

**SEDIMENTATIESNELHEID EN VISCOSITEIT
VAN DESOXYRIBONUCLEÏNEZUUR
MET
GROOT MOLECUULGEWICHT**

PROEFSCHRIFT

**TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN
AAN DE RIJSUNIVERSITEIT TE LEIDEN, OP GEZAG
VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR D. J. KUENEN,
HOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER WISKUNDE EN
NATUURWETENSCHAPPEN, TEN OVERSTAAN VAN
EEN COMMISSIE UIT DE SENAAT TE VERDEDIGEN
OP DONDERDAG 24 JUNI 1965 TE 15 UUR**

DOOR

JOHANNES BEREND THOMAS ATEN
GEBOREN TE EMMEN IN 1919

PROMOTOR: PROFESSOR DR J.A. COHEN

STELLINGEN

1. Door verschillende auteurs zijn voor DNA relaties opgesteld tussen de sedimentatiecoëfficiënt en het molecuulgewicht, die de vorm $s = KM^a$ hebben (dit proefschrift, 2.4.). Bij toepassing van dergelijke relaties dient men zich niet alleen af te vragen met welke nauwkeurigheid K en a bekend zijn, doch ook in hoeverre deze parameters inderdaad onafhankelijk zijn van het molecuulgewicht.

F.W. Studier, J.Mol.Biol., 11, 373, 1965.
K.I. Berns, C.A. Thomas Jr., J.Mol. Biol., 11, 476, 1965.

2. Het zou aanbeveling verdienen de in verschillende laboratoria bepaalde sedimentatiecoëfficiënten op hun onderlinge vergelijkbaarheid te toetsen door middel van geschikte standaard preparaten.
3. De opvatting van Pearlman en Bloch, dat de biosynthese van een polypeptide begint met een N-acetyl-aminozuur, dat vervolgens de richting van de synthese bepaalt, is onvolledig gefundeerd.

R. Pearlman, K. Bloch, Proc.Natl. Acad.Sci., 50, 533, 1963.

4. De verklaring, die Fanta geeft voor de ontleding van het gemengde anhydride van mierzuur en benzoëzuur, is onvolledig.

G.F. Fanta, J. Org.Chem., 29, 981, 1964.

5. Tegen de conclusie van Reddi, dat het eiwit van het tabaksmozaiekvirus niet in het cytoplasma van de geïnfecteerde plantecel wordt gesynthetiseerd, zijn bezwaren aan te voeren.

K.K. Reddi, Proc.Natl. Acad. Sci., 51, 619, 1964.

6. De door Schachman gegeven beschrijving van de beeldvorming bij gebruik van het optische systeem volgens Philpot en Svensson geeft geen duidelijk inzicht in de functie, die de cylinderlens in deze opstelling heeft.

H.K. Schachman, Ultracentrifugation in Biochemistry, Academic Press, New York, London, 1959.

7. Voor het veilig hanteren van radioactieve stoffen is bekendheid met het potentiële gevaar en met de praktische uitvoering van veiligheidsvoorschriften belangrijker dan het aanbrengen van kostbare technische voorzieningen.
8. Door Lang et al. werden DNA ketens, die vanuit een oplossing geadsorbeerd waren aan een eiwitfilm op het vloeistofoppervlak, elektronenmicroscopisch onderzocht. Hun veronderstelling, dat de configuraties der ketens na adsorptie op te vatten zijn als projecties van de in oplossing voorkomende configuraties, is aanvechtbaar.

D. Lang, A.K. Kleinschmidt, R.K. Zahn, Biochim. Biophys. Acta, 88, 142, 1964.

9. Natuurgetrouwe nabootsing van het geluid van een orgel met behulp van eenvoudige mechanische en elektronische middelen is om fysische redenen onmogelijk.

Aan mijn ouders

Aan mijn vrouw

INHOUDSOPGAVE

	Pag.
LIJST VAN AFKORTINGEN, SYMBOLEN EN EENHEDEN	6
HOOFDSTUK 1. INLEIDING	7
1.1. Doel van het onderzoek	7
1.2. Methoden voor de bepaling van het molecuulgewicht van DNA	7
1.3. De keuze van het te onderzoeken DNA	10
1.4. Het molecuulgewicht van T4-DNA	10
1.5. De indeling van dit proefschrift	12
HOOFDSTUK 2. DEFINITIES EN FORMULES	14
2.1. De sedimentatiecoëfficiënt	14
2.1.1. Definitie	14
2.1.2. Berekening	16
2.2. Het grensviscositeitsgetal	16
2.2.1. Definitie	16
2.2.2. Berekening	17
2.3. De snelheidsgradiënt in een cilindrische buis ten gevolge van schuifspanningen	18
2.4. Relaties tussen s_0 , $[\eta]$ en M	19
HOOFDSTUK 3. GEGEVENS OVER DE GEBRUIKTE DNA PREPARATEN	24
3.1. De bereiding van DNA uit bacteriofaag T4	24
3.2. De bereiding van DNA uit H.influenzae en uit kalf thymus	25
3.3. De bepaling van de DNA concentratie	26
3.4. Het breken van DNA moleculen door middel van schuifspanningen	27

	Pag.
HOOFDSTUK 4. DE GEBRUIKTE APPARATEN EN DE ONTWIKKELING VAN NOODZAKELIJKE MODIFICATIES	29
4.1. De Spinco ultracentrifuge	29
4.2. De Phywé ultracentrifuge	30
4.2.1. Meting van het toerental van de rotor	30
4.2.2. Meting van de rotortemperatuur	31
4.2.3. IJking van de temperatuuraanwijzing	32
4.2.4. Foto-elektrische registratie van de extinctie in de ultracentrifugecel	35
4.3. De viscosimeter	45
4.4. De spectrofotometer	47
HOOFDSTUK 5. BEPALING VAN HET GRENSVISCOSITEITSGETAL VAN T4-DNA	48
HOOFDSTUK 6. BEPALING VAN DE SEDIMENTATIECOEFFICIENT VAN T4-DNA	54
6.1. Sedimentatie-anomalieën bij hoge toerentallen	54
6.2. Sedimentatie-experimenten bij 15.000 rpm	66
6.3. De invloed van het toerental van de rotor op $s_{20,w}$	73
HOOFDSTUK 7. DE INVLOED VAN SCHUIFSPANNINGEN OP DE WAARDE VAN s_0 EN $[\eta]$	77
HOOFDSTUK 8. BEREKENING VAN HET MOLECULGEWICHT VAN DNA UIT s_0 EN $[\eta]$	79
SAMENVATTING	83
SUMMARY	85
LITERATUURLIJST	88

AFKORTINGEN, SYMBOLEN EN EENHEDEN

DNA	= desoxyribonucleïnezuur
c	= concentratie ($\mu\text{g/ml}$)
D	= diffusiecoëfficiënt (cm^2/sec)
E	= extinctie
M	= molecuulgewicht
M_w	= gewichtsgemiddeld molecuulgewicht
p	= druk (dyne/cm^2)
Q	= vloeistofvolume (cm^3)
q	= snelheidsgradiënt (sec^{-1})
R	= universele gasconstante = $8,313 \times 10^7 \text{ erg/}^\circ\text{K}$
rpm	= omwentelingen per minuut
s	= sedimentatiecoëfficiënt (Svedberg-eenheden)
$s_{20,w}$	= sedimentatiecoëfficiënt bij 20°C in water
s_o	= $s_{20,w}$ bij oneindige verdunning
S	= Svedberg-eenheid = 10^{-13} sec
T	= temperatuur ($^\circ\text{K}$)
t	= tijd (in sec)
t(als index)	= temperatuur ($^\circ\text{C}$)
V	= partieel specifiek volume (cm^3/g)
V_{20}, V_t	= partieel specifiek volume bij 20 respectievelijk $t^\circ\text{C}$
x	= afstand tot rotatiecentrum in de ultracentrifuge (cm)
η	= (dynamische) viscositeit (poise)
η_o	= viscositeit van het oplosmiddel
η_{rel}	= η/η_o = relatieve viscositeit
η_{sp}	= $\eta_{rel} - 1$ = specifieke viscositeit
$[\eta]$	= grensviscositeitsgetal = intrinsieke viscositeit (dl/g)
η_t^o, η_{20}^o	= viscositeit van water bij t respectievelijk 20°C
η_t	= viscositeit van het oplosmiddel bij $t^\circ\text{C}$
ρ	= soortelijke massa (g/cm^3)
ρ_t, ρ_{20}	= soortelijke massa bij t respectievelijk 20°C
ρ_{20}^o	= soortelijke massa van water bij 20°C
τ	= schuifspanning (dyne/cm^2)
ω	= hoeksnelheid van de ultracentrifuge (radialen per sec)

HOOFDSTUK I

INLEIDING

1.1. *Doel van het onderzoek.*

Voor desoxyribonucleïnezuur (DNA), dat reeds bijna een eeuw geleden voor het eerst in biologisch materiaal werd gevonden, bestaat vooral de laatste jaren een zeer grote belangstelling. De belangrijkste reden hiervoor is de ontdekking dat het DNA de drager is van de erfelijke eigenschappen in de cel. De kennis omtrent de wijze waarop deze eigenschappen in de cel tot uitdrukking worden gebracht is echter nog zeer onvolledig. Die kennis is niet alleen van theoretisch belang, doch is ook noodzakelijk voor een goed begrip van de werking van fysische en chemische agentia zoals straling, mutagene en carcinogene stoffen en dus ook voor het bestuderen van de mogelijkheden om eventuele schadelijke invloeden te voorkomen of teniet te doen.

In het kader van deze problematiek bestond in het Medisch Biologisch Laboratorium der RVO-TNO belangstelling voor het vaststellen van relaties tussen fysisch chemische en biologische eigenschappen van DNA. Uiteraard is hierbij het molecuulgewicht een zeer belangrijke grootte. Dit geldt niet slechts voor het molecuulgewicht van intacte moleculen, maar ook voor dat van hieruit bereide fragmenten, die met bepaalde biologische functies kunnen worden geassocieerd. De basis voor een dergelijk onderzoek is de laatste jaren gelegd doordat een aantal methoden bekend is geworden om de biologische activiteit van gezuiverd DNA c.q. fragmenten hiervan aan te tonen.

1.2. *Methoden voor de bepaling van het molecuulgewicht van DNA.*

Voor de bepaling van het molecuulgewicht M van een verbin-

ding zijn vele methoden beschreven, waarvan een aantal echter niet toegepast kan worden op DNA. De redenen hiervoor zijn de volgende:

- a) Het is nodig molecuulgewichten van ongeveer 1 tot 150 miljoen in het onderzoek te betrekken.
- b) DNA is een polyelektrolyt zodat de metingen onder andere bij een bepaalde ionensterkte en pH en bij kleine concentraties uitgevoerd moeten worden.
- c) Een DNA molecuul in oplossing is niet zonder meer te beschrijven met een model dat zich leent voor een theoretische behandeling, zoals een staaf, bol of statistisch kluwen.

De DNA moleculen met een molecuulgewicht tussen 1 en 150 miljoen, waarop de meeste (ook de in dit proefschrift beschreven) onderzoeken betrekking hebben, zijn enerzijds niet star genoeg om een staafmodel als uitgangspunt voor een theoretische beschouwing te kunnen gebruiken en anderzijds te weinig flexibel om een beschrijving als statistisch kluwen zonder meer mogelijk te maken. Dit hangt samen met de structuur die meestal wordt aangetroffen, namelijk een dubbele spiraal (Watson en Crick, 1953) waarin tussen beide ketens waterstofbruggen aanwezig zijn. Daardoor is het DNA molecuul een kluwen met begrensde flexibiliteit, waardoor het oplosmiddel min of meer vrij kan passeren.

Meting van osmotische druk, vriespuntsverlaging en dergelijke is voor DNA oplossingen onmogelijk omdat bij concentraties die zo laag zijn dat de deeltjes elkaar niet kunnen beïnvloeden, het aantal deeltjes per volume-eenheid te klein wordt om nog een effect waar te kunnen nemen.

Strooilichtmetingen zijn slechts bruikbaar voor molecuulgewichten die 10×10^6 , wellicht zelfs 3×10^6 , niet te boven gaan (Doty, 1957; Sadron en Pouyet, 1958; Fleischman, 1960; Froelich, Strazielle, Bernardi, Benoit, 1963; Eigner en Doty, 1965).

Berekening van het molecuulgewicht uit de waarde van sedimentatie- en diffusiecoëfficiënten is in principe ook mogelijk met behulp van de Svedberg vergelijking (Svedberg en Pedersen, 1940). Sedimentatie- en diffusie-experimenten zijn door enkele auteurs met DNA uitgevoerd (Tennent en Vilbrandt, 1943; Iso en Watanabe, 1957; Goodgal en Herriott, 1961). De grootte van de diffusiecoëfficiënt bleek van de orde van $0,1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ te zijn voor DNA preparaten met een molecuulgewicht beneden ongeveer

5×10^6 . Voor grote molecuulgewichten zal de diffusiecoëfficiënt van de orde van $0,01 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ zijn. De bepaling van zulke kleine diffusiecoëfficiënten stelt, door de langdurige metingen die hiervoor nodig zijn, zeer hoge eisen aan de kwaliteit van de meetopstelling omdat de vrije diffusie gemakkelijk verstoord kan worden door uitwendige invloeden zoals mechanische trillingen en temperatuurfuctuaties. Hieruit volgt dat voor molecuulgewichten groter dan 10×10^6 ook deze methode minder bruikbaar is.

Als DNA gecentrifugeerd wordt in een geconcentreerde CsCl-oplossing, waarvan de soortelijke massa ongeveer gelijk is aan die van het DNA, dan blijkt dat zich na verloop van tijd een dichtheidsgradiënt instelt van het CsCl in de oplossing in de ultracentrifugecel. De DNA moleculen worden verzameld in een band op de plaats waar de soortelijke massa van de CsCl-oplossing gelijk is aan die van het DNA. Het is mogelijk uit de verdeling van het DNA in de band een molecuulgewicht te berekenen (Sueoka, 1959). De resultaten die hiermee door Thomas en Pinkerton (1962) werden bereikt, zijn zodanig dat deze methode in dit stadium niet als aanvaardbaar gekarakteriseerd kan worden.

