

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
inéditas



TESIS DOCTORAL

## **Propiedades biofísicas del bacteriófago O29**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Victor Rubio Susán**

Madrid, 2015

BIBLIOTECA UCM



5306705214

RUB  
pmo

PROPIEDADES BIOFISICAS DEL BACTERIOFAGO Ø29

Tesis presentada por  
VICTOR RUBIO SUSAN  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas



Madrid, Mayo, 1973

R. 23. 596

a David, María, Alberto y a su  
madre.

## INDICE

1. INDICE GENERAL
2. INDICE DE FIGURAS
3. INDICE DE TABLAS
4. INDICE DE PLACAS

## INDICE GENERAL

	página
I. INTRODUCCION .....	1
II. MATERIALES	17
II.1. Bacteria huésped y fago .....	17
II.2. Medios de cultivo .....	17
II.3. Enzimas .....	17
II.4. Tampones .....	18
II.5. Productos y materiales varios .	18
II.6. Cromatografía .....	19
II.7. Electroforesis .....	21
II.8. Radioactividad .....	23
II.9. Microscopía electrónica .....	23
II.10. Equipo .....	23
III. METODOS	
III.1. Crecimiento de la bacteria huésped .....	25
III.2. Valoración de Ø29 .....	25
III.3. Preparación de lisados de Ø29 .	27
III.4. Purificación de Ø29 .....	28
4.1. Concentración del fago ...	28
4.2. Cromatografía en vidrio de poro controlado .....	29
4.3. Centrifugación diferencial	29

	página
4.4. Centrifugación en cloruro de cesio .....	30
4.5. Centrifugación en gradiente de sacarosa .....	30
III.5. Electroforesis en gel de poli-acrilamida .....	31
5.1. Electroforesis en un sistema con pH continuo .....	31
5.2. Electroforesis en un sistema con pH discontinuo ....	33
III.6. Aislamiento de la proteína de $\phi 29$ .....	35
6.1. Tratamiento de $\phi 29$ con EDTA .....	35
6.2. Hidrólisis del DNA .....	35
6.3. Cromatografía en Sephadex G-50 .....	36
6.4. Centrifugación hasta equilibrio de densidad en cloruro de cesio .....	36
III.7. Aislamiento del DNA de $\phi 29$ ....	36
III.8. Análisis químicos .....	37
8.1. Análisis de carbono y nitrógeno .....	37
8.2. Análisis de fósforo .....	38
8.3. Análisis de DNA .....	39
8.4. Análisis de hexosas .....	40
8.5. Análisis de aminoácidos ..	41
8.6. Análisis de bases .....	45
III.9. Determinación de densidades ...	48
III.10. Determinación de viscosidades .	50

	página
III.11. Determinación de absorbancias..	50
III.12. Determinación de peso seco ....	52
III.13. Determinación de volúmenes espe cíficos .....	55
13.1. Volumen específico de Ø29	56
13.2. Volumen específico de la proteína de Ø29 .....	57
13.3. Volumen específico del DNA de Ø29 .....	58
III.14. Determinación de coeficientes de sedimentación .....	59
14.1. Ecuaciones fundamentales	59
14.2. Corrección a condiciones estandar .....	61
14.3. Determinación experimen- tal .....	65
III.15. Determinación de coeficientes de difusión .....	67
15.1. Ecuaciones fundamentales	67
15.2. Corrección a condiciones standar .....	73
15.3. Determinación experimen- tal .....	76
1) Método de la relación altura-área .....	76
2) Método de Longsworth .	78
3) Método del papel de probabilidad . .....	87
III.16. Determinación de movilidades electroforéticas .....	88
III.17. Espectros ultravioleta .....	91

III.18. Microscopía electrónica .....	92
IV. RESULTADOS	
IV.1. Purificación de Ø29. Rendimiento y homogeneidad .....	94
IV.2. Composición química de Ø29 .....	107
2.1. Análisis de fago completo ..	107
2.2. Composición de aminoácidos de la proteína de Ø29 .....	113
IV.3. Absorbancia específica de Ø29 ...	117
IV.4. Absorbancia específica de la proteína de Ø29 .....	121
IV.5. Volumen específico de Ø29 .....	123
IV.6. Volumen específico de la proteína de Ø29 .....	127
IV.7. Volumen específico del DNA de Ø29	129
IV.8. Coeficiente de sedimentación de Ø29 .....	131
IV.9. Coeficiente de difusión de Ø29 ..	137
9.1. Método de la relación altura-área .....	137
9.2. Método de Longsworth	140
9.3. Método del papel de probabilidad .....	152
IV.10. Punto isoeléctrico de Ø29 .....	176
IV.11. Peso molecular de Ø29 .....	181
11.1. A partir de la ecuación de Svedberg .....	181

11.2. A partir de la composición química .....	183
V. DISCUSION .....	188
VI. CONCLUSIONES .....	197
VII. BIBLIOGRAFIA	

## INDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1. Relación entre absorbancia a 660 nm y densidad bacteriana .....	26
Figura 2. Relación entre $A_{260}$ y dilución de una disolución de $\phi 29$ en diluyente de fago .....	54
Figura 3. Ensanchamiento de un límite inicialmente nítido durante difusión libre	72
Figura 4. Interferograma de un límite de difusión obtenido con un interferómetro Rayleigh .....	80
Figura 5. Síntesis de una curva integral de difusión completa .....	82
Figura 6. Infección de <u>B. amyloliquefaciens</u> con $\phi 29$ .....	97
Figura 7. Cromatografía de un lisado concentrado con polietilenglicol, en una columna de vidrio de poro controlado.	98
Figura 8. Centrifugación en ClCs del pico excluido en el cromatograma de la fig. 7 .....	99
Figura 9. Centrifugación en ClCs de las fracciones del pico II de la fig. 8 ...	100
Figura 10. Sedimentación de $\phi 29$ en un gradiente de sacarosa 5-20% en diluyente de fago .....	104
Figura 11. Valoración de DNA en $\phi 29$ .....	110
Figura 12. Valoración de fósforo total en $\phi 29$ .	111
Figura 13. Valoración de hexosas en la proteína de $\phi 29$ .....	112

Figura 14.	Relación entre $A_{260}$ de $\phi 29$ en diluyente de fago y peso seco del virus	119
Figura 15.	Relación entre densidad y concentración de $\phi 29$ en diluyente de fago a $20^{\circ}\text{C}$ .....	125
Figura 16.	Posición del límite de sedimentación de $\phi 29$ en función del tiempo. 6.5 unidades de $A_{260}$ .....	133
Figura 17.	Variación del coeficiente de sedimentación de $\phi 29$ con la concentración .	135
Figura 18.	Relación entre $(A/H)^2/G^2$ y $t$ durante la difusión de $\phi 29$ en diluyente de fago a $1^{\circ}\text{C}$ . Concentración = 30.0 unidades de $A_{260}$ .....	139
Figura 19.	Relación entre $4Dt (\Delta H/\Delta h)^2$ y $t$ durante la difusión de $\phi 29$ en diluyente de fago a $1^{\circ}\text{C}$ . Concentración = 30.0 unidades de $A_{260}$ .....	151
Figura 20.	Relación entre el porcentaje de franjas y su posición respecto al eje de la célula a diferentes tiempos durante la difusión de $\phi 29$ en diluyente de fago a $1^{\circ}\text{C}$ . Concentración = 30.0 unidades de $A_{260}$ .....	155
Figura 21.	Relación entre $\sigma^2$ y $t$ durante la difusión de $\phi 29$ en diluyente de fago a $1^{\circ}\text{C}$ . Concentración = 30.0 unidades de $A_{260}$ .....	156
Figura 22.	Variación del coeficiente de difusión de $\phi 29$ con la concentración ...	159
Figura 23.	Relación entre $D$ y $1/t$ durante la difusión de $\phi 29$ en diluyente de fago a $20^{\circ}\text{C}$ . Concentración = 9,3 unidades de $A_{260}$ .....	175
Figura 24.	Migración electroforética de $\phi 29$ a pH 2,7 y $I = 0,1$ en función de $\frac{t}{I}$ , sometido a un campo de $3,46 \text{ V cm}^{-1}$ .....	178
Figura 25.	Punto isoeléctrico de $\phi 29$ .....	180

## INDICE DE TABLAS

	página
Tabla 1. Electroforesis en poliacrilamida-SDS con pH discontinuo .....	34
Tabla 2. Análisis de triptófano: valores de la relación molar <i>t</i> rosina/triptófano en función de S. ....	46
Tabla 3. Análisis de bases del DNA de $\phi 29$ ....	49
Tabla 4. Determinación de la densidad de una disolución de $\phi 29$ por picnometría ...	51
Tabla 5. Determinación de la absorbancia a 260 nm de una disolución de $\phi 29$ en diluyente de fago .....	53
Tabla 6. Determinación de los valores $4Dt (\Delta H/\Delta h)^2$ a partir de un interferograma Rayleigh de difusión .....	86
Tabla 7. Purificación de $\phi 29$ .....	106
Tabla 8. Composición de $\phi 29$ . Porcentajes de C, N y H .....	108
Tabla 9. Composición de $\phi 29$ . Análisis de DNA y P .....	109
Tabla 10. Composición de aminoácidos de la proteína de $\phi 29$ .....	114
Tabla 11. Composición de bases del DNA de $\phi 29$ .	116
Tabla 12. Absorbancia específica a 260 nm de $\phi 29$ en diluyente de fago .....	120
Tabla 13. Absorbancia específica a 260 nm de la proteína de $\phi 29$ en diluyente de fago	121
Tabla 14. Relación entre densidad y concentración de disoluciones de $\phi 29$ en diluyente de fago, a 20°C .....	124

Tabla 15.	Volumen específico de $\phi 29$ .....	126
Tabla 16.	Volumen específico de la proteína de $\phi 29$ .....	128
Tabla 17.	Volumen específico del DNA de $\phi 29$ .	130
Tabla 18.	Sedimentación de $\phi 29$ en una disolución de concentración 6.5 unidades de $A_{260}$ .....	132
Tabla 19.	Relación entre coeficiente de sedimentación y concentración de soluciones de $\phi 29$ en diluyente de fago a $20^{\circ}\text{C}$ .....	134
Tabla 20.	Coficiente de sedimentación, $s_{20,W}^{\circ}$ de $\phi 29$ .....	136
Tabla 21.	Coficiente de difusión de $\phi 29$ a $1^{\circ}\text{C}$ y 30.0 unidades de $A_{260}$ . Método de la relación altura-área .....	138
Tabla 22.	Coficiente de difusión de $\phi 29$ a $1^{\circ}\text{C}$ y 30.0 unidades de $A_{260}$ . Método de Longsworth .....	141-9
Tabla 23.	Valores de $4Dt (\Delta H/\Delta h)^2$ en función de $t$ a $1^{\circ}\text{C}$ durante la difusión de $\phi 29$ a una concentración de 30.0 unidades de $A_{260}$ .....	150
Tabla 24.	Coficiente de difusión de $\phi 29$ a $1^{\circ}\text{C}$ y 30.0 unidades de $A_{260}$ . Método del papel de probabilidad .....	153-4
Tabla 25.	Relación entre coeficiente de difusión y concentración de soluciones de $\phi 29$ en diluyente de fago a $1^{\circ}\text{C}$ .	158
Tabla 26.	Coficiente de difusión, $D_{20,W}^{\circ}$ de $\phi 29$ .....	160
Tabla 27.	Coficiente de difusión de $\phi 29$ a $20^{\circ}\text{C}$ .....	161-73
Tabla 28.	Valores de $D$ en función de $1/t$ a $20^{\circ}\text{C}$ durante la difusión de $\phi 29$ a una concentración de 9,3 unidades de $A_{260}$ .....	174

	página
Tabla 29. Distancias recorridas por Ø29 a pH 2,7 y $I = 0,1$ sometido a un campo de $3,46 \text{ V cm}^{-1}$ .....	177
Tabla 30. Movilidad electroforética de Ø29 en tampón de Michaelis (10°C; $J = 0,1$ ) en función del pH .....	179
Tabla 31. Peso molecular de Ø29 a partir de la ecuación de Svedberg .....	182
Tabla 32. Porcentaje de N en la proteína de Ø29 .....	184
Tabla 33. Porcentaje de N y P en el DNA de Ø29	185
Tabla 34. Peso molecular de Ø29 deducido de su composición química y del peso molecular del DNA .....	186-7

INDICE DE PLACAS

	página
Placa I. Microscopía electrónica de Ø29 en el pico I del gradiente de ClCs de la figura 8 .....	101
Placa II. Microscopía electrónica de variantes morfológicas de Ø29 en el pico II del gradiente de ClCs de la figura 8 ...	102
Placa III. Microscopía electrónica de componentes estructurales sin DNA en el pico III del gradiente de ClCs de la figura 8 .....	103
Placa IV. Electroforesis en poliacrilamida-SDS (pk discontinuo) de las proteínas de Ø29 (pico I del gradiente de la figura 8) .....	105

El trabajo que presento como tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias, ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular del Instituto G. Marañón (C.S.I.C.) bajo la dirección del Dr. Eladio Viñuela a quien quiero expresar mi agradecimiento por su ayuda, enseñanzas y orientación en el desarrollo del trabajo. Quiero también agradecer a la Dra. Margarita Salas su apoyo y sugerencias y a ambos su continuo interés por mi formación.

Igualmente quiero expresar mi agradecimiento al Profesor José Luis Rodríguez-Candela, director del Instituto G. Marañón, por su amable acogida en el Instituto.

También deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Juan Francisco Llopis y a los doctores Armando Albert, Pilar Usobiaga y José L. Saiz, del Instituto Rocasolano (C.S.I.C.), por su ayuda en el planteamiento y realización de parte del trabajo.

Así mismo expreso mi agradecimiento al Dr. Cesar Vásquez de la Facultad de Medicina de Buenos Aires por su inapreciable ayuda en la microscopía electrónica. A mis compañeros Jesús Avila, Javier Corral, José Miguel Hermoso, Juan José Lopez-Fando, Enrique Méndez, Miguel Angel Moreno, Antonio Nieto, Juan Ortín, Galo Ramírez, Matilde Salinas y Antonio Talavera, agradezco su ayuda material y valiosas sugerencias, al Sr. Eloy Blanco su ayuda técnica en el microscopio electrónico y fotografía, al Sr. Jesús López su ayuda en el crecimiento de bacterias, a las Srtas Eloisa Cano, Nieves Fonturbel, Irene Romo y Pilar Zaragoza su ayuda técnica. A las Srtas Margarita Corral, Victoria Gijón y al Sr. Javier de la Torre su ayuda en la preparación del manuscrito.

Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca para la formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

I. I N T R O D U C C I O N

Un hecho esencial para la comprensión de la estructura y organización funcional de los virus es que el agente infeccioso es el ácido nucleico que está contenido en una cubierta proteica protectora o cápsida, que transmite el ácido nucleico de huésped a huésped.

En 1956, Crick y Watson (1) hicieron la hipótesis de que la cápsida de los virus más simples está formada por subunidades de proteína idénticas acopladas de un modo regular. La naturaleza multimérica de la cápsida es una necesidad física porque su masa es varias veces mayor que la del ácido nucleico que encierra. La naturaleza triplete de la clave genética (2,3) indica que tres nucleótidos de masa media 1.000 determinan un aminoácido de masa media 100. Es decir, un ácido nucleico puede especificar, como máximo, una masa de proteína diez veces menor que la suya propia.

En las proteínas multiméricas, formadas por la repetición de uno o un pequeño número de protómeros, estos deben disponerse de un modo regular pues, al ser iguales, deben establecer entre sí contactos recíprocos idénticos, dando lugar a simetrías estruc-

turales. A primera vista, podría parecer que el número de formas con las que podría conseguirse este objetivo es grande. La realidad es, sin embargo, lo contrario. De las tres operaciones básicas de simetría (translación, rotación y reflexión), en las estructuras biológicas a nivel molecular sólo hay que considerar las dos primeras y las simetrías que pueden formarse por combinación de las mismas (por ejemplo, la simetría helicoidal), pues la presencia de átomos de carbono asimétricos en las moléculas de los seres vivos, especialmente en proteínas y ácidos nucleicos, elimina las simetrías de reflexión. Un análisis detallado de estas operaciones de simetría muestra que el número posible de combinaciones es finito y enumerable (4).

El análisis de una serie de virus bacterianos, vegetales y animales ha mostrado que la mayoría de ellos pertenecen a tres estilos arquitectónicos :

- (a) Virus alargados en forma de bastoncillo
- (b) Virus isométricos o esféricos
- (c) Virus con una forma que combina los estilos (a) y (b).

Los diseños geométricos básicos para la cons-

trucción de cápsidas formadas por la asociación de subunidades de proteína idénticas son dos : el tubo helicoidal y el icosaedro. La hélice es la curva descrita por un punto sobre la superficie lateral de un cilindro cuando éste gira alrededor de su eje longitudinal y al mismo tiempo se desplaza a lo largo del mismo eje. El icosaedro es uno de los cinco poliedros regulares formado por veinte caras, triángulos equiláteros, doce vértices y treinta aristas.

#### Virus helicoidales.

El virus helicoidal mejor estudiado es el virus del mosaico del tabaco. Cada partícula de virus está formada por una molécula de RNA, que contiene unos 6.000 nucleótidos, y unas 2.100 subunidades idénticas de proteína, cada una de las cuales contiene 158 aminoácidos (5). Las subunidades de proteína están muy empaquetadas entre sí con una distribución helicoidal y el RNA está enrollado entre las vueltas de la hélice de proteína, existiendo una correspondencia de tres nucleótidos en el RNA por cada subunidad de proteína (6).

¿Por qué una hélice? Partiendo de subunidades

asimétricas iguales, de tal modo que la posición relativa de cada subunidad con respecto a la siguiente sea la misma, las únicas estructuras posibles son : en una dimensión, una línea recta; en dos dimensiones, una línea en zig-zag y, en tres dimensiones, una hélice (7). Por tanto, la propiedad fundamental de la hélice es que todas las subunidades iguales, dispuestas a lo largo de la misma, se encuentran en posiciones equivalentes. Esto no ocurre en los extremos de la estructura, pero éstos quedan definidos por la longitud del RNA.

#### Virus icosaédricos.

Crick y Watson (1,8), cuando hicieron la hipótesis de que la cápsida de los virus sencillos debería estar formada por asociación de subunidades de proteína idénticas y que esto conduce, necesariamente, a estructuras regulares, indicaron también que de todos los tipos de simetría posibles, sólo la simetría cúbica conduciría a una partícula isométrica.

La propiedad fundamental de la simetría cúbica es que las tres coordenadas en el espacio son equivalentes y, por tanto, no hay preferencia por nino

guna dirección determinada. Esto conduce, automáticamente, a estructuras isométricas o esféricas.

En cada uno de los tres tipos de simetría cúbica (tetraédrica (3:2), tetraedro; octaédrica (4:3:2), cubo y octaedro; icosaédrica (5:3:2), dodecaedro e icosaedro), se pueden disponer en posiciones equivalentes sobre la superficie de una esfera 12, 24 y 60 subunidades asimétricas iguales, respectivamente.

A partir de 1956 un gran número de observaciones de virus por difracción de rayos X y microscopía electrónica mostraron que de los tres tipos de simetría cúbica, la preferida era la icosaédrica. Prácticamente todos los virus isométricos estudiados hasta la fecha presentan simetría icosaédrica. La demostración mas clara de la simetría icosaédrica de los virus esféricos fué la obtenida del estudio de los virus iridiscentes de los insectos, pues estos virus son de un tamaño suficientemente grande para mostrar su estructura regular directamente en el microscopio electrónico, cuando las preparaciones se sombream con átomos de un metal pesado (9).

El hecho de que la forma externa de un virus

sea icosaédrica no implica, necesariamente, que esta simetría se extienda hasta un nivel molecular. Sin embargo, el análisis de virus isométricos por difracción de rayos X demostró de un modo concluyente que la simetría icosaédrica no es sólo externa, sino que también existe una distribución geométrica icosaédrica de las subunidades asimétricas de proteína (10-13).

En un principio, para justificar la preferencia de la simetría icosaédrica sobre la tetraédrica y la octaédrica se hicieron dos tipos de consideraciones :

(a) La simetría icosaédrica permite colocar en posiciones equivalentes sobre la superficie de una esfera un número de subunidades asimétricas mayor que los otros dos tipos de simetría (60 comparado con 12 y 24, en el caso de las simetrías tetraédrica y octaédrica, respectivamente). Por tanto, la superficie de la esfera se puede cubrir con subunidades mas pequeñas, lo cual supone una economía de información genética (14).

(b) Se puede demostrar geoméricamente que si se desea cerrar un espacio alrededor de un punto cen-

tral con un conjunto de elementos iguales, la relación entre el número de elementos y el área de la superficie cubierta es un mínimo cuando los elementos se disponen con simetría icosaédrica (14).

Sin embargo, cuando pudo determinarse el número de unidades morfológicas o capsómeros de los virus isométricos se observó que este número no era 60 ni un múltiplo de 60, como correspondería a una estructura con simetría icosaédrica. En general, el número de capsómeros era superior a 60 (15). Como se ha indicado antes, es imposible colocar mas de 60 elementos idénticos sobre la superficie de una esfera de modo que la posición relativa de cada elemento se la misma. Para salir de la paradoja estructural resultante de la discordancia entre la simetría icosaédrica observada y el número de capsómeros presente en los virus isométricos, Caspar y Klug (14) abandonaron la idea de la equivalencia matemática estricta en la colocación de los capsómeros reteniendo, sin embargo, los aspectos físicos esenciales. El problema planteado era encontrar un modo de colocar mas de 60 elementos sobre la superficie de un esfera de modo que sus posiciones relativas sean casi equivalentes, es decir, que la desviación de los ángulos de enlace de unas

subunidades respecto a otras fuera mínima.

La solución de Caspar y Klug (14) se inspiró en los principios empleados por Fuller en la construcción de cúpulas geodésicas (16). Aplicando los mismos principios al diseño de la cápsida de los virus isométricos, Caspar y Klug demostraron que una cápsida isodimensional sólo se puede construir de un modo general y este método específico conduce, necesariamente, a una simetría icosaédrica.

La hipótesis básica es que la estructura de la cápsida se mantiene por el mismo tipo de enlaces en toda su extensión, pero que estos enlaces pueden deformarse de modos ligeramente distintos. Esto tiene como consecuencia que las posiciones relativas de los capsómeros no sean equivalentes, sino casi-equivalentes.

Si imaginamos un poliedro formado por unidades estructurales agrupadas en capsómeros, el problema era determinar las clases de poliedros en los que la desviación de los ángulos de enlace entre las unidades estructurales sea un mínimo, comparados con los ángulos de enlace de las mismas unidades si estuviesen dispuestas en posiciones estrictamente equivalentes.

tes. Pawley (17) ha demostrado que solo hay dos tipos de retículos planos, sin simetría de reflexión, que pueden plegarse para dar lugar a un poliedro convexo en el que las posiciones relativas de los elementos sean análogos a las existentes en el plano. Uno de ellos es un retículo de cuadrados y el otro de triángulos equiláteros. El primero solo puede plegarse para dar lugar a un cubo, si en cada punto del retículo se unen tres aristas. Un retículo de triángulos equiláteros puede plegarse para dar lugar a un tetraedro, octaedro o icosaedro, respectivamente, si en cada vértice del retículo se unen tres, cuatro o cinco aristas.

Ahora supongamos que en el centro de cada cara se encuentra una unidad estructural, formando un ángulo de enlace de  $90^{\circ}$  con las subunidades contiguas en el caso de un retículo de cuadrados y un ángulo de  $120^{\circ}$  en el caso del retículo de triángulos equiláteros. Si de estos retículos planos formamos los poliedros indicados antes, los ángulos de enlace entre las unidades estructurales cambian un mínimo en el caso del icosaedro. Por tanto, energéticamente el icosaedro es la estructura mas estable.

Si consideramos un número mayor de unidades es tructurales en un retículo triangular, dividiendo cada triángulo equilátero en otros tres y en cada uno de estos colocamos tres unidades estructurales idénticas cuyos ángulos de enlace son de  $120^{\circ}$ , al cerrarse el retículo para dar lugar a una estructura con simetría icosaédrica, las unidades estructurales quedan agrupadas en grupos de seis unidades o hexámeros, situados sobre los centros de las aristas, y capsómeros de cinco unidades o pentámeros, que ocupan los doce vértices del icosaedro. Si como hemos convenido, las unidades estructurales son iguales, los ángulos de en lace de los pentámeros serán menos estables que los de los hexámeros, pero mas estables que en el caso en que los capsómeros de los vértices fuesen trímeros (tetraedro) o tetrámeros (octaedro).

El problema quedó reducido a determinar todos los poliedros con caras triangulares y simetría icosaédrica (icosadeltaedro). El primer miembro de la serie es el icosaedro, formado por 20 caras triángulos equiláteros. Cualquier icosadeltaedro tendrá 20 T caras triangulares, siendo T el número de triangu- lación, es decir, el número de triángulos equiláteros en que puede dividirse el triángulo original.

El número de triangulación, T, solo puede tomar ciertos valores dados por la expresión

$$T = Pf^2,$$

siendo f cualquier número entero. P viene dado por la expresión

$$P = h^2 + hk + k^2,$$

siendo h y k dos números cualesquiera primos entre sí.

Para un valor fijo de P, dando a f valores sucesivos se obtienen las triangulaciones sucesivas del deltaedro original.

Cada unidad estructural puede visualizarse acoplada a un tercio de cada cara triangular. Por tanto, el número total de unidades estructurales, E, será

$$E = 3 \times 20 T = 60 T$$

Las unidades morfológicas o capsómeros serán de dos tipos : hexámeros, formados por el agrupamiento de seis unidades estructurales, y pentámeros, formados por el agrupamiento de cinco unidades estructurales. El número de pentámeros, P, es igual al número de vértices del icosaedro, es decir, doce. Para determinar el número de hexámeros basta tener en cuenta

que el número de unidades estructurales,  $60T$ , es igual al número de unidades presentes en hexámeros,  $6H$ , mas el de unidades presentes en pentámeros, igual a 60. Es decir,

$$60T = 6H + 60.$$

y, por tanto,

$$H = 10(T-1)$$

#### Virus no isométricos.

Muchos virus bacterianos poseen una organización estructural mas complicada que la de los virus helicoidales e icosaédricos (18). La cubierta proteica está formada por la cápsida propiamente dicha, que encierra al ácido nucleico y una cola por la que el virus se fija a los receptores de la bacteria huésped y a través de la cual se inyecta el material genético del virus. La cápsida puede presentar simetría icosaédrica, como en el caso del fago lambda que ataca a Escherichia coli, pero en otros casos, como en el colifago  $T_4$ , la cápsida es demasiado alargada para poseer simetría icosaédrica.

El virus no isométrico mejor estudiado es el fago  $T_4$ . La cápsida de este virus tiene un contorno

exagonal alargado longitudinalmente y encierra una molécula de DNA de dos bandas con un peso molecular de  $120 \times 10^6$  (19). T4 posee una cola, unida a la cabeza a través de un cuello, formada por un núcleo central rodeado de una vaina contráctil. En el extremo de la cola hay una placa basal, con simetría exagonal, de la que salen seis fibras.

La cápsida de T4 es demasiado alargada para tener simetría icosaédrica. Sin embargo, como extensión de la teoría general de la organización de los virus isométricos, se ha postulado que el diseño de la cápsida de T4 puede originarse por plegamiento de un retículo exagonal. De este modo la cabeza de T4 se ha llamado un icosaedro prolato, formado por las pirámides de un icosaedro separadas por dos bandas ecuatoriales de 10 triángulos cada una (20-22). Sin embargo, el fago T4 es, estructuralmente, muy complejo (23,24) y su química poco conocida, lo cual hace imposible, por ahora, hacer una correlación entre la geometría general de la cápsida y las proteínas que la forman. Esto ha llevado a proponer otras formas geométricas menos convincentes para la cápsida de T4 (25).

El bacteriófago Ø29 es un virus pequeño, espe-

cífico para varias especies de Bacillus (26), que consta de una cabeza alargada con contorno exagonal (40 x 30 nm) y con fibras (14 x 2 nm), un cuello formado por dos collares y doce apéndices radiales y una cola corta (27). El material genético de Ø29 es un DNA bicatenario con un peso molecular de unos  $11 \times 10^6$  (28), que puede aislarse en una forma circular cerrada por una proteína viral que puede jugar un papel importante en el empaquetamiento del ácido nucleico dentro de la cápsida (29).

La parte proteica de Ø29 consta de siete proteínas estructurales. La cabeza contiene, aparte de la proteína asociada al DNA, otras tres proteínas, que forman la cápsida y que se han denominado HP1, HP2 y HP3. HP1 es la proteína fundamental de la cápsida y HP3 es la proteína que forma las fibras; la función de la proteína HP2 es desconocida. El collar superior, el collar inferior, los apéndices del cuello y la cola parecen estar formados cada uno por una proteína denominada, respectivamente, NP2, NP3, NP1 y TP1 (29-32).

El pequeño tamaño de la partícula viral y del DNA de Ø29 y la correlación ya realizada entre los

5306705214

componentes estructurales del fago y las proteínas que los forman, hacen de este virus un material adecuado para tratar de correlacionar su geometría con las proteínas que forman el virus. Para este fin es previo un estudio químico-físico del virus que permita determinar la masa molecular de la partícula. Conocida ésta, la del DNA y las masas relativas y los pesos moleculares de cada una de las proteínas estructurales, es posible determinar el número de subunidades de cada proteína presentes en el virus. Esto ha permitido elaborar un modelo estructural para la cápsida de  $\emptyset 29$  como un icosaedro prolato, compatible no sólo con las propiedades químicas y químico-físicas del virus, sino también con la existencia de una serie de variantes morfológicos del fago normal, producidos espontáneamente o por infección de mutantes sensibles a temperatura, crecidos a la temperatura no permisiva (33-36).

El trabajo que presentamos contiene un método de purificación del fago  $\emptyset 29$ , que permite obtener del orden de un gramo de virus infectivo y homogéneo, y que se puede escalar fácilmente, métodos de aislamiento del DNA y de la proteína del virus, análisis de bases del DNA y de aminoácidos de la proteína del virus, cuatro métodos diferentes e independientes pa-

ra determinar la masa molecular de la partícula viral, así como la determinación de una serie de constantes químico-físicas y análisis químicos del fago. En la purificación del fago se ha aislado, como una fracción lateral, una serie de variantes morfológicas de la partícula normal que parecen presentar un ensamblaje anómalo de los componentes estructurales del virus.

II. M A T E R I A L E S

### II.1. BACTERIA HUESPED Y FAGO

La bacteria huésped utilizada fué la estirpe HM de Bacillus subtilis (26), posteriormente descrita como perteneciente a la especie B. amyloliquefaciens (37). Dicha bacteria y el fago Ø29 fueron obtenidos de B.E. Reilly.

### II.2. MEDIOS DE CULTIVO

La triptona, extracto de levadura y el agar se compraron a Difco; la D-glucosa a Fisher Scientific Co. y el antiespumante (Rhodorsil) a Siliconas de España S.A.

### II.3. ENZIMAS

La DNasa pancreática, recristalizada una vez (lote D-9-DH), la RNasa pancreática, recristalizada una vez (lote R-642-5A) y la fosfodiesterasa de veneno de serpiente liofilizada (lote SPH-632) se compraron a Worthington Chemical Co.; la lisozima de clara de huevo, recristalizada tres veces (lote L-6876), a Sigma Chemical Co. y la pronasa (grado B) a Calbiochem.

Para eliminar las posibles contaminaciones de nucleasas en la pronasa, una solución del enzima en

Tris-ClH 10 mM, EDTA 20 mM, pH 8,1, a una concentración de 10 mg/ml, se incubó 3 horas a 37<sup>o</sup>C, se calentó posteriormente 5 minutos a 80<sup>o</sup>C y se enfrió inmediatamente en hielo (38).

#### II.4. TAMPONES

Las soluciones tampón se prepararon con agua destilada a partir de las siguientes soluciones concentradas: Tris-ClH 1 M, pH 7,8; EDTA-Na 0,25 M, pH 7,5; acetato sódico 1/7 M en barbital sódico 1/7 M-ClH 0,1 M; fosfato potásico 0,5 M, pH 7,5; Cl<sub>2</sub>Mg 1 M.

#### II.5. PRODUCTOS Y MATERIALES VARIOS

El cloruro de cesio, grado sequanal, se obtuvo de Pierce Chemical Co., el PEG 6000 se obtuvo de Serva, la sacarosa de May & Baker Ltd. El fenol se compró de Merk y se destiló a 180<sup>o</sup>C, calentando un matraz de 1 l que contenía aproximadamente 500 g de fenol; los vapores se recogieron sobre agua destilada.

Los tubos de diálisis de Unión Carbide Corporation se hirvieron en una disolución de EDTA 20 mM, SDS 0.1% durante 15 minutos para eliminar nucleasas, se lavaron con agua destilada y se conservaron estériles.

El resto de los productos químicos usados fueron productos especiales para análisis y se utilizaron sin posterior purificación.

## II.6. CROMATOGRAFIA

El Spherosil tipo C, con un diámetro medio de partícula de 100-200  $\mu$  y con un diámetro de poro de 20-40 nm, se compró a Serva Feinbiochemica, GMBH Co. Cada 300 g de Spherosil se resuspendieron agitando en 20 litros de agua desionizada y se dejó sedimentar para eliminar finos por decantación. Esta operación se repitió cuatro veces. A continuación se lavó con 2 litros de ClH 1 M durante 15 minutos y con H<sub>2</sub>O desionizada hasta eliminar el ácido, luego se trató con 2 litros de NH<sub>4</sub>OH 1 M durante 15 minutos, se eliminó la base por lavado con H<sub>2</sub>O, y finalmente, el spherosil se resuspendió en DF y se conectó a una bomba de vacío para eliminar el aire de los poros.

El Sephadex G-50 se obtuvo de Sigma Chemical Co. 100 g de Sephadex G-50 se resuspendieron en 2 litros de H<sub>2</sub>O destilada con agitación y se dejó sedimentar para eliminar finos por decantación. Esta operación se repitió 6 veces. A continuación se resuspendió en DF y se conectó a una bomba de vacío para eli-

minar el aire de los poros.

El papel Whatman 3 MM y Whatman 1 se compró a Reeve Angel.

Las resinas empleadas para el análisis de aminoácidos fueron resinas esféricas de poliestireno sulfonado entrecruzado con divinilbenceno. Para el análisis de los aminoácidos básicos se empleó la resina PA-35 de Beckman ( $13 \pm 6 \mu$ ; 7,5% de divinilbenceno), en una columna de 2,3 x 0,9 cm, y para los aminoácidos ácidos y neutros la resina PA-28 de Beckman ( $16 \pm 6 \mu$ ; 7,5% de divinilbenceno), en una columna de 69 x 0,9 cm.

Las resinas se limpiaron siguiendo el procedimiento indicado en el manual de instrucciones del analizador de aminoácidos Unichrom de Beckman:

La resina se recogió por filtración a través de Whatman nº 5 en un Buchner, se pasó a un vaso donde se cubrió con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  70% y la suspensión se mantuvo a  $70-80^\circ\text{C}$  durante 5 hr. La suspensión se diluyó cinco veces añadiendo el contenido del vaso lentamente sobre 4 volúmenes de agua destilada y la resina se recogió en un Buchner con papel Whatman nº 5, lavándose con agua destilada hasta que el filtrado dejó de salir ácido. La resina se lavó con  $\text{ClH}$  2 M hasta que el

filtrado salía incoloro y, a continuación, se pasó a un vaso donde se cubrió con ClH 2 M - EDTA 0,1%. La suspensión se incubó 2 hr a 70-80<sup>o</sup>C, se lavó sobre un Buchner con H<sub>2</sub>O, como antes, hasta que el filtrado sa lía neutro. La resina se pasó a un vaso donde se cubrió con NaOH 2 M - EDTA 0,1%, se calentó 30 min a 40<sup>o</sup>C, se recogió sobre papel Whatman nº 5, lavando con agua destilada hasta tener un filtrado neutro y, finalmente, con varios volúmenes del tampón inicial de la columna.

Los tampónes empleados, preparados de acuerdo con las normas indicadas en el manual de instrucciones del analizador, fueron las siguientes :

Tampón	pH	Molaridad del Na <sup>+</sup>
Tampón para la muestra	2.2 <sup>±</sup> 0.03	0.20
Aminoácidos ácidos y neutros, I	3.28 <sup>±</sup> 0.005	0.20
Aminoácidos ácidos y neutros, II	4.25 <sup>±</sup> 0.02	0.20
Aminoácidos básicos	5.28 <sup>±</sup> 0.02	0.35

## II.7. ELECTROFORESIS

La acrilamida, la N,N'-metilenbisacrilamida y el azul de Coomassie se compraron a Serva Feinbioche-

mica GMBH Co., el SDS y el Sigmacote a Sigma Chemical Co. y la tetrametilendiamina a Eastman Chemical Co.

La acrilamida, bisacrilamida y SDS se purificaron, como se describe a continuación:

70 gr de acrilamida se disolvieron en 1 litro de cloroformo a  $50^{\circ}\text{C}$  y la disolución se filtró por papel. El filtrado se dejó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 5 horas, al menos, y los cristales se recogieron filtrando en Buchner, se lavaron con cloroformo frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) y se secaron en vacío (39).

10 gr de bisacrilamida se disolvieron en 1 litro de acetona a  $45^{\circ}\text{C}$ . La suspensión se filtró por papel y el filtrado se dejó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante la noche. Los cristales se recogieron por filtración y se secaron en vacío (39).

En un erlenmeyer de 2 litros se disolvieron 60 gr de SDS en 1 litro de etanol 98% en ebullición. A la disolución se añadió Celita y se filtró por papel Whatman 1. El filtrado se dejó en reposo durante la noche a temperatura ambiente y los cristales, recogidos por filtración se secaron a  $50^{\circ}\text{C}$  en vacío.

## II.8. RADIOACTIVIDAD

El butil-PBD se compró a Ciba Limited, el tolueno a Carlo Erba y los filtrados de papel de fibra de vidrio Whatman GF/C y GF/A a Reeve Angel.

## II.9. MICROSCOPIA ELECTRONICA

Las rejillas de cobre electrolítico (3 mm de diámetro, 200 mallas) se compraron a Veco Zeefplatten Falnick N.V. El formvar y el colodión se compraron a Shawiniga Ltd. y a Mallinckrodt Chem. Co., respectivamente. El 1,2-dicloroetileno y el acetato de isoamilo fueron productos de Schuchardt BMBH, el ácido fosfotúngstico y el acetato de uranilo se adquirieron de Merck. Las rejillas de platino (tipo Siemens, 7 agujeros) se compraron a Siemens.

Las placas y el material fotográfico se adquirieron a Agfa-Gevaret y Kodak, respectivamente.

## II.10. EQUIPO

Fermentadores de 30 litros de Belenguer S.A.

Centrífuga Sorvall refrigerada modelo RC2-B y sistema KSB para flujo continuo.

Ultracentrífugas preparativas Spinco de Beckman, modelos L, L2-50 y L3-50.

Ultracentrífuga analítica Spinco de Beckman,  
modelo E.

Aparato de difusión libre y electroforesis  
Spinco de Beckman, modelo H.

pHmetro Radiometer, modelo 25, con escala ex-  
pandida.

Fuente de alimentación Buchler, modelo No-3-  
1014 A.

Cubeta de electroforesis Buchler, modelo nº  
1004 A.

Espectrofotómetro Gilford (modelo 240) con  
transporte lineal (modelo 2410) e impresor (modelo  
2453).

Espectrofotómetro Cary, modelo 15.

Espectrofotómetro Beckman, modelo DU-2.

Analizador de aminoácidos Beckman, modelo Uni-  
chrom.

Microscopio electrónico Jeol JEM 100-B.

Liofilizador Virtis, modelo 10-146 MR - BA.

Fraccionador de geles (Autogeldivider de Savant  
Instruments Inc.).

Microcomparador Nikon, modelo 6C.

III. M E T O D O S

### III.1 CRECIMIENTO DE LA BACTERIA HUESPED

B. amyloliquefaciens, cepa HM (26), se creció a 37°C con aireación en un medio L (40) modificado, que contenía triptona 1%, extracto de levadura 1%, ClNa 0,5%, Cl<sub>2</sub>Mn 0,01 mM y glucosa 10 mM. Para los cultivos en fermentador el medio contenía, 0,4 ml de antiespumante por litro de medio. El medio sin glucosa se esterilizó en autoclave durante 20 min a 120°C; la glucosa se esterilizó por separado y se añadió al medio en condiciones de esterilidad.

Los cultivos se iniciaron con un inóculo al 3% de células creciendo en fase logarítmica y el crecimiento se siguió turbidimétricamente a 660 nm con un espectrofotómetro Beckman DU-2, usando cubetas de 1 cm de paso de luz. En algunas ocasiones el crecimiento se siguió por contaje directo de las bacterias, añadiendo a 1 ml del cultivo 0,1 ml de formaldehído 0,3% para contar las bacterias al microscopio en una cámara de Thoma. La figura 1 muestra la relación entre absorbancia y número de células.

### III.2. VALORACION DE Ø29.

El fago se valoró por el método de la placa de

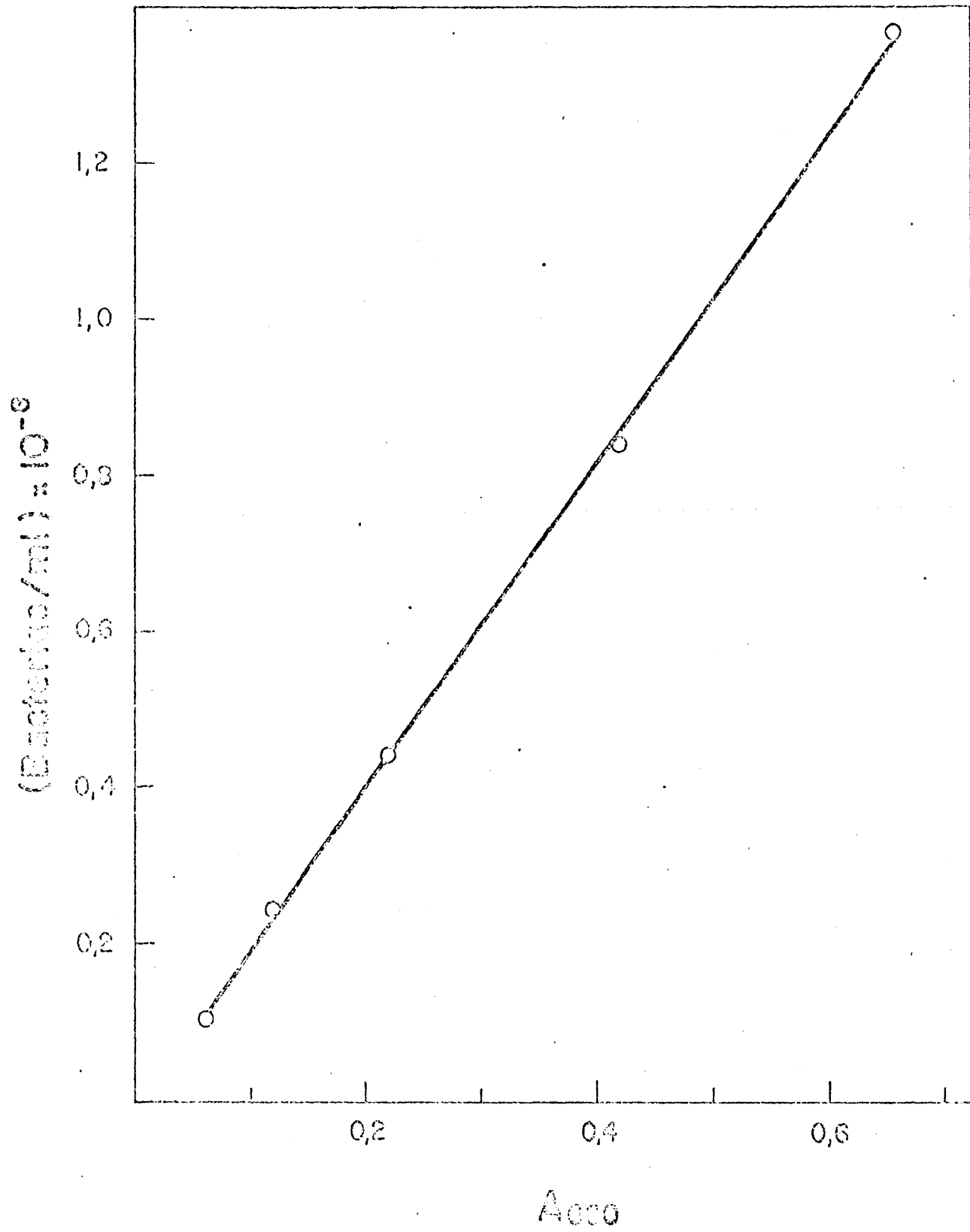


Figura 1. Relación entre absorbancia a 660 nm y densidad bacteriana.

lisis (41).

