'40
$2'18 \cdot 10^{-5}$	$3'64 \cdot 10^{-5}$	191'90	42'73	0'60
$2'67 \cdot 10^{-5}$	$3'33 \cdot 10^{-5}$	168'28	37'47	0'80
$3'07 \cdot 10^{-5}$	$3'08 \cdot 10^{-5}$	148'10	32'97	1'00
$3'43 \cdot 10^{-5}$	$2'85 \cdot 10^{-5}$	144'74	32'23	1'20
$3'73 \cdot 10^{-5}$	$2'67 \cdot 10^{-5}$	144'74	32'23	1'49

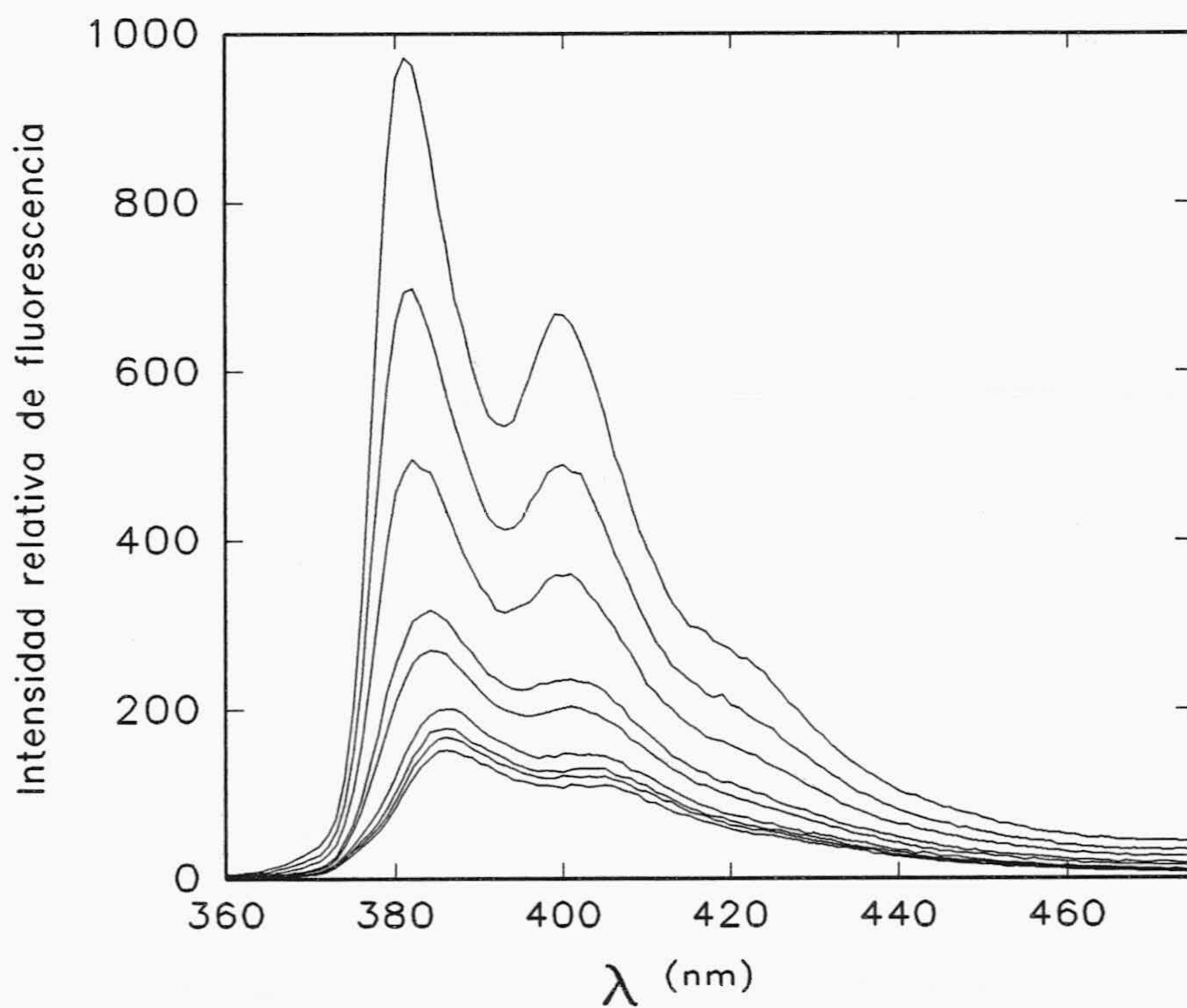
### III. 4. 8. 2. Detección fluorescente de la hibridación de pireno-poli (C) con poli (I) en presencia de cloruro de tetraetil amonio (TEACl).

Melchior y von Hippel (1973) mostraron que, en una disolución de TEACl 2'4 M, las temperaturas de fusión,  $T_m$ , de diferentes ds-ADN, son independientes de las bases que componen las secuencias específicas del ds-ADN. Chang y col. (1974) extendieron estas investigaciones al objeto de conocer el efecto de la temperatura en la velocidad de renaturalización de ADN, en medios que contienen TEACl 2'4 M, llegando a la conclusión de que tanto el valor de  $T_m$  como la temperatura a la que la velocidad de renaturalización es máxima, son menores que las conseguidas cuando al medio de reacción se adicionan otras sales caotrópicas. Estas ventajosas propiedades del TEACl nos han llevado a investigar la posible influencia que mencionada sal pueda tener en la detección fluorescente de la hibridación de pireno-poli (C).

En la figura III.44 se representan los espectros obtenidos en la valoración de 450  $\mu\text{l}$  de una disolución  $3'80 \cdot 10^{-4}$  M de pireno-poli (C) en tampón de hibridación con TEACl 2'4 M, a la que se han agregado alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  de una disolución de poli (I)  $5'90 \cdot 10^{-4}$  M



en tampón de hibridación con TEACl 2'4 M. Los espectros mostrados en la figura no están corregidos por el efecto de dilución. En la tabla III.14 se recogen las relaciones  $[\text{poli (I)}]/[\text{pireno-poli (C)}]$  y las correspondientes intensidades de fluorescencia, una vez que ambas han sido corregidas por el efecto de dilución. La disminución de la señal de fluorescencia tras la hibridación ha sido del 79'67 %, lo que resulta concordante con las disminuciones de fluorescencia obtenidas en ausencia de TEACl.



**Figura III.44.-** Espectros de emisión de fluorescencia entre 360 y 475 nm obtenidos tras la valoración de una disolución de pireno-poli(C)  $3'8 \cdot 10^{-4}$  M con poli(I)  $5'90 \cdot 10^{-4}$  M en presencia de TEACl.



Tabla III.13

Valores obtenidos tras la valoración de una disolución de pireno-poli(C) con poli(I) en presencia de TEACl, ( $r = [\text{poli(I)}]/[\text{pireno-poli(C)}]$ ).

[poli(I)] (M)	[poli(C)] (M)	$I_f$ corregida	$I_f$ normalizada	r
0	$3'80 \cdot 10^{-4}$	973'86	100	0
$5'90 \cdot 10^{-5}$	$3'42 \cdot 10^{-4}$	770'12	79'08	0'17
$1'07 \cdot 10^{-4}$	$3'11 \cdot 10^{-4}$	587'52	60'33	0'34
$1'48 \cdot 10^{-4}$	$2'85 \cdot 10^{-4}$	378'16	38'83	0'52
$1'82 \cdot 10^{-4}$	$2'63 \cdot 10^{-4}$	341'23	35'04	0'69
$2'11 \cdot 10^{-4}$	$2'44 \cdot 10^{-4}$	215'20	22'10	0'86
$2'36 \cdot 10^{-4}$	$2'28 \cdot 10^{-4}$	201'97	20'74	1'04
$2'58 \cdot 10^{-4}$	$2'14 \cdot 10^{-4}$	198'00	20'33	1'20
$2'78 \cdot 10^{-4}$	$2'01 \cdot 10^{-4}$	198'00	20'33	1'38

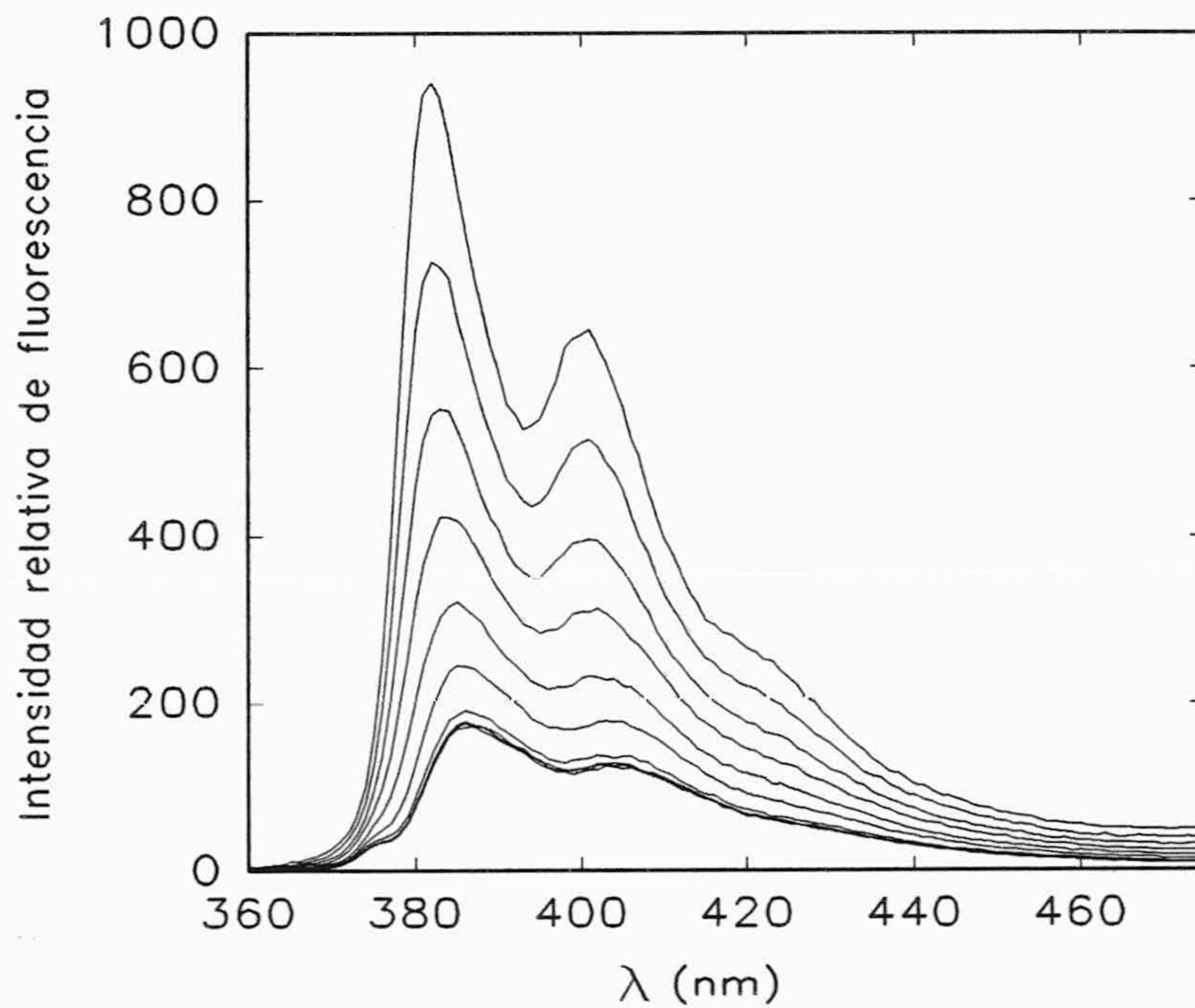
### III. 4. 8. 3. Detección fluorescente de la hibridación de pireno-poli (C) con poli (I) en presencia de etanol.

De forma similar a como acontece con formamida o TEACl, la adición de etanol provoca también una acusada disminución del valor de  $T_m$  así como de la temperatura óptima de hibridación, por lo que se ha empleado una mezcla formada por el tampón de hibridación/etanol (80:20), que se comporta aproximadamente igual que TEACl 2'4 M o formamida al 50 %.

En la figura III.45 se representan los espectros de emisión obtenidos en la valoración de una mezcla formada por 320  $\mu\text{l}$  de una disolución  $10^{-4}$  M de pireno-poli (C) en tampón de hibridación y 80  $\mu\text{l}$  de etanol (96 °), a la que se han agregado alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  de poli (I)  $10^{-4}$  M disuelto en la misma mezcla. Los espectros mostrados en la figura no están corregidos por el efecto de dilución. En la tabla III.15 se recogen las relaciones  $[\text{poli (I)}]/[\text{pireno-poli (C)}]$  y las correspondientes intensidades de fluorescencia, una vez que ambas han sido corregidas por el efecto de dilución. La disminución de la señal de



fluorescencia tras la hibridación ha sido del 75'80 %, lo que resulta concordante con las disminuciones de fluorescencia obtenidas en ausencia de etanol y en las experiencias anteriores con formamida o TEACl.



**Figura III.45.-** Espectros de emisión de fluorescencia entre 360 y 475 nm obtenidos tras la valoración de una disolución de pireno-poli(C)  $10^{-4}$  M con poli(I)  $10^{-3}$  M en presencia de etanol.



Tabla III.15.

Valores obtenidos tras la valoración de una disolución de pireno-poli(C) con poli(I) en presencia de etanol, ( $r = [\text{poli(I)}]/[\text{pireno-poli(C)}]$ ).

[poli(I)] (M)	[poli(C)] (M)	$I_f$ corregida	$I_f$ normalizada	r
0	$8'00 \cdot 10^{-5}$	940'80	100	0
$1'11 \cdot 10^{-5}$	$7'11 \cdot 10^{-5}$	807'50	85'83	0'16
$2'00 \cdot 10^{-5}$	$6'40 \cdot 10^{-5}$	666'22	70'81	0'31
$2'73 \cdot 10^{-5}$	$5'82 \cdot 10^{-5}$	530'20	56'36	0'47
$3'33 \cdot 10^{-5}$	$5'33 \cdot 10^{-5}$	399'60	42'47	0'62
$3'85 \cdot 10^{-5}$	$4'92 \cdot 10^{-5}$	303'70	32'28	0'78
$4'28 \cdot 10^{-5}$	$4'57 \cdot 10^{-5}$	232'90	24'75	0'94
$4'66 \cdot 10^{-5}$	$4'27 \cdot 10^{-5}$	228'00	24'23	1'09
$5'00 \cdot 10^{-5}$	$4'00 \cdot 10^{-5}$	227'70	24'20	1'25
$5'29 \cdot 10^{-5}$	$3'76 \cdot 10^{-5}$	227'70	24'20	1'41

III. 4. 8. 4. *Influencia de la temperatura en la estabilidad de la hibridación de pireno-poli (C) con poli (I) en presencia de sustancias aceleradoras.*

Las conclusiones que se pueden alcanzar con los resultados obtenidos en las tres experiencias anteriormente descritas son de gran interés, debido a que la disminución de  $T_m$  y temperatura óptima de hibridación, permite que ésta se lleve a cabo a temperaturas lo suficientemente bajas como para que no haya, durante la hibridación, una sensible hidrólisis de la marca fluorescente, tal y como se ha demostrado mediante experiencias adicionales en que se recorrieron los espectros de fluorescencia de disoluciones etanólicas (80:20) de pireno-poli (C) y de fluoresceína-poli (C), a 45 °C durante 10 horas. Las señales de fluorescencia medidas a 385 y 515 nm, respectivamente, aumentaron en una cantidad tan baja como el 3 y 4 %, en ambos casos, lo que se puede interpretar como el efecto de una muy pequeña hidrólisis de la etiqueta fluorescente. Para corroborar esto, se precipitaron ambas muestras con alcohol, según la metodología habitual y se redisolviéron en el mismo



disolvente, posteriormente se han recorrido sus espectros de emisión y se han medido las señales de fluorescencia a las correspondientes longitudes de onda, observándose una pérdida del 4 y 5 % respecto a los valores obtenidos después de incubar durante las 10 horas, para las disoluciones de pireno-poli (C) y de fluoresceína-poli (C), respectivamente. Si se tiene en cuenta que se puede conseguir el 80 % aproximadamente de la hibridación de una muestra de ADN natural, en unas dos o tres horas, las pequeñas variaciones obtenidas en la señal fluorescente, tras el calentamiento durante 10 horas, se pueden considerar despreciables y no deben de afectar demasiado a la sensibilidad con la que se detecta la hibridación.



### III. 5. RESOLUCIÓN TEMPORAL DE LA FLUORESCENCIA DEL PIRENO ENLAZADO A POLI (C) Y DEL HÍBRIDO FORMADO CON POLI (I).

Debido al gran porcentaje de disminución de la señal de fluorescencia en estado estacionario mostrado en la figura III.24.a, se han seleccionado las sondas que utilizan sulfonil pireno y fluoresceína como etiquetas fluorescentes, para efectuar los estudios que permitan proponerlas para su utilización en la detección fluorescente, en medios homogéneos, de la hibridación de ácidos nucleicos de origen natural.

Por este motivo, se han realizado estudios complementarios con mencionadas sondas al objeto de profundizar en la interpretación del mecanismo de *quenching* de fluorescencia observado. Tales estudios han sido ya realizados por Jackson (1991) con fluoresceína-poli (C), proporcionando la interpretación ya mencionada con anterioridad, que se refiere a la variación aparente del  $pK_a$  de la fluoresceína, debida probablemente a variaciones locales del pH en las inmediaciones del fluoróforo.

En lo que se refiere a la sonda que utiliza sulfonil pireno como marca fluorescente, la gran disminución observada en la señal de fluorescencia, puede deberse a cambios en la eficiencia de fluorescencia (o en el tiempo de vida), a variaciones en el movimiento rotacional del fluoróforo, o ambas cosas a la vez. Por lo que, con objeto de dilucidar las contribuciones relativas de estos factores y profundizar en la posible interpretación del mecanismo de *quenching*, se ha efectuado, en primer lugar, un estudio de los tiempos de vida de fluorescencia de pireno- poli (C) y cuando éste hibrida con poli (I), en distintas condiciones experimentales.

#### III. 5. 1. Tiempos de vida de pireno-poli (C).

Las experiencias preliminares realizadas por nuestro grupo de investigación que se describieron en el epígrafe III.4.4, se complementaron con otras en las que se midió el tiempo de vida de fluorescencia de una disolución de ITCpireno-poli (C) en tampón Tris-HCl 20 mM, AEDT 1mM, pH 7.5 (Yguerabide y col., 1996). Los datos experimentales obtenidos indicaron un decaimiento complejo que se ajustó bien a una ley triexponencial. En tales casos es de utilidad el uso del denominado tiempo de vida promedio, como ya se indicó en el epígrafe I.6.2. La aplicación de la ecuación (12) a los datos obtenidos con



ITCpireno-poli (C) proporcionó un tiempo de vida promedio de unos 6 ns, aproximadamente. El bajo valor del  $\tau_{\text{pro}}$  obtenido con la sonda de ITCpireno-poli (C) comparado con el conocido valor del ácido pireno butírico en disolución acuosa (~ 60 ns), indica que hay un *quenching* de fluorescencia que no está motivado por el disolvente acuoso.

Para comprobar el origen de tal *quenching* se llevó a cabo un experimento del decaimiento de la fluorescencia de la disolución resultante de la hidrólisis de isotiocianato de pireno en tampón Tris-HCl 20 mM, AEDT 1mM, pH 7'5 durante una hora. A los datos obtenidos se les aplicó la ecuación (12), que proporcionó un  $\tau_{\text{pro}}$  similar al de la sonda de ITCpireno-poli (C). Estos resultados indican que el grupo isotiocianato provoca un *quenching* de la fluorescencia del pireno que no debe de ser adscrita al enlace del fluoróforo con poli (C).

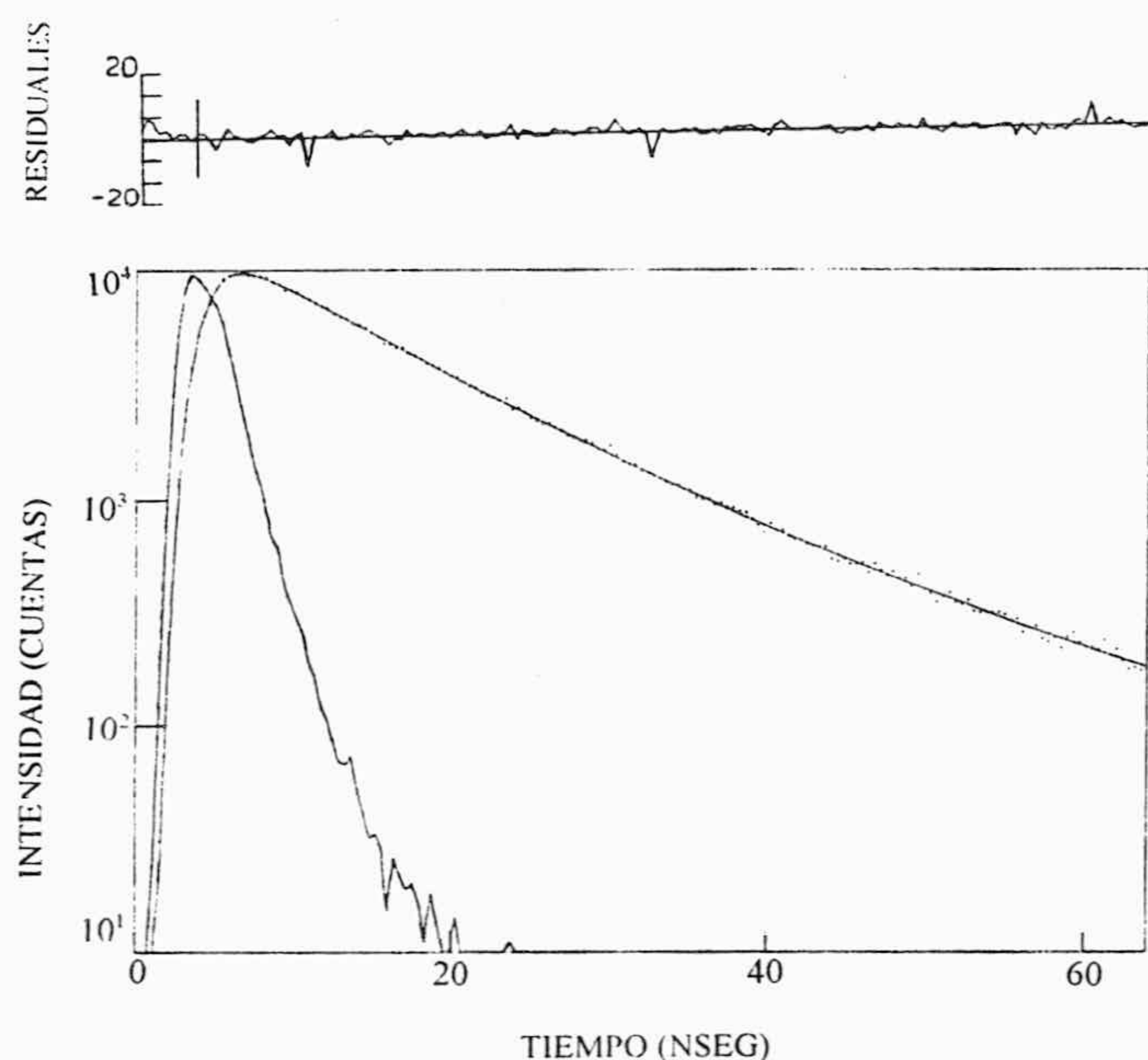
La serie de experiencias previas realizadas por nuestro grupo de investigación que se están describiendo, engloba también las realizadas a una disolución de cloruro de pireno sulfonilo, hidrolizada durante una hora en tampón Tris-HCl 20 mM, AEDT 1mM, pH 7'5. El ajuste de los datos experimentales proporcionó un tiempo de vida promedio similar al del ácido pireno butírico. Estos resultados previos junto a los relativos al estado estacionario descritos en el apartado III.4.4, fueron consistentes con la idea de que el pireno reactivo que debía de utilizarse para etiquetar el oligonucleótido, es el correspondiente cloruro de ácido, al objeto de conseguir el mayor tiempo de vida posible para que sea más sensible al posible *quenching* dinámico de la fluorescencia, provocado por la hibridación.

Así, se ha medido el decaimiento temporal de la fluorescencia de pireno-poli (C)  $10^{-5}$  M disuelto en tampón de hibridación, procedente del etiquetado con cloruro de pireno sulfonilo. En la figura III.46, se muestran los resultados experimentales, el ajuste teórico de los mismos y las desviaciones del ajuste respecto a cada punto experimental, que se han obtenido, por el método del contaje simple de fotones, en un fluorímetro de nanosegundos. Los valores de los tiempos de vida y de los factores preexponenciales normalizados, obtenidos mediante ajuste no lineal por el método de los mínimos cuadrados, se indican en la Tabla 16, junto a los valores cuya obtención se detalla en el epígrafe siguiente.

Como se puede observar, la sonda de pireno-poli (C) presenta tres tiempos de vida, uno muy pequeño,  $\tau_1$ , de 0'3 ns; uno intermedio,  $\tau_2$ , de 10'7 ns y otro mayor,  $\tau_3$ , de 22'9 ns.



Esta heterogeneidad en los tiempos de vida se puede deber a una heterogeneidad en los sitios de enlace del fluoróforo con la macromolécula o a un sitio único de enlace con diferentes microambientes (Yguerabide, 1972). Los resultados concuerdan con los obtenidos por Liu y col. (1981) quienes encontraron que el cloruro de pireno sulfonilo enlazado covalentemente a proteínas, también exhibe decaimientos multiexponenciales.



**Figura III.46.-** Decaimiento de la fluorescencia de una disolución de pireno-poli(C)  $10^{-5}$  M, los tiempos de vida y los factores preexponenciales correspondientes son:

$$\tau_1 = 0'3, A_1 = 14'2, \tau_2 = 10'7, A_2 = 56'4, \tau_3 = 22'9 \text{ y } A_3 = 29'4.$$

### III. 5. 2. Variación del tiempo de vida de pireno-poli (C) en la hibridación con poli (I).

A la disolución anterior de pireno-poli (C), se han añadido cantidades crecientes de poli (I), en alícuotas de  $20 \mu\text{l}$  de una disolución  $10^{-4}$  M de poli (I) en tampón de hibridación, obteniéndose las relaciones molares  $[\text{poli (I)}]/[\text{poli (C)}]$ , que se indican en la Tabla 16 y en los correspondientes pies de las figuras III.47 a III.54. En estas figuras, al igual que en la III.46, se muestran los resultados experimentales, el ajuste teórico de los mismos (obtenido mediante ajuste no lineal por el método de los mínimos cuadrados) y las desviaciones del ajuste respecto a cada punto experimental, del decaimiento temporal de la fluorescencia de las disoluciones pireno-poli (C)-poli (I), mencionadas con anterioridad.



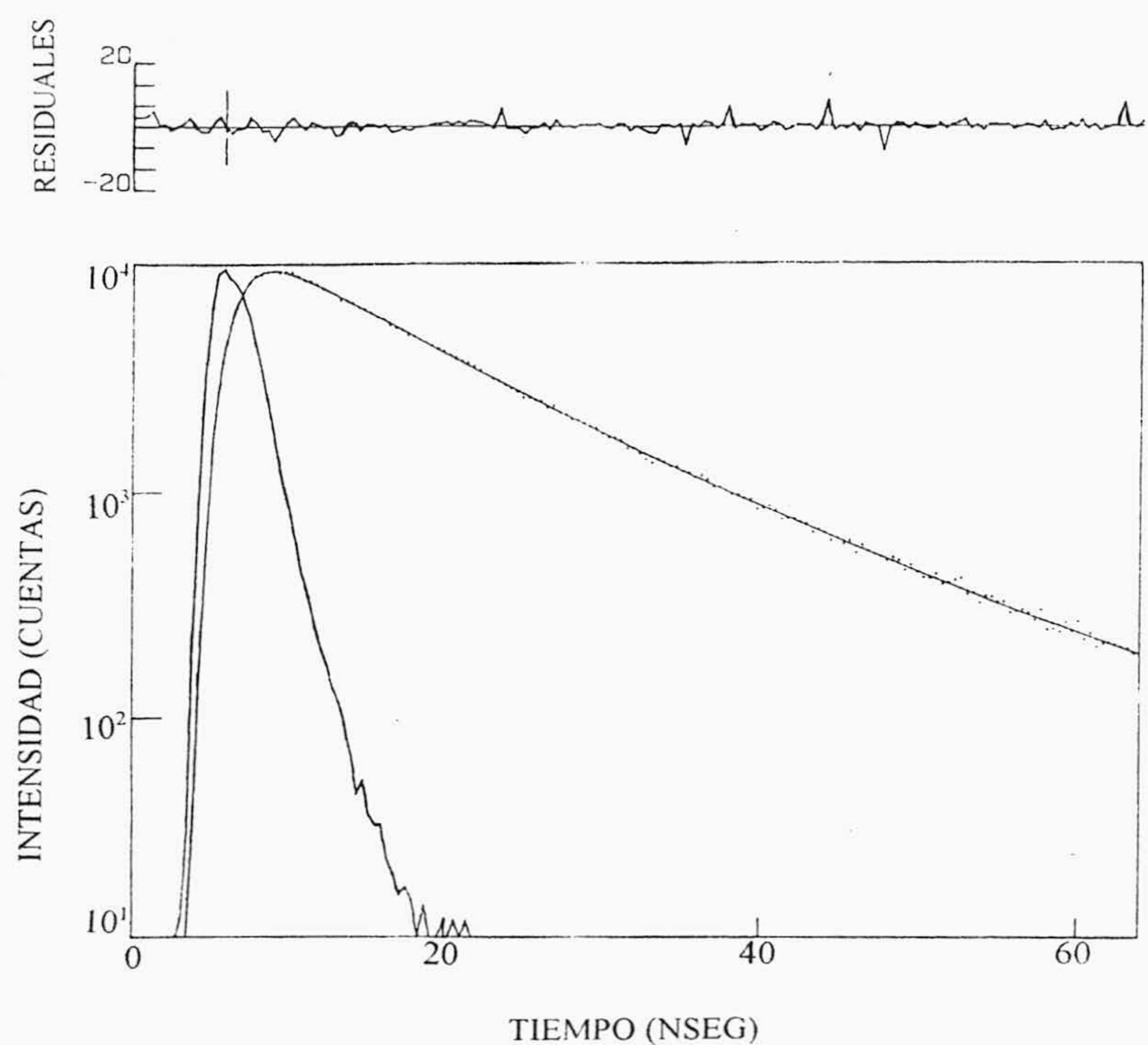
Como se puede observar en la Tabla 16, la progresiva hibridación, conduce a un decrecimiento continuo de  $\tau_2$ , tanto en el valor absoluto como en su abundancia (valor del preexponencial). Al mismo tiempo, hay una pequeña disminución en el valor de  $\tau_3$  y un aumento en la abundancia del tiempo de vida corto. Cuando la adición de poli (I) es suficiente para que la hibridación del pireno-poli (C) sea total, se producen variaciones más drásticas en los valores de los tiempos de vida y en sus distribuciones, aunque los datos experimentales se siguen ajustando bien a tres exponenciales. Así, se produce un decrecimiento considerable del porcentaje de  $\tau_3$ , mientras que  $\tau_2$  se reduce hasta un valor de 5'5 ns, y aparece un tiempo de vida de 1'2 ns en sustitución del que previamente presentaba el menor valor. Estos parámetros permanecen aproximadamente constantes con las siguientes adiciones de poli (I).