Met behulp van autoradiografische en elektronenmicroscopische methoden is het mogelijk gebleken molecuulgewichten van grote moleculen met aanvaardbare nauwkeurigheid vast te stellen. Hierbij vindt de bepaling van het molecuulgewicht echter onder zodanige omstandigheden plaats dat de werkwijze, hoewel zeer geschikt voor de ijking van andere methoden, niet geschikt is voor routine-bepalingen. Bovendien is in het algemeen voor biologische toepassingen het gedrag van de moleculen in oplossing van belang, waarbij zuurgraad en ionensterkte ook hun invloed doen gelden.

Aan deze eisen wordt nu wel voldaan door hydrodynamische methoden, waarvan de bepaling van de sedimentatiecoëfficiënt s en het grensviscositeitsgetal $[\eta]$ het meest voor de hand ligt. Een theoretische beschrijving, waarmee het molecuulgewicht van DNA uit sedimentatie- en viscositeitsgegevens kan worden berekend, is echter nog niet bekend. Voor het verband tussen deze grootheden moeten daarom empirische of semi-empirische relaties worden gebruikt. Bovendien is gebleken dat speciale maatregelen genomen moeten worden om voor DNA bruikbare resultaten te verkrijgen. Deze maatregelen bestaan in het aanbrengen van bepaalde modificaties in conventionele apparaten om ze geschikt te maken voor het gestelde doel.

1.3. *De keuze van het te onderzoeken DNA.*

Als voorwerp van onderzoek werd gekozen het DNA van bacteriofaag T4, die als gastheer heeft *Escherichia coli* stam B.

De argumenten die tot deze keuze hebben geleid waren de volgende:

- a) Het molecuulgewicht van T4-DNA is bepaald met chemische, autoradiografische en elektronenmicroscopische methoden en bedraagt $(130 \pm 30) \times 10^6$ (zie 1.4.).
- b) Het is mogelijk de biologische activiteit van geïsoleerd, gezuiverd en intact T4-DNA en van fragmenten hiervan aan te tonen (Veldhuisen, Jansz, Aten, Pouwels, Oosterbaan, Cohen, 1962).
- c) Bacteriofaag T4 kan in voldoende grote hoeveelheden geproduceerd worden.
- d) De isolatiemethode van het DNA is eenvoudig en geeft, zoals in de volgende hoofdstukken zal blijken, goed reproduceerbare preparaten.
- e) Indien de nodige voorzorgen genomen worden, blijkt het mogelijk van T4-DNA zeer homogene preparaten in handen te krijgen.

Enkele belangrijke eigenschappen van T4-DNA zijn:

Het DNA is tweestrengig, bevat hydroxymethylcytosine in plaats van cytosine en de hydroxymethylcytosine groepen zijn geglycosylerd. Deze afwijking in de chemische samenstelling leidt tot een toename van het molecuulgewicht van DNA, doch het is gebleken dat de hiermee gepaard gaande toename van de sedimentatiecoëfficiënt niet significant verschilt van wat men op grond van de toename van het molecuulgewicht mag verwachten (Davison en Freifelder, 1964).

1.4. *Het molecuulgewicht van T4-DNA.*

Tot voor enkele jaren werd verondersteld dat het molecuulgewicht van de meeste geïsoleerde DNA preparaten ongeveer 6 à 8 miljoen bedroeg. De heterogeniteit van preparaten en het vinden van "abnormaal hoge" molecuulgewichten werd door Butler, Phillips en Shooter (1957) toegeschreven aan de aanwezigheid van eiwitbruggen tussen de moleculen. De door deze auteurs aanbevolen chymotrypsine behandeling had bij andere onderzoekers wel (Hermans, 1958) of geen (Van de Ven, 1959; Davison, 1960; Aten, Altona, Weterings, 1961) effect.

Door Davison (1959, 1960) werd de aandacht gevestigd op de mogelijke breuk van DNA moleculen onder invloed van hydrodynamische schuifspanningen waardoor DNA moleculen zelfs bij eenvoudige chemische bewerkingen als pipetteren gebroken kunnen worden. De veronderstelling ligt thans voor de hand dat de in vroegere onderzoeken gebruikte DNA preparaten, door het optreden van zulke schuifspanningen, tijdens de isolatie in belangrijke mate waren gebroken.

Door toepassing van een methode waarbij het optreden van schuifspanningen zoveel mogelijk werd vermeden (Mandell en Hershey, 1960) bleek het mogelijk veel grotere moleculen te isoleren.

Voor enkele bacteriofagen (T4, T7, λ) kon worden aangetoond, dat hierin slechts één DNA molecuul per partikel voorkwam.

Op grond van chemische bepalingen van de hoeveelheid DNA per partikel volgt uit de gegevens vermeld in een overzichts-artikel van Sinsheimer (1960) voor T4-DNA een molecuulgewicht van 120 à 150 miljoen. De nauwkeurigheid van deze bepalingen wordt begrensd door het feit dat de fractie partikels, die niet meer in staat is een bacterie te infecteren doch wel bijdraagt tot de totale hoeveelheid DNA, moeilijk te meten is. De berekende waarden kunnen hierdoor iets te hoog zijn.

Cummings en Kozloff (1960) bepaalden het drooggewicht van een (langs elektronenmicroscopische weg gemeten) aantal bacteriofagen en concludeerden tot een partikelgewicht van 215×10^6 voor de T4 faag. Aangezien deze bacteriofaag 53% DNA bevat, volgt hieruit voor het molecuulgewicht van T4-DNA 114×10^6 .

Andere onderzoekers hebben bacteriofagen gemerkt met radioactieve nucliden. Het DNA werd geïsoleerd en enige tijd in contact gebracht met een fotografische emulsie. Uit het aantal door β -deeltjes in de emulsie veroorzaakte sporen (^{32}P) of korrels (^3H) en de verhouding van de aantallen radioactieve en niet-radioactieve atomen kan met deze zogenaamde autoradiografische methode een waarde voor het molecuulgewicht worden berekend. Rubenstein, Thomas en Hershey (1961) vonden op deze manier voor T2-DNA, gemerkt met ^{32}P , een molecuulgewicht van 130 à 160 miljoen. Cairns (1961) bepaalde autoradiografisch de lengte van T2-DNA moleculen, die gemerkt waren met ^3H en concludeerde tot een molecuulgewicht van 110×10^6 .

Kleinschmidt, Lang, Jacherts en Zahn (1962) berekenden uit de langs elektronenmicroscopische weg gemeten lengte van T2-DNA moleculen een molecuulgewicht van 100×10^6 .

Cummings (1963) leidde het molecuulgewicht van DNA af uit metingen aan de intacte faag in een dichtheidsgradiënt en vond $(113 \pm 11) \times 10^6$ voor T2-DNA.

Hoewel het molecuulgewicht van T2- of T4-DNA nog niet exact bekend is, mag een waarde van $(130 \pm 30) \times 10^6$ als een zeer goede benadering worden beschouwd.

Op basis van dit gegeven kan men dus de bruikbaarheid van theoretische of empirische relaties tussen het molecuulgewicht en andere grootheden toetsen voor grote molecuulgewichten. Bovendien kunnen grote moleculen, gebruik makend van de door Davison (1959) beschreven eigenschap, gedegrademd worden tot DNA preparaten met kleinere molecuulgewichten, waarmee een verdere mogelijkheid tot het toetsen van de betreffende relaties wordt gegeven.

1.5. *De indeling van dit proefschrift.*

In het bovenstaande is uiteengezet dat voor routinebepalingen van het molecuulgewicht van T4-DNA preparaten hydrodynamische methoden de voorkeur verdienen. Met name komen metingen van sedimentatiesnelheid en viscositeit in aanmerking.

In hoofdstuk 2 worden deze en hiermee gecorreleerde grootheden gedefinieerd en wordt aangegeven op welke wijze de sedimentatiecoëfficiënt bij oneindige verdunning s_0 en het grensviscositeitsgetal $[\eta]$ worden berekend. Enkele formules betreffende de snelheidsgradiënt ten gevolge van schuifspanningen in een cilindrische buis en een aantal empirische relaties tussen s_0 , $[\eta]$ en M worden ook in dit hoofdstuk vermeld.

In hoofdstuk 3 wordt de isolatie van DNA preparaten beschreven, evenals de concentratiebepaling en de wijze waarop de DNA moleculen werden gebroken teneinde kleinere moleculen te verkrijgen.

Hoofdstuk 4 bevat, naast een korte beschrijving van de commercieel verkrijgbare apparaten, een bespreking van de modificaties die ten behoeve van het onderzoek moesten worden aangebracht.

De resultaten van viscositeitsmetingen met T4-DNA worden in hoofdstuk 5 besproken, waarna hoofdstuk 6 gewijd is aan sedimentatie-experimenten en hierbij onder bepaalde omstandigheden optredende anomalieën.

In hoofdstuk 7 wordt de invloed van de snelheidsgradiënt op de parameters s_0 en $[\eta]$ besproken.

Tenslotte worden in hoofdstuk 8 aan de hand van de in dit proefschrift beschreven onderzoeken voorwaarden genoemd waaraan voldaan moet worden om op basis van de waarde van s_0 en/of $[\eta]$ tot een molecuulgewicht te komen (ook voor preparaten met een groot molecuulgewicht) waarvan de nauwkeurigheid aanvaardbaar is.

HOOFDSTUK 2

DEFINITIES EN FORMULES

2.1. *De sedimentatiecoëfficiënt.*

2.1.1. *Definitie.*

De sedimentatiecoëfficiënt s is gedefinieerd als de sedimentatiesnelheid van een molecuul in oplossing per eenheid van centrifugale versnelling:

$$s = \frac{dx/dt}{\omega^2 x} \quad (2.1.1.1.)$$

Hierin is x de afstand van de grenslaag tot het rotatiecentrum (in cm) op het tijdstip t (in sec) en ω de hoeksnelheid in radialen/sec = $2\pi n/60$, als n het aantal omwentelingen per minuut (rpm) voorstelt.

Integratie van (2.1.1.1.) geeft:

$$s = \frac{\ln (x_2/x_1)}{\omega^2 (t_2 - t_1)} \quad (2.1.1.2.)$$

Hierin stellen x_1 en x_2 de afstanden voor van de grenslaag tot het rotatiecentrum op de tijdstippen t_1 en t_2 . De sedimentatiecoëfficiënt wordt dus bepaald uit de snelheid waarmee de grenslaag zich verplaatst.

De waarde van s is afhankelijk van de aard, grootte, vorm en concentratie van de opgeloste moleculen en van de samenstelling en temperatuur van het oplosmiddel. De samenstelling van het oplosmiddel beïnvloedt de sedimentatiesnelheid niet slechts via de viscositeit van het milieu doch kan ook van invloed zijn (door

pH en ionensterkte) op de vorm en afmetingen van de opgeloste moleculen. Het is gebruikelijk de experimentele resultaten te corrigeren voor viscositeits- en dichtheidsverschillen met behulp van de volgende formule:

$$s_{20,w} = s \cdot \frac{\eta_t^0}{\eta_{20}^0} \cdot \frac{\eta_t}{\eta_t^0} \cdot \frac{1 - V_{20} \rho_{20}^0}{1 - V_t \rho_t} \quad (2.1.1.3.)$$

waarin

$s_{20,w}$ = de waarde van de sedimentatiecoëfficiënt betrokken op water van 20 °C.

$\eta_t^0, \eta_{20}^0, \rho_{20}^0$ = de viscositeit en soortelijke massa van water bij t en 20 °C.

η_t, ρ_t = de viscositeit en soortelijke massa van het oplosmiddel bij t °C.

V_{20}, V_t = het partieel specifiek volume van de opgeloste stof bij 20 respectievelijk t °C.

Waarden voor η_t^0/η_{20}^0 en η_t/η_t^0 zijn in tabellen te vinden. Voor de waarde van het partieel specifiek volume is, in navolging van vele anderen, aangenomen: $V_t = V_{20} = 0,55$ (Tennent en Vilbrandt, 1943).

De invloed van de concentratie van de opgeloste stof op de waarde van de sedimentatiecoëfficiënt wordt geëlimineerd door experimenten bij verscheidene concentraties uit te voeren. Door extrapolatie naar $c=0$ wordt de waarde van de sedimentatiecoëfficiënt bij oneindige verdunning, de zogenaamde intrinsieke sedimentatiecoëfficiënt s_0 (ook wel genoteerd als $[s]^0$ of $s_{20,w}^0$) gevonden.

s_0 is bij gegeven samenstelling van het oplosmiddel (in verband met de invloed hiervan op vorm en afmetingen van de moleculen) karakteristiek voor de moleculen van de opgeloste stof.

De eenheid van sedimentatiecoëfficiënt is de Svedberg,

$$1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ sec}$$

Voor een uitvoerige verhandeling over de sedimentatiecoëfficiënt zij verwezen naar desbetreffende handboeken (Svedberg en Pedersen, 1940; Schachman, 1959).

2.1.2. Berekening.

Van alle "opnamen" die tijdens een proef zijn gemaakt, wordt de x waarde, behorend bij het 50% punt van de concentratie in de grenslaag bepaald.

Noemen we t het tijdsverschil (uitgedrukt in seconden) tussen het moment van de eerste opname en het tijdstip waarop een latere opname is gemaakt, dan is $s \omega^2$ gelijk aan de helling van de lijn die men krijgt door $\ln x$ uit te zetten tegen de bijbehorende waarde van t .

Met behulp van de onder 2.1.1. genoemde correctieformule en de tabellen uit het boek van Svedberg en Pedersen (1940) wordt $s_{20,w}$ berekend. Experimenten, uitgevoerd bij verschillende DNA concentraties, geven de sedimentatiecoëfficiënt als functie van de concentratie.

De ervaring heeft geleerd dat een geringe verontreiniging met niet-sedimenterend, wel ultraviolet licht absorberend materiaal veelal niet te verhinderen is. De meting van de extinctie met het optische systeem van de ultracentrifuge is weliswaar minder nauwkeurig dan een spectrofotometrische bepaling, doch heeft het voordeel dat voor de aanwezigheid van verontreinigingen gecorrigeerd kan worden. De DNA concentraties zijn als regel dan ook afgeleid uit de extinctie, gemeten tijdens sedimentatie-experimenten.