A 2 ml de medio L con agar 0,6%, fundido y mantenido a 45<sup>o</sup>C, se añadieron 0,5 ml de un cultivo de la bacteria huésped en crecimiento logarítmico y 0,1 ml de una dilución del fago en DF. La mezcla se extendió sobre una placa de Petri con 25 ml de medio L sin glucosa, solidificado con agar 1,6%. Una vez solidificada la capa con la bacteria y el fago a temperatura ambiente, las placas se incubaron a 30<sup>o</sup>C durante la noche para permitir la formación de las placas de lisis.

### III.3. PREPARACION DE LISADOS DE Ø29

16,5 l de medio L con antiespumante en un fermentador de 30 l a 37<sup>o</sup>C, se inocularon con 500 ml de B. amyloliquefaciens creciendo en fase logarítmica en el mismo medio. Cuando la  $A_{660} = 1$  ( $2 \times 10^8$  bacterias/ml) se añadió Ø29 a una multiplicidad de infección de 2 fagos por bacteria y se continuó la incubación durante 3-4 horas o hasta que se produjo la lisis del cultivo. Durante la incubación se mantuvo el pH constante entre 6,4 y 6,8, añadiendo 4-8 ml de NaOH 10 M cada 30 min.

El lisado se trató con lisozima (10 µg/ml), RNasa (0,1 µg/ml) y DNasa (0,2 µg/ml) en presencia de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  5 mM, durante 30 min a 37<sup>o</sup>C y, a continuación, se centrifugó en una Sorvall de flujo continuo a 20,000 x g a un flujo de 100 ml/min para eliminar restos celulares.

### III.4. PURIFICACION DE Ø29

#### 4.1. Concentración del fago

Para concentrar el fago del lisado se emplearon dos métodos : (a) precipitación isoeléctrica y (b) precipitación con PEG 6000.

(a) Precipitación isoeléctrica. Al lisado a temperatura ambiente se añadió lentamente y agitando ácido acético glacial hasta bajar el pH a 4.1-4.2. Después de 1 hora sin agitación se añadieron 3 g de celita por litro y la suspensión se filtró por papel de fibra de vidrio GFA con succión. El fago retenido en el filtro se resuspendió en 0,1 vol de DF mantenido a pH 7.8 por adición de NaOH 10 M.

(b) Precipitación con PEG 6000 (42). Al lisado, enfriado a 4<sup>o</sup>C en un baño de hielo, se añadió PEG 6000 10% (peso/volumen). Después de dejar preci-

pitando en reposo 24-48 hr a 4-8<sup>o</sup>C, se decantó el sobrenadante y se recogió el sedimento suspendido en el menor volumen posible del sobrenadante.

La suspensión se centrifugó en una Sorvall refrigerada a 4<sup>o</sup>C durante 30 min a 7,500 rpm en un rotor GSA. El sedimento que contenía el fago se resuspendió en 200 ml de DF, se incubó 30 min a 37<sup>o</sup>C con lisozima (100 µg/ml), RNasa (1 µg/ml) y DNasa (1 µg/ml) y se volvió a centrifugar a 20<sup>o</sup>C como se ha indicado antes. El fago quedó en el sobrenadante.

#### 4.2. Cromatografía en vidrio de poro controlado (43)

La muestra con el fago se cromatografió en una columna de Spherosil tipo C, tratado como se indica en Materiales, empaquetada por gravedad y equilibrada con, al menos, 10 volúmenes de DF. El volumen de la columna era de 2,8 l (45 cm x 63,4 cm<sup>2</sup>) y el de la muestra nunca fué superior al 10% del volumen de la columna. Una vez había penetrado la muestra en la columna, se eluyó con DF a una velocidad de flujo de 5 ml/min, recogiendo fracciones de 20 ml. En cada fracción se determinó A<sub>260</sub> y fago.

#### 4.3. Centrifugación diferencial.

Las fracciones que contenían el fago se mezcla

ron y centrifugaron en un rotor 19 de una ultracentrífuga Spinco L2-50 a 18,000 rpm y 4°C durante 4 hr. El fago quedó en el sedimento y se resuspendió en 0,05 volúmenes de DF en un agitador rotatorio a temperatura ambiente.

#### 4.4. Centrifugación en cloruro de cesio (44)

Por cada gramo de la suspensión del fago en DF, a una concentración igual o menor que 150 unidades de  $A_{260} \text{ cm}^{-1}$ , se añadieron 0,66 g de ClCs, para obtener una densidad de 1,43 g x  $\text{cm}^{-3}$ . La suspensión se centrifugó en tubos de policarbonato en un rotor 30 de una ultracentrífuga Spinco L2-50 a 13°C durante 24 hr a 24,000 rpm. La centrífuga se paró sin freno y el gradiente se fraccionó por medio de un sifón, recogiéndose fracciones de 1 ml. En cada fracción se determinó  $A_{260}$ , fago y en fracciones seleccionadas se determinó la densidad refractométricamente (45) o picnométricamente con una micropipeta calibrada. Las fracciones que contenían el fago se dializaron a 4°C contra varios cambios de DF.

#### 4.5. Centrifugación en gradiente de sacarosa (46)

En tubos de nitrato de celulosa de un rotor

Spinco SW50, SW39 o SW25.1 se establecieron gradientes de sacarosa entre el 5 y el 20% en DF y se equilibraron a 4°C. 0,2-0,3 ml de suspensión de fago conteniendo no mas de 5 unidades de  $A_{260} \text{ cm}^{-1}$  (rotores SW50 o SW39) o 1 ml conteniendo no mas de 25 unidades de  $A_{260} \text{ cm}^{-1}$  (rotor SW25.1) se pusieron en la parte superior del gradiente y se centrifugó a 4°C durante 30 min a 36,000 rpm (rotores SW50 o SW39) o 60 min a 22,000 rpm (rotor SW25.1). Una vez parado el rotor sin freno, el gradiente se fraccionó como se ha descrito antes, recogándose fracciones de seis gotas ( $\sim 0,12 \text{ ml}$ ) en el caso de los rotores SW50 o SW39 ó de 1 ml en el caso del rotor SW25.1. En cada fracción se determinó  $A_{260}$  y/o fago.

### III. 5. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Las proteínas desnaturalizadas con SDS se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida usando dos sistemas de electroforesis diferentes.

#### 5.1. Electroforesis en un sistema con pH continuo(47)

Los geles de 20 cm de longitud, preparados de acuerdo con Méndez y colaboradores (30), contenían acrilamida 10%, N, N'-metilenbisacrilamida 0,15%, te-

tetrametilendiamina 0,05%, SDS 0,1%, fosfato sódico 0,05 M, pH 7,2, y persulfato amónico 0,075% (todos los porcentajes se dan en peso por volumen, excepto en el caso de la tetrametilendiamina que se dan en volumen por volumen).

El electrolito era fosfato sódico 0,05 M, pH 7,2, y SDS 0,1%.

La muestra (20-200  $\mu$ g de proteína) se dializó contra acetato amónico 0,1 M, se liofilizó y el residuo se disolvió en 0,2-0,3 ml una solución que contenía fosfato sódico 0,005 M, pH 7,2, SDS 1%, 2-mercaptoetanol 1% y urea 2 M. La mezcla se calentó 5 min en un baño de agua a ebullición para disgregar las proteínas hasta las últimas cadenas polipeptídicas y se enfrió a temperatura ambiente. A continuación se añadió a la muestra 0,01 ml de una disolución de azul de bromofenol 0,2%. La muestra se puso sobre la parte superior del gel, que había sido sometido previamente a un voltaje constante de 60 volt con objeto de eliminar el persulfato.

La electroforesis se hizo a un voltaje constante de 2,5 volt/cm durante unas 15 hr, tiempo que tarda en salir el azul de bromofenol del gel. En otras oca

siones la electroforesis se hizo durante 20 hr.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se fraccionaron con un fraccionador de geles (Autogeldivider de Savant Instruments Inc.) o se tiñeron con una disolución de azul brillante de Coomassie 0,25% en metanol : ácido acético : agua (5:1:5), y se destiñeron agitándolos en ácido acético 7%.

#### 5.2. Electroforesis en un sistema con pH discontinuo (23).

Los geles, con una longitud total de 11 cm (8 cm el gel de separación y 3 cm el gel de concentración) y 6 mm de diámetro, tenían la composición que se incia en la tabla 1, la cual muestra también la composición del electrolito y del tampón de la muestra.

La electroforesis se hizo a una corriente constante de 5 mA hasta que el colorante salió del gel.

Los geles se fraccionaron como se ha indicado antes o se fijaron en ácido tricloroacético 50% durante la noche, se tiñeron durante 1 hr a 37<sup>o</sup>C en una disolución recién preparada de azul brillante de Coomassie, en ácido tricloroacético 50% y se destiñeron

Tabla 1 . Electroforesis en poliacrilamida-SDS con  
pH discontinuo.

A. Composición del gel

Componente	Gel de separación	Gel de concentración
Tris-ClH	0,375 M (pH 8,8)	0,125 M (pH 6,8)
Acrilamida <sup>x</sup>	10%	3%
Bisacrilamida	0,25%	0,075%
Dodecil sulfato sódico	0,1%	0,1%
Tetrametilendiamina	0,025%	0,025%
Persulfato amónico	0,025%	0,025%

<sup>x</sup> Todos los porcentajes se refieren a peso, excepto el de la tetrametilendiamina, que se refiere a volumen.

B. Composición del electrolito

Tris 0,025 M - glicina 0,192 M (pH 8,3)  
Dodecilsulfato sódico 0,1%

C. Composición del tampón de la muestra

Tris-ClH 0,05 M (pH 6,8)  
Dodecilsulfato sódico 0,1%  
2-mercaptoetanol 5%  
Azul de bromofenol 0,001%

por difusión lavando los geles repetidas veces con ácido acético 7%.

### III.6. AISLAMIENTO DE LA PROTEINA DE Ø29.

#### 6.1. Tratamiento de Ø29 con EDTA

25 ml de una suspensión de Ø29, a una concentración de 40 unidades de  $A_{260} \text{ cm}^{-1}$ , a la que se había añadido EDTA a una concentración final 70 mM, se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante la noche con agitación. En estas condiciones la mayor parte del fago libera el DNA y las partículas se disocian dando lugar a cápsidas con y sin cuello y colas con cuello (30).

#### 6.2. Hidrólisis del DNA

La mezcla se dializó a  $4^{\circ}\text{C}$  contra varios cambios de Tris-ClH 0,01 M,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  5 mM, pH 7,8, para eliminar el EDTA, y, a continuación, se incubó 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$  con DNasa (10  $\mu\text{g/ml}$ ), se ajustó el pH a 9 con KOH 1 M en el pHmetro y se añadió fosfodiesterasa de veneno de serpiente (10  $\mu\text{g/ml}$ ), continuándose la incubación durante 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . La mezcla se llevó a sequedad por liofilización y el residuo se disolvió en 3 ml de agua.

### 6.3. Cromatografía en Sephadex G-50

La muestra se cromatografió en una columna de Sephadex G-50 con un volumen de unos 220 ml (45 cm x 4,9 cm<sup>2</sup>), equilibrada y eluida con DF a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min, recogién dose fracciones de 2 ml en los que se determinó  $A_{260}$  y  $A_{280}$ .

### 6.4. Centrifugación hasta equilibrio de densidad en cloruro de cesio.

Las fracciones correspondientes al volumen excluido, libres de nucleótidos, se mezclaron (20-25 ml) y se centrifugaron hasta equilibrio de densidad de ClCs (densidad media = 1,43 g x cm<sup>-3</sup>) para separar el fago residual, no disgregado, de la proteína libre de DNA, del mismo modo como se describió antes para la purificación del fago completo.

El gradiente se fraccionó como se ha indicado antes y en cada fracción se determinó  $A_{260}$  y  $A_{280}$ . Las fracciones de la parte superior del gradiente, libres de DNA y de fago intacto, se mezclaron y dializaron contra varios cambios de DF a 4<sup>o</sup>C.

### III.7. AISLAMIENTO DEL DNA DE Ø29

Una suspensión de fago (20 ml) a una concentra-

ción de 1 unidad de  $A_{260} \text{ cm}^{-1}$  se trató con 1 mg de pronasa autodigerida (38) por ml en presencia de SDS 0,5%, durante 3 hr a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación suave. Este tratamiento se repitió dos veces consecutivas más.

A la solución viscosa se añadió 1 volumen de fenol destilado y equilibrado con Tris-ClH 0,1 M, pH 7,8, estéril y las dos fases se mezclaron por agitación suave durante 5 min a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó 5 min a 13.000 rpm a temperatura ambiente, para separar las dos fases. La capa fenólica se extrajo con una pipeta estéril y la capa acuosa se volvió a tratar dos veces mas con 1 volumen de fenol. Las tres fases fenólicas mezcladas se extrajeron con un volumen de Tris-ClH 0,1 M, pH 7,8, estéril, igual a la suspensión de fago inicial. Las dos fases acuosas se mezclaron y dializaron contra varios cambios de 0,1 x SSC a  $4^{\circ}\text{C}$ . La solución de DNA dializada se conservó a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### III.8. ANALISIS QUIMICOS

#### 8.1. Análisis de carbono y nitrógeno

Las muestras de fago en DF se dializaron contra acetato amónico 0,1 M y se liofilizaron repetidas

veces, disolviendo cada vez el residuo en agua destilada estéril. El residuo final se secó en vacío en presencia de pentóxido de fósforo. Otras muestras de fago en DF se precipitaron repetidas veces con 2 volúmenes de etanol absoluto a 0°C, se liofilizaron y secaron como se acaba de indicar.

El C, H y N se determinaron en un Analizador Elemental Perkin Elmer 240 en el Centro Nacional de Química Orgánica (C.S.I.C.).

### 8.2. Análisis de fósforo (48)

El reactivo se preparó inmediatamente antes del ensayo mezclando 1 volumen de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  6 N con 2 volúmenes de agua destilada, 1 volumen de molibdato amónico ( $\text{MO}_7\text{O}_{24} (\text{NH}_4)_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ) 2,5 % y 1 volumen de ácido ascórbico 10%.

(1) Fósforo inorgánico. A 1 ml del problema, conteniendo 0,1-1  $\mu\text{g}$  de fosforo (ajustando la concentración con agua destilada) se añadió 1 ml de reactivo. Los tubos se taparon con papel de parafilm y se incubaron 2 hr a 37°C. La densidad óptica a 820 nm se leyó contra un blanco tratado de un modo análogo al problema.

Las muestras que contenían proteína se desproteinizaron previamente por precipitación con ácido tricloroacético o perclórico 5%, tomando para el análisis una alícuota del sobrenadante.

(2) Fósforo total. La muestra (1 - 10  $\mu\text{g}$  de fósforo) se evaporó a sequedad en un tubo de ensayo, se añadieron 2 gotas de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado y se calentó hasta que comenzaron a aparecer humos blancos de trióxido de azufre. A continuación se añadió 1 gota de ácido perclórico 70% y la muestra se calentó hasta que quedó clara. Después de enfriar a temperatura ambiente el volumen se ajustó a 10 ml con agua destilada y se tomaron alícuotas (0,1 - 1  $\mu\text{g}$  de fósforo) para análisis de fósforo inorgánico.

Como patrón se utilizó una disolución de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ .

### 8.3. Análisis de DNA (49)

El reactivo de difenilamina se preparó disolviendo 1,5 g de difenilamina en 100 ml de ácido acético glacial y añadiendo 1,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Antes de usarlo, a 20 ml de la mezcla anterior se añadió 0,1 ml de una disolución de acetaldehído en agua, preparada como se indica a continuación.

La defenilamina se recrystalizó de etanol 70% y el acetaldehído se destiló y almacenó a 4°C disuelto en agua a una concentración de 16 mg/ml.

La muestra se diluyó con  $\text{ClO}_4\text{H}$  0,5 N para tener una concentración final de 5 - 80  $\mu\text{g}$  de DNA por ml. A 1 ml de la muestra se añadieron 2 ml del reactivo y la mezcla se incubó 16 - 20 hr a 30°C. La densidad óptica a 600 nm se midió contra un blanco de  $\text{ClO}_4\text{H}$  0,5 N tratado de un modo análogo al problema.

Como patrón se utilizó DNA de esperma de salmón disuelto en NaOH 5 mM a una concentración de 0,5 - 1 mg/ml. La concentración del DNA patrón se determinó por análisis de fósforo total.

#### 8.4. Análisis de hexosas (50)

El reactivo se preparó disolviendo 0,05 g de antrona en 100 ml de ácido sulfúrico concentrado, conteniendo tiourea 1%.

A 0,1 ml de la muestra (1-50  $\mu\text{g}$  de hexosa) se añadieron 0,5 ml de reactivo. Las muestras se incubaron a 80°C durante 15 min y se determinó el espectro entre 500 y 800 nm frente a un blanco sin hexosa tratado del mismo modo que el problema.

Como patrones se emplearon glucosa, manosa, ga lactosa y fucosa, así como triptófano. Este aminoácido da color con el reactivo con un máximo entre 520 y 560 nm, diferente del máximo obtenido con las hexosas a 620 nm.

Para el análisis de glicoproteínas en el fago o proteína del fago, las muestras procedentes de gradientes de sacarosa se dializaron durante cuatro días contra 8 litros de DF (2 litros/día) para eliminar la sacarosa. A 1 ml de la muestra se añadió 0,1 ml de ácido tricloroacético 100% (en volumen) enfriado a 4<sup>o</sup>C, se dejó 15 min en hielo y el precipitado se recogió centrifugando 10 min a 12.000 rpm. El sedimento se resuspendió en un pequeño volumen de fosfato sódico 0,01 M-SDS 0,1% (concentración de proteína, 0,5-2 mg/ml) y se neutralizó con HaOH 0,5 M. Para análisis de hexosas se empleó 0,1 ml de esta muestra conteniendo 50-800  $\mu$ g de proteína.

#### 8.5. Análisis de aminoácidos (51)

##### Hidrólisis de la proteína.

La proteína de Ø29, libre de DNA, preparada como se indica en III.6, se dializó exhaustivamente contra acetato amónico 0,1 M a 4<sup>o</sup>C y una alícuota, que

contenía unos 0,2 mg de proteína, se pesó en un tubo de vidrio pyrex, pesado previamente. Las muestras se liofilizaron repetidas veces, disolviendo cada vez el residuo en H<sub>2</sub>O destilada. Finalmente, se pesaron los tubos con el residuo seco y se añadieron 0,25 ml de ClH concentrado y 0,25 ml de H<sub>2</sub>O destilada. La parte superior del tubo se estiró a la llama en forma de un capilar y el contenido se congeló en una mezcla de alcohol-nieve carbónica. El tubo se conectó a una bomba y después de hecho el vacío, se sacó el tubo del baño de congelación y se cerró el capilar mientras se seguía aplicando el vacío. Los tubos de hidrólisis se incubaron a 105<sup>o</sup>C durante 24, 48 o 72 hr. Una vez abierto el tubo, la muestra se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio en vacío, se añadieron 2 ml de H<sub>2</sub>O destilada y se volvió a evaporar. A veces, la muestra se llevó a sequedad en un desecador de vacío, conteniendo KOH sólido, conectado a una bomba durante la noche. El residuo seco se disolvió en 2,5 ml de tampón de pH 2,2 y se usó 1 ml para el análisis de aminoácidos ácidos y neutros y 1 ml para el análisis de los aminoácidos básicos.

#### Oxidación con ácido per fórmico (52,53)

El ácido per fórmico se preparó añadiendo a 1,8

ml de ácido fórmico 98%, 0,2 ml de  $H_2O_2$  30% y manteniendo la mezcla a temperatura ambiente durante 2 hr.

Al residuo resultante de liofilizar 1 ml de la disolución standard de aminoácidos (2,5  $\mu$ moles/ml) se añadieron 0,25 ml de ácido perfórmico y la mezcla se incubó en un baño de hielo durante 2,5 hr. A continuación se diluyó con 2,5 ml de agua, se liofilizó y el residuo se disolvió en 2,5 ml del tampón de pH 2,2 (1  $\mu$ mol/ml).

Para la oxidación de la muestra, 0,3 ml de la disolución de proteína se liofilizaron y el residuo se disolvió en 0,1 ml de ácido perfórmico. Después de incubar en un baño de hielo durante 2,5 hr se añadió 1 ml de agua y se liofilizó. Al residuo se añadieron 0,3 ml de  $ClH$  6 N y se hidrolizó 24 hr a  $110^{\circ}C$ . Las manipulaciones subsiguientes se describen en el apartado anterior; la muestra se analizó en la columna larga y se calcularon los micromoles de ácido cistéico y metioninasulfona con respecto a los picos de alanina y leucina, que no se alteran por el tratamiento con ácido perfórmico.

#### Análisis de los resultados

Los picos correspondientes a cada aminoácido

se integraron manualmente, multiplicando la altura de cada pico por su anchura, determinada contando los puntos impresos existentes sobre la paralela media a la línea base. Las áreas de cada pico, comparadas con las determinadas en el análisis de una mezcla patrón de aminoácidos (media de tres determinaciones), permitió calcular las cantidades absolutas de cada aminoácido.

La cantidad de treonina, serina y tirosina se determinaron extrapolando a tiempo cero los valores experimentales. Para la isoleucina se tomaron los valores correspondientes a 72 hr. Para el resto de los aminoácidos se tomó la media de las tres determinaciones.

#### Valoración del triptófano.

El triptófano se determinó espectrofotométricamente (54,55).

La proteína de Ø29, preparada como se indicó anteriormente, se disolvió en NaOH y se leyó la absorción a 294 y 280 nm. Empíricamente se ha establecido que la relación molar entre tirosina y triptófano es

$$\frac{\text{Tyr}}{\text{Try}} = \frac{0,592 \epsilon_{294} - 0,263 \epsilon_{280}}{0,263 \epsilon_{280} - 0,170 \epsilon_{294}}$$

Por tanto, conocidos los moles de tirosina del análisis de aminoácidos, se pueden calcular los moles de triptófano.

En otras ocasiones se determinó el espectro entre 240 y 320 nm. En este espectro se obtienen dos máximos de absorción. La pendiente de la tangente a ambos picos nos permite obtener un parámetro

$$S = 10^3 \frac{E_2 - E_1}{\lambda_2 - \lambda_1} \cdot \frac{1}{E_{\max}}$$

donde  $E_2$  y  $E_1$  son las absorciones en los dos máximos, correspondientes a unas longitudes de onda  $\lambda_2$  y  $\lambda_1$ , respectivamente.

La relación entre S y la relación molar Tyr/Try se da en la tabla 2.

### 8.6. Análisis de bases (56)

A 1 ml de una disolución de DNA de  $\phi 29$  de 1 mg/ml, en un tubo de centrifuga, se añadieron 2 volúmenes de acetona a  $4^\circ\text{C}$  y el precipitado se recogió centrifu-

Tabla 2 . Análisis de triptófano. Valores de la relación molar tirosina/triptófano en función de S.

<u>Tyr/Try</u>	<u>S (nm<sup>-1</sup>)</u>	<u>Tyr/Try</u>	<u>S (nm<sup>-1</sup>)</u>
0,1	- 17,5	1,1	- 1,8
0,2	- 14,7	1,3	0,11
0,3	- 12,6	1,5	1,5
0,4	- 10,7	2,0	4,8
0,5	- 9,0	2,5	8,4
0,7	- 6,1	3,0	11,9
0,9	- 3,9	4,0	19,4
1,0	- 2,8		

$$S = 10^3 \cdot \frac{E_2 - E_1}{\lambda_2 - \lambda_1} \cdot \frac{1}{E_{\max}}$$

gando 15 min a 5.000 rpm a 4°C, se sacó el sobrenadante y el sedimento se secó con una corriente suave de nitrógeno.

Al DNA seco se añadieron 0,015 ml de  $\text{ClO}_4\text{H}$  70% y el tubo tapado con parafilm se sumergió durante 1 hr en un baño de agua hirviendo. Después de enfriar a temperatura ambiente se diluyó con 2 volúmenes de agua destilada. Del hidrolizado así obtenido se tomaron 0,01 - 0,02 ml para cromatografía en papel Whatman 1 o 3 MM, previamente lavado con el disolvente (isopropanol- $\text{ClH}$ - $\text{H}_2\text{O}$ ; 170:41:39) y secado posteriormente.

Como marcadores se emplearon 0,015 ml de una mezcla de las cuatro bases del DNA a una concentración de 0,3 mg/ml, disueltos con  $\text{ClO}_4\text{H}$  70% diluido con 2 volúmenes de agua destilada, y DNA de esperma de salmón, de composición de bases conocida, hidrolizado a la misma concentración y en las mismas condiciones que el DNA de Ø29.

Después de 20 hr de cromatografía descendente se secó el papel y las manchas se detectaron con una lámpara ultravioleta, se recortó la zona de papel correspondiente a cada mancha y el material se eluyó agitando durante la noche el papel suspendido en  $\text{ClH}$

0,1 M. El volumen de la disolución se determinó por pesada y la densidad óptica se midió en un espectrofotómetro Beckman DU-2, calibrando con  $\text{CrO}_4\text{K}_2$  (59), en una cubeta de 1 cm de paso de luz. Como blanco se utilizó una disolución en ClH 0,1 M del material eluido de una zona del cromatograma a la que no se había aplicado muestra.

Para cada mancha se determinaron las relaciones espectrales, que confirmaron la identificación de las mismas.

Para las diferentes bases se tomaron los coeficientes de extinción que se dan en la tabla 3, resumen de un experimento.

### III.9. DETERMINACION DE DENSIDADES

La densidad de disoluciones de fago o disolvente se determinaron por picnometría a  $20^{\circ}\text{C}$ , usando un picnómetro calibrado de 7 ml de capacidad cuya ecuación empírica de calibración era

$$W_{20} = 7,12392 + 0,078 L,$$

siendo  $W_{20}$  la masa del líquido que llena el picnómetro y L la distancia desde el cero del picnómetro hasta el menisco.

Tabla 3 . Análisis de bases del DNA de Ø29

Base	$\lambda$ , nm	$\Sigma M$	A $\lambda$	Disolución, g	A x Peso $\lambda$	A x Peso $\Sigma M$	%
Adenina	260	13.000	0,142	3,48	0,494	380	30,4
Timina	265	7.950	0,090	3,47	0,312	393	31,4
Citosina	275	10.500	0,073	3,47	0,253	241	19,3
Guanina	250	11.000	0,070	3,47	0,260	236	18,9

La tabla 4 indica una determinación de la densidad de una disolución de Ø29.

### III.10. DETERMINACION DE VISCOSIDADES

La viscosidad de disoluciones de determinaron a 20<sup>o</sup>C usando un viscosímetro de Ostwald.(57).

### III.11. DETERMINACION DE ABSORBANCIAS

Las densidades ópticas se determinaron en un espectrofotómetro Beckman DU-2, calibrado con una solución que contenía 0,0400 g de  $\text{CrO}_4\text{K}_2$  por litro de KOH 0,05 M, usando una cubeta con un paso de luz de 1 cm (58).

Las diluciones de la solución concentrada para la medida de su absorción a 260 nm se hicieron por diferencia de pesada, operando del modo siguiente : una cubeta del espectrofotómetro que contenía una pequeña barra agitadora se pesó 1<sup>o</sup>) vacía, 2<sup>o</sup>) con disolvente (diluyente de fago) y 3<sup>o</sup>) tras añadir, sucesivamente 0,01-0,02 ml de la solución concentrada del fago. Tras cada adición se agitó el contenido, se pesó la cubeta y se midió la densidad óptica a 260 nm y 350 nm para corregir la absorción debida a "scattering". Las absorciones se corrigieron de acuerdo con

Tabla 4. Determinación de la densidad de una disolución de Ø29 por piconometría.

L = altura del menisco - cero del picnómetro =	10,477 - 6,093 =	3,574 cm.
Peso del picnómetro + peso de la disolución	=	21,87623 g
Peso del picnómetro vacío	=	14,61422 g
Peso de la disolución	=	7,26201 g
Peso del agua :		
$W_{20} = 7,12392 + 0,0178 L = 7,12392 + 0,0178 \times 3,574$	=	7,18753 g
Densidad del agua a 20°C	=	0,9982 g cm <sup>-3</sup>
Densidad de la disolución, $\rho_2 = \frac{7,26201}{7,18753} \times 0,9982$	=	1,0086 g cm <sup>-3</sup>

la curva de calibración y, por la diferencia de pesada, se determinó el peso de la disolución concentrada de fago añadida a la cubeta. A partir de este valor y del peso del disolvente se determinó el factor de dilución (d) correspondiente a cada adición, expresado en gramos de disolución diluida de fago por gramo de disolución concentrada. El producto de la absorción a 260 nm por el factor de dilución correspondiente es una constante que indica las unidades de  $A_{260}$  de la solución de fago original (tabla 5). Multiplicando este valor por la densidad de la solución concentrada del fago se obtiene la absorción de la solución por ml.

En otros casos, para determinar las unidades de  $A_{260}$  de la solución concentrada se representó gráficamente la  $A_{260}$  frente a  $1/d-1$ . Después de interpolar la mejor recta por mínimos cuadrados, se determinó d para una  $A_{260} = 1$ . El inverso del valor obtenido más 1 da, directamente, las unidades de  $A_{260}$  de la solución original (tabla 5, figura 2).

### III.12. DETERMINACION DE PESO SECO

Para determinar la absorción específica de fago, primero se midió la  $A_{260}$  de la solución, co-

Tabla 5. Determinación de la absorbancia a 260 nm de una solución de Ø29 en diluyente de fago

Cubeta + agitador = 6,2084  
 " + " + disolvente = 8,7539  
 Peso del disolvente = 2,5455

Adición	Peso, g	Disolución, g	A <sub>260</sub>	Dilución(d)	A <sub>260</sub> xd	$\Delta$	$\Delta^2$	$(1/d-1) \times 10^3$
1	8,7555	0,0016	0,139	1.591	221,1	8,0	64,00	0,629
2	8,7568	0,0029	0,240	878	210,7	- 2,4	5,76	1,140
3	8,7583	0,0044	0,378	578	218,5	5,4	29,16	1,733
4	8,7595	0,0056	0,497	455	226,1	13,0	169,00	2,203
5	8,7614	0,0075	0,633	339	214,6	1,0	1,00	2,958
6	8,7631	0,0092	0,753	277	208,6	- 5,0	25,00	3,610
7	8,7649	0,0110	0,895	231	206,7	- 6,4	40,96	4,329
8	8,7664	0,0125	1,025	204	209,1	- 4,0	16,00	4,902
9	8,7681	0,0142	1,165	179	208,5	- 4,6	21,16	5,618
10	8,7697	0,0158	1,285	161	206,9	- 6,2	38,44	6,250
					2130,8		410,48	
					213,1			

$$\sigma_M = (410,48/10 \times 9)^{1/2} = (4,56)^{1/2} = 2,1$$

213 ± 2 unidades de A<sub>260</sub> por g de disolu

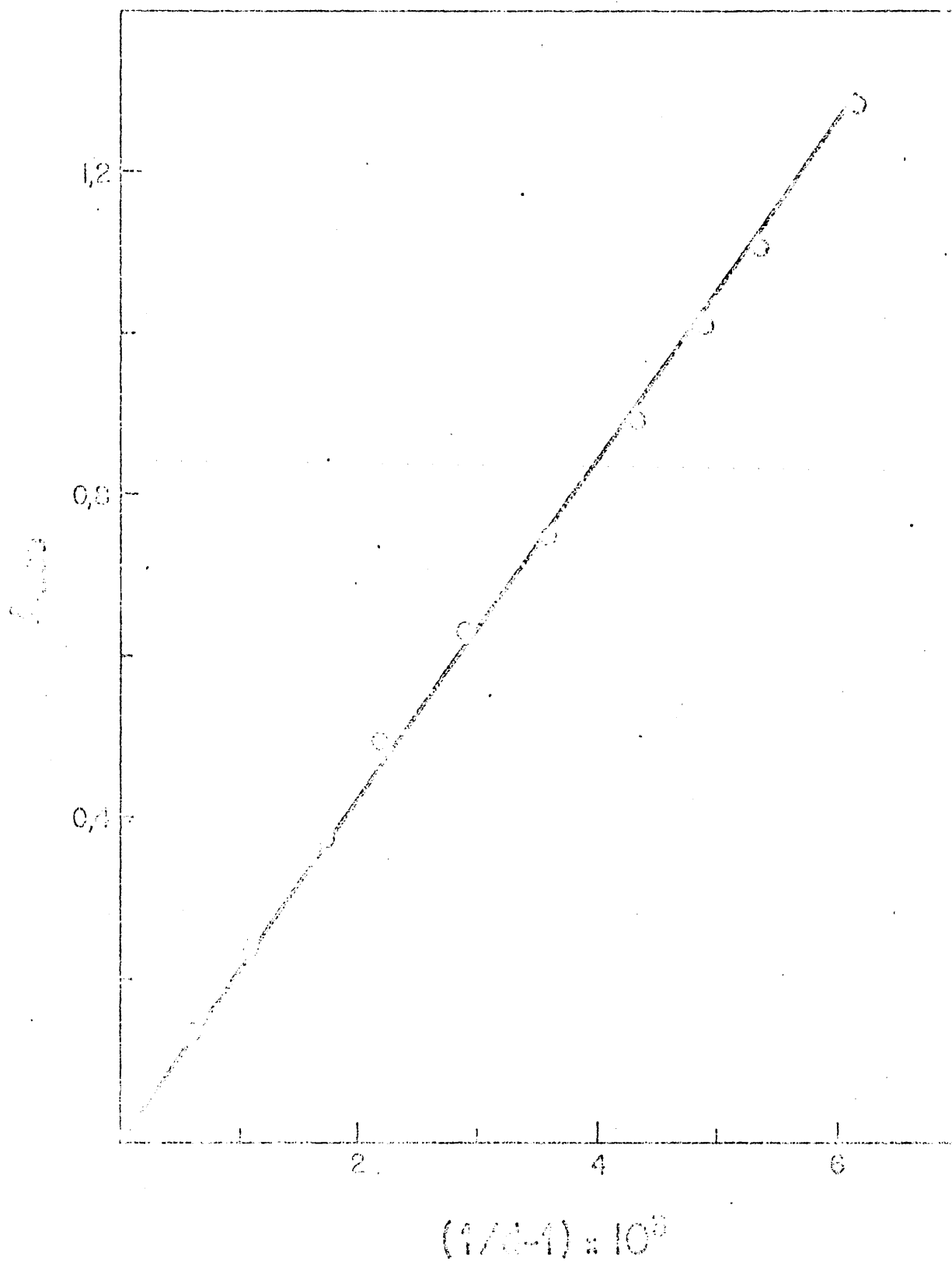


Figura 2. Relación entre  $A_{260}$  y dilución de una disolución de Ø29 en diluyente de fago.

mo se acaba de indicar. A continuación la muestra se dializó frente a agua destilada o, preferiblemente, contra acetato amónico 0,1 M. La disolución dializada se liofilizó, el residuo se resuspendió en agua y se volvió a liofilizar. Esta operación se repitió una vez más. El residuo liofilizado se secó a presión reducida a 100<sup>o</sup>C en presencia de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> hasta peso constante (48 hr).

### III.13. DETERMINACION DE VOLUMENES ESPECIFICOS

El volumen específico parcial de un soluto es el incremento de volumen del disolvente al añadir la unidad de masa de soluto a una masa, infinita de disolvente.

$$\bar{v}_2 = \left( \frac{\partial V}{\partial m_2} \right)_{m, T, P} \quad (13-1)$$

Siendo  $\rho_1$  la densidad del disolvente en g cm<sup>-3</sup>, V<sub>1</sub> el volumen del disolvente en cm<sup>3</sup>, W<sub>1</sub> el peso del disolvente en g y  $\rho_2$ , V<sub>2</sub> y W<sub>2</sub> la densidad, el volumen y el peso del soluto,  $\rho_3$ , V<sub>3</sub> y W<sub>3</sub>, los de la disolución y  $\bar{v}_2$  el volumen específico parcial del soluto, se tiene que

$$W_3 = W_1 + W_2 - W_2 \bar{v}_2 \rho_1 \quad (13-2)$$

Dividiendo por  $V_3$

$$\frac{W_3}{V_3} = \frac{W_1}{V_3} + \frac{W_2}{V_3} (1 - \bar{v}_2 \rho_1) \quad (13-3)$$

Puesto que por definición de  $\bar{v}_2$ , la masa del disolvente ( $W_1$ ) es infinita frente a la de soluto ( $W_2$ )

$$\rho_3 = \rho_1 + (1 - \bar{v}_2 \rho_1) C_2 \quad (13-4)$$

que nos permite determinar  $\bar{v}_2$  a partir de la pendiente de la recta que tiene  $\rho_3$  como ordenada y  $C_2$  abscisa.

### 13.1. Volumen específico de Ø29.

La densidad del fago en diluyente de fago se determinó por picnometría a 20°C de disoluciones de fago de concentraciones entre 10 mg/ml y 35 mg/ml(59,68,69).

La concentración de las disoluciones de Ø29 se determinó midiendo la absorción óptica como se ha indicado antes; multiplicando ésta por la absorción específica del fago se obtuvo la concentración en  $\text{g cm}^{-3}$ .

Representando la densidad,  $\rho_3$ , de diluciones de fago en función de la concentración,  $C_3$ , se define una recta cuya ordenada en el origen es la densidad,  $\rho_1$ , del disolvente y de cuya pendiente  $(1 - \bar{v}_2 \rho_1)$ , se

puede calcular  $\bar{V}_2$ .

### 13.2. Volumen específico de la proteína de Ø29.

El volumen específico parcial de la proteína total de Ø29 se obtuvo a partir de su composición de aminoácidos (60).

El volumen molar aparente de una proteína de composición conocida puede calcularse a partir de los incrementos de volumen de sus aminoácidos. Si la proteína contiene  $n_i$  moles del aminoácido  $i$  de peso molecular  $M_i$  y volumen molar aparente  $\phi_i$ , el volumen molar de la proteína  $\phi_p$ , es

$$\phi_p = \sum_i n_i \phi_i \quad (13-5)$$

Por tanto, el volumen específico aparente de la proteína,  $\bar{V}_p$ , es

$$\bar{V}_p = \frac{1}{\rho} = \frac{\phi_p}{M_p} = \frac{\sum_i n_i \phi_i}{\sum_i n_i M_i} \quad (13-6)$$

Esta ecuación contiene el peso molecular de la proteína,  $M_p$ , pero este valor no es necesario conocerlo para determinar el volumen específico aparente,  $\bar{V}_p$ . Si  $w_i$  es el tanto por ciento en peso del aminoácido  $i$  y  $\bar{V}_i$  el volumen específico del mismo ( $= \phi_i/M_i$ ),

el volumen de 100 g de proteína es  $w_i \bar{V}_i$ , y el volumen específico aparente,  $\bar{V}_p$ .

$$\bar{V}_p = \frac{\sum w_i \bar{V}_i}{100} \quad (13-7)$$

### 13.3. Volumen específico del DNA de $\phi 29$

El volumen específico del DNA de  $\phi 29$  se determinó a partir de su densidad de flotación en ClCs y de su composición de bases, después de corregir el agua ligada y pasar de cationes Cs a Na.

La ecuación

$$\frac{M_{Cs} + 18 n}{\rho_{Cs}} = M_{Cs} \bar{V}_{Cs} + 18 n \quad (13-8)$$

relaciona la masa media de la sal de Cs de los nucleótidos del DNA con su volumen específico (61).

$M_{Cs}$  es la masa media de la sal de Cs de los nucleótidos,  $n$  es el número de moles de agua ligada por ml de nucleótido,  $\rho_{Cs}$  es la densidad de flotación del DNA en ClCs y  $\bar{V}_{Cs}$  es el volumen específico de la sal de Cs del DNA.

Hearst y Vinograd (62,63), estudiando las densidades de flotación del DNA de T<sup>4</sup> en varias sales de

cesio, determinaron que para este catión el número de moléculas de agua ligada por ml. de nucleótido es 7. La masa media de la sal de cesio de los nucleótidos del DNA de Ø29 se determinó a partir de su composición de bases.

Sustituyendo estos valores en la ecuación anterior se obtiene el volumen específico de la sal de cesio del DNA. Para pasar de la sal de cesio a la sal sódica hay que tener en cuenta la diferencia de volumen entre dichos cationes (64). Llamando  $C_{Cs}$  y  $C_{Na}$  los volúmenes de los cationes indicados, el volumen específico de la sal sódica del DNA será

$$\bar{v}_{Na} = \frac{\bar{v}_{Cs} \bar{M}_{Cs} - (C_{Cs} - C_{Na})}{\bar{M}_{Na}} \quad (13-9)$$

### III.14. DETERMINACION DE COEFICIENTES DE SEDIMENTACION.

#### 14.1. Ecuaciones fundamentales (65).

Una macromolécula en disolución contiene una cierta cantidad de disolvente por lo que, en general, la masa,  $M_h$ , y el volumen,  $V_h$ , de la partícula solvatada son, en general, desconocidos.

Si la solución se somete a un campo centrífugo,

la fuerza por partícula es

$$F_c = M_h w^2 r \quad (14-1)$$

siendo  $w$  la velocidad angular del rotor y  $r$  la distancia de la partícula al eje de giro.

