

# Lo studio delle varie conformazioni del DNA

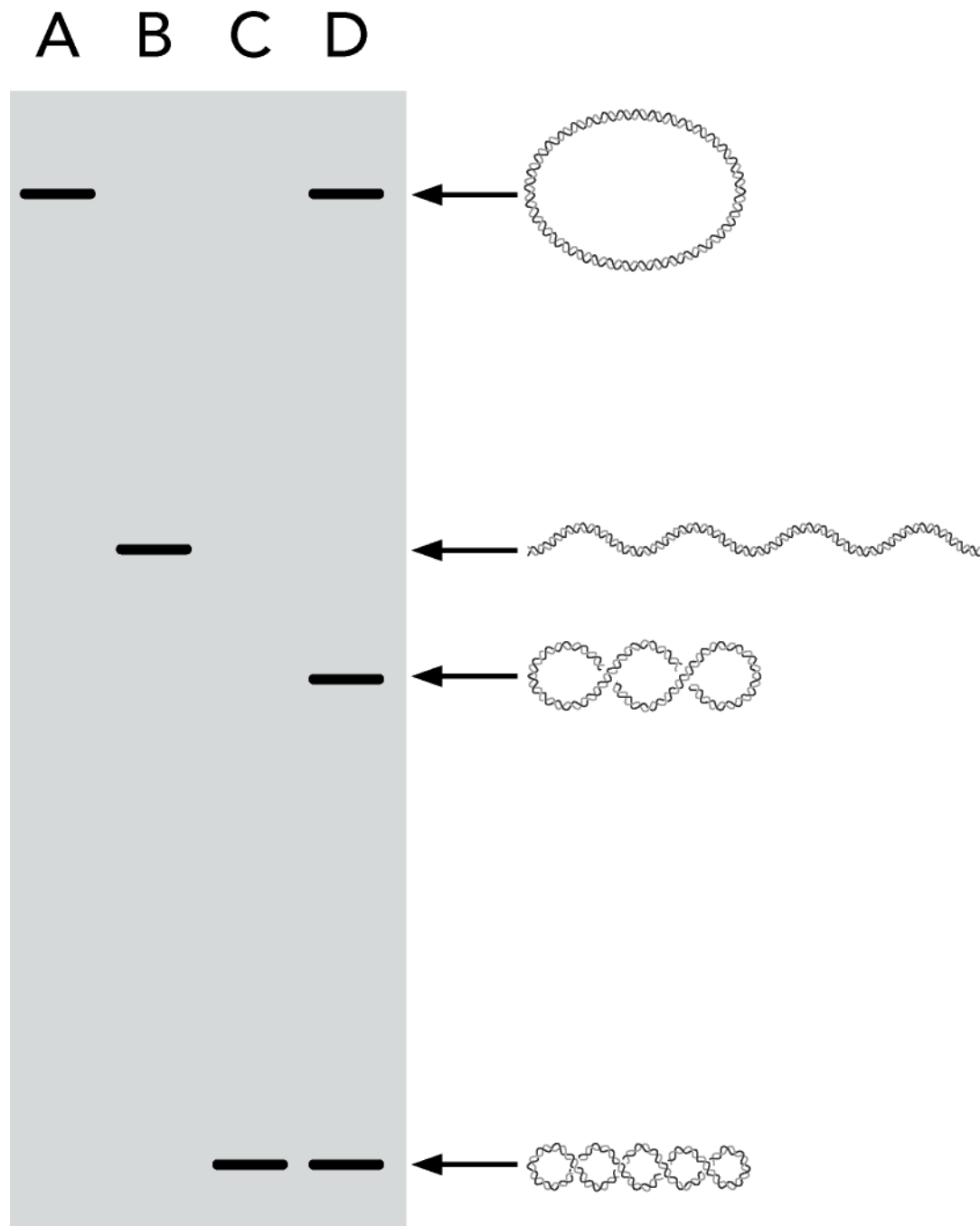


## Separazione dei topoisomeri

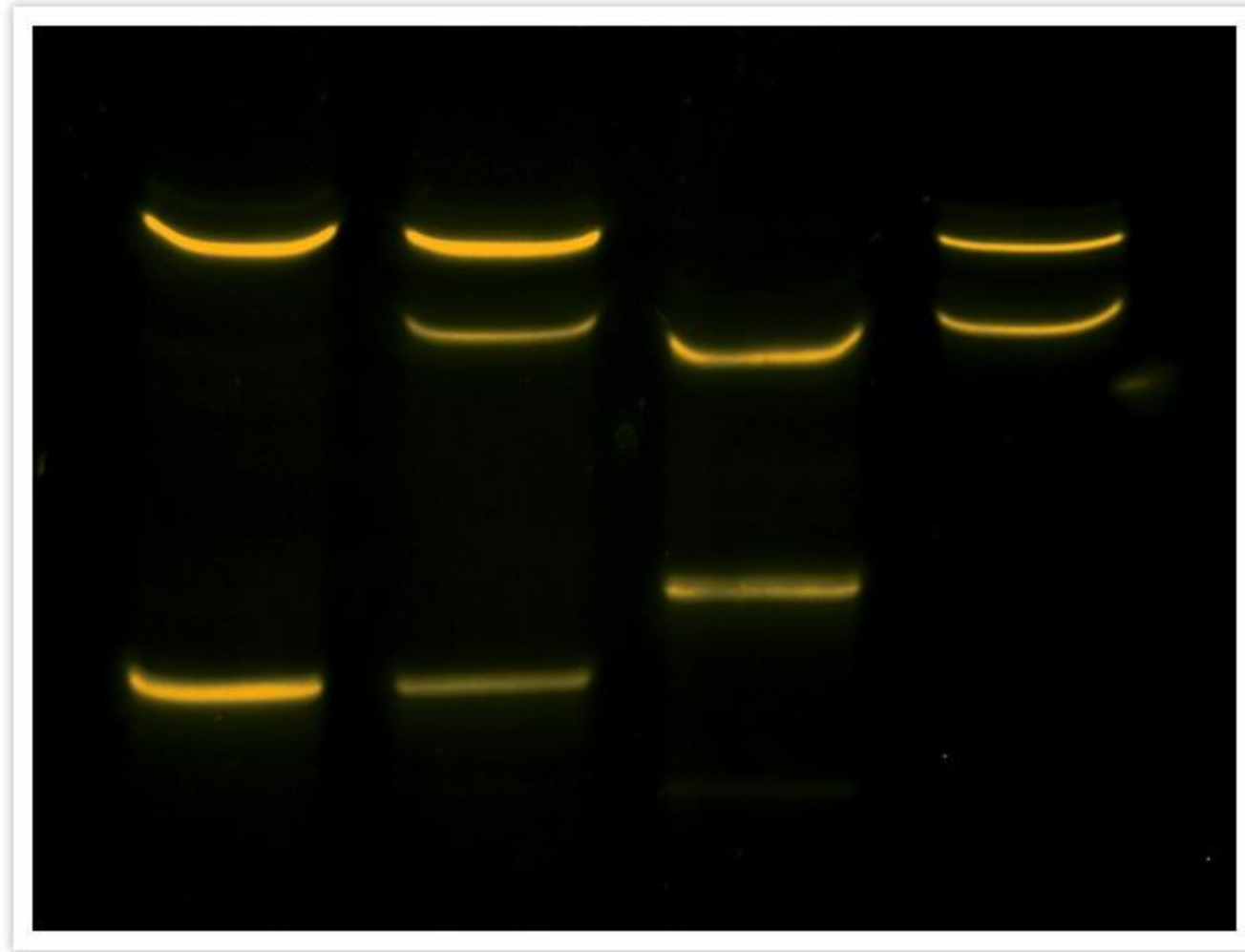
Molecole di DNA ccc di una uguale lunghezza e composizione in basi, ma diverso Lk, sono dette topoisomeri.