2.2. Het grensviscositeitsgetal.

2.2.1. Definitie.

De dynamische viscositeit η is de evenredigheidsfactor uit de door Newton gegeven relatie

$$\tau = \eta q$$

Hierin is τ de schuifspanning en q de snelheidsgradiënt.

Voor oplossingen van vele macromoleculen (onder andere DNA) is τ niet evenredig met q . η is dan een functie van τ en blijkt toe te nemen als τ afneemt. Men spreekt in zulke gevallen van niet-Newtonse vloeistoffen. Bij lage concentraties van de opge-

loste stof wordt dit verschijnsel toegeschreven aan het gedrag van de afzonderlijke moleculen in de oplossing (structuurviscositeit), terwijl het effect bij hogere concentraties wordt versterkt door intermoleculaire wisselwerking.

Noemen we de viscositeit van de oplossing η en die van het oplosmiddel η_0 dan is $\eta_{rel} = \eta/\eta_0$. De specifieke viscositeit is gedefinieerd als $\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$.

Het grensviscositeitsgetal of de intrinsieke viscositeit $[\eta]$ is gedefinieerd als

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \lim_{\tau \rightarrow 0} \eta_{sp}/c$$

De bepaling van $[\eta]$ impliceert dus een tweetal extrapolaties:

- a) extrapolatie van η_{sp} naar $\tau = 0$. Voor de gebruikelijke viscosimeters is τ echter te groot om een nauwkeurige bepaling van η_{sp} bij $\tau = 0$ mogelijk te maken.
- b) extrapolatie van η_{sp}/c naar $c = 0$. Bij lage concentraties nadert η_{sp} naar 0, zodat zelfs kleine absolute fouten in η_{rel} (dit is de grootheid die gemeten wordt) grote relatieve fouten in η_{sp} tot gevolg kunnen hebben.

2.2.2. Berekening.

Bij gebruik van de in 4.3. beschreven viscosimeter (een Ubbelohde viscosimeter, waarvan de bolletjes vervangen zijn door een cilindrische meetbuis met een millimeterverdeling) kan de viscositeit van een Newtonse vloeistof worden weergegeven door

$$\eta = C \frac{dt}{d \log h}$$

waarin C afhankelijk is van de afmetingen van de viscosimeter en de soortelijke massa van de vloeistof. In de praktijk worden de verschillen gemeten tussen de tijdstippen waarop de meniscus vaste punten op de meetbuis passeert (zie ook hoofdstuk 5). De relatieve viscositeit van een verdunde oplossing kan dan berekend worden uit

$$\eta/\eta_0 = (\Delta t / \Delta \log h) / (\Delta t / \Delta \log h)_0$$

(De index $\circ$ geeft aan dat een grootheid betrekking heeft op het oplosmiddel).

Door Hermans (1958) is aangetoond dat deze formule bij benadering ook gebruikt kan worden voor de berekening van $\eta/\eta_{\circ}$ van DNA oplossingen. De fout is kleiner dan 1% mits Δt kleiner is dan 500 sec. Door de vaste punten op de meetbuis goed te kiezen kan aan deze eis worden voldaan.

Na ieder experiment wordt de plaats van de evenwichtsstand $h_{\circ}$ van de meniscus in de meetbuis bepaald. Indien de viscosimeter goed schoon en de oplossing stofvrij is, is de waarde van $h_{\circ}$ constant. Lage DNA concentraties hebben een verwaarloosbare invloed op $h_{\circ}$. Om de extrapolatie van η_{sp} naar $\tau = 0$ (zie 2.2.1.) mogelijk te maken wordt η_{sp} uitgezet tegen h . De waarde van η_{sp} , ge-extrapolleerd naar $h = 0$, wordt daarna uitgezet tegen c . Uit de helling van de aldus verkregen lijn (die door de oorsprong van het coördinatensysteem moet gaan) volgt dan de waarde van het grensviscositeitsgetal $[\eta]$. De waarde van c speelt hierbij een belangrijke rol. Daar met de meeste oplossingen waaraan viscositeitsmetingen gedaan zijn, ook sedimentatie-experimenten zijn verricht, is (zie 4.2.4.) de concentratie gebaseerd op de waarnemingen tijdens sedimentatie. Dit impliceert uiteraard de veronderstelling dat eventuele verontreinigingen van de oplossingen een verwaarloosbare invloed op $[\eta]$ uitoefenen. De tijden Δt die in enkele gevallen met in dezelfde mate verontreinigde buffer-oplossingen gevonden zijn, rechtvaardigen deze veronderstelling.

2.3. *De snelheidsgradiënt in een cilindrische buis ten gevolge van schuifspanningen.*

In een laminaire vloeistofstroming door een buis (straal R en lengte L) is de snelheidsgradiënt in een Newtonse vloeistof evenredig met de afstand tot het midden van de buis.

Noemen we r de straal van een cylinder die coaxiaal is met de buis en Δp de drukval over de buis, dan vinden we door de drijvende kracht gelijk te stellen aan de wrijvingskracht

$$\pi r^2 \Delta p = \eta \frac{dv}{dr} 2 \pi r L \quad (2.3.1.)$$

$$\text{Nu is} \quad \tau = \eta \frac{dv}{dr} \quad (2.3.2.)$$

$$\text{dus} \quad \tau = (\Delta p/L) \cdot (r/2) \quad (2.3.3.)$$

De gemiddelde schuifspanning in de buis is derhalve gelijk aan

$$\bar{\tau} = \frac{\int_0^R (\Delta p/L) \cdot (r/2) \cdot 2 \pi r dr}{\pi R^2} = \Delta p \cdot R/3L \quad (2.3.4.)$$

$$\text{terwijl } \tau_{\max} \text{ (aan de wand van de buis)} = \Delta p \cdot R/2L. \quad (2.3.5.)$$

Volgens Poiseuille is

$$\Delta p = \frac{8 \eta L}{\pi R^4} \frac{dQ}{dt} \quad (2.3.6.)$$

waarin dQ het vloeistofvolume is dat in de tijd dt door de buis stroomt. Substitutie van (2.3.6.) in (2.3.4.) geeft

$$\bar{\tau} = \frac{8 \eta}{3 \pi R^3} \frac{dQ}{dt} \quad (2.3.7.)$$

De gemiddelde waarde van $\frac{dv}{dr} = q$ noemen we $\bar{q}$.

Dus

$$\bar{q} = (8/3 \pi R^3) \cdot (dQ/dt) \quad (2.3.8.)$$

Dit is de formule van Kroepelin (1929).

Zowel de vergelijking van Poiseuille als de formule van Kroepelin zijn theoretisch slechts geldig voor Newtonse vloeistoffen. Wij zullen de formule van Kroepelin echter in sommige gevallen gebruiken om bij benadering de grootte van een snelheidsgradiënt te bepalen.

2.4. Relaties tussen s_o , $[\eta]$ en M^* .

Door Mandelkern en Flory (1952) is theoretisch het volgen-

* De notaties s , s_o , M en M_v zijn overgenomen van de genoemde auteurs en worden daarom in deze paragraaf door elkaar gebruikt.

de verband afgeleid tussen de sedimentatiecoëfficiënt bij oneindige verdunning s_o , het grensviscositeitsgetal $[\eta]$ en het molecuulgewicht M :

$$M = \left[\frac{s_o [\eta]^{1/3} \eta_o N 10^{-13}}{\beta (1 - V\rho)} \right]^{3/2} \quad (2.4.1.)$$

Hierin is η_o de viscositeit van het oplosmiddel, N het getal van Avogadro, ρ de soortelijke massa van het oplosmiddel en V het partieel specifiek volume van de opgeloste stof. De waarde van de coëfficiënt β is afhankelijk van de vorm van het molecuul in oplossing. De waarde van β is berekend voor deeltjes die de vorm van een langgerekte omwentelingsellipsoïde hebben en blijkt te variëren van $2,12 \times 10^6$ voor een assenverhouding 1 (dus een bol) tot $3,60 \times 10^6$ voor een assenverhouding 300 (Scheraga en Mandelkern, 1953).

Mandelkern, Krigbaum, Scheraga en Flory (1952) vonden voor enkele synthetische polymeren in organische oplosmiddelen, die zich onder deze omstandigheden gedragen als een statistisch kluwen, experimenteel de waarde $\beta = (2,5 \pm 0,1) \times 10^6$.

Zoals reeds in 1.2. werd vermeld is nog niet met zekerheid vastgesteld of één van de bekende modellen (bol, staaf, statistisch kluwen) geschikt is voor de beschrijving van het gedrag van dubbelstrengig DNA in oplossing. Eigner (1960) beschouwde daarom voor DNA moleculen β als een niet constante factor. Hij berekende de waarde van β voor preparaten waarvan de waarden van s_o , $[\eta]$ en M_w (het gewichtsgemiddelde molecuulgewicht, bepaald uit strooilightmetingen) bekend waren. Hieruit volgde een verband tussen β en M_w (namelijk $\beta = 0,830 \times 10^6 M_w^{0,0851}$) die, gecombineerd met vergelijking (2.4.1.) bij substitutie van $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$ en $V = 0,55 \text{ cm}^3/\text{g}$, de volgende relatie gaf:

$$M_w = 1,86 \times 10^4 (s_o [\eta]^{1/3})^{1,33} \quad (2.4.2a.)$$

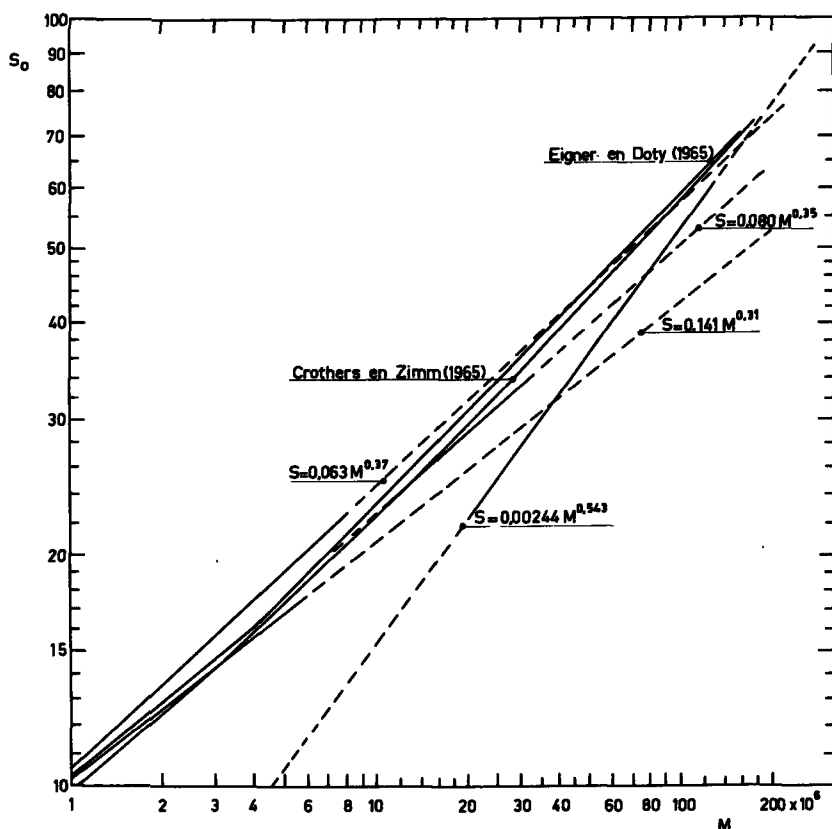
$$\text{of } \log M_w = 4,269 + 1,33 \log (s_o [\eta]^{1/3}) \quad (2.4.2b.)$$

De bepaling van M_w werd uitgevoerd met preparaten waarvan het molecuulgewicht kleiner was dan ongeveer 15×10^6 .

Naast deze semi-empirische relatie zijn door anderen zui-

ver empirische relaties opgesteld, waardoor s_0 of $[\eta]$ als functie van M wordt weergegeven. De gepubliceerde relaties zijn in twee groepen in te delen:

De eerste groep (2.4.3. - 2.4.6.) is gebaseerd op experimenten met inhomogene preparaten, meestal geïsoleerd uit kalf thymus of (haring) sperma, dat gemakkelijk in voldoende hoeveelheden verkrijgbaar is. De relaties uit de tweede groep (2.4.7. - 2.4.12.) werden opgesteld aan de hand van proeven met homogeen DNA met een groot molecuulgewicht, geïsoleerd uit bacteriofagen onder vermindering van schuifspanningen. Enkele relaties tussen s_0 en M zijn grafisch weergegeven in figuur 1. De lijnen zijn gestippeld buiten het traject van molecuulgewichten, waarvoor de relaties



Figuur 1

Grafische voorstelling van enkele empirische relaties tussen s_0 en M .

werden opgesteld. Uit deze figuur blijkt hoe groot de onzekerheid is van de molecuulgewichten, die uit de verschillende relaties volgen. Bij $s_0 = 40$ bijvoorbeeld kan M nog variëren van ongeveer 40×10^6 tot ongeveer 80×10^6 .

Doty, McGill en Rice (1958) gebruikten kalf thymus DNA en DNA dat gebroken was door ultrasonore behandeling en vonden, gebruik makend van strooilichtmetingen,

$$s_0 = 0,063 M_w^{0,37} \quad (2.4.3.)$$

$$\text{en } [\eta] = 1,45 \times 10^{-6} M_w^{1,12} \quad (2.4.4.)$$

voor preparaten met molecuulgewichten tussen $0,3 \times 10^6$ en 8×10^6 .

Cavalieri en Rosenberg (1959) degradeerden DNA preparaten door verstuiwing en vonden voor het traject van molecuulgewichten van 1×10^6 tot 6×10^6 de relatie

$$s = 0,141 M_w^{0,31} \quad (2.4.5.)$$

Lett en Stacey (1960) vonden voor molecuulgewichten tussen ongeveer 1 en 10 miljoen:

$$[\eta] = 1,1 \times 10^{-5} M_w \quad (2.4.6.)$$

Rubenstein, Thomas en Hershey (1961) bepaalden langs autoradiografische weg het molecuulgewicht van T2-DNA. Door roeren werden de moleculen gebroken, waarna chromatografische fractionering plaatsvond, zodat vrijwel monodisperse preparaten werden geïsoleerd, waarvan eveneens autoradiografisch het molecuulgewicht werd bepaald. Combinatie met sedimentatie-experimenten gaf de relatie

$$s = 0,00244 M_w^{0,543} \quad (2.4.7.)$$

voor $20 \times 10^6 < M < 130 \times 10^6$. Deze auteurs namen, in navolging van Thomas en Pinkerton (1962) aan, dat de sedimentatiecoëfficiënt onafhankelijk is van de DNA concentratie. Dit is, zoals in 6.2. zal worden aangetoond, onjuist.