Tabla 16

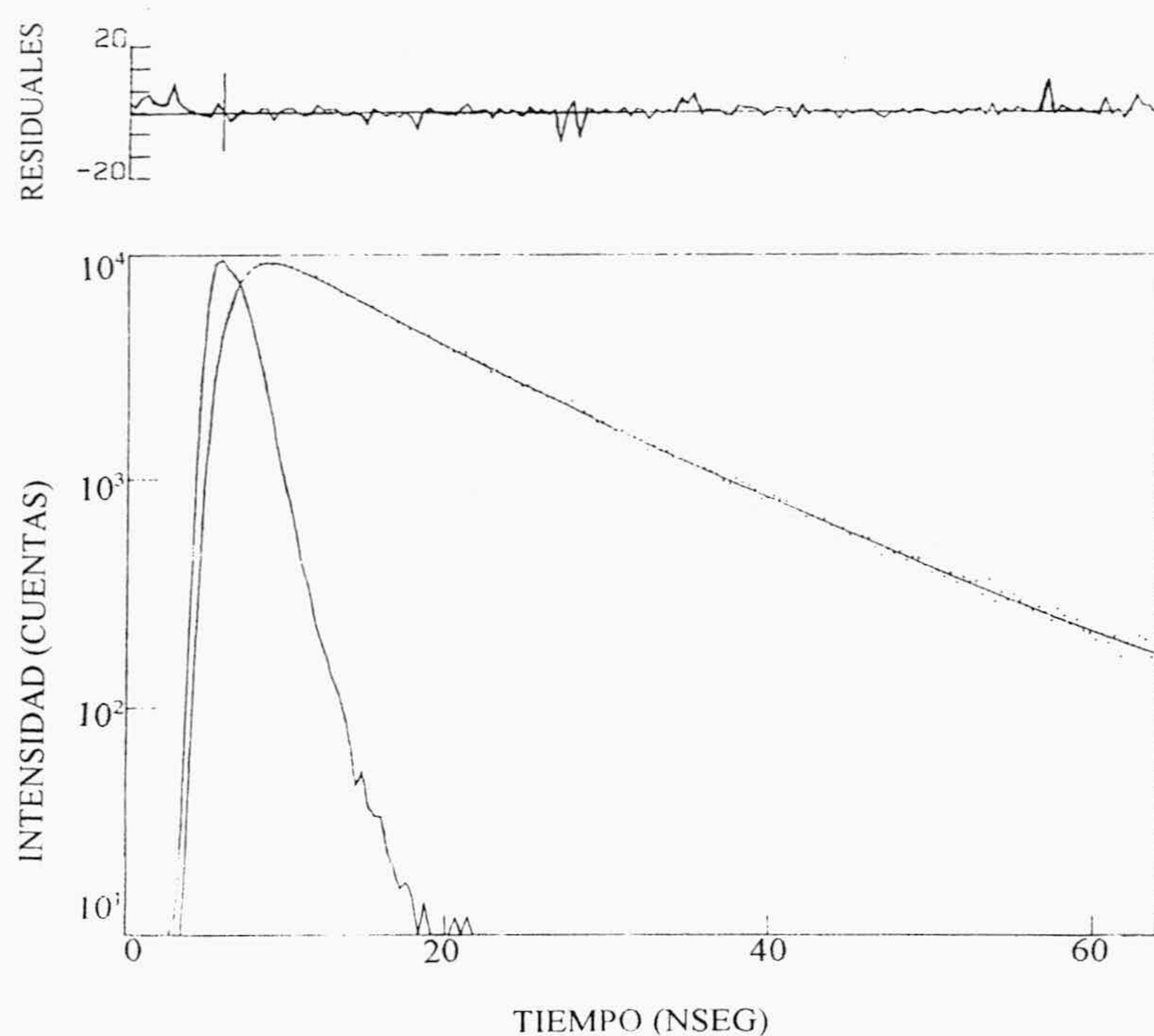
Tiempos de vida y factores preexponenciales normalizados a diferentes relaciones molares [poli (I)]/[pireno-poli (C)] (expresadas en bases de nucleótidos).

relación	$\tau_1$	$A_1(\%)$	$\tau_2$	$A_2(\%)$	$\tau_3$	$A_3(\%)$	$\tau_{\text{pro}}$
0'00	0'3	14'2	10'7	56'4	22'9	29'4	12'81
0'15	0'2	19'4	9'8	63'2	20'0	17'4	9'71
0'29	0'1	41'8	8'9	40'6	17'9	17'6	6'81
0'44	0'3	45'2	6'7	33'9	15'8	20'9	5'71
0'58	0'4	50'2	5'8	30'2	15'1	19'6	4'91
0'87	1'2	50'3	6'2	38'9	16'9	10'8	4'84
1'02	1'2	54'3	5'8	38'0	17'1	7'7	4'17
1'16	1'2	51'9	5'5	39'6	16'3	8'5	4'18
1'31	1'0	52'5	5'4	39'0	15'7	8'5	3'97



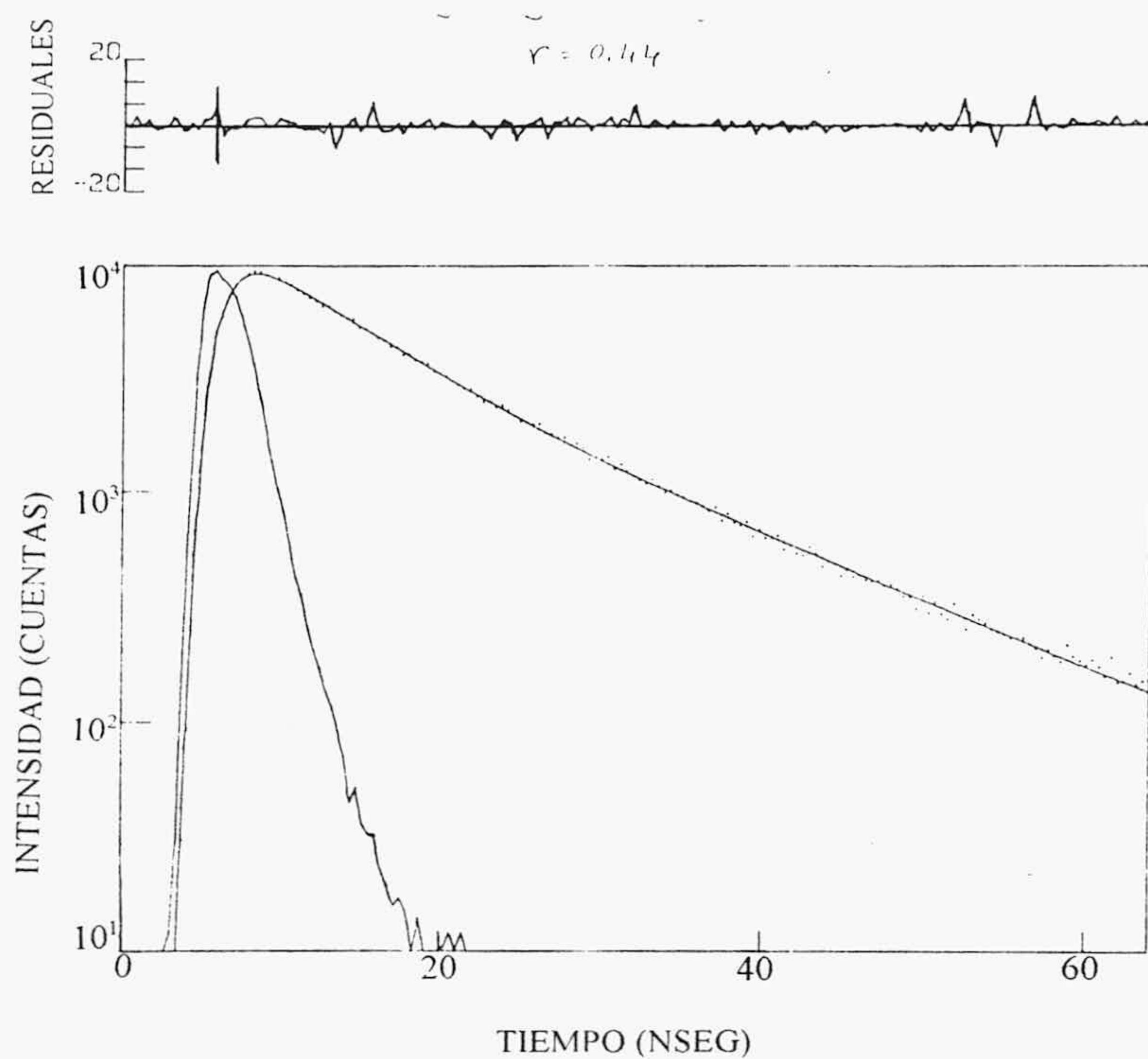


**Figura III.47.-** Decaimiento de la fluorescencia de una disolución de pireno-poli(C)-poli(I) a la relación molar  $[\text{poli(I)}]/[\text{pireno-poli(C)}] = 0.15$ .

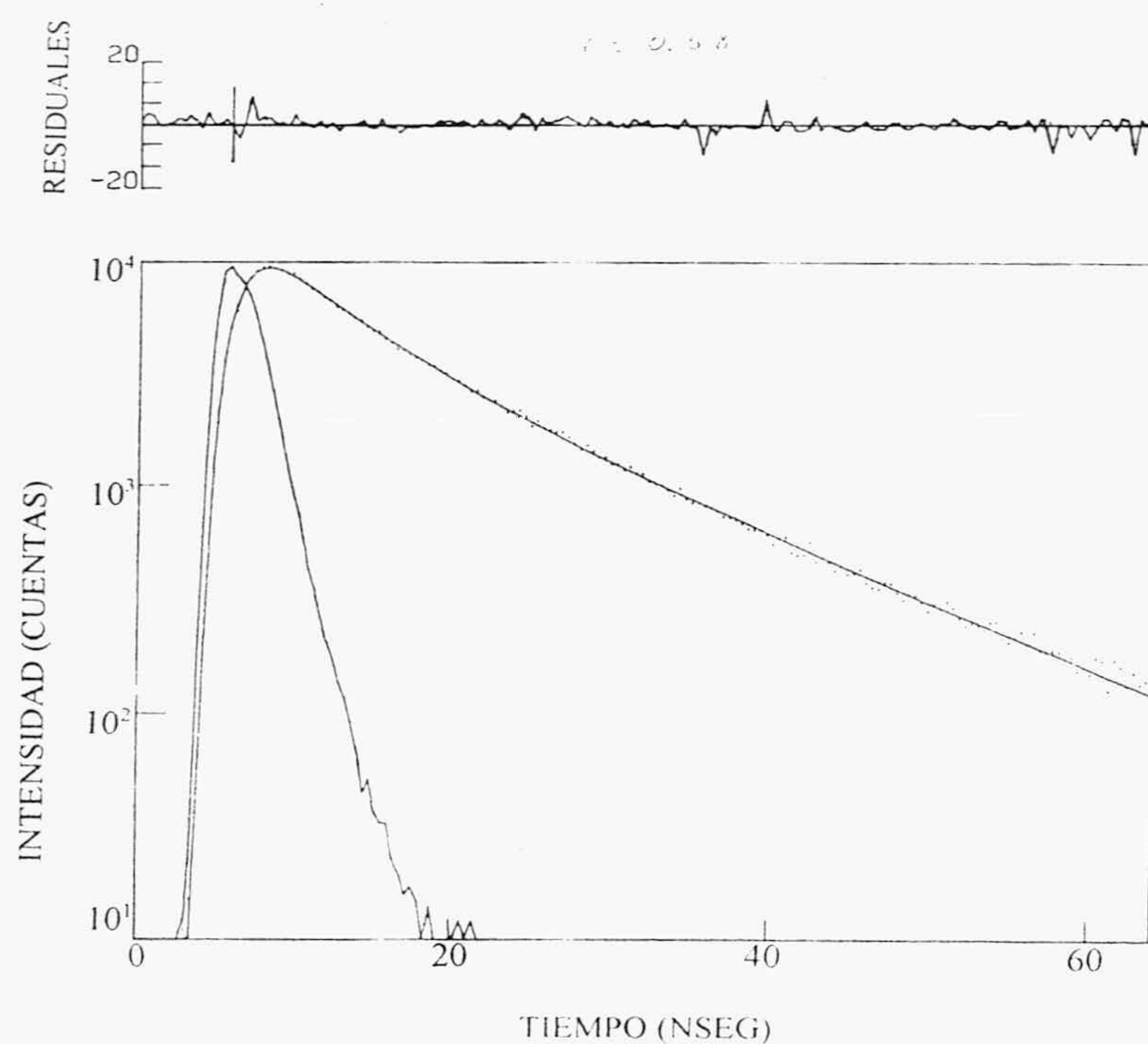


**Figura III.48.-** Decaimiento de la fluorescencia de la misma disolución a la relación molar  $[\text{poli(I)}]/[\text{pireno-poli(C)}] = 0.29$ .



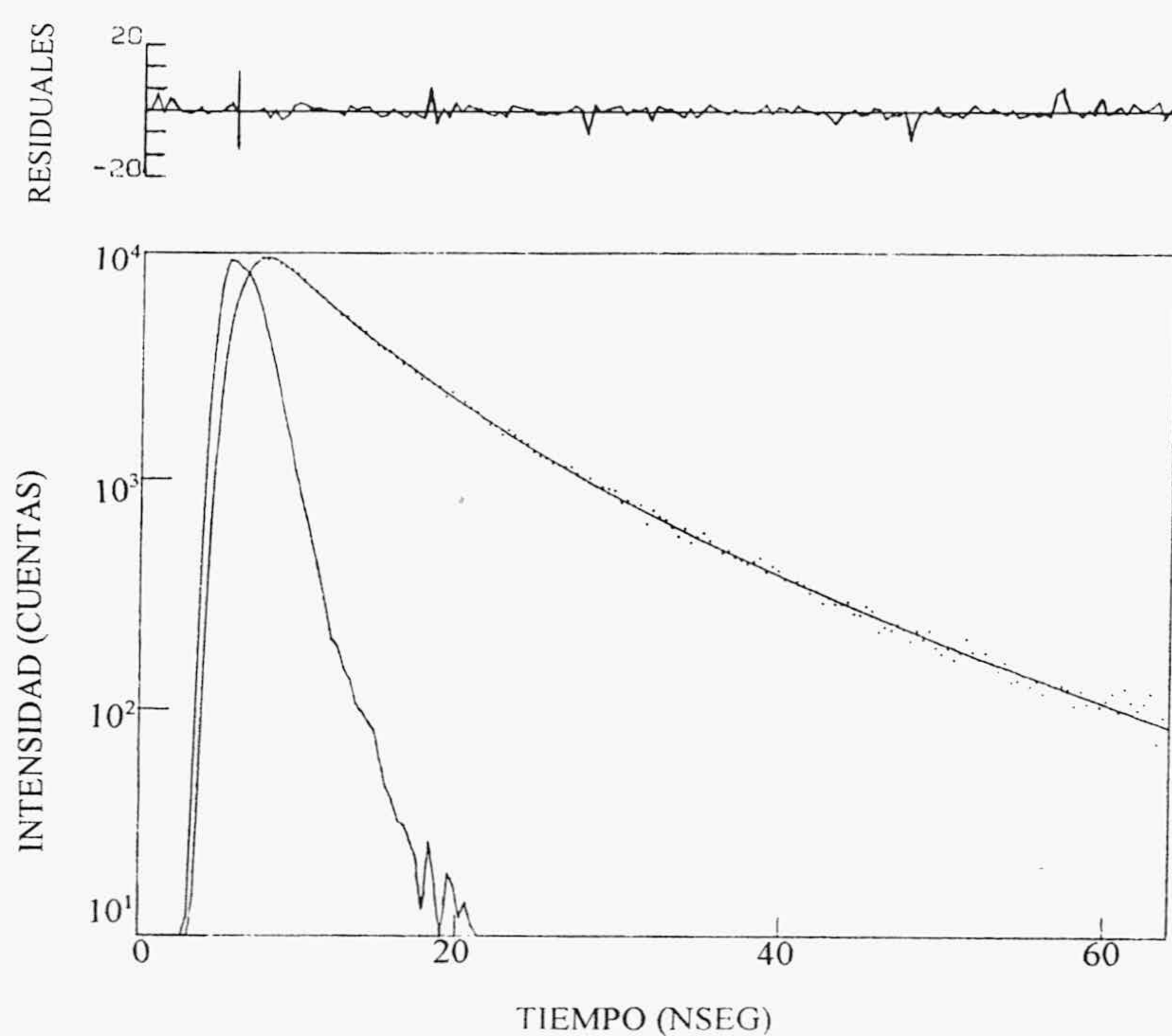


**Figura III.49.-** Decaimiento de la fluorescencia de la misma disolución a la relación molar  $[\text{poli(I)}]/[\text{pireno-poli(C)}] = 0'44$ .

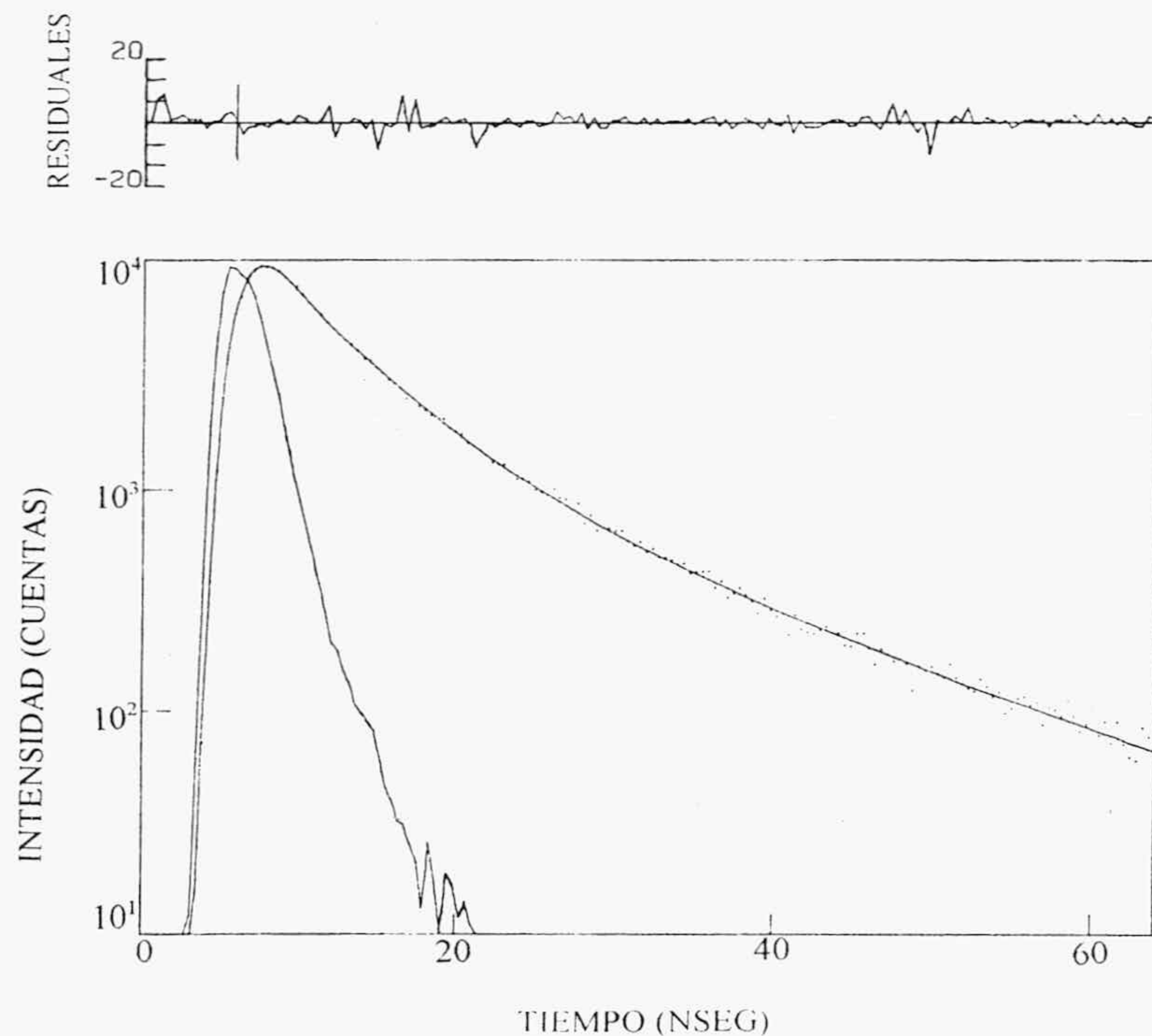


**Figura III.50.-** Decaimiento de la fluorescencia de la misma disolución a la relación molar  $[\text{poli(I)}]/[\text{pireno-poli(C)}] = 0'58$ .



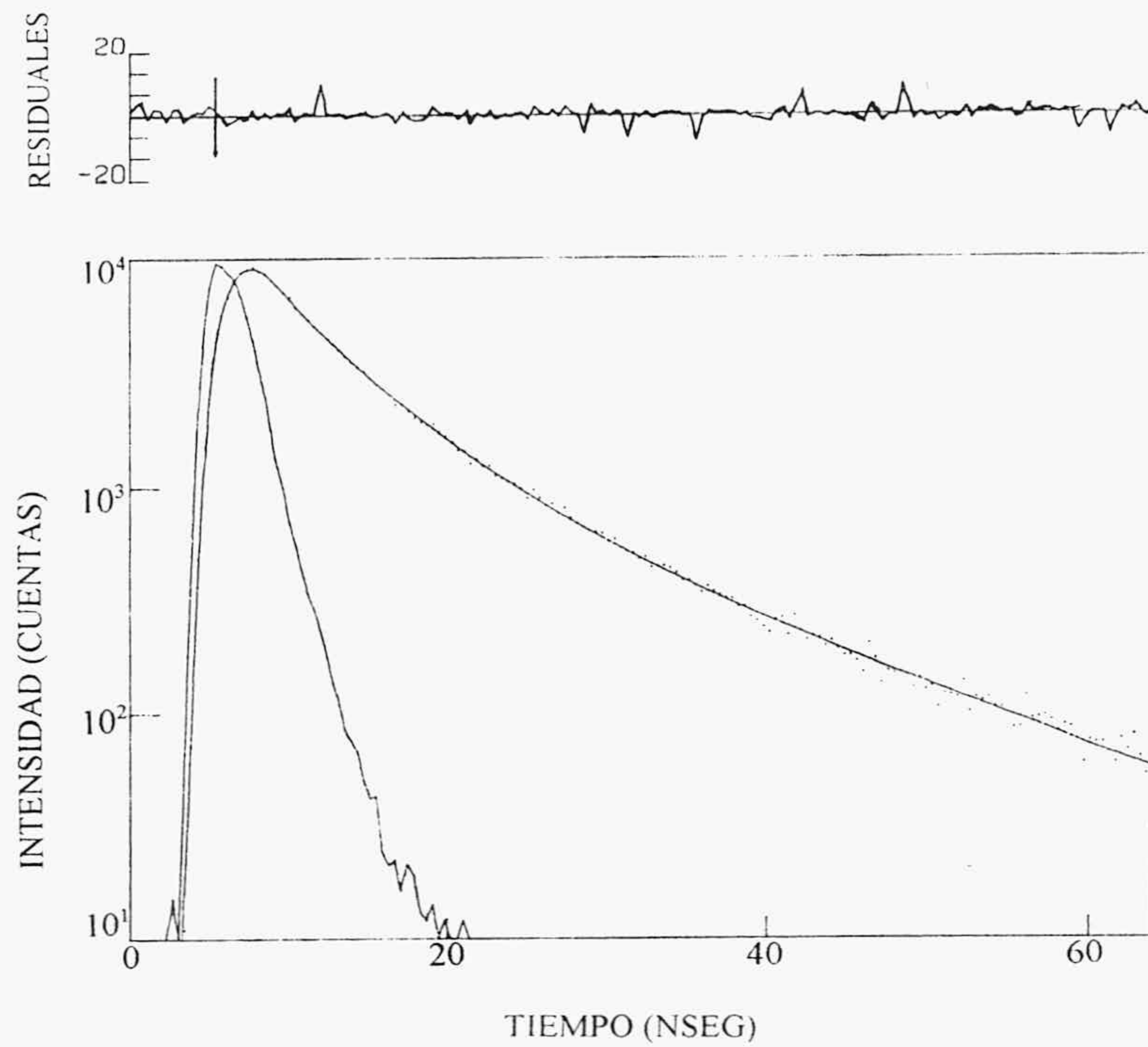


**Figura III.51.-** Decaimiento de la fluorescencia de la misma disolución a la relación molar  $[\text{poli(I)}]/[\text{pireno-poli(C)}] = 0.87$ .

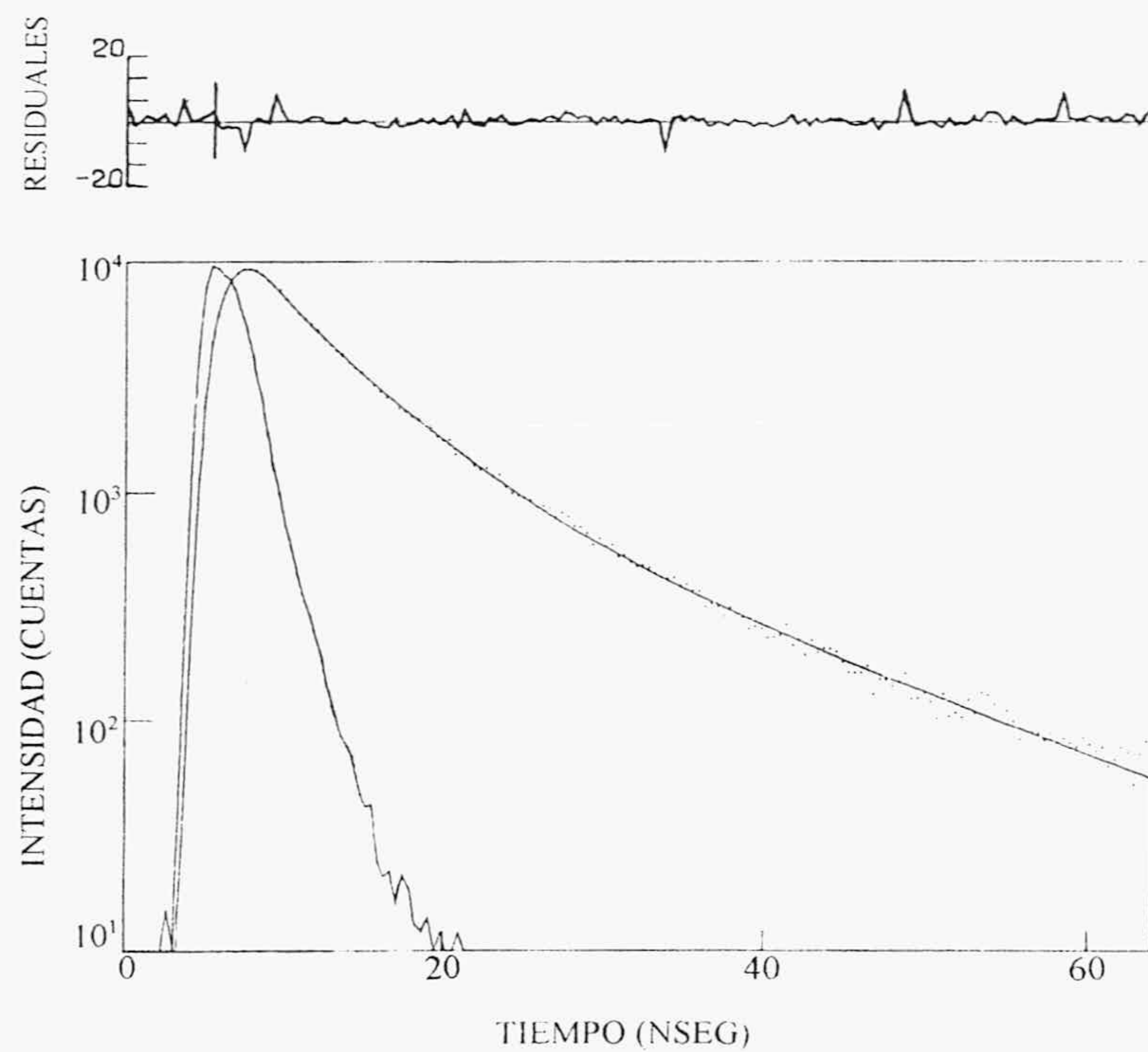


**Figura III.52.-** Decaimiento de la fluorescencia de la misma disolución a la relación molar  $[\text{poli(I)}]/[\text{pireno-poli(C)}] = 1.02$ .





**Figura III.53.-** Decaimiento de la fluorescencia de la misma disolución a la relación molar [poli(I)]/[pireno-poli(C)] = 1'16.



**Figura III.54.-** Decaimiento de la fluorescencia de la misma disolución a la relación molar [poli(I)]/[pireno-poli(C)] = 1'31.



En lo que se refiere a la variación del tiempo de vida promedio de fluorescencia con poli (C) marcado con isotiocianato de pireno tras la hibridación con poli (I), los ajustes realizados del decaimiento experimental obtenido, proporcionaron un valor para  $\tau_{\text{pro}}$  de aproximadamente 4'8 ns, es decir, algo menor que con la sonda de isotiocianato de pireno-poli (C) sola. Por lo que,  $\tau_{\text{pro}}$  disminuye con la hibridación una cantidad tan pequeña como 1'2 ns.

Estos resultados junto a todos los referidos anteriormente y que mostraron menores decrecimientos en la intensidad de fluorescencia en estado estacionario cuando poli (I) hibrida con isotiocianato de pireno-poli (C) (comparados con los obtenidos cuando se utilizó cloruro de pirenosulfonilo como etiqueta fluorescente), son indicativos de la gran influencia que tiene la disminución del tiempo de vida de fluorescencia, en el *quenching* de la intensidad de fluorescencia en estado estacionario.

### III. 5. 3. Tiempos de vida de pireno enlazado a poli (C) y del híbrido formado con poli (I) obtenidos con excitación y emisión polarizada.

Es conocida la influencia del tamaño de las macromoléculas en el coeficiente de difusión rotacional del fluoróforo y que los distintos valores de éste pueden introducir errores en las medidas de los tiempos de vida (Shinitzky y Barenholz, 1978; Shinitzky y Yuli, 1982). Por estos motivos, se han realizado medidas del tiempo de vida excitando con luz polarizada verticalmente y midiendo la emisión con un polarizador a 54'7 ° (ángulo mágico), ya que la emisión medida con el ángulo mágico refleja los parámetros de los tiempos de vida sin que estén afectados por los movimientos rotacionales del fluoróforo (Shinitzky y Yuli, 1982). De esta forma, se puede obtener información sobre las contribuciones relativas del tiempo de vida y del coeficiente de difusión rotacional, en la disminución de la intensidad de fluorescencia observada en estado estacionario. Las figuras III.55 y III.56 muestran las gráficas de emisión resuelta en el tiempo, obtenidas situando el polarizador de excitación en dirección vertical y el de emisión en el ángulo mágico, de disoluciones en tampón de hibridación, de pireno-poli (C) no hibridado y de pireno-poli (C)-poli (I) completamente hibridado, respectivamente. En la Tabla 17 se indican los valores de los tiempos de vida, de los factores preexponenciales normalizados y del tiempo de vida promedio, para los dos ajustes realizados por regresión no lineal. Los valores de la Tabla 17 muestran que la emisión al ángulo mágico del pireno-poli (C) es igual de compleja que cuando no se utilizan polarizadores, requiriendo un mínimo de tres tiempos de vida para su



descripción. Además, hay un gran aumento de la velocidad de decaimiento tras la hibridación, como se refleja en los valores del tiempo de vida promedio, que decrece desde 10'81 ns en pireno-poli (C) hasta 4'05 ns cuando se produce la hibridación con poli (I). Como ya se ha indicado, las gráficas de nanosegundos medidas en el ángulo mágico, reflejan los tiempos de vida sin que estén afectados por movimientos rotacionales del fluoróforo. Como se puede observar, los valores son bastante semejantes a los obtenidos anteriormente sin los polarizadores.

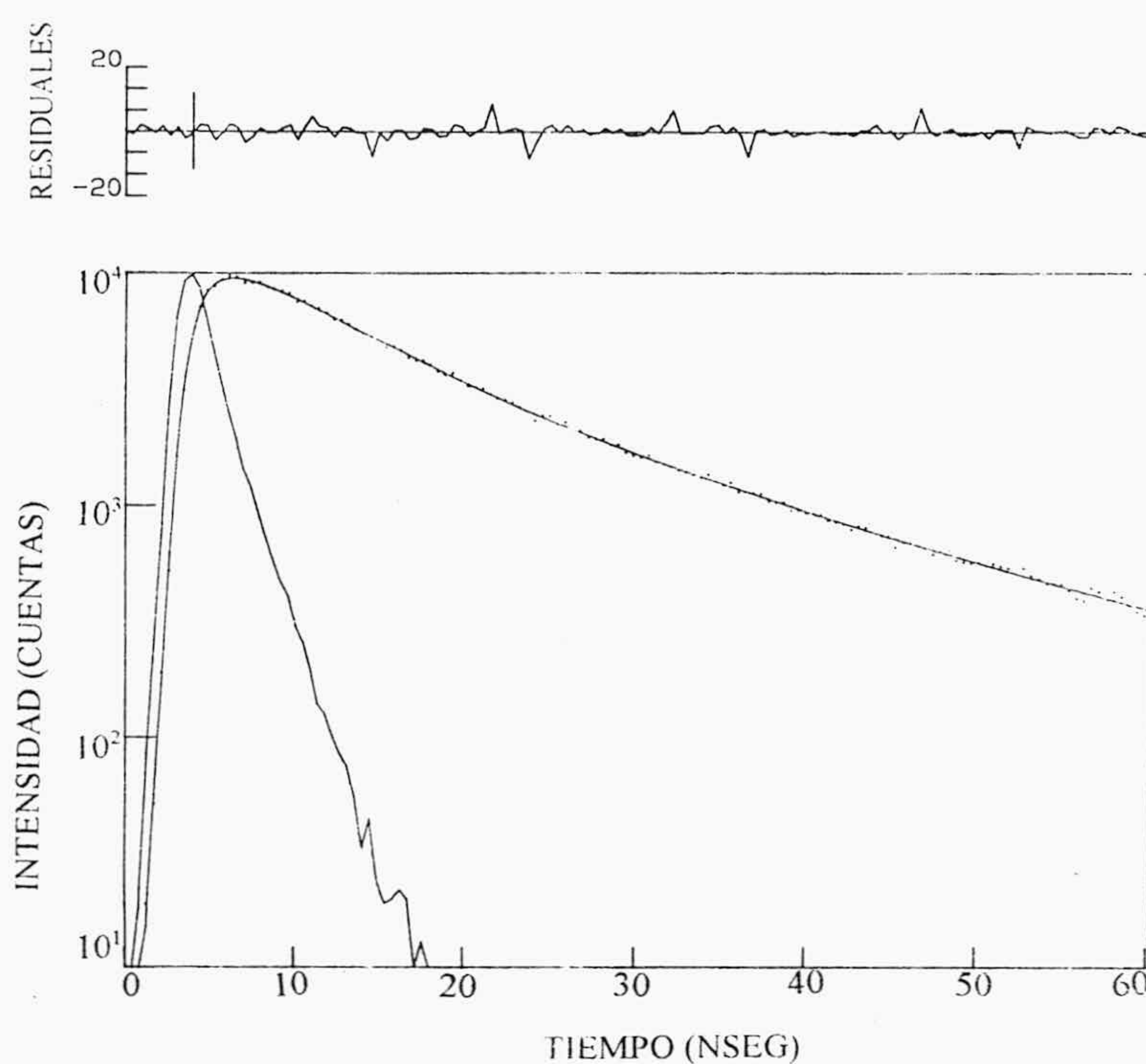
Por otra parte, para separar los efectos de  $\Phi$  y  $\tau$  en los cambios de A que suceden en la hibridación de poli (C) con poli (I), es necesario efectuar medidas de la evolución temporal de la anisotropía de fluorescencia. Sin embargo, debido a la baja sensibilidad que inherentemente tiene un fluorímetro de nanosegundos (respecto a la que posee un fluorímetro de estado estacionario), al bajo porcentaje de marca fluorescente que necesariamente se ha de utilizar para que la sonda conserve sus propiedades de hibridación y a la pérdida de señal que se produce cuando se intercalan los polarizadores en los canales de excitación y de emisión, las medidas de resolución temporal de la anisotropía no han resultado suficientemente precisas, por lo que se ha considerado conveniente utilizar una aproximación, que seguidamente se describirá. Para ello es necesario medir previamente los decaimientos temporales de muestras de pireno-poli (C), sólo y totalmente hibridado con poli (I), con excitación polarizada verticalmente y recoger las emisiones polarizadas tanto vertical como horizontalmente. En las figuras III.57 a III.60, se muestran los resultados de estas medidas. Los parámetros obtenidos en los ajustes se han incluido también en la Tabla 17.