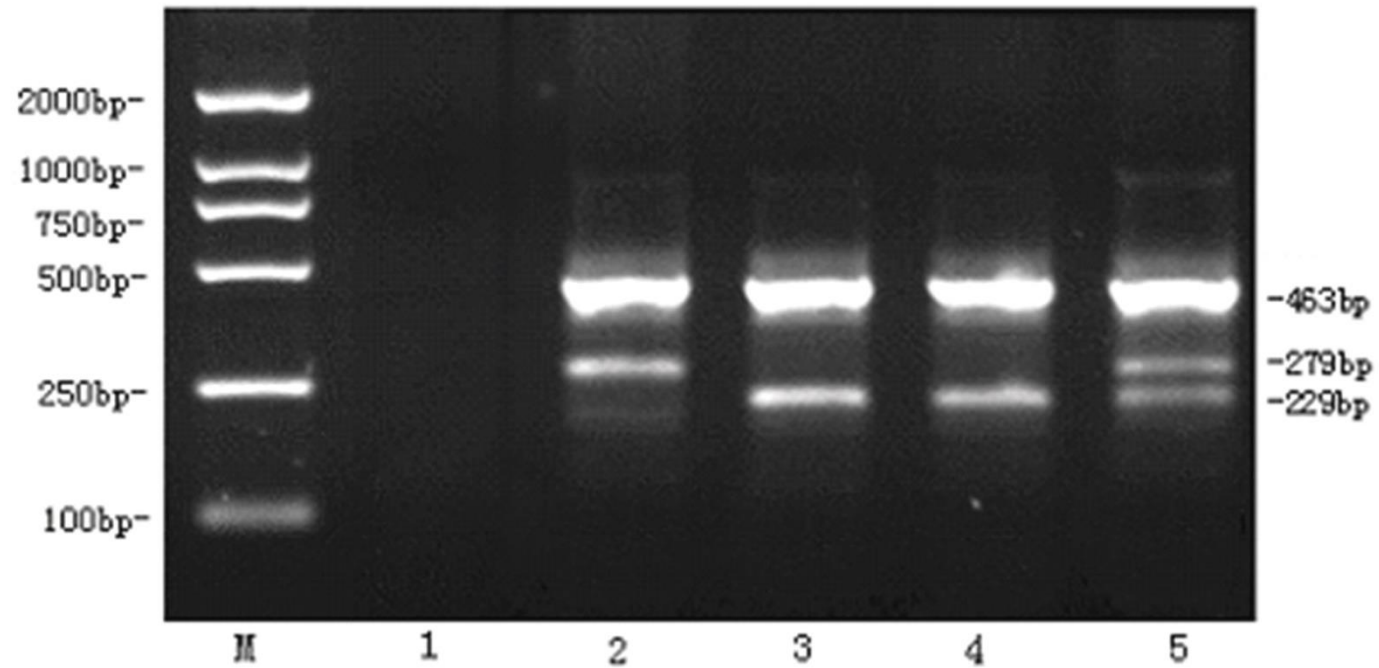
I topoisomeri possono essere separati in elettroforesi su gel, pur avendo lo stesso rapporto carica/massa. La diversa mobilità è dovuta al loro diverso grado di compattamento (diverso coefficiente d'attrito).

Più la molecola è compatta (DNA superavvolto) più migra velocemente nel gel. Viceversa un cccDNA rilassato migra molto più lentamente di uno fortemente superavvolto.



# Single-strand conformation polymorphisms (SSCP)





La banda da 229 bp indica l'allele wild type, mentre un allele mutante è indicato dalla banda da 279 bp.

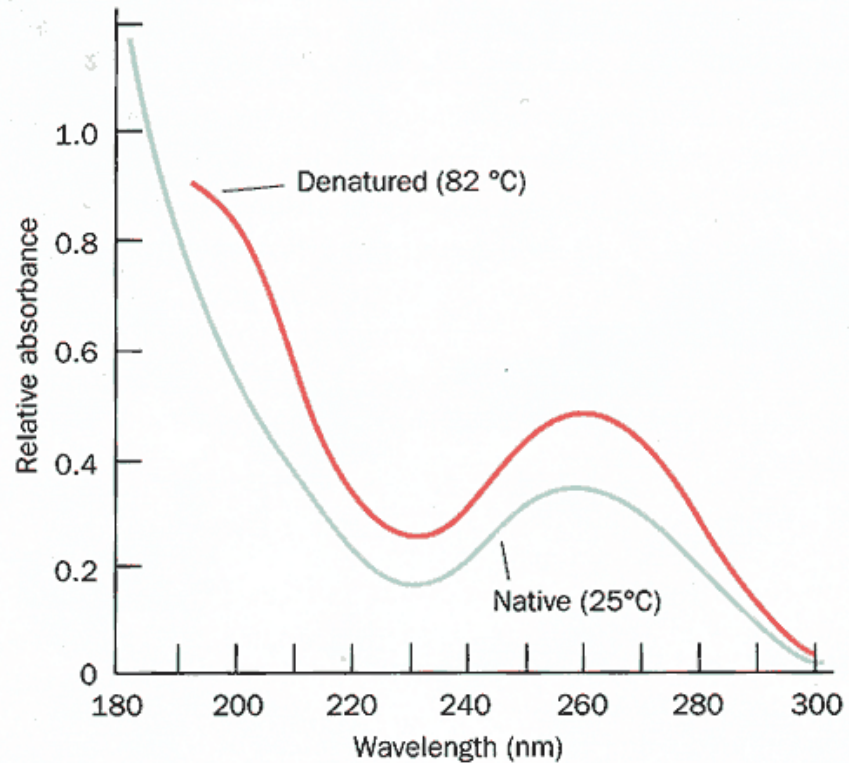
1. Controllo mix
2. Controllo omozigote mutato
3. Controllo omozigote non mutato
4. Campione omozigote non mutato
5. Campione eterozigote

# STABILITA' DEL DNA e DENATURAZIONE

- Stabilità termodinamica del duplex di DNA e sua denaturazione: dipendenza da **fattori intrinseci** (composizione in basi, peso molecolare) ed **estrinseci** (temperatura, pH, forza ionica, co-soluti caotropi).
- Cinetiche di rinaturazione del DNA sono funzione della complessità e stabilità della molecola.