Voor molecuulgewichten tot ongeveer 30×10^6 vonden Burgi en Hershey (1963) de relatie

$$s_o = 0,080 M^{0,35} \quad (2.4.8.)$$

Door Studier (1965) is onlangs een relatie aangegeven waarvan de coëfficiënt en exponent slechts weinig verschillen van die in (2.4.8.).

Volledigheidshalve worden nog de volgende relaties weergegeven die voor een niet onbelangrijk gedeelte gebaseerd zijn op de resultaten die in dit proefschrift worden vermeld:

Crothers en Zimm (1965) (voor $1 \times 10^6 < M < 130 \times 10^6$):

$$0,665 \log M = 2,863 + \log ([\eta] + 5) \quad (2.4.9.)$$

$$0,445 \log M = 1,819 + \log (s_o - 2,7) \quad (2.4.10.)$$

Eigner en Doty (1965):

$$s_o = 0,116 M^{0,325} \quad 3 \times 10^5 < M < 4 \times 10^6 \quad (2.4.11a.)$$

$$s_o = 0,034 M^{0,405} \quad M > 4 \times 10^6 \quad (2.4.11b.)$$

en

$$[\eta] = 1,05 \times 10^{-7} M^{1,32} \quad M < 2 \times 10^6 \quad (2.4.12a.)$$

$$[\eta] = 6,9 \times 10^{-4} M^{0,70} \quad 2 \times 10^6 < M < 130 \times 10^6 \quad (2.4.12b.)$$

HOOFDSTUK 3

GEGEVENS OVER DE GEBRUIKTE DNA PREPARATEN

3.1. *De bereiding van DNA uit bacteriofaag T4.*

Behalve bij een aantal oriënterende proeven met oplossingen van DNA uit kalf thymus of uit *Haemophilus influenzae* is DNA, geïsoleerd uit de bacteriofaag T4, tot studieobject gekozen. De argumenten die tot deze keuze hebben geleid, zijn reeds vermeld onder 1.3.

Onder 1.4. is opgemerkt dat tijdens de isolatie van DNA schuifspanningen zoveel mogelijk vermeden moeten worden teneinde breuk van DNA moleculen te voorkomen. Daarom is de door Mandell en Hershey (1960) beschreven methode gevolgd:

In een erlenmeyer met ingeslepen stop wordt een T4-suspensie * (concentratie ongeveer 2×10^{12} fagen per ml in een oplossing van 0,1 M NaCl en 0,1 M fosfaat, pH = 7,1) geschud met een gelijk volume fenol, dat met water verzadigd is. Dit schudden wordt zo voorzichtig mogelijk met de hand gedaan. De water- en fenollaag worden door centrifugatie gescheiden. In de fenollaag bevindt zich vrijwel al het faag-eiwit. Deze (onderste) laag wordt met een uitgetrokken pipet verwijderd. Deze onteiwitting wordt tweemaal herhaald met het halve volume fenol. De DNA bevattende waterlaag wordt herhaaldelijk met peroxyde-vrije ether geschud om het fenol te verwijderen. Ether, in de waterlaag opgelost, wordt verwijderd door deze laag enige tijd in een geëvacueerde exsiccator te plaatsen. Alle bewerkingen worden in de koude kamer met koude reagentia en voorgekoeld glaswerk uitgevoerd. De DNA oplossing wordt daarna gedialyseerd tegen het te gebruiken oplosmiddel

* Drs G. Veldhuisen bereidde en zuiverde de bacteriofagen. Hem ben ik veel dank verschuldigd voor de bereidwilligheid waarmee hij steeds de gevraagde hoeveelheden T4-faag beschikbaar stelde.

(zie 3.3.). De dialysehulzen worden van tevoren schoongemaakt door uitkoken in en spoelen met gedestilleerd water. Hierdoor wordt voorkomen dat de preparaten verontreinigd worden met stoffen die licht met een golflengte van 260 m μ absorberen. Om dezelfde reden worden nooit rubberstoppen gebruikt doch worden buizen en dergelijke afgesloten met Parafilm (Marathon, American Can Company, Neenah, Wisconsin) dat dit bezwaar niet of in mindere mate heeft.

De preparaten vermeld in Tabel II als no. 5 en 6, zijn op deze wijze geïsoleerd.

Eén preparaat (Tabel II no. 4) is bereid door aan de faagsuspensie ureum toe te voegen tot de oplossing 6M was, osmotische shock toe te passen door de oplossing snel te verdunnen en het eiwit te verwijderen met de detergens methode (zie 3.2.). Het optreden van schuifspanningen werd zoveel mogelijk vermeden. Hoewel blijkbaar ook op deze wijze preparaten met grote sedimentatiecoëfficiënten en grensviscositeitsgetallen verkregen kunnen worden, verdient de fenol extractie methode de voorkeur omdat deze minder bewerkelijk is.

3.2. *De bereiding van DNA uit H.influenzae en uit kalf thymus.*

Eén DNA preparaat (Tabel II no. 1) werd door Dr Ir A. Rörsch bereid uit H.influenzae volgens de door Marmur (1961) beschreven methode, waarbij voor de onteiwitting gebruik gemaakt wordt van chloroform en isoamyl alcohol. Tijdens deze isolatie werd het optreden van schuifspanningen niet verhinderd, evenmin als tijdens de isolatie van thymus DNA preparaat no. 3 (zie Tabel II), dat bereid werd volgens de door Kay, Simmons en Dounce (1952) vermelde methode.

Preparaat no. 2 uit Tabel II werd zo voorzichtig mogelijk geïsoleerd door Dr C.Altona uit kalf thymus (Aten, Altona, Weterings, 1961), waarbij voor de onteiwitting natriumdodecylsulfaat werd toegepast. Uit de grote s_0 en $[\eta]$ waarden van preparaat no.2 (evenals die van het op analoge wijze geïsoleerde preparaat no. 4, zie 3.1.) volgt, dat het althans ten dele voorkomen van breuk van de moleculen door schuifspanningen bij gebruik van de detergens methode zeer wel mogelijk is.

3.3. De bepaling van de DNA concentratie.

Het oplosmiddel, waarin alle DNA preparaten zijn opgelost, is 0,14 M aan NaCl en 0,02 M aan natriumcitraat. De pH is 7. De oplossing is verzadigd met chloroform om infecties te voorkomen. Sommige desoxyribonucleasen worden geactiveerd door ionen van zware metalen of door Ca^{++} en Mg^{++} ionen. Sporen Ca^{++} en Mg^{++} worden door het citraat gebonden. Zowel tijdens de isolatie van het DNA als bij het verdunnen van DNA oplossingen wordt ieder contact met metalen voorwerpen vermeden. Het is gebleken dat van DNA oplossingen, gedurende enkele maanden bij 4°C bewaard in genoemd oplosmiddel, zowel de sedimentatiecoëfficiënt als de viscositeit binnen de grenzen van de meetnauwkeurigheid constant bleven.

De waarde van $E_{260}^{1\%}$, dit is de extinctie van een 1%-ige DNA oplossing gemeten bij 260 m μ in cuvetten met een lichtweg van 10 mm, bedraagt in het algemeen ongeveer 200. Voor T4-DNA is $E_{260}^{1\%} = 181$ (Rubenstein, Thomas, Hershey, 1961), voor DNA van andere origine is de waarde 202 aangenomen (Aten, Altona, Weterings, 1961).

Concentratie bepalingen werden gebaseerd op spectrofotometrische waarnemingen, gebruik makend van de genoemde waarden van $E_{260}^{1\%}$. Hierbij moet echter rekening worden gehouden met een tweetal effecten.

In de eerste plaats kan een verontreiniging met stoffen die ook licht met een golflengte van 260 m μ absorberen de metingen verstoren. Hiervoor kan gecorrigeerd worden door de metingen te verrichten met het optische systeem van de Phywé ultracentrifuge (zie 2.1.2. en 4.2.4.).

In de tweede plaats is gebleken dat de extinctie van een oplossing direct na verdunning vaak niet overeenstemt met de waarde die op grond van de extinctie van de oorspronkelijke oplossing en de gebruikte verdunningsfactor verwacht werd. Dit verschijnsel moet worden toegeschreven aan aggregaten die nog enige tijd na verdunning blijven bestaan en een grote locale concentratie veroorzaken. Bij verdunning van een oplossing met een concentratie kleiner dan 50 $\mu\text{g/ml}$ is het bij 4°C voldoende de verdunde oplossing 2 à 3 dagen te bewaren om een homogene oplossing te verkrijgen. Voor meer geconcentreerde oplossingen is uiteraard een langere tijd nodig.

Indien met de genoemde effecten rekening wordt gehouden

blijkt dat T4-DNA oplossingen met concentraties kleiner dan 50 $\mu\text{g/ml}$ voldoen aan de wet van Lambert-Beer.

3.4. *Het breken van DNA moleculen door middel van schuifspanningen.*

Onder 1.4. is reeds opgemerkt dat DNA moleculen zeer gevoelig zijn voor hydrodynamische schuifspanningen (Davison, 1959 en 1960). In de literatuur worden verschillende methoden beschreven om door middel van schuifspanningen grote DNA moleculen te breken.

Door een DNA oplossing te roeren (Rosenkranz en Bendich, 1960; Hershey en Burgi, 1960; Burgi en Hershey, 1961; Rubenstein, Thomas en Hershey, 1961; Thomas en Pinkerton, 1962) kunnen DNA moleculen worden verkregen met een molecuulgewicht ongeveer gelijk aan de helft of een vierde deel van het oorspronkelijke molecuulgewicht.

Mandell en Hershey (1960) vermelden dat DNA moleculen worden gebroken door een verdunde oplossing te schudden. Door Cavallieri en Rosenberg (1959) is een glazen verstuurder gebruikt. Davison (1959 en 1960) en anderen (Levinthal en Davison, 1961; Thomas en Pinkerton, 1962) hebben glascapillairen of injectienaalden gebruikt. Een voordeel van deze methode is a priori dat een gemiddelde snelheidsgradiënt berekend kan worden volgens Kroepelin (1929) (zie 2.3.). Hoewel deze gemiddelde waarde slechts geldig is voor Newtonse (ideale) vloeistoffen, kan hieruit toch een min of meer kwantitatief gegeven worden gevonden waardoor verschillende experimentele opstellingen onderling vergeleken kunnen worden. Voor onze experimenten is gebruik gemaakt van injectienaalden (no. 20) en glascapillairen van verschillende diameters en lengten, aangesloten op een injectiespuit van 20 ml. De spuit wordt ingeklemd op een draaibanksupport, dat door middel van een mechanische koppeling met een instelbare doch constante snelheid wordt verplaatst terwijl de zuiger stilstaat. De DNA oplossing, die horizontaal uit naald of capillair wordt gespoten, wordt zo voorzichtig mogelijk afgeremd langs de wand van een maatcilinder of erlenmeyer om oncontroleerbare breuken bij de botsing met een glaswand te voorkomen. Het vloeistofdebiet (Q/t) is niet evenredig met de zuigersnelheid omdat, vooral bij hoge zuigersnelheden, een

deel van de oplossing langs de zuiger lekt. Deze doorgelekte vloeistof wordt niet verder gebruikt. De meeste oplossingen worden twee-of driemaal bij dezelfde zuigersnelheid door naald of capillair geperst, om alle moleculen voldoende kans op een breuk te geven. Voor de berekening van de gemiddelde snelheidsgradiënt is de gemeten waarde van Q/t genomen, zonodig gemiddeld over het aantal passages door naald of capillair.

HOOFDSTUK 4

DE GEBRUIKTE APPARATEN EN DE ONTWIKKELING VAN NOODZAKELIJKE MODIFICATIES

4.1. *De Spinco ultracentrifuge.*

Enkele experimenten zijn uitgevoerd met de Spinco ultracentrifuge Model E, die opgesteld is in het Laboratorium voor Toegepaste Enzymologie en Radiobiologie van de Rijksuniversiteit te Leiden. Deze centrifuge is uitgerust met een temperatuur meet- en regelinstallatie (RTIC) waarin een thermistor, die zich in de voet van de rotor bevindt, is toegepast en met een optisch systeem waarmee de absorptie van ultraviolet licht in de te onderzoeken oplossing gemeten wordt. Voor de fotografische registratie van de intensiteit van het doorgelaten licht wordt gebruik gemaakt van een Kodak film (Kodak B). De films worden na de belichting ontwikkeld (in Kodak D11 ontwikkelaar) en gefixeerd (zuur fixeerbath). Na spoelen en drogen wordt de zwarting gemeten met een Spinco Analytrol, voorzien van een "micro-analyser attachment". De belichtingstijden, waarbij een lineair verband tussen de zwarting van de film en de DNA concentratie in de oplossing wordt verkregen, worden empirisch vastgesteld.

Het gewenste toerental van de rotor wordt bereikt door instelling van een keuzeknop en regeling van het vermogen, opgenomen door de elektromotor die de rotor aandrijft. Bij juiste afstelling is de afwijking van het ingestelde toerental volgens opgave van de fabrikant kleiner dan 300 rpm.

De gebruikte cellen hadden een lichtweg van 12 mm (incidenteel van 30 mm). Het cellichaam is gemaakt van een kunststof (Kel-F). De rotor van de Spinco ultracentrifuge draait in hoog vacuüm.

4.2. *De Phywé ultracentrifuge.*

De meeste experimenten zijn verricht met de Phywé ultracentrifuge die in 1952 is opgesteld in het Medisch Biologisch Laboratorium der RVO-TNO. De rotor, die via een as aangedreven wordt door een luchtturbine, draait in een vacuümkamer waarop een roterende oliepompe is aangesloten. Hiermee wordt een druk bereikt van ongeveer 0,1 mm Hg. Resten lucht worden verwijderd door de vacuümkamer tijdens de experimenten te spoelen met waterstofgas bij een druk van enkele millimeters kwik. De Phywé cellen hebben een lichtweg van ongeveer 12 mm. Het cellichaam bestaat of geheel uit nylon of uit aluminium waarover een laagje nylon is aangebracht.