Contrarrestando a la fuerza centrífuga existe una fuerza de flotación,  $F_b$ , que, por el principio de Arquímedes, es

$$F_b = V_h \rho_o w^2 r \quad (14-2)$$

siendo  $\rho_o$  la densidad del disolvente.

Por tanto, la fuerza neta por partícula es

$$F = F_c - F_b = (M_h - \rho_o V_h) w^2 r \quad (14-3)$$

La masa,  $M_h$ , y el volumen,  $V_h$ , de la partícula solvatada, valen

$$M_h = M (1 + \delta_1) \quad (14-4)$$

$$V_h = M (\bar{V}_2 + \delta_1 \bar{V}_1^o) \quad (14-5)$$

siendo  $M$  el peso molecular de la partícula no solvatada,  $\delta_1$  los gramos de disolvente asociados con 1 g de la partícula no solvatada,  $\bar{V}_2$  el volumen específico parcial de la partícula y  $\bar{V}_1^o$  el volumen específico

del disolvente.

Sustituyendo (14-4) y (14-5) en (14-3)

$$F_c = M (1 - \bar{v}_2 \rho) w^2 r \quad (14-6)$$

La fuerza,  $F_c$ , imparte a la partícula una velocidad constante,  $u$ ,

$$u = \frac{F}{f} = M (1 - \bar{v}_2 \rho) w^2 r \quad (14-7)$$

siendo  $f$  el coeficiente de rozamiento de la partícula.

La velocidad,  $u$ , depende de la velocidad del rotor,  $w$ , y de la distancia,  $r$ , al eje de giro. Por tanto, es conveniente definir una cantidad que dependa sólo de parámetros moleculares. Esta cantidad es el coeficiente de sedimentación de la partícula,  $s$ ,

$$s = \frac{u}{w^2 r} = \frac{M (1 - \bar{v}_2 \rho)}{f} \quad (14-8)$$

El coeficiente de sedimentación es, por tanto, la velocidad que adquiere la macromolécula por campo centrífugo unidad. En el sistema CGS sus unidades son seg.

#### 14.2. Corrección a condiciones standard

De la ecuación (14-7) es claro que el coeficien

te de sedimentación,  $s$ , debe variar con la concentración, ya que depende del coeficiente de rozamiento,  $f$ , que varia con la concentración.

Aunque no existe una teoría general de la dependencia de  $f$  y, por tanto, de  $s$  con la concentración, empíricamente se ha observado que para macromoléculas compactas o simétricas, el coeficiente de sedimentación suele variar linealmente con la concentración en la forma

$$s = s^0 - KC \quad (14-9)$$

mientras que para macromoléculas asimétricas la relación empírica es

$$\frac{1}{s} = \frac{1}{s^0} + KC \quad (14-10)$$

Tanto en (14-9) como en (14-10),  $s^0$  es el coeficiente de sedimentación a dilución infinita y  $C$  la concentración de la disolución. En las dos ecuaciones  $K$  siempre es positivo, es decir,  $s$  siempre disminuye al aumentar  $C$ .

Como es lógico el valor del coeficiente de sedimentación extrapolado a concentración cero,  $s^0$ , depende de las propiedades del disolvente, por esta ra-

zón, el valor de  $s^0$  se reduce a condiciones standard de agua a  $20^{\circ}\text{C}$  como disolvente. El valor de  $s^0$  corregido de este modo sería el que tendría una disolución de la macromolécula en agua a  $20^{\circ}\text{C}$  si los parámetros moleculares  $M$ ,  $\bar{v}_2$  y  $f$  (ecuación (14-8)) fueran constantes independientes del disolvente.

Para una partícula esférica no solvatada ( $h = 0$ ) de masa  $M$  y volumen específico parcial  $\bar{v}_2$  el coeficiente de rozamiento molar es

$$f = 6\pi\eta N \left( \frac{3M\bar{v}_2}{4\pi N} \right)^{1/3} = h\psi(M, \bar{v}_2) \quad (14-11)$$

siendo  $\eta$  la viscosidad del medio y  $\psi(M, \bar{v}_2)$  una función de  $M$  y  $\bar{v}_2$ .

Si la partícula no es esférica y está solvatada,

$$f = h\psi(M, \bar{v}_2, h) \quad (14-12)$$

siendo  $\psi(M, \bar{v}_2, h)$  una función desconocida determinada por la forma, tamaño y solvatación de la partícula. Sin embargo, para corregir el valor de  $s^0$  a agua a  $20^{\circ}\text{C}$  se supone que  $\psi(M, \bar{v}_2, h)$  es una constante independiente del disolvente (65).

Por tanto, si en un cierto disolvente,  $d$ , a una

temperatura de  $t^{\circ}\text{C}$  tenemos, de acuerdo con (14-8) y (14-12), un valor del coeficiente de sedimentación a dilución infinita,  $s_{t,d}^{\circ}$ ,

$$s_{t,d}^{\circ} = \frac{M (1-\bar{v}_{2,t,d}) \rho_{t,d}}{\eta_{t,d} \psi(M, \bar{v}_2, h)} \quad (14-13)$$

y en agua, w, a  $20^{\circ}\text{C}$

$$s_{20,w}^{\circ} = \frac{M (1-\bar{v}_{2,20,w}) \rho_{20,w}}{\eta_{20,w} \psi(M, \bar{v}_2, h)} \quad (14-14)$$

De (13) y (14)

$$s_{20,w}^{\circ} = s_{t,d}^{\circ} \frac{\eta_{t,d}}{\eta_{20,w}} \cdot \frac{(1-\bar{v}_{2,20,w}) \rho_{20,w}}{(1-\bar{v}_{2,t,d}) \rho_{20,d}} \quad (14-15)$$

En la ecuación (14-15) el valor del volumen específico parcial del soluto en agua a  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $\bar{v}_{2,20,w}$ , se suele sustituir por el valor del volumen específico parcial en el disolvente experimental a  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $\bar{v}_{2,20,d}$  (66), resultando

$$s_{20,w}^{\circ} = s_{t,d}^{\circ} \frac{\eta_{t,d}}{\eta_{20,w}} \cdot \frac{(1-\bar{v}_{2,20,d}) \rho_{20,w}}{(1-\bar{v}_{2,t,d}) \rho_{t,d}} \quad (14-16)$$

En la corrección del coeficiente de sedimentación el factor mas importante suele ser la viscosidad ya que durante un experimento de sedimentación la viscosidad del disolvente puede variar de un modo apre-

ciable. Por tanto, el factor debido a la viscosidad,

$$\begin{aligned} \frac{\eta_{t,d}}{\eta_{20,w}} &= \frac{\eta_{t,w}}{\eta_{20,w}} \times \frac{\eta_{t,d}}{\eta_{t,w}} \\ &= \left( \frac{\eta_t}{\eta_{20}} \right)_w \left( \frac{\eta_d}{\eta_w} \right)_t \end{aligned} \quad (14-17)$$

suele separarse en dos subfactores, uno, variable con la temperatura, que da la relación de viscosidades del agua y otro, que da la relación de viscosidades del disolvente y del agua a la temperatura del experimento.

De acuerdo con (14-17), la ecuación (14-16) se transforma en

$$s_{20,w}^o = s_{t,d}^o \left( \frac{\eta_t}{\eta_{20}} \right)_w \left( \frac{\eta_d}{\eta_w} \right)_t \frac{(1-\bar{V})_{2,20,d} \rho_{20,w}}{(1-\bar{V})_{2,t,d} \rho_{t,d}} \quad (14-18)$$

### 14.3. Determinación experimental

Reescribiendo (14-8),

$$s = \frac{dr/dt}{w^2 r} = \frac{2.203}{60 w^2} \frac{d \log r}{dt'}$$

siendo  $t'$  el tiempo en minutos, si representamos  $\log r$  frente a  $t'$  se obtiene una recta cuya pendiente nos permite conocer el valor  $s$  de la partícula a la concentración del experimento.

Los coeficientes de sedimentación de  $\phi 29$  en DF se determinaron en una serie de disoluciones de concentraciones comprendidas entre  $1 \text{ mg cm}^{-3}$  y  $0.056 \text{ mg cm}^{-3}$ , en una ultracentrífuga analítica Beckman, modelo E, a  $10,589 \text{ rpm}$  y a  $20,0^{\circ}\text{C}$  por el método de la velocidad de sedimentación (67,68), empleándose un rotor An-D con una célula standard de aluminio de  $12 \text{ mm}$ .

El termistor se calibró representando los valores del dispositivo de medida del aparato frente a las lecturas de un termómetro contrastado insertado en el orificio del rotor donde se coloca la célula. El rotor enfriado previamente se fué calentando lentamente en un termostato.

Para medir las distancias desde el eje de giro hasta la zona límite entre el disolvente y la disolución se usó el sistema óptico schlieren que permite la visualización del límite en una fotografía en que aparece representado el gradiente del índice de refracción,  $dn/dr$ , en función de la distancia,  $r$ , como una curva de Gauss. En general, la variación del índice de refracción  $dn$ , puede considerarse directamente proporcional a la variación de concentra-

ción (69); por tanto, para la precisión requerida en la mayoría de las medidas, la figura schlieren es una gráfica de  $dn/dr$  en función de  $r$ . La abcisa correspondiente a la ordenada máxima se utilizó para medir los desplazamientos del límite a diferentes tiempos, por medio de un microcomparador óptico (68).

El valor obtenido para  $s_{20,DF}^0$ , a  $20^{\circ}C$  en diluyente de fago se corrigió para agua a  $20^{\circ}C$  de acuerdo con la ecuación (14-16)

$$s_{20,W}^0 = s_{20,DF}^0 \frac{\eta_{20,DF}}{\eta_{20,W}} \frac{(1-\bar{V}_{2,20,DF}) \rho_{20,W}}{(1-\bar{V}_{2,20,DF}) \rho_{20,DF}}$$

$\frac{\eta_{20,DF}}{\eta_{20,W}}$ , la relación de viscosidades del DF y el agua a  $20^{\circ}C$ , se determinó experimentalmente en un viscosímetro de Ostwald obteniéndose un valor de  $1,028 \pm 0,004$ ;  $\bar{V}_{2,20,DF}$ , el volumen específico parcial de  $\phi 29$  en DF, se determinó como se indica en la pág. 56;  $\rho_{20,W}$ , la densidad del agua a  $20,0^{\circ}C$ , es  $0,99823$  y  $\rho_{20,DF}$ , la densidad del DF a  $20^{\circ}C$ , se determinó experimentalmente por picnometría, obteniéndose un valor de  $1,0072$ .

### III.15. DETERMINACION DE COEFICIENTES DE DIFUSION

#### 15.1. Ecuaciones fundamentales (65).

Supongamos que en un tubo que contiene una disolución de una macromolécula de concentración  $C_0$  colocamos sobre ella con cuidado disolvente puro. De este modo se crea un límite nítido a través del cual la concentración de soluto cambia bruscamente de cero a  $C_0$ . Este sistema no está en equilibrio y, si se aguarda un cierto tiempo, el potencial químico,  $\mu_2$ , del soluto será el mismo en todo el sistema. Por tanto, la fuerza motriz que tiende a desplazar el soluto a través del límite es el cambio del potencial químico con la distancia. El flujo,  $J_2$ , por unidad de área será

$$J_2 = - L_2 \left( \frac{\partial \mu_2}{\partial x} \right) \quad (15-1)$$

El potencial químico del soluto depende de T, P y C, pero si T y P son constantes

$$\frac{\partial \mu_2}{\partial x} = \left( \frac{\partial \mu_2}{\partial C_2} \right)_{T,P} \left( \frac{\partial C_2}{\partial x} \right) \quad (15-2)$$

Por tanto el gradiente de concentración crea el flujo de soluto.

Como

$$\mu_2 = \mu_2^0 + RT \ln C_2 \gamma_2 \quad (15-3)$$

donde  $\gamma_2$  es el coeficiente de actividad, que es función de T, P y  $C_2$ . Diferenciando respecto a  $C_2$ ,

$$\left(\frac{\partial u_2}{\partial c_2}\right) = \frac{RT}{c_2} \left[ 1 + c_2 \left( \frac{\partial \ln \gamma_2}{\partial c_2} \right) \right] \quad (15-4)$$

Sustituyendo (15-4) y (15-2) en (15-1)

$$J_2 = - \frac{L_2 RT}{c_2} \left[ 1 + c_2 \left( \frac{\partial \ln \gamma_2}{\partial c_2} \right) \right] \frac{\partial c_2}{\partial x} \quad (15-5)$$

El factor  $L_2/c_2$  en (15-4) es  $1/Nf_2$ , siendo  $N$  el número de Avogrado y  $f_2$  el coeficiente de rozamiento del soluto (65). Por tanto,

$$J_2 = - \frac{RT}{Nf_2} \left[ 1 + c_2 \left( \frac{\partial \ln \gamma_2}{\partial c_2} \right) \right] \left( \frac{\partial c_2}{\partial x} \right) \quad (15-6)$$

o

$$J_2 = - D_2 \left( \frac{\partial c_2}{\partial x} \right) \quad (15-7)$$

siendo

$$D_2 = \frac{RT}{Nf_2} \left[ 1 + c_2 \left( \frac{\partial \ln \gamma_2}{\partial c_2} \right) \right] \quad (15-8)$$

El factor  $D_2$  es el coeficiente de difusión, con unidades  $\text{cm}^2 \text{seg}^{-1}$ , definido experimentalmente por la ecuación (15-7) que es la primera ley de Fick. La ecuación (15-8) indica que  $D_2$  es función de  $RT$ , que es una medida de la energía cinética de las moléculas, de  $f_2$ , que determina el tamaño y forma de la molécula y de un factor de corrección

$$1 + c_2 \left( \frac{\partial \ln \gamma_2}{\partial c_2} \right)$$

que indica que  $D_2$  depende de la interacción soluto-so-

luto, es decir, de la concentración.

Para soluciones ideales,

$$\lim \gamma_2 = 1$$

$$C_2 \rightarrow 0$$

Por tanto,

$$D_2 = \frac{RT}{Nf_2} \quad (15-9)$$

Si, además,  $f_2$  no varía con la concentración,  $D_2$  es una constante.

Para la determinación experimental de  $D_2$  lo más fácil es observar como varía la concentración del soluto,  $C_2$ , en función del tiempo en la región del límite. Esto puede obtenerse combinando la ecuación (15-7) con la ecuación de continuidad

$$\left( \frac{\partial C_2}{\partial t} \right)_x = - \left( \frac{\partial J_2}{\partial x} \right)_t \quad (15-10)$$

que establece la conservación de masa de la macromolécula en el sistema.

De (15-7) y (15-10)

$$\left( \frac{\partial C_2}{\partial t} \right)_x = \frac{\partial}{\partial x} \left[ D_2 \left( \frac{\partial C_2}{\partial x} \right)_t \right] \quad (15-11)$$

y, si suponemos que  $D_2$  no depende de  $C_2$ , obtenemos

$$\left( \frac{\partial c_2}{\partial t} \right)_x = D \left( \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \right)_t \quad (15-12)$$

La ecuación (15-12), que es la expresión de la segunda ley de Fick, indica que la velocidad de cambio de la concentración de soluto en el límite de difusión es proporcional a la velocidad de cambio del gradiente de concentración en el límite.

La ecuación (15-12) puede resolverse en casos especiales, una vez definidas unas ciertas condiciones iniciales y de contorno (figura 3). La longitud de la célula (coordenada  $x$ ) puede considerarse muy larga, en relación al tiempo durante el que se sigue el proceso de difusión. Por tanto, puede suponerse que en la parte superior e inferior ( $x = +\infty$  y  $-\infty$ ) la concentración no deja de ser cero y  $C_0$ , respectivamente. A tiempo  $t = 0$  en  $x = 0$  se crea un límite nítido del disolvente sobre la disolución. En estas condiciones de difusión libre la solución de la ecuación (15-12) es

$$c_2 = \frac{C_0}{2} \left[ 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{x/2 \sqrt{Dt}} e^{-y^2} dy \right] \quad (15-13)$$

siendo  $y = \frac{x}{2 \sqrt{Dt}}$

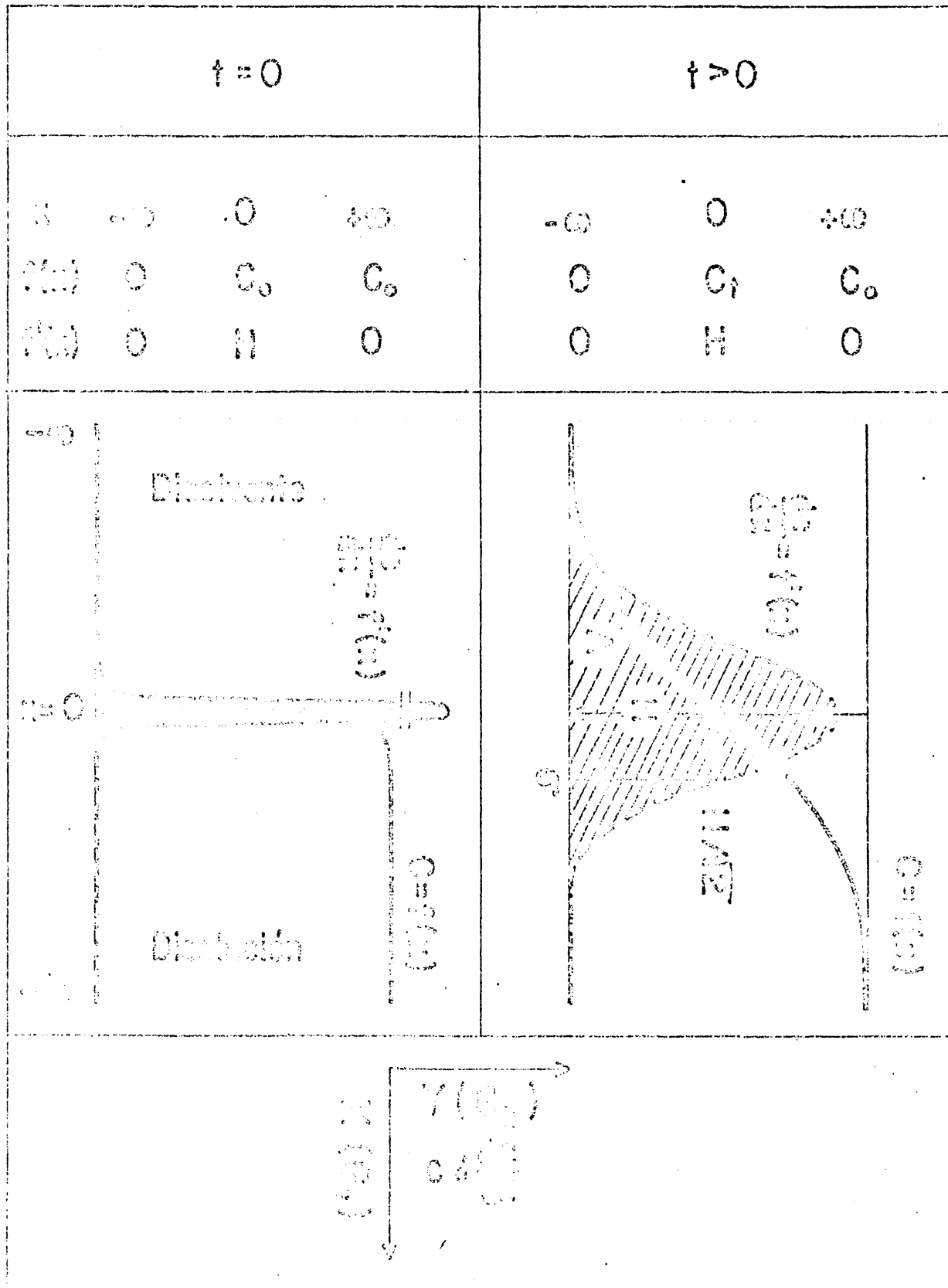


Figura 3. Ensanchamiento de un límite inicialmente nítido durante difusión libre.

La ecuación (15-13) es la curva en forma de S de la figura 3, que representa  $C_2 = f(x)$ . La integral es la integral de probabilidad, cuyo valor, que es una función de  $x/2\sqrt{Dt}$ , varía desde 0 hasta  $1/2$ , cuando  $x/2\sqrt{Dt}$  varía desde 0 hasta  $\infty$ .

En algunos casos es mal útil tener la  $dC_2/dx = f(x)$ . Para ello, derivando (15-13) respecto a  $x$ , obtenemos el gradiente de concentración, que es la "curva de error" o campana de Gauss.:

$$\left(\frac{\partial C_2}{\partial x}\right) = \frac{C_0}{2\sqrt{Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \quad (15-14)$$

Tanto la ecuación (15-13) como la (15-14) permiten determinar experimentalmente el coeficiente de difusión.

## 15.2. Corrección a condiciones standard (65)

Para interpretar el coeficiente de difusión obtenido, extrapolado a concentración cero,  $D^0$ , ha de tenerse en cuenta que una partícula en disolución está solvatada con una cierta cantidad de disolvente,  $\delta$ , adquiriendo un volumen solvatado,  $V_h$ , dado por

$$V_h = \frac{4}{3} \pi R_0^3 \quad (15-15)$$

suponiendo que la partícula solvatada sea una esfera de radio  $R_o$ .

De acuerdo con la ecuación (14-5)

$$V_h = M (\bar{V}_2 + \delta_1 V_1^o)$$

Por tanto,

$$R_o = \left[ \frac{3M}{4\pi} (\bar{V}_2 + \delta_1 \bar{V}_1) \right]^{1/3} \quad (15-16)$$

El coeficiente de rozamiento de la esfera ideal sería

$$f_o = 6\pi\eta R_o \quad (15-17)$$

siendo  $\eta$  la viscosidad del medio.

El coeficiente de rozamiento real de la partícula puede expresarse en función de  $f_o$ , por medio de la relación  $f/f_o$ ,

$$f = \frac{f}{f_o} \cdot 6\pi\eta R_o \quad (15-18)$$

La relación  $(f/f_o) = 1$  si la macromolécula solvatada es, realmente, una esfera, pero, en general,  $(f/f_o) > 1$ .

Combinando (15-9), (15-16) y (15-18)

$$f = \frac{RT}{ND^o} = 6\pi\eta(f/f_o) \left[ \frac{3M (\bar{V}_2 + \delta_1 \bar{V}_1)}{4\pi} \right]^{1/3} \quad (15-19)$$

La ecuación (15-19) indica que el coeficiente de difusión de las partículas,  $D^{\circ}$ , depende de su peso molecular,  $M$ , de su volumen específico parcial,  $\bar{v}_2$ , de  $(f/f_0)$ , que es un índice de la desviación de la partícula de la forma esférica, y del índice de solvatación,  $\delta$ .

De un modo análogo a lo hecho con el coeficiente de sedimentación,  $s^{\circ}$ , el coeficiente de difusión,  $D^{\circ}$ , se corrige normalmente a condiciones standard de agua a  $20^{\circ}\text{C}$ . El valor corregido de  $D^{\circ}$ ,  $D_{20,W}^{\circ}$ , sería el coeficiente de difusión de la partícula si los parámetros moleculares,  $M$ ,  $\bar{v}_2$ ,  $(f/f_0)$  y  $\delta$ , (ecuación 15-19) fuesen constantes independientes del disolvente. Si esto fuera así, de acuerdo con (15-19), para un cierto disolvente,  $d$ , a una temperatura  $273 + t$ , y con una viscosidad  $\eta_{273+t,d}$

$$D_{t,d}^{\circ} = \frac{(273 + t)}{\eta_{273 + t,d}} \psi (M, \bar{v}_2, (f/f_0), \delta_1) \quad (15-20)$$

Para el agua a  $20^{\circ}\text{C}$

$$D_{20,W}^{\circ} = \frac{293}{\eta_{293,W}} \psi (M, \bar{v}_2, (f/f_0), \delta_1) \quad (15-21)$$

De (15-20) y (15-21)

$$D_{20,W}^o = D_{t,d}^o \left( \frac{\rho_{273+t,d}}{\rho_{293,W}} \right) \left( \frac{293}{273+t} \right) \quad (15-22)$$

y desdoblando la relación de viscosidades en dos subfactores, igual que se hizo en la corrección del coeficiente de sedimentación,

$$D_{20,W}^o = D_{t,d}^o \left( \frac{\rho_d}{\rho_w} \right)_{273+t} \left( \frac{\rho_{273+t}}{\rho_{293}} \right)_w \left( \frac{293}{283+t} \right) \quad (15-23)$$

### 15.3. Determinación experimental

Los coeficientes de difusión de Ø29 en DF se determinaron en una serie de disoluciones de diferente concentración en un aparato de difusión libre-electroforesis de Beckman, modelo H, a 1°C y 20°C, por tres métodos diferentes.

#### 1) Método de la relación altura-área (70)

Utilizando el sistema óptico schlieren puede visualizarse en una placa fotográfica el límite de difusión o zona de separación entre el disolvente y la disolución, dando una gráfica del gradiente del índice de refracción,  $\partial n / \partial x$ , en función de la distancia. Esta gráfica es la representación de la ecuación (15-14).

$$\frac{\partial n}{\partial x} = \frac{\Delta n}{2\sqrt{\pi Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \quad (15-24)$$

siendo  $n = n_0 + KC$  y  $\Delta n$  la diferencia total del índice de refracción a través del límite.

En la figura 3, la altura,  $H$ , de la curva de Gauss, es

$$H = \left( \frac{\partial n}{\partial x} \right)_{x=0} = \frac{\Delta n}{2\sqrt{\pi Dt}} \quad (15-25)$$

y el área,  $A$ , bajo la curva es

$$A = \int_{-\infty}^{+\infty} \left( \frac{\partial n}{\partial x} \right) dx = \Delta n \quad (15-26)$$

Sustituyendo (15-26) en (15-25) y operando

$$\left( \frac{A}{H} \right)^2 = 4\pi Dt \quad (15-27)$$

Por tanto, representando  $(A/H)^2$  en función de  $t$  se obtiene una recta cuya pendiente es  $4\pi D$ . Sin embargo, en la práctica hay que reducir las dimensiones obtenidas en la placa a las dimensiones reales en la célula.

Así,  $\partial n / \partial x$  en la célula y la ordenada  $Y$  de la placa schlieren están relacionadas por la ecuación :

$$\frac{\partial n}{\partial x} = G_h Y \quad (15-28)$$

Por otro lado, siendo  $G_v$  los aumentos verticales,  $X$  la coordenada en la placa y  $x$  la de la célula,

$$x = \frac{X}{G_v} \quad (15-29)$$

Por tanto

$$\Delta n = \frac{K}{G_v} \int_{-\infty}^{+\infty} Y \, dx = \frac{G_h}{G_v} A \quad (15-30)$$

Sustituyendo (28) y (30) en (9),

$$\frac{\frac{G_h}{G_v} \cdot A}{2\sqrt{\pi D t}} = G_v H \quad (15-31)$$

y, siendo  $G = G_v/G_h$ ,

$$D = \frac{1}{4\pi G^2} \left( \frac{A}{H} \right)^2 \cdot \frac{1}{t} \quad (15-32)$$

## 2) Método de Longworth (70-72).

Utilizando un interferómetro de Rayleigh como sistema óptico se obtiene directamente una representación del índice de refracción frente a  $x$  a través del límite de difusión. Esta curva es la integral de la obtenida con el sistema schlieren y está dada por la ecuación

$$n = \frac{\Delta n}{2} \left[ 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{x/2\sqrt{Dt}} e^{-y^2} dy \right] \quad (15-33)$$

siendo  $\Delta n$  la diferencia total del índice de refracción entre la disolución y el disolvente a través del límite y  $y = x/2\sqrt{Dt}$ .

Un límite de difusión libre en una célula de un interferómetro (la otra célula se llena con disolvente) da lugar a una diferencia de índice de refracción que va variando con la coordenada vertical a lo largo de la extensión del límite de difusión. En la fotografía se obtiene, por tanto, un desplazamiento horizontal continuo de líneas, tal como se muestra en la figura 4. Las líneas verticales en las partes superior (disolvente) e inferior (disolución) de las fotos corresponden a regiones de la célula donde no hay límite de difusión. Estas líneas definen, por tanto, el eje vertical de la célula. Las líneas diagonales en el centro de cada foto corresponden al límite de difusión. Cada línea corresponde a una función,  $n(x)$ , del índice de refracción en la célula; es decir, es una curva de probabilidad integral completa (ecuación 15-33), pero como la apertura lateral del aparato está limitada por la falta de coherencia de la luz de la

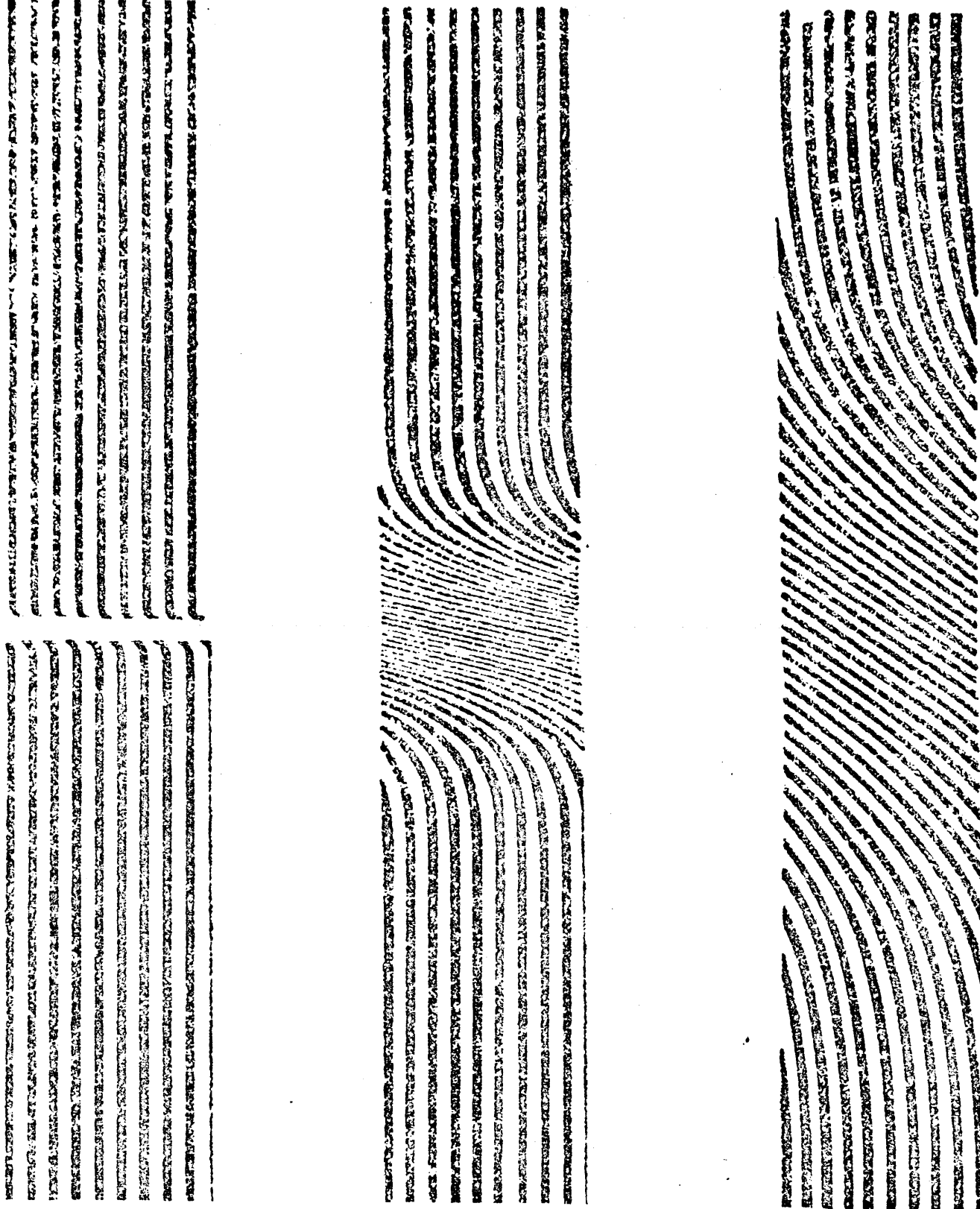


Figura 4. Interferograma de un límite de difusión obtenido con un interferómetro Rayleigh.

fuente luminosa, tan pronto como una línea se desplaza del eje mas de una cierta cantidad, se pierde; esto hace que no se obtenga el trazado completo de una línea a lo largo de todo el límite de difusión. En la figura 5 se han montado paralelas una serie de fotos idénticas de un mismo interferograma Rayleigh a distancias tales que las líneas ocupen seis posiciones relativas verdaderas. De este modo puede reconstruirse la situación que se tendría si las aperturas laterales de las rendijas del interferómetro fuesen mucho mayores. En dicha figura puede verse que la gráfica correspondiente a una línea completa es la curva integral de probabilidad dada por la ecuación (15-33).

Puesto que las coordenadas verticales,  $H$ , de una figura de interferencias son proporcionales a la altura,  $h$ , (figura 3), en la célula, los puntos en los que las franjas diagonales sucesivas cortan a una vertical representan los niveles en el límite entre los que el camino óptico difiere en una longitud de onda.

Un parámetro fundamental de los cálculos es el número total de líneas,  $J$ , que es una medida del cambio total de concentración a través del límite. Si  $a$  es el grosor de la célula,  $\Delta n$  la diferencia del  $n$

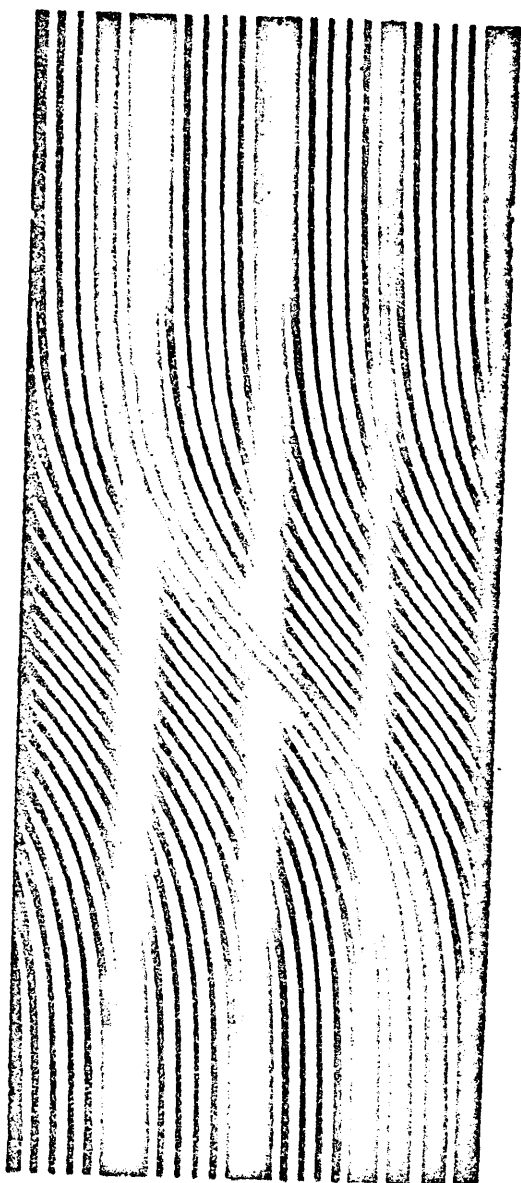


Figura 5. Síntesis de una curva integral de difusión completa.

dice de refracción entre la disolución y el disolvente y  $\lambda$  la longitud de onda de la luz,

$$J = \frac{a \Delta n}{\lambda}$$

En general J no es un número entero; la parte entera es el número de líneas diagonales que cortan a una vertical; la porción decimal se determina del modo siguiente : si se traza una recta como continuación de una de las líneas verticales correspondiente a la disolución homogénea situada por debajo del límite, dicha línea no coincide en general con una línea vertical en el disolvente situado sobre el límite de difusión. La relación entre este desplazamiento lateral y la separación de líneas verticales adyacentes es la parte decimal de J.

Todos los cálculos que se describen a continuación están basados en la idea que la distribución de concentración en el límite de difusión es Gaussiana : Puesto que el número de la línea, j, es una medida de la concentración en el límite de difusión y es igual a J/2 en el centro (x = 0), figura 3, estos números pueden normalizarse a la misma escala que los de las tablas de funciones de probabilidad (73) usando la proporción

$$\left(j - \frac{J}{2}\right) / \frac{J}{2} = (2j - J) / J.$$

En las tablas de funciones de probabilidad, las "concentraciones" normalizadas

$$\frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-x^2} dx$$

están tabuladas en función de las "distancias" normalizadas,

$$x = - \frac{h}{2\sqrt{Dt}}$$

y varían desde 0 hasta 1 cuando  $x$  varía desde 0 hasta infinito.

Por tanto, una vez emparejadas las líneas  $j$ -columnas (1) y (2) de la tabla 6, se calculan los valores  $(2j - J)/J$  para cada valor de  $j$ -columnas (3) y (4)-; puesto que las tablas de funciones de probabilidad sólo cubren la mitad positiva de la función de probabilidad, el signo de  $(2j - J)/J$  puede ignorarse siempre que  $j_k < J/2 < j_l$ , y los valores de  $h_j/2\sqrt{Dt}$ -columnas (5) y (6)- se suman para obtener el valor del factor de normalización -columna (7)-.

Las posiciones relativas,  $H_j$ , de los pares de líneas emparejadas se determinan en un microcomputador obteniéndose las columnas (8) y (9) y la diferencia,

$\Delta H = H_1 - H_k$ , indica la distancia entre ambas -columna 10-.

Dividiendo los valores de la columna (10) por los de la (17) se obtiene el valor de  $2\sqrt{Dt}$ . ( $\Delta H/\Delta h$ ) -columna (11)- o sus cuadrados  $4Dt (\Delta H/\Delta h)^2$  -columna 12-.

La relación  $\Delta H/\Delta h$  es el factor de aumento del sistema de lentes, que se determina fotografiando una escala exacta dibujada sobre una placa de vidrio, que se monta delante de la célula. La comparación de los intervalos de las líneas en la fotografía con los de la escala original permite determinar el valor de  $\Delta H/\Delta h$ .

Dividiendo los valores de la columna (12) por el valor de  $(\Delta H/\Delta h)^2$  se obtiene  $4Dt$ . - columna(13)-.

Repitiendo todas las operaciones indicadas a diferentes tiempos y obtenidos los correspondientes valores de  $D$ , en general se observa que los valores del coeficiente de difusión suelen disminuir con el tiempo ya que el límite de difusión va haciéndose menos nítido. Representando los distintos valores obtenidos para  $D$  en función de  $t$  puede extrapolarse para  $t = 0$ .

Tabla 6. Determinación de los valores  $4Dt (\Delta H/\Delta h)^2$  a partir de un interferograma Rayleigh de difusión (ver tabla 22)

Columna		
(1), (2)	$j_k, j_1$	Pares de líneas apareadas; el número de la línea es una medida de la concentración en el límite de difusión.
(3), (4)	$(2j_k - J)/J$	Normalización de los valores $j_k, j_1$ a una escala igual que la de las funciones de probabilidad.
(5), (6)	$X_k, X_1$	Distancias $x = -h/2 \sqrt{Dt}$ normalizadas, obtenidas de las tablas de funciones de probabilidad a partir de los valores $(2j_k - J)/J$ y $(2j_1 - J)/J$ .
(7)	$h/2 \sqrt{Dt}$	Factor de normalización = $X_k + X_1$ .
(8), (9)	$H_k, H_1$	Posiciones relativas de las líneas $j_k, j_1$ , determinadas con un microcomparador.
(10)	$\Delta H$	Distancia entre las líneas $j_k, j_1 = H_1 - H_k$ .
(11)	$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h)$	Cociente entre (10) y (7). $(\Delta H/\Delta h)$ , el factor de aumento del sistema de lentes, se determina como se indica en el texto.
(12)	$4Dt (\Delta H/\Delta h)^2$	Cuadrado de (11)
(13)	$4Dt$	Cociente entre (12) y $(\Delta H/\Delta h)^2$

### 3) Método del papel de probabilidad (72)

Como ya se ha indicado antes, la ecuación (15-24)

$$\frac{\partial n}{\partial x} = \frac{\Delta n}{2\sqrt{\pi Dt}} e^{-x^2/4Dt}$$

es la derivada de la ecuación integral de probabilidad (15-33).

Los valores de  $x$  en los dos puntos de inflexión de la curva, es decir, la desviación standard, pueden obtenerse igualando a cero la segunda derivada de  $dn/dx$ , obteniéndose

$$x_i = \sigma = 2\sqrt{Dt} \quad (15-34)$$

Por tanto,

$$D = \frac{\sigma^2}{2t} \quad (15-35)$$

es decir, el coeficiente de difusión es la mitad de la varianza,  $\sigma^2$ , dividido por el tiempo de difusión,  $t$ .

En una distribución normal de probabilidad la desviación standard,  $\sigma$ , se encuentra en una posición correspondiente al 16% y al 84% del número total de líneas. Por tanto, una vez determinado el número total

de líneas, se calcula qué porcentaje del mismo se encuentra entre el centro de cada línea y un extremo de la célula. Este porcentaje se representa frente a la posición de la línea con respecto al eje de la célula. Siempre que el límite sea suficientemente nítido al comienzo del experimento y el coeficiente de difusión no varíe mucho con la concentración, estos valores deben distribuirse como una distribución normal acumulativa. Representando esta función sobre papel de probabilidad debe obtenerse una recta en la que  $\sigma$  corresponde, con buena precisión, al 16 y 84% del número total de líneas.

Representando los porcentajes de cada línea respecto al total ( $J_m$ ) frente a sus posiciones relativas, para cada tiempo, se obtiene una recta de la que puede deducirse el valor de  $\sigma$ . Con los valores de  $\sigma$  a diferentes tiempos, representando  $\sigma^2$  en función de  $2t$  (ecuación 15-35), la pendiente da el valor de  $D$ .

### III.16. DETERMINACION DE MOVILIDADES ELECTROFORETICAS (65)

La movilidad electroforética,  $u$ , de un polielectrolito se define como la velocidad por campo eléctrico unidad.

$$u = \frac{V}{E} \quad (16-1)$$

De acuerdo con (16-1) las unidades de  $u$  son  $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{seg}^{-1}$ .

En el caso de un polielectrolito, el número de grupos ionizados, positivos y negativos, y por tanto su carga, es una función del pH. Aquel pH para el que se hace cero la carga neta del polielectrolito se llama punto isoeléctrico, pI.

Para determinar movilidades electroforéticas de un polielectrolito a diferentes pHs, con el fin de determinar el punto isoeléctrico, es necesario hacer las determinaciones a fuerza iónica constante, ya que las dimensiones de la doble capa electroquímica del macroión son función de la fuerza iónica,  $I$ , y por tanto, una variación de la fuerza iónica daría lugar a un cambio en la movilidad.

Una aproximación de la relación entre movilidad y fuerza iónica esta dada por la expresión

$$u = \frac{ze}{6\pi\eta R} \cdot \frac{X(kR)}{1 + kR} \quad (16-2)$$

donde

$$k = \left( \frac{8\pi N e^2}{1000 \epsilon k T} \right)^{1/2} I^{1/2}, \quad (16-3)$$

Z es el número de unidades de carga ( $e = 4,8 \times 10^{-10}$  u.e.e.),  $\eta$  es la viscosidad del medio, R es el radio de la partícula,  $\epsilon$  es la constante dieléctrica y I es la fuerza iónica del medio ( $I = \sum_i C_i Z_i^2$ ).