# Cinetiche di rinaturazione

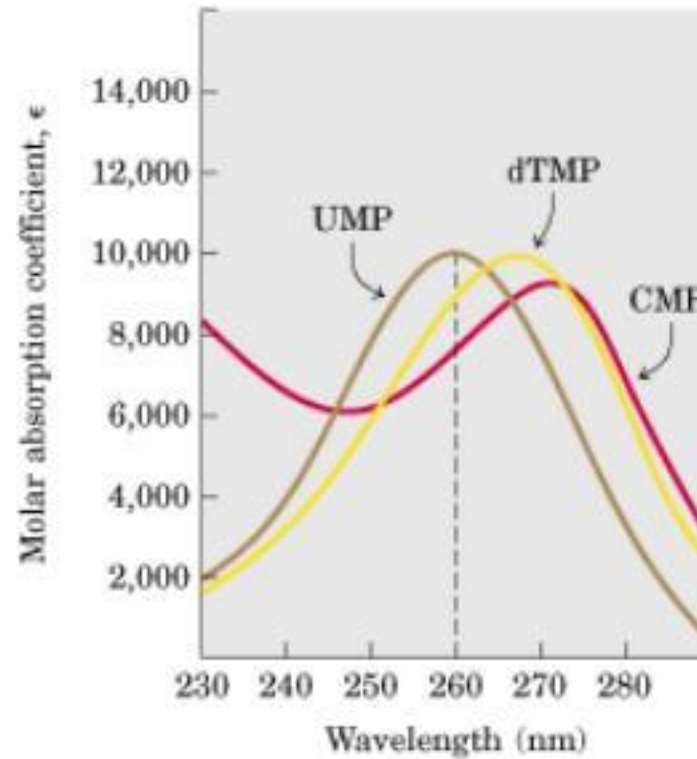
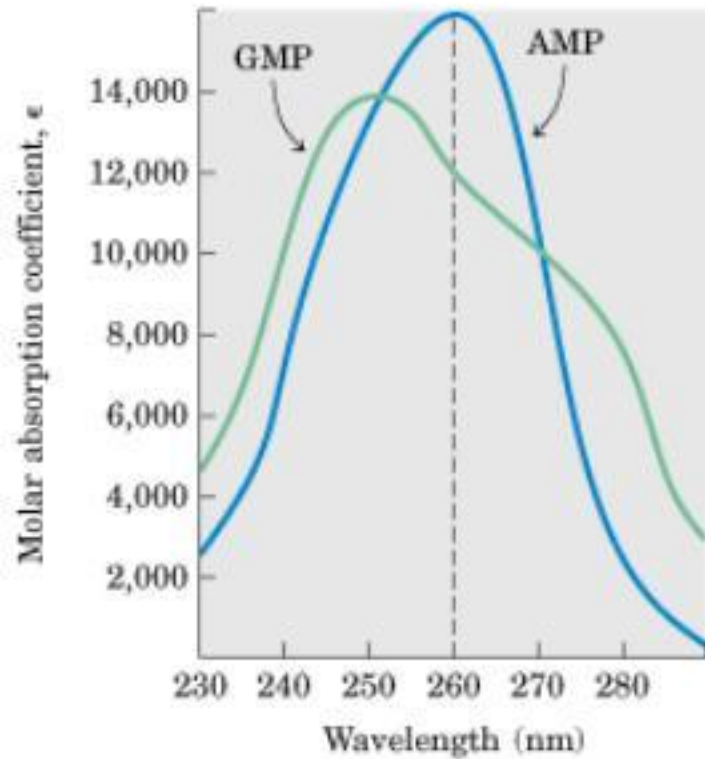
In genere la denaturazione termica del DNA in soluzione è un processo molto rapido. Per contro il processo inverso, la rinaturazione (riformazione del duplex) in seguito ad abbassamento della temperatura, è un processo la cui velocità (cinetica) può essere estremamente variabile a seconda della natura del DNA all'esame, andando da velocità non molto minori di quelle di denaturazione nel caso di oligonucleotidi, o DNA costituito da sequenze brevi ripetute, a velocità talmente basse da richiedere giorni o addirittura mesi per osservare un grado di rinaturazione apprezzabile.



## Il fenomeno dell'ipercromismo del DNA.

Le basi del DNA assorbono la luce UV tra 300 e 230 nm (con massimo di assorbimento attorno a 260 nm). Ma l'entità dell'assorbimento a parità di concentrazione è maggiore di quasi il 50% per il DNA denaturato rispetto al DNA "nativo", cioè a doppia elica. Pertanto misure di assorbimento UV a 260 nm, facilmente ottenibili con uno spettrofotometro, si sono rivelate particolarmente comode nello studio della denaturazione (e della rinaturazione) del DNA.

## Nucleotides strongly absorb UV light at ~260nm



Molar absorption coefficient at 260 nm, $\epsilon_{260}$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	
AMP	15,400
GMP	11,700
CMP	7,500
UMP	9,900
dTMP	9,200

Gli spettri di assorbimento UV dei singoli nucleotidi sono leggermente diversi l'uno dall'altro, sia come posizione del massimo che come intensità. La banda centrata a 260 nm del DNA è la media pesata per la composizione in basi del dato DNA.

Da notare che gli spettri somma delle coppie C:G e A:T sono molto simili, per cui la composizione di un DNA duplex influisce molto poco sull'assorbimento del DNA.