4.2.1. *Meting van het toerental van de rotor.*

Aan de rotoras is een tachometer bevestigd, bestaande uit een schijfvormige magneet die binnen een viertal spoelen draait. De in deze spoelen opgewekte spanning is na gelijkrichting evenredig met het toerental van de rotor. Een draaispoelmeter, die deze gelijkgerichte spanning meet, geeft een ruwe indicatie van het toerental, terwijl een nauwkeurige aflezing op de volgende wijze wordt verkregen:

De wisselspanning van de tachometer wordt gemoduleerd met een signaal dat is afgeleid van de netspanning. Het resulterende signaal geeft via een elektronische schakeling op een oscillograafbuisje één stilstaand punt te zien als het toerental van de rotor een 3000-voud is. p stilstaande punten betekenen een afwijking van een 3000-voud ter grootte van $\pm 3000/p$. Bij een geringe verandering van het toerental gaan de punten op het oscillograafscherm langs een cirkelomtrek links- of rechtsom draaien.

Wanneer enige ervaring is verkregen, is het mogelijk met behulp van het oscillograafbeeld de luchtdruk op de turbine zodanig in te stellen dat het toerental van de rotor minder dan 10 rpm van de gekozen waarde afwijkt, mits de netfrequentie constant 50 Herz bedraagt.

4.2.2. Meting van de rotortemperatuur.

In het onderste gedeelte van de rotor zijn twee magnetische schijven aangebracht die van elkaar gescheiden zijn door een schijf thermoperm. Thermoperm is een ijzer-nikkel legering met 30% Ni (Stäblein, 1934; Bozorth, 1951) met de eigenschap dat de magnetisatie snel afneemt als de temperatuur toeneemt. De magnetisatie is een lineaire functie van de temperatuur over het temperatuurtraject van 0 - 40 °C.

Indien de temperatuur van de rotor toeneemt, neemt de uit de rotor tredende magnetische flux eveneens toe. Deze flux induceert een spanning in een tweetal spoelen die dicht bij het onderste gedeelte van de rotor zijn opgesteld. Bij benadering zal de geïnduceerde wisselspanning sinusvormig zijn. De magnetische flux ter plaatse van de spoelen is dan weer te geven door

$$\phi = \phi_0 \sin \omega t$$

waarin de hoekfrequentie ω bepaald wordt door het toeren-tal van de rotor. De in de spoelen opgewekte wisselspanning is gelijk aan

$$V_1 = \frac{d\phi}{dt} = \phi_0 \omega \cos \omega t$$

De spoelen zijn in serie geschakeld met een zelfinductie L (een smoorspoel) en een weerstand R. De wisselspanning over de weerstand R is, afgezien van de fase, gelijk aan

$$\frac{R}{\sqrt{R^2 + \omega^2 L^2}} \phi_0 \omega \cos \omega t$$

Gelijkrichting door middel van een Graetz schakeling geeft een gelijkspanning die evenredig is met

$$\frac{R \phi_0 \omega}{\sqrt{R^2 + \omega^2 L^2}}$$

Als $R \ll \omega L$ is de gelijkspanning bij benadering evenredig met $\frac{R}{L} \cdot \phi_0$. Hieruit volgt dat de met een draaispoelmeter gemeten

spanning onafhankelijk is van ω , dus van het toerental van de rotor, mits ω niet te klein is. Via θ_0 is deze spanning een functie van de rotortemperatuur.

Door de fabrikant is opgegeven dat het toerental van de rotor groter dan 10.000 rpm moet zijn. In de praktijk blijkt de afwijking boven 6000 rpm reeds verwaarloosbaar klein te zijn.

De schaalverdeling op de draaispoelmeter, een verdeling in graden Celsius, is niet lineair en wordt door de fabrikant aangebracht. Hoe de relatie tussen de rotortemperatuur en de meteruitslag empirisch wordt vastgesteld is ons niet bekend. Wel wordt vermeld dat voor alle rotoren, behorend bij één centrifuge, gebruik gemaakt moet worden van geselecteerde ringen thermoperm en magneten. De nodige reserve-onderdelen worden door de fabrikant bewaard.

4.2.3. *IJking van de temperatuuraanwijzing.*

Op grond van een aantal experimenten met oplossingen van zeer zuiver bovine serum albumine rees twijfel aan de juistheid van de temperatuuraanwijzing van de Phywé ultracentrifuge. De gemeten sedimentatiecoëfficiënten bleken namelijk altijd groter te zijn dan de (met Spinco ultracentrifuges bepaalde) waarden opgegeven in de literatuur. Met de Spinco ultracentrifuge van het Van 't Hoff laboratorium te Utrecht * werden wel de verwachte waarden gevonden. Met de Phywé ultracentrifuge van het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek te Lisse * werden nog hogere waarden gevonden dan met die van het Medisch Biologisch Laboratorium.

De enige redelijke verklaring voor de geconstateerde verschillen bleek een afwijking in de temperatuuraanwijzing te zijn. Daarom werd besloten de temperatuurmeting van de Phywé ultracentrifuge van het Medisch Biologisch Laboratorium aan een onderzoek te onderwerpen en zo mogelijk te ijken.

Daartoe werden tijdelijk de volgende voorzieningen aan de centrifuge aangebracht:

De koelspiraal in de vacuümkamer werd aangesloten op een thermostaatbad. De glasplaat in het deksel van de vacuümkamer werd vervangen door een rubberplaat waardoor vacuümdicht de

* Dr P.F. Mijnlieff en Ir J.A. v.d. Veecken ben ik zeer erkentelijk voor het uitvoeren van deze experimenten.

"warme" las van een ijzer-constantaan thermokoppel werd gebracht. Hierdoor was verplaatsing van het laspunt mogelijk zonder het vacuüm op te heffen. Het laspunt was na het lassen vertind en afgeslepen om een zo goed mogelijk thermisch contact met de rotor te verkrijgen. Tijdens het draaien van de rotor werd dit laspunt op enige afstand van de rotor gezet. De "koude" las van het thermokoppel stond in smeltend ijs. De thermo-e.m.k. werd gemeten met een galvanometer. Het verband tussen de temperatuur van de warme las en de uitslag van de galvanometer werd experimenteel bepaald vóór en na de ijsing van de temperatuuraanwijzing. Een verandering had niet plaatsgevonden.

De stalen vacuümkamer werd aan de buitenzijde zo goed mogelijk thermisch geïsoleerd met behulp van geëxpandeerd polystyreen (Tempex, Isola, Bussum). Gezien de onvolkomen isolatie, de hoge weerstand van de koelspiraal en de capaciteit van de pomp van het thermostaatbad was enige invloed van de kamertemperatuur op die van de vacuümkamer (en dus van de rotor) te verwachten bij temperaturen van het thermostaatbad die veel van de kamertemperatuur verschilden.

Nadat zich een thermisch evenwicht tussen rotor en omgeving had ingesteld werd de temperatuur van de stilstaande rotor gemeten met het thermokoppel. De rotortemperatuur werd niet beïnvloed door het waterstofgas waarmee de vacuümkamer werd gespoeld (Bon, 1955).

Bij 12.000 rpm bleek de rotortemperatuur, afgelezen op de draaispoelmeter van de ultracentrifuge, constant te zijn of evenveel toe te nemen als de temperatuur van de vacuümkamer, die eveneens met een thermokoppel werd gemeten. Hierbij werd dus aangenomen dat kleine temperatuurverschillen door de te ijken draaispoelmeter goed werden aangegeven. Nadat de rotor tot stilstand was gebracht werd de rotortemperatuur opnieuw met het thermokoppel gemeten. Als een verschil tussen de vóór en na de proef gemeten temperatuur werd gevonden bleek dit even groot te zijn als de toename van de vacuümkamertemperatuur tijdens de proef, zodat uit de met het thermokoppel gemeten temperatuur de ware rotortemperatuur (eventueel betrokken op een bepaald tijdstip) kon worden bepaald.

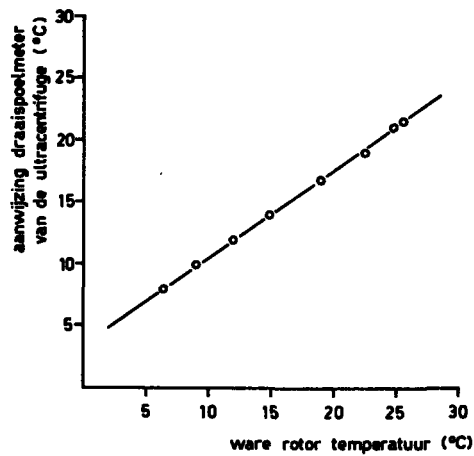
Zulke proeven werden uitgevoerd bij een aantal temperaturen. In Tabel I en figuur 2 zijn de resultaten van de metingen samengevat.

Tabel I

IJking van de temperatuuraanwijzing van de Phywé ultracentrifuge.

Rotortemperatuur in °C	
Afgeleid uit de meting met het thermokoppel	Afgelezen op de draaispoelmeter van de ultracentrifuge
6,4	8,0
8,9	10,0
11,8	11,9
14,8	14,0
18,9	16,8
22,4	19,0
24,7	21,0
25,4	21,5

Hieruit blijkt dat de correctie bij ongeveer 12 °C nul is. Daarboven is de aanwijzing te laag, daaronder te hoog.



Figuur 2

Correctiegrafiek voor de temperatuur-aanwijzing van de Phywé ultracentrifuge.

Er moet rekening mee worden gehouden dat de ijking van de temperatuuraanwijzing nog een systematische fout bevat. Werd de rotor namelijk snel op het gewenste toerental gebracht, dan nam de rotortemperatuur aanvankelijk vrij snel met 0,3 à 0,5 °C toe om daarna praktisch constant te blijven. Werd de rotor snel geremd, dan bleek de met het thermokoppel gemeten rotortemperatuur ook ongeveer 0,3 à 0,5 °C hoger te zijn dan wanneer de rotor langzaam werd geremd. Deze verschillen zouden toegeschreven kunnen worden aan een adiabatische afkoeling respectievelijk verwarming van de rotor (Waugh en Yphantis, 1952). Ook het ontstaan van een klein temperatuurverschil tussen rotor en omgeving ten gevolge van ontwikkelde wrijvingswarmte is niet uit te sluiten. Door dit effect te verwaarlozen kan dus een kleine fout in de temperatuurijsking aanwezig zijn, die dan echter 0,5 °C niet te boven gaat.

Nadat de in Tabel I vermelde temperatuurcorrectie op de sedimentatiecoëfficiënt van albumine was aangebracht, bleken de met de Phywé ultracentrifuge verkregen resultaten in redelijke overeenstemming te zijn met de literatuurwaarden.

Sedimentatie-experimenten met andere materialen, onder vergelijkbare omstandigheden uitgevoerd met de Phywé ultracentrifuge en de Spinco ultracentrifuge in het Laboratorium voor Toegepaste Enzymologie en Radiobiologie te Leiden *, hebben aangetoond dat ook na een aantal jaren nog een zeer goede overeenstemming bestaat tussen de verkregen resultaten.

4.2.4. Foto-elektrische registratie van de extinctie in de ultracentrifugecel.

Een optisch systeem dat gebruik maakt van de absorptie van (monochromatisch) licht (verder aan te duiden met "absorptie systeem") door de sedimenterende stof werd reeds door Svedberg (1925) toegepast. Nadat deze waarnemingsmethode een aantal jaren op de achtergrond was gedrongen door het optische systeem volgens Philpot (1938) en Svensson (1939, 1940), waarmee door middel van een "schlierenmethode" een bewegende grenslaag zichtbaar wordt

* Deze experimenten werden uitgevoerd in samenwerking met de Heer L.W. van Kesteren van het Instituut voor Radiopathologie en Stralenbescherming.

gemaakt, werd zij in ere hersteld door het werk van Shooter en Butler (1955, 1956) en van Schumaker en Schachman (1957).

DNA oplossingen met een concentratie van meer dan 0,5 mg/ml (ongeveer de laagste concentratie die met een Philpot - Svensson systeem waarneembaar is) geven bij sedimentatie namelijk een zeer steile concentratiegradiënt in de grenslaag te zien die men alleen verwacht bij een homogeen preparaat. Door genoemde auteurs werd er nu op gewezen dat bij lagere concentraties blijkt, dat zulke preparaten echter terdege heterogeen kunnen zijn. Dit werd aangetoond met een absorptie systeem waarbij gebruik gemaakt wordt van de absorptie van licht met een golflengte van ongeveer 260 m μ (het absorptiemaximum van DNA oplossingen). Een dergelijk systeem zullen we korthedshalve een "ultraviolet absorptie systeem" noemen.

Onder 4.1. is reeds vermeld dat bij de Spinco ultracentrifuge zo'n systeem verkrijgbaar is, zulks in tegenstelling tot het door de Phywé gefabriceerde instrument.

In principe is de methode zeer eenvoudig: men laat een bundel evenwijdig licht met de juiste golflengte vallen door de ultracentrifugecel. De intensiteit van het doorgelaten licht wordt gemeten door de uittreezijde van de cel af te beelden op een fotografische plaat. De zwarting van de fotografische plaat is een maat voor de lokale concentratie van de sedimenterende stof in de cel.

Aan de lichtbron en het fotografische materiaal moet echter een aantal eisen worden gesteld, waaraan in de praktijk niet op eenvoudige wijze is te voldoen. Een lichtbundel, die bij benadering evenwijdig is, vereist een kleine lichtbron (c.q. het gebruik van een klein gedeelte van een lichtbron). Bovendien moet de lichtintensiteit constant zijn en moet de spectrale verdeling van het licht aangepast zijn aan het absorptiespectrum van de sedimenterende stof. Dit laatste wordt doorgaans gerealiseerd door filters in de lichtweg te plaatsen. De verandering van de sedimentatie-toestand tijdens een fotografische opname moet verwaarloosbaar zijn, dit wil zeggen de expositietijden moeten klein zijn.

Daar zowel de oppervlakte-intensiteit van de lichtbron als de gevoeligheid van de fotografische emulsie niet onbegrensd opgevoerd kunnen worden is het nodig met een niet volkomen evenwijdige lichtbundel genoeg te nemen. Verder is een constante

gevoeligheid van de emulsie en een reproduceerbare ontwikkel-procedure gewenst.