K es el recíproco del radio de la nube iónica de la teoría de Debye-Hückel, que es una función de la fuerza iónica del medio : si I es grande la nube iónica alrededor del macroión se contrae; si I es pequeña, la nube iónica se difunde y extiende.

La función X (kR) es la función de Henry, que varía entre 1.0 y 1.5 cuando kR cambia de cero hasta infinito.

Para la determinación de las movilidades electroforéticas de Ø29 a diferentes pHs se empleó un tampón de barbital sódico-acetato sódico-ClH desde pH 2,6 a 9. A este tampón se añadió en todos los casos  $Cl_2Mg$  a una concentración final 0,01 M y cantidades variables de ClNa según el pH, para mantener la fuerza iónica constante

Las medidas de movilidad se hicieron en una cé-

lula de 11 ml de electroforesis libre, tipo Tiselius, de Beckman a una temperatura de  $1^{\circ}\text{C}$  para evitar distorsiones térmicas, aplicándose un campo eléctrico de  $4,5 \text{ V cm}^{-2}$ . En todas las determinaciones la concentración de  $\phi 29$  fué de 20 unidades de  $A_{260} \text{ cm}^{-1}$ .

Para determinar la posición en función del tiempo del límite de separación entre la disolución y el disolvente en las ramas ascendente y descendente de la célula se utilizó el sistema óptico Schlieren. Representando las distancias recorridas en función del tiempo se obtiene una recta para cada pH, cuya pendiente es la velocidad media,  $v_m$ . Dividiendo la velocidad media por el campo eléctrico aplicado se obtiene la movilidad electroforética.

### III.17. ESPECTROS ULTRAVIOLETA

Los espectros ultravioleta de  $\phi 29$ , su proteína y DNA se determinaron en un espectrofotómetro Cary 15, previamente calibrado con una disolución alcalina de  $\text{CrO}_4\text{K}_2$  (.58).

De las muestras conteniendo 0,6 - 0,7 unidades de  $A_{260} \text{ cm}^{-1}$  de fago, proteína o DNA se realizaron espectros entre 250 y 320 nm en una cubeta con un paso

de luz de 1 cm. Los valores obtenidos se corrigieron para la absorción debida a "scattering".

### III.18. MICROSCOPIA ELECTRONICA

#### Preparación de las rejillas.

Un portaobjetos limpio y desengrasado se sumergió en un frasco de boca ancha que contenía una disolución de colodión al 0,75% en acetato de isoamilo y se dejó secando a temperatura ambiente, en un recipiente cerrado 15-30 minutos.

La película de colodión se separó del portaobjetos haciéndola flotar sobre una superficie limpia de agua destilada en una placa de Petri, y sobre la misma se colocaron las rejillas de cobre con la cara brillante hacia abajo. La película con las rejillas se sacó de la placa de Petri introduciendo en el agua un papel de filtro tocando un extremo de la película y sumergiendo lentamente hasta que toda la película con las rejillas quedó adherida al mismo. El papel de filtro con las rejillas con película se dejó a temperatura ambiente sobre varias hojas de papel de filtro hasta quedar completamente seco.

Sobre la película de colodión se depositó una

película de carbón introduciendo el papel de filtro con las rejillas en la cámara de un evaporador Siemens. Una vez alcanzado un vacío de  $1 \times 10^{-5}$  mm de mercurio se hizo pasar una corriente de 30-50 A durante 60 seg a través de dos electrodos de carbón con una superficie de contacto de aproximadamente  $1 \text{ mm}^2$ . De este modo se obtuvo un depósito uniforme de carbón con un espesor de menos de  $100 \text{ \AA}$ , sobre la película de colodión.

Con un capilar se puso una gota de la muestra sobre la rejilla y después de un minuto se retiró la mayor parte del líquido tocando la gota con el borde de un papel de filtro. La muestra se contrastó con una gota de una disolución recién preparada de acetato de uranilo  $10^{-4}$  M en agua, que se aplicó y retiró de la rejilla del modo indicado para la colocación de la muestra. El tiempo de tinción fue de 60 segundos. (75).

La película de colodión se eliminó calentando la rejilla en una estufa a  $180^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, y las preparaciones se observaron al microscopio electrónico a un voltaje de 80 KV, con una apertura de  $50 \mu\text{m}$ , a unos 40,000 aumentos.

#### IV. RESULTADOS

#### IV.1. PURIFICACION DE Ø29. RENDIMIENTO Y HOMOGENEIDAD.

Un cultivo de la bacteria huésped (17 litros) en fase logarítmica se infectó a una multiplicidad de 2 fagos/bacteria cuando la densidad del cultivo era de unas  $2 \times 10^8$  bacterias/ml (figura 6). Como puede observarse, Ø29 no detiene el crecimiento bacteriano y antes y poco después de la infección el pH del medio sigue disminuyendo; sin embargo, en el momento en que el cultivo comienza a lisar, como indica la caída de densidad óptica a 660 nm, el pH aumenta de un modo marcado.

El lisado espontáneo se trató con lisozima, DNasa y RNasa, como se indica en Métodos, y, a continuación se centrifugó en flujo continuo para eliminar restos celulares. El sobrenadante, que contenía el virus, se trató con polietilenglicol que precipita cuantitativamente el fago. El sedimento se pasó por una columna de esferosil, que se eluyó con DF. La figura 7 muestra la aparición de un primer pico de  $A_{260}$  coincidente con el pico de infectividad y un segundo pico de material incluido que no contenía virus.

El material del primer pico se concentró por centrifugación y al sedimento, resuspendido en DF, se

añadió ClCs hasta una densidad de  $1,43 \text{ g cm}^{-3}$  y se centrifugó hasta equilibrio de densidad. La figura 8 muestra la distribución de  $A_{260}$ , infectividad y densidad en las fracciones del gradiente; a una densidad de  $1,44 \text{ g cm}^{-3}$  se observa la existencia de un pico principal de  $A_{260}$ , que coincide con un pico de u.f.p. (pico I); en la parte superior del gradiente (fracciones 28 y 29) hay un pico de  $A_{260}$  que no contiene virus infectivo (pico III); finalmente, en la zona de densidad  $1,42 - 1,43 \text{ g cm}^{-3}$  se observa un pico pequeño de  $A_{260}$  y u.f.p. (pico II); este último se hace mas claro cuando las fracciones correspondientes a una densidad comprendida entre  $1,42$  y  $1,43 \text{ g cm}^{-3}$  se mezclan y se vuelven a centrifugar hasta equilibrio en ClCs de densidad media  $1,43 \text{ g cm}^{-3}$  (figura 9).

Cuando el material de los picos I, II y III se examina con el microscopio electrónico se observa que el pico I contiene  $\emptyset 29$  esencialmente homogéneo (placa I), el pico II variantes morfológicos de  $\emptyset 29$  (placa II) y el pico III, fagos completos sin DNA, estructuras parciales del virus (cabezas con y sin cuello, que carecen de colas, cuellos con cola, etc) y variantes morfológicos, también libres de DNA (placa III).

El material correspondiente al pico I está esencialmente puro, como se prueba por microscopía electrónica (placa 1), por sedimentación en gradiente de sacarosa (figura 10) y por electroforesis de las proteínas del fago (placa IV).

La tabla 7 muestra el rendimiento en la purificación de Ø29 partiendo de un lisado de 17 litros.

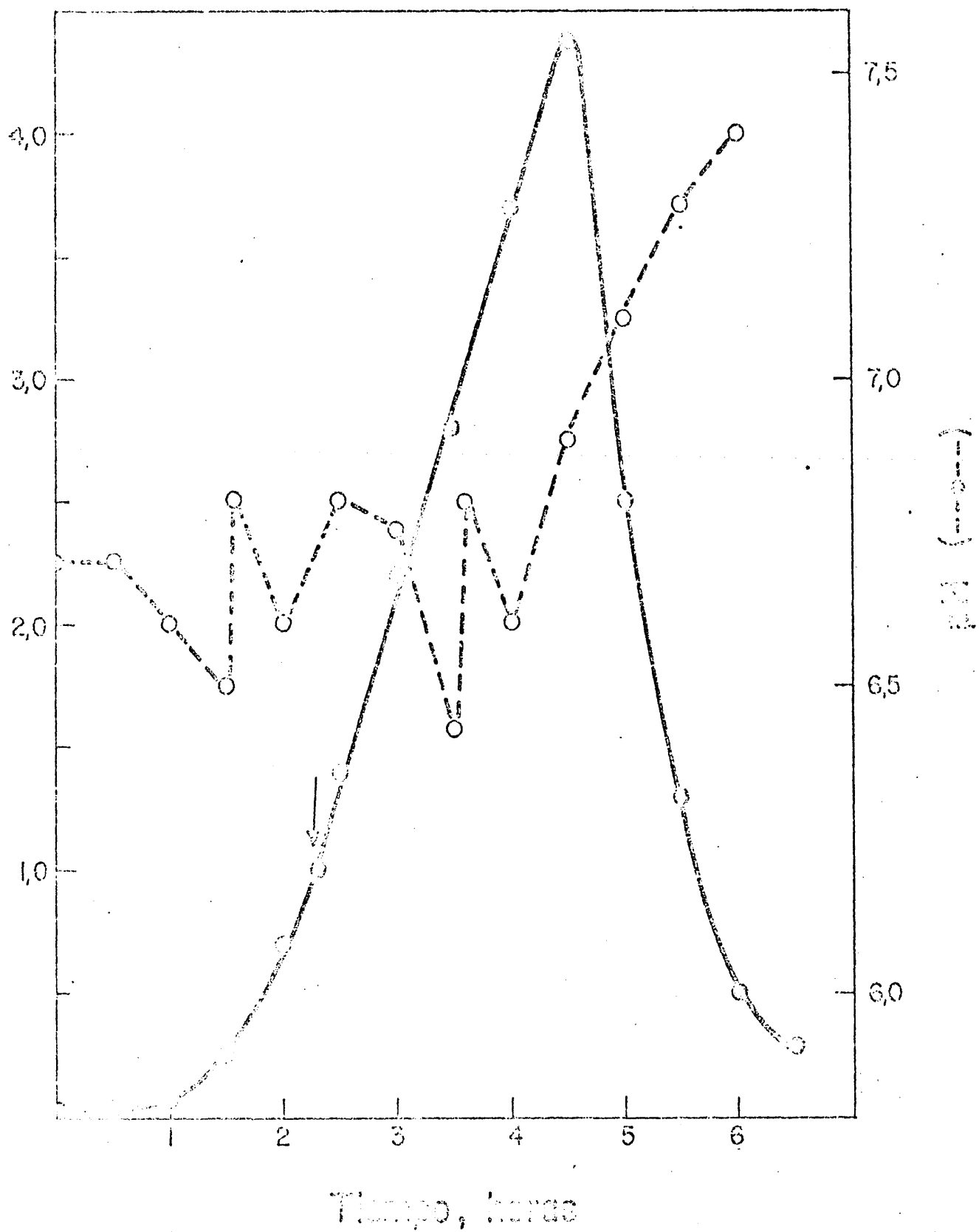


Figura 6. Infección de B. amyloliquefaciens con Ø29.

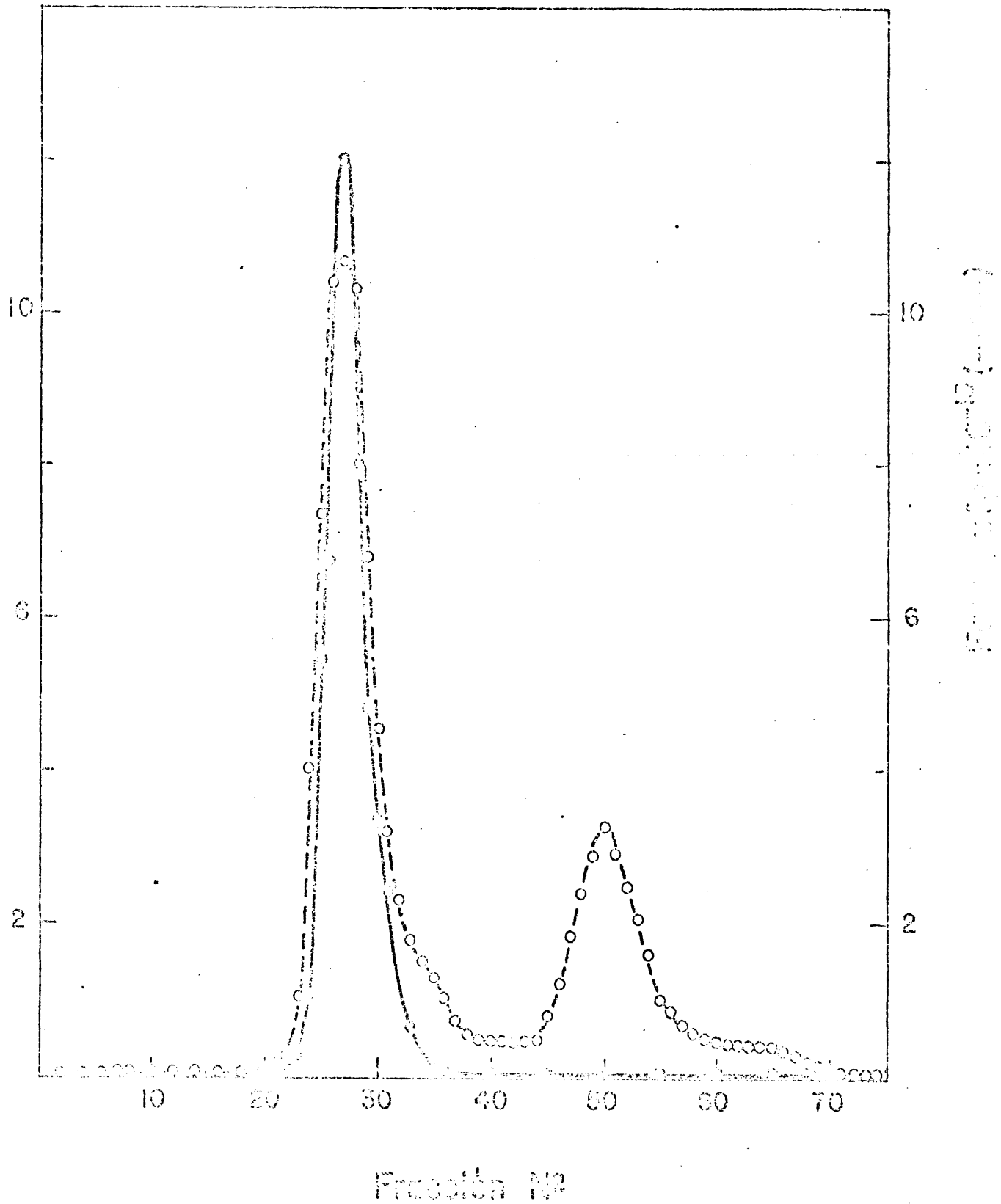


Figura 7. Cromatografía de un lisado concentrado con polietilenglicol, en una columna de vidrio de poro controlado.

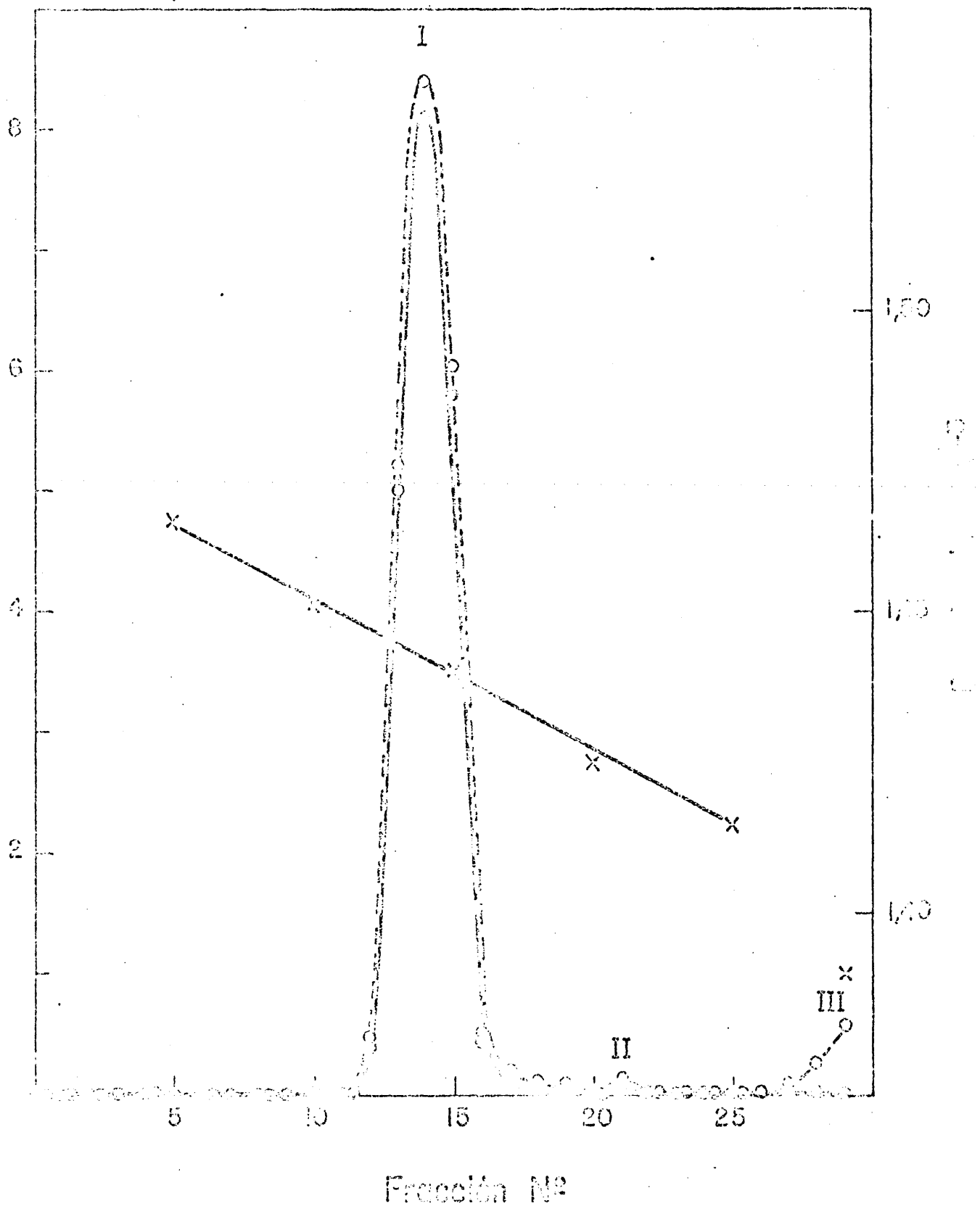
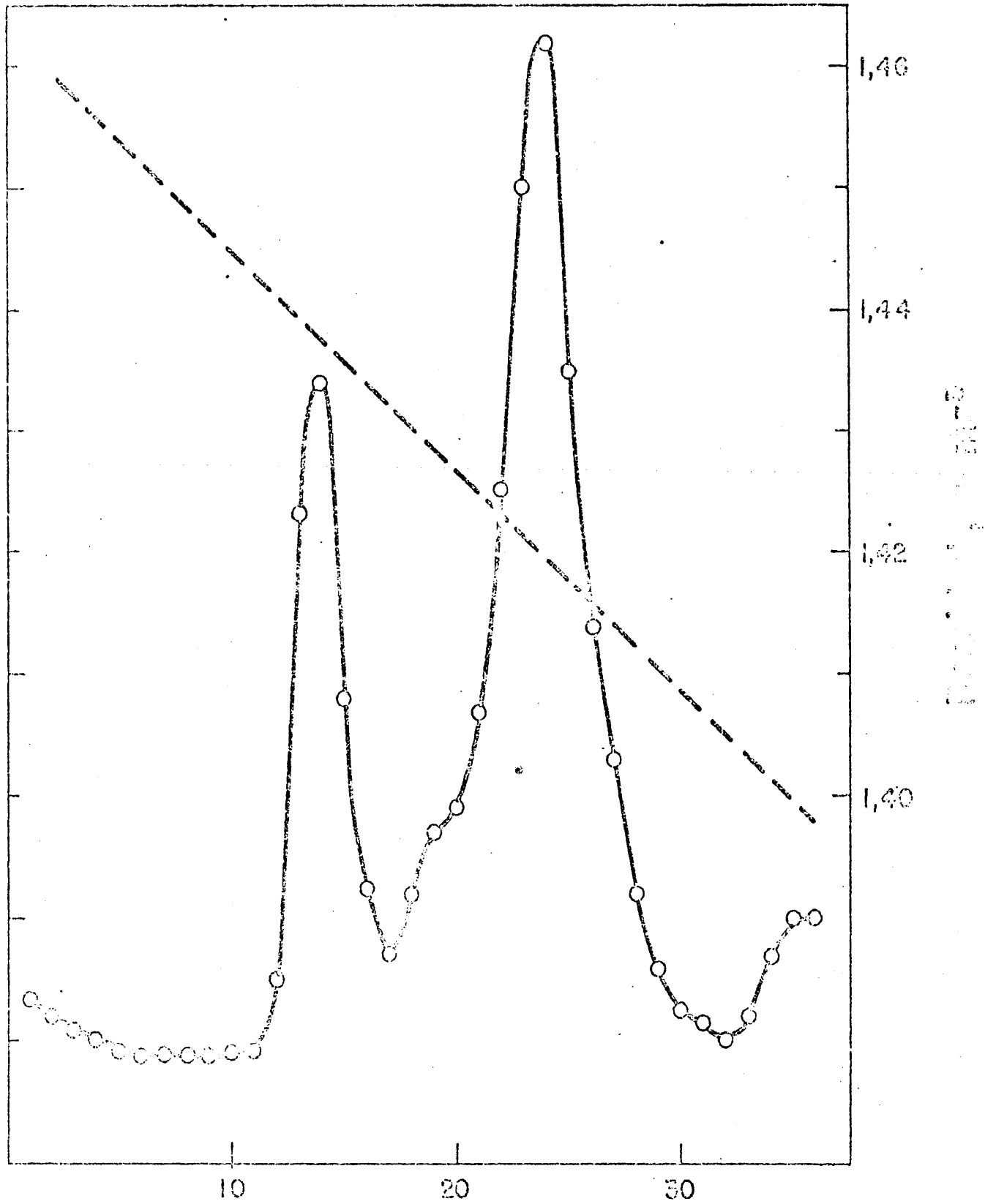
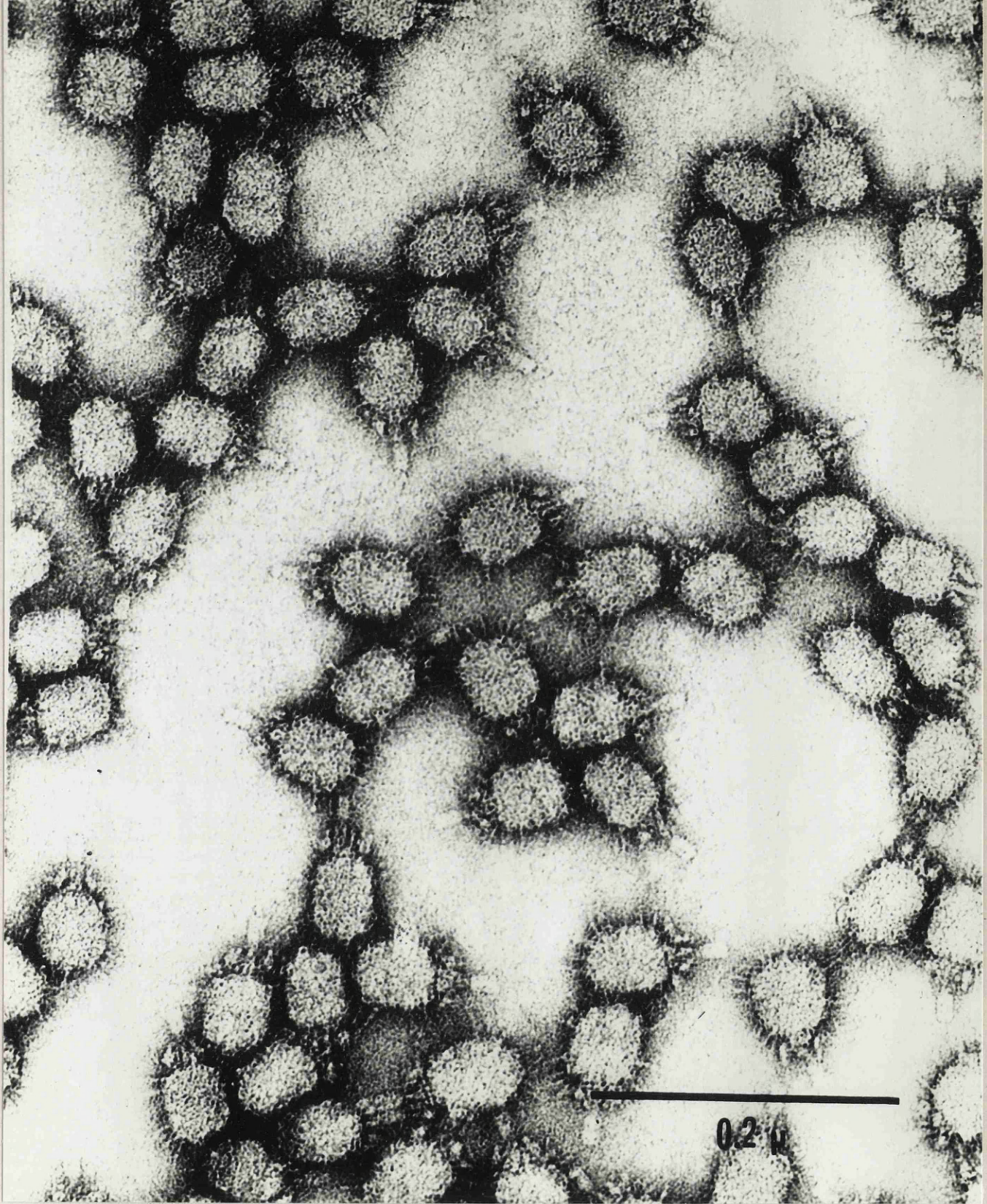


Figura 8. Centrifugación en C1Cs del pico excluido en el cromatograma de la Figura 7.

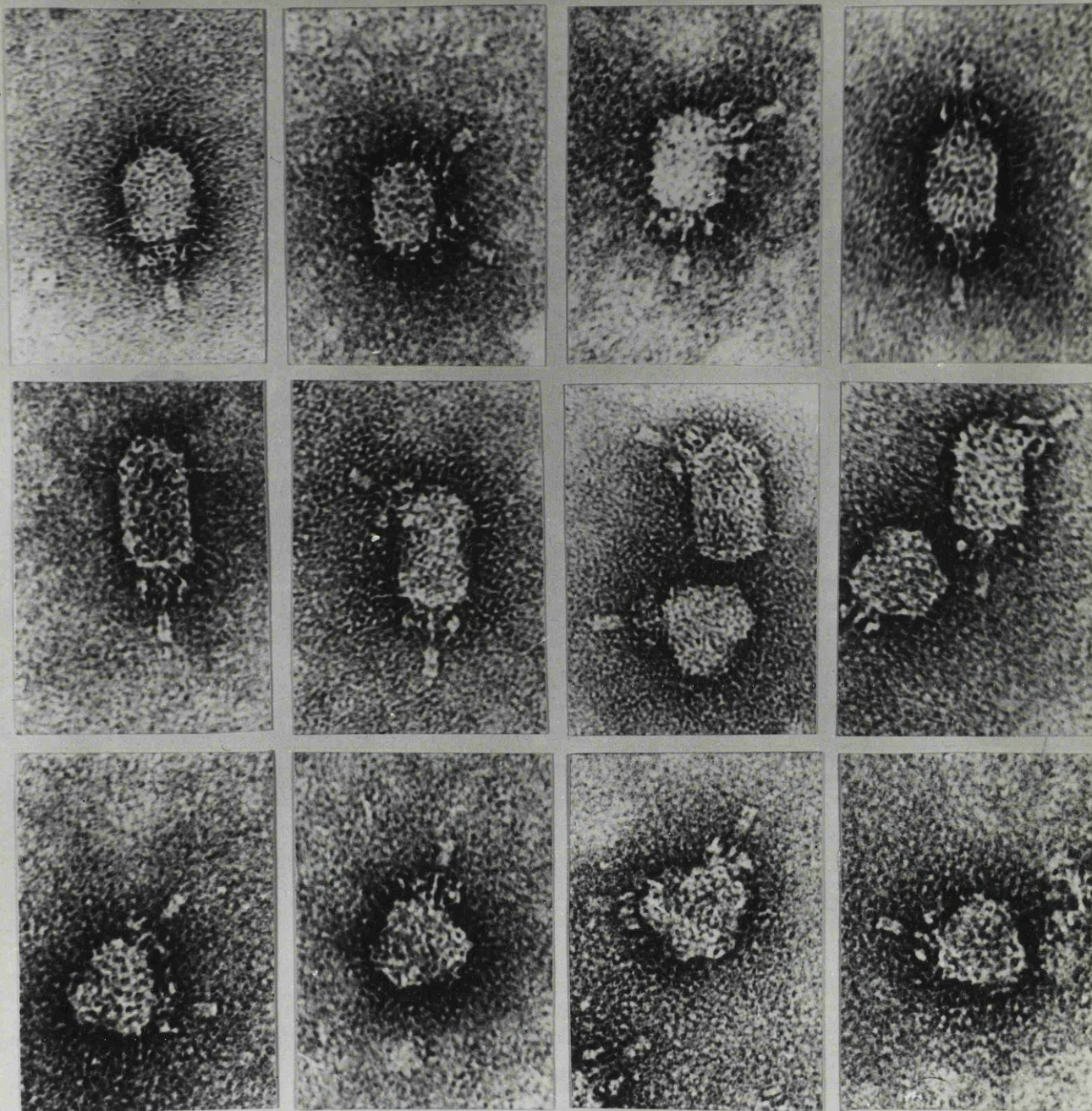


Fractions II

Figura 9. Centrifugación en ClCs de las fracciones del pico II de la Figura 8.

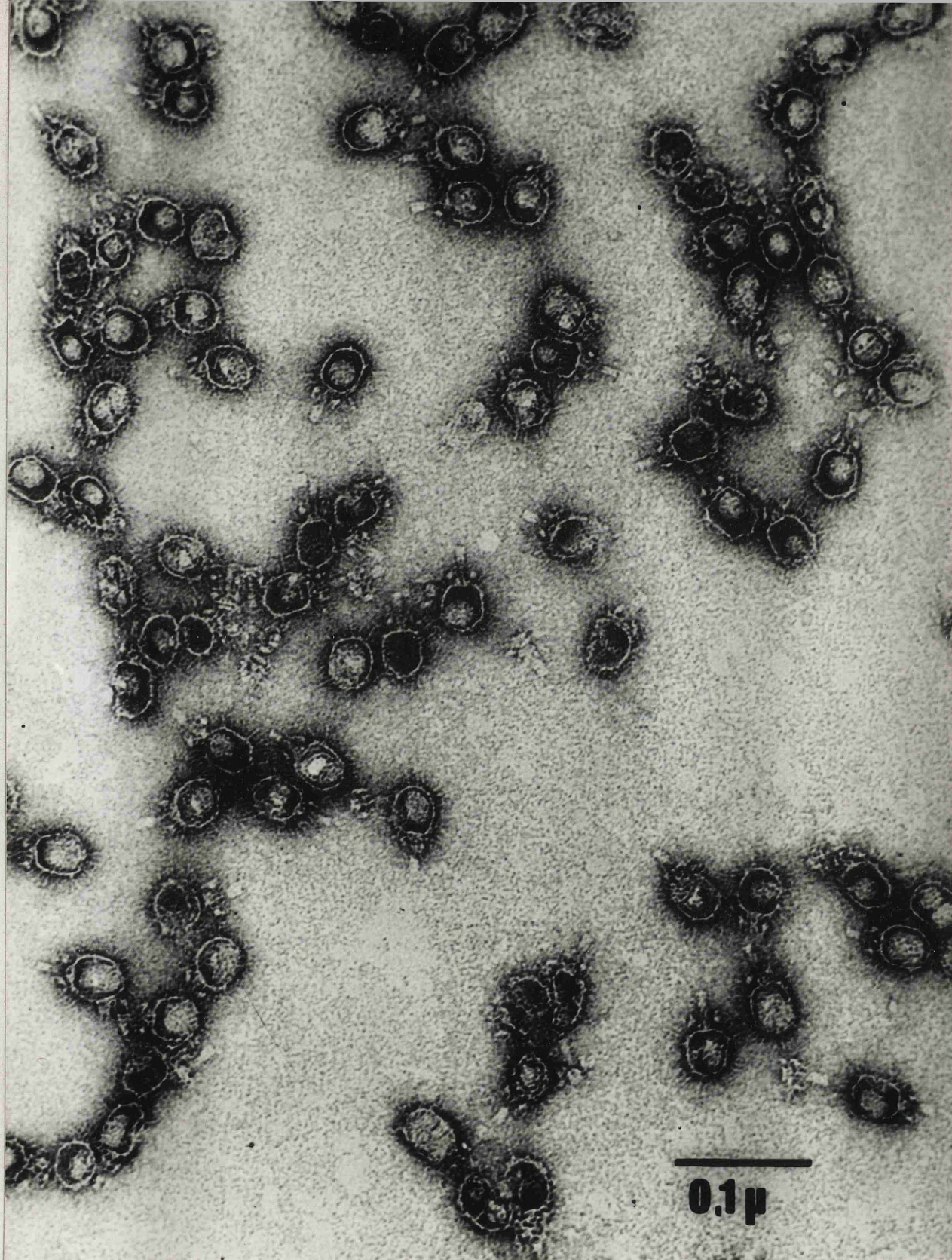


Placa I. Microscopía electrónica de  $\phi 29$  en el pico I del gradiente de ClCs de la figura 8.



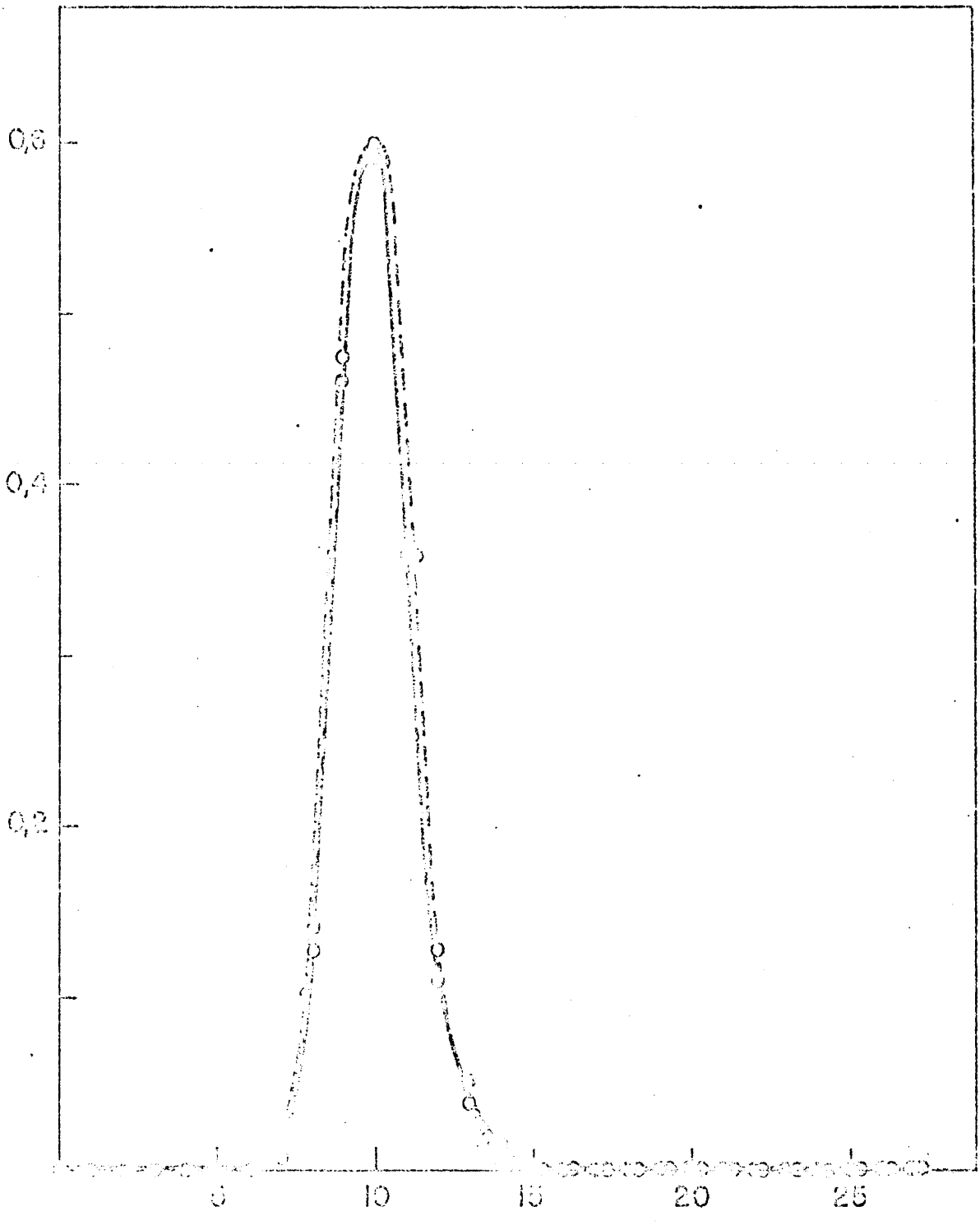
0,1  $\mu$

Placa II. Microscopía electrónica de variantes morfológicas de  $\varnothing 29$  en el pico II del gradiente de ClCs de la figura 8.



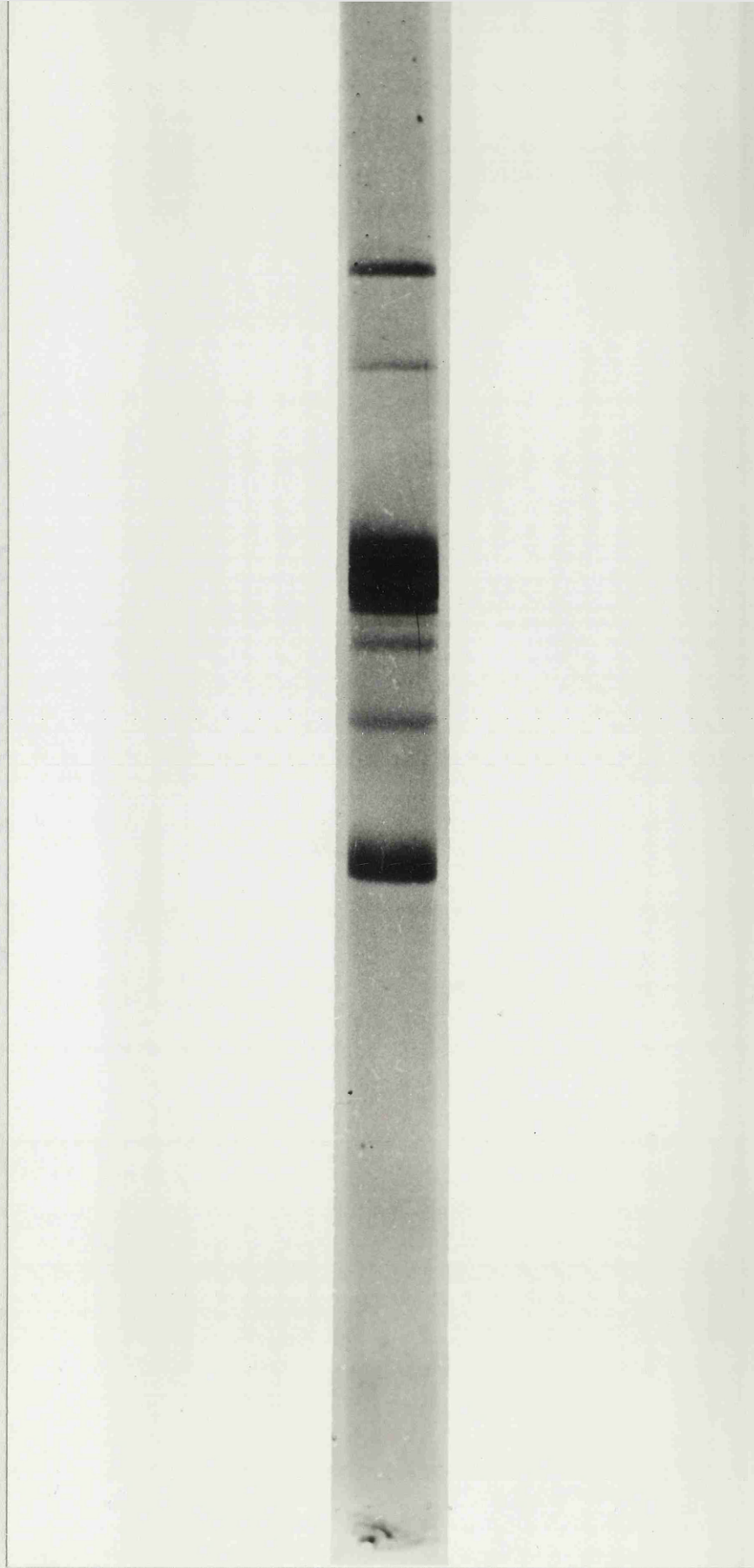
Placa III. Microscopía electrónica de componentes estructurales sin DNA en el pico III del gradiente de ClCs de la figura 8.

$A_{210}(\text{---})$  y  $f_{210}$  ( $\text{---}$ )



Fracción N°

Figura 10. Sedimentación de  $\phi 29$  en un gradiente de sacarosa 5-20% en diluyente de fago.



Placa IV. Electroforesis en poliacrilamida-SDS (pH discontinuo) de las proteínas de Ø29 (pico I del gradiente de la figura 8).

Tabla 7 . Purificación del bacteriófago Ø29

Fracción	Volumen, ml	u. f. p.	A <sub>260</sub>
Lisado	17.000	1,1 x 10 <sup>16</sup>	
Esferosil	450	6,0 x 10 <sup>15</sup>	7.620
Centrifugación	38	5,5 x 10 <sup>15</sup>	7.546
Centrifugación en CICs			
I. Fago	13,0	5,5 x 10 <sup>15</sup>	5.589
II. Variantes morfológicos	1,4	6,5 x 10 <sup>12</sup>	21
III. Estructuras sin DNA	1,1	6,5 x 10 <sup>11</sup>	22

## IV.2. COMPOSICION QUIMICA DE Ø29

### 2.1. Análisis de fago completo

La composición elemental de Ø29 (C,H,N), determinada como se indica en Métodos, se muestra en la tabla 8. El porcentaje medio de cada elemento, determinado en seis preparaciones diferentes del virus, fué de  $43,8 \pm 0,3$  para el carbono,  $5,5 \pm 0,2$  para el hidrógeno y  $15,8 \pm 0,2$  para el nitrógeno.