# ANALISI FISICA

## Effetto ipercromico:

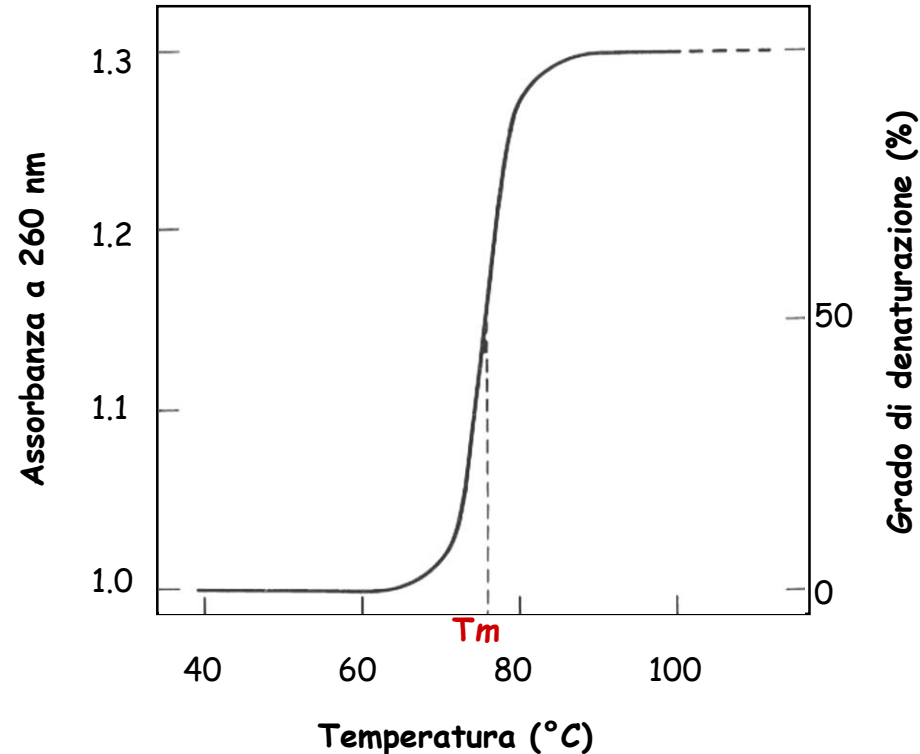
Aumento dell' $A_{260\text{nm}}$  durante il processo di denaturazione del DNA.

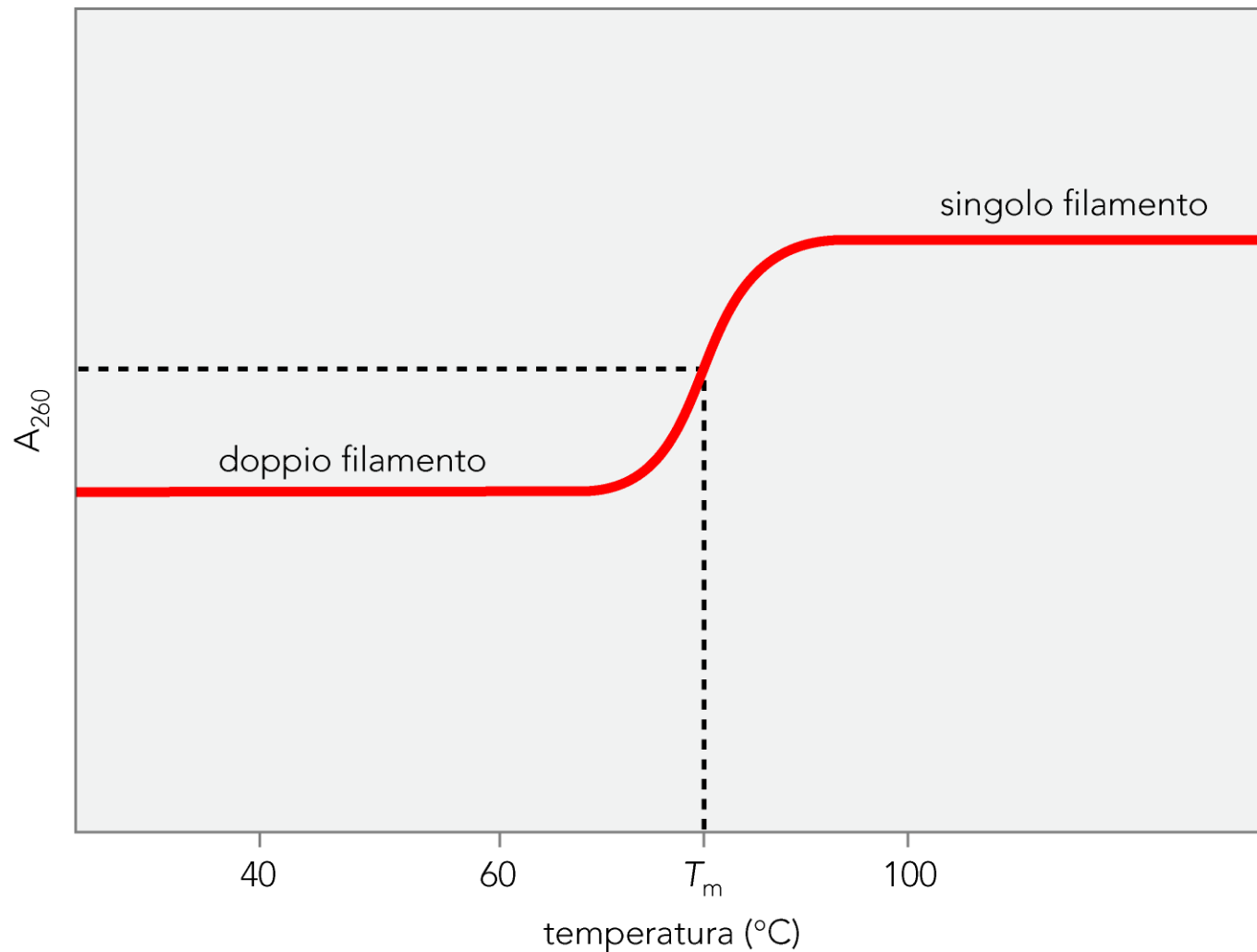
## Temperatura di melting ( $T_m$ ):

Temperatura in corrispondenza della quale il DNA è denaturato al 50%.

Maggiore è  $G+C$ , maggiore è  $T_m$ .

## Curva di fusione





### **Effetto ipercromico**

L'assorbimento di luce UV a 260 nm da parte del DNA permette di seguirne la denaturazione termica. Infatti le basi nella doppia elica hanno coefficiente di assorbimento della luce minore che nello stato a singolo filamento, a causa dello stacking delle basi.

La transizione è cooperativa e il punto di mezzo  $T_m$  è detto temperatura di fusione (melting).