**Tabla 17**

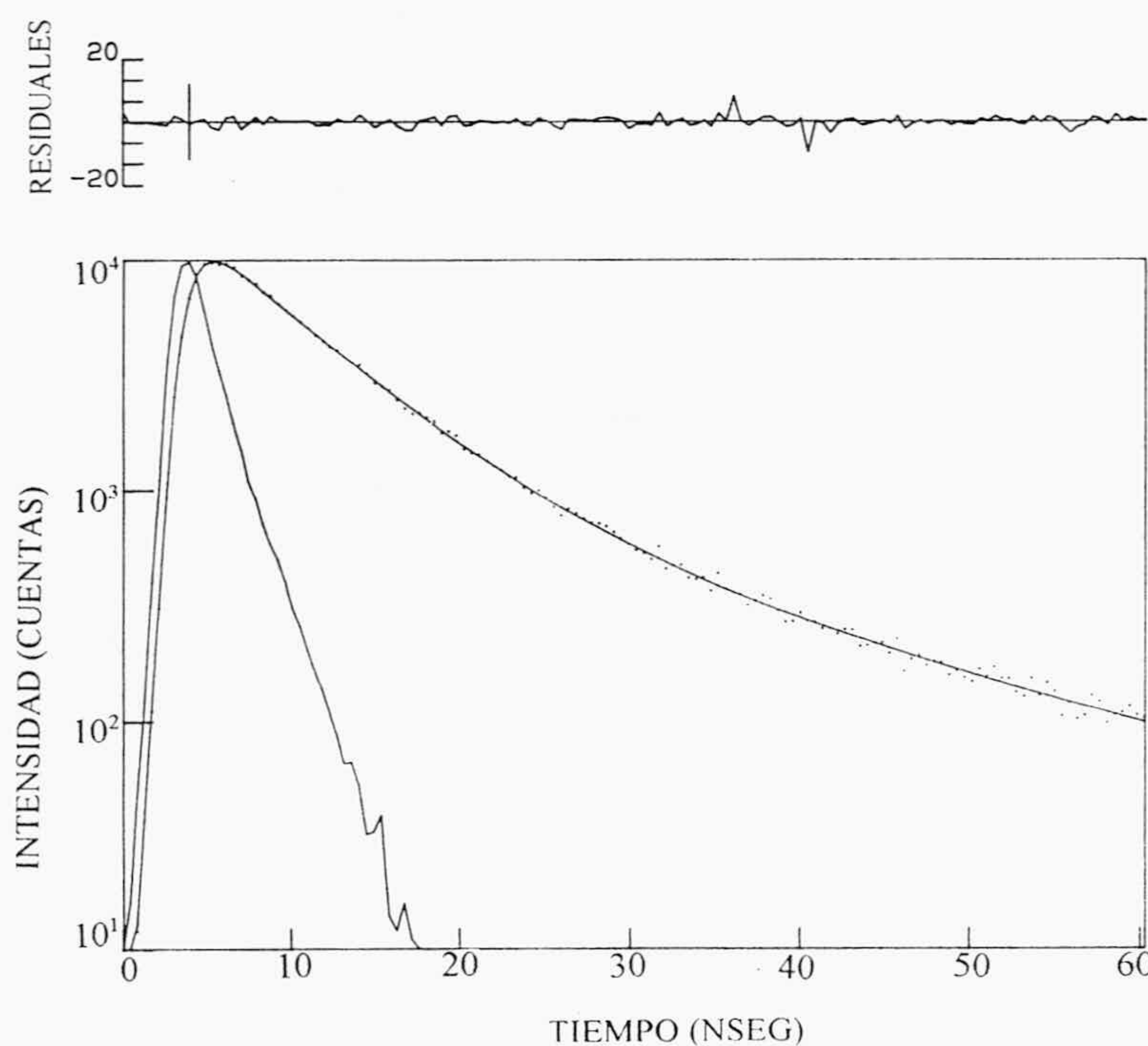
Tiempos de vida y factores preexponenciales normalizados de pireno-poli (C) y del híbrido formado con poli (I), medidos con luz polarizada.

Polariz.	muestra	$a_1$	$\tau_1$	$a_2$	$\tau_2$	$a_3$	$\tau_3$	$\tau_{pro}$
V-V	no hibrid.	0'390	1'022	0'451	7'906	0'159	23'658	7'726
V-V	hibridada	0'595	0'689	0'340	4'721	0'065	15'390	3'015
V-H	no hibrid.	0'391	7'060	0'413	10'700	0'196	26'960	12'464
V-H	hibridada	0'623	0'346	0'311	6'452	0'066	22'388	3'674
V-54'7	no hibrid.	0'144	1'272	0'627	8'209	0'229	23'931	10'810
V-54'7	hibridada	0'521	0'818	0'425	5'885	0'055	20'361	4'047



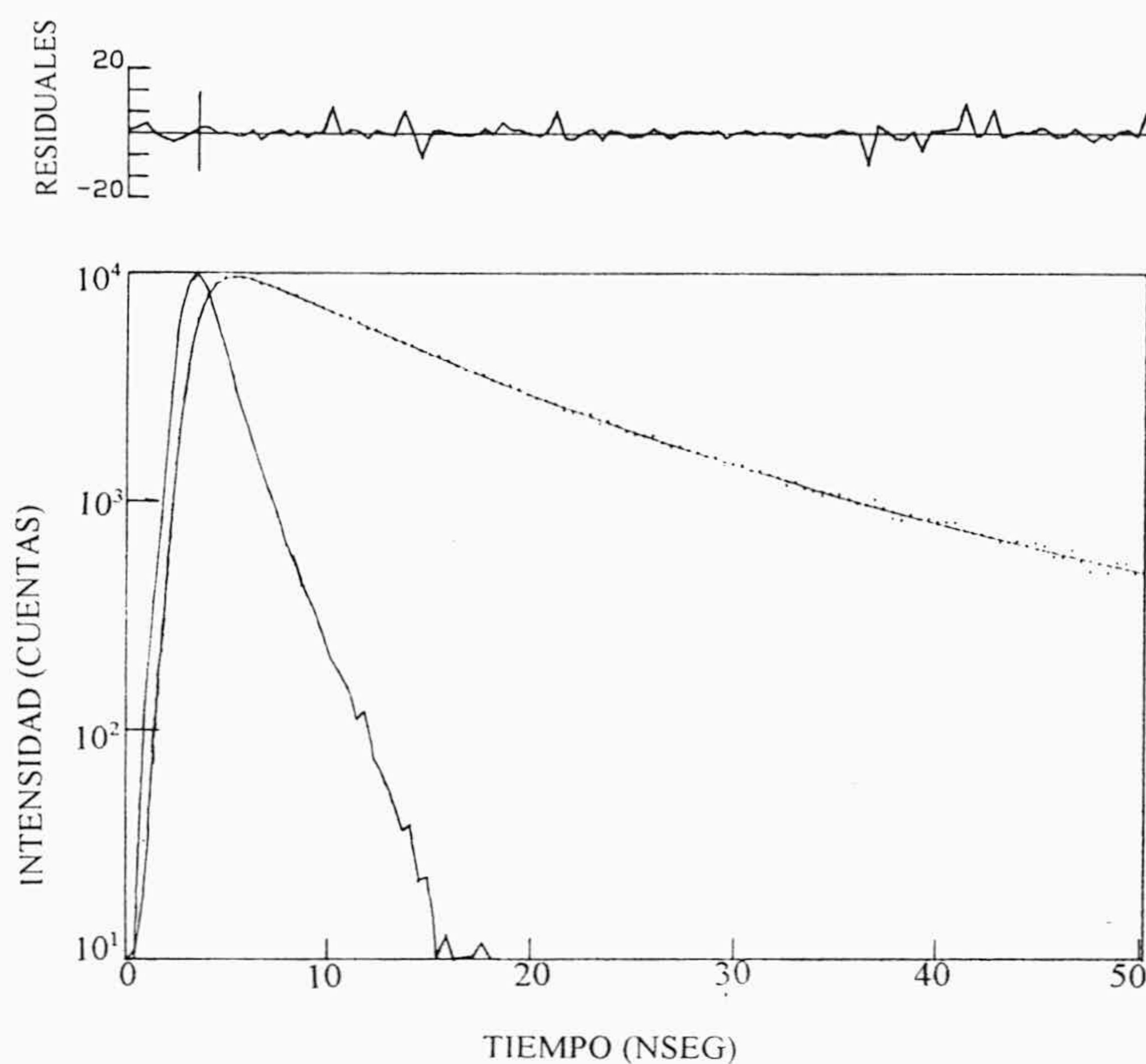


**Figura III.55.-** Decaimiento de la fluorescencia de una disolución de pireno-poli(C)  $10^{-5}$  M excitada con luz polarizada verticalmente y emitiendo en el ángulo mágico (V-54'7).

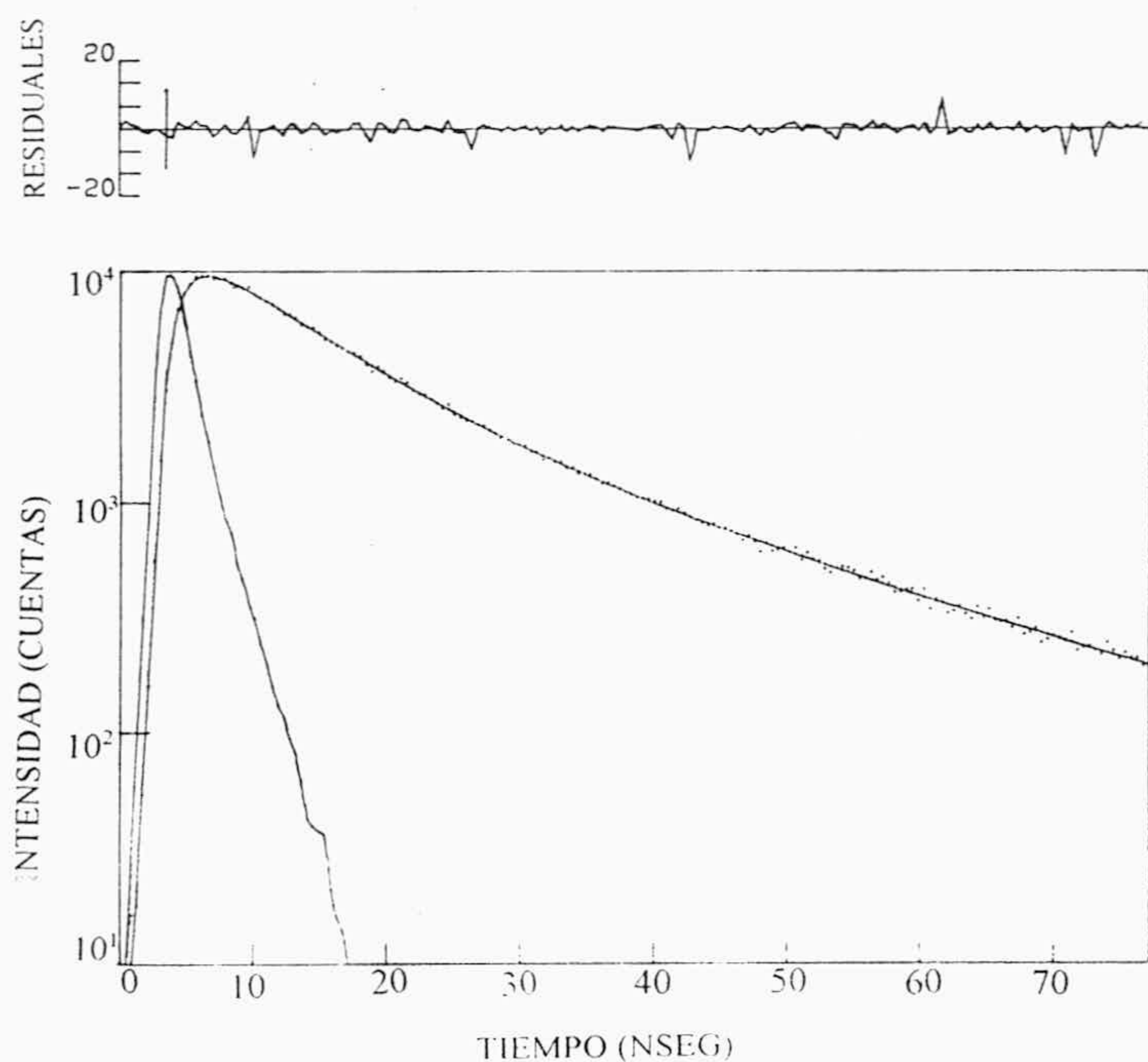


**Figura III.56.-** Decaimiento de la fluorescencia de la misma disolución totalmente hibridada y en las mismas condiciones de excitación y de emisión.



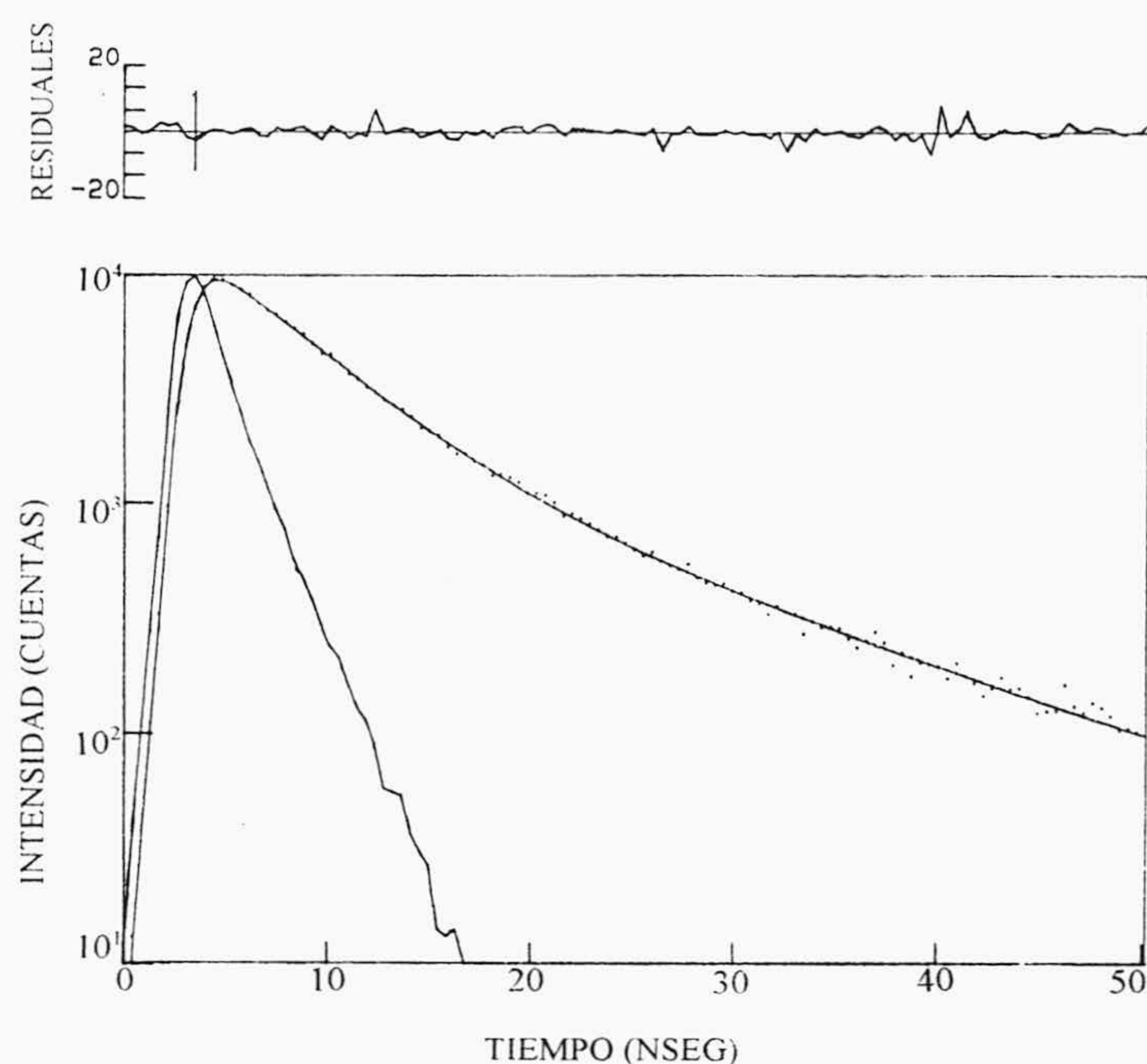


**Figura III.57.-** Decaimiento de la fluorescencia de una disolución de pireno-poli(C)  $10^{-5}$  M excitada con luz polarizada verticalmente y recogiendo la emisión polarizada verticalmente (V-V).

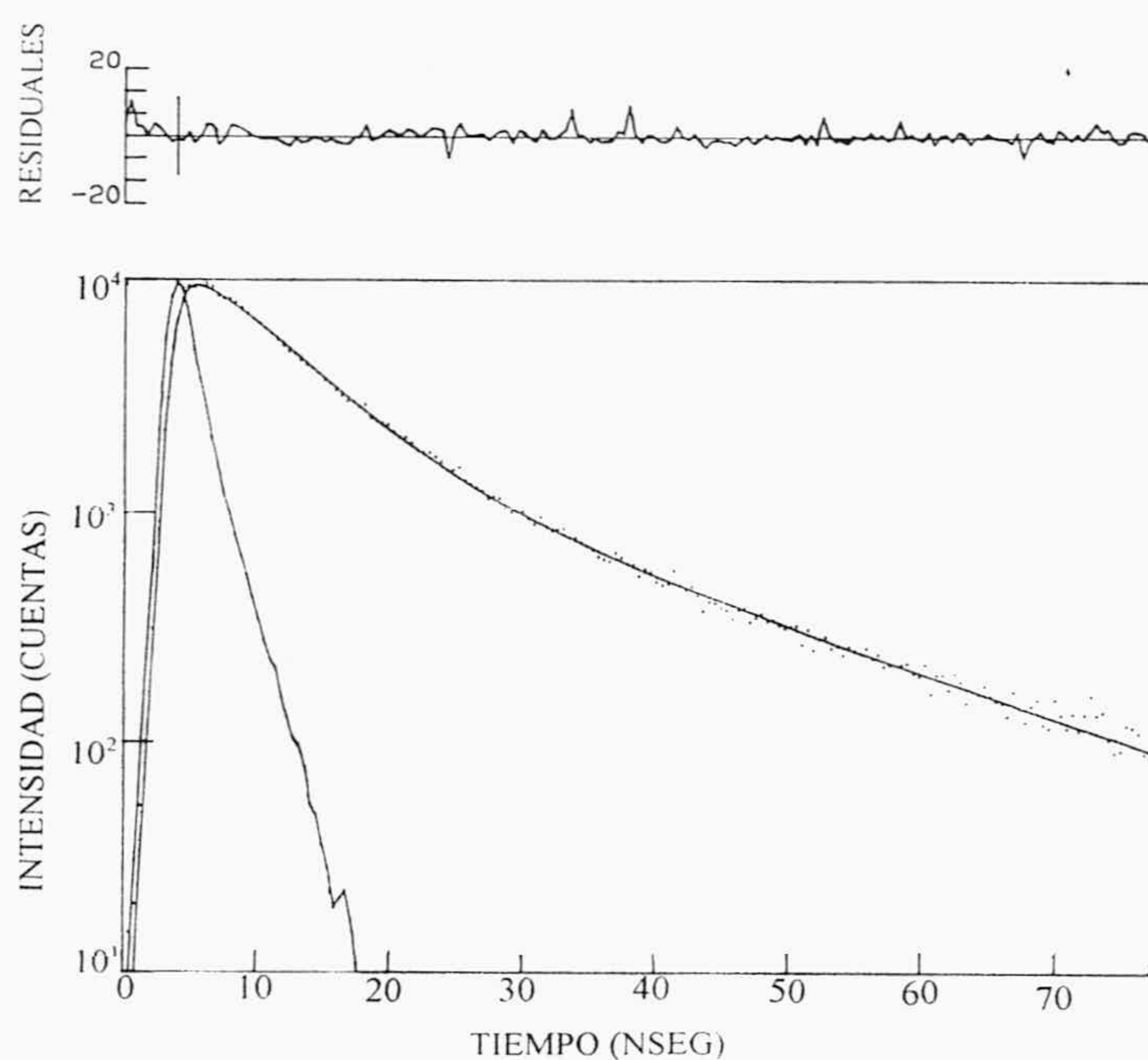


**Figura III.58.-** Decaimiento de la fluorescencia de la misma disolución excitada con luz polarizada verticalmente y recogiendo la emisión polarizada horizontalmente (V-H).





**Figura III.59.-** Decaimiento de la fluorescencia de la misma disolución totalmente hibridada excitando con luz polarizada verticalmente y recogiendo la emisión verticalmente (V-V).



**Figura III.60.-** Decaimiento de la fluorescencia de la misma disolución totalmente hibridada excitando con luz polarizada verticalmente y recogiendo la emisión horizontalmente (V-H).



### III. 6. INTERPRETACIÓN CONJUNTA DE LOS DATOS FLUORIMÉTRICOS CON LA SONDA DE PIRENO-POLI (C).

#### III. 6. 1. Relación entre tiempos de vida e intensidad de fluorescencia en estado estacionario.

Consideremos la relación entre la intensidad de fluorescencia en estado estacionario y el tiempo de vida. Si el fluoróforo en cuestión tiene un sólo tiempo de vida, la intensidad en el espectrofluorímetro de nanosegundos vendrá dada por:

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} = k_e \cdot n_0^* \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (26)$$

en donde  $n_0^*$  = número total de moléculas excitadas y  $k_e$  la velocidad específica de la desactivación radiativa.

Por otra parte, la intensidad en estado estacionario viene dada por la integración de la expresión anterior en todo el intervalo de tiempo.

$$I = k_e \cdot n_0^* \int_0^\infty e^{-\frac{t}{\tau}} dt = -[k_e \cdot n_0^* \cdot \tau \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}]_0^\infty = k_e \cdot n_0^* \cdot \tau \quad (27)$$

Si el fluoróforo puede desactivarse por *quenching* dinámico y si llamamos  $I^0$  e  $I^q$  a la intensidad de fluorescencia no desactivada por *quenching* y desactivada por éste, respectivamente, con los mismos superíndices para los correspondientes tiempos de vida, se obtiene:

$$\frac{I^q}{I^0} = \frac{\tau^q}{\tau^0} \quad (28)$$

Cuando el fluoróforo en cuestión tiene múltiples tiempos de vida, entonces la intensidad en función del tiempo vendrá dada por:

$$I(t) = k_e \cdot n_0^* \cdot \sum_i a_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (29)$$



siendo la  $\sum_i a_i = 1$ .

La intensidad de estado estacionario, en este caso, es:

$$I = k_e \cdot n_0^* \cdot \sum_i a_i \cdot \tau_i \quad (30)$$

y, por consiguiente, si hay desactivación dinámica:

$$\frac{I^q}{I^0} = \frac{\sum_i a_i^q \cdot \tau_i^q}{\sum_i a_i^0 \cdot \tau_i^0} \quad (31)$$

Mediante la ecuación (30) y los datos de la Tabla 17 se han calculado las intensidades normalizadas de fluorescencia en estado estacionario, es decir, divididas entre  $k_e \cdot n_0^*$ . Así, se han obtenido los valores de  $I_{VV}$ ,  $I_{VH}$  e  $I_{V54'7}$ , para el pireno-poli (C) sin hibridar (señalado con el superíndice  $u$ ) y para el pireno-poli (C)-poli (I) hibridado (señalado con el superíndice  $h$ ). Según convenios estándar, el primer subíndice se refiere a la orientación del polarizador de excitación y el segundo a la del de emisión (V para vertical y H para horizontal).

$$\begin{aligned} I_{VV}^u &= 0'390 \cdot 1'022 + 0'451 \cdot 7'906 + 0'159 \cdot 23'658 \\ I_{VV}^h &= 0'595 \cdot 0'689 + 0'340 \cdot 4'721 + 0'065 \cdot 15'390 \\ I_{VH}^u &= 0'391 \cdot 7'060 + 0'413 \cdot 10'700 + 0'196 \cdot 26'960 \\ I_{VH}^h &= 0'623 \cdot 0'346 + 0'311 \cdot 6'452 + 0'066 \cdot 22'388 \\ I_{V54'7}^u &= 0'144 \cdot 1'272 + 0'627 \cdot 8'209 + 0'229 \cdot 23'931 \\ I_{V54'7}^h &= 0'521 \cdot 0'818 + 0'425 \cdot 5'885 + 0'055 \cdot 20'361 \end{aligned}$$

En la Tabla 18 se presentan los valores  $I_{VV}$ ,  $I_{VH}$  e  $I_{V54'7}$ . Como se deduce de los datos de esta Tabla 18, cuando poli (I) hibrida completamente con el pireno-poli (C), se reducen los valores de  $I_{VV}$ ,  $I_{VH}$  e  $I_{V54'7}$  por factores iguales a 2'56, 3'39 y 2'67, respectivamente.



TABLA 18

Valores normalizados de la intensidad de fluorescencia polarizada en estado estacionario del pireno-poli (C) sin hibridar ( $u$ ) y totalmente hibridado ( $h$ ).

Polarizadores	$I^u$	$I^h$	$I^h/I^u$	$I^u/I^h$
VV	7'726	3'015	0'390	2'56
VH	12'464	3'674	0'295	3'39
V 54'7 <sup>a</sup>	10'810	4'047	0'374	2'67

También se pueden generar las gráficas de nanosegundos correspondientes a  $I_{VV}$ ,  $I_{VH}$  e  $I_{V54'7}$ , para la muestra no hibridada de pireno-poli (C) y la completamente hibridada de pireno-poli (C)-poli (I), sin más que expresar la intensidad de fluorescencia dependiente del tiempo,  $I(t)$ , como la suma de las tres exponenciales que describen el decaimiento experimental de la fluorescencia, es decir:

$$I_{jj}(t) = \sum_1^3 a_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (32)$$

en donde  $I_{jj}(t)$  es la intensidad de fluorescencia en función del tiempo con los polarizadores en la posición  $j$ ,  $a_i$  son los factores preexponenciales normalizados según  $\sum_i a_i = 1$  y  $\tau_i$  los tiempos de vida. En nuestro caso:

$$\begin{aligned} I_{VV}^u(t) &= 0'390 \cdot e^{-t/1'022} + 0'451 \cdot e^{-t/7'906} + 0'159 \cdot e^{-t/23'658} \\ I_{VV}^h(t) &= 0'595 \cdot e^{-t/0'689} + 0'340 \cdot e^{-t/4'721} + 0'065 \cdot e^{-t/15'390} \\ I_{VH}^u(t) &= 0'391 \cdot e^{-t/7'060} + 0'413 \cdot e^{-t/10'700} + 0'196 \cdot e^{-t/26'960} \\ I_{VH}^h(t) &= 0'623 \cdot e^{-t/0'346} + 0'311 \cdot e^{-t/6'452} + 0'066 \cdot e^{-t/22'388} \\ I_{V54'7}^u(t) &= 0'144 \cdot e^{-t/1'272} + 0'627 \cdot e^{-t/8'209} + 0'229 \cdot e^{-t/23'931} \\ I_{V54'7}^h(t) &= 0'521 \cdot e^{-t/0'818} + 0'425 \cdot e^{-t/5'885} + 0'055 \cdot e^{-t/20'361} \end{aligned}$$

Como es de esperar, el cálculo del área bajo las curvas  $I_{jj}(t)$ , proporciona prácticamente los mismos resultados que la aplicación de la ecuación (30).



### III. 6. 2. Contribución de la anisotropía en estado estacionario, a las intensidades de fluorescencia en estado estacionario.

Como es conocido, en un fluoróforo sin restricciones en su movimiento rotacional, que presente un único tiempo de vida y que no esté sometido a *quenching* estático, se pueden relacionar entre sí los cambios en las intensidades de fluorescencia en estado estacionario  $I_{VV}$ ,  $I_{VH}$ ,  $I_{V547}$ , la anisotropía en estado estacionario  $A$  y el tiempo de vida  $\tau$ , a través de las siguientes expresiones (Yguerabide e Yguerabide, 1984; Kinoshita y col., 1971):

$$I_{VV} = \frac{ak_e}{3} \cdot \tau \cdot (1+2A) \quad (33)$$

$$I_{VH} = \frac{ak_e}{3} \cdot \tau \cdot (1-A) \quad (34)$$

donde  $a$  es una constante de proporcionalidad y  $k_e$  es la velocidad específica de emisión del fluoróforo (el tiempo de vida radiativo se define como  $\tau = 1/k_e$ ).

La intensidad de fluorescencia en estado estacionario será la función suma,  $S$ , dada por:

$$S = I_{VV} + 2I_{VH} = ak_e\tau \quad (35)$$

Las ecuaciones (33)-(35) nos permiten escribir las siguientes relaciones:

$$\frac{S^u}{S^h} = \frac{\tau^u}{\tau^h} \quad (36)$$



$$\frac{I_{VV}^u}{I_{VV}^h} = \frac{\tau^u(1+2A^u)}{\tau^h(1+2A^h)} = \frac{S^u(1+2A^u)}{S^h(1+2A^h)} \quad (37)$$

$$\frac{I_{VH}^u}{I_{VH}^h} = \frac{\tau^u(1-A^u)}{\tau^h(1-A^h)} = \frac{S^u(1-A^u)}{S^h(1-A^h)} \quad (38)$$

Las anteriores ecuaciones muestran que los efectos del tiempo de vida o de la función suma en las relaciones  $I_{VV}^u/I_{VV}^h$  y  $I_{VH}^u/I_{VH}^h$  se pueden separar de los efectos de anisotropía. Como ya se ha indicado, las anteriores ecuaciones se aplican estrictamente sólo en el caso de que el fluoróforo tenga un único tiempo de vida y de que su movimiento rotacional no tenga restricciones. Nuestros datos indican múltiples tiempos de vida y, además, es lógico pensar que el movimiento rotacional de un fluoróforo etiquetado a ADN, debe de estar parcialmente impedido. Sin embargo, podemos suponer que se pueden usar las ecuaciones anteriores, como una primera aproximación al caso de tiempos de vida múltiples, si se utilizan los valores del tiempo de vida promedio. Esto ha sido empleado por otros autores con buenos resultados (Hanson y col., 1981). De otra parte, los datos experimentales muestran un valor bajo de la anisotropía de fluorescencia, por lo que parece razonable suponer que las restricciones en su movimiento rotacional no son demasiado severas. Estos argumentos permiten emplear las ecuaciones anteriores como una razonable aproximación.

Como ya se ha indicado, las ecuaciones (33) - (38) muestran que se pueden separar o factorizar como términos individuales los efectos de  $\tau$  y  $A$  en las relaciones  $I_{VV}^u/I_{VV}^h$  y  $I_{VH}^u/I_{VH}^h$  entre las intensidades en estado estacionario. Las ecuaciones indican que el factor tiempo de vida es el mismo para ambas relaciones,  $I_{VV}^u/I_{VV}^h$  y  $I_{VH}^u/I_{VH}^h$ , pero el factor de la anisotropía es diferente. Esto significa que las relaciones  $I_{VV}^u/I_{VV}^h$  y  $I_{VH}^u/I_{VH}^h$  serán diferentes si hay cambios en  $A$  tras la hibridación, pero deben de ser iguales si la anisotropía permaneciese constante. Así, si  $A^h$  es mayor que  $A^u$ , entonces las ecuaciones indican que  $I_{VV}^u/I_{VV}^h$  debe ser menor que  $I_{VH}^u/I_{VH}^h$ . Esta conclusión se puede comprender con facilidad con el siguiente razonamiento, si la anisotropía es mayor para la forma hibridada, debe de cumplirse que para esta forma,  $I_{VV}/I_{VH}$  es mayor que para la especie no hibridada y por lo tanto  $I_{VV}^u/I_{VV}^h$  debe ser menor que  $I_{VH}^u/I_{VH}^h$ . Nuestros resultados indicados en la Tabla 18



proporcionan para estas relaciones los valores siguientes:

$$I_{VV}^u/I_{VV}^h = 2'56$$

$$I_{VH}^u/I_{VH}^h = 3'39$$

En adición, de la figura III.30 se obtiene  $A^u = 0'058$  y  $A^h = 0'11$ . Así, utilizando la ecuación (38), se puede calcular la contribución de los cambios en la anisotropía a la relación  $I_{VH}^u/I_{VH}^h$ , que resulta:

$$(1-0'058)/(1-0'11) = 0'942/0'890 = 1'06$$

según la ecuación (37) la contribución de los cambios en la anisotropía a la relación  $I_{VV}^u/I_{VV}^h$  es:

$$(1+2\cdot 0'058)/(1+2\cdot 0'11) = 1'16/1'22 = 0'95$$

Estos cálculos indican que la relación  $I_{VV}^u/I_{VV}^h$  debe de ser  $0'95/1'06 = 0'89$  veces menor que la relación  $I_{VH}^u/I_{VH}^h$ . Nuestros resultados experimentales, anteriormente expuestos, son:  $I_{VV}^u/I_{VV}^h = 2'56$  y  $I_{VH}^u/I_{VH}^h = 3'39$ , lo que proporciona una relación de  $2'56/3'39 = 0'76$ , que es concordante con las predicciones realizadas, dentro de un supuesto error del 15%.

Consideremos ahora el factor función suma. La relación  $S^u/S^h$  vendrá dada por la relación entre las intensidades al ángulo mágico,  $I_{V547}^u/I_{V547}^h$ . De acuerdo con la Tabla 18,  $S^u/S^h = 3'15$ . Si sustituimos en la ecuación (37) obtenemos que,  $I_{VV}^u/I_{VV}^h = 2'99$ . Como el resultado experimental, según la Tabla 18, es 2'56, la concordancia con la teoría vuelve a ser bastante aceptable. Si usamos la ecuación (38), se obtiene una concordancia aún mejor, ya que según esta ecuación la relación  $I_{VH}^u/I_{VH}^h$  tiene un valor de 3'34, mientras que los datos de la Tabla 18 proporcionan un valor de 3'39.

El empleo de las ecuaciones (37) y (38) con los tiempos de vida promedio, también proporciona los valores esperados para las relaciones  $I_{VH}^u/I_{VH}^h = 1'06(10'81/4'05) = 2'83$ , y  $I_{VV}^u/I_{VV}^h = 0'95(10'81/4'05) = 2'54$ . Ambos valores concuerdan de forma aceptable con los de la Tabla 18, que son 3'39 y 2'56, respectivamente.

Los cálculos realizados en los párrafos precedentes son indicativos de que los cambios en las intensidades de fluorescencia en estado estacionario, son debidos principalmente a las variaciones observadas en los tiempos de vida, por lo que el tiempo de correlación rotacional parece ser bastante insensible a la hibridación. Esto parece razonable



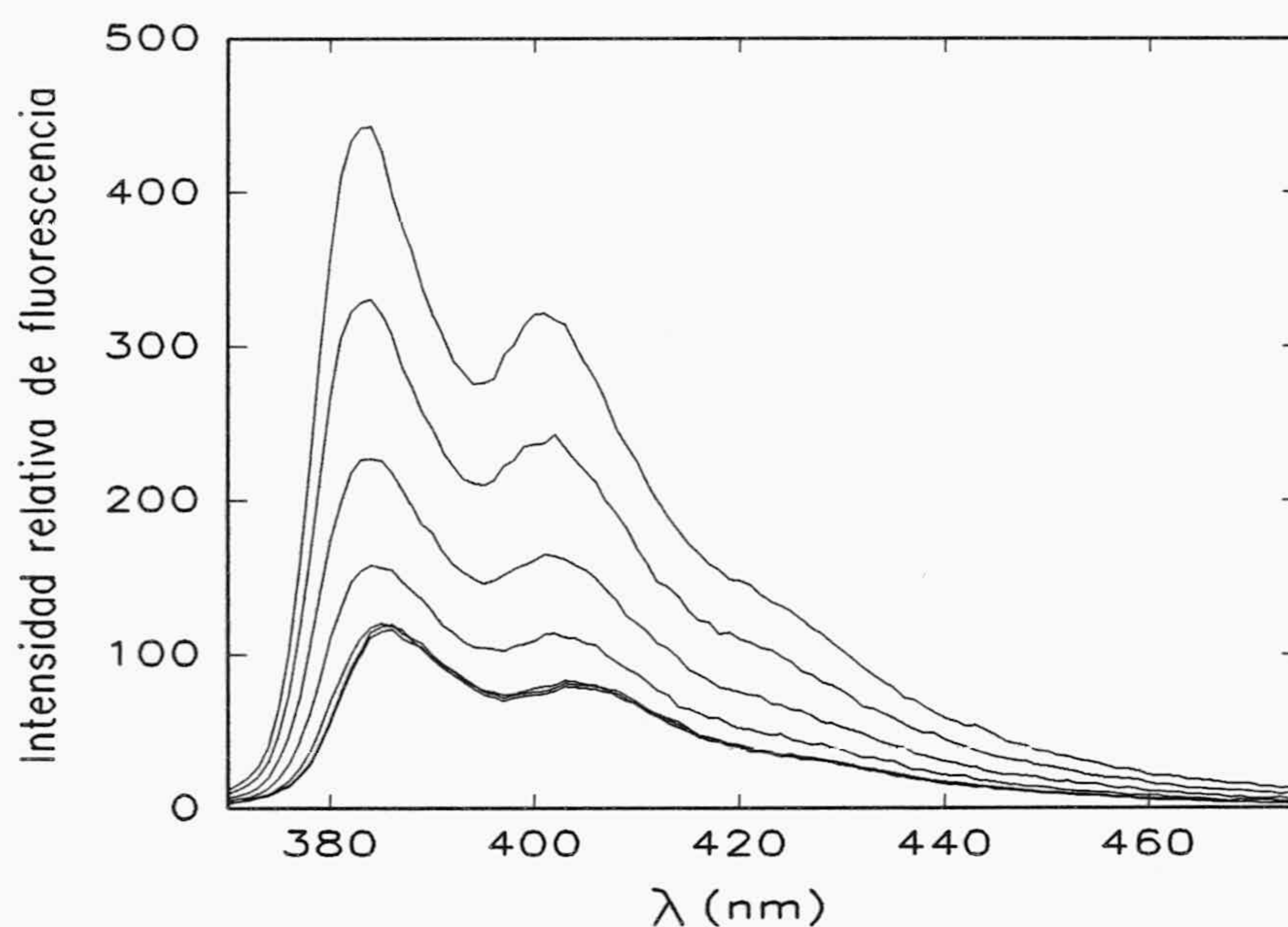
si se tiene en cuenta el bajo valor de anisotropía que presentan tanto las muestras sin hibridar como las hibridadas por completo (0'058 y 0'11 respectivamente) lo que, en una macromolécula grande como poli (C), significa que el enlace a la macroestructura es poco rígido y el fluoróforo goza de amplia movilidad rotacional.