El análisis de DNA y fósforo se muestra en la tabla 9. Los valores están referidos a la masa de fago correspondiente a un mililitro de una solución de virus que tiene 1 unidad de  $A_{260}$ , que equivale a 0,084 mg de Ø29 (ver página 117). El valor medio de ocho análisis del DNA de Ø29 fué de  $46,1 \pm 0,4 \mu\text{g}$ , tomando como patrón el DNA de esperma de salmón (figura 11), mientras que el valor medio para el fósforo fué  $4,5 \pm 0,03 \mu\text{g}$  (figura 12) por 1 unidad de  $A_{260}$ .

La presencia de hexosas en la proteína de Ø29 se ensayó con antrona como se describe en Métodos. La figura 13 muestra los espectros de absorción de glucosa, manosa, galactosa, fucosa, triptófano y la proteína del fago.

Tabla 8. Composición de Ø29. Porcentajes de C, N y H.

	C		N		H	
	$\Delta$	$\Delta^2$	$\Delta$	$\Delta^2$	$\Delta$	$\Delta^2$
1	43,55	0,053	- 0,26	0,068	4,88	0,348
2	43,06	0,518	0,63	0,397	5,39	0,006
3	44,39	0,372	0,25	0,062	5,66	0,036
4	44,63	0,722	0,39	0,152	5,26	0,044
5	44,00	0,048	0,03	0,001	5,56	0,008
6	43,08	0,490	+ 0,21	0,044	6,07	0,360
	<u>262,71</u>	<u>2,203</u>		<u>0,724</u>	<u>32,82</u>	<u>0,802</u>
	43,78		15,81		5,47	
	$\sigma_M = (2,203/6 \times 5)^{1/2} = (0,073)^{1/2} =$		$\sigma_M = (0,724/6 \times 5)^{1/2} = (0,024)^{1/2}$		$\sigma_M = (0,802/6 \times 5)^{1/2} = (0,026)$	
	$= 0,27$		$= 0,15$		$= 0,16$	
	<u><u>43,8 ± 0,3</u></u>		<u><u>15,8 ± 0,2</u></u>		<u><u>5,5 ± 0,2</u></u>	

Tabla 9. Composición de Ø29. Análisis de DNA y P

	DNA ( $\mu\text{g}/A_{260}$ )		P ( $\mu\text{g}/A_{260}$ )	
	$\Delta$	$\Delta^2$	$\Delta$	$\Delta^2$
1	44,0	4,41	4,5	0
2	46,4	0,09	4,5	0
3	46,6	0,25	4,4	0,01
4	46,6	0,25	4,5	0
5			4,5	0
6	46,6	0,25	4,6	0,01
7	46,0	0,01	4,6	0,01
8	46,6	0,25	4,4	0,01
	322,8	5,51	36,0	0,04
	46,1		4,5	

$\sigma_M = (5,51/7 \times 6)^{1/2} =$	$\sigma_M = (0,04/7 \times 6)^{1/2} =$
$= (0,131)^{1/2} = 0,36$	$= (0,009)^{1/2} = 0,03$
<u><u>46,1 ± 0,4</u></u>	<u><u>4,5 ± 0,03</u></u>

Fago ø29,  $A_{260}$ (—●—)

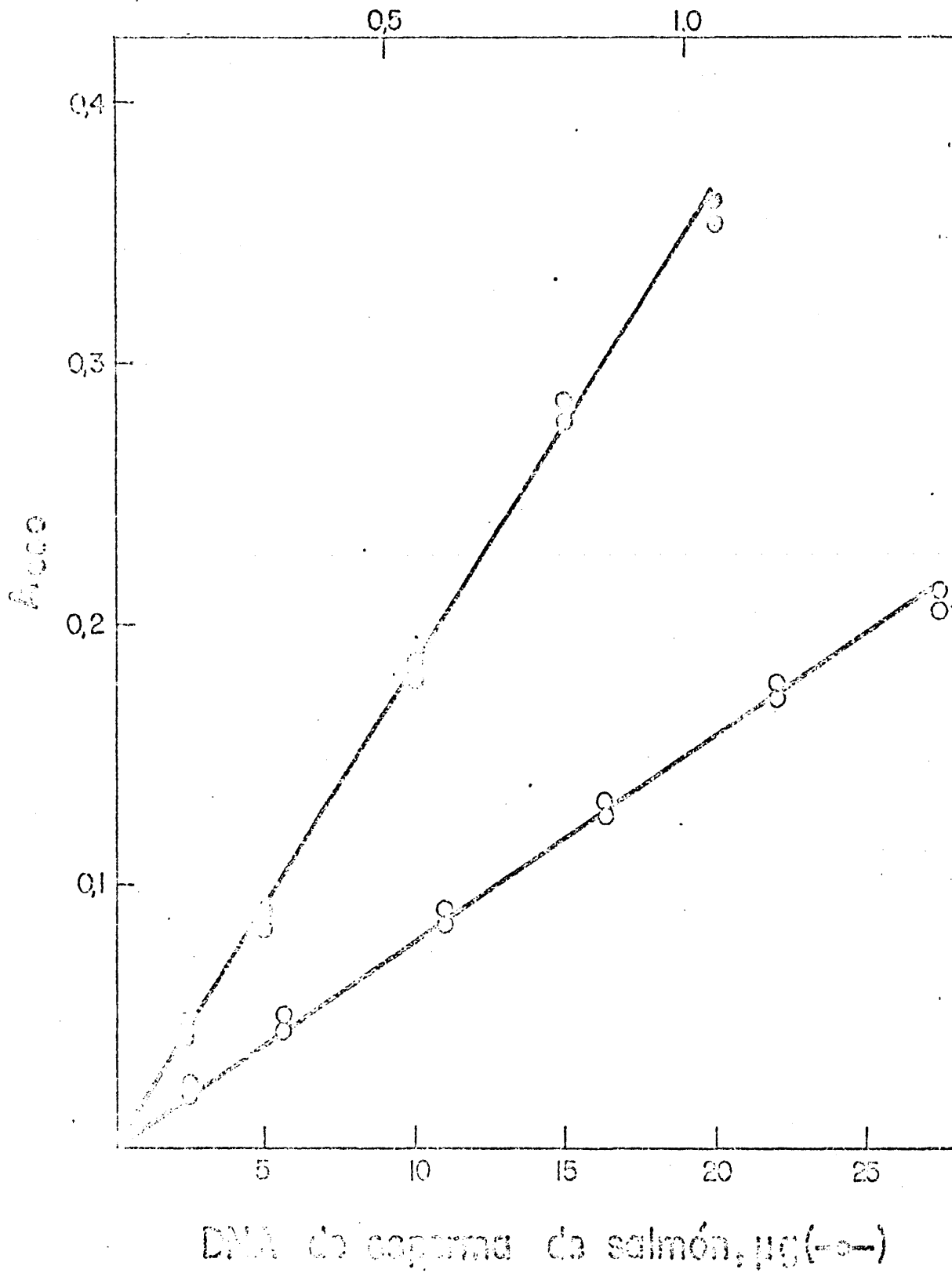


Figura 11. Valoración de DNA en ø29.

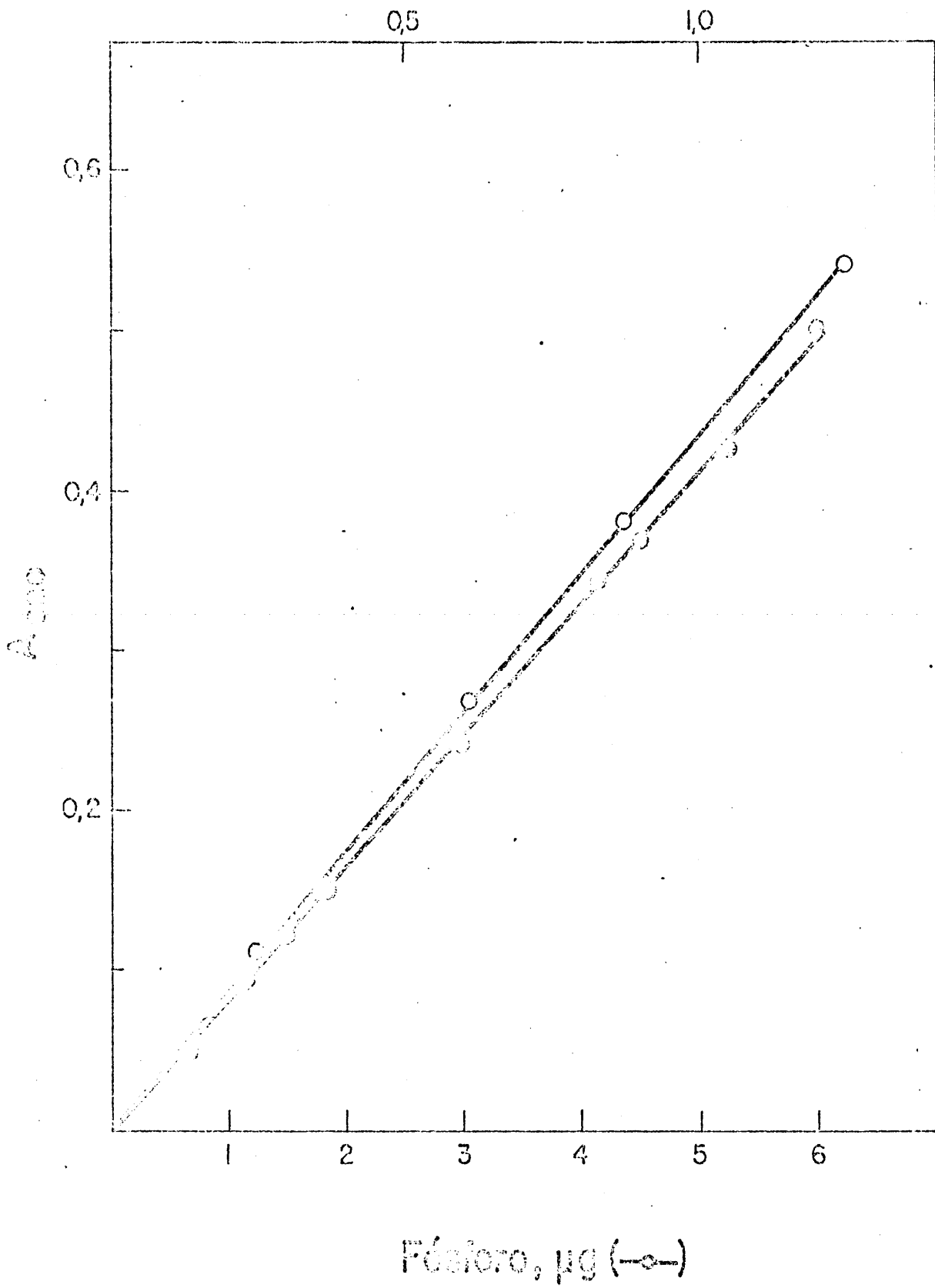


Figura 12. Valoración de fósforo total en Ø29.

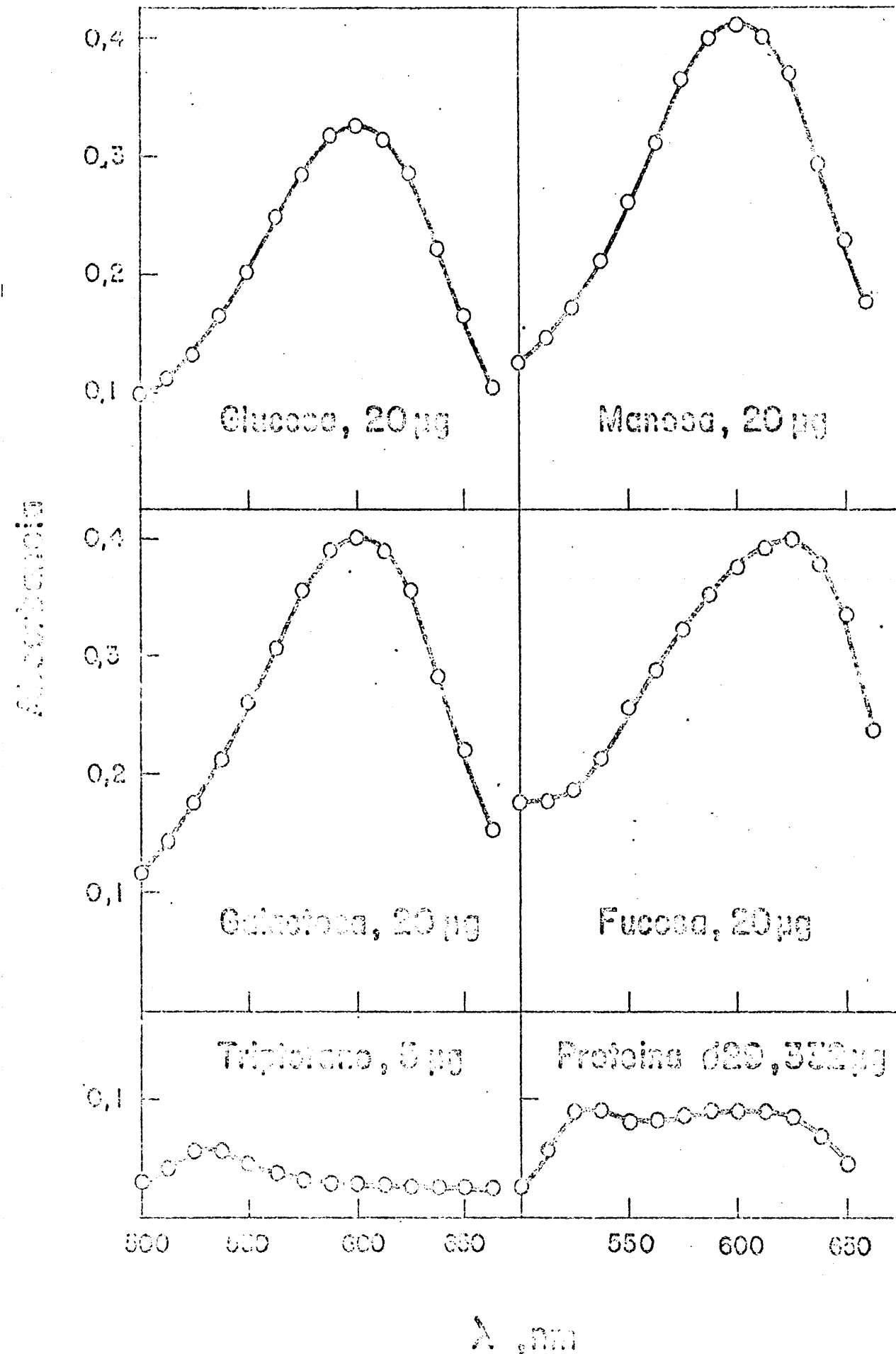


Figura 13. Valoración de hexosas en la proteína de ø29.

## 2.2. Composición de aminoácidos de la proteína de Ø29

Para la hidrólisis de la proteína de Ø29 y el posterior análisis de los aminoácidos resultantes, previamente se eliminó el DNA por tratamiento del fago completo con EDTA y hidrólisis del DNA con DNasa pancreática y fosfodiesterasa de veneno de serpiente; la proteína se aisló libre de nucleótidos por flotación en ClCs y filtración por Sephadex G-50, como se describe en Métodos.

La cisteína y la metionina se determinaron como ácido cisteico y metioninsulfona, respectivamente, en hidrolizados de 24 horas de proteína oxidada con ácido perfórmico. El triptófano se determinó espectrofotométricamente, como se indica en Métodos. Los demás aminoácidos se analizaron en hidrolizados de 24, 48 y 72 horas, corrigiendo, en el caso de serina y treonina por la descomposición de estos aminoácidos durante la hidrólisis; en el caso de la isoleucina, por el menor valor de la constante de hidrólisis, se tomó el valor determinado en el hidrolizado de 72 horas.

La tabla 10 muestra la composición de aminoácidos de la proteína de Ø29.

Tabla 10 . Composición de aminoácidos de la proteína  
de Ø29

Aminoácido	Moles, %			
	24 hr	48 hr	72 hr	Media
Lisina	4,8	4,9	—	4,8
Histidina	—	2,0	—	2,0
Arginina	3,6	3,6	—	3,6
Acido aspártico	13,4	13,5	13,7	13,5
Treonina	7,9	7,4	5,6	8,0
Serina	6,8	6,0	5,7	7,0
Acido glutámico	10,3	9,9	10,1	10,1
Prolina	2,3	2,7	2,0	2,2
Glicina	7,5	7,4	7,6	7,5
Alanina	7,5	7,0	7,2	7,2
Cisteina (ácido cisteico)				0,3
Valina	9,1	9,8	8,9	9,3
Metionina(metioninsulfona)				3,9
Isoleucina	5,5	5,7	6,3	6,3
Leucina	7,6	7,3	7,9	7,6
Tirosina	2,4	2,1	2,8	2,4
Fenilalanina	2,9	3,3	3,2	3,1
Triptófano				1,2
				100,0

### 2.3. Composición de bases del DNA de Ø29

Para la hidrólisis del DNA de Ø29 y el posterior análisis de las bases resultantes, previamente se eliminó la proteína del fago por tratamiento de éste con pronasa en presencia de dodecilsulfato sódico y ex trayendo la mezcla con fenol. El DNA libre de proteína se obtuvo intacto, sedimentando en un gradiente de sacarosa neutro o alcalino como un solo componente.

El DNA se hidrolizó con  $\text{ClO}_4\text{H}$ , como se describe en Métodos, y las bases se separaron por cromatografía. Después de identificar cada componente con luz ultravioleta, cada uno de ellos se eluyó del papel y se cuantitativó como se describe en la sección de Métodos y en la tabla 3.

El valor de los porcentajes de cada base en el DNA de Ø29, media de cinco análisis de otras tantas preparaciones de DNA, se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Composición de bases del DNA de Ø29

	A		T		C		G	
	$\Delta$	$\Delta^2$	$\Delta$	$\Delta^2$	$\Delta$	$\Delta^2$	$\Delta$	$\Delta^2$
1	30,8	0,09	29,6	0,81	20,4	0,64	19,1	0,0
2	32,9	3,24	29,6	0,81	19,4	0,04	18,0	0,6
3	30,2	0,81	32,2	2,89	19,3	0,09	18,3	0,2
4	31,1	0	29,5	1,00	19,6	0	19,7	0,8
5	30,4	0,36	31,4	0,81	19,3	0,09	18,9	0,0
	<u>155,4</u>	<u>4,50</u>	<u>152,3</u>	<u>6,32</u>	<u>98,0</u>	<u>0,86</u>	<u>94,0</u>	<u>1,8</u>
	31,1		30,5		19,6		18,8	
	$\sigma_M = (4,5/5 \times 4)^{1/2} =$		$\sigma_M = (6,32/5 \times 4)^{1/2} =$		$\sigma_M = (0,86/5 \times 4)^{1/2} =$		$\sigma_M = (1,8/5 \times 4)^{1/2} =$	
	$= (0,225)^{1/2} = 0,15$		$= (0,316)^{1/2} = 0,56$		$= (0,043)^{1/2} = 0,21$		$= (0,09)^{1/2} = 0,3$	
	<u>31,1 ± 0,2</u>		<u>30,5 ± 0,6</u>		<u>19,6 ± 0,2</u>		<u>18,8 ± 0,3</u>	

#### IV.3. ABSORBANCIA ESPECIFICA DE Ø29

La absorbancia a 260 nm de una disolución de Ø29 en diluyente de fago por unidad de masa de Ø29, se obtuvo determinando la absorbancia de la disolución y el peso seco de fago en la misma, como se ha descrito en Métodos.

Partiendo de una disolución concentrada de Ø29 (215 unidades de  $A_{260}$  por g de disolución;  $\rho = 1,0146 \pm 0,0001 \text{ g cm}^{-3}$ ) se tomaron cuatro alícuotas diferentes, medidas por diferencia de pesada, se diluyeron con un pequeño volumen de diluyente de fago y se dializaron exhaustivamente contra agua destilada. El dializado se extrajo del tubo de diálisis, lavando éste repetidas veces con agua, y se secó hasta peso constante.

En un experimento independiente, tres alícuotas de un preparado de Ø29 (284 unidades de  $A_{260}$  por g de disolución;  $\rho = 1,018 \text{ g cm}^{-3}$ ) se dializaron contra acetato amónico 0,1 M en lugar de dializar contra agua destilada, para evitar que el fago precipitase durante la diálisis. El dializado se liofilizó repetidas veces para eliminar el acetato amónico y, finalmente, se secó a peso constante como antes.

Los resultados de ambos experimentos se muestran en la figura 14 y en la tabla 12, obteniéndose para Ø29 en diluyente de fago una absorción específica a 260 nm de 0,084 mg por l unidad de  $A_{260}$  por g de disolución.

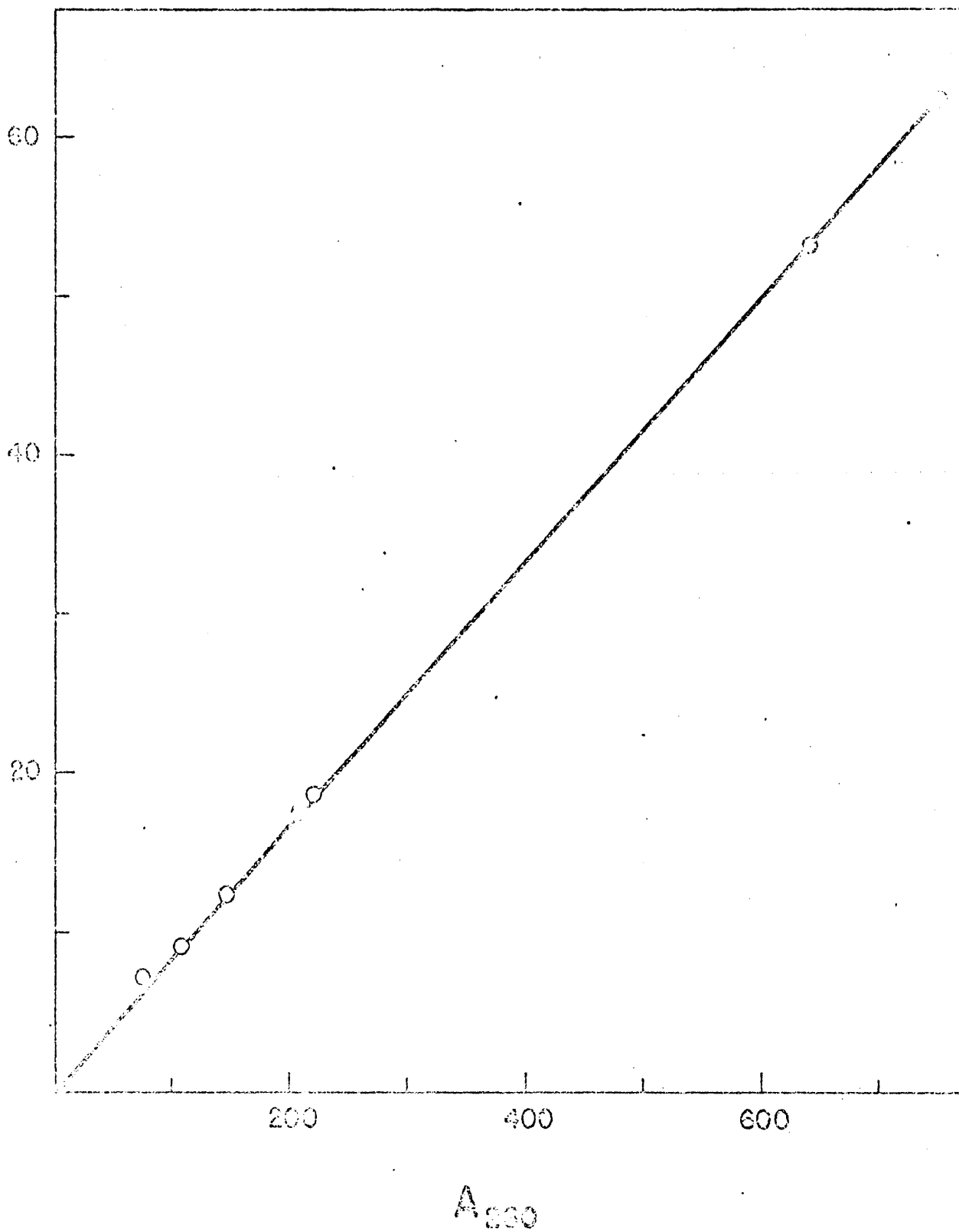


Figura 14. Relación entre  $A_{260}$  de  $\phi 29$  en diluyente de fago y peso seco del virus.

Tabla 12. Absorbancia específica a 260 nm de Ø29 en diluyente de fago.

Alicuota	Disolución, g	A <sub>260</sub>	Residuo seco, mg	A <sub>260</sub> /mg	Δ	Δ <sup>2</sup>
1	0,3554	76,4	6,87	11,1	- 0,8	0,64
2	0,4989	107	8,97	11,9	0	0
3	0,6924	149	12,25	12,2	0,3	0,09
4*	0,7123	210	17,65	11,9	0	0
5	1,0160	218	18,45	11,8	- 0,1	0,01
6*	2,1804	643	52,91	12,1	0,2	0,04
7*	2,5562	754	62,22	12,1	0,2	0,04
				<u>83,1</u>		<u>0,82</u>
				M = 11,9		

$$\sigma_M = (0,82/7 \times 6)^{1/2} = (0,019)^{1/2} = 0,14$$

$$11,9 \pm 0,1 \text{ A}_{260}/\text{mg de } \emptyset 29 \text{ seco}$$

g de disolución

Las alícuotas con asterisco procedieron de una disolución con 295 unidades de A<sub>260</sub> y la que no llevan asterisco de otra con 215 unidades de A<sub>260</sub>. Las primeras se dializaron contra acetato amónico y las segundas contra agua, y el residuo seco se determinó como se indica en el texto.

Tabla 13. Absorbancia específica a 260 nm de la proteína de Ø29 en diluyente de fago

Alicuota	Disolución, g	A <sub>260</sub>	Residuo seco, mg	A <sub>260</sub> /mg	Δ	Σ
1	0,2004	2,87	2,8	1,02	- 0,19	0,
2	0,4283	6,12	5,5	1,11	- 0,06	0,
3	0,9935	14,2	10,2	1,39	0,22	0,
				<u>3,52</u>		0,

$$M = 1,17$$

$$\sigma_M = (0,088/3 \times 2)^{1/2} = (0,014)^{1/2} = 0,12$$

1,2 ± 0,1 A<sub>260</sub>/mg proteína seca x g de disolución

#### IV.4. ABSORBANCIA ESPECIFICA DE LA PROTEINA DE Ø29

La absorbancia específica de la proteína de Ø29 en diluyente de fago se determinó a 260 nm de un modo análogo al empleado para la determinación de la absorbancia específica del fago completo.

Después de determinar la absorbancia de la solución concentrada en diluyente de fago, diferentes alícuotas de la misma se dializaron exhaustivamente contra acetato amónico 0,1 M, éste se eliminó por liofilización y el residuo se secó hasta peso constante en vacío a 100<sup>o</sup>C bajo P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Partiendo de una disolución de proteína con 14,3 unidades de A<sub>260</sub>, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 13.

Por tanto, en una disolución de proteína con 14.3 unidades de A<sub>260</sub> por g, hay 12,1 mg de proteína por g de disolución, es decir, la absorbancia específica de la proteína de Ø29 en diluyente de fago es de 0,85 mg por 1 unidad de A<sub>260</sub> por gramo.

#### IV.5. VOLUMEN ESPECIFICO DE Ø29

El volumen específico de Ø29 se determinó a partir de la relación entre densidad y concentración de disoluciones de Ø29, determinadas como se describe en Métodos.

Ajustando los valores experimentales (tabla 14) por el método de los mínimos cuadrados se obtiene una relación

$$\rho = (1,0072 \pm 0,001) + (0,392 \pm 0,006) C \text{ (figura 15)}$$

De la pendiente de la recta y el valor de la densidad del disolvente puro se obtiene (tabla 15) para el volumen específico de Ø29 en diluyente de fago un valor de  $0,604 \pm 0,006 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ .

Tabla 14. Relación entre densidad y concentración de disoluciones de Ø29 en diluyente de fago, a 20°C.

	y	x	x <sup>2</sup>	xy	y <sub>c</sub>	d	d <sup>2</sup>
1	1,0072	0	0	0	1,0072	0	
2	1,0072	0	0	0	1,0072	0	
3	1,0114	10,836x10 <sup>-3</sup>	117,419x10 <sup>-6</sup>	10,959x10 <sup>-3</sup>	1,0115	+ 0,1x10 <sup>-3</sup>	0,01x10 <sup>-6</sup>
4	1,0139	16,374x10 <sup>-3</sup>	268,108x10 <sup>-6</sup>	16,602x10 <sup>-3</sup>	1,0136	- 0,3x10 <sup>-3</sup>	0,09x10 <sup>-6</sup>
5	1,0156	21,190x10 <sup>-3</sup>	449,016x10 <sup>-6</sup>	21,521x10 <sup>-3</sup>	1,0156	0	
6	1,0166	23,598x10 <sup>-3</sup>	556,866x10 <sup>-6</sup>	23,990x10 <sup>-3</sup>	1,0165	- 0,1x10 <sup>-3</sup>	0,01x10 <sup>-6</sup>
7	1,0184	29,102x10 <sup>-3</sup>	846,926x10 <sup>-6</sup>	29,637x10 <sup>-3</sup>	1,0186	+ 0,2x10 <sup>-3</sup>	0,04x10 <sup>-6</sup>
	7,0903	101,100x10 <sup>-3</sup>	2238,335x10 <sup>-6</sup>	102,709x10 <sup>-3</sup>			0,15x10 <sup>-6</sup>

$$y = (a \pm \sigma_a) + (b \pm \sigma_b) x$$

$$a = \frac{\sum y \sum x^2 - \sum x \sum xy / n \sum x^2 - (\sum x)^2}{10^{-6}} = 1,0072$$

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y / n \sum x^2 - (\sum x)^2}{10221,210 \times 10^{-6}} = 7,0903 \times 10^{-3} - 101,100 \times 10^{-3} \times 102,709 \times 10^{-3} / 7 \times 2238,335 \times 10^{-6} = 0,0001$$

$$\sigma_a^2 = \frac{\sum d^2 / n - 2}{10^{-6}} = 0,15 \times 10^{-6} / 5 = 0,03 \times 10^{-6}$$

$$\sigma_b^2 = \frac{\sigma^2 \sum x^2 / n \sum x^2 - (\sum x)^2}{10^{-6}} = 0,03 \times 10^{-6} \times 2238,335 \times 10^{-6} / 7 \times 2238,335 \times 10^{-6} - 10221,210 \times 10^{-6} = 0,01$$

$$\sigma_b = n \sigma^2 / n \sum x^2 - (\sum x)^2 = 7 \times 0,03 \times 10^{-6} / 7 \times 2238,335 \times 10^{-6} - 10221,210 \times 10^{-6} = 39 \times 10^{-6}; \sigma_b = 0,006$$

$$y = (1,0072 \pm 0,001) + (0,392 \pm 0,006) x$$

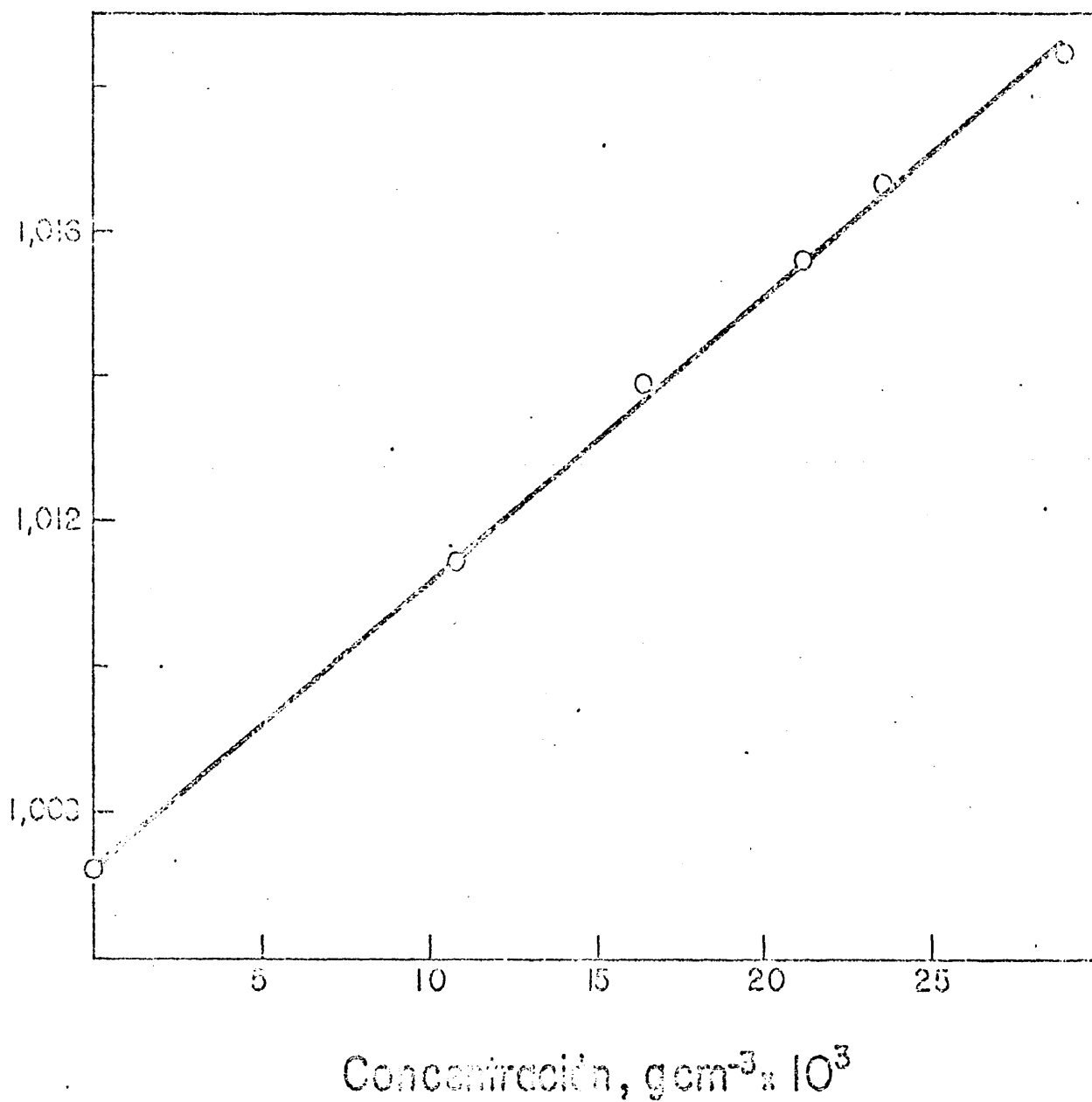


Figura 15. Relación entre densidad y concentración de Ø29 en diluyente de fago a 20°C.

Tabla 15. Volumen específico de Ø29

---

$$\rho = (1,0072 \pm 0,001) + (0,392 \pm 0,006) \text{ c}$$

$$1 - \bar{v}_2 \rho = 0,392 \pm 0,006$$

$$\rho = 1,0072 \pm 0,0001 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$$

$$\bar{v}_2 \rho = 0,608 \pm 0,006$$

$$\bar{v}_2 = \frac{0,608 \pm 0,006}{1,0072 \pm 0,0001} = 0,604$$

$$\bar{v}_2 = 0,604 \pm 0,006 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$$

---

#### IV.6. VOLUMEN ESPECIFICO DE LA PROTEINA DE Ø29

La proteína de Ø29 se preparó como se describe en Métodos y su volumen específico se calculó a partir de su composición de aminoácidos (tabla 10) y de los volúmenes de cada aminoácido.

Los cálculos se muestran en la tabla 16. A partir de la fracción molar de cada aminoácido se determinó el porcentaje en peso, tomando como peso de cada aminoácido su peso molecular menos el peso del mol de agua liberado en la formación de cada enlace peptídico. De este mol el volumen específico de la proteína de Ø29 resulta  $0,73 \pm 0,01 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ .

Tabla 16. Volumen específico de la proteína de Ø29

Aminoácido	Fracción molar	M <sup>2</sup>	W	W (%)	V <sub>i</sub>	W <sub>i</sub> V <sub>i</sub>
Lisina	0,048	128,19	6,2±0,1	5,7±0,1	0,82	4,7±0,1
Histidina	0,020	137,16	2,7±0,2	2,5±0,2	0,67	1,7±0,1
Arginina	0,036	156,21	5,6±0,2	5,1±0,2	0,70	3,6±0,1
Acido aspártico	0,135	115,10	15,6±0,2	14,3±0,2	0,60	8,6±0,1
Treonina	0,080	101,12	8,1±0,1	7,4±0,1	0,70	5,2±0,1
Serina	0,070	87,09	6,1±0,1	5,6±0,1	0,63	3,5±0,1
Acido glutámico	0,101	129,13	13,0±0,1	11,9±0,1	0,66	7,9±0,1
Prolina	0,022	97,13	2,1±0,1	1,9±0,1	0,76	1,4±0,1
Glicina	0,075	57,07	4,3±0,1	3,9±0,1	0,64	2,5±0,1
Alanina	0,072	71,09	5,1±0,1	4,7±0,1	0,74	3,5±0,1
Cisteina	0,003	103,15	0,3±0,1	0,3±0,1	0,63	0,2±0,1
Valina	0,093	89,15	8,3±0,1	7,6±0,1	0,86	6,5±0,1
Metionina	0,039	131,21	5,1±0,1	4,7±0,1	0,75	3,5±0,1
Isoleucina	0,063	113,17	7,1±0,1	6,5±0,1	0,90	5,9±0,1
Leucina	0,076	113,17	8,6±0,1	7,9±0,1	0,90	7,1±0,1
Tirosina	0,024	163,19	3,9±0,2	3,6±0,2	0,71	2,6±0,1
Fenilalanina	0,031	147,19	4,6±0,2	4,2±0,2	0,77	3,2±0,1
Triptófano	0,012	186,22	2,2±0,2	2,0±0,2	0,74	1,5±0,1
			108,9±0,6	99,8±0,6		73,1±0,4

$$V_P = \frac{73,1 \pm 0,4}{99,8 \pm 0,6} = 0,73 \pm 0,01$$

1. En la composición de aminoácidos se ha tomado un error probable del 0,1% para cada aminoácido
2. Al peso molecular de cada aminoácido se le resta 18, el peso de la molécula de agua perdida en la formación de cada enlace peptídico.

#### IV.7. VOLUMEN ESPECIFICO DEL DNA DE Ø29

El volumen específico del DNA de Ø29 se determinó a partir de su densidad de flotación en ClCs (76,77) y de su composición de bases, corrigiendo para la cantidad de agua ligada por nucleótido y pasando de la sal de cesio a la sal sódica. El procedimiento se detalla en Métodos.

Los cálculos se muestran en la tabla 17. A partir de la fracción molar de cada nucleótido se determinó el peso molecular medio de las sales de cesio y sodio en el DNA de Ø29, teniendo en cuenta el peso de la molécula de agua perdida en la formación de cada enlace nucleotídico. El volumen específico obtenido para el DNA de Ø29 resultó  $0,56 \pm 0,01 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ .

Tabla 17. Volumen específico del DNA de Ø29

	Fracción molar	$\frac{1}{M_{Na}}$	$\bar{M}_{Na}$	$M_{Cs}$	$\bar{M}_{Cs}$
dAMP	0,311 $\pm$ 0,002	335,31	104 $\pm$ 1	445,12	138 $\pm$ 1
dTMP	0,305 $\pm$ 0,006	326,20	99 $\pm$ 2	436,11	133 $\pm$ 3
dCMP	0,196 $\pm$ 0,002	311,19	61 $\pm$ 1	421,10	83 $\pm$ 1
dGMP	0,188 $\pm$ 0,003	351,22	66 $\pm$ 1	461,13	87 $\pm$ 4
			<u>330<math>\pm</math>3</u>		<u>441<math>\pm</math>5</u>

$$\rho = 1,697$$

$$C_{Cs} - C_{Na} = 24,9$$

$$n = 7$$

$$\begin{aligned} \bar{V}_{Na} &= \frac{1}{\bar{M}_{Na}} \left[ \frac{\bar{M}_{Cs} + 18n}{\rho_{Cs}} - (18n + C_{Cs}) + C_{Na} \right] = \\ &= \frac{1}{330} \left[ \frac{441 + 126}{1,701} - (126 + 24,9) \right] = \frac{1}{330} \left( \frac{567}{1,701} - 150,9 \right) \\ &= \frac{1}{330} (333,3 - 150,9) = 0,55 \end{aligned}$$

$$\bar{V}_{Na} = 0,55 \pm 0,01$$

1. Al peso molecular de cada nucleótido se le ha restado 18, el peso de la molécula de agua perdida en la formación del enlace nucleotídico.

#### IV.8. COEFICIENTE DE SEDIMENTACION DE Ø29

El coeficiente de sedimentación de Ø29 se determinó como se describe en Métodos a partir de la velocidad de sedimentación del fago en diluyente de fago a diferentes concentraciones. La tabla 18 y la figura 16 muestra la posición del límite de la figura schlieren en función del tiempo para una muestra de Ø29 a una concentración de 6,5 unidades de  $A_{260}$ .

Repitiendo el mismo procedimiento para diferentes concentraciones de fago se obtuvieron los valores que se muestran en la tabla 19. Ajustando los valores obtenidos por el método de los mínimos cuadrados se obtuvo para  $s_{20,DF}^0$  (el coeficiente de sedimentación a dilución infinita en diluyente de fago a 20°C) un valor de  $(246 \pm 2) \times 10^{-13}$  seg (figura 17). Corrigiendo este valor para agua (tabla 20) se obtiene para Ø29 un  $s_{20,W}^0 = (251 \pm 2) \times 10^{-13}$  seg.

Tabla 18 . Sedimentación de  $\phi 29$  en una disolución de concentración 6.5 unidades de  $A_{260}$ .