Om het uitwerken van de gegevens op eenvoudige wijze mogelijk te maken moeten het fotografische materiaal en de belichtingstijd zodanig gekozen worden dat de relatie tussen de concentratie van de sedimenterende stof en de zwarting van de film lineair is. Dit is doorgaans slechts geldig voor een beperkt concentratietraject. Bovendien moet er rekening mee worden gehouden dat zowel de door de fabrikant opgegeven gamma-waarde als de grootte van het lineaire gedeelte van de gamma-curve in het algemeen bepaald worden met zichtbaar licht en dat voor ultraviolet licht grote afwijkingen kunnen optreden (Eigner, 1961).

Tenslotte zijn nog een aantal bezwaren van praktische aard tegen het gebruik van de fotografische detectiemethode te noemen:

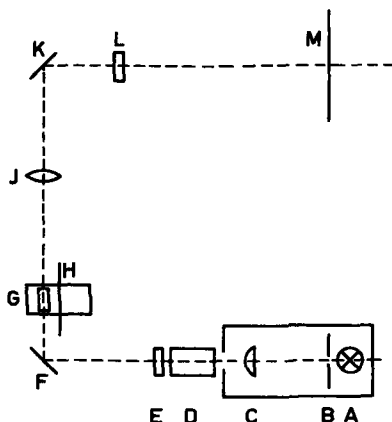
Voor zeer nauwkeurige concentratiemetingen moet de absorptie van een aantal oplossingen van bekende concentratie worden mee gefotografeerd op dezelfde film of plaat, vooral als de sedimentatiecoëfficiënt (zoals voor hoogmoleculair DNA het geval is) sterk afhankelijk is van de concentratie.

Het verloop van een experiment blijkt pas nadat de film ontwikkeld is. In vele gevallen vereist dit de uitvoering van een voorlopig experiment, op grond waarvan de rotorsnelheid, de expositietijd en het tijdsinterval tussen opeenvolgende opnamen vastgesteld moeten worden.

Vele van de genoemde moeilijkheden kunnen worden vermeden door een foto-elektrische registratiemethode toe te passen. Deze werd voor de Phywé ultracentrifuge ontwikkeld in samenwerking met de elektronische afdeling van het Medisch Biologisch Laboratorium der RVO-TNO * (Aten en Schouten, 1960, 1961). In dit ultraviolet absorptie systeem, dat schematisch is weergegeven in figuur 3, wordt als lichtbron A een Philips hogedruk-kwiklamp type HPK 125 gebruikt. De lamp wordt gevoed met een elektronisch gestabiliseerde gelijkstroombron, die de stroom door de gasontladingsbuis constant houdt. De lamp is echter geconstrueerd voor wisselstroomvoeding. Om de levensduur te vergroten wordt de polariteit

* Aan de Heren Ir A. Schouten, J. Koster en G. Langeweg ben ik veel dank verschuldigd voor de moeite die zij zich hebben willen getroosten om tot een opstelling te komen die aan de noodzakelijke stabiliteitseisen voldoet. De Heer W. de Vries ben ik erkentelijk voor zijn assistentie tijdens de ontwikkeling van een voorlopige opstelling.

aan de elektroden dagelijks verwisseld. De lichtbron is zo dicht mogelijk achter een ronde opening B (diameter 3 mm) opgesteld.



Figuur 3

Schematische voorstelling van het ultraviolet absorptie systeem van de Phywé ultracentrifuge

- | | |
|----------------------------------|---|
| A = lichtbron (Philips HPK 125); | L = difenylbutadiëen filter; |
| B = diafragma (Ø 3 mm); | F, K = gealuminiseerde spiegels; |
| C, J = kwartslenzen; | G = ultracentrifugecel; |
| D = nikkel-cobaltsulfaat filter; | H = rotatieas van de rotor; |
| E = Schott - UG 5 filter; | M = vlak waarin de cel wordt afgebeeld. |

Dit diafragma moet uiteraard zo klein mogelijk zijn. In de praktijk wordt de benedengrens bepaald door de gevoeligheid van de detector. De collimatorlens C, een planconvexe kwartslens met een diameter van 6 cm en een brandpuntsafstand (voor zichtbaar licht) van 30 cm, is op zodanige afstand van het diafragma opgesteld dat de bundel ultraviolet licht na het passeren van deze lens zo goed mogelijk evenwijdig is. De filters D, E en L, die gebruikt worden om uit het door de lichtbron uitgezonden spectrum het gewenste gedeelte te selecteren zijn, met enkele kleine wijzigingen, ontleend aan Kasha (1948) en bestaan uit:

D: een vloeistoffilter met 5 cm lichtweg, bevattende $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (240 g/l water) en $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (45 g/l water)

E: een UG 5 filter (Schott-Jena) ter dikte van 1 mm. Dit filter heeft bij 260 $m\mu$ een iets hogere transmissie dan het Corning filter No. 9863, dat door Kasha is voorgesteld

L: een oplossing van 1,4 - difenylbutadien (42,4 mg/liter) in gedestilleerde alcohol, lichtweg 1 cm. Door Kasha is ether als oplosmiddel gebruikt.

Twee filters (D en E) zijn direct achter de collimatorlens opgesteld. Het derde filter (L) is, gezien vanaf de lamp, voorbij de ultracentrifuge geplaatst. Het absorptiespectrum van difenylbutadien verandert namelijk snel indien het aan een intensieve bestraling met ultraviolet licht is blootgesteld. Een voorraad-oplossing is, in een koelkast bewaard, vele maanden houdbaar. Bij kamertemperatuur en blootgesteld aan kleine doses ultraviolette stralen is het filter enige dagen bruikbaar.

De filtercombinatie laat van het door de kwiklamp uitgezonden licht alleen de lijnen met een golflengte van ongeveer 253 en 265 $m\mu$ door. De intensiteit van licht met andere golflengten is verwaarloosbaar klein. Het absorptiespectrum van DNA ligt tussen 240 en 280 $m\mu$ met een maximum bij ongeveer 260 $m\mu$. Bij 253 en 265 $m\mu$ heeft DNA vrijwel dezelfde extinctiecoëfficiënt, zodat een lichtbundel die deze beide golflengten bevat, gebruikt kan worden voor een spectrofotometrische bepaling van de DNA concentratie. Omdat reeds bij een kleine verschuiving van het absorptiespectrum van het difenylbutadien ook een kwiklijn van ongeveer 280 $m\mu$ wordt doorgelaten, wordt voor alle zekerheid dit filter dagelijks verversd.

De bovenkant van de ultracentrifugecel G (dit is de uit-treezijde van het licht) wordt door de cameralens J, een biconvexe kwartslens met een brandpuntsafstand van 30 cm (voor zichtbaar licht) en een diameter van 6 cm, afgebeeld in het vlak van de detector (M). Hierbij wordt de cel ongeveer 3 maal vergroot afgebeeld met de sedimentatierichting verticaal.

De detector is een fotomultiplicatorbuis (RCA type 1P28). In het overigens lichtdichte huis van deze buis is een horizontaal spleetje uitgespaard met een breedte van 0,3 mm en een lengte van ongeveer 7 mm. Tussen de fotokathode en het spleetje is een gematteerd kwartsplaatje aangebracht zodat slechts diffuus licht op de fotokathode valt, waardoor een te grote locale stroomsterkte wordt voorkomen. Het huis van de fotomultiplicatorbuis kan door middel van een synchroonmotor op en neer worden bewogen

langs een verticale, rechthoekige spleet met een hoogte die groter is dan de afmeting van het beeld van de cel in de sedimentatierichting en een breedte die kleiner is dan de kleinste afmeting van de celafbeelding (in ons geval 5 mm).

Theoretisch zou het horizontale spleetje gekromd moeten zijn en zou de kromtestraal moeten variëren met de in de cel beschouwde plaats, daar immers ieder punt van de cel een cirkel beschrijft met het middelpunt in de rotatieas. Door de verticale spleet smal genoeg te maken wordt de fout ten gevolge van het gebruik van een recht spleetje verwaarloosbaar klein.

De verticale spleet moet rechthoekig zijn. Dit is als volgt in te zien: Stel dat de rotor n omwentelingen per seconde maakt. Noemen we α de tophoek van de sectorvormige cel (in graden), a de breedte van de verticale spleet (in cm) en I de belichtingssterkte bij volledige belichting van de door de horizontale en verticale spleet gevormde opening. Een punt in de cel met een afstand van r cm tot de rotatieas heeft een lineaire snelheid van $2\pi nr$ cm/sec. Het overeenkomstige punt in het beeld beweegt met snelheid $2\pi nR$, als R/r gelijk is aan de vergrotingsfactor. Iedere lichtpuls die de rechthoekige opening bereikt kunnen we beschouwen als bestaande uit 3 gedeelten. Tot de tijd $t = 0$ is de opening nog juist helemaal donker. Daarna wordt hij gedeeltelijk belicht, tot op de tijd $t = t_1$ de belichting volledig is. Deze situatie blijft bestaan tot de tijd $t = t_2$, waarna het belichte deel afneemt tot 0, welke situatie bereikt is op het tijdstip $t = t_3$. Het beeld van de cel heeft ter plaatse van de beschouwde opening op het tijdstip t_1 een afstand a afgelegd. Ten tijde t_2 is deze afstand $2\pi R \cdot \alpha / 360$ en voor de tijd t_3 is dit $a + 2\pi R \cdot \alpha / 360$. De totale hoeveelheid licht die per omwenteling op de opening valt is gelijk aan:

$$A = t_1 \cdot I/2 + I (t_2 - t_1) + I (t_3 - t_2)/2.$$

Uit de afgelegde afstanden en de lineaire snelheid volgt de tijd die ieder puls-deel duurt. Substitutie in A geeft:

$$A = (I/2\pi nR) (a/2 + 2\pi R\alpha/360 - a + a/2) = I\alpha/360 n.$$

Hieruit volgt:

a) De totale hoeveelheid licht die de fotomultiplicatorbuis, op-

gesteld achter een rechthoekige verticale spleet en een smal horizontaal spleetje bereikt, is onafhankelijk van de afstand van het beschouwde deel van de cel tot de rotatieas.

- b) De totale hoeveelheid licht die per tijdseenheid op de fotokathode valt is onafhankelijk van het toerental van de rotor.
- c) Gebruik van een cel met een andere tophoek α betekent tevens een gewijzigde lichthoeveelheid op de fotokathode.
- d) De cel moet zuiver sectorvormig zijn, niet alleen omdat een afwijking hiervan aanleiding kan geven tot storingen tijdens sedimentatie-experimenten, maar ook omdat dan niet meer voldaan wordt aan het onder a) genoemde. Enkele Phywé cellen, waarvan het cellichaam geheel uit nylon bestond, bleken niet sectorvormig te zijn, welke fout door het gebruik van het registrerende absorptiesysteem direct tot uiting kwam.

De lichtpulsen die de fotokathode treffen worden door de fotomultiplicatorbuis omgezet in elektrische pulsen. De frequentie van deze pulsen wordt bepaald door de hoeksnelheid van de rotor en ligt meestal tussen 200 en 800 pulsen per seconde. De duur van de pulsen wordt bepaald door het toerental van de rotor en de tophoek van de sectorvormige cel. De pulsduur blijkt te variëren van ongeveer 60 tot ongeveer 15 μsec , voor een tophoek van ongeveer 3 graden.

Bij een spanning van ongeveer 800 V tussen anode en kathode van de 1P28 blijkt de gemiddelde stroom slechts $2,5 \times 10^{-8}$ A te bedragen. Deze lage waarde is verklaarbaar: slechts een klein gedeelte van het door de lichtbron uitgezonden licht wordt benut, de pulsen duren kort en in de filters en andere optische componenten wordt veel licht geabsorbeerd. Daar de gemiddelde donkerstroom van de 1P28 ongeveer 10^{-9} A bedraagt, moeten hoge eisen worden gesteld aan de stabiliteit van het elektronische deel. De fluctuaties van de anodestroom worden veroorzaakt door het pulserende karakter van de fotostroom, door statistische variaties van de foto- en donkerstroom en door onvermijdelijke onregelmatigheden in de intensiteit van de lichtbron. Deze fluctuaties worden zoveel mogelijk genivelleerd door een condensator van 0,022 μF , die parallel geschakeld is met de anodeweerstand (10 M Ω) van de fotomultiplicatorbuis. De tijdconstante van dit netwerk bedraagt dus ongeveer 0,2 sec. Deze waarde mag niet veel groter zijn in verband met de tijd die nodig is om het hele celbeeld af te tasten (deze tijd is ongeveer 2 minuten), terwijl een kleinere waarde de fluctuaties onvoldoende elimineert.

De gelijkspanning, die op deze wijze over de anodeweerstand komt te staan, wordt versterkt met een lineaire versterker (versterkingsfactor ongeveer 120). De donkerstroom wordt geëlimineerd door de uitgangsspanning van de versterker op nul te zetten als op de fotokathode van de 1P28 geen licht valt. Hiertoe kan deze spanning worden afgelezen op een gevoelige meter die in serie is geschakeld met een weerstand. Door middel van een drukknop kan deze weerstand worden kortgesloten, waardoor de nauwkeurigheid van de nul-instelling met een factor 10 wordt verhoogd.

De uitgangsspanning van de versterker is nu een maat voor de lichtintensiteit die op de fotokathode van de 1P28 valt. Door vergelijking van de lichtintensiteiten die door een bufferoplossing en een DNA oplossing worden doorgelaten kan de transmissie in alle punten van de ultracentrifugecel gemeten worden. De DNA concentratie is evenredig met de extinctie van de oplossing ter plaatse, dus met de negatieve logaritme van de transmissie. Daarom wordt de uitgangsspanning van de versterker gevoerd naar de ingang van een logaritmische versterker, waarin een siliciumdiode is toegepast. Deze diode heeft in de sperrichting een stroomspanning-karakteristiek met een logaritmisch gedeelte dat over 1,5 dekade binnen 1% nauwkeurig is. Dit gedeelte van de karakteristiek is gebruikt om het gewenste versterkingsverloop te verkrijgen. De door de logaritmische versterker afgegeven spanning is nu evenredig met de concentratie van de opgeloste stof en wordt via een spanningsdeler met een recorder (Varian G 10, gevoeligheid 10 mV) geregistreerd. Door instelling van de spanningsdeler kan de hele breedte van het recorderpapier naar keuze gebruikt worden voor het extinctietraject òf van 0 tot 1 òf van 0 tot 0,5.