Es de interés la separación de los efectos del aumento de la anisotropía y de la disminución del tiempo de vida promedio, que suceden tras la hibridación. Para ello, se deben de comparar los resultados de resolución temporal de la fluorescencia sin polarizadores y con ellos situados en las posiciones V-54'7°, es decir, el tiempo de vida promedio medido en el ángulo mágico y por tanto, en ausencia de influencias debidas a la rotación molecular. Los datos obtenidos en el epígrafe III.5.2, proporcionan una disminución del tiempo de vida promedio (sin intercalar polarizadores) de 8'63 ns, lo que significa un descenso del 67'45%, mientras que cuando se eliminan los efectos de la rotación molecular se obtiene una diferencia, entre la muestra sin hibridar y la muestra completamente hibridada, de 6'76 ns, lo que implica un descenso del 62'56% en el proceso de hibridación. Los anteriores resultados significan que la diferencia en la disminución del tiempo de vida promedio sin eliminar los efectos de la anisotropía y después de eliminados dichos efectos, resulta del 4'89%.

Por otra parte, el decrecimiento de la intensidad de fluorescencia en estado estacionario, obtenido sin intercalar polarizadores ha sido, aproximadamente, del  $70 \pm 5\%$ , según se ha indicado en el epígrafe III.4.4. Se debe ahora de medir, el descenso de la señal de fluorescencia en estado estacionario, una vez eliminados los efectos de la anisotropía. Con este fin, se han efectuado experimentos en estado estacionario en los que se han intercalado los polarizadores de excitación y emisión en las posiciones vertical y a 54'7° desde la posición vertical (ángulo mágico), respectivamente. Como es conocido, los polarizadores en estas posiciones eliminan el efecto de la rotación (anisotropía) en el tiempo de vida de fluorescencia y por lo tanto, en la intensidad medida en estado estacionario (Shinitzky y Yuli, 1982). Además, ya que en la futura aplicación del método analítico a la detección de ADN natural, las hibridaciones se suelen hacer en presencia de sustancias que aceleran la velocidad y disminuyen el valor de  $T_m$  (tales como formamida, TEACl y etanol), también se han usado medios iguales a los descritos en el epígrafe III.4.8.

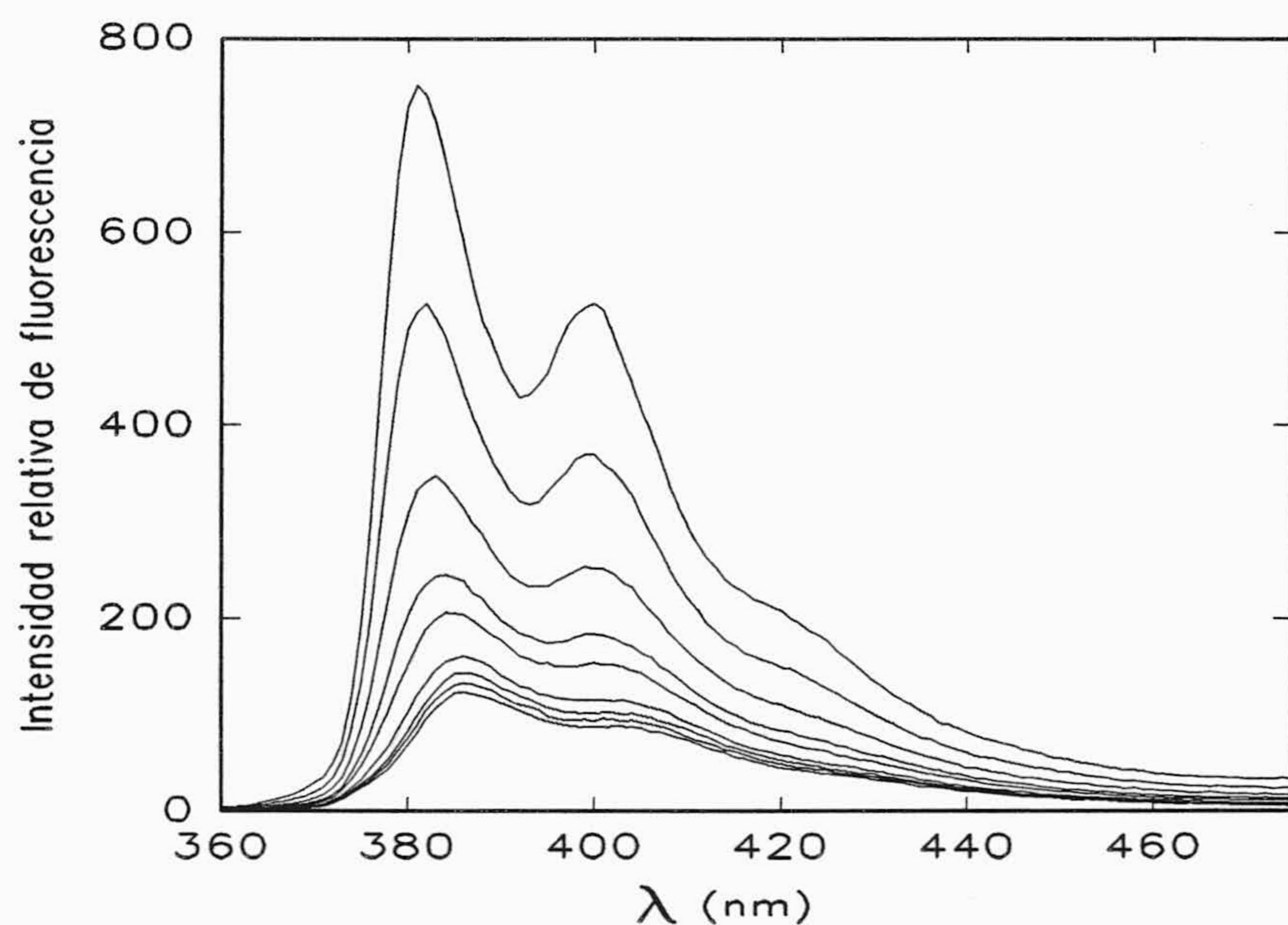


En las figuras III.61-III.64, se representan los espectros obtenidos en la valoración de muestras de pireno-poli (C) con poli (I), en tampón de hibridación, formamida al 50 % en tampón de hibridación, TEACl 2'4 M en tampón de hibridación y mezcla etanol/tampón de hibridación (20:80), respectivamente. Las disoluciones de pireno-poli (C) y de poli (I) empleadas en las valoraciones son de distintas concentraciones en cada experimento, por lo que éstas se indican en las correspondientes leyendas de cada figura. El porcentaje de marca del pireno-poli (C) fué en todos los casos del 2'2 %. Los espectros se representan sin la corrección por el efecto de dilución, por lo que para calcular el tanto por ciento de disminución de fluorescencia se ha elaborado la Tabla 19, en donde se indican las relaciones [poli (I)]/[pireno-poli (C)] y las correspondientes intensidades de fluorescencia a 383 nm normalizadas, en donde ambos valores figuran corregidos por el efecto de dilución.

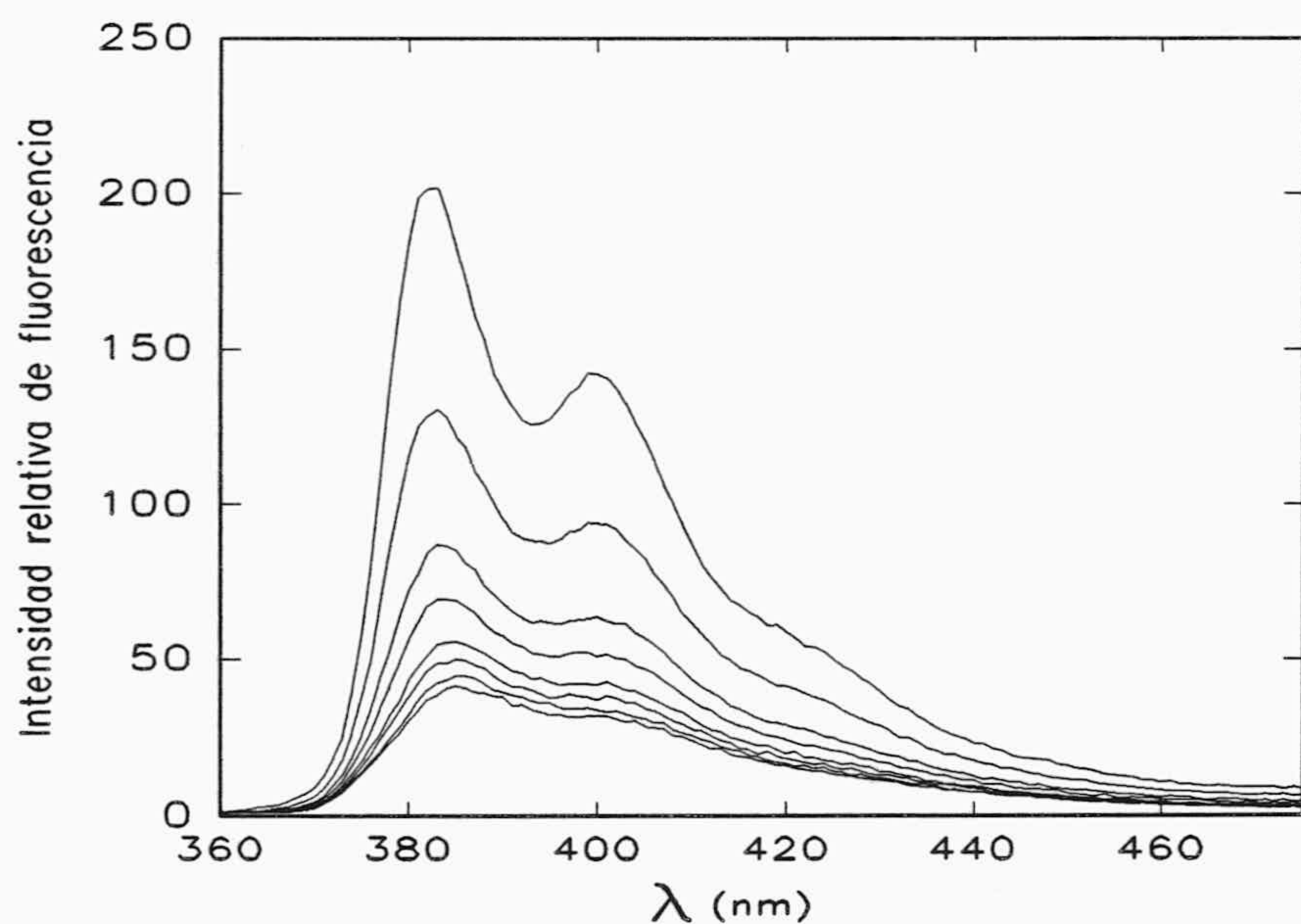


**Figura III.61.-** Espectros de emisión de fluorescencia ( $I_{V-547}$ ) entre 370 y 475 obtenidos tras la valoración de una disolución de pireno-poli(C)  $1'5 \cdot 10^{-4}$  M con poli(I)  $4 \cdot 10^{-4}$  M en tampón de hibridación.



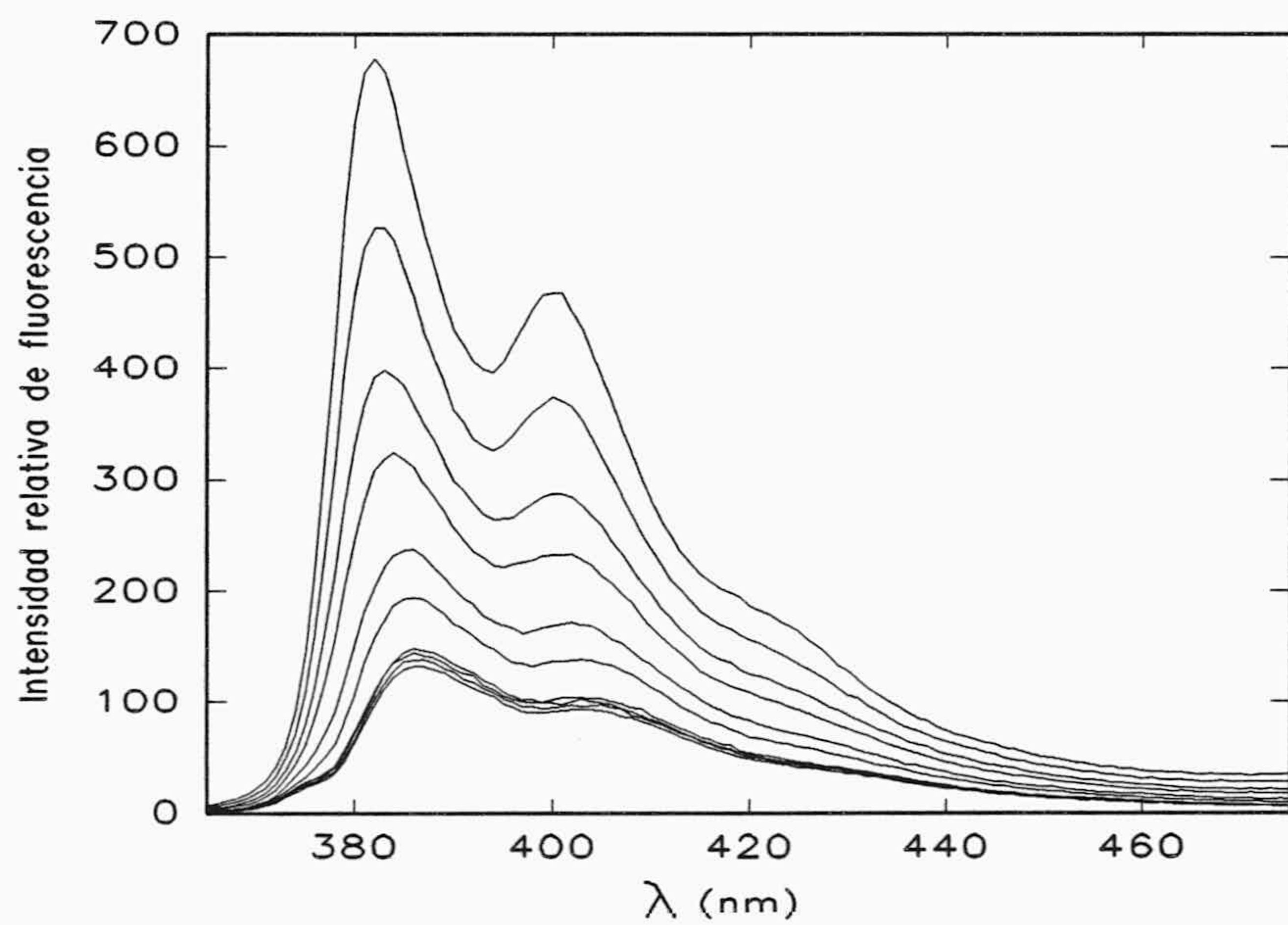


**Figura III.62.-** Espectros de emisión de fluorescencia ( $I_{V-547}$ ) entre 360 y 475 nm obtenidos tras la valoración de una disolución de pireno-poli(C)  $3'8 \cdot 10^{-4}$  M con poli(I)  $5'90 \cdot 10^{-4}$  M en presencia de TEACl.



**Figura III.63.-** Espectros de emisión de fluorescencia ( $I_{V-547}$ ) entre 360 y 475 nm obtenidos tras la valoración de una disolución de pireno-poli(C)  $5'00 \cdot 10^{-5}$  M con poli(I)  $1'56 \cdot 10^{-4}$  M en presencia de formamida.





**Figura III.64.-** Espectros de emisión de fluorescencia ( $I_{V-547}$ ) entre 360 y 475 nm obtenidos tras la valoración de una disolución de pireno-poli(C)  $10^{-4}$  M con poli(I)  $10^{-3}$  M en presencia de etanol.



Tabla III.19

Valores de las intensidades de fluorescencia normalizadas correspondientes a distintas relaciones de  $r = [\text{poli(I)}]/[\text{pireno-poli(C)}]$  y corregidos por el efecto de dilución.

Tampón de hibridación		Formamida 50% en tampón de hibridación		TEACl 2'4 M en tampón de hibridación		mezcla etanol/tampón de hibridación (20:80)	
r	I <sub>f</sub>	r	I <sub>f</sub>	r	I <sub>f</sub>	r	I <sub>f</sub>
0'00	100	0'00	100	0'00	100	0'00	100
0'20	79'00	0'20	71'70	0'16	83'32	0'16	86'41
0'40	57'36	0'40	52'22	0'33	58'44	0'31	70'55
0'60	41'17	0'60	45'94	0'50	43'74	0'47	60'12
0'80	31'57	0'80	38'36	0'66	36'22	0'62	42'45
1'00	31'14	1'00	37'30	0'83	27'06	0'78	34'87
1'20	31'14	1'20	34'69	0'99	23'72	0'94	28'22
		1'49	34'69	1'15	22'87	1'09	27'69
				1'32	22'87	1'25	26'22
						1'41	26'22

Los porcentajes de disminución en la señal fluorescente tras la completa hibridación, han sido del 68'9%, 65'3%, 77'1% y 73'8%. Dado que estas valoraciones se realizaron con las mismas muestras que las utilizadas en las experiencias descritas en los epígrafes III.4.4 y III.4.8, parece conveniente comparar los presentes resultados con los que se obtuvieron sin polarizadores en los citados epígrafes que, según se ha indicado, fueron del 75'8%, 67'8%, 79'7% y 75'8%, respectivamente. Las diferencias por tanto, entre los porcentajes de disminución de la señal de fluorescencia obtenidos con y sin polarizadores, oscilan entre el 2% y el 6'9%, estos valores están en buena concordancia con la diferencia del 4'9% obtenida en la experiencia con resolución temporal. Los resultados precedentes corroboran lo anteriormente indicado de que los cambios en las intensidades de fluorescencia en estado estacionario son debidos, principalmente, a las variaciones observadas en los tiempos de vida y que el tiempo de correlación rotacional parece ser bastante insensible a la hibridación.



### III. 6. 3. Interpretación cualitativa del mecanismo del *quenching* observado en la hibridación de pireno-poli (C) con poli (I).

Todos los resultados obtenidos hasta ahora son indicativos y concordantes con la idea de que los cambios en la eficiencia de fluorescencia y tiempo de vida, que muestra el pireno enlazado a poli (C) tras su hibridación con poli (I), se deben a variaciones en el ambiente que rodea a la etiqueta fluorescente. Esta aseveración se puede justificar mediante el siguiente razonamiento. El pireno es una molécula hidrofóbica cuyo tiempo de vida y eficiencia de fluorescencia aumenta con el decrecimiento de la polaridad del disolvente. De otra parte, poli (C) es una cadena flexible que presenta en disolución una estructura polimérica plegada al azar. Por lo que un modelo razonable de la estructura homopolimérica del poli (C) en disolución, sería suponer que las bases están conectadas por resortes elásticos que sufren torsiones oscilantes además de compresiones y extensiones (Bloomfield y col., 1974). Si ésto es así, se debe de esperar, en este modelo, que la molécula hidrofóbica de pireno enlazada a poli (C) (en la macroestructura que corresponde a poli (C) en disolución), esté preferencialmente localizada dentro del entramado hidrofóbico del poli (C). Si se tiene en cuenta que los datos de difracción de rayos X muestran que la doble cadena formada por poli (C)-poli (I) tiene una estructura de doble hélice similar al ADN, con cadenas antiparalelas formadas por pares de bases a unos 4 Å del eje helicoidal (Arnot y col., 1973); cuando poli (I) hibride con pireno-poli (C), la etiqueta fluorescente (pireno) debe de ser expulsada hacia el exterior de la estructura de la doble helice a causa del impedimento estérico, por lo que el ambiente hidrofílico de la disolución tamponada causará el decrecimiento del tiempo de vida y de la eficiencia de fluorescencia, a la vez que desplaza el espectro de fluorescencia hacia mayores longitudes de onda. En este sentido, los resultados que se obtuvieron con disoluciones metanol-agua y que se han descrito en el epígrafe III.4.6, son concordantes con la anterior suposición, ya que el microambiente que rodea al fluoróforo antes y después de la hibridación, provoca que los espectros obtenidos en ambas condiciones, se asemejen a los registrados en disoluciones de menor y mayor polaridad, respectivamente.

En este sentido, también se debe de tener en cuenta el pequeño decrecimiento en la señal de fluorescencia en estado estacionario y la baja diferencia entre los tiempos de vida, obtenidos en la hibridación de pireno-poli (C) con poli (I), cuando la sonda fluorescente se obtiene a partir de isotiocianato de pireno. Debido a la estructura química del fluoróforo, la sonda de pireno-poli (C) tiene un bajo tiempo de vida, el cual casi no se altera tras la



hibridación, ésto provoca una pequeña disminución en la eficiencia de la fluorescencia en estado estacionario.

Por otra parte, los resultados referidos en el epígrafe III.4.7 también apoyan el mecanismo de *quenching* propuesto. Recuérdese que, cuando se intercala un brazo espaciador entre el fluoróforo y los ácidos nucleicos la eficiencia de fluorescencia permanece casi inalterada con la hibridación, este resultado es consistente con la explicación dada con anterioridad sobre el posible mecanismo de *quenching*, ya que el alejamiento del fluoróforo respecto de las bases de los nucleótidos, dificulta que aquel se pueda introducir entre los plegamientos de la cadena nucleotídica y se sitúe en un microambiente hidrofóbico favorable para emitir con una eficiencia de fluorescencia relativamente alta que, posteriormente, disminuiría cuando, en la hibridación, fuese expulsado hacia un microambiente menos hidrofóbico.



### III.7. USO DEL *QUENCHING* DE FLUORESCENCIA PARA EL ESTUDIO CINÉTICO DE LA HIBRIDACIÓN DE POLI (C) CON POLI (I).

La formación de la doble cadena entre los polímeros complementarios poli (C) y poli (I) es una reacción bimolecular de segundo orden y la cinética de reasociación ha sido monitorizada por varios autores siguiendo el decrecimiento de la absorbancia a 260 nm que presenta una disolución de ADN, con el tiempo (Wetmur y Davidson, 1968; Marmur y Doty, 1961; Subirana y Doty, 1966; Thrower y Peacocke, 1966). Otros autores han empleado la técnica del hidroxapatito con objetivos similares (Britten y Kohne, 1968). Esta última técnica está basada en que el ADN de cadena simple y doble tienen diferentes afinidades por el hidroxapatito (Bernardi, 1965; Miyazawa y Thomas, 1965; Britten y Kohne, 1968) y la adsorción del ADN resulta controlada por la concentración del ión fosfato.

Ya que, según hemos demostrado, se puede detectar la reacción de hibridación midiendo los cambios en la intensidad de fluorescencia que suceden durante aquella y que mencionados cambios son proporcionales al porcentaje de híbridos formados, se pretende ahora proponer un método de estudio cinético en disolución homogénea, más sensible que el de la hipercromicidad y más sencillo en la práctica que el método heterogéneo del hidroxapatito.

Consideremos una reacción de hibridación que se inicia con la mezcla de cantidades iguales de pireno-poli (C) y de poli (I). Si denominamos  $C_0$  a la concentración inicial de pireno-poli (C), expresada en moles de bases nucleotídicas por litro, entonces la concentración  $C_t$  de pireno-poli (C) no hibridado (expresado también en bases) a un tiempo cualquiera después de realizar la mezcla, vendrá dada por la conocida expresión cinética de segundo orden:

$$C_t^{-1} = C_0^{-1} + k \cdot t \quad (39)$$

de donde, operando de forma conveniente queda:

$$\frac{C_t}{C_0} = \frac{1}{1 + C_0 \cdot k \cdot t} \quad (40)$$



siendo el tiempo requerido para el 50% de hibridación,  $t_{1/2} = 1/kC_0$ .

Si se sigue la cinética de reacción mediante la medida de la intensidad de fluorescencia del pireno-poli (C) frente al tiempo, se debe de esperar que la intensidad de fluorescencia  $I_t$  decrezca con el tiempo desde un valor inicial  $I_0$  hasta un valor final  $I_\infty$ , por lo que  $I_t/I_\infty$  será la relación entre las intensidades de fluorescencia que presentan el pireno-poli (C) libre y el que esté totalmente hibridado. Dado que los resultados obtenidos en los epígrafes anteriores demuestran que la intensidad de fluorescencia decrece linealmente con la fracción de bases de pireno-poli (C) apareadas, se puede escribir que la fracción de pireno-poli (C) no apareada es:

$$\frac{C_t}{C_0} = \frac{I_t - I_\infty}{I_0 - I_\infty} \quad (41)$$

por lo que las ecuaciones anteriores se pueden reescribir como:

$$\frac{C_t}{C_0} = \frac{I_t - I_\infty}{I_0 - I_\infty} = \frac{1}{1 + k \cdot C_0 \cdot t} \quad (42)$$

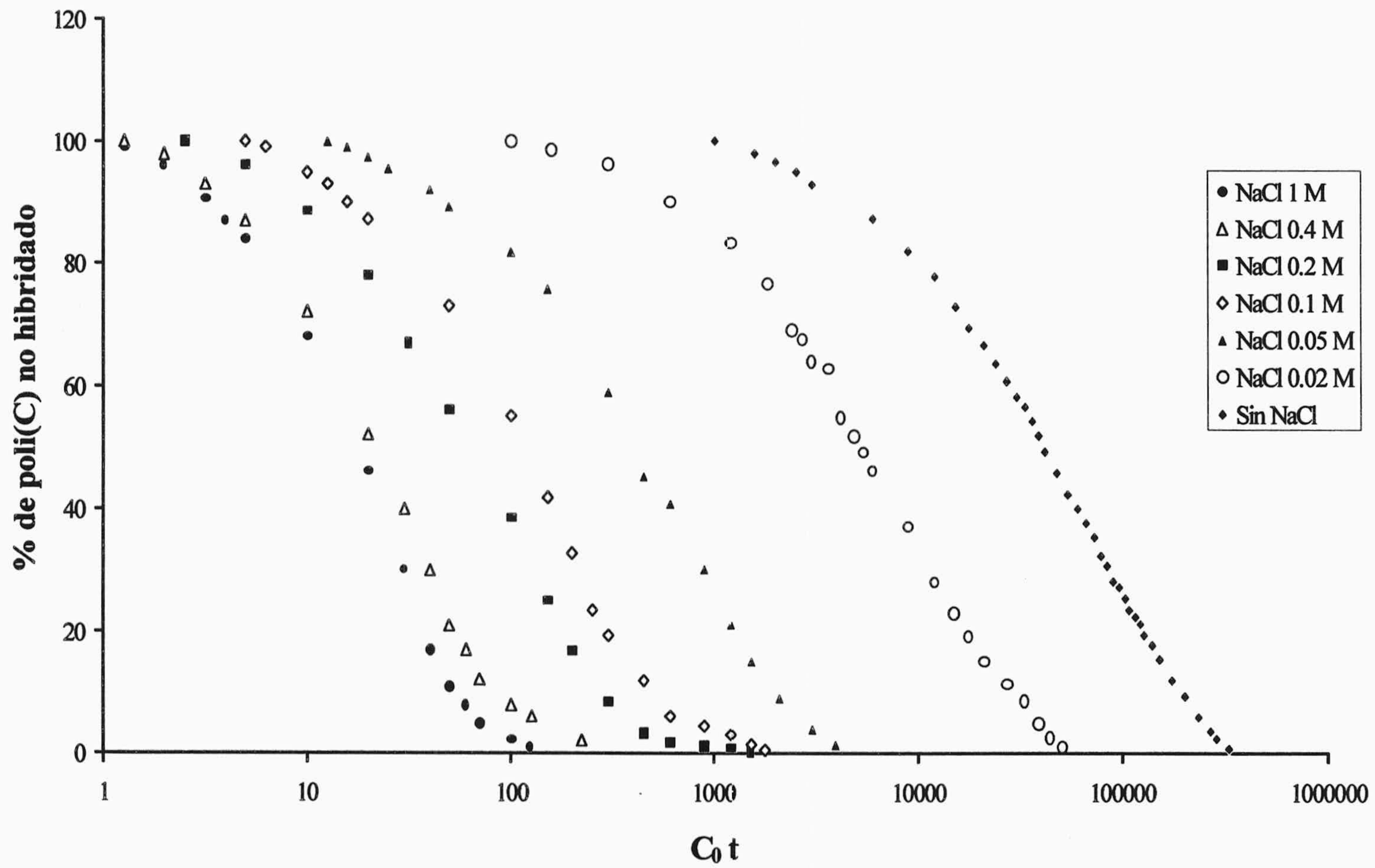
Como es conocido, la velocidad de hibridación aumenta rápidamente con el incremento de la concentración salina, debido al apantallamiento de las cargas negativas de las cadenas de poli (C) y poli (I), lo que hace decrecer la repulsión electrostática (Britten y col., 1974; Kohne y Kacian, 1992), por lo que las velocidades de reacción observadas a diferentes concentraciones salinas, pueden ser de muy distinto orden de magnitud.

Por este motivo, un método conveniente de representar los datos cinéticos de la hibridación de poli (C) con poli (I) a diferentes concentraciones salinas, es la representación semilogarítmica del porcentaje de poli (C) no hibridado vs  $C_0 \cdot t$ . La principal utilidad del método es que la representación resulta independiente de  $C_0$  y que permite la presentación de medidas de la hibridación sobre extensos períodos de tiempo y amplios intervalos de concentración (Britten y Kohne, 1968). Así, en una sola gráfica de ese tipo, se pueden comparar resultados cinéticos de reacciones llevadas a cabo con diferentes concentraciones iniciales, pudiéndose combinar los datos obtenidos para conseguir una visión completa del transcurso de la reacción, a diferentes condiciones experimentales, con el tiempo.



En la figura III-65 se han representado los datos cinéticos experimentales según el método anterior. Para ello, se han obtenido los valores de  $I_0$ ,  $I_t$  e  $I_\infty$ , de disoluciones de igual concentración de poli (C) y de poli (I) en tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y distintas concentraciones salinas en el intervalo 0-1 M, según la metodología descrita en el apartado II-3-7. Los valores experimentales de la intensidad de fluorescencia se han normalizado, los iniciales al valor 100 y los demás de forma correspondiente. Los resultados de esta operación para  $I_0$ ,  $I_t$  e  $I_\infty$  se indican en la Tabla 20. En ésta también se incluye el porcentaje de bases no hibridadas vs t, calculado multiplicando por 100 la relación  $C_t/C_0$ . Se debe destacar que, al objeto de obtener velocidades de reacción medibles experimentalmente con suficiente precisión, las concentraciones iniciales de los homopolinucleótidos complementarios (expresadas en bases) fueron iguales en cada una de las experiencias (simulando así una experiencia de reasociación de ADN), aunque las concentraciones absolutas fueron distintas para las diferentes concentraciones salinas utilizadas. Las gráficas de la figura III-65 tienen la forma bien conocida de las cinéticas de hibridación de segundo orden (Britten y Kohne, 1968) y  $t_{1/2}$  decrece con el incremento de la concentración salina tal y como se ha obtenido anteriormente por otros autores (Britten y Kohne, 1968; Britten y col., 1974). Adicionalmente, los valores absolutos de  $t_{1/2}$  obtenidos a las diferentes concentraciones salinas concuerdan con los valores obtenidos para la misma reacción de hibridación con otros métodos (Yguerabide y Ceballos, 1995).





**Figura III.65.-** Representación semilogarítmica de los datos cinéticos expresada en porcentaje de poli(C) no hibridado vs  $C_0t$ .



Tabla 20

Valores de las intensidades de fluorescencia normalizadas correspondientes a distintos porcentajes de poli (C) no hibridado, en disoluciones de distintas concentraciones salinas.