---

<u>Foto</u>	<u>t, min</u>	<u>r, cm</u>	<u>log r</u>
1	4,0	5,983	0,7769
2	6,0	6,006	0,7786
3	8,0	6,049	0,7817
4	12,0	6,093	0,7848
5	16,0	6,138	0,7880
6	20,0	6,181	0,7911
7	24,0	6,223	0,7940
8	28,0	6,269	0,7972
9	32,0	6,311	0,8001
10	36,0	6,347	0,8026
11	40,0	6,347	0,8026
12	44,0	6,449	0,8095

---

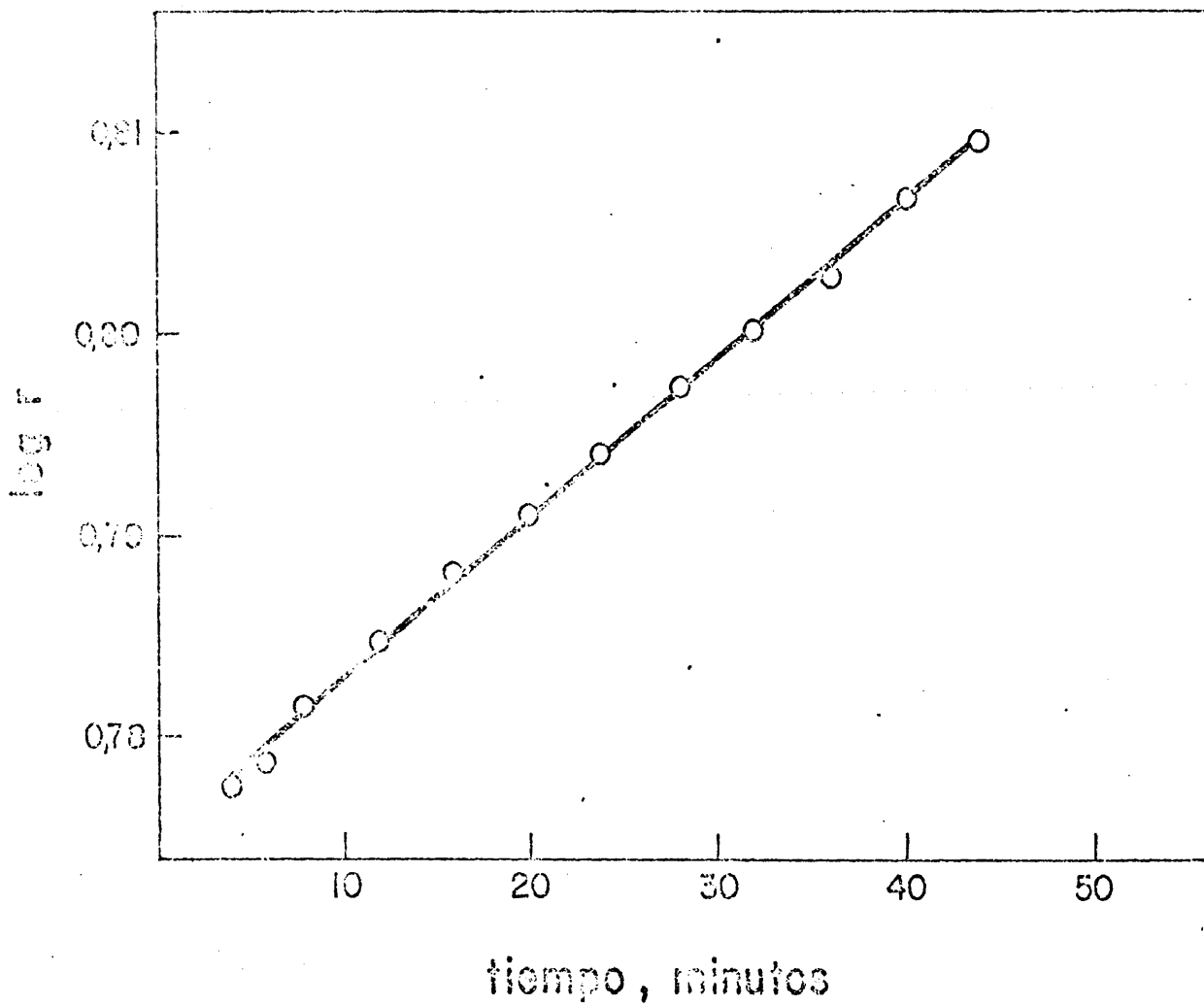


Figura 16. Posición del límite de sedimentación de  $\phi 29$  en función del tiempo. 6.5 unidades de  $A_{260}$ .

Tabla 19. Relación entre coeficiente de sedimentación y concentración de soluciones de Ø29 en diluyente de fago a 20°C.

	y	x	x <sup>2</sup>	xy	yc	d
1	241	0,56	0,31	134,8	245,9	+ 5
2	247	1,04	1,08	256,8	245,8	- 1
3	248	1,87	3,49	463,7	245,6	- 2
4	246	2,07	4,28	509,2	245,5	+ 0
5	245	2,20	4,84	539,0	245,5	+ 1
6	246	3,80	14,44	934,8	245,0	- 1
7	245	6,00	36,00	1470,0	244,4	- 1
8	249	6,50	42,25	1618,5	244,2	- 5
9	244	8,00	64,00	1952,0	243,8	0
10	237	8,00	64,00	1896,0	243,8	+ 7
11	244	10,00	100,00	2440,0	243,2	- 1
	2692	50,04	334,69	12214,8		

$$y = (a \pm \sigma_a) + (b \pm \sigma_b) x$$

$$b = n \sum xy - \sum x \sum y / n \sum x^2 - (\sum x)^2 = 11 \times 12214,8 - 50,04 \times 2692 / 11 \times 334,69 - 2504,00 = - 0,29$$

$$a = \sum y \sum x^2 - \sum x \sum xy / n \sum x^2 - (\sum x)^2 = 2692 \times 334,69 - 50,04 \times 12214,8 / 11 \times 334,69 - 2504,00 = 246,1$$

$$\sigma_a^2 = \sum \sigma^2 / n - 2 = 108 / 9 = 12$$

$$\sigma_b^2 = n \sigma^2 / n \sum x^2 - (\sum x)^2 = 11 \times 12 / 11 \times 334,69 - 2504,00 = 0,11; \quad \sigma_b = 0,34$$

$$\sigma_a^2 = \sigma^2 \sum x^2 / n \sum x^2 - (\sum x)^2 = 12 \times 334,69 - 2504,00 = 34; \quad \sigma_a = 1,8$$

$$y = (246 \pm 2) - (0,3 \pm 0,3) x$$

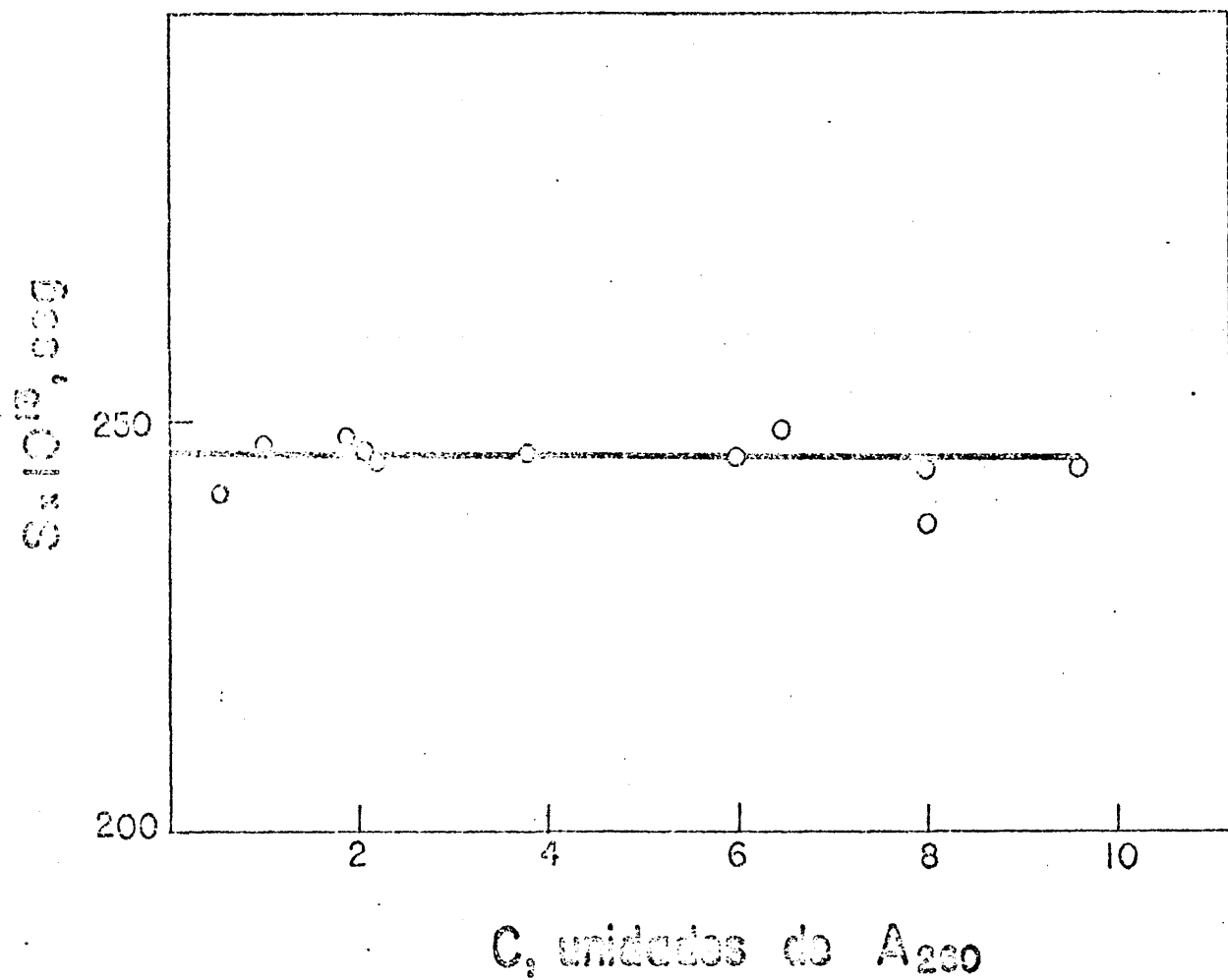


Figura 17. Variación del coeficiente de sedimentación de  $\phi 29$  con la concentración.

Tabla 20. Coeficiente de sedimentación,  $s_{20,W}^{\circ}$ , de  $\phi 29$

$$s = (246 \pm 2) \times 10^{-13} - 0,3 c$$

$$s_{20,DF}^{\circ} = (246 \pm 2) \times 10^{-13}$$

$$s_{20,W}^{\circ} = s_{20,DF}^{\circ} \left( \frac{\rho_{DF}}{\rho_W} \right)_{20} \cdot \left( \frac{\rho_W}{\rho_{DF}} \right)_{20}$$

$$\left( \frac{\rho_{DF}}{\rho_W} \right)_{20} = 1,028 \pm 0,004$$

$$\left( \frac{\rho_W}{\rho_{DF}} \right)_{20} = \frac{0,99823}{1,0072} = 0,9911 \pm 0,0002$$

$$s_{20,W}^{\circ} = 246 \times 10^{-13} \times 1,028 \times 0,9911 = 250,6$$

$$\sigma_s^2 = \left[ (2/246)^2 + (0,004/1,028)^2 + (0,0002/0,9911)^2 \right] \times 251^2 = 5,1, \quad \sigma_s = \pm 2$$

$$s_{20,W}^{\circ} = (251 \pm 2) \times 10^{-13} \text{ seg.}$$

#### IV.9. COEFICIENTE DE DIFUSION DE Ø29

La difusión de Ø29 se determinó en diluyente de fago a 12°C como se describe en Métodos, usando los sistemas ópticos schlieren e interferométrico, y empleando diferentes concentraciones de virus con objeto de extrapolar a concentración cero.

##### 4.1. Método de la relación altura-área

La tabla 21 muestra los valores obtenidos para una concentración de fago de 30.0 unidades de  $A_{260}$ . Representando  $(A/H)^2/G^2$  en función de  $t$  se obtiene una recta cuya pendiente es  $4\pi D$  (figura 18). Para la concentración de fago indicada se obtuvo un valor para  $D_{1,DF}^{30} = (3,9 \pm 0,2) \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$ .

Tabla 21. Coeficiente de difusión de  $\text{O}_2$  a  $19^\circ\text{C}$  y 30.0 unidades de  $A_{260}$ . Método de la relación altura-área.

$C = 30.0$  unidades de  $A_{260}$        $G = 9,2$

Foto	t, seg	, $\text{cm}^2$	H, cm	$(A/H)^2/G^2$
3	35.130	37,05	23,60	0,0290
4	80,844	38,46	18,20	0,0488
5	100,464	37,42	16,40	0,0601
6	121.290	35,87	15,35	0,0686
7	167,664	37,73	13,50	0,0887
8	189,504	35,42	12,30	0,1069

$$\bar{A} = 36,99$$

$$(A/H)^2/G^2 = (0,010 \pm 0,001) + (49 \pm 2) \times 10^{-8} t$$

$$4\pi D = (49 \pm 2) \times 10^{-8}; \quad D = (3,9 \pm 0,2) \times 10^{-8}$$

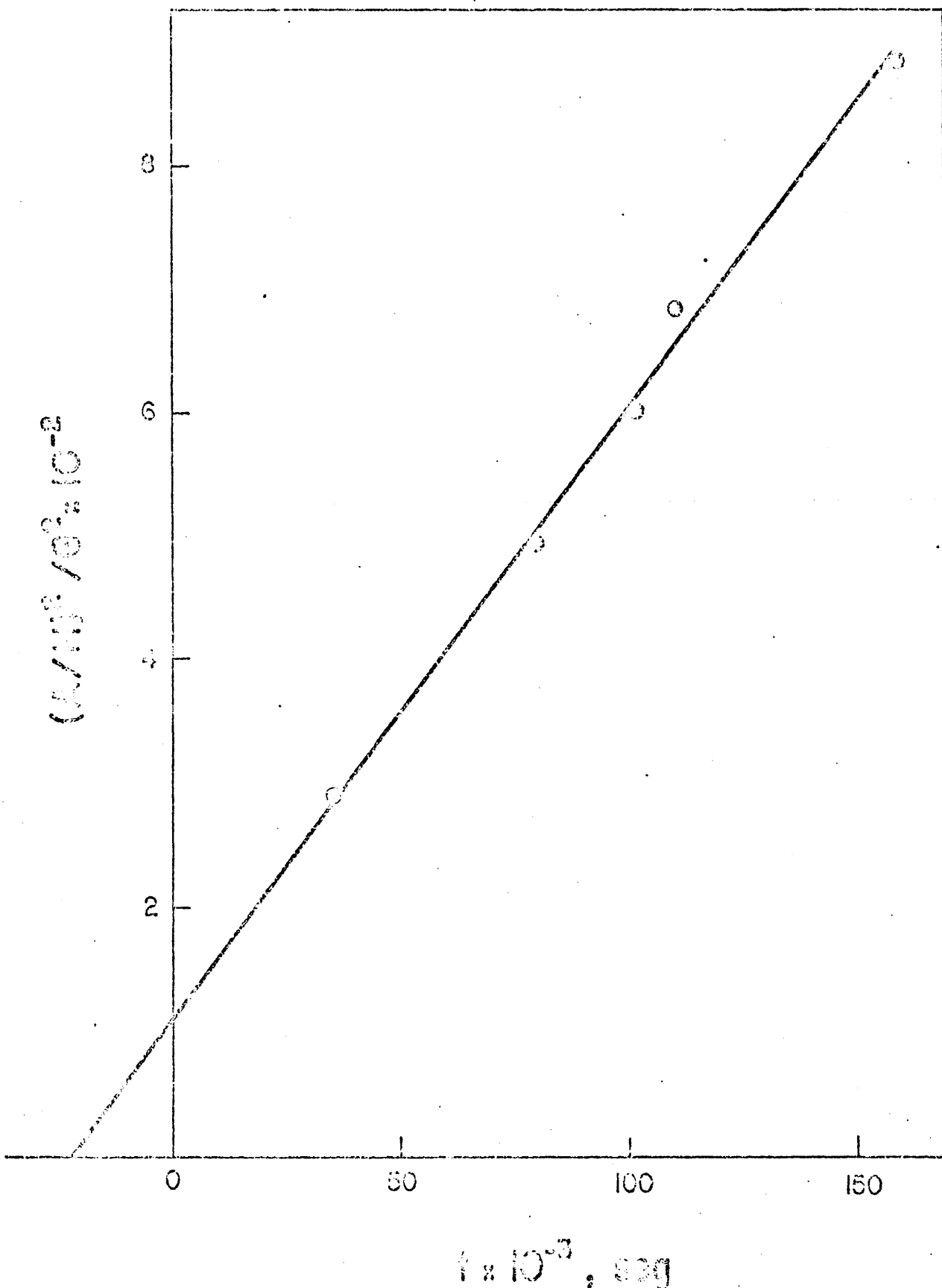


Figura 18. Relación entre  $(A/H)^2/G^2$  y  $t$  durante la difusión de  $\phi 29$  en diluyente de fago a  $10^{\circ}\text{C}$ .  
 Concentración = 30,0 unidades de  $A_{260}$

#### 4.2. Método de Longsworth

La tabla 22 muestra los cálculos para determinar el coeficiente de difusión de  $\text{Ø}29$  en las mismas condiciones que en el caso anterior. Representando los valores de  $4Dt (\Delta H/\Delta h)^2$  obtenidos en función de  $t$  (tabla 23) se obtiene una recta cuya pendiente es  $4D (\Delta H/\Delta h)^2$  (figura 19). Para la concentración de fago indicada se obtuvo un valor para -

$$D_{1,DF}^{30} = (4,4 \pm 0,1) \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}.$$

Tabla 22. Coeficiente de difusión, de  $\varnothing 29$  a  $10^{\circ}\text{C}$ . Interferencias.

$C = 30,0$  unidades de  $A_{260}$  ( $J = 47,5$  líneas) ( $\Delta H/\Delta h$ ) = 1

$j_k$	$j_l$	$(2j_k - J)/J$	$(2j_l - J)/J$	$X_k$	$X_l$	$\Delta h/2\sqrt{Dt}$
1	24	0,9579	0,0105	1,4370	0,0093	1,4463
2	25	0,9158	0,0526	1,2210	0,0467	1,2677
3	26	0,8737	0,0947	1,0810	0,0841	1,1651
4	27	0,8315	0,1368	0,9737	0,1218	1,0955
5	28	0,7895	0,1789	0,8854	0,1599	1,0453
6	29	0,7474	0,2211	0,8090	0,1985	1,0075
7	30	0,7053	0,2632	0,7410	0,2377	0,9787
8	34	0,6632	0,3052	0,6792	0,2774	0,9566
9	32	0,6211	0,3474	0,6223	0,3183	0,9406
10	33	0,5789	0,3894	0,5689	0,3601	0,9290
11	34	0,5368	0,4316	0,5187	0,4033	0,9220
12	35	0,4947	0,4737	0,4411	0,4481	0,9192
13	36	0,4526	0,5158	0,4254	0,4947	0,9201
14	37	0,4105	0,5579	0,3815	0,5435	0,9250
15	38	0,3684	0,6000	0,3391	0,5951	0,9342
16	39	0,3263	0,6421	0,2978	0,6501	0,9479
17	40	0,2842	0,6842	0,2574	0,7093	0,9667
18	41	0,2421	0,7263	0,2180	0,7740	0,9920
19	42	0,2020	0,7684	0,1791	0,8459	1,0250
20	43	0,1579	0,8105	0,1409	0,9278	1,0687
21	44	0,1158	0,8526	0,1030	1,0240	1,0270
22	45	0,0737	0,8947	0,0654	1,1450	1,2104
23	46	0,0316	0,9368	0,0280	1,3140	1,3420

Tabla 22. Coeficiente de difusión de  $\phi 29$  a  $19^{\circ}\text{C}$ .  
Interferencias (continuación)

Foto 3 .  $t = 35.130$  seg       $J = 47,5$

$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} \cdot \frac{\Delta H}{\Delta h}$	$d$
15,239	15,639	0,400	0,2766	0,1586
15,378	15,643	0,265	0,2090	0,0910
15,445	15,645	0,200	0,1717	0,0537
15,480	15,649	0,169	0,1543	0,0363
15,509	15,650	0,141	0,1349	0,0169
15,526	15,653	0,127	0,1261	0,0081
15,540	15,657	0,117	0,1195	0,0010
15,559	15,659	0,100	0,1045	0,0135
15,563	15,664	0,101	0,1073	0,0107
15,569	15,668	0,099	0,1066	0,0114
15,575	15,673	0,098	0,1063	0,0117
15,583	15,576	0,093	0,1012	0,0168
15,589	15,680	0,091	0,0989	0,0191
15,599	15,684	0,085	0,0919	0,0261
15,600	15,689	0,089	0,0953	0,0227
15,608	15,695	0,087	0,0919	0,0161
15,612	15,699	0,087	0,0899	0,0281
15,615	15,704	0,089	0,0897	0,0283
15,623	15,713	0,090	0,0878	0,0302
15,625	15,719	0,094	0,0880	0,0300
15,629	15,728	0,099	0,0878	0,0302
15,631	15,738	0,107	0,0884	0,0296
15,635	15,753	0,118	0,0879	0,0299

$$m = 0,1180 \quad d = 0,0313$$

$$m_c = 0,1108 \quad (x^4 = 0,1252)$$

$$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,1180; \quad 4Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 13,92 \times 10^{-3}$$

$$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,1108; \quad 4Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 12,28 \times 10^{-3}$$

Tabla 22. Coeficiente de difusión de Ø29 a 10°C.  
Interferencias (continuación)

Foto 4.  $t = 80,844 \text{ seg}$   $J = 47,5$

$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2 \sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h)$	$d$
15,049	15,624	0,575	0,3976	0,2345
15,300	15,629	0,329	0,2595	0,0964
15,381	15,633	0,252	0,2163	0,0532
15,432	15,636	0,204	0,1862	0,0231
15,459	15,642	0,183	0,1751	0,0120
15,487	15,649	0,162	0,1608	0,0023
15,500	15,654	0,154	0,1574	0,0057
15,515	15,659	0,144	0,1505	0,0126
15,524	15,663	0,139	0,1478	0,0153
15,531	15,667	0,136	0,1464	0,0167
15,543	15,673	0,130	0,1410	0,0221
15,550	15,679	0,129	0,1403	0,0228
15,559	15,684	0,125	0,1359	0,0272
15,562	15,690	0,128	0,1384	0,0247
15,568	15,700	0,132	0,1413	0,0218
15,576	15,708	0,132	0,1392	0,0239
15,584	15,713	0,129	0,1334	0,0297
15,590	15,722	0,132	0,1331	0,0300
15,599	15,729	0,130	0,1268	0,0363
15,604	15,738	0,134	0,1254	0,0377
15,610	15,752	0,142	0,1260	0,0371
15,613	15,773	0,160	0,1322	0,0309
15,619	15,807	0,188	0,1401	0,0230
			$m = 0,1631$	$d = 0,0365$
			$m_c = 0,1524$	$(x 4 = 0,1460)$

$$2 \sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,1631; 4Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 26,60 \times 10^{-3}$$

$$2 \sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,1524; 4Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 23,22 \times 10^{-3}$$

Tabla 22. Coeficiente de difusión de  $\phi 29$  a  $10^{\circ}\text{C}$ .  
Interferencias (continuación)

Foto 5  $t = 100.464$  ug.  $J = 47,5$

$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h)$	$d$
13,509	14,066	0,557	0,385	0,209
13,733	14,072	0,339	0,267	0,091
13,825	14,079	0,254	0,218	0,042
13,867	14,083	0,216	0,197	0,021
13,899	14,088	0,189	0,181	0,005
13,901	14,095	0,194	0,193	0,017
13,932	14,100	0,168	0,172	0,004
13,949	14,104	0,155	0,162	0,014
13,961	14,109	0,148	0,157	0,009
13,971	14,116	0,145	0,157	0,009
13,981	14,120	0,139	0,151	0,025
13,991	14,124	0,133	0,145	0,031
13,998	14,133	0,135	0,147	0,029
14,001	14,143	0,142	0,154	0,022
14,008	14,149	0,141	0,151	0,025
14,016	14,154	0,138	0,146	0,030
14,024	14,167	0,143	0,148	0,028
14,029	14,178	0,149	0,150	0,026
14,035	14,189	0,154	0,150	0,026
14,040	14,199	0,159	0,149	0,027
14,049	14,215	0,166	0,147	0,029
14,055	14,238	0,183	0,151	0,025
14,061	14,289	0,228	0,170	0,006

$$m = 0,176$$

$$m_c = 0,167$$

$$d = 0,033$$

$$(x^4 = 0,132)$$

$$2\sqrt{Dt} \cdot (\Delta H/\Delta h) = 0,176; \quad 4Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 30,98 \times 10^{-3}$$

$$2\sqrt{Dt} \cdot (\Delta H/\Delta h) = 0,167; \quad 4Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 27,89 \times 10^{-3}$$

Tabla 22 . Coeficiente de difusión de  $\text{O}_2$  a  $10^\circ\text{C}$ .  
Interferencias (continuación)

Foto 6. $t = 121.290 \text{ seg}$		$J = 47,5$		
$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h)$	$d$
13,133	13,955	0,822	0,5683	0,3727
13,555	13,963	0,408	0,3218	0,1262
13,682	13,970	0,288	0,2471	0,0515
13,734	13,976	0,242	0,2209	0,0253
13,774	13,982	0,208	0,1990	0,0034
13,798	13,990	0,192	0,1906	0,0050
13,812	13,998	0,186	0,1900	0,0056
13,827	14,001	0,174	0,1819	0,0137
13,846	14,005	0,159	0,1690	0,0266
13,854	14,011	0,147	0,1582	0,0374
13,865	14,018	0,153	0,1659	0,0297
13,874	14,026	0,152	0,1654	0,0302
13,885	14,032	0,147	0,1598	0,0358
13,896	14,039	0,143	0,1546	0,0410
13,900	14,047	0,147	0,1574	0,0382
13,906	14,055	0,149	0,1572	0,0384
13,911	14,065	0,154	0,1593	0,0363
13,918	14,068	0,150	0,1512	0,0444
13,924	14,087	0,163	0,1590	0,0366
13,932	14,098	0,166	0,1553	0,0403
13,940	14,114	0,174	0,1544	0,0412
13,945	14,129	0,184	0,1520	0,0436
13,950	14,165	0,215	0,1602	0,0354
			$m = 0,1956$	$d = 0,0504$
			$m_c = 0,1786$	$(x 4 = 0,2016)$
$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,1956; \quad 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 38,26 \times 10^{-3}$ $2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,1786; \quad 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 31,90 \times 10^{-3}$				

Tabla 22. Coeficiente de difusión de  $\text{O}_2$  a  $10^\circ\text{C}$ .  
Interferencias (continuación)

Foto 7.  $t = 167.664$  seg.  $J = 47,5$

$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h)$	$d$
15,060	15,479	0,419	0,2897	0,0719
15,176	15,488	0,312	0,2461	0,0283
15,231	15,493	0,262	0,2248	0,0070
15,264	15,500	0,236	0,2154	0,0024
15,289	15,510	0,221	0,2114	0,0064
15,305	15,515	0,210	0,2084	0,0094
15,320	15,522	0,202	0,2064	0,0114
15,340	15,529	0,189	0,1976	0,0202
15,353	15,537	0,184	0,1956	0,0222
15,364	15,544	0,180	0,1938	0,0240
15,377	15,553	0,176	0,1909	0,0269
15,385	15,560	0,175	0,1904	0,0274
15,394	15,568	0,174	0,1891	0,0287
15,401	15,579	0,178	0,1924	0,0254
15,408	15,590	0,182	0,1948	0,0230
15,471	15,600	0,183	0,1931	0,0247
15,424	15,612	0,188	0,1945	0,0233
14,431	15,623	0,192	0,1935	0,0243
15,439	15,641	0,202	0,1971	0,0207
15,445	15,667	0,222	0,2077	0,0101
15,454	15,709	0,255	0,2263	0,0085
15,459	15,805	0,346	0,2859	0,0681
15,466	15,955	0,489	0,3644	0,1466
			$m = 0,2178$	$d = 0,0287$
			$m_c = 0,2111$	$(x 4 = 0,1148)$
<hr/>				
$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,2178; 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 47,44 \times 10^{-3}$				
$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,2111; 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 44,56 \times 10^{-3}$				

Tabla 22. Coeficiente de difusión de  $\varnothing 29$  a  $10^{\circ}\text{C}$ .  
Interferencias (continuación)

Foto 8. $t = 189.504$ $J = 47,5$				
$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h)$	$d$
14,979	15,457	0,478	0,3305	0,1171
15,134	15,462	0,328	0,2587	0,0453
15,199	15,469	0,270	0,2317	0,0183
15,238	15,478	0,240	0,2191	0,0057
15,260	15,486	0,226	0,2162	0,0028
15,283	15,495	0,212	0,2104	0,0030
15,298	15,501	0,207	0,2115	0,0019
15,306	15,505	0,199	0,2080	0,0054
15,325	15,514	0,189	0,2009	0,0025
15,334	15,523	0,189	0,2034	0,0100
15,350	15,533	0,183	0,1985	0,0149
15,361	15,540	0,179	0,1947	0,0187
15,372	15,549	0,177	0,1924	0,0210
15,380	15,559	0,179	0,1935	0,0199
15,390	15,571	0,181	0,1937	0,0197
15,399	15,581	0,182	0,1920	0,0214
15,405	15,596	0,191	0,1976	0,0158
15,410	15,608	0,198	0,1996	0,0138
15,419	15,623	0,204	0,1990	0,0144
15,425	15,641	0,216	0,2021	0,0113
15,430	15,672	0,242	0,2147	0,0013
15,440	15,715	0,275	0,2272	0,0138
15,449	15,936	0,287	0,2139	0,0005
			$m = 0,2134$	$d = 0,0173$
			$m_c = 0,2081$	$(x 4 = 0,0692)$
$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,2134$			$4 DT (\Delta H/\Delta h)^2 = 45,54 \times 10^{-3}$	
$2 Dt (\Delta H/\Delta h) = 0,2081$			$4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 43,31 \times 10^{-3}$	

Tabla 22 . Coeficiente de difusión de  $\phi 29$  a  $10^{\circ}\text{C}$ .  
Interferencias (continuación)

Foto 9. $t = 253.10^4$ seg $J = 47,5$				
$H_k$	$H_e$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h)$	$d$
14,051	14,641	0,590	0,4079	0,1681
14,268	14,649	0,381	0,3005	0,0607
14,344	14,654	0,310	0,2661	0,0263
14,387	14,662	0,275	0,2510	0,0112
14,418	14,675	0,257	0,2459	0,0061
14,445	14,684	0,239	0,2372	0,0026
14,462	14,694	0,232	0,2370	0,0028
14,481	14,700	0,219	0,2289	0,0109
14,498	14,707	0,209	0,2222	0,0176
14,505	14,713	0,208	0,2239	0,0159
14,517	14,723	0,206	0,2234	0,0164
14,533	14,735	0,202	0,2198	0,0200
14,545	14,745	0,200	0,2174	0,0224
14,556	14,756	0,200	0,2162	0,0236
14,564	14,767	0,203	0,2173	0,0225
14,574	14,783	0,209	0,2205	0,0193
14,585	14,795	0,210	0,2172	0,0226
14,595	14,805	0,210	0,2117	0,0281
14,603	14,824	0,221	0,2156	0,0242
14,611	14,842	0,231	0,2162	0,0236
14,619	14,868	0,249	0,2425	0,0027
14,624	14,901	0,277	0,2288	0,0110
14,633	14,966	0,333	0,2481	0,0083
			$m = 0,2398$	$d = 0,0246$
			$m_c = 0,2322$	$(x 4 = 0,0984)$
<hr/>				
$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,2398$			$4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 57,50 \times 10^{-3}$	
$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,2322$			$4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 53,92 \times 10^{-3}$	

Tabla 22 . Coeficiente de difusión de  $\phi 29$  a  $10^{\circ}\text{C}$ .  
Interferencias (continuación)

Foto 10.  $t = 341.964$  seg.  $J = 47,5$

$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h)$	$d$
13,895	14,582	0,687	0,4750	0,2022
14,165	14,590	0,425	0,3353	0,0625
14,253	14,601	0,348	0,2987	0,0259
14,296	14,609	0,313	0,2857	0,0129
14,327	14,604	0,287	0,2746	0,0018
14,357	14,624	0,267	0,2650	0,0078
14,374	14,635	0,261	0,2667	0,0061
14,395	14,645	0,250	0,2613	0,0115
14,413	14,653	0,240	0,2552	0,0176
14,426	14,664	0,238	0,2562	0,0166
14,445	14,676	0,231	0,2505	0,0223
14,454	14,687	0,233	0,2535	0,0193
14,465	14,698	0,233	0,2532	0,0196
14,479	14,709	0,230	0,2486	0,0242
14,496	14,722	0,226	0,2419	0,0309
14,500	14,736	0,236	0,2490	0,0238
14,514	14,753	0,239	0,2472	0,0256
14,523	14,765	0,242	0,2440	0,0288
14,533	14,789	0,256	0,2498	0,0230
14,542	14,810	0,268	0,2508	0,0220
14,551	14,831	0,288	0,2804	0,0076
14,560	14,875	0,315	0,2602	0,0126
14,571	14,936	0,365	0,2720	0,0008
			$m = 0,2728$	$d = 0,0272$
			$m_c = 0,2636$	$(x 4 = 0,1088)$

$$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,2728 \quad 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 74,42 \times 10^{-3}$$

$$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,2636 \quad 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 69,48 \times 10^{-3}$$

Tabla 23. Valores de  $4Dt (\Delta H/\Delta h)^2$  en función de t a 1°C durante la difusión de  $\phi 29$  a una concentración de 30.0 unidades de  $A_{260}$

---

$4Dt (\Delta H/\Delta h)^2$	t
$12,28 \times 10^{-3}$	35.130
$23,22 \times 10^{-3}$	80.844
$27,89 \times 10^{-3}$	100.464
$31,90 \times 10^{-3}$	121.290
$44,56 \times 10^{-3}$	167.664
$43,31 \times 10^{-3}$	189.504
$53,92 \times 10^{-3}$	253.104
$69,48 \times 10^{-3}$	341.964

---

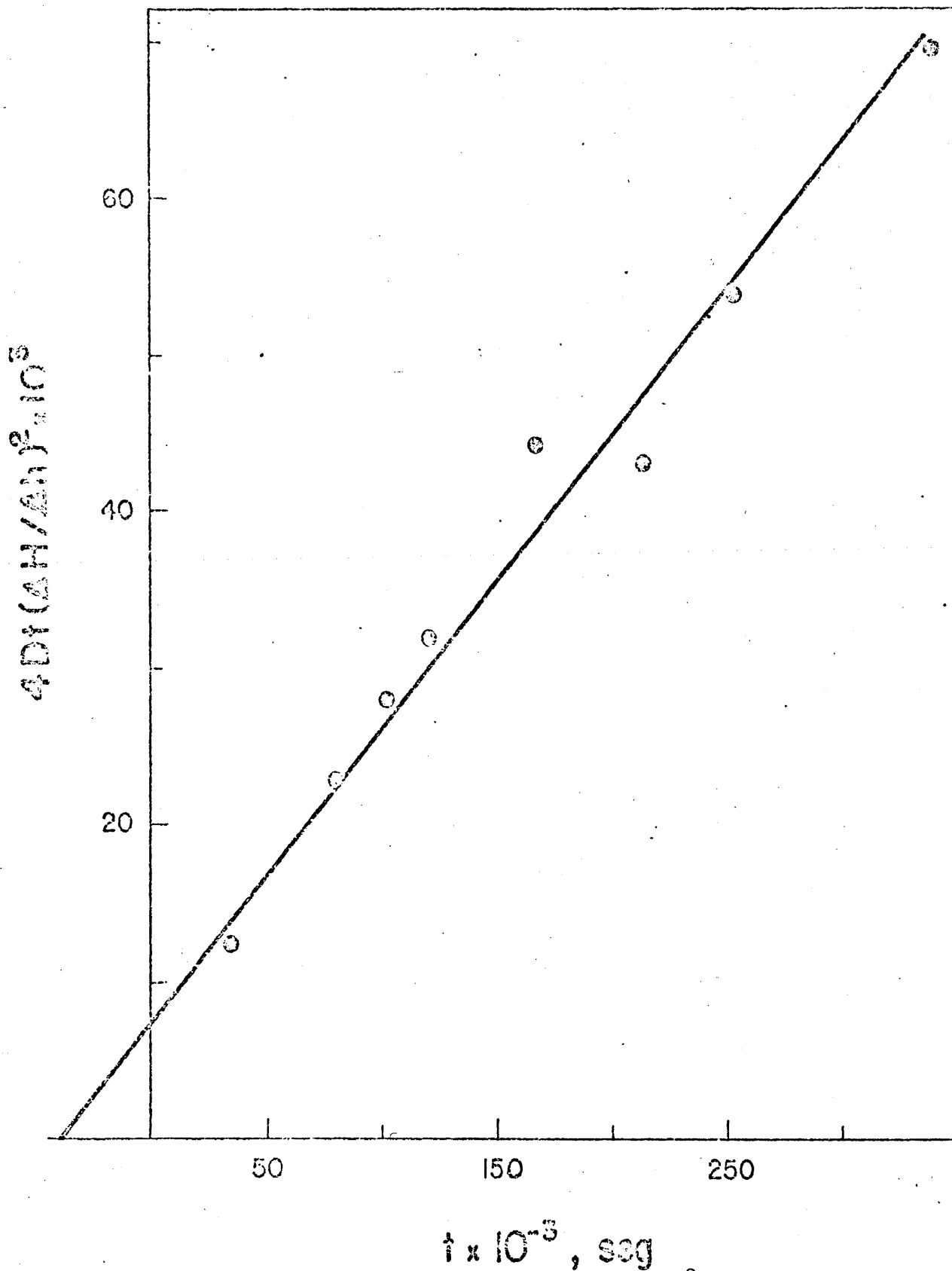


Figura 19. Relación entre  $4Dt (\Delta H/\Delta h)^2$  y  $t$  durante la difusión de  $\phi 29$  en diluyente de fago a  $10^\circ\text{C}$ . Concentración = 30,0 unidades de  $A_{260}$ .

#### 4.3. Método del papel de probabilidad

La tabla 24 muestra los cálculos para determinar el coeficiente de difusión de  $\phi 29$  en las mismas condiciones que en el caso anterior. Representando los valores de el porcentaje del número total de franjas que se encuentran entre el centro de cada franja y un extremo de la célula en función de la posición de la franja respecto al eje de la célula, se obtiene la figura 20 para cada uno de los tiempos de difusión que se indican en la tabla 22. Los valores se distribuyen como distribuciones normales de probabilidad acumulativas, a cada una de las cuales corresponde un valor de  $\sigma$ . Representando  $\sigma^2$  en función de t (figura 21) se obtiene una recta cuya pendiente es D. De este modo se obtuvo para la concentración de fago indicada un valor para  $D_{1,DF}^{30} = (4,3 \pm 0,2) \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$ .

Tabla 24 . Coeficiente de difusión de  $\emptyset 29$  a 10C. Método del papel de probabilidad.

C = 30,0 unidades de  $A_{260}$  (J = 47,5). Las coordenadas,  $H_i$ , de las líneas,  $j_i$ , se dan en la tabl

$j_i$	%	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
5	10,5	0,270	0,410	0,390	0,641	0,229	0,281	0,367	0,432
6	12,6	0,287	0,438	0,392	0,665	0,245	0,304	0,394	0,462
7	14,7	0,301	0,451	0,423	0,679	0,260	0,319	0,411	0,479
8	16,8	0,320	0,466	0,440	0,694	0,280	0,327	0,430	0,500
9	18,9	0,324	0,475	0,452	0,713	0,293	0,346	0,447	0,518
10	21,1	0,330	0,482	0,462	0,721	0,304	0,355	0,454	0,531
15	31,6	0,361	0,519	0,499	0,767	0,348	0,411	0,513	0,601
20	42,1	0,386	0,555	0,531	0,799	0,385	0,446	0,560	0,647
25	52,6	0,404	0,580	0,563	0,830	0,428	0,483	0,598	0,695
30	63,2	0,418	0,605	0,591	0,865	0,462	0,522	0,643	0,740
35	73,7	0,437	0,630	0,615	0,893	0,500	0,561	0,684	0,792
38	80,0	0,450	0,651	0,640	0,914	0,530	0,592	0,716	0,827
39	82,1	0,456	0,659	0,645	0,922	0,540	0,602	0,732	0,841
40	84,2	0,460	0,664	0,658	0,932	0,552	0,617	0,744	0,858
41	86,3	0,465	0,673	0,669	0,935	0,563	0,629	0,754	0,870
42	88,4	0,474	0,680	0,680	0,954	0,581	0,644	0,773	0,894
44	92,6	0,489	0,703	0,706	0,981	0,649	0,693	0,817	0,936

Tabla 24. Coeficiente de difusión de  $\text{O}_2$  a 1°C. Método del papel de probabilidad (continuación).