Het extinctie-nulpunt wordt vastgelegd door de anodespanning van de fotomultiplicatorbuis in te stellen, terwijl de ultracentrifugecel gevuld is met het oplosmiddel. Dit nulpunt wordt veelvuldig gecontroleerd, waarbij tegelijkertijd verontreiniging van objecten in de lichtweg kan worden geconstateerd. Hoewel het gebruik van ultraviolet licht een grote kans op storende invloeden meebrengt is het mogelijk gebleken een standaardprocedure voor het reinigen van de ultracentrifugecel en het schoonhouden van lenzen, kwartsplaten en filters vast te stellen waarbij slechts sporadisch storingen optreden. Daarbij worden de voorwerpen schoongemaakt met alcohol, water en zeep, gespoeld met (ge-

destilleerd) water en tenslotte afgewreven met lenspapier.

Voor het vaststellen van de relatie tussen de recorderuitslag en de DNA concentratie is gebruik gemaakt van DNA oplossingen met bekende concentraties die bij een laag toerental werden gecentrifugeerd. Het verschil van de extincties, gemeten met een spectrofotometer bij 260 $m\mu$ en met het ultracentrifugesysteem bleek, na correctie voor verschillen in de laagdikte, ongeveer 6% te bedragen. Dit is in goede overeenstemming met het verschil in extinctiecoëfficiënt van DNA oplossingen bij 260 $m\mu$ respectievelijk 253 of 265 $m\mu$.

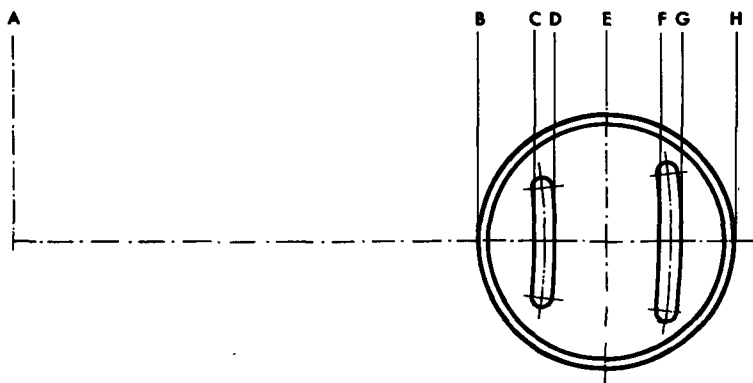
Met behulp van de beschreven opstelling worden (X, c) curven verkregen, waarin c de concentratie, bijvoorbeeld uitgedrukt in μg DNA/ml, voorstelt en X een grootte is die gecorreleerd is met de afstand x van het beschouwde punt in de ultracentrifugecel tot de rotatieas. Het verband tussen X en x wordt bepaald door:

- a) de optische vergrotingsfactor (ongeveer drie)
- b) de snelheid waarmee het beeld door de fotomultiplicatorbuis wordt afgetast
- c) de loopsnelheid van het recorderpapier.

De totale vergroting moet nauwkeurig bekend zijn om uit een (X, c) curve een (x, c) curve af te kunnen leiden. In principe zou deze totale vergroting bepaald kunnen worden door enerzijds de afmeting van de cel in de sedimentatierichting nauwkeurig te bepalen (bijvoorbeeld met behulp van een meetmicroscop of een kathetometer) en anderzijds de afstand te meten op het recorderpapier tussen de lijnen die de plotselinge toename en afname van de lichtintensiteit weergeven bij de naar de rotatieas gekeerde zijde respectievelijk de bodem van de cel. Hierbij doen zich enkele praktische problemen voor.

De "afbeelding" van de cel op het recorderpapier is namelijk niet goed gedefinieerd door de volgende oorzaken. Bij de vulopening, die zich in de naar de rotatieas gekeerde zijde van de cel bevindt, vertoont de cel kleine oneffenheden van het oppervlak, waardoor de afmeting van de cel bij draaiende rotor niet volkomen scherp afgebeeld wordt. Verder wordt de helling van de lijn, die de overgang van donker naar licht (of omgekeerd) aangeeft, beïnvloed door de spleetbreedte (0,3 mm) en door de instel-tijd van de recorder, dus ook door de afstand die de recorderpen over het papier moet afleggen om het extinctie-nulpunt te bereiken.

Daarom is een speciale cel geconstrueerd voor het bepalen van de vergrotingsfactor. In deze cel is aan de zijde waar het licht uittreedt een plaatje aangebracht, waarin twee gekromde spleten zijn gemaakt, waarvan de krommingsmiddelpunten op de rotatieas liggen. De afmetingen zijn aangegeven in figuur 4. De afstand $CF = DG$ is nauwkeurig bekend. Met deze cel worden nu registraties gemaakt, terwijl de rotor op een laag toerental draait.



Figuur 4

Cel voor het bepalen van de vergrotingsfactor van het ultraviolet absorptie systeem.

A = rotatiecentrum

AE = afstand van rotatiecentrum tot middelpunt vande cel = 65 mm

BH = celdiameter = 28,45 mm

CD = FG = spleethreedte = 2 mm

CF = DG = afstand tussen spleten = $14,00 \pm 0,02$ mm.

De totale vergroting volgt dan uit de afstand tussen de lijnen die de overgang van donker naar licht (of van licht naar donker) aangeven, gemeten bij dezelfde recorderuitslag, en uit de genoemde afstand CF (of DG).

Tenslotte moeten nog enkele opmerkingen gemaakt worden over de mogelijke beïnvloeding van het geregistreeerde concentratieverloop in de grenslaag tijdens de sedimentatie van DNA door eigenschappen van het optische systeem.

Zowel de loopsnelheid van het recorderpapier als die van de fotomultiplicatorbuis kunnen, door het inschakelen van ver-

schillende synchroommotoren, worden gevarieerd. Voor de opstelling die doorgaans is gebruikt gelden de volgende gegevens:

De afmeting van de cel in de sedimentatierichting is ongeveer 14,5 mm. De optische vergroting is ongeveer 3 maal. Het celbeeld wordt in ongeveer 120 seconden afgetast. De snelheid van het recorderpapier bedraagt ongeveer 10 cm per minuut, zodat de totale vergroting ongeveer 12 maal is.

We veronderstellen nu dat in de ultracentrifugecel een discontinue overgang plaatsvindt van extinctie nul naar één. Voor de registratie van deze overgang moet de spleet, die het celbeeld aftast, over 0,3 mm verplaatst worden. Hiervoor is ongeveer $0,3 \times 120/45 = 0,8$ sec nodig. In deze tijd verplaatst het recorderpapier zich over ongeveer 1,3 mm. De insteltijd van de recorder (99% van de volle schaal in 1 sec) en de RC tijd van de versterker (0,2 sec) kunnen deze waarde slechts in geringe mate beïnvloeden. Hieruit volgt dat een discontinue overgang geregistreerd moet worden als een lijn die op het recorderpapier verloopt over een afstand kleiner dan 1,5 mm. De breedte van de grenslaag van ongebroken T4-DNA is gebleken niet kleiner te zijn dan 5 mm, zodat deze breedte niet uitsluitend door het optische systeem veroorzaakt kan worden.

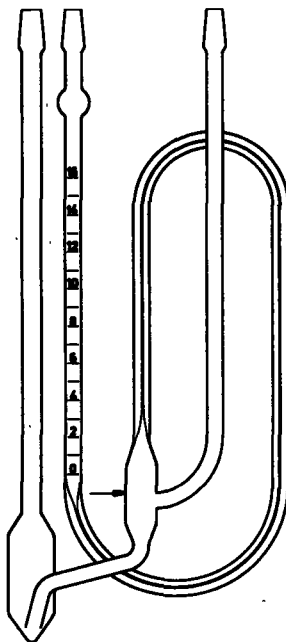
4.3. De viscosimeter.

Een Ubbelohde viscosimeter, waarvan de bolletjes vervangen zijn door een cilindrische meetbuis met een millimeterverdeling, is beschreven door Van Duin (1957) en Hermans (1958). Een dergelijke viscosimeter, weergegeven in figuur 5, is geconstrueerd in het Medisch Biologisch Laboratorium der RVO-TNO. De afmetingen zijn:

capillair lengte	49,1	cm
capillair diameter	0,564	mm
meetbuis diameter	3,98	mm

De plaats van de meniscus in de meetbuis wordt aangeduid met h' . Als de plaats van de meniscus in de meetbuis in de evenwichtsstand h_0 is, dan is de hoogte van de vloeistofkolom boven de evenwichtsstand gelijk aan $h = h' - h_0$. De metingen kunnen worden voortgezet tot $h = 0,5$ cm, corresponderend met een gemiddelde snelheidsgradiënt in het capillair van 9 sec^{-1} . Vergeleken met de

snelheidsgradiënten, vermeld door Eigner (1960) van 130, 90, 60 en 30 sec^{-1} betekent deze waarde een drastische verbetering van de nauwkeurigheid waarmee η_{sp} van niet-Newtonse vloeistoffen bepaald kan worden. De "hangende" meniscus aan de uitstroomzijde van het capillair geeft gemakkelijker een goede bevochtiging van de glaswand dan een stijgende meniscus (Hermans, 1958). Het is echter gebleken dat een trechtervormige overgang van het capillair-uiteinde naar het reservoir waarin de doorgestroomde vloeistof



Figuur 5

De Ubbelohde viscosimeter met gecalibreerde meetbuis.

wordt verzameld, niet voldoende is om een constante waarde van h_0 te bereiken. Blijkbaar wordt h_0 op niet-reproduceerbare wijze beïnvloed door geringe oneffenheden op het glasoppervlak direct onder de uitstroomopening. Een gelijkmatig verlopend, glad oppervlak kan worden verkregen door het laatste deel van het capillair uit te blazen tot een reservoir van zodanige afmetingen dat de

verbindingsplaatsen met andere viscosimeterdelen (in figuur 5 aangegeven met een pijl) geen invloed meer hebben op de vloeistoffilm die aan de wand onder de uitstroomopening wordt gevormd.*

4.4. *De spectrofotometer.*

Voor het meten van de extinctie van DNA oplossingen werd gebruik gemaakt van een Beckman spectrofotometer, model DU. De metingen zijn verricht bij een golflengte van $260\text{ m}\mu$ in cuvetten met een lichtweg van 10 mm (zie echter ook 2.1.2.).

* De Heer J.K.W. Schriefer ben ik zeer erkentelijk voor de deskundige wijze waarop hij de viscosimeter heeft geconstrueerd.

HOOFDSTUK 5

BEPALING VAN HET GRENSVISCOSITEITSGETAL VAN T4-DNA

De in 4.3. beschreven viscosimeter werd met behulp van een schietlood zo nauwkeurig mogelijk verticaal opgesteld in een doorzichtig thermostaatbad, waarvan de temperatuur minder dan $0,05^{\circ}\text{C}$ varieerde.

Vaatjes met de te onderzoeken oplossingen werden vóór het vullen van de viscosimeter enige tijd in hetzelfde waterbad opgehangen om de vorming van gasbelletjes in het capillair tijdens de meting te voorkomen. Indien toch nog belvorming optrad werd de meting afgebroken, aangezien dit aanleiding zou geven tot onjuiste waarnemingen.

Door Van Duin (1957) is opgemerkt dat de meetbuis een uniforme diameter moet hebben. Dit kan gecontroleerd worden door de viscosimeter met een Newtonse vloeistof, bijvoorbeeld water, te vullen en $\Delta t / \Delta \log h$ te meten op vele punten in de buis. In ons geval werd in dit quotiënt een spreiding gevonden van 2 à 3%. De waarde bleek voor een bepaald punt in de buis echter zeer goed reproduceerbaar te zijn.

Hoewel dus een kleine fout in de meting van η mogelijk is, zal de waarde van η_{rel} niet worden beïnvloed door onregelmatigheden in de meetbuis mits de metingen verricht worden tussen vaste punten in de buis. Dit heeft bovendien nog enkele praktische voordelen. Het rekenwerk en het in grafiek brengen van de meetresultaten worden hierdoor aanzienlijk vereenvoudigd. Tijdens de meting van de viscositeit van het oplosmiddel zijn afwijkingen van tevoren gevonden Δt waarden snel te constateren (dit komt meestal voort uit een onjuiste waarde van de evenwichtsstand h_0 ten gevolge van het niet geheel vetvrij zijn van de viscosimeter). Tenslotte wordt de nauwkeurigheid van $(\Delta t / \Delta \log h)_0$ aanmerkelijk vergroot door het gemiddelde van een aantal waarnemingen te gebruiken.

De waarde van h_0 werd na ieder experiment bepaald. De afwijking van de gemiddelde waarde bedroeg niet meer dan 0,1 mm als de viscosimeter goed schoon was en het preparaat geen stofdeeltjes bevatte. Experimenten waarbij de afwijking groter was werden niet gebruikt, tenzij een bijbehorende meting van het oplosmiddel dezelfde waarde van h_0 gaf.

De viscosimeter werd na gebruik altijd gevuld met chroomzuur. In verband met een mogelijke activering van een DNase door metaalionen werd de viscosimeter vóór een volgende meting gespoeld met geconcentreerd salpeterzuur, met verdund salpeterzuur, met verdunde ammonia en tenslotte met het oplosmiddel.

In het algemeen werd $(\Delta t / \Delta \log h)_0$ (voor het oplosmiddel) zowel vóór als na de meting van een DNA oplossing bepaald. Indien de viscositeit van meerdere DNA oplossingen na elkaar gemeten werd, werd de viscosimeter tussen twee experimenten enkele malen gespoeld met het oplosmiddel.