[NaCl]= 1 M		[NaCl]= 0'4 M		[NaCl]= 0'2 M	
$I_t$	$(C_t \cdot 100)/C_0$	$I_t$	$(C_t \cdot 100)/C_0$	$I_t$	$(C_t \cdot 100)/C_0$
100	100	100	100	100	100
88	96	82	98	92	96
75	91	69	93	87	88
58	87	61	87	72	78
45	84	52	72	58	67
35	68	49	52	49	56
30	46	47	40	44	38
28	30	44	30	38	25
25	17	41	21	35	17
23	11	40	17	34	8'0
23	8'0	37	12	34	3'0
23	5'0	36	8'0	33	2'0
23	2'0	36	6'0	33	1'0
21	1'0	36	2'0	33	1'0
21	0	36	0	33	0



Tabla 20 (continuación)

[NaCl]= 0'1 M		[NaCl]= 0'05 M		[NaCl]= 0'02 M	
$I_t$	$(C_t \cdot 100)/C_0$	$I_t$	$(C_t \cdot 100)/C_0$	$I_t$	$(C_t \cdot 100)/C_0$
100	100	100	100	100	100
90	99	92	99	98	99
80	95	87	98	94	96
66	93	82	96	89	90
56	90	70	92	86	83
49	87	60	89	80	77
42	73	56	82	78	69
39	55	48	76	75	68
29	34	42	59	73	64
28	23	37	45	71	62
27	22	37	41	69	55
26	19	33	30	68	52
25	12	33	21	67	49
25	6'0	32	15	61	46
25	5'0	30	9'0	55	37
25	3'0	29	4'0	51	28
25	2'0	28	2'0	48	23
25	1'0	27	0	46	19
25	0	26	0	44	15
		26	0	41	11
				40	9'0
				40	5'0
				38	3'0
				36	1'0
				31	0



Tabla 20 (continuación)

[NaCl] = 0 M			
$I_t$	$(C_t \cdot 100)/C_0$	$I_t$	$(C_t \cdot 100)/C_0$
100	100	58	38
96	98'0	57	35
92	97	55	32
89	95	55	31
86	93	54	28
83	87	52	27
81	82	52	25
79	78	51	24
77	73	50	22
75	69	49	21
74	67	47	19
73	64	45	18
71	61	44	15
70	58	42	12
69	57	40	9'0
66	54	39	6'0
64	49	38	3'0
63	46	38	2'0
61	42	38	0
60	40	38	0



El método gráfico convencional en la comprobación de datos cinéticos correspondientes a reacciones de segundo orden, es la representación de éstos según la ecuación (39). El posterior ajuste lineal por mínimos cuadrados permite el cálculo directo de la constante de velocidad con mayor precisión que las representaciones anteriormente discutidas. Para nuestros datos espectroscópicos correspondientes a la reacción de hibridación entre poli (C) y poli (I), la ecuación (39) se puede escribir, utilizando la ecuación (41), de una forma conveniente para su representación gráfica, como:

$$(I_t - I_\infty)^{-1} = (I_0 - I_\infty)^{-1} + \frac{C_0}{I_0 - I_\infty} \cdot k \cdot t \quad (43)$$

En las figuras III-66 a III-69 se muestran las representaciones gráficas de los resultados experimentales según la ecuación (43), a distintas concentraciones de NaCl en el intervalo 10-40 mM. Se ha escogido este intervalo de baja concentración salina porque la velocidad de hibridación de los homopolinucleótidos sintéticos utilizados en estas experiencias es, en general, muy alta y el incremento de la concentración salina aumenta mucho la mencionada velocidad, como se puede observar en la figura III-65. Ya que nuestro deseo es testear nuestro método fluorimétrico con la máxima precisión posible, se han elegido condiciones experimentales (concentraciones salinas) que hacen relativamente lenta la reacción, permitiendo la obtención de un alto número de datos, al objeto de que el posterior análisis de éstos proporcione parámetros de ajuste con baja desviación estándar. Debido a este alto número de datos experimentales recogidos (entre 500 y 1.000, según la velocidad de reacción), no se ha considerado oportuno tabularlos, por lo que las representaciones se han realizado mediante el paso directo de los datos fluorimétricos a una hoja de cálculo adecuada y el subsiguiente ajuste lineal por mínimos cuadrados.

En los pies de cada figura, se indican las condiciones experimentales empleadas en cada experiencia, así como los parámetros del ajuste. Como se puede observar, la buena linealidad obtenida junto al gran número de datos, nos ha proporcionado un excelente coeficiente de regresión y valores muy pequeños en las desviaciones estándar de los parámetros del ajuste.



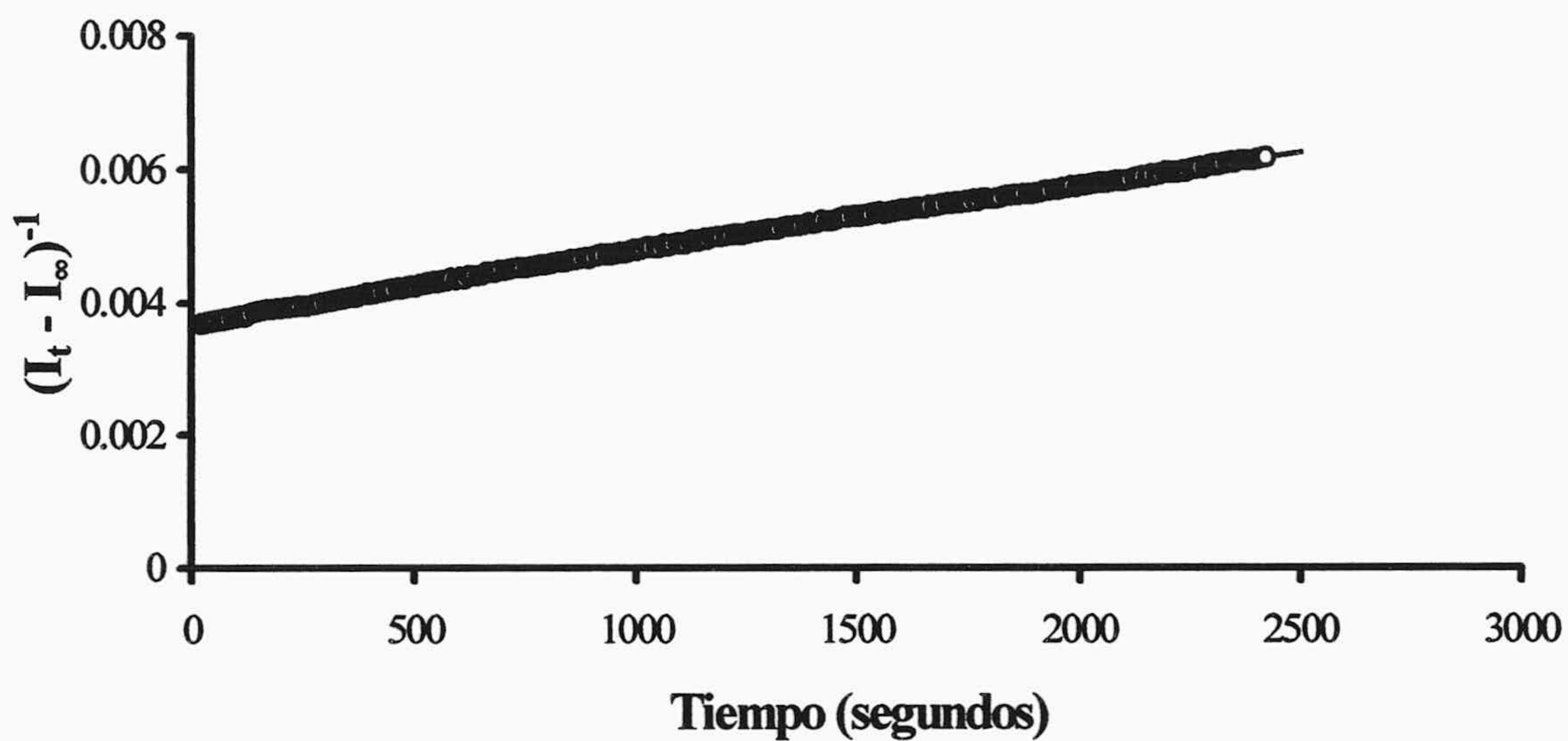


Figura III.66.- Representación gráfica de los datos cinéticos correspondientes a las condiciones:  $[\text{NaCl}] = 10 \text{ mM}$ ,  $[\text{pireno-poli(C)}] = [\text{poli(I)}] = 10^{-6} \text{ M}$ .

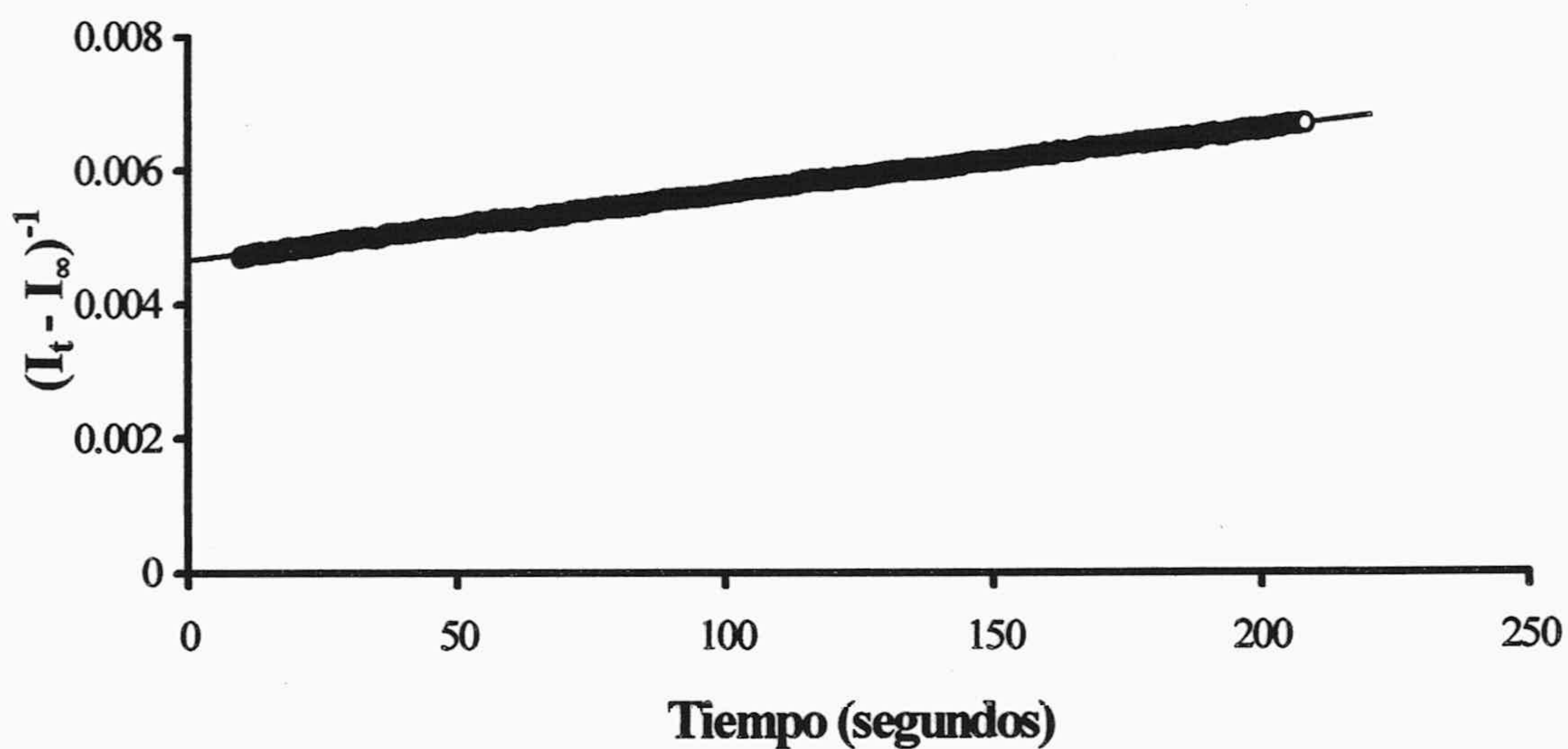


Figura III.67.- Representación gráfica de los datos cinéticos correspondientes a las condiciones:  $[\text{NaCl}] = 20 \text{ mM}$ ,  $[\text{pireno-poli(C)}] = [\text{poli(I)}] = 10^{-6} \text{ M}$ .



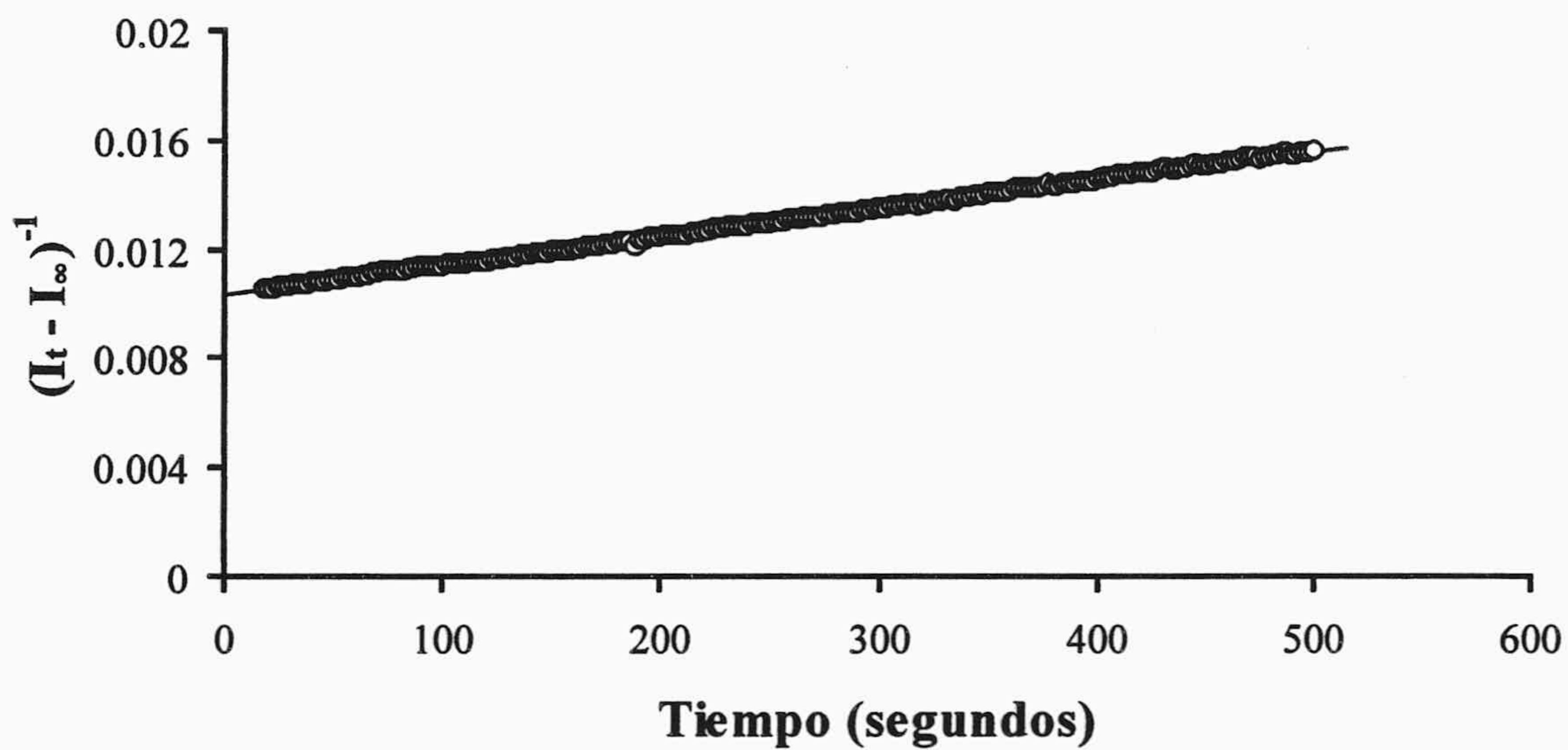


Figura III.68.- Representación gráfica de los datos cinéticos correspondientes a las condiciones:  $[\text{NaCl}] = 30 \text{ mM}$ ,  $[\text{pireno-poli(C)}] = [\text{poli(I)}] = 10^{-7} \text{ M}$ .

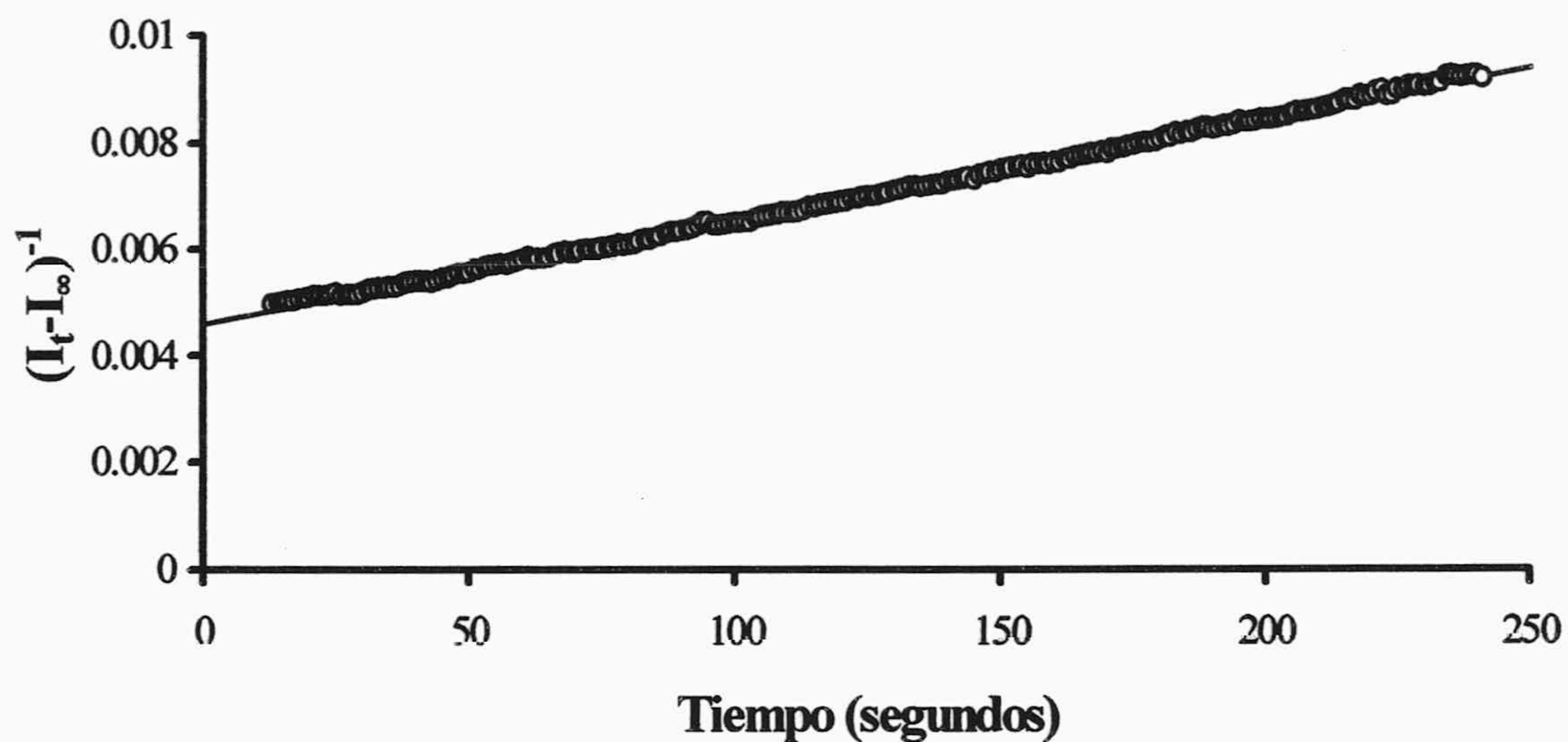


Figura III.69.- Representación de los datos cinéticos correspondientes a las condiciones:  $[\text{NaCl}] = 40 \text{ mM}$ ,  $[\text{pireno-poli(C)}] = [\text{poli(I)}] = 2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ .



Una vez comprobada la buena concordancia del modelo cinético con los datos experimentales, se han calculado los valores de la constante de la reacción bimolecular de hibridación, haciendo uso de los datos de concentración inicial en estas experiencias y de los parámetros del ajuste de la ecuación (43). Asimismo, también se han calculado los valores de la constante de la reacción bimolecular de hibridación, con la ecuación (42) y los resultados de la Tabla 20 y de la figura III.65. Todos estos valores se han incluido en la Tabla 21.

**Tabla 21**

Valores de la constante de velocidad bimolecular de hibridación entre poli (C) y poli (I) con disoluciones de distintas concentraciones salinas.

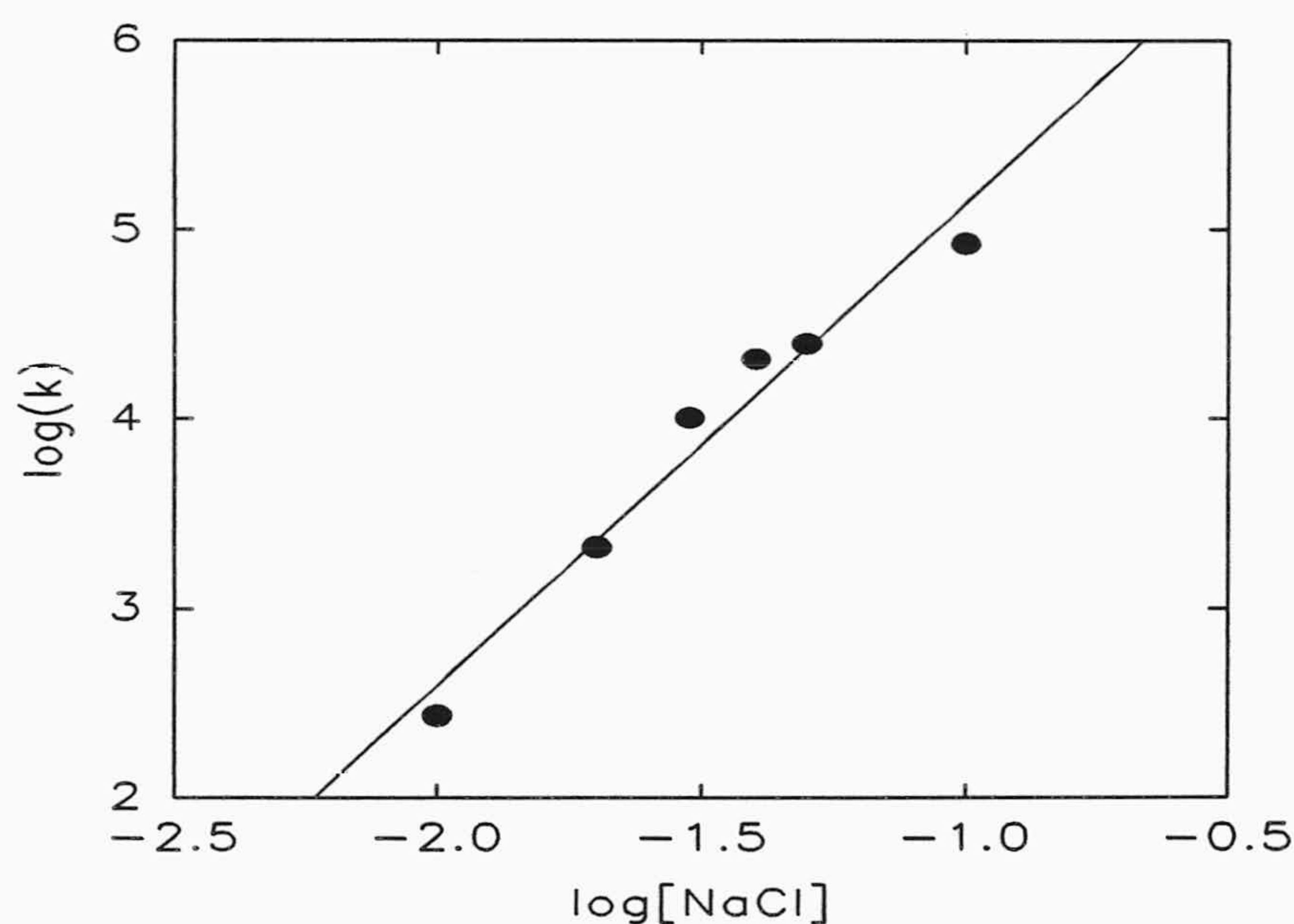
[NaCl] (M)	k (M·s) <sup>-1</sup>
0	246
0'01	271
0'02	2116
0'03	10128
0'04	20779
0'05	23981
0'10	84746
0'20	161290
0'40	472813
1'00	571428

La influencia de la fuerza iónica en la velocidad de la reacción entre cadenas complementarias de ácidos nucleicos ha sido estudiado por Marmur y Lane (1960), Britten y Kohne (1966), Wetmur y Davidson (1968) y otros. En general, se ha observado que por encima de 0'4 M de NaCl hay un cambio moderado en la velocidad con el aumento de la concentración salina, mientras que se obtiene un gran aumento de la velocidad con el



incremento de la concentración salina cuando ésta es menor de 0'4 M. Nuestros resultados sobre el efecto del aumento de la concentración salina, en la constante de velocidad de hibridación, son concordantes con la tendencia general descrita por estos autores.

Se han propuesto varios tipos de relaciones entre las constantes de velocidad y la fuerza iónica, aunque no hay ninguna que se cumpla de forma estricta. Por ejemplo, Nygaard y Hall (1964) indican que la velocidad de hibridación se incrementa de 5 a 6 veces, cuando se aumenta la fuerza iónica desde 0'2 hasta 1'5 M con NaCl. Otros autores han establecido que, a bajas concentraciones salinas (< 0'1 M), la velocidad aumenta entre 5 y 10 veces cuando se duplica la [NaCl]. Quizás la relación cuantitativa más explícita es la de Studier (1969), quién propuso que a [NaCl] < 0'2 M, la constante de velocidad es aproximadamente proporcional al cubo de la fuerza iónica. Al objeto de comprobar si los valores obtenidos con nuestra metodología, siguen la mencionada tendencia, en la figura III.70 se han representado los logaritmos de la constante de velocidad que se indican en la Tabla 21, frente al logaritmo de la concentración salina, para valores de ésta menores de 0'2. Se ha despreciado la contribución de la fuerza iónica del tampón, por ser ésta muy baja. El ajuste mediante regresión lineal es bastante aceptable ( $r^2 = 0'98$ ) y proporciona un valor de la pendiente de 2'6, lo que concuerda bastante bien con la relación de Studier.



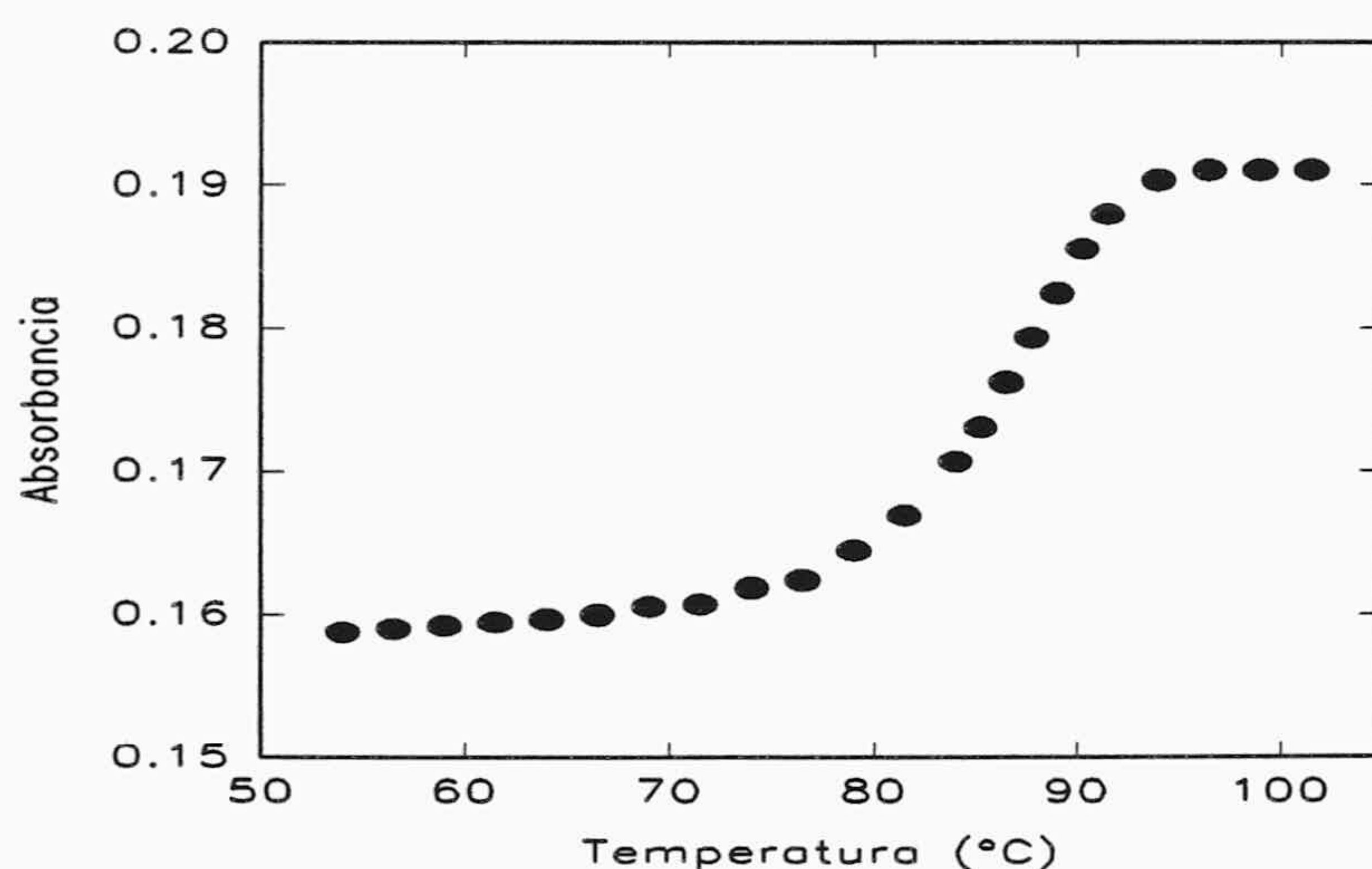
**Figura III.70.-** Representación gráfica del logaritmo de la constante de velocidad de reacción vs logaritmo de la concentración salina.



### III. 8. DETECCIÓN DE LA REASOCIACIÓN DE ADN DE *E. COLI* POR FLUORIMETRÍA EN ESTADO ESTACIONARIO.

Una vez establecida, con los homopolinucleótidos sintéticos, la utilidad de nuestra metodología para la detección fluorescente de la hibridación, se ha procedido a ensayarla con ácidos nucleicos naturales. En una primera serie de experiencias, se ha utilizado ADN procedente de *E. coli*, para determinar la estabilidad térmica de la doble cadena, cuando se introduce en los restos citosina, la etiqueta fluorescente.

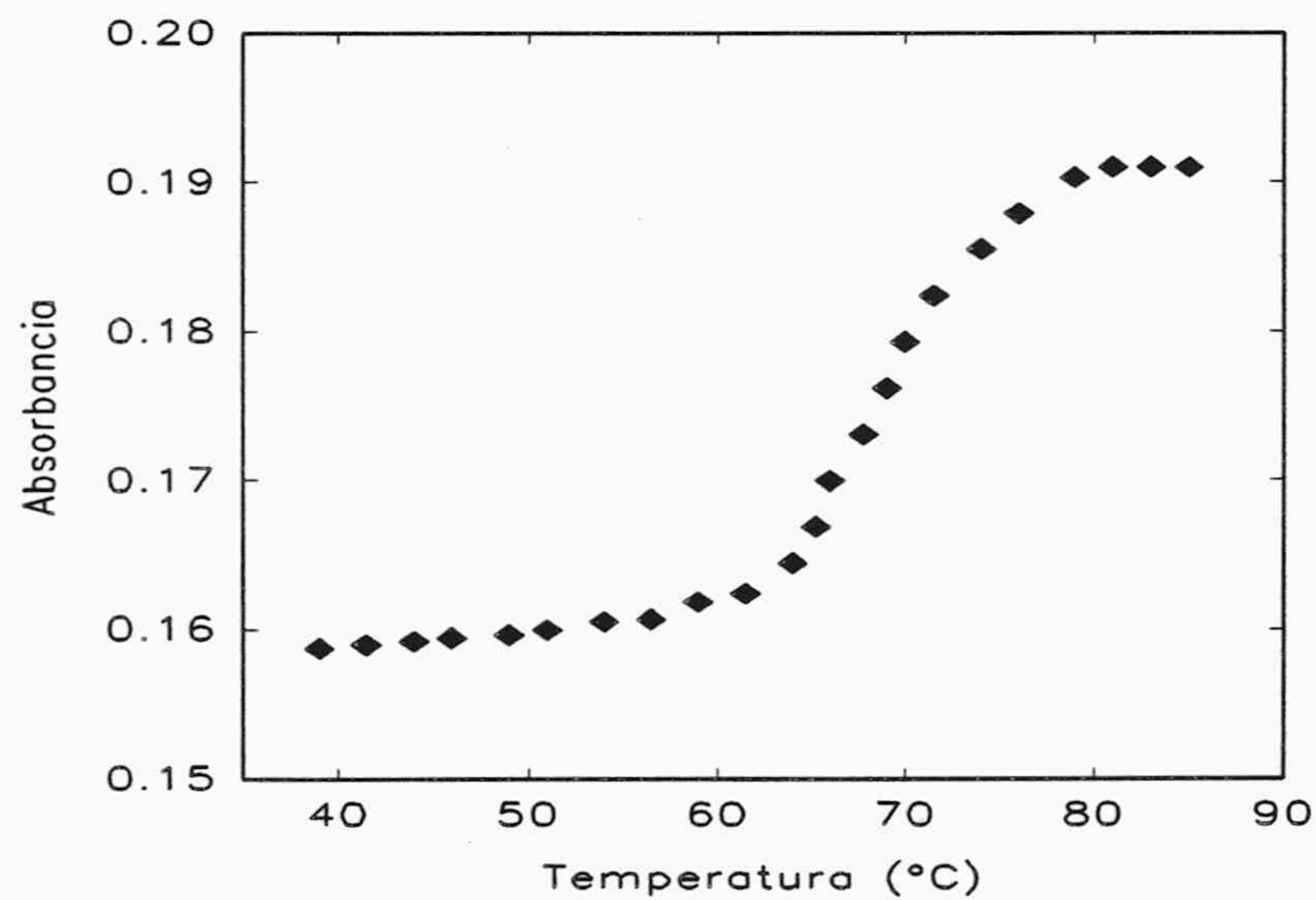
Así, con el ADN procedente de *E. coli*, después de sonicado, se introdujo en una placa de gel de agarosa junto con marcadores de ácidos nucleicos y tras la correspondiente electroforesis, se seleccionaron los fragmentos comprendidos entre 500 y 1.000 bases. Estos fragmentos se disolvieron en tampón de fosfatos 0'1 M, pH 7'5 y se llevaron a un espectrofotómetro con control externo de la temperatura. Se controló ésta a 25°C y se monitorizó la absorbancia continuamente a la longitud de onda de 260 nm. Seguidamente se procedió al calentamiento de la muestra en etapas de 2°C cada 5 min. La representación de las absorbancias frente a la temperatura se indica en la figura III-71. El mismo experimento se ha repetido tres veces, y a partir de los resultados obtenidos, se ha calculado la  $T_m$ , que ha resultado de  $87'8 \pm 1'3$  °C. Estos valores son concordantes con los ya conocidos para fragmentos de ADN de *E. coli* de tamaño similar (?).



**Figura III.71.-** Representación gráfica de la absorbancia vs temperatura de la hiperchromosidad del ADN de *E. coli*.



Melchior y von Hippel (1973), han mostrado que, en una disolución de ADN en tampón a pH 7.5 adicionado de cloruro de tetraetil amonio, TEACl, 2.4 M, las temperaturas de fusión de la doble cadena son independientes de la composición en bases nucleotídicas. Chang y col. (1974) han extendido estas investigaciones, encontrando que la velocidad de reasociación del ADN en TEACl 2.4 M, es mayor y la temperatura de máxima velocidad de reasociación es menor, si se compara con la obtenida en un tampón de las mismas características, adicionado de otras sustancias caotrópicas. Por lo tanto, las curvas de fusión en tal medio, facilita nuestros estudios sobre la variación de la señal fluorescente en la hibridación, haciendolos mas rápidos. Además, en nuestra investigación, la disminución de la temperatura de reasociación posee un enorme interés, ya que una menor temperatura de renaturalización, previene la posible hidrólisis de la etiqueta fluorescente. Por estas razones, se han realizado una serie de experiencias similares a la anteriormente descrita. Así, con los mismos fragmentos de ADN, se repitió la experiencia anterior otras tres veces, pero disolviendo el ADN en el tampón de fosfatos 0.1 M, pH 7.5, adicionado de TEACl hasta una concentración 2.4 M. El perfil absorbancia-temperatura obtenido en uno de los tres experimentos, se muestra en la figura III-72. Con los tres resultados obtenidos, se ha calculado el valor medio de  $T_m$ , que ha resultado de  $69.1 \pm 0.9$  °C.