# CINETICA di RINATURAZIONE

## Effetto ipocromico:

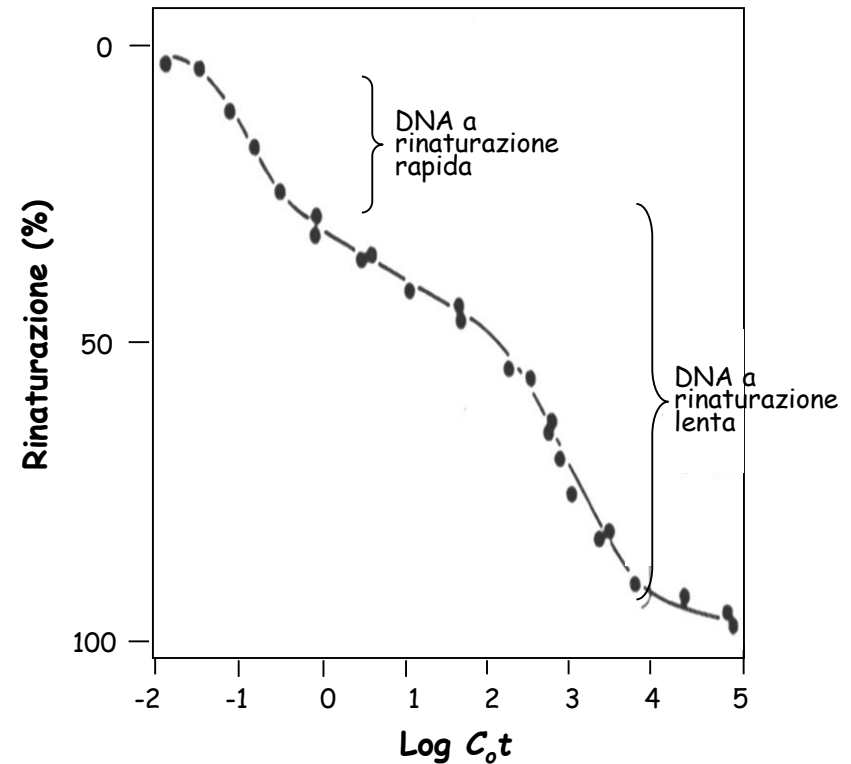
Diminuzione dell' $A_{260\text{nm}}$  durante il processo di rinaturazione del DNA.

## Parametri che influenzano la rinaturazione:

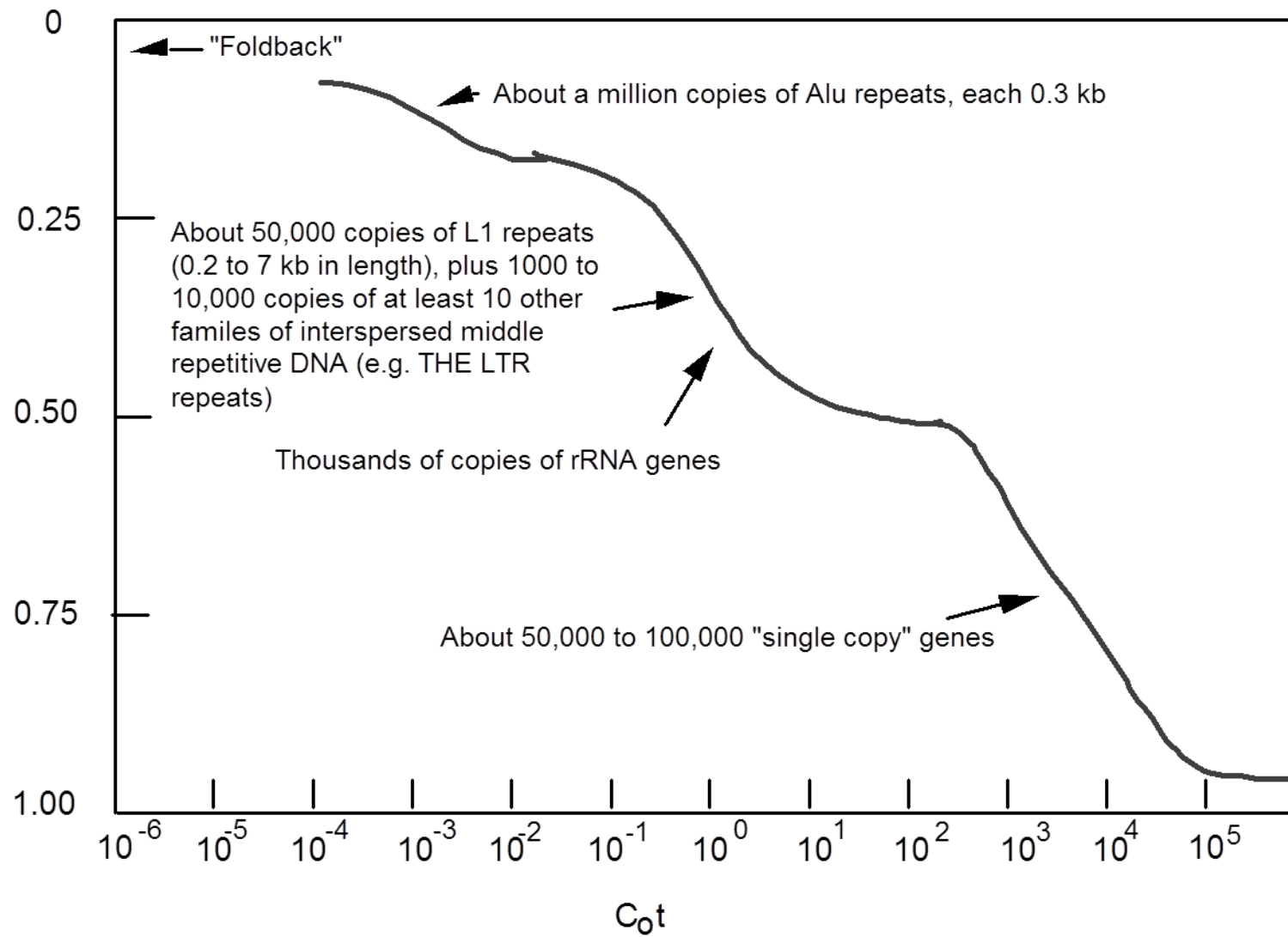
- 1)  $C_0$   $\longrightarrow$  Concentrazione espressa in nucleotidi/unità di volume
- 2) Tempo

La misura della velocità di rinaturazione può fornire utili informazioni circa la complessità del DNA