	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
$H_{-\sigma}$	0,32	0,46	0,44	0,70	0,28	0,33	0,42	0,50
$H_{+\sigma}$	0,46	0,67	0,66	0,93	0,55	0,62	0,75	0,86
$H_{50}$	0,39	0,57	0,55	0,82	0,42	0,47	0,58	0,68
$\sigma$	0,070	0,105	0,110	0,115	0,135	0,145	0,165	0,180
$\sigma^2 \times 10^2$	0,49	1,10	1,21	1,32	1,82	2,10	2,72	3,24
t, seg	35.130	80.844	100.464	121.290	167.664	189.504	253.104	341.964
$2t \times 10^{-5}$	0,702	1,616	2,010	2,426	3,354	3,790	5,062	6,840

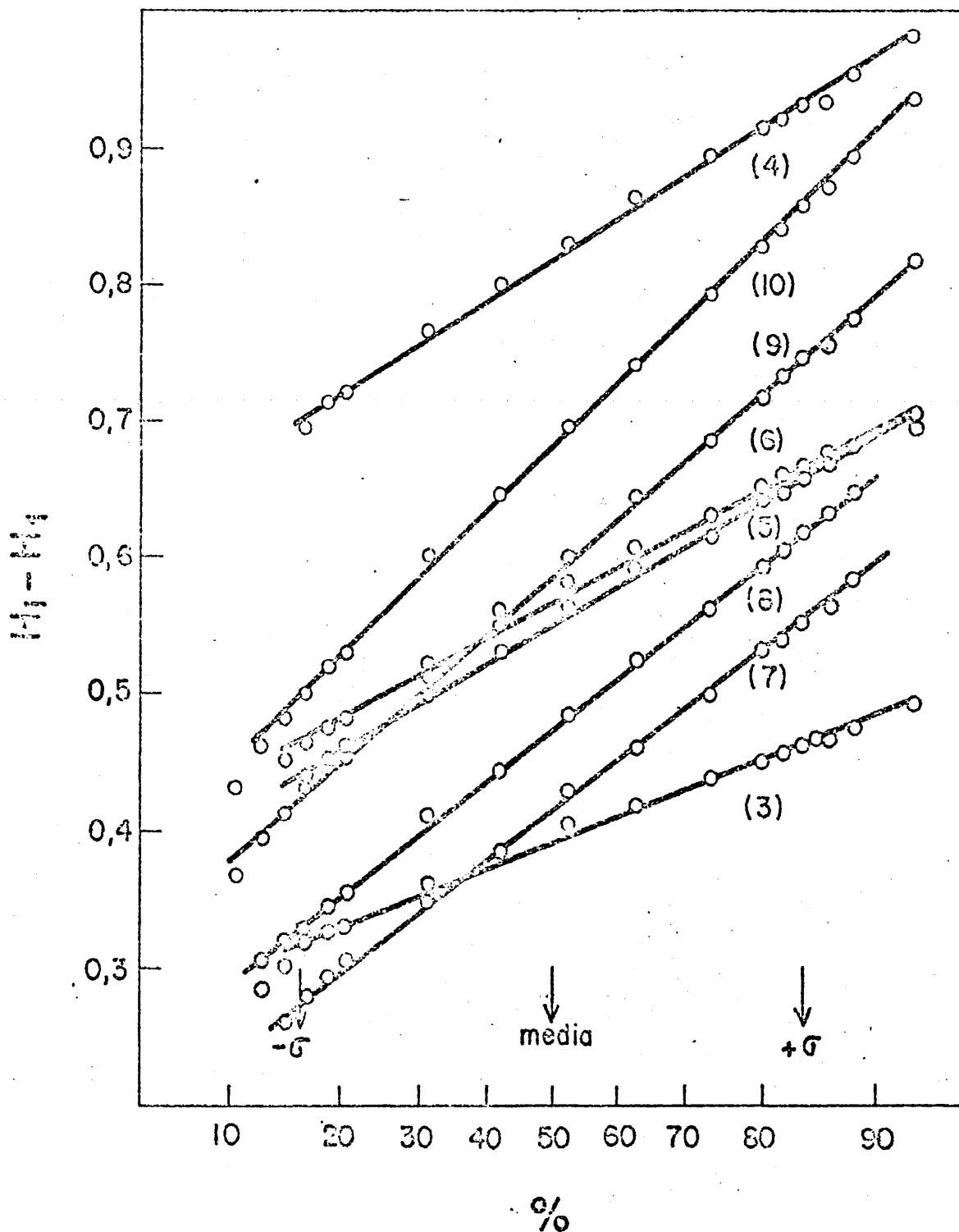


Figura 20. Relación entre el porcentaje de franjas y su posición respecto al eje de la célula a diferentes tiempos durante la difusión de Ø29 en diluyente de fago a 19°C. Concentración = 30,0 unidades de  $A_{260}$

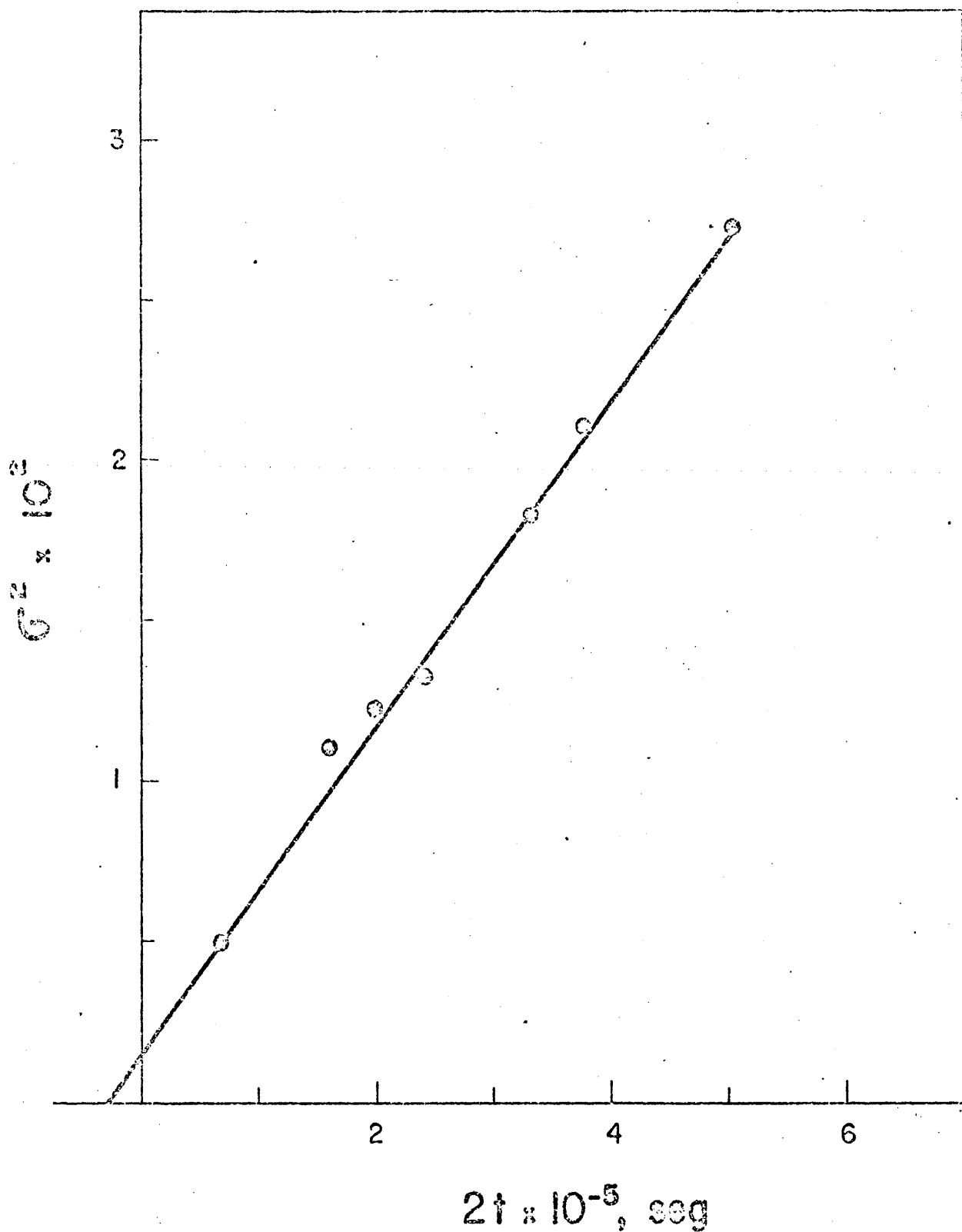


Figura 21. Relación entre  $\sigma^2$  y  $t$  durante la difusión de  $\phi 29$  en diluyente de fago a  $10^{\circ}\text{C}$ . Concentración = 30,0 unidades de  $A_{260}$ .

Repitiendo el cálculo de  $D_{1,DF}$  para diferentes concentraciones de  $\phi 29$  se obtuvieron los valores que se muestran en la tabla 25. Ajustando los valores obtenidos por el método de los mínimos cuadrados se obtuvo para  $D_{1,DF}^0$  (el coeficiente de difusión a dilución infinita en diluyente de fago a 10°C) un valor de  $(4,9 \pm 0,1) \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$  (figura 22). Cuando este valor se corrige para agua a 20°C (tabla 26) se obtiene para  $\phi 29$  un valor de  $D_{20,W}^0 = (9,2 \pm 0,5) \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ x seg}^{-1}$ .

Observando los dos valores obtenidos, puede notarse que la corrección de cambios de disolvente y temperatura implica un valor casi dos veces mayor para  $D_{20,W}^0$ . Para comprobar la validez de la extrapolación se repitió la determinación del coeficiente de difusión de  $\phi 29$  en diluyente de fago a 20°C a una sola concentración de 9,3 unidades de  $A_{260}$ . Los resultados, obtenidos a partir del método de Longworth, apareando las franjas de interferencia de un modo simétrico y no simétrico, se muestra en la tabla 27, tabla 28 y figura 23, obteniendo un valor para  $D_{20,DF}^{9,3} = (8,5 \pm 0,6) \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$ .

Tabla 25. Relación entre coeficiente de difusión y concentración de soluciones de diluyentes de fago, a 10°C.

	y	x	x <sup>2</sup>	xy	y <sub>c</sub>	d	d <sup>2</sup>
1	5,02x10 <sup>-8</sup>	3,09	9,55	15,51x10 <sup>-8</sup>	4,82x10 <sup>-8</sup>	- 0,20x10 <sup>-8</sup>	0,04x10 <sup>-8</sup>
2	4,78x10 <sup>-8</sup>	5,90	34,81	28,20x10 <sup>-8</sup>	4,70x10 <sup>-8</sup>	- 0,08x10 <sup>-8</sup>	0,01x10 <sup>-8</sup>
3	4,30x10 <sup>-8</sup>	8,80	77,44	37,84x10 <sup>-8</sup>	4,59x10 <sup>-8</sup>	+ 0,29x10 <sup>-8</sup>	0,08x10 <sup>-8</sup>
4	4,53x10 <sup>-8</sup>	10,29	105,88	46,61x10 <sup>-8</sup>	4,53x10 <sup>-8</sup>	0	0
5	4,28x10 <sup>-8</sup>	14,90	222,01	63,77x10 <sup>-8</sup>	4,34x10 <sup>-8</sup>	+ 0,06x10 <sup>-8</sup>	-
6	3,82x10 <sup>-8</sup>	30,00	900,00	114,60x10 <sup>-8</sup>	3,74x10 <sup>-8</sup>	- 0,08x10 <sup>-8</sup>	0,06x10 <sup>-8</sup>
	26,73x10 <sup>-8</sup>	72,98	1349,69	306,53x10 <sup>-8</sup>			0,19x10 <sup>-8</sup>

$$y = (a \pm \sigma_a) + (b \pm \sigma_b) x$$

$$a = y x^2 - x xy/n x^2 - (x)^2 = 26,73 x 10^{-8} x 1349,69 - 72,98 x 306,53 x 10^{-8} / 6 x 1349,69 - 5326,08 = - 4,02 x 10^{-8} = 4,94 x 10^{-8}$$

$$b = n xy - x y/n x^2 - (x)^2 = 6 x 306,53 x 10^{-8} - 72,98 x 26,73 x 10^{-8} / 6 x 1349,69 - 5326,08 = - 4,02 x 10^{-8}$$

$$\sigma_a^2 = d^2/n-2 = 0,19 x 10^{-16} / 4 = 0,05 x 10^{-16}$$

$$\sigma_b^2 = \sigma_a^2 x^2/n x^2 - (x)^2 = 0,05 x 10^{-16} x 1349,69 / 6 x 1349,69 - 5326,08 = 0,02 x 10^{-16}; \sigma_a = 0,14 x 10^{-8}$$

$$\sigma_b^2 = n\sigma_a^2/n x^2 - (x)^2 = 6 x 0,05 x 10^{-16} / 6 x 1349,69 - 5326,08 = 0,0001 x 10^{-16}; \sigma_b = 1 x 10^{-10}$$

$$y = (4,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-8} - (4 \pm 1) \cdot 10^{-10} x$$

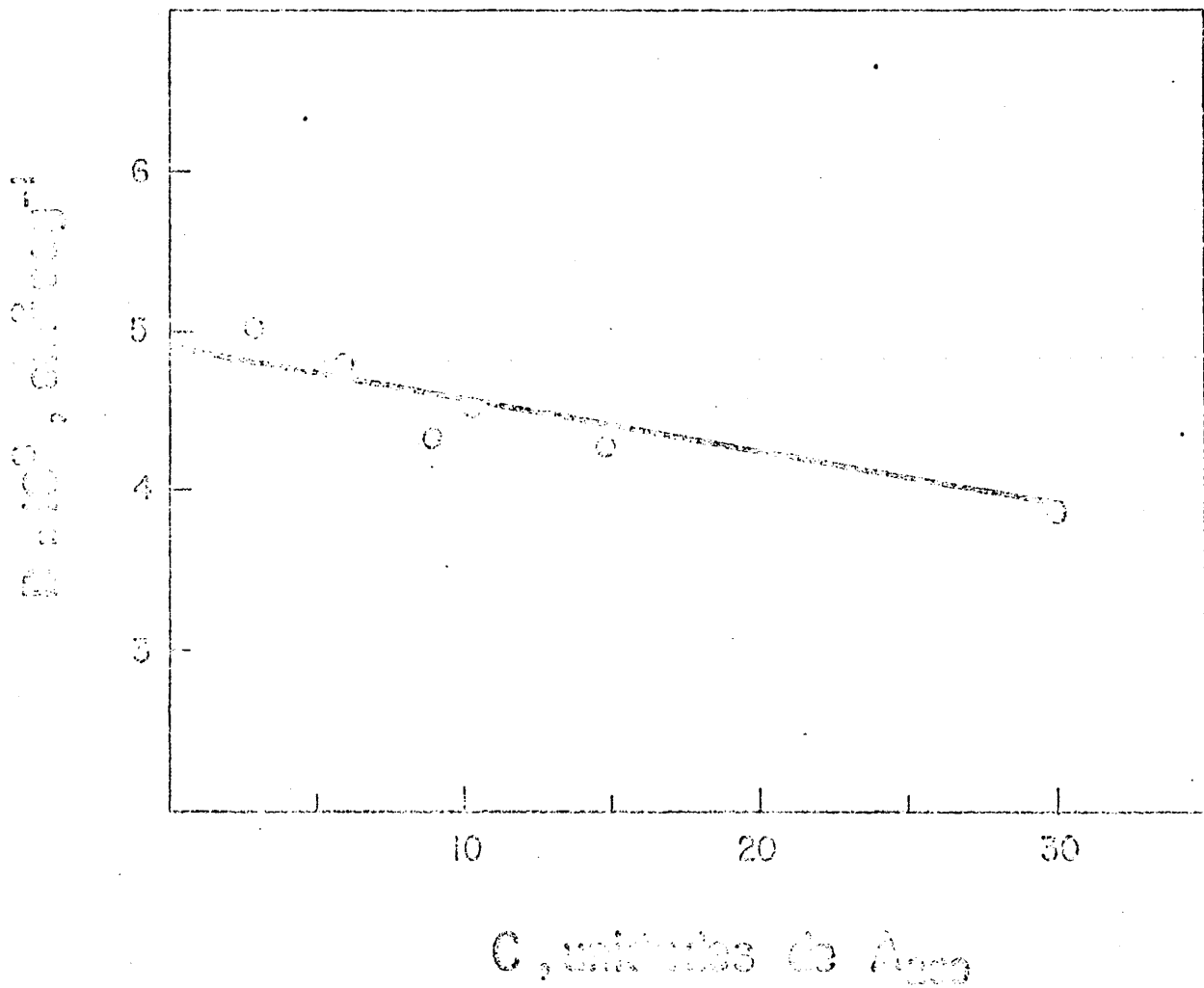


Figura 22. Variación del coeficiente de difusión de  $\phi 29$  con la concentración.

Tabla 26 . Coeficiente de difusión,  $D_{20,W}^{\circ}$ , de Ø29

$$D = (4,9 \pm 0,1) \times 10^{-8} - (4 \pm 1) \times 10^{-10} \text{ C}$$

$$D_{1,DF}^{\circ} = (4,9 \pm 0,1) \times 10^{-8}$$

$$D_{20,W}^{\circ} = D_{1,DF}^{\circ} \frac{T + 20}{T + 1} \left( \frac{\gamma_{DF}}{\gamma_W} \right)_t \left( \frac{\gamma_t}{\gamma_{20}} \right)_W$$

$$\frac{T + 20}{T + t} = \frac{293,2}{274,2} = 1,07 \pm 0,05$$

$$\left( \frac{\gamma_{DF}}{\gamma_W} \right)_{10C} = \frac{104,4}{102,7} = 1,016 \pm 0,005$$

$$\left( \frac{\gamma_{10}}{\gamma_{200}} \right)_W = \frac{1,7313}{1,0050} = 1,7227 \pm 0,0005$$

$$D_{20,W}^{\circ} = 4,9 \times 10^{-8} \times 1,07 \times 1,016 \times 1,7227 = 9,2 \times 10^{-8}$$

$$\sigma_D^2 = \left[ (0,1/4,9)^2 + (0,05/1,07)^2 + (0,0005/1,016)^2 + (0,0005/1,7226)^2 \right] \times 9,2 \times 10^{-8} = 0,26 ; \sigma_D = \pm 0,5$$

$$D_{20,W}^{\circ} = (9,2 \pm 0,5) \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{seg}^{-1}$$

Tabla 27. Coeficiente de difusión de Ø29 a 20°C. Interferencias.

C = 9,3 unidades de A<sub>260</sub> J = 17

		Agrupamiento no simétrico				Agrupamiento simétrico							
j <sub>k</sub>	j <sub>e</sub>	$\frac{2j_k - J}{J}$	$\frac{2j_l - J}{J}$	X <sub>k</sub>	X <sub>l</sub>	$\frac{h}{2\sqrt{Dt}}$	j <sub>k</sub>	j <sub>l</sub>	$\frac{2j_k - J}{J}$	$\frac{2j_l - J}{J}$	X <sub>k</sub>	X <sub>l</sub>	$\frac{\Delta h}{2\sqrt{D}}$
1	9	0,8823	0,0588	1,1060	0,0522	1,1582	1	16	0,8823	0,8823	1,1060	1,1060	2,21
2	10	0,7647	0,1765	0,8392	0,1577	0,9969	2	15	0,7647	0,7647	0,8392	0,8392	1,67
3	11	0,6471	0,2941	0,6568	0,2669	0,9237	3	14	0,6471	0,6471	0,6568	0,658	1,31
4	12	0,5294	0,4118	0,5102	0,3828	0,8930	4	13	0,5294	0,5294	0,5102	0,5102	1,02
5	13	0,4118	0,5294	0,3828	0,5102	0,8930	5	12	0,4118	0,4118	0,3828	0,3828	0,76
6	14	0,2941	0,6471	0,2669	0,6568	0,9237	6	11	0,2941	0,2941	0,2669	0,2669	0,53
7	15	0,1765	0,7647	0,1577	0,8392	0,9969	7	10	0,1765	0,1765	0,1577	0,1577	0,31
8	16	0,0588	0,8823	0,0522	1,1060	1,1582	8	9	0,0588	0,0588	0,0522	0,0522	0,10

Tabla 27 . Coeficiente de difusión de  $\text{O}_2$  a 20°C. Interferencias (continuación)

Foto 4.  $t = 11.280 \text{ seg}$   $l/t = 0,887 \times 10^{-4}$   $J = 17$

Agrupamiento no simétrico				Agrupamiento simétrico			
$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} \frac{\Delta H}{\Delta h}$	$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} \frac{\Delta H}{\Delta h}$
1,0750	1,9395	0,8645	0,7464	1,0750	2,1560	1,0810	0,4887
1,3704	1,9698	0,5994	0,6013	1,3704	2,1057	0,7353	0,4381
1,5482	1,9983	0,4501	0,4873	1,5482	2,0763	0,5281	0,4020
1,6652	2,0250	0,3598	0,4029	1,6652	2,0495	0,3843	0,3766
1,7497	2,0495	0,2998	0,3357	1,7497	2,0250	0,2753	0,3596
1,8126	2,0763	0,2637	0,2855	1,8126	1,9983	0,1857	0,3460
1,8624	2,1057	0,2433	0,2441	1,8624	1,9698	0,1074	0,3405
1,9044	2,1560	0,2516	0,2172	1,9044	1,9395	0,0351	0,3362
			0,3511				0,3860
$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h)^2 = 123,27 \times 10^{-3}$ ; $D = 2,73 \times 10^{-6}$				$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h)^2 = 149,00 \times 10^{-3}$ $4 DT (\Delta H/\Delta h)^2 = 0,3860$ $3,30 \times 10^{-6}$			

Tabla 27. Coeficiente de difusión de Ø29 a 20°C. Interferencias (continuación)

Foto 5.  $t = 15.000 \text{ seg}$   $1/t = 0,667 \times 10^{-4}$   $J = 17$

Agrupamiento no simétrico					Agrupamiento simétrico				
$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} \frac{\Delta H}{\Delta h}$	$H_k$	$H_k$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} \frac{\Delta H}{\Delta h}$	$H_k$	$2\sqrt{Dt} \frac{\Delta H}{\Delta h}$
0,6310	1,7365	1,1055	0,9545	0,6310	1,9488	1,3178	0,5958	0,6310	1,3178
1,0980	1,7686	0,6706	0,6727	1,0980	1,9074	0,8094	0,4822	1,0980	0,8094
1,3090	1,7980	0,4890	0,5294	1,3090	1,8759	0,5669	0,4316	1,3090	0,5669
1,4387	1,8241	0,3854	0,4316	1,4387	1,8505	0,4118	0,4036	1,4387	0,4118
1,5308	1,8505	0,3197	0,3580	1,5308	1,8241	0,2933	0,3831	1,5308	0,2933
1,6006	1,8759	0,2753	0,2980	1,6006	1,7980	0,1974	0,3684	1,6006	0,1974
1,6556	1,9074	0,2518	0,2526	0,6556	1,7686	0,1130	0,3583	0,6556	0,1130
1,6997	1,9488	0,2491	0,2115	1,6997	1,7365	0,0368	0,3525	1,6997	0,0368
			0,3739						0,4219

$$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,3739, 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 139,80 \times 10^{-3}; D = 2,33 \times 10^{-6}$$

$$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,4219, 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 178,00 \times 10^{-3}; D = 2,97 \times 10^{-6}$$

Tabla 27 . Coeficiente de difusión de Ø29 a 20°C. Interferencias (continuación)

Foto 6. t = 18.000 seg  $1/t = 0,556 \times 10^{-4}$  J = 17

Agrupamiento no simétrico				Agrupamiento simétrico			
$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} \frac{\Delta H}{\Delta h}$	$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} \frac{\Delta H}{\Delta h}$
0,6043	1,6762	1,0719	0,9255	0,6043	1,8930	1,2887	0,5826
1,0364	1,7074	0,6710	0,6731	1,0364	1,8485	0,8121	0,4839
1,2514	1,7372	0,4858	0,5259	1,2514	1,8178	0,5664	0,4312
1,3804	1,7643	0,3839	0,4299	1,3804	1,7901	0,4097	0,4015
1,4718	1,7901	0,3183	0,3564	1,4718	1,7643	0,2925	0,3860
1,5412	1,8178	0,2766	0,2994	1,5412	1,7372	0,1950	0,3639
1,5943	1,8485	0,2542	0,2550	1,5943	0,7074	0,1131	0,3586
1,6380	1,8930	0,2550	0,2202	1,6380	1,6762	0,0382	0,3659
			m = 0,3733				m = 0,3845
$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,3733$ ; $4 DT (\Delta H/\Delta h)^2 = 139,35 \times 10^{-3}$ ; $D = 1,94 \times 10^{-6}$				$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,3845$ ; $4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 147,84 \times 10^{-3}$ ; $D = 2,05 \times 10^{-6}$			

Tabla 27 . Coeficiente de difusión de  $\phi 29$  a  $20^{\circ}\text{C}$ . Interferencias (continuación)

Foto 7.  $t = 21.840$   $1/t = 0,458 \times 10^{-4}$   $J = 17$

Agrupamiento no simétrico				Agrupamiento simétrico			
$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} \frac{\Delta H}{\Delta h}$	$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} \frac{\Delta H}{\Delta h}$
0,8720	1,8599	0,9879	0,8530	0,8720	2,0813	1,2093	0,5467
1,2523	1,8914	0,6391	0,6411	1,2523	2,0345	0,7822	0,4660
1,4452	1,9212	0,4760	0,5153	1,4452	2,0034	0,5582	0,4249
1,5689	1,9477	0,3788	0,4242	1,5689	1,9750	0,4061	0,3979
1,6609	1,9750	0,3141	0,3517	1,6609	1,9477	0,2868	0,3746
1,7271	2,0034	0,2763	0,2991	1,7271	1,9212	0,1941	0,3623
1,7786	2,0345	0,2559	0,2567	1,7786	1,8914	0,1128	0,3576
1,8227	2,0813	0,2586	0,2273	1,8227	1,8599	0,0372	0,3563
			$m = 0,3694$				$m = 0,3789$
$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,3694; 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 136,46 \times 10^{-3}; D = 1,56 \times 10^{-6}$				$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,3789; 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 143,57 \times 10^{-3}; D = 1,64 \times 10^{-6}$			

Tabla 27 . Coeficiente de difusión de Ø29 a 20°C. Interferencia (continuación)

Foto 8. t = 25.260 1/t = 0,396 x 10<sup>-4</sup> J = 17

Agrupamiento no simétrico					Agrupamiento simétrico					
H <sub>k</sub>	H <sub>l</sub>	H	2√Dt $\frac{\Delta H}{\Delta h}$	H <sub>k</sub>	H <sub>l</sub>	ΔH	2√Dt $\frac{\Delta H}{\Delta h}$			
0,7870	1,8325	1,0455	0,9027	0,7870	2,0567	1,2697	0,5740			
1,2050	1,8645	0,6595	0,6616	1,2050	2,0102	0,8052	0,4797			
1,4060	1,8950	0,4890	0,5294	1,4060	1,9780	0,5720	0,4354			
1,5408	1,9225	0,3817	0,4274	1,5408	1,9502	0,4094	0,4012			
1,6283	1,9502	0,3219	0,3605	1,6283	1,9225	0,2942	0,3843			
1,6965	1,9780	0,2815	0,3048	1,6965	1,8950	0,1985	0,3705			
1,7510	2,0102	0,2592	0,2600	1,7510	1,8645	0,1135	0,3599			
1,7950	2,0567	0,2617	0,2260	1,7950	1,8325	0,0375	0,3592			
m = 0,3764				m = 0,3850						
$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,3764; 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 141,68 \times 10^{-3}; D = 1,40 \times 10^{-6}$					$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,3850; 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 148,23 \times 10^{-6}; D = 1,47 \times 10^{-6}$					

Tabla 27 . Coeficiente de difusión de Ø29 a 20°C. Interferencias (continuación)

Foto 9		t = 73.560		$1/t = 0,136 \times 10^{-4}$		J = 17	
Agrupamiento no simétrico				Agrupamiento simétrico			
$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} \frac{\Delta H}{\Delta h}$	$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} \frac{\Delta H}{\Delta h}$
0,1270	1,7680	1,6410	1,4168	0,1270	2,0325	1,9055	0,8614
1,0337	1,8038	0,7701	0,7725	1,0337	1,9750	0,9413	0,5608
1,3006	1,8368	0,5362	0,5805	1,3006	1,9361	0,6355	0,4838
1,4494	1,8682	0,4188	0,4690	1,4494	1,9015	0,4521	0,4431
1,5494	1,9015	0,3521	0,3943	1,5494	1,8682	0,3188	0,4164
1,6205	1,9361	0,3156	0,3417	1,6205	1,8368	0,2163	0,4037
1,6782	1,9750	0,2968	0,2977	1,6782	1,8038	0,1256	0,3982
1,7270	2,0325	0,3055	0,2638	1,7270	1,7680	0,0410	0,3927
			m = 0,4166				
$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,4166$ ; $4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 173,56 \times 10^{-3}$ ; $D = 0,59 \times 10^{-6}$				$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,4229$ ; $4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 178,84 \times 10^{-3}$ ; $D = 0,61 \times 10^{-6}$			

Tabla 27 . Coeficiente de difusión de Ø29 a 20°C. Interferencias (continuación)

Foto 10		t = 89.520 seg		$1/t = 0,112 \times 10^{-4}$		J = 17	
Agrupamiento no simétrico				Agrupamiento simétrico			
$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} \frac{\Delta H}{\Delta h}$	$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} \frac{\Delta H}{\Delta h}$
0,0050	1,7120	1,7070	1,4738	0,0050	1,9864	1,9814	0,8958
0,9605	1,7487	0,7882	0,7907	0,9605	1,982	0,9677	0,5766
1,2332	1,7830	0,5498	0,5952	1,2332	1,8863	0,6531	0,4972
1,3836	1,8170	0,4334	0,4853	1,3836	1,8502	0,4666	0,4573
1,4890	1,8502	0,3612	0,4045	1,4890	1,8170	0,3280	0,4284
1,5625	1,8863	0,3238	0,3505	1,5625	1,7830	0,2205	0,4115
1,6226	1,9282	0,3056	0,3066	1,6226	1,7487	0,1261	0,3998
1,6708	1,9864	0,3156	0,2725	1,6708	1,7120	0,0412	0,3946
			0,4284				0,4314
$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,4284; 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 183,53 \times 10^{-3}; D = 0,51 \times 10^{-6}$				$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,4314; 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 186,11; D = 0,52 \times 10^{-6}$			

Tabla 27 . Coeficiente de difusión de Ø29 a 20°C. Interferencias (continuación)

Foto 11		t = 113.040 seg		1/t = 0,088 x 10 <sup>-4</sup>		J = 17	
Agrupamiento no simétrico				Agrupamiento simétrico			
H <sub>k</sub>	H <sub>l</sub>	ΔH	2√Dt $\frac{\Delta H}{\Delta h}$	H <sub>k</sub>	H <sub>l</sub>	ΔH	2√Dt $\frac{\Delta H}{\Delta h}$
0,0000	1,2750	1,2750	1,1008	0,0000	1,5652	1,5652	0,7076
0,5700	1,3121	0,7421	0,7444	0,5700	1,5016	0,9316	0,5551
0,8096	1,3476	0,5380	0,5824	0,8096	1,4564	0,6468	0,4924
0,9516	1,3827	0,4311	0,4828	0,9516	1,4176	0,4660	0,4567
1,0529	1,4176	0,3647	0,4084	1,0529	1,3827	0,3298	0,4308
1,1245	1,4564	0,3319	0,3593	1,1245	1,3476	0,2231	0,4164
1,1835	1,5016	0,3181	0,3191	1,1835	1,3121	0,1286	0,4077
1,2310	1,5652	0,3342	0,2886	1,2310	1,2750	0,0440	0,4215
			0,4304				0,4375
$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,4304; 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 =$ $= 185,24 \times 10^{-3}; D = 0,41 \times 10^{-6}$				$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,4375; 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 =$ $= 191,41 \times 10^{-3}; D = 0,42 \times 10^{-6}$			

Tabla 27 . Coeficiente de difusión de Ø29 a 20°C. Interferencias (continuación)

Foto 12		t = 161.400 seg		1/t = 0,062 x 10		J = 17	
Agrupamiento no simétrico				Agrupamiento simétrico			
$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} \frac{\Delta H}{\Delta h}$	$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} \frac{\Delta H}{\Delta h}$
3,1038	4,2757	1,1719	1,0118	3,1038	4,6012	1,4974	0,6769
3,6065	4,3152	0,7087	0,7109	3,6065	4,5255	0,9190	0,5475
3,8293	4,3528	0,5235	0,5667	3,8293	4,4730	0,6437	0,4900
3,9629	4,3908	0,4279	0,4792	3,9629	4,4295	0,4666	0,4573
4,0575	4,4295	0,3720	0,4166	4,0575	4,3908	0,3333	0,4353
4,1292	4,4730	0,3438	0,3722	4,1292	4,3528	0,2236	0,4173
4,1839	4,5255	0,3416	0,3427	4,1839	4,3152	0,1313	0,4163
4,2324	4,6012	0,3688	0,3184	4,2324	4,2757	0,0433	0,4148
			0,4354				0,4386

$$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,4354; 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 189,57; D = 0,29 \times 10^{-6}$$

$$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,4386; 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 192,37 \times 10^{-3}; D = 0,30 \times 10^{-6}$$

Tabla 27 . Coeficiente de difusión de Ø29 a 20°C. Interferencias (continuación)

Foto 13                      t = 195.960 seg                      1/t = 0,051 x 10<sup>-4</sup>                      J = 17

Agrupamiento no simétrico				Agrupamiento simétrico			
H <sub>k</sub>	H <sub>l</sub>	Δ H	2√Dt $\frac{\Delta H}{\Delta h}$	H <sub>k</sub>	H <sub>l</sub>	Δ H	2√Dt $\frac{\Delta H}{\Delta h}$
3,0440	4,2860	1,2420	1,0723	3,0440	4,6316	1,5876	0,7177
3,5787	4,3291	0,7504	0,7527	3,5787	4,6496	1,0709	0,6380
3,8191	4,3674	0,5483	0,5936	3,8191	4,4953	0,6762	0,5148
3,9615	4,4072	0,4457	0,4991	3,9615	4,4485	0,4870	0,4773
4,0588	4,4485	0,3897	0,4364	4,0588	4,4072	0,3484	0,4551
4,1326	4,4953	0,3627	0,3927	4,1326	4,3674	0,2348	0,4382
4,1923	4,6496	0,4573	0,4587	4,1923	4,3291	0,1368	0,4337
4,2415	4,6316	0,3901	0,3368	4,2415	4,2860	0,0445	0,4262
			0,4761				0,4575

$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,4761$ ; $4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 226,67 \times 10^{-3}$ ; $D = 0,29 \times 10^{-6}$	$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,4575$ ; $4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 = 209,31 \times 10^{-3}$ ; $D = 0,27 \times 10^{-6}$
--	--

Tabla 27 . Coeficiente de difusión de Ø29 a 20°C. Interferencias (continuación)

Foto 14		t = 245.340		1/t = 0,041 x 10 <sup>-4</sup>		J = 17	
Agrupamiento no simétrico				Agrupamiento simétrico			
H <sub>k</sub>	H <sub>l</sub>	ΔH	2√Dt $\frac{\Delta H}{\Delta h}$	H <sub>k</sub>	H <sub>l</sub>	ΔH	2√Dt $\frac{\Delta H}{\Delta h}$
3,1390	4,4296	1,2906	1,1143	3,1390	4,7949	1,6559	0,7486
3,7224	4,4707	0,7483	0,7506	3,7224	4,7096	0,9872	0,5882
3,9600	4,5133	0,5533	0,5960	3,9600	4,6575	0,6975	0,5310
4,1000	4,5568	0,4568	0,5115	4,1000	4,6021	0,5021	0,4921
4,1969	4,6021	0,4052	0,4538	4,1969	4,5568	0,3599	0,4701
4,2700	4,6575	0,3875	0,4195	4,2700	4,5133	0,2433	0,4541
4,3292	4,7096	0,3804	0,3816	4,3292	4,4707	0,1415	0,4486
4,3825	4,7949	0,4124	0,3561	4,3825	4,4296	0,0471	0,4511
			0,4730				0,4745
2√Dt (ΔH/Δh) = 0,4730; 4 Dt (ΔH/Δh) <sup>2</sup> = 223, 73 ; D = 0,23 x 10 <sup>-6</sup>				2√Dt (ΔH/Δh) = 0,4745; 4 Dt (ΔH/Δh) <sup>2</sup> = 225, 15; D = 0,23 x 10 <sup>-6</sup>			

Tabla 27 . Coeficiente de difusión de Ø29 a 20°C. Interferencias (continuación)

Foto 15		t = 286,200 seg		$1/t = 0,035 \times 10^{-4}$		J = 17	
Agrupamiento no simétrico				Agrupamiento simétrico			
$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} \frac{\Delta H}{\Delta h}$	$H_k$	$H_l$	$\Delta H$	$2\sqrt{Dt} \frac{\Delta H}{\Delta h}$
3,1970	4,4706	1,2736	1,0996	3,1970	4,8523	1,6553	0,7483
3,7630	4,5155	0,7525	0,7548	3,7630	4,7653	1,0023	0,5972
3,9966	4,5611	0,5645	0,6111	3,9966	4,7024	0,7058	0,5373
4,1350	4,6033	0,4683	0,5244	4,1350	4,6508	0,5158	0,5055
4,2324	4,6508	0,4174	0,4674	4,2334	4,6033	0,3699	0,4832
4,3100	4,7024	0,3924	0,4248	4,3100	4,5611	0,2511	0,4686
4,3700	4,7653	0,3953	0,3965	4,3700	4,5155	0,1455	0,4613
4,4223	4,8253	0,4300	0,3713	4,4223	4,4706	0,0483	0,4626
			0,4848				0,4864
$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,4848; 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 =$ $= 235,03 \times 10^{-3}; D = 0,21 \times 10^{-6}$				$2\sqrt{Dt} (\Delta H/\Delta h) = 0,4864; 4 Dt (\Delta H/\Delta h)^2 =$ $= 236,58 \times 10^{-3}; D = 0,21 \times 10^{-6}$			

Tabla 28. Valores de D en función de  $1/t$  a  $20^{\circ}\text{C}$  durante la difusión de  $\text{O}_2$  a una concentración de 9,3 unidades de  $A_{260}$

$D \times 10^6$		$t, \text{seg}$	$(1/t) \times 10^4$
Agrupamiento no simétrico	Agrupamiento simétrico		
2,73	3,30	11.280	0,887
2,33	2,97	15.000	0,667
1,94	2,05	18.000	0,556
1,56	1,64	21.840	0,458
1,40	1,47	25.260	0,396
0,59	0,61	73.560	0,136
0,51	0,52	89.520	0,112
0,41	0,42	113.040	0,088
0,29	0,30	161.400	0,062
0,29	0,27	195.960	0,051
0,23	0,23	245.340	0,041
0,21	0,21	286.200	0,035

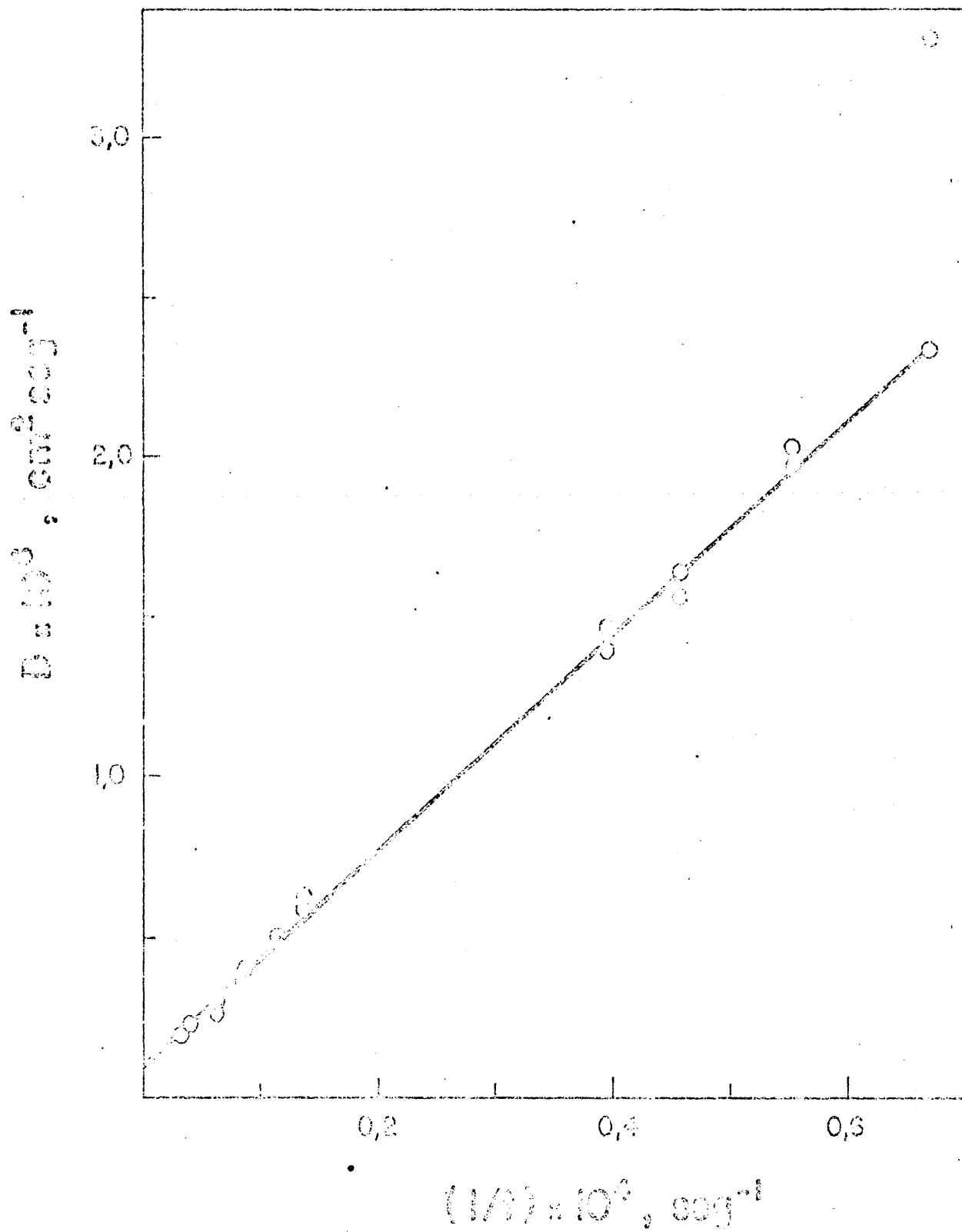


Figura 23. Relación entre  $D$  y  $1/t$  durante la difusión de  $\phi 29$  en diluyente de fago a  $20^{\circ}\text{C}$ . Concentración = 9,3 unidades de  $A_{260}$ .

#### IV.10. PUNTO ISOELECTRICO DE Ø29

El punto isoeléctrico de Ø29 se determinó a 10°C a partir de la relación entre movilidad electroforética y pH a fuerza iónica constante, como se describe en Métodos.

La tabla 29 muestra las posiciones del picoschlieren de Ø29 en tampón de Michaelis (pH 2,7; I = 0,1) en la rama ascendente de una célula de Tiselius, cuando se somete a un gradiente de 3,46 V cm<sup>-1</sup>. Representando la distancia recorrida en función del tiempo se obtiene una recta (figura 24), cuya pendiente (la velocidad media de migración) dividida por el campo aplicado, da una movilidad electroforética de + 5,7 x 10<sup>-5</sup> cm<sup>2</sup> V seg<sup>-1</sup> al pH indicado.

La tabla 30 muestra los valores de la movilidad electroforética de Ø29 a 10°C a diferentes pH y a una fuerza iónica de 0,1. Representando dichos valores en función del pH (figura 25), la intersección con el eje de abscisas (u = 0), da un valor para el punto isoeléctrico de Ø29 de 4,3.

Tabla 29. Distancias recorridas por  $\emptyset 29$  a pH 2,7  
 y  $I \approx 0,1$  sometido a un campo de  $3,46$   
 $V \text{ cm}^{-1}$ .