**Figura III.72.-** Representación gráfica de la hiperromosidad a 260 nm del ADN de *E. coli* en presencia de TEACl (2.4 M).



Experiencias similares se han realizado con fragmentos de ADN del mismo tamaño, modificados por transaminación en la posición N<sup>4</sup> de los restos citosina. Los estudios se llevaron a cabo en tampón de fosfatos 0'1 M, pH 7'5, sólo y adicionado de TEACl 2'4 M. Los perfiles absorbancia-temperatura obtenidos, se muestran en las figuras III-73 y III-74. Siendo los valores medios de T<sub>m</sub>, 86'3 ± 1'7 °C y 69'1 ± 0'9 °C, respectivamente.

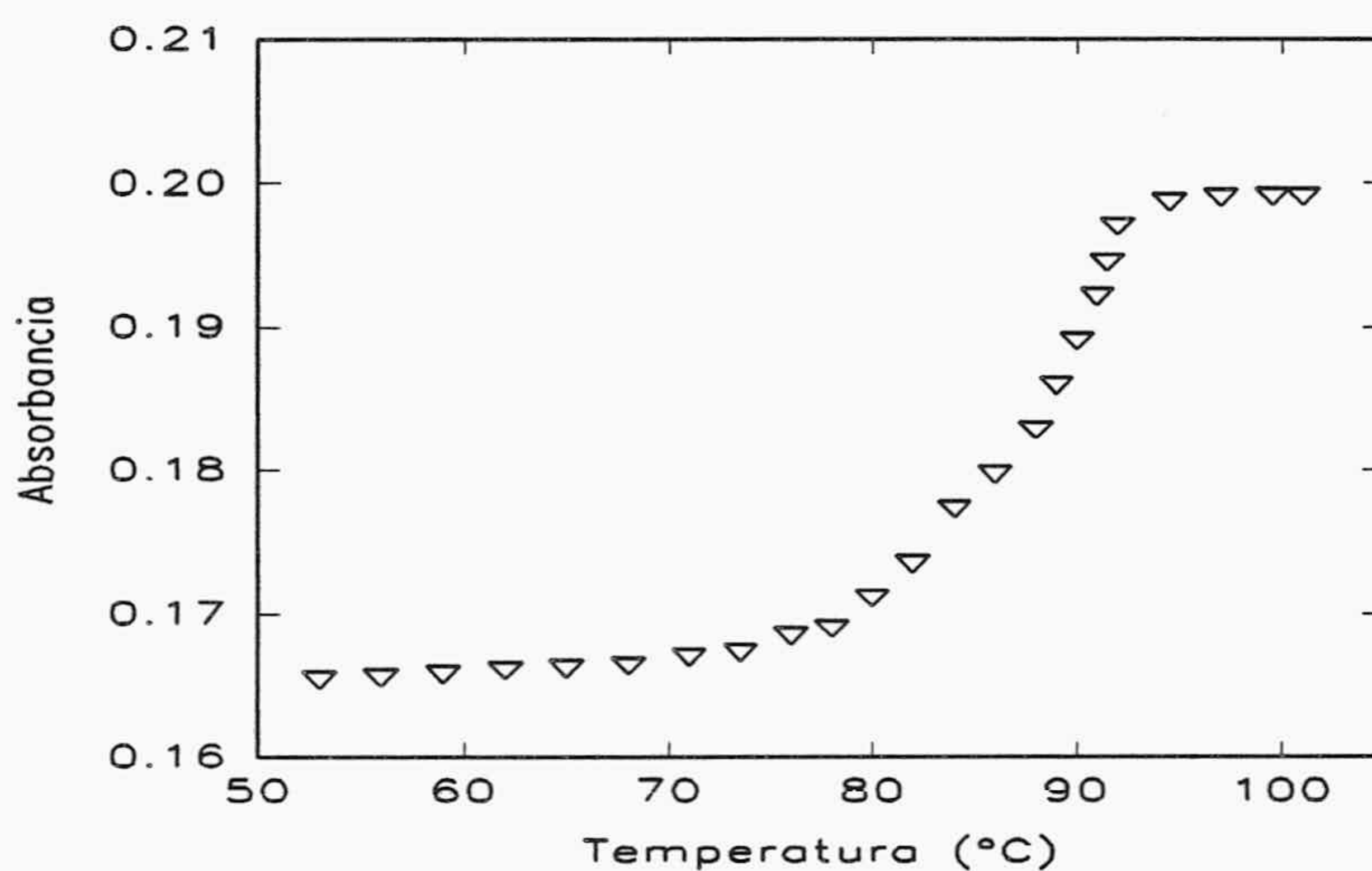


Figura III.73.- Representación gráfica de la hipercromosidad del ADN de *E.coli* modificado por transaminación.

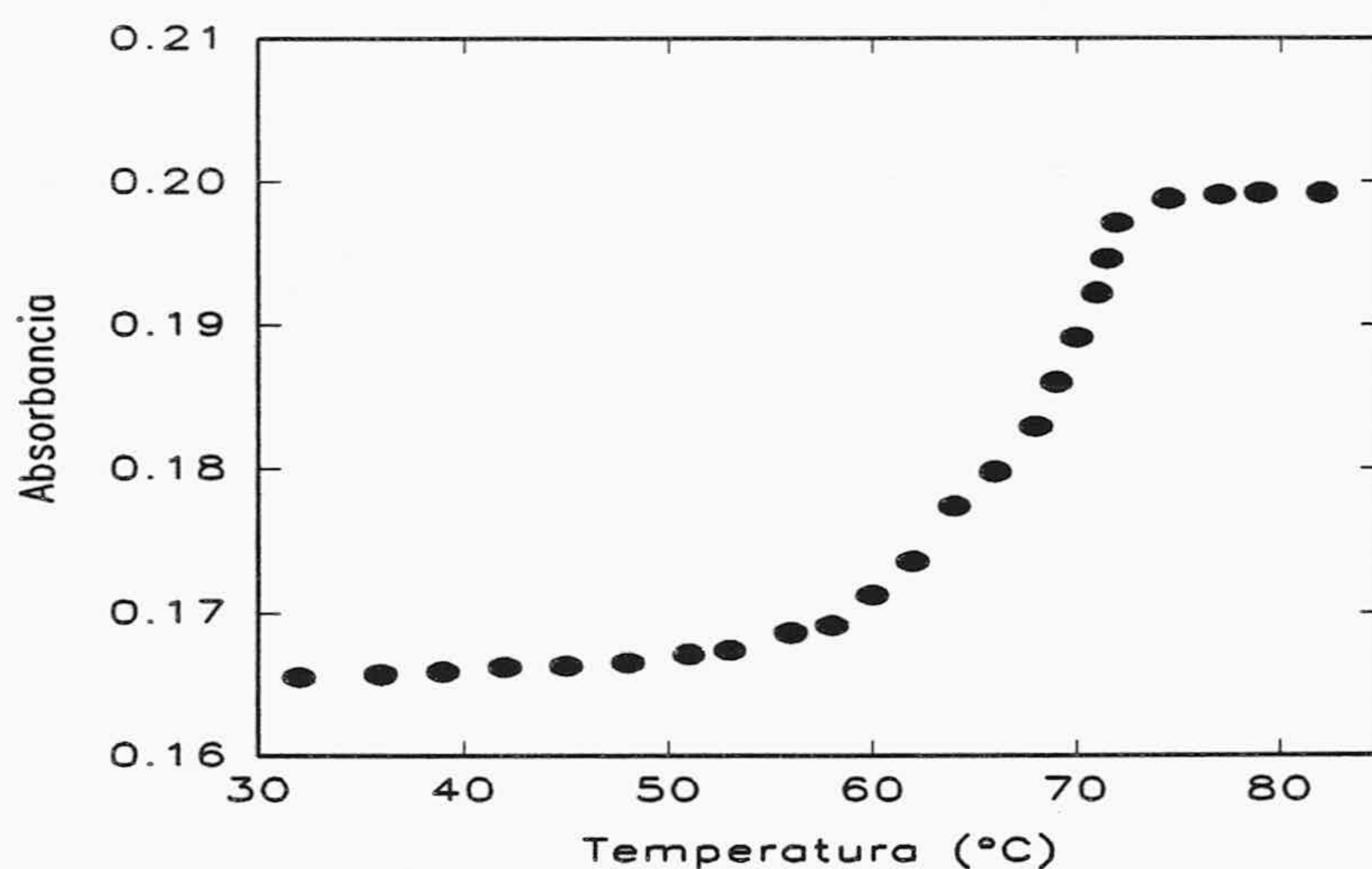
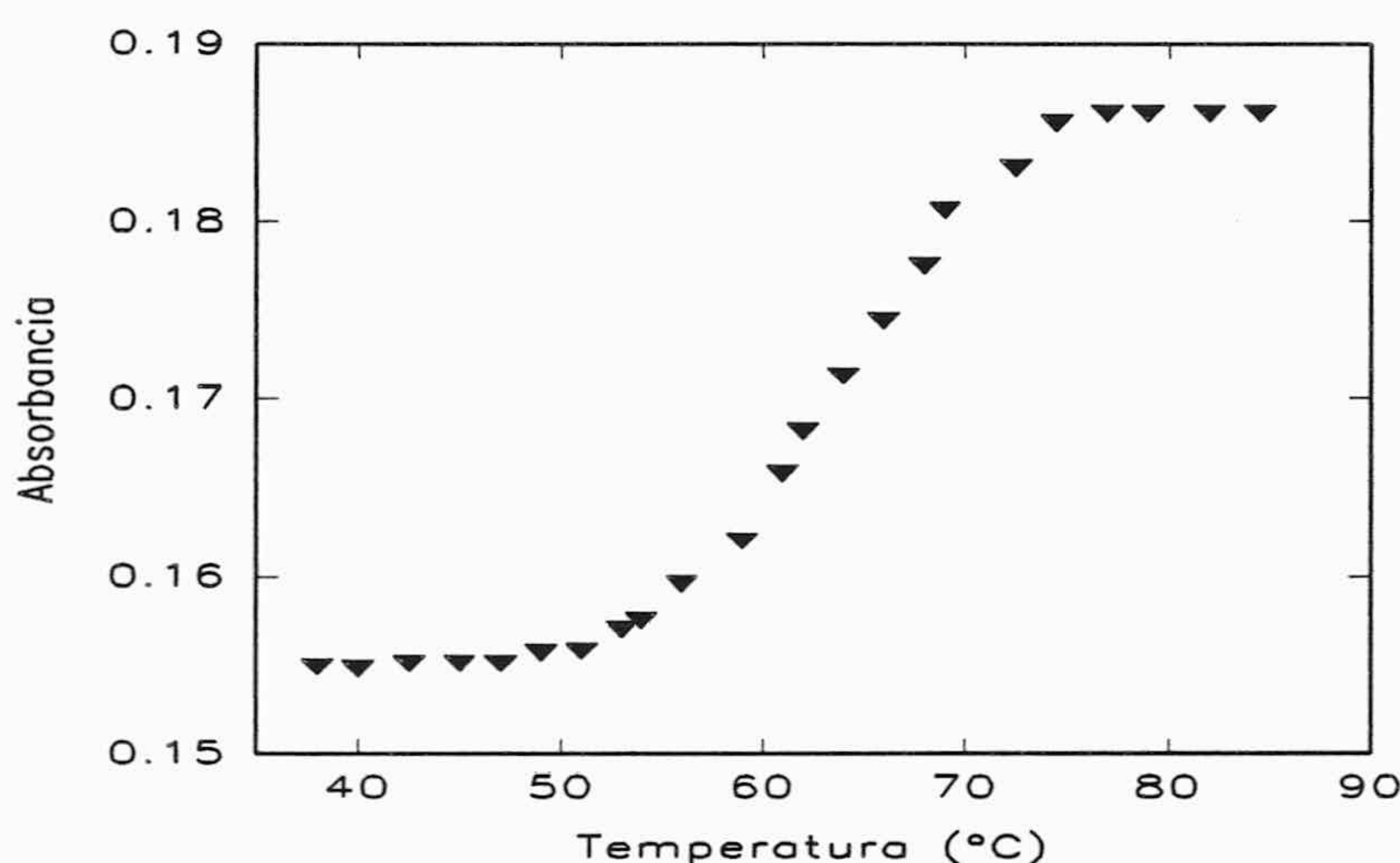


Figura III.74.- Representación gráfica de la hipercromosidad del ADN de *E.coli* modificado y en presencia de TEACl.



Como última etapa de esta serie de experiencias, se ha medido la hipercromicidad a 260 nm, de fragmentos de ADN procedentes del mismo lote y tamaño que los anteriores, etiquetados con fluoresceína en una extensión del 3'8%, disueltos en tampón de fosfatos 0'1 M, pH 7'5, TEACl 2'4 M. La representación absorbancia-temperatura de la figura III-75, junto a otras dos medidas mas, proporciona un valor de  $T_m = 64'7 \pm 1'8$  °C. Otras medidas de hipercromicidad, realizadas con fragmentos de ADN etiquetados en una extensión del 11% y 17%, dieron valores de  $T_m$  mucho menores, 57 °C y 53'5 °C, respectivamente.



**Figura III.75.-** Representación gráfica de la hipercromosidad del ADN de E.coli marcado con fluoresceína y en presencia de TEACl.

Los datos obtenidos indican con claridad que la transaminación con etilen diamina disminuye ligeramente la estabilidad térmica de la doble cadena y que, adicionalmente el subsiguiente etiquetado con fluoresceína, disminuye en alguna mayor extensión la estabilidad térmica. Sin embargo, cuando el etiquetado fluorescente no sobrepasa el 4%, la disminución en la estabilidad térmica es insignificante, por lo que se puede concluir que nuestro esquema de derivatización y etiquetado proporciona sondas fluorescentes de ADN con aceptables características de hibridación.

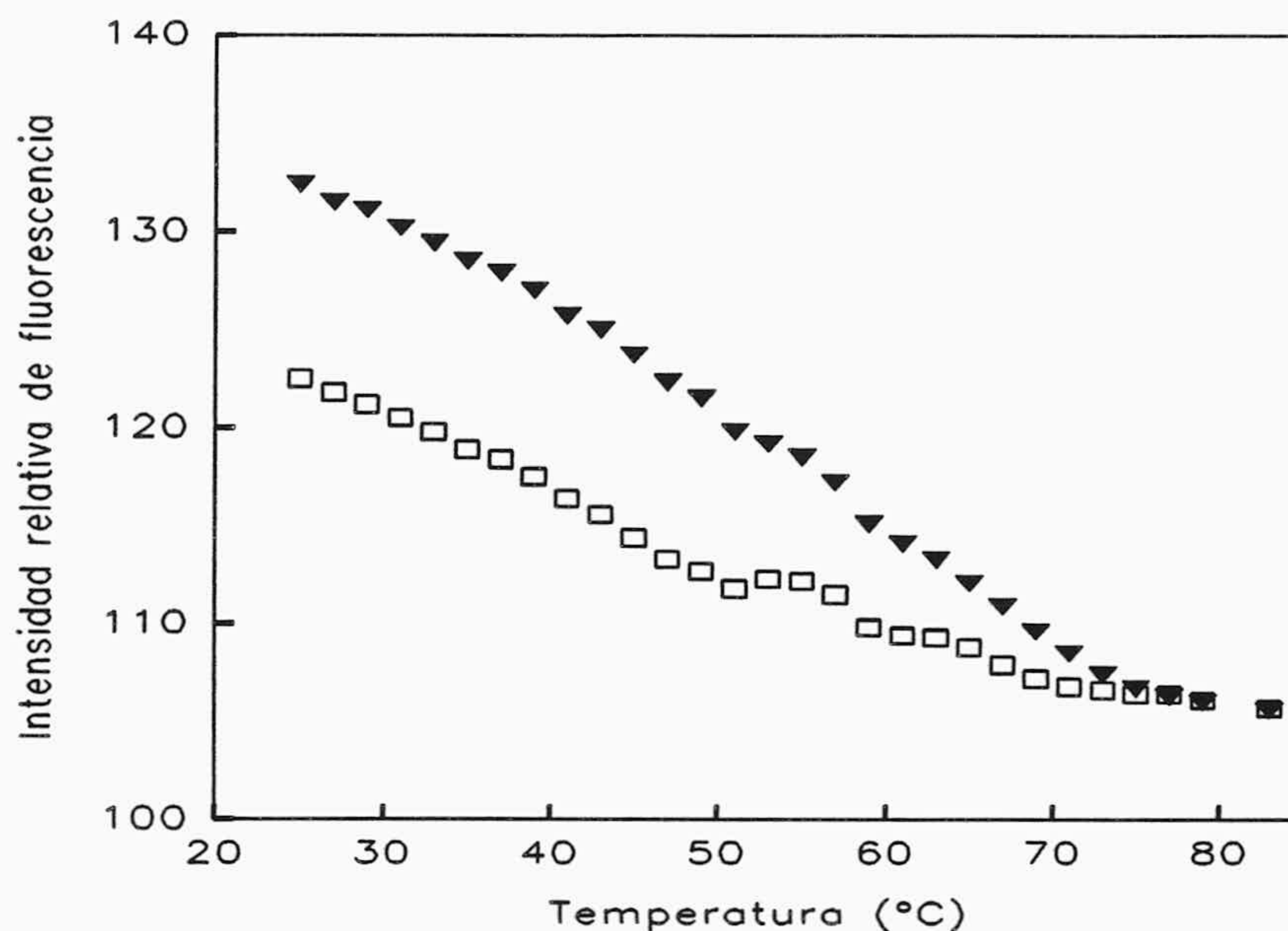
Una vez demostrada la aceptable estabilidad térmica del ADN etiquetado con fluoresceína, se ha tratado de seguir ésta, mediante la disminución de la señal fluorescente en estado estacionario. Como una cuestión previa de importancia, se necesita conocer el



efecto de la temperatura en la intensidad de fluorescencia de la fluoresceína libre y del conjugado fluoresceína-ADN, disueltos en el mismo tampón en que se van a efectuar las medidas fluorimétricas. El experimento con fluoresceína libre se llevó a cabo en tampón de fosfatos 0'1 M, pH 7'5. Para ello se calentó una disolución  $5 \cdot 10^{-6}$  M de fluoresceína, situada en el porta muestras termostatzado del fluorímetro, con incrementos de temperatura de 2°C cada 5 min. y se recorrió su espectro de emisión entre 500 y 580 nm, con excitación a 480 nm. Los espectros obtenidos revelan que la intensidad de fluorescencia decrece con el aumento de la temperatura, produciéndose un adicional desplazamiento del máximo de emisión hacia el rojo, lo que motiva la presencia de un punto isoemisivo a 520 nm. En concreto, el aumento de temperatura hasta 60 °C provoca una disminución del 10% de la intensidad de fluorescencia. Estos resultados pueden explicarse mediante el conocido coeficiente de temperatura negativo que presenta el tampón de fosfatos, que implica una disminución del pH con el aumento de la temperatura. Ésto, a su vez provoca una mayor cantidad fraccional de monoanión de fluoresceína que, como ya se ha comentado, fluoresce con menor intensidad que el dianión (Martin y Lindqvist, 1975), que es la forma predominante al pH inicial del tampón, 7'5 a 20 °C. Un efecto similar se ha observado cuando fluoresceína-ADN se sometió al mismo calentamiento que la fluoresceína libre. Para ello se calentó, en las mismas condiciones experimentales que anteriormente, una disolución del conjugado en tampón de fosfatos 0'1 M, TEACl 2'4 M, pH 7'5. Los resultados son similares a los obtenidos con fluoresceína, aunque no se manifiesta ningún punto isoemisivo.

Ya que la intensidad de fluorescencia del conjugado fluoresceína-ADN depende de la temperatura, para poner de manifiesto fluorimetricamente la desnaturalización térmica del ADN etiquetado, es necesario comparar las intensidades de fluorescencia que presentan ambas cadenas de ADN, la sencilla y la doble. La experiencia se realizó con dos alícuotas de ds-ADN-fluoresceína, con el 3'8% de marca y una concentración de  $3 \cdot 10^{-8}$  M, disueltas en tampón de fosfatos 0'1 M, TEACl 2'4 M, pH 7'5. Una de ellas se calentó a 80°C durante 5 min. e inmediatamente se enfrió en hielo, al objeto de obtener ss-ADN-fluoresceína. Seguidamente, las dos alícuotas se calentaron tal como se ha descrito en el apartado II. 2. 11 y se registraron sus señales de fluorescencia a 515 nm. En la figura III-76 se muestran las intensidades de fluorescencia obtenidas con las dos muestras vs temperatura. El experimento se repitió 2 veces mas y se calcularon los valores medios.





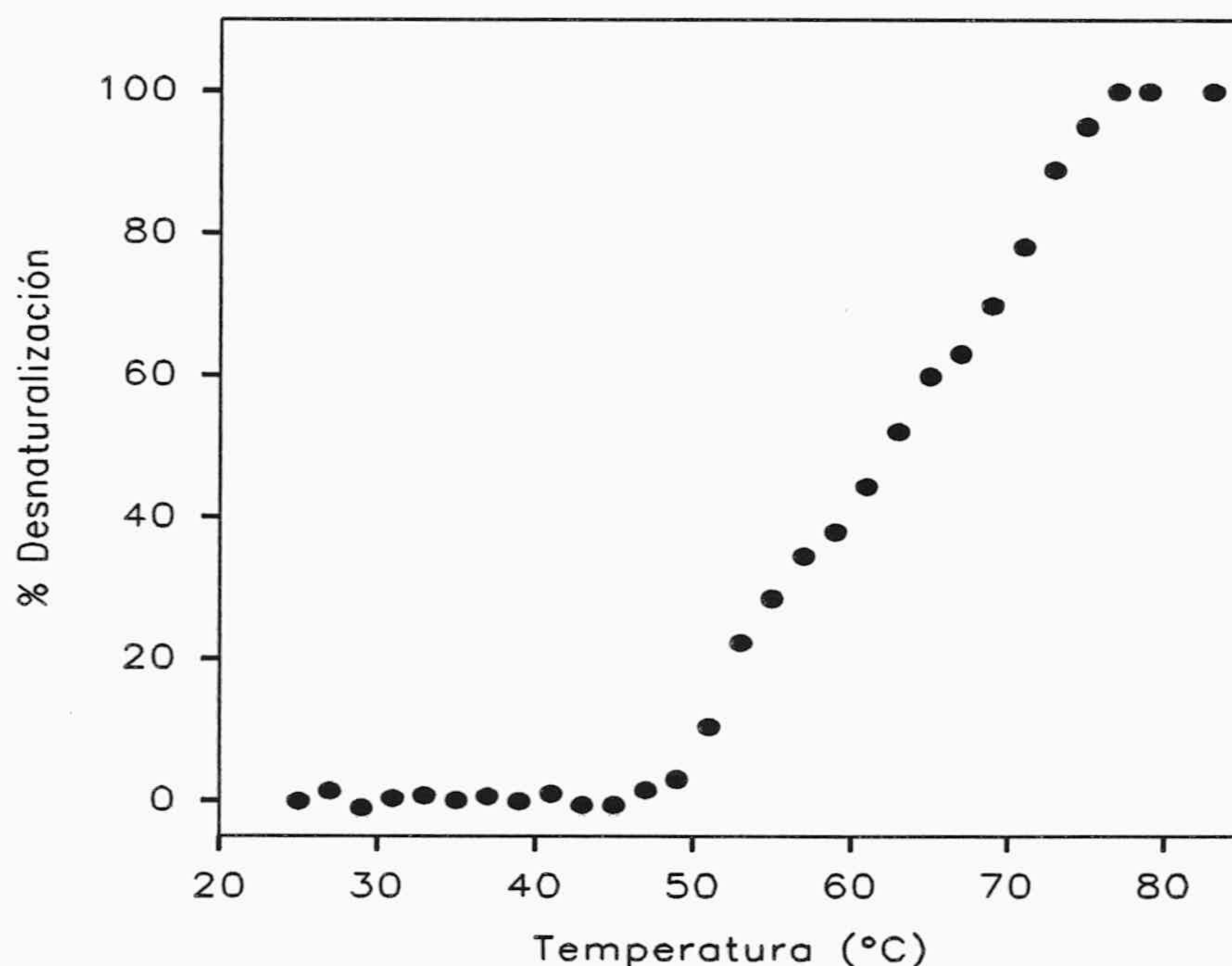
**Figura III.76.-** Intensidades de fluorescencia de: (▼) ss-ADN-fluoresceína y (□) ds-ADN-fluoresceína en tampón fosfatos 0'1 M, TEACl 2'4 M, pH=7'5 a distintas temperaturas.

Para obtener el perfil de fusión se ha supuesto que el incremento en la intensidad de fluorescencia tras la desnaturalización térmica de la doble cadena, es proporcional a la cantidad de ds-ADN-fluoresceína desnaturalizada. Por otra parte, los valores de intensidad de fluorescencia de la muestra a las diferentes temperaturas,  $I_T$ , deben de multiplicarse por un factor de corrección debido al decrecimiento del rendimiento cuántico de fluorescencia con el aumento de la temperatura. Este factor es igual a la relación:  $I_{25}^S/I_T^S$ , en donde  $I_{25}^S$  e  $I_T^S$  son las intensidades de fluorescencia de la cadena simple a 25°C y a la temperatura T, respectivamente, ya que en la cadena sencilla la única variación posible en la señal fluorescente se supone que estará motivada por la variación de la temperatura. Con estas dos suposiciones, el porcentaje de doble cadena desnaturalizada vendrá dado por la siguiente expresión:

$$\% \text{ desnaturalizado} = \frac{I_T \frac{I_{25}^S}{I_T^S} - I_{25}^D}{I_{25}^S - I_{25}^D} 100 \quad (44)$$



donde  $I^S$ ,  $I^D$  e  $I$  son las intensidades de fluorescencia de ss-DNA, ds-DNA y de las muestras con ss-DNA y ds-DNA. Los subíndices se refieren a la temperatura. Con los datos calculados mediante la ecuación anterior, se ha representado el % de ADN desnaturalizado frente a la temperatura, en la figura III-77. El valor de  $T_m$  obtenido mediante tal representación ha sido  $62'4 \pm 1'4$  °C que, como se puede observar no presenta diferencias significativas con el que se obtuvo por medidas de hipercromicidad,  $64'7 \pm 1'8$  °C. Así, el método fluorimétrico ensayado por nosotros, proporciona resultados similares a los obtenidos por hipercromicidad. Ambas técnicas tienen las ventajas de los análisis homogéneos, aunque nuestro método tiene la ventaja adicional de que se puede detectar con menor cantidad de muestra, en concreto con una concentración cuatro órdenes de magnitud menor que por medidas de absorbancia.



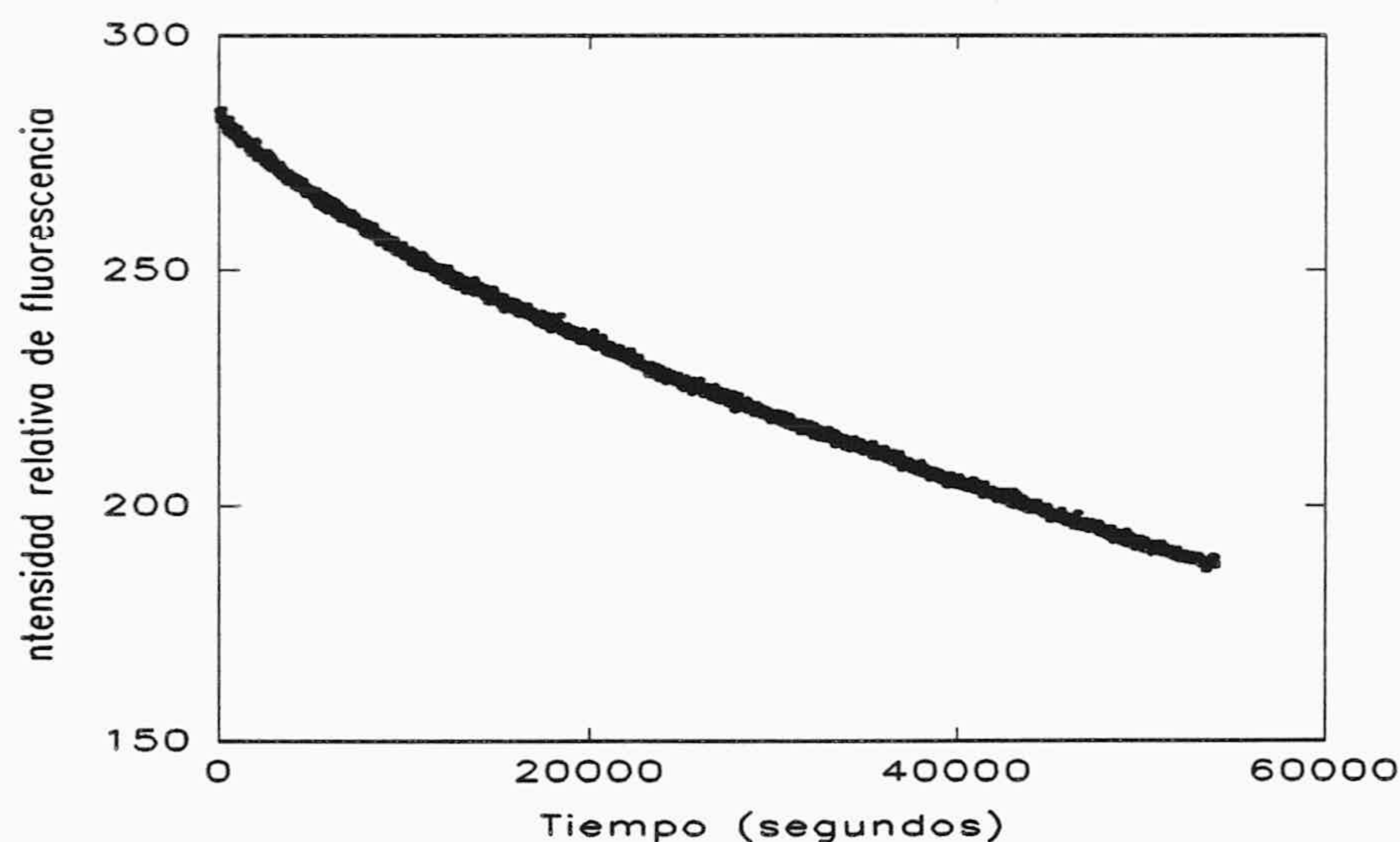
**Figura III.77.-** Representación gráfica del porcentaje de desnaturalización de ADN vs la temperatura.

Para finalizar esta serie de estudios, que tratan de demostrar la validez del análisis fluorimétrico propuesto por nosotros, en la detección de la reasociación de ácidos nucleicos, hemos realizado un experimento que trata de establecer la utilidad del método en un estudio cinético de reasociación. Así mismo, se pretende comprobar si las



características cinéticas de renaturalización son similares a las de fragmentos de ADN de *E. coli* sin modificar ni etiquetar y realizar una comparación de las velocidades de reasociación en ambos casos.

Sin embargo, la adición de TEACl 2'4 M al medio de reacción, aunque ya se ha discutido que resulta beneficioso en ciertos aspectos, proporciona una fuerza iónica demasiado alta, que puede resultar perjudicial en un experimento bioquímico. Por esta razón hemos considerado conveniente utilizar otros medios, de menor fuerza iónica, que también aceleren la velocidad de reasociación, minimicen la hibridación no específica y disminuyan la  $T_m$  en una cuantía similar al TEACl 2'4 M. Las gentiles indicaciones del Dr. David E. Kohne, nos han permitido encontrar un medio que *a priori* nos ha parecido muy apropiado para tales estudios. Así, hemos empleado una mezcla constituida por tampón Tris-HCl 10mM, AEDT 1mM, NaCl 0'4 M, pH 7'5/etanol (80/20 v/v). El ds-ADN-fluoresceína (3'8%) se disolvió en la mezcla anterior a concentración  $7'5 \cdot 10^{-5}$  M (expresada en bases) y se calentó hasta 80 °C durante 5 min., para asegurar la total desnaturalización. Inmediatamente después se situó en el porta muestras del fluorímetro termostatzado a 45°C que es la temperatura óptima de reasociación ( $T_m - 25^\circ\text{C}$ ), con agitación suave, registrandose la señal de emisión a 515 nm, con excitación a 480 nm. Las tomas de lectura se efectuaron cada 15 min. Los resultados experimentales obtenidos se indican en la figura III-78.



**Figura III.78.-** Gráfica de la cinética de reasociación de ADN de *E. coli* marcado con fluoresceína expresada en intensidad de fluorescencia vs el tiempo.