Curva  $C_0t$

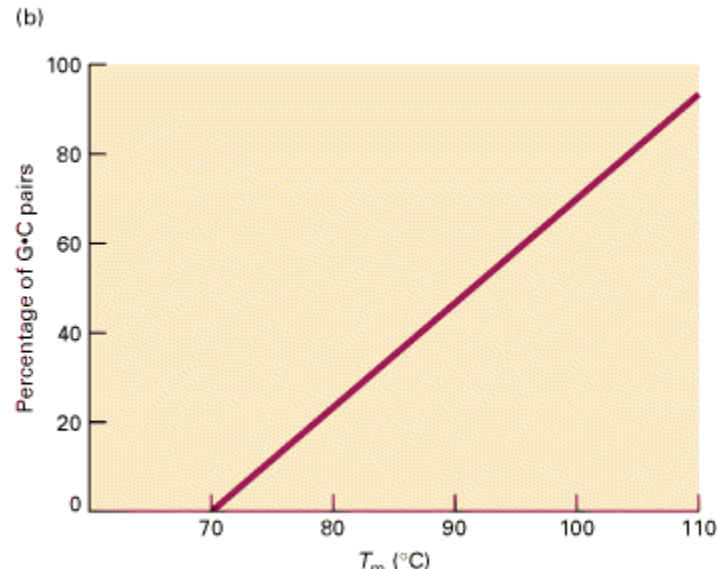
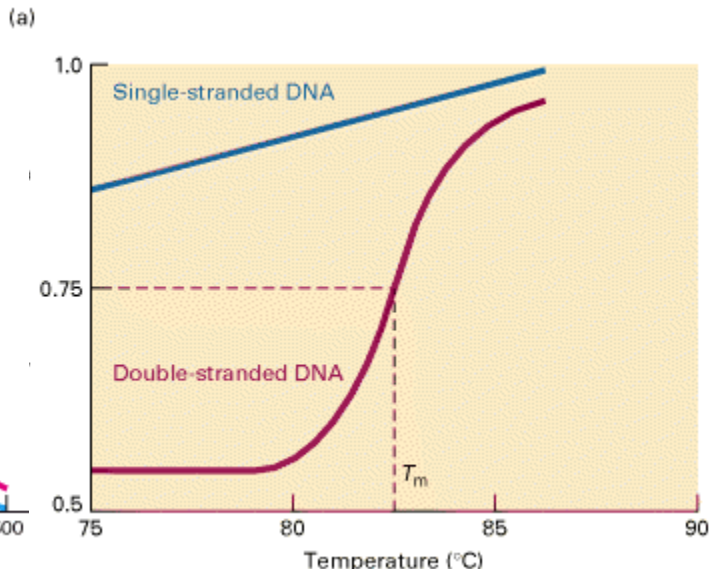
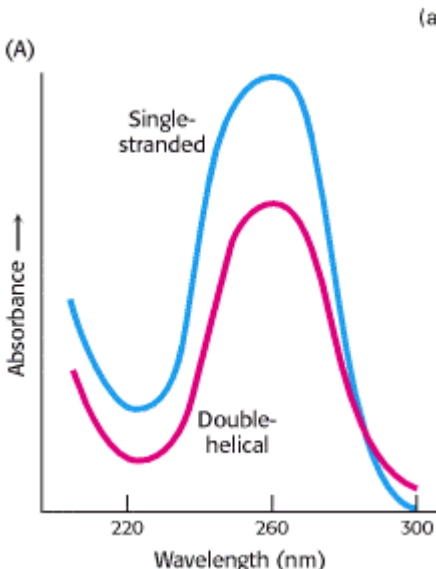
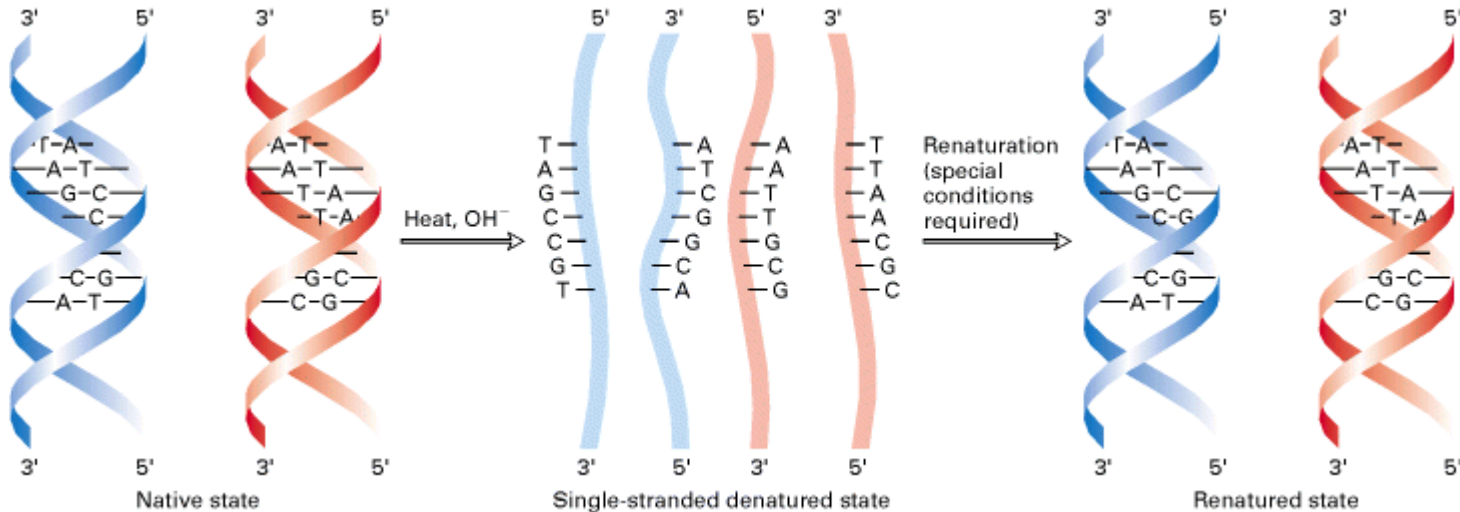