---

<u>Foto</u>	<u>t, seg</u>	<u>Borde</u>	<u>Pico</u>	<u>d, cm</u>
1	0	9.050	11.285	2.735
2	3.600	9.143	12.510	3.367
3	7.500	8.938	12.963	4.025
4	9.960	9.090	13.572	4.482
5	12.480	9.054	13.956	4.902
6	15.360	9.027	14.302	5.355
7	17.940	9.109	14.900	5.791
8	21.540	9.080	15.650	6.570

---

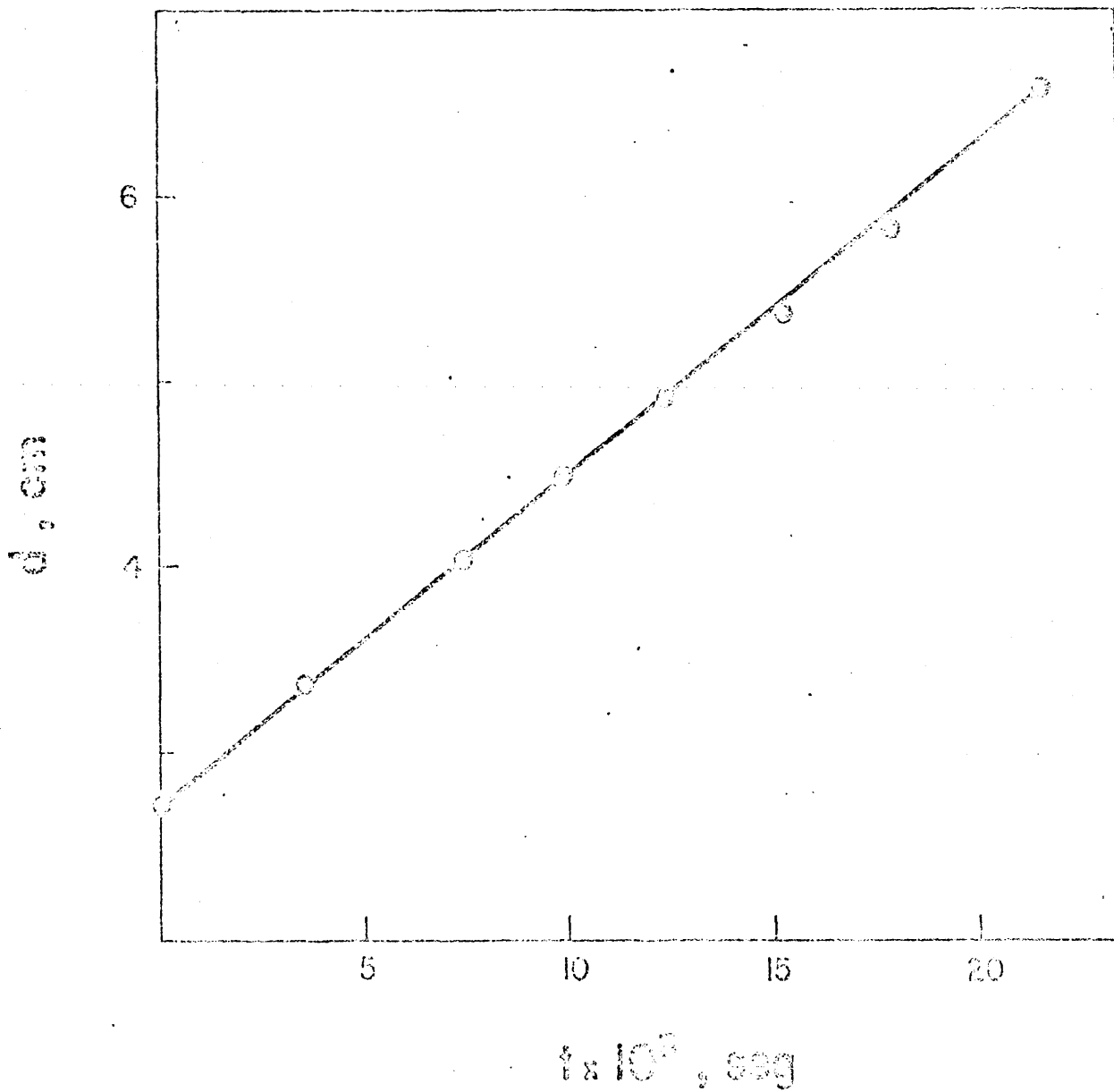


Figura 24. Migración electroforética de  $\emptyset 29$  a pH 2,7 y  $I = 0,1$  en función de  $t$ , sometido a un campo de  $3,46 \text{ V cm}^{-1}$ .

Tabla 30. Movilidad electroforética de Ø29 en tampón de Michaelis (10°C; I = 0,1) en función del pH.

---

pH	u, cm <sup>2</sup> v <sup>-1</sup> seg <sup>-1</sup>
2,7	+ 5,17 x 10 <sup>-5</sup>
3,4	+ 4,51 x 10 <sup>-5</sup>
3,8	+ 2,89 x 10 <sup>-5</sup>
4,5	- 0,32 x 10 <sup>-5</sup>
4,9	- 0,63 x 10 <sup>-5</sup>
5,9	- 0,99 x 10 <sup>-5</sup>
6,8	- 1,62 x 10 <sup>-5</sup>
7,8	- 1,68 x 10 <sup>-5</sup>
7,8	- 1,70 x 10 <sup>-5</sup>
9,0	- 1,71 x 10 <sup>-5</sup>

---

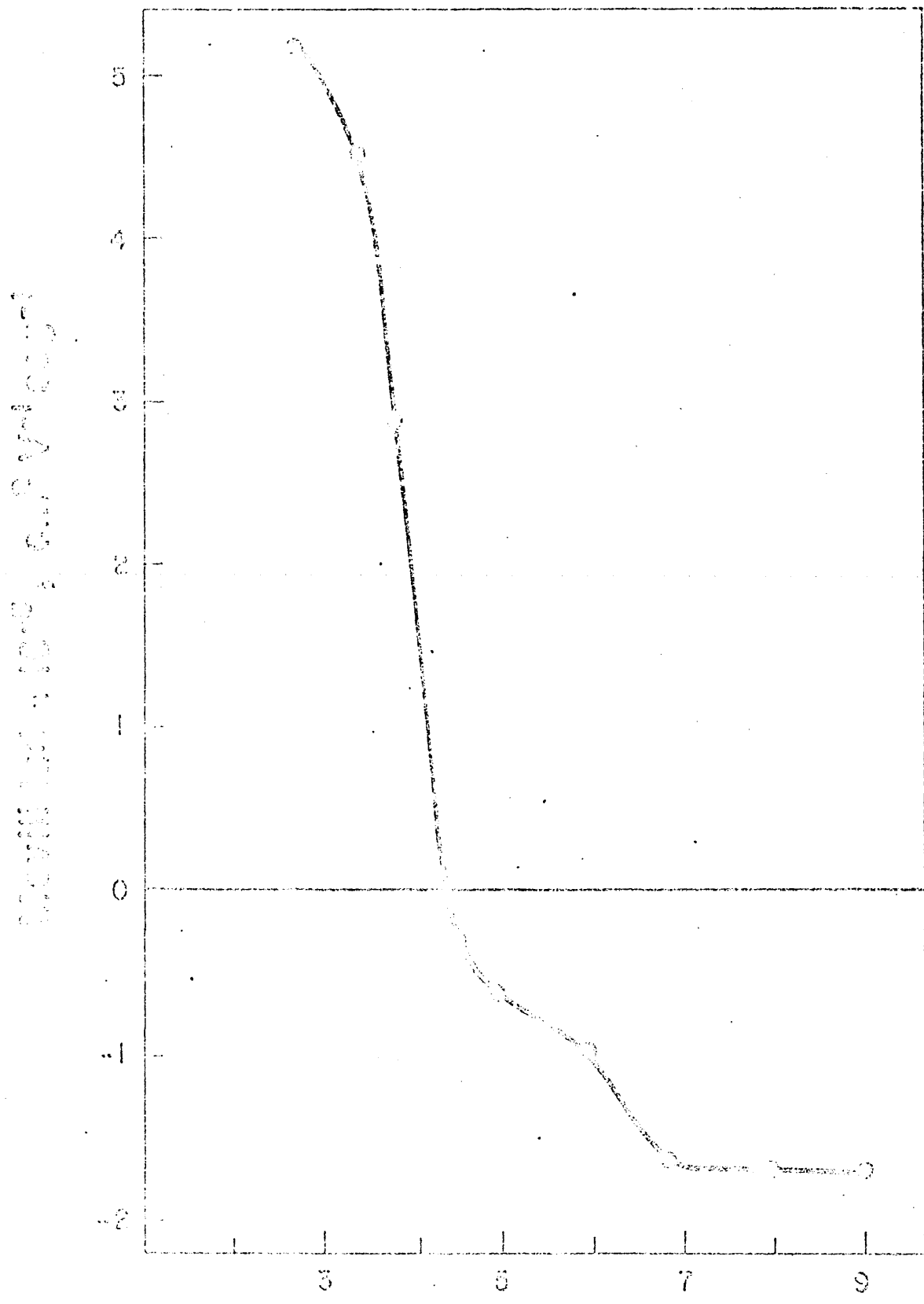


Figura 25. Punto isoelectrico de Ø29.

#### IV.11. PESO MOLECULAR DE Ø29

##### 11.1. A partir de la ecuación de Svedberg

Conocidos el coeficiente de sedimentación,  $s_{20,W}^0$ , el coeficiente de difusión,  $D_{20,W}^0$ , y el volumen específico parcial,  $\bar{v}_2$ , de Ø29, el peso molecular de la partícula puede determinarse a partir de la ecuación de Svedberg (tabla 31):

$$M = \frac{RT s}{D(1 - \bar{v}_2 \rho)}$$

De este modo se obtiene para Ø29 un peso molecular de  $(17 \pm 1) \times 10^6$ .

Tabla 31. Peso molecular de Ø29 a partir de la ecuación de Svedberg.

$$M = \frac{RTs}{D(1 - \bar{v}_2\rho)} = \frac{8,314 \times 10^7 \times 293,2 \times 251 \times 10^{-13}}{9,2 \times 10^{-8} \times 0,392} = 16,96 \times 10^6$$

$$\sigma_M^2 = \left( \frac{\partial M}{\partial T} \right)^2 \sigma_T^2 + \left( \frac{\partial M}{\partial D} \right)^2 \sigma_D^2 + \left( \frac{\partial M}{\partial (1 - \bar{v}_2\rho)} \right)^2 \sigma_{(1 - \bar{v}_2\rho)}^2$$

$$\left[ \left( \frac{\partial M}{\partial T} \right) \sigma_T \right]^2 = \left( \frac{M\sigma_T}{T} \right)^2 = \frac{16,96 \times 10^6}{293,2} \times 0,05 = 0,000009 \times 10^{12}$$

$$\left[ \left( \frac{\partial M}{\partial s} \right) \sigma_s \right]^2 = \left( \frac{M\sigma_s}{s} \right)^2 = \frac{16,96 \times 10^6}{251 \times 10^{-13}} \times 2 \times 10^{-13} = 0,0180 \times 10^{12}$$

$$\left[ \left( \frac{\partial M}{\partial D} \right) \sigma_D \right]^2 = \left( - \frac{M\sigma_D}{D} \right)^2 = \frac{16,96 \times 10^6}{9,3 \times 10^{-8}} \times 0,5 \times 10^{-8} = 0,8158 \times 10^{12}$$

$$\left[ \left( \frac{\partial M}{\partial (1 - \bar{v}_2\rho)} \right) \sigma_{(1 - \bar{v}_2\rho)} \right]^2 = \left( - \frac{M\sigma_{(1 - \bar{v}_2\rho)}}{(1 - \bar{v}_2\rho)} \right)^2 = \frac{16,8 \times 10^6}{0,392} \times 0,006 = 0,0661 \times 10^{12}$$

$$\sigma_M^2 = 0,8999 \times 10^{12} ; \sigma_M = 1 \times 10^6$$

$$M = (17 \pm 1) \times 10^6$$

## 11.2. A partir de la composición química

Conocido el peso molecular del DNA de  $\phi 29$  (27,28), el peso molecular de la partícula puede calcularse determinando el porcentaje de la masa total que es DNA (78).

Para ello se determinó primero el porcentaje de N en la proteína de  $\phi 29$  (tabla 32), a partir de la composición de aminoácidos de la proteína del virus, y el porcentaje de N y P en el DNA de  $\phi 29$  (tabla 33), a partir de la composición de bases del DNA.

A partir de estos datos (tabla 34) se obtiene que 1 unidad de  $A_{260}$  de  $\phi 29$  contiene  $85 \pm 2$   $\mu\text{g}$  de virus, de los cuales,  $48 \pm 1$   $\mu\text{g}$  son DNA. De estos valores y del peso molecular del DNA,  $M = (11 \pm 1) \times 10^6$ , se obtiene para  $\phi 29$  un peso molecular de  $(19 \pm 1) \times 10^6$ .

Tabla 32 . Porcentaje de N en la proteína de Ø29

Aminoácido	Fracción molar	$\frac{1}{M}$	W	W (N)
Lisina	0,048	128,19	6,2 $\pm$ 0,1	1,34 $\pm$ 0,02
Histidina	0,020	137,16	2,7 $\pm$ 0,2	0,84 $\pm$ 0,03
Arginina	0,036	156,21	5,6 $\pm$ 0,2	2,02 $\pm$ 0,04
Acido aspártico	0,135	115,10	15,6 $\pm$ 0,2	1,89 $\pm$ 0,01
Treonina	0,080	101,12	8,1 $\pm$ 0,1	1,12 $\pm$ 0,01
Serina	0,070	87,09	6,1 $\pm$ 0,1	0,98 $\pm$ 0,01
Acido glutámico	0,101	129,13	13,0 $\pm$ 0,1	1,41 $\pm$ 0,01
Prolina	0,022	97,13	2,1 $\pm$ 0,1	0,31 $\pm$ 0,01
Glicina	0,075	57,07	4,3 $\pm$ 0,1	1,05 $\pm$ 0,01
Alanina	0,072	71,09	5,1 $\pm$ 0,1	1,01 $\pm$ 0,01
Cisteina	0,003	103,15	0,3 $\pm$ 0,1	0,04 $\pm$ 0,01
Valina	0,093	89,15	8,3 $\pm$ 0,1	1,30 $\pm$ 0,01
Metionina	0,039	131,21	5,1 $\pm$ 0,1	0,55 $\pm$ 0,01
Isoleucina	0,063	113,17	7,1 $\pm$ 0,1	0,88 $\pm$ 0,01
Leucina	0,076	112,17	8,6 $\pm$ 0,1	1,06 $\pm$ 0,01
Tirosina	0,024	163,19	3,9 $\pm$ 0,2	0,34 $\pm$ 0,01
Fenilalanina	0,031	147,19	4,6 $\pm$ 0,2	0,43 $\pm$ 0,01
Triptofano	0,012	186,22	2,2 $\pm$ 0,2	0,34 $\pm$ 0,02
			108,9 $\pm$ 0,6	16,91 $\pm$ 0,07

$$\% \text{ de N en proteína} = \frac{16,91 \pm 0,07}{108,9 \pm 0,6} \times 100 = 15,5 \pm 0,1$$

1. Al peso molecular de cada aminoácido se le ha restado 18, es decir, el peso del mol de agua liberado en la formación de cada enlace peptídico.

Tabla 33. Porcentaje de N y P en el DNA de Ø29

Nucleótido	Fracción molar	$M_{Na}^I$	W	W (N)	W (P)
dAMP	$0,311 \pm 0,002$	335,31	$104,3 \pm 0,7$	$21,8 \pm 0,1$	$9,6 \pm 0,1$
dTMP	$0,305 \pm 0,006$	326,20	$99,5 \pm 1,4$	$8,5 \pm 0,2$	$9,5 \pm 0,4$
dCMP	$0,196 \pm 0,002$	311,19	$61,0 \pm 0,6$	$8,2 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,1$
dGMP	$0,188 \pm 0,003$	351,22	$66,0 \pm 1,0$	$13,2 \pm 0,3$	$5,8 \pm 0,2$
			<u>330,8 ± 1,9</u>	<u>51,7 ± 0,3</u>	<u>31,0 ± 0,5</u>
$\% \text{ de N en DNA} = \frac{51,7 \pm 0,3}{330,8 \pm 1,9} \times 100 = 15,6 \pm 0,1$					
$\% \text{ de P en DNA} = \frac{31,0 \pm 0,5}{330,8 \pm 1,9} \times 100 = 9,4 \pm 0,2$					

1. Al peso molecular de la sal sódica de cada nucleótido se le ha restado 18, es decir, el peso del mol de agua liberado en la formación de cada enlace nucleotídico.

Tabla 34. Peso molecular de Ø29 deducido de su composición química y del peso molecular del DN

<sup>2</sup> µg P/A <sub>260</sub>	<sup>3</sup> P en DNA-Na, %	<sup>4</sup> µg DNA-Na/A <sub>260</sub>	<sup>5</sup> N en DNA-Na, %	µg N-DNA/A <sub>260</sub>
4,5 ± 0,03	9,4 ± 0,2 (9,8 ± 0,1)	48 ± 1 (46,1 ± 0,4)	15,6 ± 0,1	7,5 ± 0,
<sup>7</sup> N en fago, %	<sup>8</sup> µg N-fago/A <sub>260</sub>	<sup>9</sup> µg N-proteína/A <sub>260</sub>	<sup>10</sup> µg proteína/A <sub>260</sub>	µg fago/A <sub>260</sub>
15,8 ± 0,2	13,3 ± 0,2	5,8 ± 0,3	37 ± 2	85 ± 2 (84,0 ± 0,1)

$$M_D = (11 \pm 1) \times 10^6 \cdot \frac{85 \pm 2}{48 \pm 1} = \frac{M}{(11 \pm 1) \times 10^6}; M = (19 \pm 1) \times 10^6$$

Tabla 34 (continuación)

- (1) Todas las masas indicadas se refieren a 1 ml de Ø29 con una  $A_{260} = 1$
- (2) Deducido del análisis de P del fago (Tabla 9)
- (3) Deducido de la composición de bases del DNA (Tabla 11). El valor en paréntesis se deduce del análisis directo de DNA y P del fago (Tabla 9)
- (4) Deducido de (2) y (3) :  $4,5 \times 100/9,4 = 47,8$ . El valor en paréntesis corresponde a la valoración directa de DNA (Tabla 9).
- (5) Deducido de la composición de bases del DNA (Tabla 11).
- (6) Deducido de (4) y (5) :  $48 \times 15,6/100 = 7,5$
- (7) A partir del análisis de N del fago (Tabla 8)
- (8) Deducido del porcentaje de N en fago (Tabla 8 :  $15,8 \pm 0,2$ ) y de la absorbancia específica (Tabla 12 :  $84,0 \pm 0,1$ ) :  $15,8 \times 84,0 / 100 = 13,3$
- (9) Deducido de (8) y (6) :  $13,3 - 7,5 = 5,8$
- (10) Deducido de (9) y del porcentaje de N en proteína (Tabla 32 :  $15,5 \pm 0,1$ ) :  $5,8 \times 100/15,5 = 37$
- (11) Deducido de (4) y (10) :  $48 + 37 = 85$ . El valor en paréntesis corresponde a la determinación directa de la absorbancia específica (Tabla 12 :  $84,0 \pm 0,1$ ).

V. DISCUSSION

El objetivo fundamental de esta tesis ha sido la determinación de la composición química y de los parámetros quimicofísicos del fago Ø29 necesarios para calcular su masa molecular, con el fin de estimar el número de subunidades de cada una de las 7 proteínas estructurales presentes en la cápsida del virus (30).

Para dicho estudio era previo disponer de virus homogéneo en cantidad suficiente. Los métodos publicados para la purificación de Ø29 eran adecuados para obtener pequeñas cantidades de virus (27, 30), pero no para obtener la cantidad de fago suficiente para realizar los análisis que se describen en esta tesis.

El método de purificación de Ø29 que se describe aquí parte de 17 litros de un lisado de bacterias infectadas, pero la escala del proceso puede aumentarse fácilmente. Como es general en cualquier proceso de purificación de macromoléculas en gran escala, uno de los primeros pasos del proceso es la concentración del fago presente en el lisado. Esta concentración puede hacerse por precipitación isoeléctrica a pH 4,3 o con polietilenglicol (42). Los dos procedimientos dan lugar a una buena recuperación del virus, pero el segundo es más conveniente

por su economía y suavidad.

El segundo paso de la purificación es una cromatografía a través de vidrio con poros de diámetro medio 20-40 nm (43, 79-81). Como este tamaño es inferior al del virus, éste aparece en el volumen excluido de la columna, bien separado de los contaminantes de menor tamaño. Después de este paso el virus completo está contaminado con partículas vacías (sin DNA) y otros componentes estructurales (cabezas con o sin cuello), que no quedan retrasados en la columna de vidrio poroso.

Las partículas completas pueden separarse de las que no contienen DNA, por centrifugación en ClCs hasta equilibrio de densidad (44). En el gradiente de densidad aparecen tres zonas (I, II y III, figura 8). El pico I ( $\rho = 1,44 \text{ g cm}^{-3}$ ) es virus infeccioso, el pico II ( $\rho = 1,42$ ) son variantes morfológicas espontáneas de la partícula que contienen DNA y el pico III ( $\rho < 1,40$ ) contiene una mezcla de partículas sin ácido nucleico.

El fago Ø29 obtenido de este modo es homogéneo por varios criterios:

a) Al microscopio electrónico se observan partículas virales completas.

b) El material sedimenta como un sólo componente en un gradiente de sacarosa.

c) Por velocidad de sedimentación en la ultracentrífuga, por difusión y por electroforesis libre se observa sólo un componente.

d) En el material purificado sólo se observan, por electroforesis en gel de poliacrilamida las siete proteínas virales previamente identificadas analizando virus marcado con aminoácidos radioactivos (30).

El rendimiento de virus homogéneo obtenido, respecto al virus total presente en el lisado, fué de un 50%. Como 1 ml de una solución de Ø29 que contiene 1 unidad de  $A_{260}$  equivale a 0,084 mg de Ø29 (pág. 117), las 5.589 unidades de  $A_{260}$  de virus homogéneo procedentes de un lisado de 17 litros (tabla 7), equivalen a 469 mg de virus.

Adoptando para Ø29 una masa molecular de  $18 \times 10^6$  (ver más adelante), como 5.589 unidades de  $A_{260}$  equivalen a  $5.5 \times 10^{15}$  unidades formadoras de placas, el número total de partículas es

$$\frac{5.589 \times 0,084 \times 10^{-3}}{18 \times 10^6} \times 6,02 \times 10^{23} = 1,6 \times 10^{16},$$

de las cuales un 34,3% ( $5.5 \times 10^{15}$ ) son infectivas.

El peso molecular de  $\phi 29$  se determinó por dos métodos: (1) a partir de la ecuación de Svedberg, una vez determinados los coeficientes de sedimentación y difusión y el volumen específico parcial de la partícula y (2) a partir de análisis químicos del fago completo, DNA y la proteína, y tomando para el peso molecular del DNA un valor de  $11 \times 10^6$  (28).

Para la determinación del volumen específico es necesario conocer la relación existente entre la  $A_{260}$  del fago y el peso seco del mismo. De medidas realizadas en dos experimentos diferentes se obtuvo para  $\phi 29$  en diluyente de fago una absorbancia específica de  $11,9 \pm 0,1$  unidades de  $A_{260}$  por mg de virus por g de disolución. Es decir, 1 ml de una suspensión de  $\phi 29$  en diluyente de fago que tiene una  $A_{260} = 1$ , contiene  $0,084$  mg de virus.

El volumen específico se determinó a partir de la relación entre densidad y concentración de disoluciones de  $\phi 29$  en diluyente de fago a  $20^\circ$ , obteniéndose un valor para  $\bar{v}_2 = 0,604 \pm 0,006 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ .

El coeficiente de sedimentación de  $\phi 29$  se determinó a  $20^\circ$  en diluyente de fago a diferentes concentraciones, se extrapoló a concentración cero y, finalmente, se corrigió para el valor correspondiente a

agua, obteniéndose un  $s_{20,W}^0 = (251 \pm 2) \times 10^{-13}$  seg.

El coeficiente de difusión de Ø29 se determinó en diluyente de fago a 10°C con objeto de minimizar convecciones térmicas. Partiendo de una disolución concentrada de virus (30 unidades de  $A_{260}$  por ml) el coeficiente de difusión se obtuvo por tres métodos diferentes, obteniéndose los siguientes resultados:

Método	$D_{1,DF}^{30} \times 10^8 \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$
Relación altura-área	$3,9 \pm 0,2$
Longsworth	$4,4 \pm 0,1$
Papel de probabilidad	$4,3 \pm 0,2$

Para concentraciones mas diluidas del virus el  $D_{1,DF}$  se determinó empleando solo el método de la relación altura-área. De la relación entre coeficiente de difusión y concentración se extrapoló a dilución infinita, obteniéndose un  $D_{1,DF}^0 = (4,9 \pm 0,1) \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$ . Corrigiendo este valor para agua a 20°C se obtiene para Ø29 un  $D_{20,W}^0 = (9,2 \pm 0,5) \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$ .

Como puede observarse, la corrección de temperatura practicamente duplica el valor del coefi-

ciente de difusión; para garantizar la validez de la corrección se determinó el valor del coeficiente de difusión de Ø29 a 20°C en diluyente de fago a una única concentración (9,3 unidades de  $A_{260}$ ) obteniéndose un  $D_{20,DF}^{9,3} = (8,5 \pm 0,6) \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$ .

Corrigiendo para las diferencias de viscosidad del agua y del diluyente de fago a 20°C (tabla 20) se obtiene

$$D_{20,W}^{9,3} = 8,5 \times 10^{-8} \times 1,028 = (8,7 \pm 0,6) \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1},$$

un valor muy próximo al calculado a partir de las medidas realizadas a 1°C.

Sustituyendo los valores de  $\bar{v}_2$ ,  $s_{20,W}^0$  y  $D_{20,W}^0$  en la ecuación de Svedberg se obtiene para la masa molecular de Ø29 un valor de  $(17 \pm 1) \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ .

El modo de determinar la masa molecular de un fago, conocida la masa de su DNA, se basa en análisis puramente químicos (78), que permiten determinar el porcentaje de la masa total del virus que es DNA. Este método requiere analizar por separado el virus completo, la proteína y el DNA.

Refiriendo todos los valores a 1 ml de una disolución de Ø29 que tenga una  $A_{260} = 1$ , a partir de un análisis de P total en fago y de la composición

de bases del DNA, se obtienen  $48 \mu\text{g}$  de DNA Na por unidad de  $A_{260}$ . Este valor es muy próximo a  $46,1 \pm 0,4$ , obtenido de un análisis directo del DNA en fago.

Para calcular los microgramos de proteína de fago por unidad de  $A_{260}$  se determina, primero, los microgramos de N en la proteína del fago, que es igual a la diferencia entre el N total en el fago, deducido del porcentaje de N en el fago y la absorbancia específica del mismo, y el N en el DNA, deducido del porcentaje de N en DNA y de la absorción específica del DNA Na. De esta diferencia se obtienen  $5,8 \mu\text{g}$  de N en la proteína por unidad de  $A_{260}$ , que multiplicado por el porcentaje de N en proteína, obtenido de la composición de aminoácidos, da  $37 \mu\text{g}$  de proteína.

Por tanto, si por cada  $48 \mu\text{g}$  de DN Na hay  $37 \mu\text{g}$  de proteína, tomando para el DNA de  $\phi 29$  un valor de  $11 \times 10^6$  (27, 28) se obtiene para la masa molecular de  $\phi 29$  un valor de  $(19 \pm 1) \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ .

De un modo más directo, el porcentaje de la masa de  $\phi 29$  que es DNA puede determinarse de la masa del fago ( $84 \mu\text{g}/A_{260}$ ) y del análisis directo del DNA ( $46,1 \mu\text{g}/A_{260}$ ). De estos valores, tomando para el peso molecular del DNA de  $\phi 29$  un valor de  $11 \times 10^6$ ,

la masa de  $\phi 29$  resulta  $20 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ .

Otro método independiente de estimar la masa del fago  $\phi 29$  es a partir de las absorciones específicas a 260 nm de la partícula, el DNA y la proteína. Tomando para la absorbancia específica del DNA bicatenario 20, y para las absorbancias del fago completo y la proteína, 11,9 (tabla 12) y 1,2 (tabla 13), respectivamente, y suponiendo que la contribución de cada componente está en relación a su masa, tomando para la del DNA un valor de  $11 \times 10^6$ , resulta para la masa del fago un valor de  $(19 \pm 2) \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ .

En conclusión, de estos resultados puede concluirse que la masa molecular de  $\phi 29$  es de unos  $18 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ . Una vez conocida la masa total del fago, puede obtenerse la masa de la cápsida restando a la primera el peso molecular del DNA, resultando, por tanto, para la cápsida protéica de  $\phi 29$  un peso molecular de alrededor de  $7 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ .

Para estudiar la morfogénesis de un fago como  $\phi 29$  es conveniente disponer de un modelo, que de cuenta del número de subunidades de cada proteína es estructural y su posición relativa en la partícula. Una vez conocida la masa proteica del fago, los pe-

Los pesos moleculares de cada proteína estructural y sus masas relativas, ha sido posible estimar que la cabeza de Ø29 consta de 85 subunidades de proteína HP1, 5 subunidades de proteína HP2 y 55 subunidades de proteína HP3; el cuello consta de 5-6 subunidades de proteína NP2 y NP3, y 12 subunidades de proteína NP1; finalmente, la cola consta de 3 subunidades de proteína TP1. De estos datos, adoptando para la cápsida de Ø29 una simetría básica icosaédrica, se ha construido un modelo que explica los datos de los análisis químicos del fago y está de acuerdo con la estructura observada por microscopía electrónica de la partícula normal de Ø29 y de los variantes morfológicos que se describen en esta tesis (82).

VI. C O N C L U S I O N E S

1. El bacteriófago  $\phi 29$  de Bacillus subtilis se ha purificado partiendo de 17 litros de cultivo, obteniéndose cerca de 0,5 g de virus homogéneo, de los cuales un 34% corresponden a partículas infectivas.
2. El virus purificado es homogéneo por los siguientes criterios: microscopía electrónica, sedimentación, difusión, electroforesis y análisis de las proteínas estructurales de la partícula.
3. La absorbancia específica a 260 nm de  $\phi 29$  y de la proteína viral, libre de DNA, en diluyente de fago es  $11,9 \pm 0,1$  y  $1,2 \pm 0,1$  unidades de  $A_{260}$  por mg de material seco por gramo de disolución.
4. Los valores del volumen específico parcial, el coeficiente de sedimentación y el coeficiente de difusión de  $\phi 29$  son, respectivamente,  $0,604 \pm 0,006 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ,  $(251 \pm 2) \times 10^{-13} \text{ seg}$  y  $(9,2 \pm 0,5) \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$ .
5. El punto isoeléctrico de  $\phi 29$  es 4,3.
6. Usando la ecuación de Svedberg y los datos del apartado 4, el peso molecular de  $\phi 29$  es  $(17 \pm 1) \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ .
7. A partir de análisis químicos, el peso molecular de  $\phi 29$  es  $(19 \pm 1) \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ .

VII. B I B L I O G R A F I A

- 1.- Crick, F.H.C. and J.D. Watson. The structure of small viruses. *Nature*, 177, 473 (1956).
- 2.- Crick, F.H.C., L. Barnett, S. Brenner and R.J. Watts-Tobin. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 192, 1227 (1961)
- 3.- Nishimura, S., D.S. Jones and H.G. Khorana. Studies on polynucleotides. XLVIII. The *in vitro* synthesis of a co-polypeptide containing two amino acids in alternating sequence dependent upon a DNA-like polymer containing two nucleotides in alternating sequences. *J. Mol. Biol.* 13, 302 (1965).
- 4.- Klug, A. Point groups and the design of aggregates. En "*Symmetry and Function of Biological Systems at the Molecular Level*"; eds. A. Engström and B. Strandberg, p. 425. New York: John Wiley & Sons (1969).
- 5.- Tsugita, A., D.T. Gish, J. Young, H. Frankel-Conrat, C.A. Knight and W.M. Stanley. The complete amino acid sequence of the protein of tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 46, 1463 (1960).
- 6.- Klug, A. and D.L.D. Caspar. The structure of small viruses. *Advances in Virus Research*, 7, 225 (1960).
- 7.- Crane, H.R. Principles and problems of biological growth. *Sci. Monthly*, 70, 376 (1950).
- 8.- Crick, F.H.C. and J.D. Watson. Virus structure: general principles. En "*The Nature of Viruses*"; eds. G.E.W. Wolstenholme and E.C.P. Millar, p. 5. Londres : Churchill (1957).

- 9.- Williams, R.C. and Smith, K.M. The polyhedral form of the Tipiela iridescent virus. Biochim. Biophys. Acta, 28, 464 (1958).
- 10.- Caspar, D.L.D. Structure of tomato bushy stunt virus. Nature, 177, 476 (1956).
- 11.- Klug, A., J.T. Finch and R.E. Franklin. The structure of turnip yellow mosaic virus: X-ray diffraction studies. Biochim. Biophys. Acta, 25, 242 (1957).
- 12.- Klug, A. and J.T. Finch. The symmetries of the protein and nucleic acid in turnip yellow mosaic virus : X-ray diffraction studies. J. Mol. Biol. 2, 201 (1960).
- 13.- Finch, J.T. and A. Klug. Structure of poliomyelitis virus. Nature, 183, 1709 (1959).
- 14.- Caspar, D.L.D. and A. Klug. Physical principles in the construction of regular viruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 27, 1 (1962).
- 15.- Horne, P. and R.W. Wildy. Symmetry in virus architecture. Virology, 15, 348 (1961).
- 16.- Marks, R.W. "The Dymaxion World of Buckminster Fuller". New York : Reinhold (1960).
- 17.- Pawley, G.S. Plane groups on polyhedra. Acta Cryst., 15, 49 (1962).
- 18.- Tikhonenko, A.S. "Ultrastructure of Bacteria Viruses". New York : Plenum Press (1970).
- 19.- Dubin, S.B., G.B. Benedek, F.C. Bancroft and D. Freifelder. Molecular weights of cliphages and coliphage DNA. II. Measurement of diffusion coefficients using optical mixing spectroscopy, and measurements of sedimentation constants. J. Mol. Biol., 54, 547 (1970).

- 20.- Moody, M.F. The shape of the T-even bacteriophage head. *Virology*, 26, 567 (1965).
- 21.- Kellenberger, E. The genetic control of the shape of a virus. *Scient. Am.* 215, 32 (1966).
- 22.- Kellenberger, E. Control mechanisms in bacteriophage morphopoiesis. En "Principles of Biomolecular Organization", p. 192, eds. G.E.W. Wolstenholme and M. O'Connor, London: Churchill (1966).
- 23.- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680 (1970).
- 24.- Dickson, R.C., S.L. Barnes and F.A. Eiserling. Structural proteins of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.*, 53, 461 (1970).
- 25.- Forrest, G.L. and D.J. Cummings. Head proteins from T-even bacteriophages. *J. Virology*, 5, 398 (1970).
- 26.- Reilly, B.E. and J. Spizizen. Bacteriophage deoxyribonucleate infection of competent Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.*, 89, 782 (1965).
- 27.- Anderson, D.L., D.D. Hickman and B.E. Reilly. Structure of Bacillus subtilis bacteriophage  $\phi 29$  and the length of  $\phi 29$  deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 91, 2081 (1966).
- 28.- Anderson, D.L. and E.T. Mosharrafa. Physical and biological properties of phage  $\phi 29$  deoxyribonucleic acid. *J. Virology*, 2, 1185 (1968).
- 29.- Ortín, J., E. Viñuela, M. Salas and C. Vásquez. DNA-protein complex in circular DNA from phage  $\phi 29$ . *Nature New Biology*, 234, 275 (1971).
- 30.- Méndez, E., G. Ramírez, M. Salas and E. Viñuela. Structural proteins of bacteriophage  $\phi 29$ . *Virology*, 45, 567 (1971).

- 31.- Ramírez, G., E. Méndez, M. Salas and E. Viñuela. Head-neck connecting protein in bacteriophage  $\phi$ 29. *Virology* 48, 263 (1972).
- 32.- Salas, M., C. Vásquez, E. Méndez and E. Viñuela. Heads fibers of bacteriophage  $\phi$ 29. *Virology*, 50, 180 (1972).
- 33.- Ramírez, G., V. Rubio, E. Méndez, M. Salas and E. Viñuela. Structure of bacteriophage  $\phi$ 29. En preparación.
- 34.- Talavera, A., F. Jiménez, M. Salas and E. Viñuela. Temperature-sensitive mutants of bacteriophage  $\phi$ 29. *Virology*, 46, 586 (1971).
- 35.- Talavera, A., F. Jiménez, M. Salas and E. Viñuela. Mapping of temperature-sensitive mutants of bacteriophage  $\phi$ 29. *Mol. Gen. Genetics*, 115, 31 (1972).
- 36.- Carrascosa, J.L., A. Talavera, J. de la Torre and E. Viñuela. Variantes morfológicos de la cápsida de  $\phi$ 29. XII Reunión de la Sociedad Española de Bioquímica (1972).
- 37.- Welker, N.E. and L.L. Campbell. Unrelatedness of *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* 94, 1124 (1967).
- 38.- Young, E.T. and R.L. Sinsheimer, Vegetative bacteriophage DNA. II. Physical characterization and replication. *J. Mol. Biol.*, 30, 165 (1967).
- 39.- Loening, U.F. The fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem. J.*, 102, 251 (1967).
- 40.- Dubnau, D., C. Goldthwaite, J. Smith and J. Marmur. Genetic map of *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.*, 27, 163 (1967).

- 41.- Adams, M.H. "Bacteriophages". New York : Interscience (1950).
- 42.- Yamamoto, K.R., B.K. Alberts, R. Benzinger. L. Lawhorne and G. Treiber. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology* 40, 734 (1970).
- 43.- Gschwender, H.H., W. Haller and P.H. Hofschneider. Large-scale preparations of viruses by steric chromatography on columns of controlled pore glass. *Biochim. Biophys. Acta*, 190, 460 (1969).
- 44.- Meselson, M., F.W. Stahl and J. Vinograd. Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 43, 581 (1957).
- 45.- Ifft, J.B., D.H. Voet and J. Vinograd. The determination of density distributions and density gradients in binary solutions at equilibrium in the ultracentrifuge. *J. Phys. Chem.* 65, 1138 (1961).
- 46.- Britten, R.J. and R.B. Roberts. High-resolution density gradient sedimentation analysis. *Science* 131, 32 (1960).
- 47.- Maizel, J.V., Jr. Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins. In "Methods in Virology", vol. 5, p. 180. Eds., K. Maramorosch and H. Koprowski. New York : Academic Press (1971).
- 48.- Chen, P.S., T.Y. Toribara and H. Warner. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.*, 28, 1756 (1956).
- 49.- Burton, K. A study of the conditions of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, 62,

315 (1956).

- 50.- Strauss, J.H., B.W. Burge and J.E. Darnell. Carbohydrate content of the membrane protein of Sindbis virus. *J. Mol. Biol.*, 47, 437 (1970).
- 51.- Moore, S. and W.H. Stein. Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. En "Methods in Enzymology", vol. 6, p. 819. Eds, S.P. Colowick and N.O. Kaplan. New York : Academic Press (1963).
- 52.- Hirs, C.H.W. Performic acid oxidation. En "Methods in Enzymology", vol 11, p. 197. Ed. C.H.W. Hirs. New York : Academic Press (1967).
- 53.- Brewer, H.B., Kentmann, H.T., Potts, J.T. and Reisfeld, R.A. Isolation and chemical properties of porcine thyrocalcitonin. *J. Biol. Chem.*, 21, 5739 (1968).
- 54.- Goodwin, T.W. and R.A. Morton. The spectrophotometric determination of tyrosin and tryptophan in proteins. *Biochem. J.*, 40, 628 (1946).
- 55.- Benche, W.L. and K. Schmid. Determination of tyrosine and tryptophan in proteins. *Anal. Chem.*, 29, 1193 (1957).
- 56.- Wyatt, G.R. The purine and pyrimidine composition of deoxypentose nucleic acids. *Biochem. J.* 48, 584 (1951).
- 57.- Kragh, A.M. Viscosity. En "A Laboratory Manual of Analytical Methods in Protein Chemistry. vol. 3, p. 173. Eds., P. Alexander and R.J. Block. London : Pergamon Press (1961).
- 58.- Gibson, K.S. Spectrophotometry. *Natl. Bur. Standards (U.S.). Circ.* 484 (1949).
- 59.- Bauer, N. Determination of density. En "Technique of Organic Chemistry". Vol. 1, parte 1, p.

253. Ed., A. Weissberger, 2<sup>a</sup> ed. New York : Interscience (1949).
- 60.- Cohn, E.J. and J.T. Edsall. En "Proteins, Amino Acids and Peptides as ions and dipolar ions", p. 370. New York : Hafner Publishing Co (1965).
- 61.- Dyson, R.D. and K.E. van Holde. An investigation of bacteriophage lambda, its protein ghosts and subunits. *Virology* 33, 559 (1967).
- 62.- Hearst, J.E. and J. Vinograd. The net hydration of deoxyribonucleic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 47, 825 (1961).
- 63.- Hearst, J.E. and J. Vinograd. The net hydration of T<sub>4</sub> bacteriophage deoxyribonucleic acid and the effect of hydration on buoyant behavior in a density gradient at equilibrium in the ultracentrifuge. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 47, 1005 (1961).
- 64.- J.E. Hearst. The specific volume of various cationic forms of deoxyribonucleic acid. *J. Mol. Biol.* 4, 415-417 (1962).
- 65.- Tanford, C. *Physical Chemistry of Macromolecules*. London : Wiley (1961).
- 66.- T. Svedberg and K.O. Pedersen. *The Ultracentrifuge*, pp. 34-38 y 273-276. Oxford : Clarendon Press (1940).
- 67.- T. Svedberg and K.O. Pedersen. *The Ultracentrifuge*, p. 237. Oxford : Clarendon Press (1940).
- 68.- Schachman, H.K. Ultracentrifugation, diffusion and viscometry. *Methods in Enzymology* 4, 32(1957).
- 69.- Svedberg, T. and K.O. Pedersen. *The Ultracentrifuge*. p. 253. Oxford : Clarendon Press (1940).
- 70.- Svensson, H. and T.E. Thompson. Translational diffusion methods in protein chemistry. En "A Laboratory Manual of Analytical Methods of Protein

- Chemistry", vol. 3, p. 57. Eds. P. Alexander and R.J. Block. London : Pergamon Press (1961).
- 71.- Longsworth, L.G. Diffusion measurements at 10°C of aqueous solutions of amino acids, peptides and sugars. J. Amer. Chem. Soc. 74, 4155 (1952).
- 72.- Markham, R. Diffusion. En "Methods in Virology" vol. 2, p. 275. Eds., K. Maramorosch and H. Koprowski. New York : Academic Press (1967).
- 73.- Tables of the Error Function and its Derivative. National Bureau of Standards Applied Mathematics Series 41 (1954).
- 74.- Magdoff, B.S. Electrophoresis of proteins in liquid media. En "A Laboratory Manual of Analytical Methods in Protein Chemistry", p. 170. Eds., P. Alexander and R.J. Block. London : Academic Press (1960).
- 75.- Gordon, C.N. and A.K. Kleinschmidt. High contrast staining of individual nucleic acid molecules. Biochim. Biophys. Acta 155, 305 (1968).
- 76.- Borst, P. Size, structure and information content of mitochondrial DNA. En "Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts", p. 260. Eds., N.K. Boardman, A.W. Lynne and R.M. Luellie. Amsterdam : North Holland (1971).
- 77.- Hirokawa, H. Transfecting deoxyribonucleic acid of Bacillus bacteriophage Ø29 that is protease sensitive. Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 1555 (1972).
- 78.- Bancroft, F.C. and D. Freifelder. Molecular weights of Coliphages and coliphage DNA. I. Measurements of the molecular weight of bacteriophage T7 by high-speed equilibrium centrifugation. J. Mol. Biol. 54, 537 (1970).

- 79.- Haller, W. Chromatography on glass of controlled pore size. *Nature* 206, 693 (1965).
- 80.- Haller, W. Virus isolation with glass of controlled pore size : MS-2 bacteriophage and Kilham virus. *Virology* 33, 740 (1967).
- 81.- Hiatt, C.W., A. Shelokov, E.J. Rounthal and J.M. Galimore. Treatment of controlled-pore glass with poly (ethylene oxide) to prevent adsorption of rabies virus. *J. Chromatogr.* 56, 362 (1971).
- 82.- Ramírez, G., V. Rubio, E. Méndez, M. Salas and E. Viñuela. A structural model of bacteriophage Ø29. En preparación.