Ya que la reacción de reasociación es aproximadamente de segundo orden en términos de concentración de ADN, hemos ensayado la ecuación cinética de tal orden, en el caso de que las concentraciones iniciales de reactivos sean iguales, es decir cuando la concentración inicial de ambas cadenas sencillas es la misma, siguiendo la teoría desarrollada por Wetmur y Davidson (1968). Denominemos por  $I_{\infty}$  e  $I_0$  a las intensidades de fluorescencia a 515 nm del ADN renaturalizado y completamente desnaturalizado a 25°C por debajo de la  $T_m$ , respectivamente. Denominemos también por  $[ADN]_T$  a la concentración total de ADN reasociado, lo que implica que  $[ADN]_T = q \cdot I_{\infty}$ . Si denominamos por  $I$  a la intensidad de fluorescencia cuando  $[ADN]$  es la concentración de bases desnaturalizadas en disolución, a un tiempo genérico  $t$ , se puede escribir la siguiente expresión:

$$[DNA] = \frac{I - I_{\infty}}{I_0 - I_{\infty}} [DNA]_T \quad (45)$$

si la reacción obedece a una cinética de segundo orden, la ecuación diferencial de velocidad es:

$$\frac{-d\left(\frac{[DNA]}{2}\right)}{dt} = k_2 \left(\frac{[DNA]}{2}\right)^2 \quad (46)$$

(ya que  $[DNA]/2$  es la concentración de bases desnaturalizadas que corresponden a cadenas sencillas). La integración de la ecuación (46) proporciona:

$$\frac{I_0 - I_{\infty}}{I - I_{\infty}} = \frac{k_2 [DNA]_T}{2} t + 1 \quad (47)$$

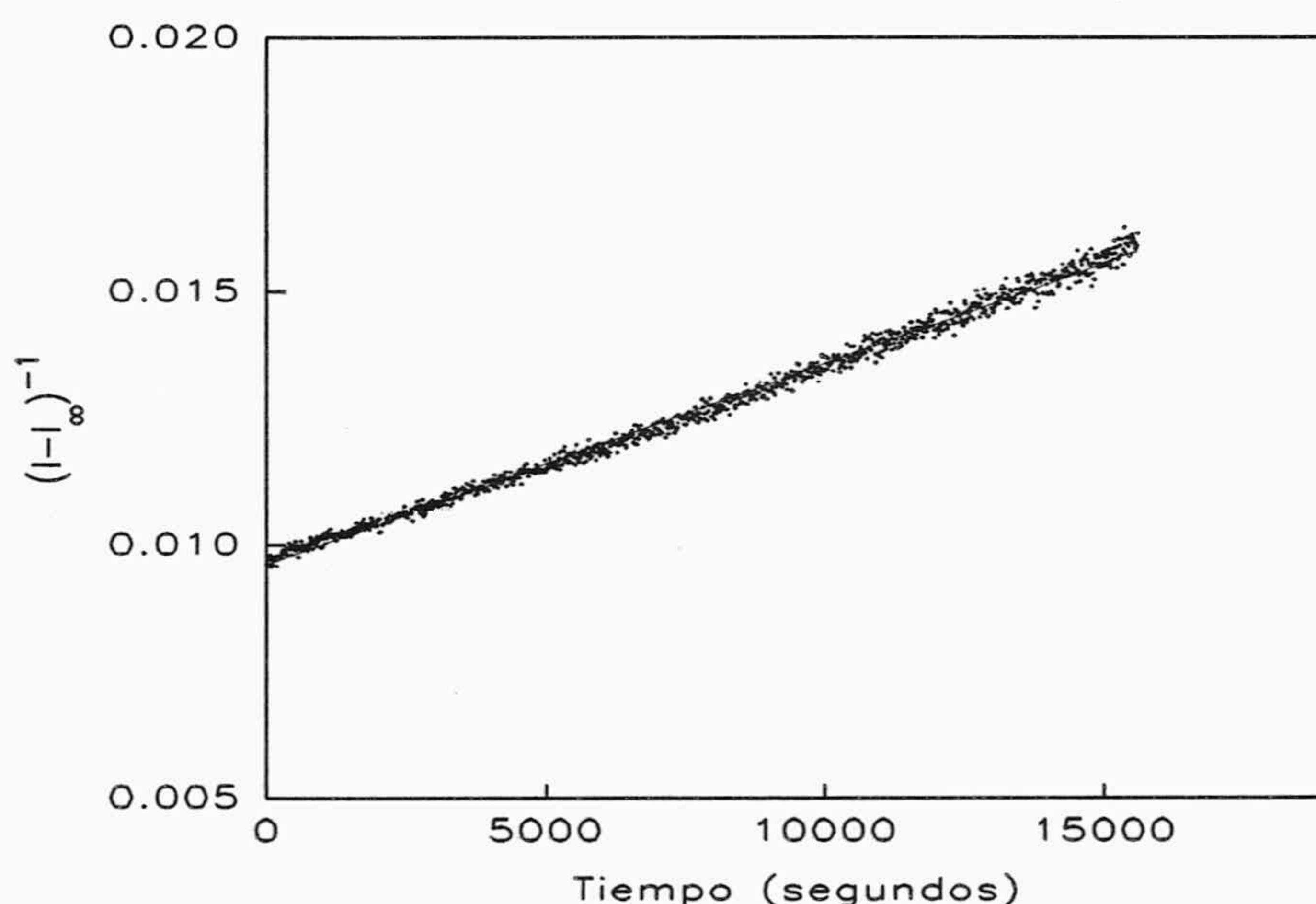
que reordenada en forma mas conveniente para su representación gráfica, queda:

$$(I - I_{\infty})^{-1} = \frac{k_2 [DNA]_T}{2(I_0 - I_{\infty})} t + (I_0 - I_{\infty})^{-1} \quad (48)$$

En la figura III-79 se representan los resultados obtenidos de la aplicación de la ecuación (48) a los datos de la figura III-78. Como se puede observar, la representación es



lineal hasta aproximadamente el 50% de la reasociación (Wetmur y Davidson, 1968). Por ajuste lineal de mínimos cuadrados, se ha calculado la pendiente de la recta, que ha resultado de  $3'962 \cdot 10^{-7} \pm 9'10 \cdot 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ . Los valores de la ordenada en el origen y del coeficiente de determinación son, respectivamente,  $9'609 \cdot 10^{-3} \pm 8'0 \cdot 10^{-6}$  y 0'997. De los valores anteriores se obtiene que  $k_2 = 1'090 \pm 0'004 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Este valor es del mismo orden de magnitud que el obtenido por Wetmur y Davidson (1968) con ADN de *E. coli* (aunque con fragmentos de diferente tamaño). Los resultados obtenidos indican que la etiqueta fluorescente no perturba significativamente las características cinéticas de la renaturalización.



**Figura III.79.-** Representación gráfica de los datos cinéticos obtenidos en la reasociación del ADN-fluoresceína.

La discusión realizada sobre las experiencias anteriormente comentadas, parecen demostrar que la utilización de ADN-fluoresceína etiquetado según nuestra estrategia de marcaje, proporciona sondas fluorescentes que simplifican el método de detección de la reasociación de ácidos nucleicos de origen animal, ya que permite la continua monitorización de la cinética de reasociación en medios homogéneos, sin necesidad de complejas operaciones de separación y lavado de la sonda no hibridada. El método además, es mucho más sensible que el de la medida de la hipercromicidad a 260 nm.



### III.9. DETECCIÓN DE LA HIBRIDACIÓN DE cADN HEPÁTICO POR FLUORIMETRÍA EN ESTADO ESTACIONARIO.

Aunque el ADN de *E. coli* etiquetado con fluoresceína, ha resultado un sistema de gran utilidad en nuestra investigación, ya que con él se han realizado estudios fundamentales sobre la utilidad de nuestro esquema de etiquetado, siendo además, un sistema económico y relativamente fácil de obtener, se debe de reconocer que, en un sentido estricto, el ADN de *E. coli* etiquetado con un fluoróforo no es realmente una sonda fluorescente de ácidos nucleicos, es decir, no es el sistema idóneo para efectuar un análisis que detecte la hibridación de un ácido nucleico diana. Por consiguiente, se ha buscado la posibilidad de trabajar con una cadena sencilla individual de algún ácido nucleico natural, en el que se pueda ensayar nuestra metodología y sirva como ejemplo general de su utilidad en el análisis homogéneo de la hibridación de ácidos nucleicos. Esto se ha podido conseguir gracias a la colaboración del grupo de investigación del Dr. Alberto Vargas, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada, quién nos ha proporcionado cadenas sencillas y complementarias, por separado, de cADN hepático de rata, de 1'2 kbases, que resulta un tamaño aproximado al escogido en las experiencias con ADN de *E. coli*. Estas macromoléculas se han modificado y etiquetado con fluoresceína y pireno según la metodología usual en nuestros estudios y con el material resultante se ha procedido al estudio de la hibridación, bien con su cadena complementaria exclusivamente, o bien con la cadena doble previamente desnaturalizada. Esta forma de operar cumple con las condiciones de un análisis práctico de hibridación de ácidos nucleicos.

#### III. 9. 1. Ensayos con pireno-cADN.

Con la metodología habitual descrita en el epígrafe II. 2. 4. 1. se ha etiquetado cADN hepático de rata de 1'2 kbases con cloruro de sulfonil pireno. Después de purificado mediante columna de Sephadex G-25, seguida de precipitación con etanol y NaCl, hasta que no se obtuvo señal fluorescente apreciable en el sobrenadante de la última etapa de purificación, se disolvió en tampón de fosfatos 0'1 M, AEDT 1 mM, pH 7'5. La cantidad de fluoróforo incorporada al ADN se ha calculado mediante la ecuación (23), por medidas de absorbancia a 260 y a 355 nm. Como ya se indicó, mencionada ecuación proporciona la relación de marcaje en moles de fluoróforo por moles de bases. Los coeficientes de extinción molar del pireno utilizados para los cálculos han sido  $\epsilon_{260}^{Pi} = 12000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  y



$\epsilon_{355}^{\text{pi}} = 34840 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , mientras que para el ADN,  $\epsilon_{260}^{\text{ssADN}} = 10000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , en donde los subíndices y superíndices tienen el significado habitual. Se ha tomado un valor de  $330 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  para la masa molecular media de las bases. La aplicación de la ecuación (23) ha proporcionado un valor del 3 % de marca.

La temperatura de desnaturalización se ha calculado mediante la expresión:

$$T_M = 81.5 \text{ }^\circ\text{C} + 16.6 \cdot (\log[\text{Na}^+]) + 0.41 \cdot (\%[\text{G}+\text{C}]) - 0.63 \cdot (\%\text{formamida}) - \frac{600}{\text{longitud}} \quad (49)$$

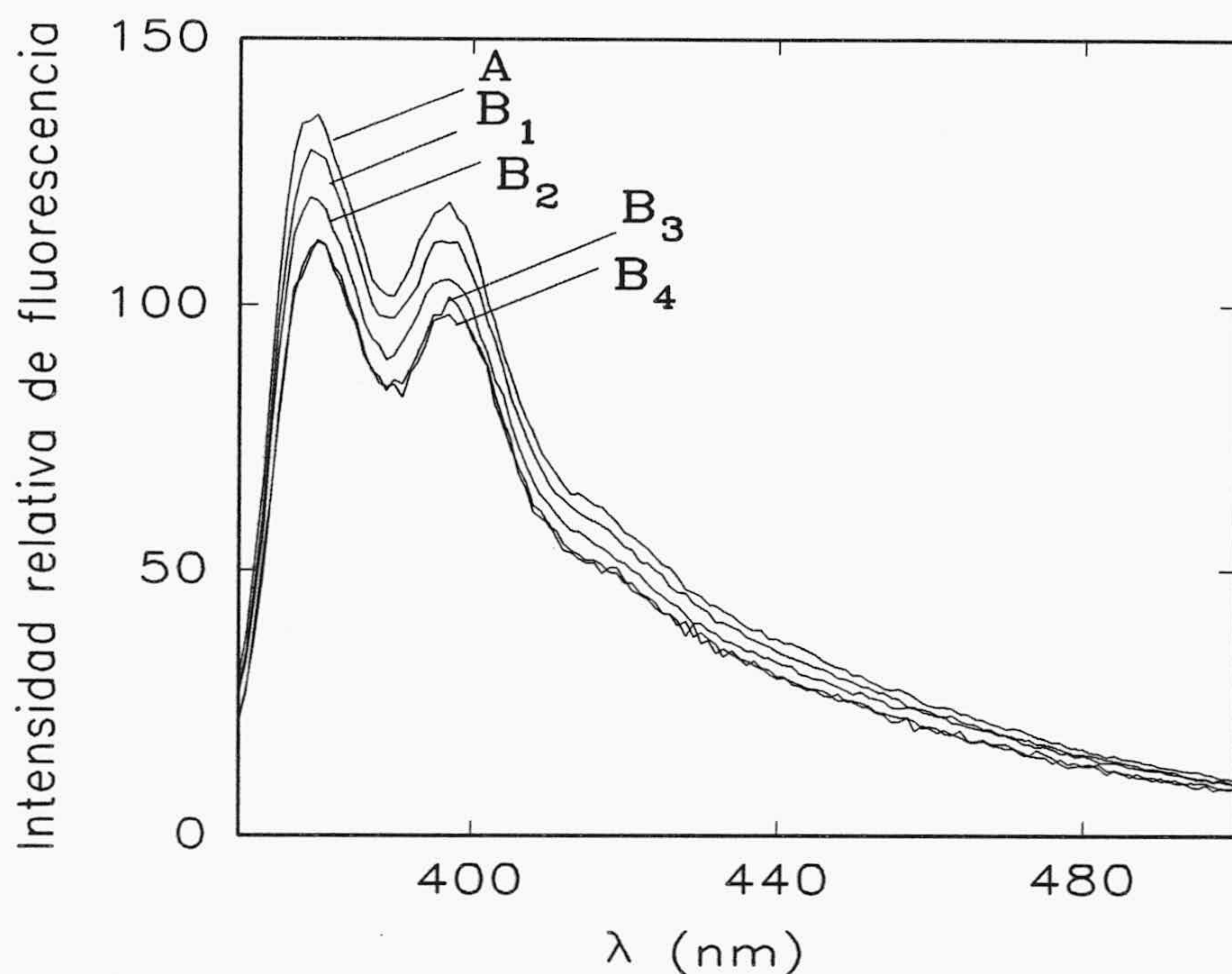
que proporciona buenos resultados cuando se cumplen las siguientes restricciones: ① que la longitud sea mayor de 100 nucleótidos, ② que el % de G+C esté dentro del intervalo 30-75% y ③ que  $[\text{Na}^+]$  sea mayor de 0.01 M y menor de 0.4 M.

El cADN hepático utilizado en este trabajo tiene una longitud de 428 bases y  $\text{G}+\text{C} = 235 = 54.9 \%$ , por lo que si  $[\text{Na}^+] = 0.1 \text{ M}$ , se obtiene que  $T_M = 86 \text{ }^\circ\text{C}$  en ausencia de formamida y  $T_M = 54.5 \text{ }^\circ\text{C}$  en presencia del 50 % de formamida. Estos valores, han permitido escoger el intervalo de temperatura óptimo para la hibridación.

En uno de los experimentos de hibridación realizados, se han mezclado 1250  $\mu\text{l}$  de formamida y 1250  $\mu\text{l}$  de una disolución  $4.8 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  de ADN etiquetado con pireno en tampón de fosfatos 0.1 M, NaCl 0.2 M, pH 7.5, y se ha recogido su espectro de emisión en las condiciones instrumentales habituales ( $\lambda_{\text{ex}} = 352 \text{ nm}$ ), manteniendo la temperatura a  $45^\circ\text{C}$  y bajo suave agitación continua. A continuación se han añadido 325  $\mu\text{l}$  de una disolución  $1.87 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  en el mismo tampón, de la cadena complementaria del ADN y se han registrado los espectros de fluorescencia cada dos horas, durante las primeras 24 horas y luego cada 24 horas durante dos días más.

Algunos de los espectros registrados se indican en la figura III.80. Después de corregir el efecto de dilución, se ha calculado una disminución de la señal de fluorescencia del 19.8 % respecto a la inicial.





**Figura III.80.-** Espectros de emisión fluorescente entre 370 y 500 nm ( $\Delta\lambda_{\text{ex}}=3$  nm,  $\Delta\lambda_{\text{em}}=10$  nm) de una disolución de: (A) pireno-cADN (cadena sencilla) y (B) pireno-cADN tras añadirle su cadena complementaria. (B<sub>1</sub>) después de 2 h. de reacción; (B<sub>2</sub>) después de 6 h.; (B<sub>3</sub>) después de 10 h.; (B<sub>4</sub>) después de 24 h.

A la vista de los resultados obtenidos se pueden realizar las siguientes consideraciones: ① El porcentaje de disminución de la intensidad de fluorescencia calculado, es sensiblemente inferior al obtenido en la hibridación de ácidos nucleicos sintéticos. ② La casi totalidad del decrecimiento en la señal fluorescente se ha producido durante las primeras 10 horas del análisis y los espectros obtenidos a tiempos superiores son prácticamente coincidentes en intensidad.

Sin embargo, los datos de que disponemos, en lo que se refiere a la velocidad de hibridación de los fragmentos de cADN hepático utilizados en el ensayo, indican que la hibridación del 95 % de ss-cADN, a una concentración  $1 \cdot 10^{-3}$  M en un medio igual al usado por nosotros, se alcanza en unos 5 minutos (A. Vargas, comunicación personal). Este dato permite efectuar un cálculo aproximado, a través del modelo cinético de segundo orden, del tiempo que tardaría en producirse el 95 % de hibridación en una disolución de concentración de ss-cADN igual a la inicial empleada en nuestro anterior experimento ( $2'1 \cdot 10^{-6}$  M). El cálculo indica que el 95 % de la hibridación se alcanza en unas 40 horas.



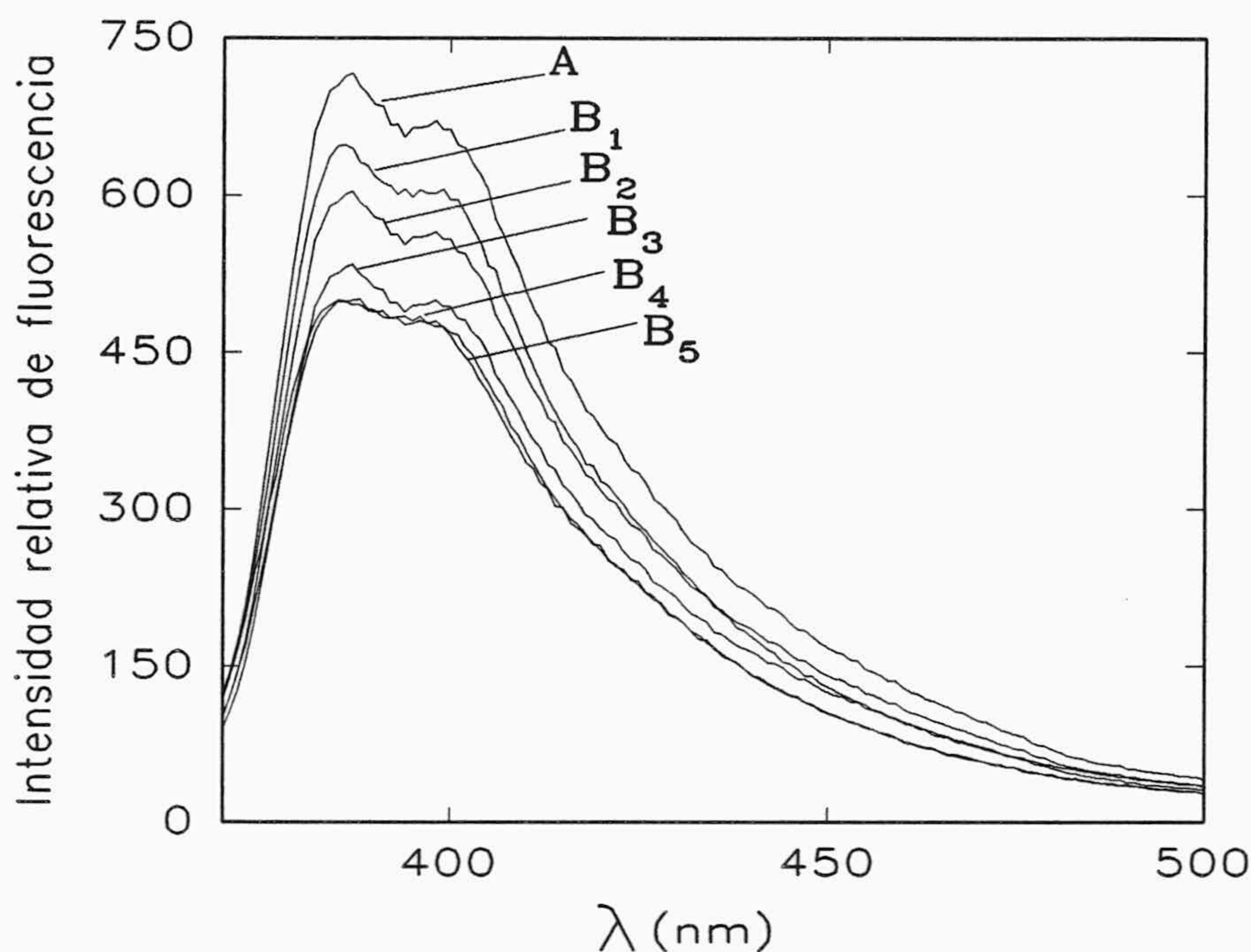
De otra parte, las experiencias de hidrólisis térmica de la sonda, referidas en el epígrafe III.4.8.4 de la página 151, demuestran que la etiqueta fluorescente permanece ligada al ADN por lo menos durante 3 horas a 45 °C, sin que se detecte hidrólisis apreciable de la misma, aunque no se conoce el posible efecto de la temperatura a mayores tiempos de incubación.

Si se tiene en cuenta que la disminución de la intensidad de fluorescencia se produce en las primeras 10 horas y que durante ese tiempo, según los datos cinéticos anteriormente referidos, se produce solamente un 82'7 % de hibridación, se debe de suponer que el porcentaje restante de hibridación no ha sido detectado. El motivo de no haber detectado el 12'3 % (que restaría hasta el 95 % con el que se han efectuado los cálculos), podría ser la posible hidrólisis de la etiqueta fluorescente, producida por la acción térmica durante el largo tiempo empleado en la reacción de hibridación, lo que implicaría un concomitante aumento de la señal fluorescente y una disminución aparente del *quenching* de fluorescencia observado.

Otra posible causa que puede conducir a una menor disminución de la intensidad de fluorescencia que la esperada, es la adsorción del cADN en las paredes de la célula de medida. Es sobradamente conocido que el ADN se adsorbe en las paredes de la cubeta y esta adsorción será tanto más apreciable cuanto menor sea la concentración de cADN. Al objeto de minimizar el posible efecto de la adsorción, se ha llevado a cabo un experimento similar al anterior, en el que se ha silanizado la cubeta mediante la adición previa de una disolución de "Sigma Cot". Así, se han revestido las paredes de la célula con una película hidrofóbica que impide que el cADN se fije en ellas. Además, se aumentó la concentración inicial de pireno-cADN hasta  $4'6 \cdot 10^{-6}$  M, al objeto de conseguir una mayor velocidad de hibridación que permita que, a las 10 horas de reacción, haya hibridado la práctica totalidad del cADN. Los espectros se registraron cada hora, durante 24 horas.

En la figura III.81 se indican algunos de los espectros obtenidos a distintos tiempos de reacción. Después de corregir el efecto de dilución, se ha calculado una disminución de la señal de fluorescencia del 30 % respecto a la inicial. Al igual que en el anterior experimento, la máxima disminución de la señal fluorescente se alcanza a las 10 horas de reacción, aproximadamente.





**Figura III. 81.-** Espectros de emisión fluorescente entre 370 y 500 nm ( $\Delta\lambda_{\text{ex}}=10$  nm,  $\Delta\lambda_{\text{em}}=10$  nm) de una disolución de: (A) pireno-cADN (cadena sencilla) y (B) pireno-cADN tras añadirle su cadena complementaria. (B<sub>1</sub>) después de 1 h. de reacción; (B<sub>2</sub>) después de 2 h.; (B<sub>3</sub>) después de 6 h.; (B<sub>4</sub>) después de 10 h.; (B<sub>5</sub>) después de 24 h.

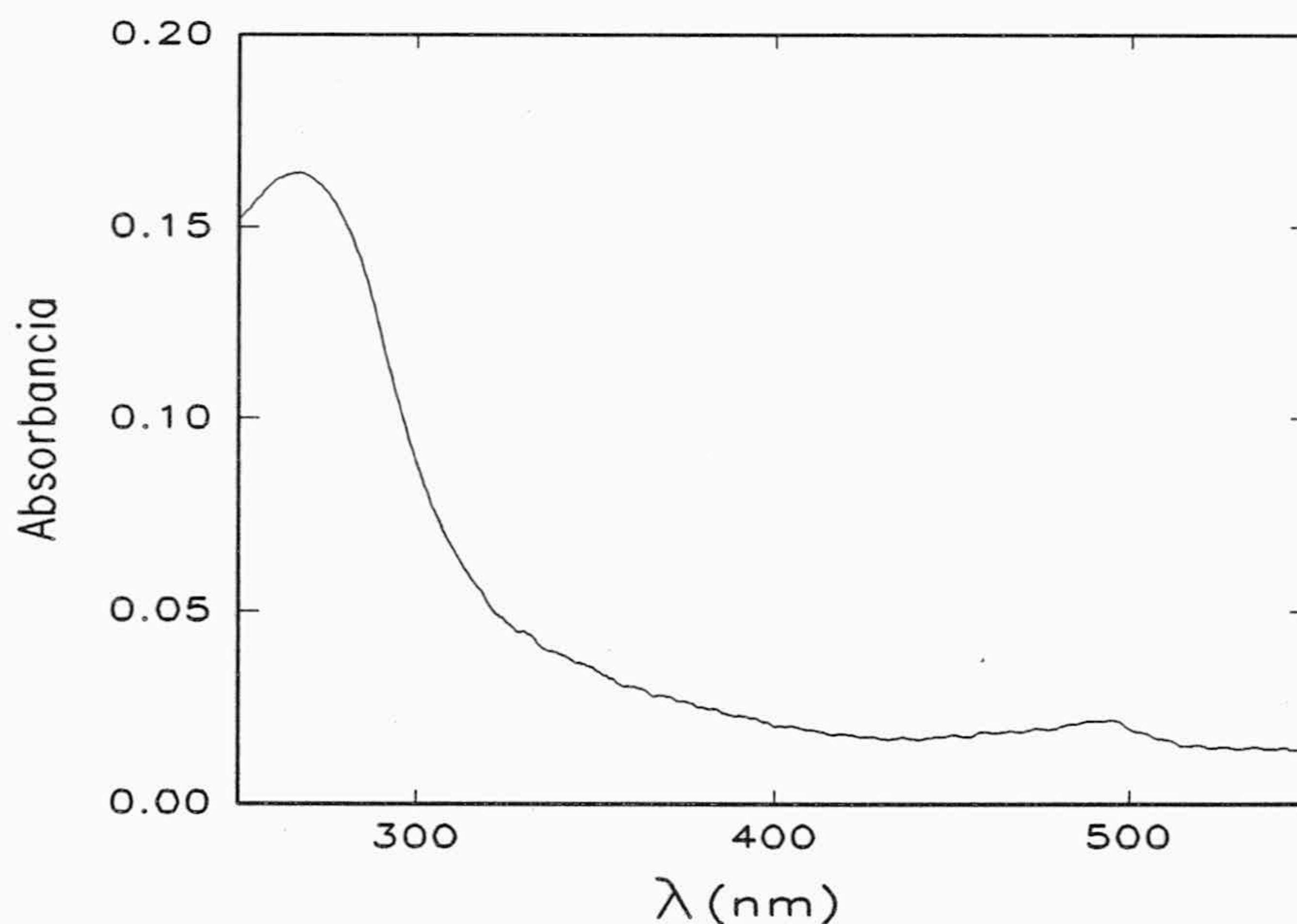
La obtención de un mayor descenso de la señal de fluorescencia con esta forma de operar, parece indicar que hay realmente una pérdida de sensibilidad debida a la adsorción superficial del cADN en las paredes de la célula de medida, por lo que es aconsejable su revestimiento hidrofóbico, sobre todo en los análisis realizados con concentraciones de ADN muy pequeñas.

No obstante la mejora efectuada, los datos sobre la sensibilidad del método (dada por el porcentaje de disminución de fluorescencia) que se han obtenido anteriormente en el modelo sintético poli (C)-poli (I), permiten suponer que la sensibilidad real del análisis, puede ser superior a la obtenida en estas últimas experiencias con cADN hepático y que el menor *quenching* de fluorescencia observado, podría deberse al efecto de la temperatura sobre el enlace de la etiqueta fluorescente, cuando el tiempo de incubación de la sonda resulta excesivo. Sería del mayor interés (y es nuestra intención) efectuar estudios adicionales sobre la posible aceleración de la velocidad de hibridación, al objeto de que la sonda no quede expuesta demasiado tiempo al posible efecto de la temperatura.



### III. 9. 2. Ensayos con fluoresceína-cADN.

En otro grupo de experiencias similares a las anteriores, se ha ensayado la utilidad de la fluoresceína enlazada a cADN, en la detección de la hibridación con su cadena complementaria. Con la metodología habitual se ha etiquetado cADN hepático de rata de 1'2 kbases con isotiocianato de fluoresceína. Después de purificado mediante columna de Sephadex G-25, seguida de sucesivas precipitaciones con etanol y NaCl, hasta que no se obtuvo señal fluorescente apreciable en el sobrenadante de la última etapa de purificación, se disolvió en tampón de fosfatos 0'1 M, AEDT 1 mM, pH 7'5. La cantidad de fluoróforo incorporada al ADN se ha calculado mediante la ecuación (23), por medidas de absorbancia a 260 y a 494 nm. Los coeficientes de extinción molar de la fluoresceína utilizados para los cálculos han sido  $\epsilon_{260}^{Fl} = 11610 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{494}^{Fl} = 43000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , mientras que para el ADN,  $\epsilon_{260}^{ssADN} = 10000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . La aplicación de la ecuación (23) ha proporcionado un valor del 3 % de marca. El espectro de absorción correspondiente a la disolución de fluoresceína-cADN se indica en la figura III.82.



**Figura III. 82.-** Espectro de absorción entre 250 y 550 nm de la disolución de cADN marcado con fluoresceína.



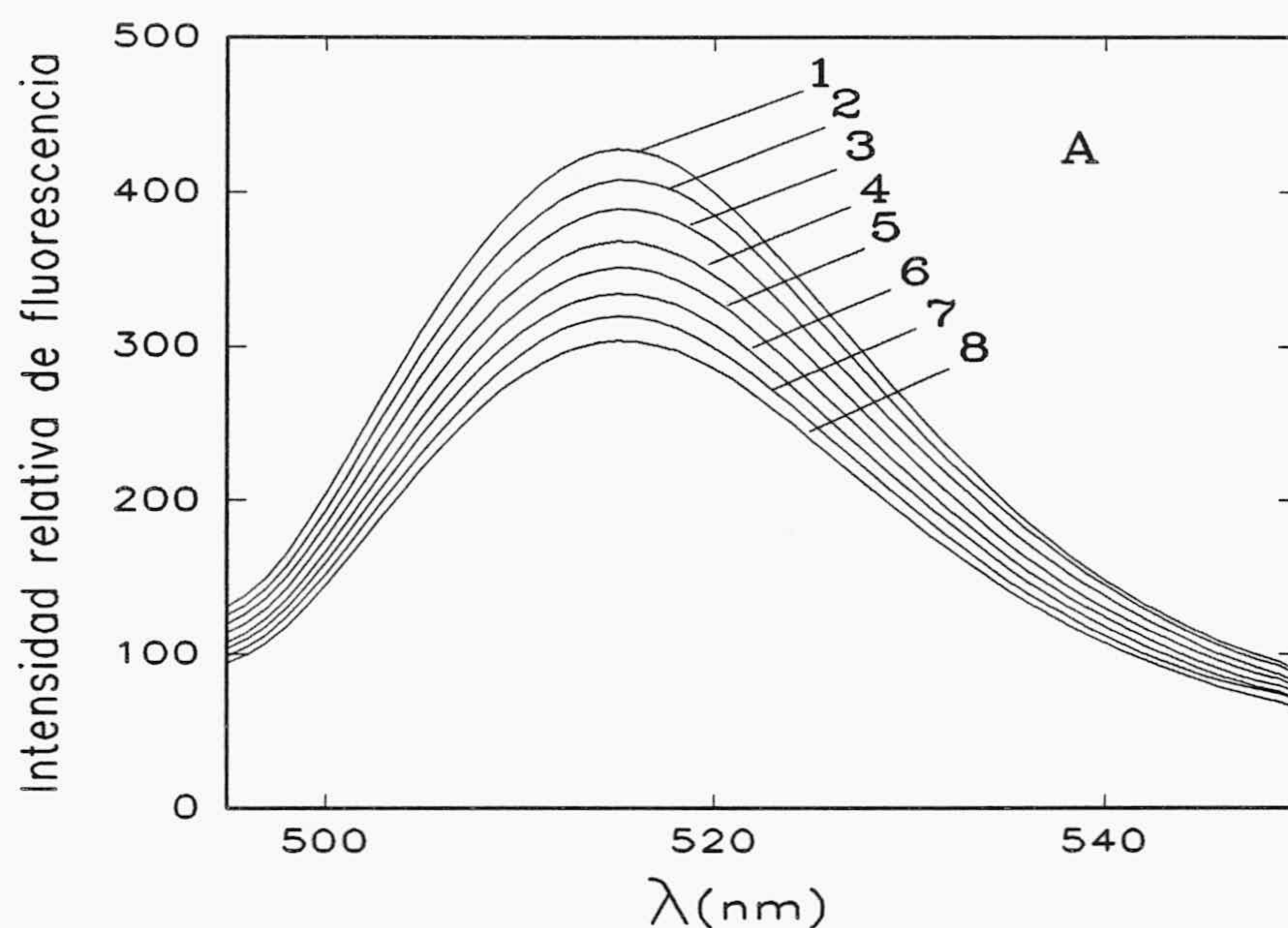
Con la sonda etiquetada se han realizado varios experimentos en los que ésta se ha hibridado con la cadena complementaria, así como con la doble cadena previamente desnaturalizada. Estos experimentos se han hecho en presencia y ausencia de formamida, con silanización de la célula de medida y sin ella, así como a temperatura constante y enfriando lentamente la mezcla de reacción desde la temperatura de desnaturalización de la doble cadena hasta la temperatura óptima de hibridación (este último experimento se ha llevado a cabo en un intento de aumentar la velocidad de hibridación).

En todos los experimentos realizados se ha observado el fotoblanqueamiento del fluoróforo al someterlo a la acción repetida de la lámpara de xenon. El mencionado fotoblanqueamiento hace imprescindible la comparación del medio de reacción con un control, que debe de estar constituido por la misma sonda fluorescente, sin la adición de la cadena complementaria, en un medio y una concentración iguales a los empleados en el análisis y debe de someterse a idéntica acción por parte de la luz. Con esta forma de operar, se puede esperar que la disminución de la señal de fluorescencia debida al fotoblanqueamiento del fluoróforo sea el mismo, tanto en la mezcla de reacción como en el control. Así, la diferencia de disminución en la señal de fluorescencia de ambas disoluciones puede atribuirse, en una primera aproximación, al *quenching* provocado por la hibridación.