# Human DNA

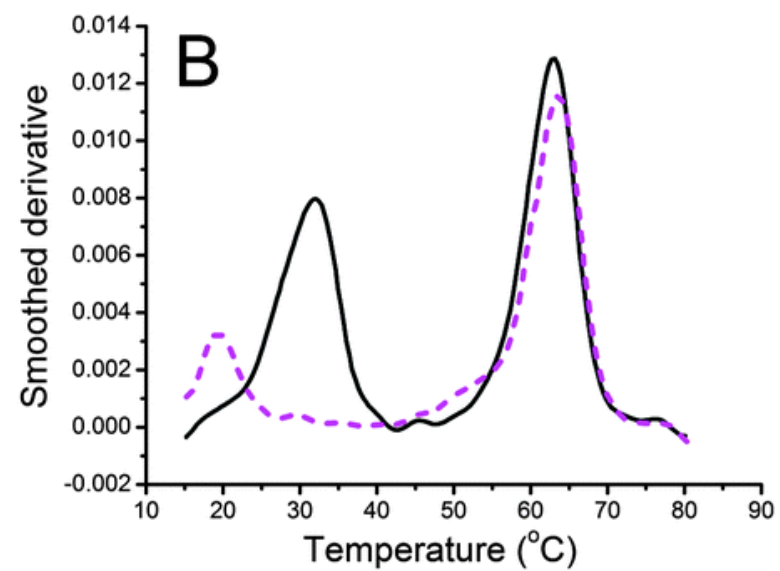
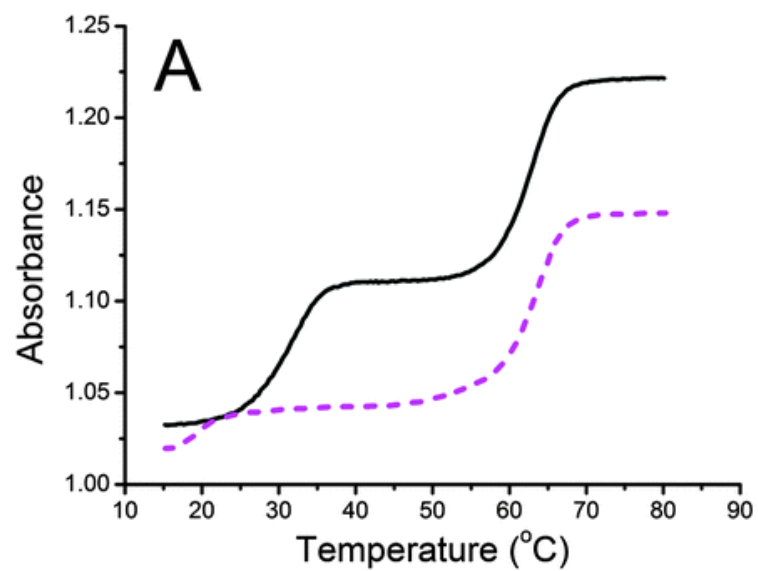


Time required for half-renaturation is directly proportional to sequence complexity

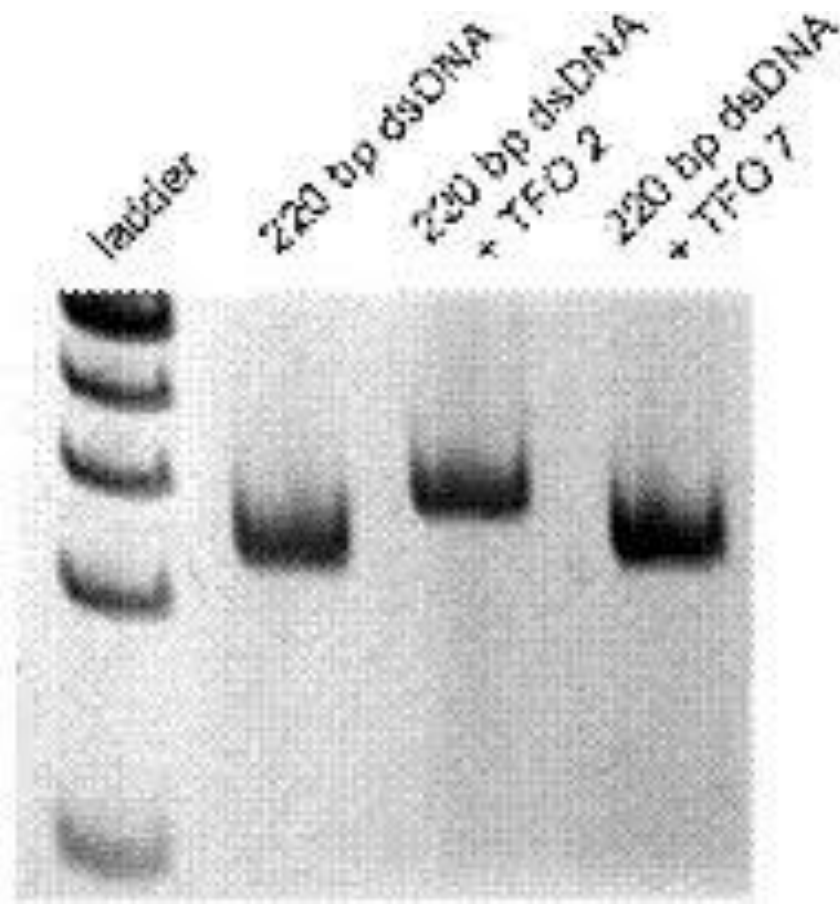
RIASSUMENDO.....

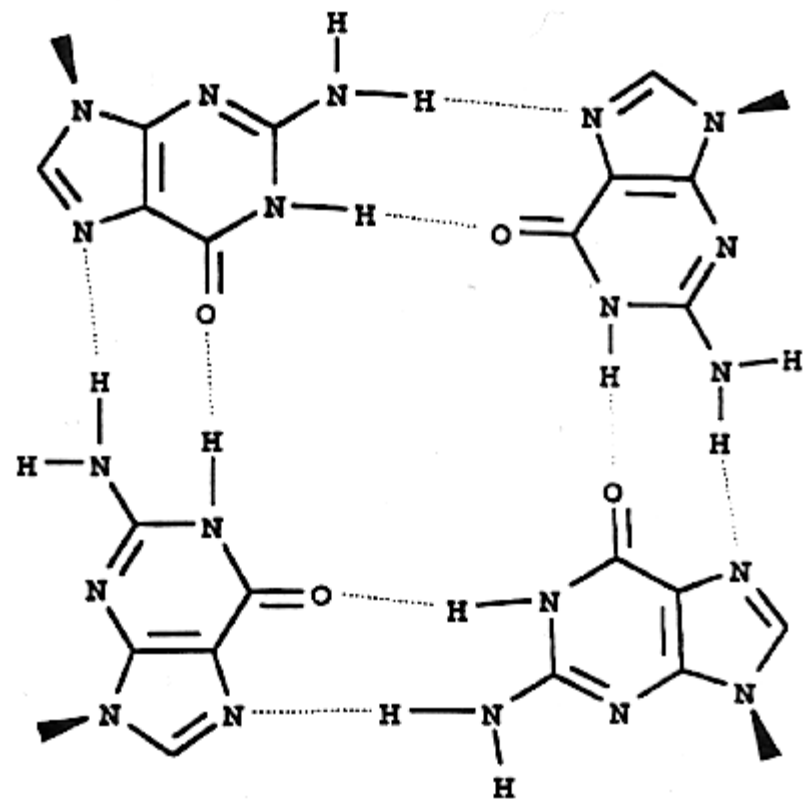
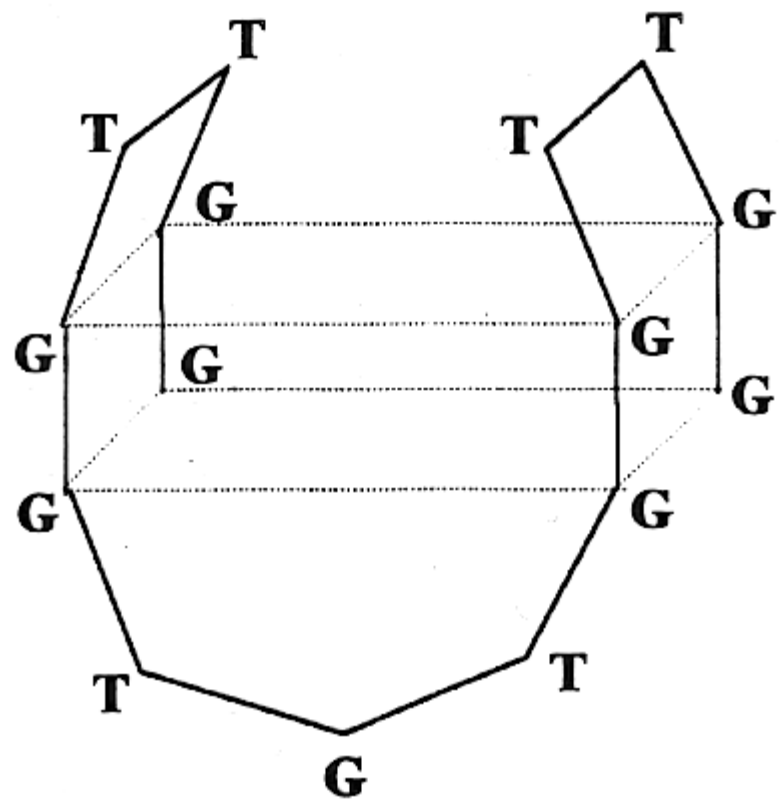


## Transizione duplex-triplex



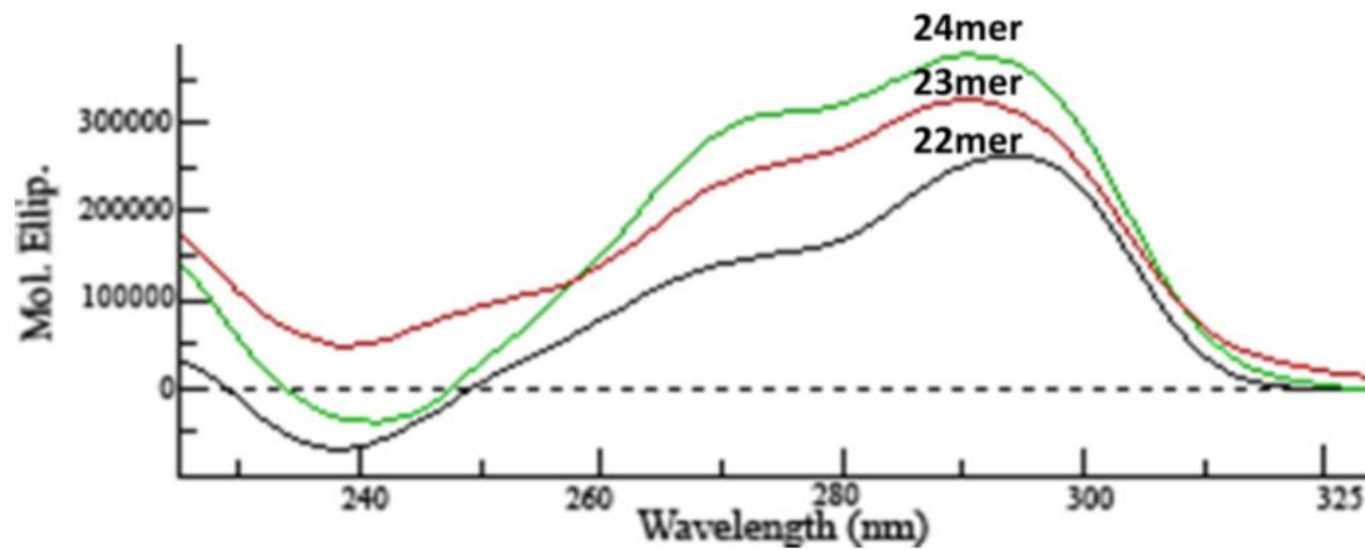
50



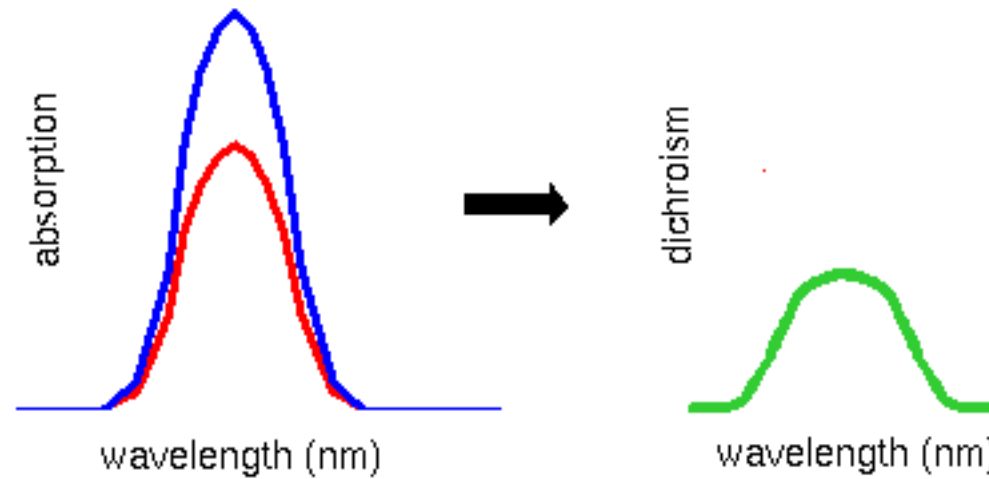




Quadruplex picchi positivi a 270 e a 290 nm



## Dicroismo circolare



- *Il Dicroismo circolare* è la differenza tra la luce destra e sinistra circolarmente polarizzata ed è misurata in funzione della lunghezza d'onda
- La differenza tra l'assorbimento a **destra** e quello a **sinistra** dà il **dicroismo circolare**
- L'analisi di spettri CD dà importanti informazioni sulla struttura secondaria di molecole come proteine e acidi nucleici.