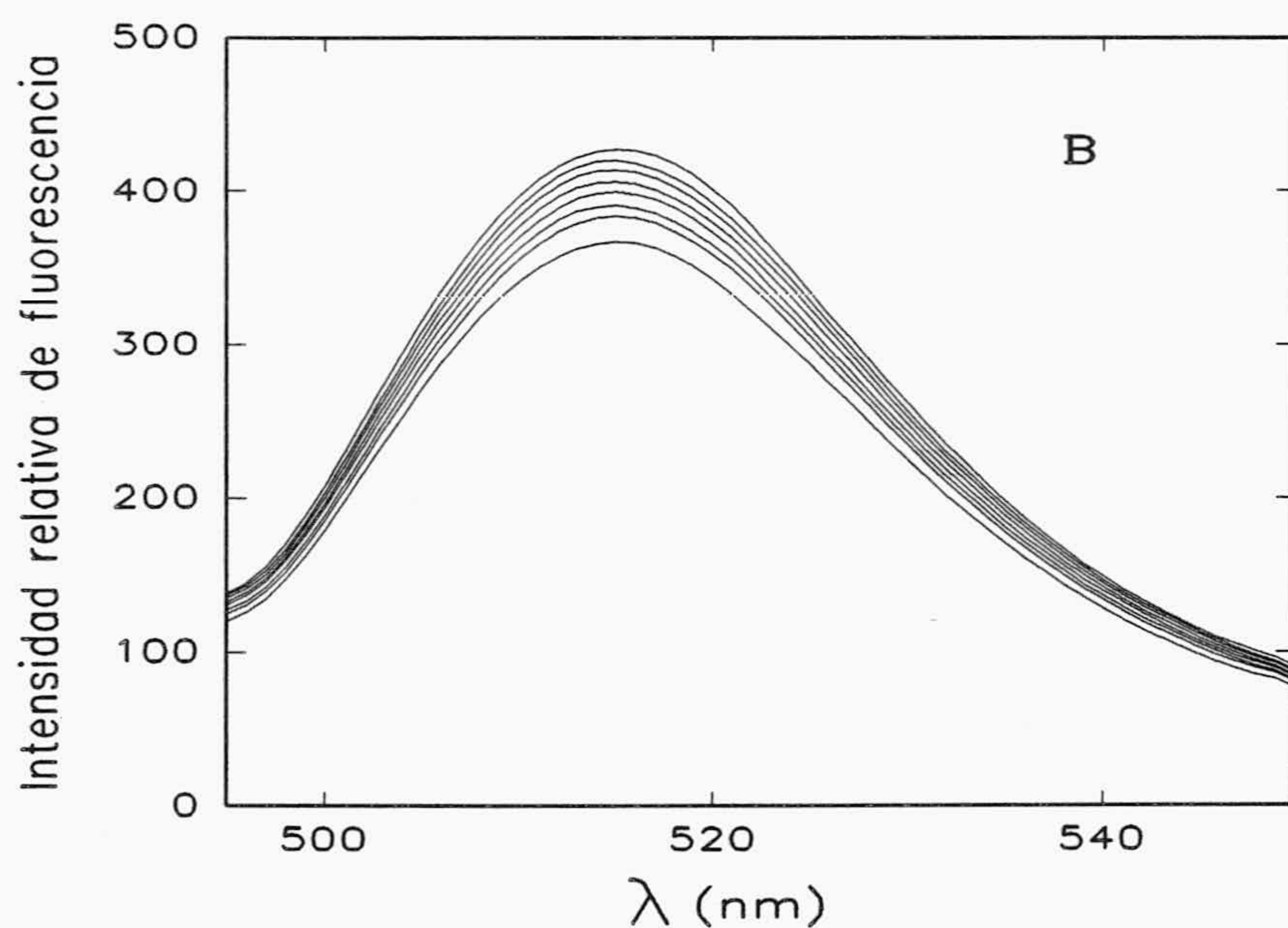
Como ejemplo, se describe uno de los experimentos de hibridación realizados mediante la adición de la cadena complementaria de la sonda fluorescente. Las condiciones experimentales han sido las siguientes: concentración inicial de ADN etiquetado con fluoresceína,  $1 \cdot 10^{-5}$  M en tampón de fosfatos 0'1 M, NaCl 0'2 M, pH 7'5; formamida al 50 % y  $\lambda_{ex} = 480$  nm (para minimizar la influencia del raman a 515 nm). Además, se ha silanizado la célula de medida y se mantuvo la temperatura constante a 45°C, bajo suave agitación continua. En la disolución de hibridación se han añadido 400  $\mu$ l de una disolución de la cadena complementaria del ADN de concentración  $5'5 \cdot 10^{-5}$  M en el mismo tampón, lo que conduce a una concentración  $8'8 \cdot 10^{-6}$  M en la mezcla de reacción. En la cubeta del control se adicionaron 400  $\mu$ l de tampón. Los espectros de fluorescencia se han registrado cada dos horas, durante 24 horas. En la figura III.83 (A) se muestran algunos de los espectros obtenidos en el anterior experimento de hibridación y en la III.83 (B) los correspondientes al control en idénticas condiciones experimentales.

de cada figura está corregido por el efecto de dilución. ~~Amplias conclusiones~~  
de los espectros // p. r. u. n. a





**Figura III. 83 (A).**- Espectros de emisión de fluorescencia entre 495 y 550 nm de disoluciones de: (1) fluoresceína-cADN (cadena sencilla) y (2)-(8) fluoresceína-cADN tras añadirle su cadena complementaria. Los espectros (2)-(7) se registraron cada dos horas y el (8) a las 24 horas de reacción



**Figura III. 83 (B).**- Espectros de emisión de la disolución control de fluoresceína-cADN, registrados a las mismas condiciones experimentales que los de la figura (A).



Los resultados obtenidos se concretan en un decrecimiento de la señal de fluorescencia en la disolución en que se ha efectuado la hibridación del 29'1 % y un decrecimiento por fotoblanqueamiento de la disolución control del 14'3 %. La diferencia entre ambas disminuciones, proporciona un descenso del 14'8 %, que se puede asignar al *quenching* de fluorescencia producido en la reacción de hibridación. El resultado es concordante con el decrecimiento obtenido en el epígrafe III.8 con ADN de *E. coli*.

En adición, si se comparan los descensos en la fluorescencia, que se obtienen al hibridar pireno-poli (C) con poli (I) y los indicados por Jackson (1991) en la hibridación de fluoresceína-poli (C) con poli (I), con los que ahora se han calculado en la hibridación de cADN etiquetado con los dos fluoróforos, se puede observar que la proporcionalidad existente entre los decrecimientos con sendos fluoróforos es similar en ambas clases de ácidos nucleicos.

Los resultados anteriormente discutidos reflejan que el pireno detecta con mayor sensibilidad la hibridación de los ácidos nucleicos. Además, posee la ventaja adicional de su fotoestabilidad. Como antes se ha indicado, será de gran interés efectuar estudios adicionales dirigidos al aumento de la estabilidad del enlace del pireno como etiqueta fluorescente, así como sobre la aceleración de la velocidad de hibridación, al objeto de que la sonda no quede expuesta demasiado tiempo al posible efecto de la temperatura, lo que, a su vez, aumentaría el interés analítico práctico de la metodología descrita y puesta a punto en esta Memoria.



## ***CONCLUSIONES***



De acuerdo con los resultados experimentales que han sido descritos y con la discusión que de ellos se ha efectuado, se han podido establecer las siguientes conclusiones:

- ① La modificación de la base citosina por N<sup>4</sup> transaminación con etilendiamina y el subsiguiente etiquetado con fluoróforos que llevan en su estructura un grupo reactivo de aminas, tal como isotiocianato o cloruro de ácido, proporciona sondas de ADN altamente fluorescentes. Las características de hibridación de tales sondas, temperatura de fusión de la doble cadena y velocidad de reacción con la cadena complementaria, no se afectan sensiblemente, cuando el porcentaje de marca fluorescente no supera el 5%, aproximadamente, de las bases que constituyen el oligonucleótido.
- ② En el caso concreto de que la etiqueta fluorescente sea isotiocianato de fluoresceína o cloruro de pirenosulfonilo, las sondas sintetizadas son capaces de detectar la hibridación con la cadena complementaria en medios homogéneos, es decir en simple disolución, sin tener que recurrir a la fijación del ADN diana en un medio heterogéneo respecto al que se utiliza para su hibridación.
- ③ El mecanismo a través del que se puede detectar la hibridación es un *quenching* específico de la señal fluorescente. En el caso de la fluoresceína el mencionado *quenching* se produce a causa de un desplazamiento del pK<sub>a</sub> aparente del equilibrio monoanión-dianión, lo que provoca una mayor cantidad fraccional del monoanión (que es la especie menos fluorescente), al pH fisiológico. En lo que se refiere a la sonda de pireno, hay un *quenching* dinámico provocado por la expulsión del fluoróforo de los plegamientos hidrofóbicos en que se sitúa en la cadena sencilla lo que, unido al impedimento estérico en el interior de la doble cadena cuando ésta se forma, hace que el fluoróforo se sitúe en ambientes más hidrofílicos, que disminuyen el tiempo de vida de fluorescencia y, por lo tanto, la señal en estado estacionario.
- ④ El empleo de cloruro de pirenosulfonilo como etiqueta fluorescente en un porcentaje superior al 4 %, provoca la aparición del espectro de emisión característico del excímero y una concomitante disminución de la señal de fluorescencia correspondiente al monómero. Esto origina una menor sensibilidad en la detección fluorimétrica de la hibridación de la sonda.



- ⑤ Debido al extenso tiempo de vida de fluorescencia de la sonda pireno-ADN y a la amplia disminución del mismo tras la hibridación, se puede detectar ésta por fluorimetría con resolución temporal, sin interferencias de la posible fluorescencia intrínseca de las muestras biológicas, que, usualmente, poseen tiempos de vida de fluorescencia mucho más cortos.
- ⑥ La sonda con pireno etiquetado también permite la detección de la hibridación por anisotropía de fluorescencia en estado estacionario, ya que se ha obtenido un incremento de ésta tras la hibridación, del 100 % respecto al valor inicial.
- ⑦ El método fluorescente que se ha establecido, permite el seguimiento cinético de la hibridación y de la reasociación, mediante una técnica más sencilla que las habituales heterogéneas y con mayor sensibilidad que el método convencional de la hipercromicidad. Aplicando nuestra técnica se han obtenido valores de la constante de velocidad concordantes con las obtenidas mediante los otros métodos citados. Asimismo, se ha podido establecer la influencia de la fuerza iónica en la constante bimolecular de velocidad de hibridación con una gran sensibilidad.
- ⑧ La presencia en el medio de hibridación de agentes aceleradores de la velocidad de la misma tales como, formamida, TEACl o etanol, no influye sensiblemente en la magnitud del *quenching* de fluorescencia. Su presencia, además, resulta beneficiosa por disminuir la temperatura óptima de hibridación.
- ⑨ La hibridación con las sondas marcadas con pireno provoca un mayor porcentaje de disminución en la señal de fluorescencia en estado estacionario, que la hibridación con sondas etiquetadas con fluoresceína. Además, en estas últimas, cuando la concentración de la fluoresceína es del orden de  $10^{-8}$  M, se presenta el fotoblanqueamiento irreversible del fluoróforo.



## ***BIBLIOGRAFÍA***



- ◆ Allen, D.J. y Benkovic, S.J. (1989) *Biochemistry* 28, 9586.
- ◆ Allen, D.J., Darke, P.L. y Benkovic, S.J. (1989) *Biochemistry* 28, 4601-4607.
- ◆ Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C. Y Zenke, M. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 4593-4602.
- ◆ Arnott, S., Hulkins, P., Dover, S., Fuller, W. y Hodgson, A. (1973) *J. Mol. Biol.* 81, 107-122.
- ◆ Backer, R.J. y Wichman, H. (1990) *Evolution* 44, 2083-2088.
- ◆ Ballesteros, L., Alvarez, J.M. y Talavera, E.M. (resultados no publicados) (1998) L. Ballesteros, Tesis Doctoral, Universidad de Jaén.
- ◆ Barak, L.S. y Webb, W.W. (1981) *J. Cell. Biol.* 90, 595-604.
- ◆ Bermejo, R., Alvarez, J.M. y Talavera, E.M. (1997). R. Bermejo, Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- ◆ Bernardi, (1965) *Methods Enzimol.* 21, 95-
- ◆ Betcher-Lange, S. y Lehrer, S.S. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 3757-3760.
- ◆ Bevington, P.R. (1969) "Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences" p. 187. McGraw-Hill, New York.
- ◆ Birks, J.B. (1970) "Photophysics of Aromatic Molecules". Wiley-Interscience. London.
- ◆ Birnstiel, M., Sells, B. y Purdom, I.F. (1972) *J. Mol. Biol.* 63, 21-39.
- ◆ Bishop, J.O. (1972) *Biochem. J.* 126, 171-185.



- ◆ Bjorson, K.P., Amaratunga, M., Moore, K.J.M. y Lohman, T.M. (1994) *Biochemistry* 33, 14306-14316.
- ◆ Blakeslee, D. y Baines, M.G. (1976) *J. Immunol. Methods* 13, 305.
- ◆ Bloom, L.B., Otto, M.R., Eritja, R., Reha-Krantz, L.J., Goodman, M.F. y Beechem, J.M. (1994) *Biochemistry* 33, 7576-7586.
- ◆ Bloomfield, V., Crothers, D. y Tinoco Jr., D.I. (1974) "Physical Chemistry of Nucleic Acids". Harper & Row. New York.
- ◆ Brelje, T.C., Wessendorf, M.W. y Sorenson, R.L. (1993) *Methods Cell. Biol.* 38, 98.
- ◆ Brimacombe, R. Y Reese, C. B. (1966) *J. Mol. Biol.* 18, 529-540.
- ◆ Brinkley, M. (1992) *Bioconjugate Chem.* 3, 2-13.
- ◆ Britten, R.J., Graham, D.E. y Neufeld, B.R. (1974) *Methods Enzymol.* 29, 363-418.
- ◆ Britten, R.J. y Kohne, D.E. (1966) *Yearb. Carnegie Inst.* p. 78.
- ◆ Britten, R.J. y Kohne, D.E. (1968) *Science* 161, 529-540.
- ◆ Broido, M.S. y Kearns, D.R. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* 104, 5207-5216.
- ◆ Cardullo, R.A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P.C. y Wolf, D.E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8790-8794.
- ◆ Carle, G.F. y Olsen, M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3756-3759.
- ◆ Caruthers, M.H., Beaton, G., Wu, J.V. y Wiesler, W. (1995) *Methods Enzymol.* 211, 3-20.
- ◆ Chabbert, M., Lami, H. y Takahashi, M. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 5395-5400.



- 
- ◆ Chamberlin, M. y Patterson, D. (1965) *J. Mol. Biol.* 12, 410-428.
  - ◆ Chang, C.T., Hain, T.C., Hutton, J.R. y Wetmur, J.G. (1974) *Biopolymers* 13, 1847.
  - ◆ Chu, G., Vollrath, D. y Davis, J. (1986) *Science* 234, 1582-1585.
  - ◆ Chu, G. y Orgel, L.E. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16, 3671-3678.
  - ◆ Clark, S.M., Lai, E., Birren, B.W. y Hood, L. (1988) *Science* 241, 1203-1209.
  - ◆ Clegg, R.M. (1992) *Methods Enzymol.* 211, 353-388.
  - ◆ Connolly, B.A. y Rider, P. (1985) *Nucleic Acids Res.* 12, 4485-4502.
  - ◆ Connolly, B.A. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 3131-3139.
  - ◆ Daniels, M., Hart, L.P., Ho, P.S., Ballini, J.P. y Vigny, P. (1990) in "Time Resolved Laser Spectroscopy in Biochemistry II" (J.R. Lakowicz, ed.), p. 304. SPIE, Bellingham, Washington.
  - ◆ Demas, J.N. (1983) in "Molecular Luminescence Spectroscopy" (S.G. Schulman, ed.), p. 79. Wiley, New York.
  - ◆ Denhardt, D.T. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23, 641-646.
  - ◆ DePetris, S. (1978) *Methods Membr. Biol.* 9, 1.
  - ◆ Diamandis, E.P., Morton, R.C., Reichstein, E. y Khosravi, M.J. (1989) *Anal. Chem.* 61, 48
  - ◆ Diamandis, E.P. (1988) *Clin. Biochem.* 21, 139-150.
  - ◆ Diehl, H. y Horchack-Morris, N. (1987) *Talanta* 34, 739-741.
  - ◆ Diehl, H. (1989) *Talanta* 36, 413-415.



- 
- ◆ Dovichi, N.J., Martin, J.C., Jett, J.H., Trkula, M. y Keller, R.A. (1984) *Anal. Chem.* 56, 348-354.
  - ◆ Draper, D. y Gold, L. (1980) *Biochemistry* 19, 1774-1781.
  - ◆ Draper, D. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 989-1001.
  - ◆ Dudich, E.I., Nezhlin, R.S. y Franek, F. (1978) *FEBS Lett.* 89, 89.
  - ◆ Ebata, K., Masuko, M., Ohtani, H. Y Kashiwasake-Jibu, M. (1995) *Photochem. Photobiol.* 62, 836-839.
  - ◆ Eftink, M.R. (1997) *Methods Enzymol.* 278, 221-257.
  - ◆ Fairclough, R.H. y Cantor, C.R. (1978) *Methods Enzymol.* 48, 347-379.
  - ◆ Felsenfeld, G. y Miles, H. (1967) *Ann. Rev. Biochem.* 37, 407-430.
  - ◆ Flory, P.J. (1961) *J. Polymer Sci.* 49, 105.
  - ◆ Förster, T. (1949) *Z. Naturforsch. A: Astrophys. Phys. Chem.* 4, 321.
  - ◆ Förster, T. (1969) *Angew. Chem. Int. Ed.* 8, 333.
  - ◆ Förster, A.C., McInnes, J.L., Skingle, D.C. y Symons, R.H. (1985) *Nucleic Acids Res.* 13, 745-761.
  - ◆ Gebeyehu, G., Rao, P.Y., SooChan, P., Simms, D.A. y Klevan, L. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 4513-4534.
  - ◆ Gelb, L.D., Kohne, D.E. y Martin, M. (1971) *J. Mol. Biol.* 57, 129-145.
  - ◆ Ghosh, S., Eis, P.S., Blumeyer, K., Fearon, K. y Millar, D.P. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 3155.



- 
- ◆ Gibson, K.J. y Benkovic, S.J. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 6455.
  - ◆ Gillam, I.C. y Tener, G.M. (1986) *Anal. Biochem.* 157, 199-207.
  - ◆ Gillespie, P. Y Spiegelman S. (1966) *J. Mol. Biol.* 12, 829-842.
  - ◆ Graceffa, P. y Lehrer, S.S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11296-11300.
  - ◆ Grinvald, A. y Steinberg, I.Z. (1974) *Anal. Biochem.* 59, 583-598.
  - ◆ Grinvald, A. (1976) *Anal. Biochem.* 75, 260.
  - ◆ Grunstein, M. y Hogness, D. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3961-3966.
  - ◆ Hagmar, P., Nordem, B., Baty, D. Chartier, M. y Takahashi, M. (1992) *J. Mol. Biol.* 226, 1193-1205.
  - ◆ Hall, B.D., y Spiegelman S. (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47, 137-146.
  - ◆ Hames, B.D. y Higgins, S.J. (1985) *Nucleic Acid Hybridization. A Practical Approach.* IRL Press, Oxford.
  - ◆ Hanson, D.C., Yguerabide, J., and Schumacker, V.N. (1981) *Biochemistry* 20, 6842
  - ◆ Haralambidis, J., Chai, M. y Tregear, G.W. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 4857-4876.
  - ◆ Haralambidis, J., Angus, K., Pownall, S., Duncan, L., Chai, M. y Tregear, G.W. (1990 b) *Nucleic Acids Res.* 18, 501-505.
  - ◆ Haralambidis, J., Duncan, L., Angus, K. y Tregear, G.W. (1990 a) *Nucleic Acids Res.* 18, 493-499.
  - ◆ Hartman, K. y Rich, A. (1965) *J. Am. Chem. Soc.* 87, 2033-2039.



- 
- ◆ Haugland, R.P. (1983) en "Excited States of Biopolymers" (R.F. Steiner, ed.), p. 29. Plenum, New York.
  - ◆ Haugland, R.P. (1996) "Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals". (M.T.Z. Spence, ed.) Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon.
  - ◆ Hemmila, I.A. (1988) *ISI Atlas Sci.: Immunol.* 1, 231.
  - ◆ Heyduk, T. y Lee, J.C. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1744-1749.
  - ◆ Heyduk, T., Lee, J.C., Ebright, Y.W., Blatter, E., Zhou, Y. y Ebright, R.H. (1993) *Nature* 364, 548-549.
  - ◆ Hill, J.J. y Royer, C.A. (1997) *Methods Enzymol.* 278, 390-416.
  - ◆ Holzwarth, A.R. (1989) *Q. Rev. Biophys.* 22, 239.
  - ◆ Hoyer, R.h., B.J. McCarthy, y E.T. Bolton (1964) *Science* 144, 957-967.
  - ◆ Hutton, J.R. y Wetmur, J.G. (1973) *J. Mol. Biol.* 77, 495.
  - ◆ Hutton, J.R. (1977) *Nucleic Acids Res.* 4, 3537.
  - ◆ Isenberg, I. y Dyson, R.D. (1969) *Biophys. J.* 9, 1337.
  - ◆ Isenberg, I. (1973) *J. Chem. Phys.* 59, 5696.
  - ◆ Ishii, Y. y Lehrer, S.S. (1989) Intramolecular excimer fluorescence of pyrene maleimide-labeled dithiothreitol. In "Fluorescent Biomolecules" (D.M. Jameson & G.D. Reinhart, eds.). Vol. 51, pp 423-425. Plenum, New York.
  - ◆ Jablonski, A. (1960) *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci.* 8, 259.
  - ◆ Jablonski, E., Moomaw, E.W., Tullis, R.H. y Ruth, J.L. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14, 6115-6123.



- 
- ◆ Jackson, J.T. e Yguerabide, J. (resultados no publicados) (1991) J.T. Jackson, Ph. D. Thesis, Universidad de California, San Diego.
  
  - ◆ Jameson, D.M. y Sawyer, W.H. (1995) *Methods Enzymol.* 246, 283-300.
  
  - ◆ Jolley, M.E., Stroupe, S.D., Schwenzler, K.S., Wang, C.J., Lu-Steffes, M., Hill, H.D., Popelka, S.R., Holen, J.T. y Kelso, D.M. (1981) *Clin. Chem.*, 27, 1575-1579.
  
  - ◆ Kallenbach, N.R., Crothers, D.M. y Mortimer, R.G. (1963) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 11, 213.
  
  - ◆ Kao, J. Yin, Anne, K. Soutar, Koung-Yi Houg, Henry, J. Pownall and Louis, C. Smith (1978) *Biochemistry* 17, 2689-2696.
  
  - ◆ Kalyanasundaram, K. y Thomas, J.K. (1977) *J. Am. Chem. Soc.* 99, 2039-2044.
  
  - ◆ Kelly, R.B., Cozzarelli, N.R., Deutsher, M.P., Lehman, I.R. y Kornberg, A. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 39-44.
  
  - ◆ Kim, Y.T., Tabor, S., Churchich, J.E. y Richardson, C.C. (1994) *J. Biol. Chem.* 267, 15032.
  
  - ◆ Kinosita, K., Kawato, S., and Schumaker, V.N. (1981) *Biophys. J.* 20, 289
  
  - ◆ Kobayashi, Y., Amitani, K., Watanabe, F. y Miyai, K. (1979) *Clin. Chim. Acta*, 92, 241-247.
  
  - ◆ Kohne, D.E. (1970) *Q. Rev. Biophys.* 3, 327-375.
  
  - ◆ Kohne, D.E., and Kacian, D.L. (1992) *U.S. Patent* 5, 132-207.
  
  - ◆ Kremsky, J.N., Wooters, J.L., Dougherty, J.P., Meyers, R.E., Collins, M. y Brown, E.L. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 2891-2909.



- 
- ◆ Kristensen, T., Voss, H., y Ansorge, W. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 5507-5516
  - ◆ Kronick, M.N. (1986) *J. Immunol. Methods* 92, 1.
  - ◆ Kronick, M.N. y Grossman, P.D. (1983) *Clin. Chem.* 29, 1582-1586.
  - ◆ Kwok, R.P.S., Lundblad, J.R., Chrivia, J.C., Richards, J.P., Bachinger, H.P., Brend, R.G., Roberts, S.G.E., Green, M.R. y Goodman, R.H. (1994) *Nature*, 370, 223-226.
  - ◆ Lakowicz, J.R. (1983) "Principles of Fluorescence Spectroscopy". Plenum Press, New York.
  - ◆ Lakowicz, J.R. (ed.) (1991) "Topics in Fluorescence Spectroscopy" vol. 2. Plenum Press, New York.
  - ◆ Langer, P.R., Waldrop, A.A. y Ward, D.C. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6633-6637.
  - ◆ Leary, J.J., Brigati, D.J. y Ward, D.C. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4045-4049.
  - ◆ Lehrer, S.S. (1995) *Pyrene excimer change as a probe of protein conformational change*. In "Subcellular Biochemistry" (B.B. Biswas y S. Roy, eds.). Vol. 24, pp.115-139. Plenum, New York.
  - ◆ Leonhardt, H., Gordon, L. y Livingston, R. (1971) *J. Phys. Chem.* 75, 245-249.
  - ◆ LeTilly, V. y Royer, C.A. (1993) *Biochemistry* 32, 7753-7758.
  - ◆ Lipper, Von E. (1957) *Z. Electrochem.* 61, 962-975.
  - ◆ Lipsett, M.N. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 1256.
  - ◆ Liu, B.M., Cheung, H.C. y Mestecky, J. (1981) *Biochemistry* 20, 1997-2003.



- 
- ◆ Liu, B.M., Cheung, H.C., Mestecky, J. y Harvey, S.C. (1977) *Biophys. J.* 17, 137.
  - ◆ Lundblad, J.R., Kwok, R.P.S., Laurance, M.E., Harter, M.L. y Goodman, R.H. (1995) *Nature* 374, 85-88.
  - ◆ Marmur, J y Lane, D. (1960) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 46, 453-461.
  - ◆ Marmur, J. y Doty, P. (1961) *J. Mol. Biol.* 3, 585-594.
  - ◆ Marmur, J., Rownd, R. y Schildkraut, C.L. (1963). In "Progress in Nucleic Acid Research" (J.N. Davidson y W.E. Cohn, eds.). Academic Press, New York.
  - ◆ Martin, M.M. and Lindquist, L. (1975) *J. Luminesc.* 10, 381-
  - ◆ Mason, W.T. (ed.) (1993) "Fluorescent and Luminiscent Probes for Biological Activity". Academic Press, New York.
  - ◆ Mathies, R.A., Peck, K. y Stryer, L. (1990) *Anal. Chem.* 62, 1786-1791.
  - ◆ McCarthy, B.J., y E.T. Bolton (1963) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 50, 156-164.
  - ◆ McConaughy, B.L., Laird, C.D. y McCarthy, B.J. (1969) *Biochemistry* 8, 3289.
  - ◆ Meinkoth, J. y Wahl, G. (1984) *An. Biochem.* 138, 267-271.
  - ◆ Melchior, W.B., and Von Hippel, P.H. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 70, 289-
  - ◆ Millar, D.P., Allen, D.J. y Benkovic, S.J. (1990) in "Time Resolved Laser Spectroscopy in Biochemistry II" (J.R. Lakowicz, ed.), p. 392. SPIE, Bellingham, Washington.
  - ◆ Miller, W.G. y Anderson, F.P. (1989) *Anal. Chim. Acta* 227, 135-143.
  - ◆ Miyazawa, Y. And Thomas, C.A. (1965) *J. Mol. Biol.* 11, 223-237.



- 
- ◆ Morrison, L.E. (1988) *Anal. Biochem.* 174, 101.
  
  - ◆ Mujumdar, R.B., Ernst, L.A., Mujumdar, S.R., Lewis, C.J. y Waggoner, A.S. (1993) *Bioconjugate Chem.* 4, 105-111.
  
  - ◆ Nordlund, T.M., Wu, P., Andersson, S., Nilsson, L., Rigler, R., Graslund, A., McLaughlin, L.W. y Gildea, B. (1990) in "Time Resolved Laser Spectroscopy in Biochemistry II" (J.R. Lakowicz, ed.), p. 344. SPIE, Bellingham, Washington.
  
  - ◆ Nygaard, A.P. y Hall, B.D. (1963) *J. Mol. Biol.* 9, 125.
  
  - ◆ Oi, V.T., Glazer, A.N. y Stryer, L. (1982) *J. Cell. Biol.* 93, 981-986.
  
  - ◆ Oser, A., Roth, W.K. y Valet, G. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16, 1181.
  
  - ◆ Panayotou, G., Waterfield, M.D. y End, P. (1993) *Curr. Biol.* 3, 913-921.
  
  - ◆ Peck, K., Stryer, L., Glazer, A.N. y Mathies, R.A. (1989) 86, 4087.
  
  - ◆ Perez-Howard, G.M., Weil, P.A. y Beechem, J.M. (1995) *Biochemistry* 34, 8005-8017
  
  - ◆ Pérez-Howard, G.M., Weil, P.A. y Beechem, J.M. (1995) *Biochemistry* 34, 10816-10826.
  
  - ◆ Perrin, F. (1929) *Ann. Phys.* 12, 169-275.
  
  - ◆ Pochon, F. y Michelson, A.M. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53, 1425-1430.
  
  - ◆ Pringsheim, P. (1965) "Fluorescence and Phosphorescence". Interscience Publishers, New York.
  
  - ◆ Prober, J. y col., (1987) *Science* 238, 336.
  
  - ◆ Pyles, E.A. y Lee, J.C. (1996) *Biochemistry* 35, 1162-1172.



- 
- ◆ Rawitch, A.B. y Weber, G. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 680-688.
  - ◆ Rayburn, A.L. y Gill, B.S. (1987) *Am. J. Bot.* 74 (4), 574-580.
  - ◆ Reines, S.A. y Shulman, L.H. (1979) *Methods Enzymol.* 59, 146-166.
  - ◆ Reisfeld, A., Rothenberg, J.M., Bayer, E.A. y Wilchek, M. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 519-526.
  - ◆ Ricroch, A., Peffley, E.B. y Backer, R.J. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 83, 413-418.
  - ◆ Rigby, P.W., Dickman, M., Rhodes, C. y Berg, P. (1977) *J. Mol. Biol.* 113, 237-248.
  - ◆ Ross, P.D. y Sturtevant, J.M. (1962) *J. Am. Chem. Soc.* 84, 4503.
  - ◆ Rozwadowski, M. (1961) *Acta Phys. Pol.* 20, 1005-1017.
  - ◆ Ruth, J. (1984) *DNA* 3, 122.
  - ◆ Saiki, R.K., Bugawan, T.L., Horn, Cs.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. (1986) *Nature* 324, 163-166.
  - ◆ Saiki, R.K., Schrf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, Cs.T., Erlich, H.A. y Arnheim, N. (1985) *Science* 230, 1350-.
  - ◆ Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
  - ◆ Saunders, M. y Ross, P.D. (1960) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 3, 314.
  - ◆ Schmeckpeper, B.J. y Smith, K.D. (1972) *Biochemistry* 11, 1319-1326.
  - ◆ Schwartz, D.C. y Cantor, C.R. (1984) *Cell* 37, 67-72.
  - ◆ Selvin, P.R. (1995) *Methods Enzymol.* 246, 300-334.



- 
- ◆ Shapiro, R., Selvis, R. y Weicher, M. (1970) *J. Am. Chem. Soc.* 92, 422-424.
  - ◆ Shinitzky, M. And Barenholz, Y. (1978) *Biochim. Biophys.* 515, 367-394.
  - ◆ Shinitzky, M. And Yuli, I. (1982) *Chem. Phys. Lipids* 30, 261-282.
  - ◆ Sheldon y col., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9085-9092.
  - ◆ Smith, M.L., Fung, S., Hunkapiller, M.W. y Hood, L.E. (1985) *Nucleic Acids Res.* 13, 2399-.
  - ◆ Smith, M.L., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Heiner, C., Kent, S.B.H. y Hood, L.E. (1989) *Nature* 321, 674-679.
  - ◆ Soengas, M.S., Esteban, J.A., Salas, M. y Gutierrez, C. (1994) *J. Mol. Biol.* 239, 213-226.
  - ◆ Soini, E. y Kojola, H. (1983) *Clin. Chem.* 29, 65-68.
  - ◆ Southern, E.M. (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
  - ◆ Steiner, R.F. y McAlister, A. (1957) *J. Polym. Sci.* 24, 105-123.
  - ◆ Stryer, L. (1978) *Annu. Rev. Biochem.* 47, 819-846.
  - ◆ Stryer, L., Glazer, A.N. y Oi, V.T. (1985) *United States Patent* nº 4.520.110.
  - ◆ Studier, F.W. (1969) *J. Mol. Biol.* 41, 189-197.
  - ◆ Subirana, J.A. y Doty, P. (1966) *Biopolymers* 4, 189-200.
  - ◆ Symons, R.H. (1989) *Nucleic Acid Probes*. CRC Press. New York.
  - ◆ Talavera, E.M., Alvarez-Pez, J.M., Afkir, M., Ballesteros, L. y Bermejo, R. (1997) *Appl. Spectroscopy*, 51, 401-406.



- 
- ◆ Tao, T. (1969) *Biopolymers* 8, 609.
  
  - ◆ Terpetschnig, E., Szmecinski, H. y Lakowicz, J.R. (1997) *Methods Enzymol.* 278, 295-321.
  
  - ◆ Thiele, D. y Guschlbauer, W. (1969a) *Biopolymers* 8, 361-378.
  
  - ◆ Thiele, D. y Guschlbauer, W. (1969b) *Biopolymers* 10, 143-157.
  
  - ◆ Thiele, D. y Guschlbauer, W. (1969c) *Biochem. Biophys. Acta* 272, 22-26.
  
  - ◆ Thrower, K.J. y Peacocke, A.R. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 119, 652-654.
  
  - ◆ Titus, J.A., Haugland, R.P., Sharrow, S.O. y Segal, D.M. (1982) *J. Immunol. Methods* 50, 193-204.
  
  - ◆ Tumerman, I.A., Nezlin, R.S. y Zagyansky, Y.A. (1972) *FEBS Lett.* 19, 290-292.
  
  - ◆ Ullman, E.F., Schwarzberg, M. y Rubenstein, K.E. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4172-4178.
  
  - ◆ Viscidi, R.P., Connelly, C.J. y Yolken, R.H. (1986) *J. Clin. Microol.* 23, 311-317.
  
  - ◆ Wahl, P. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 175, 55-64.
  
  - ◆ Wang, Y. y Taylor, D.L. (1989) "Fluorescence Microscopy of Living Cells". Academic Press, San Diego.
  
  - ◆ Watson, R.A., Landon, J., Shaw, E.J. y Smith, D.S. (1976) *Clin. Chim. Acta*, 73, 51-55.
  
  - ◆ Weber, G. (1951) *Biochem. J.* 51, 145-153.
  
  - ◆ Weber, G. (1969) *Methods Enzymol.* 16, 380-394.



- ◆ Weber, G. (1975) *Adv. Protein Chem.* 29, 1-83.
- ◆ Wetmur, J.G. (1971) *Biopolymers* 10, 601-613.
- ◆ Wetmur, J.G. y Davidson, N. (1968) *J. Mol. Biol.* 31, 349-370.
- ◆ Wilkerson, C.W., Goodwin, P.M., Ambrose, W.P., Martin, J.C. y Keller, R.A. (1993) *Appl. Phys. Lett.* 62, 2030-2032.
- ◆ Wittmayer, P.K. y Raines, R.T. (1996) *Biochemistry* 35, 1076-1083.
- ◆ Wittung, P., Norden, B., y Takahashi, M. (1994) *Eur. J. Biochem.* 224, 39-45.
- ◆ Wu, P. y Brand, L. (1994) *Anal. Biochem.* 218, 1-13.
- ◆ Yang, M. Ghosh, S. y Millar, D.P. (1994) *Biochemistry* 33, 15329-15337.
- ◆ Yang, M. y Millar, D.P. (1997) *Methods Enzymol.* 278, 417-444.
- ◆ Yguerabide, J. (1973) in "Fluorescence Techniques in Cell Biology" (A.A. Thayer y M. Serentz, eds.), p. 311. Springer, New York.
- ◆ Yguerabide, J. (1972) *Methods Enzymol.* 26, 498-578.
- ◆ Yguerabide, J. e Yguerabide, E.E. (1984) in "Optical in Biological Research" (D.L. Rousseau, ed.), p. 181. Academic Press, New York.
- ◆ Yguerabide, J. y Ceballos, A. (1996) *Anal. Biochem.* 228, 208-220.
- ◆ Yguerabide, J., Talavera, E., Alvarez, J.M. y Quintero, B. (1994) *Photochem. Photobiol.* 60, 435-441.
- ◆ Zuckermann, R., Corey, D. y Schultz, P. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 5305-5321.