In 1.4. is reeds opgemerkt dat DNA moleculen gemakkelijk gebroken worden door hydrodynamische schuifspanningen. Het is daarom van belang na te gaan of de in de capillairviscosimeter optredende snelheidsgradiënten aanleiding kunnen geven tot breuk van de DNA moleculen. Daartoe berekenen we de maximale schuifspanning met behulp van vergelijking (2.3.5.). Daar $R = 0,028$ cm en $L = 49,1$ cm (zie 4.3.) en $\Delta p = \rho g h$ vinden we voor water:

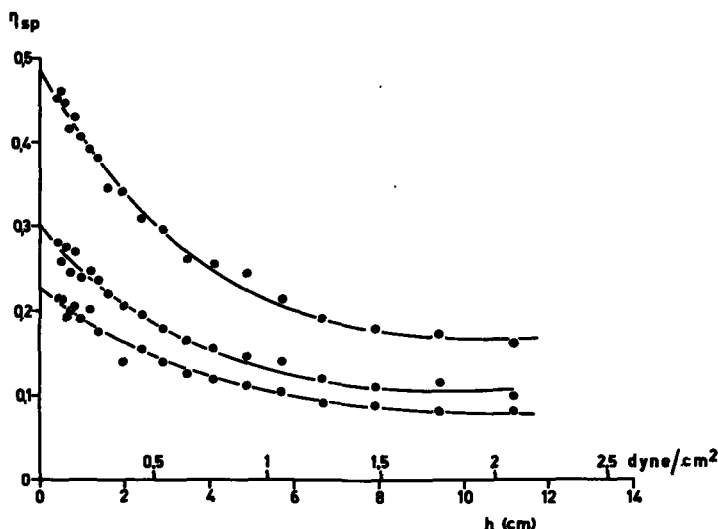
$$\tau_{\max} = \frac{1 \times 981 \times 0,028}{2 \times 49,1} h = 0,280 h \text{ dyne/cm}^2$$

Hierin is h de hoogte van de vloeistofspiegel in de meetbuis boven de evenwichtsstand uitgedrukt in cm. De maximale waarde van h is 15 cm. Daarbij is $\tau_{\max} = 4,2$ dyne/cm². De maximale snelheidsgradiënt is in water, waarvoor $\eta = 0,01$ poise dus gelijk aan 420 sec⁻¹. Zoals in hoofdstuk 7 zal blijken, zijn deze waarden te klein om breuk van de DNA moleculen te kunnen veroorzaken.

Van een aantal oplossingen die ongebroken of gebroken DNA moleculen bevatten werd het grensviscositeitsgetal bepaald. De waarden zijn weergegeven in tabel II, kolom (2).

In de figuren 6 tot 8 zijn enkele voorbeelden van de bij deze experimenten verkregen resultaten grafisch weergegeven.

In figuur 6 is η_{sp} uitgezet als functie van h voor enkele concentraties van ongebroken DNA moleculen (molecuulgewicht ongeveer 130×10^6).



Figuur 6

η_{sp} als functie van h voor ongebroken DNA moleculen.

Molecuulgewicht ongeveer 130×10^6 .

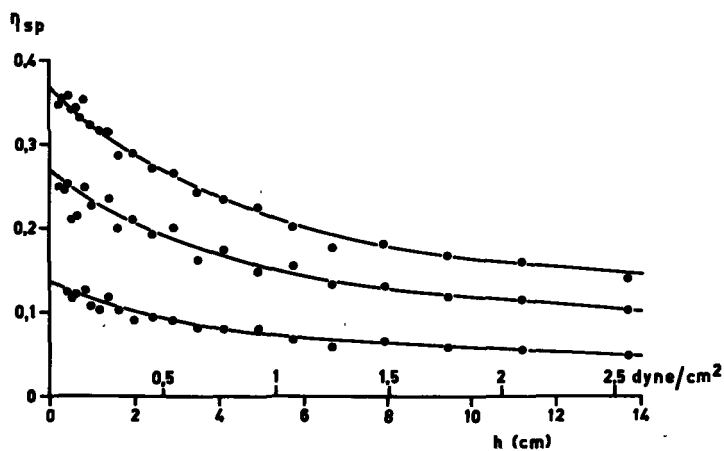
Concentraties (van onder naar boven) 8,1, 9,5 en $14,7 \mu\text{g/ml}$.

Figuur 7 bevat een analoge informatie over gebroken DNA moleculen (molecuulgewicht ongeveer 60×10^6). (In figuur 6 en 7 heeft de onderste curve betrekking op de laagste concentratie).

De naar snelheidsgradiënt 0 geëxtrapoleerde waarde van η_{sp} uit figuur 7 is als functie van de concentratie uitgezet in figuur 8.

Deze resultaten geven aanleiding tot de volgende opmerkingen:

- 1) De ongebroken DNA preparaten vertonen slechts geringe onderlinge verschillen. Hieruit volgt dat de isolatieprocedure goed reproduceerbaar is voor wat betreft de viscositeit van de oplossingen.
- 2) Het grensviscositeitsgetal van oplossingen van ongebroken T4-DNA is ongeveer 10% lager dan de door Schumaker en Bennett

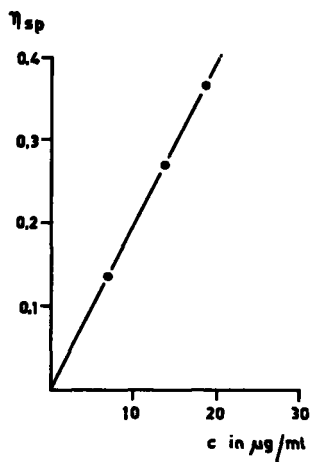


Figuur 7

η_{sp} als functie van h voor gebroken DNA moleculen.

Molecuulgewicht ongeveer 60×10^6 .

Concentraties (van onder naar boven) 6, 9, 13,8 en 18,5 $\mu\text{g/ml}$.



Figuur 8

η_{sp} ($h = 0$) uit figuur 7 als functie van de concentratie.

(1962) en Crothers en Zimm (1965) vermelde waarden. Deze auteurs verrichtten hun metingen met roterende viscosimeters bij zeer lage snelheidsgradiënten waarbij bleek dat η_{sp} sterk toenam met afnemende snelheidsgradiënt om tenslotte bij zeer kleine snelheidsgradiënten een vrijwel constante waarde aan te nemen. Het is duidelijk dat de in figuur 6 aangegeven extrapolatie om deze reden in principe niet juist is. Het is echter onmogelijk met de beschikbare gegevens een betere extrapolatie uit te voeren.

Uit oriënterende metingen met een onlangs gereedgekomen kopie van de door Zimm en Crothers (1962) beschreven viscosimeter is gebleken dat de in Tabel II vermelde $[\eta]$ waarden voor ongebroken moleculen inderdaad ongeveer 10% te laag zijn en dat de $[\eta]$ waarden van preparaten met een molecuulgewicht van ongeveer 20×10^6 goed zijn. Metingen in het tussenliggende traject van molecuulgewichten moeten nog worden uitgevoerd.

- 3) Vergeleken met oudere literatuurgegevens, betrekking hebbende op DNA preparaten met vergelijkbaar molecuulgewicht, die echter verkregen werden door meting bij grotere snelheidsgradiënten dan de door ons gebruikte, zijn de grensviscositeitsgetallen vermeld in tabel II aanzienlijk groter. Ten dele is dit het gevolg van de verbeterde meettechniek, ten dele van het beschikbaar zijn van betere isolatiemethoden.
- 4) Uit de resultaten vermeld in tabel II blijkt dat $[\eta]$ afneemt naarmate de preparaten aan grotere schuifspanningen werden blootgesteld. De informatie, die de waarde van $[\eta]$ geeft over het molecuulgewicht zal later worden besproken.
- 5) Voor hoogmoleculair DNA is het gewenst de viscositeitsmetingen uit te voeren bij concentraties die zo laag mogelijk zijn, omdat de onzekerheid bij extrapolatie naar $h = 0$ hierdoor vermoedelijk iets kleiner wordt (zie figuur 6 en 7).
- 6) De DNA concentraties werden bepaald uit spectrofotometrische waarnemingen indien geen gegevens beschikbaar waren die gebaseerd waren op metingen in de ultracentrifuge. In alle gevallen is de invloed van laagmoleculaire verontreinigingen op de viscositeit van de oplossing verwaarloosd. De extinctie bij $260 m\mu$ ten gevolge van de verontreinigingen was doorgaans zeer gering of niet waarneembaar en bedroeg incidenteel 10 à 20% van de totale extinctie.
- 7) Het niet-Newtonse gedrag van DNA oplossingen neemt af als het

molecuulgewicht afneemt. Dit is te zien door vergelijking van de bovenste curve uit figuur 6 met de middelste curve uit figuur 7, die betrekking hebben op DNA oplossingen van bijna gelijke concentratie.

HOOFDSTUK 6

BEPALING VAN DE SEDIMENTATIECOEFFICIENT VAN T4-DNA

6.1. *Sedimentatie-anomalieën bij hoge toerentallen.*

Reeds kort na het gereedkomen van het ultraviolet absorptie systeem en de foto-elektrische registratiemethode (omstreeks 1958) werden tijdens sedimentatie-experimenten met DNA, geïsoleerd uit kalf thymus of uit Haemophilus influenzae, onverwachte afwijkingen waargenomen waarvan in de literatuur geen melding was gemaakt.

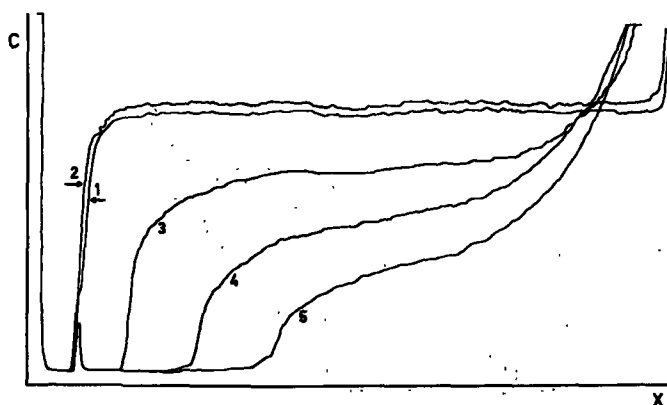
In eerste instantie vielen twee verschijnselen op:

- a) De concentratie van de oplossing in de ultracentrifugecel voorbij de grenslaag (het plateaugebied) verminderde snel tijdens het centrifugeren. Deze concentratie daling was aanmerkelijk groter dan op grond van radiale verdunning (ten gevolge van de sectorvorm van de cel en het met de afstand tot het rotatiecentrum lineair toenemende centrifugale veld) verklaard kon worden. Dit verschijnsel wordt verder plateaudaling genoemd.
- b) De concentratiegradiënt in de grenslaag, die aanvankelijk groot was, werd voortdurend kleiner om tenslotte praktisch nul te worden. Deze effecten bleken, althans kwalitatief, reproduceerbaar te zijn.

Het lag voor de hand in de eerste plaats te denken aan een fout in het zelfgebouwde optische systeem, doch reeds spoedig bleek dat dit niet het geval kon zijn. Bij lagere toerentallen van de rotor werd namelijk een sedimentatiepatroon geregistreerd, zoals dat voor betrekkelijk homogene stoffen verwacht mocht worden, terwijl in dit geval de concentratievermindering in het plateaugebied geheel verklaard kon worden met het radiale verdunningseffect. Hoewel het blijkbaar mogelijk was de experimentele omstandigheden zodanig te kiezen dat de storende effecten ge-

elimineerd werden, waren aan het gebruik van een lager toerental van de ultracentrifuge bezwaren verbonden in verband met het kleine scheidend vermogen en de lange duur van de experimenten. Daarom werd een aantal proeven uitgevoerd om te trachten een verklaring voor de plateaudaling te vinden. Dit leverde de volgende experimentele gegevens.

- 1) Plateaudaling werd waargenomen tijdens experimenten bij hogere toerentallen zowel met de Phywé- (figuur 9) als met de Spinco-ultracentrifuge (figuur 10). De Spinco cel heeft uitwendig een kleinere diameter en een grotere hoogte dan



Figuur 9

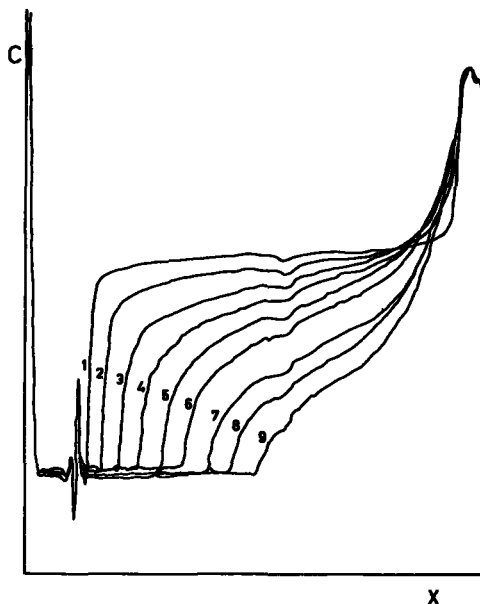
Plateaudaling in Phywé ultracentrifuge.

Beginconcentratie 40 $\mu\text{g/ml}$. Tijdsinterval 5 minuten.

Toerentallen: 25.500 rpm (1), 39.000 rpm (2), 45.000 rpm (3-5).

de Phywé cel. De cellen zijn derhalve niet zonder meer te verwisselen. Daarom werd om een Spinco cel een aluminium huls gemaakt van zodanige afmetingen dat de uitwendige diameter overeen kwam met de diameter van één Phywé cel. Hoewel de Spinco cel enkele millimeters boven de Phywé rotor uitstak werd een sedimentatie-experiment uitgevoerd bij 30.000 rpm, zonder zichtbare schade. Ook hierbij trad plateaudaling op. De conclusie is dus gerechtvaardigd dat de verschijnselen niet aan een bepaald type ultracentrifuge of een bepaald type cel toegeschreven moeten worden.

Hierbij moet echter worden opgemerkt dat kwalitatief en kwantitatief enkele verschillen werden waargenomen. In de Phywé ultracentrifuge werd in het algemeen de concentratiegradiënt tussen oplossing en oplosmiddel in sterkere mate verstoord dan in de Spinco ultracentrifuge. De sedimentatiecoëfficiënt, gemeten in de Phywé ultracentrifuge bij een toerental waarbij geen plateaudaling optrad, was groter dan



Figuur 10

Plateaudaling in Spinco ultracentrifuge.
 Beginconcentratie 40 $\mu\text{g/ml}$. Tijdsinterval 2 minuten.
 Toerental 44.700 rpm (1 - 9).

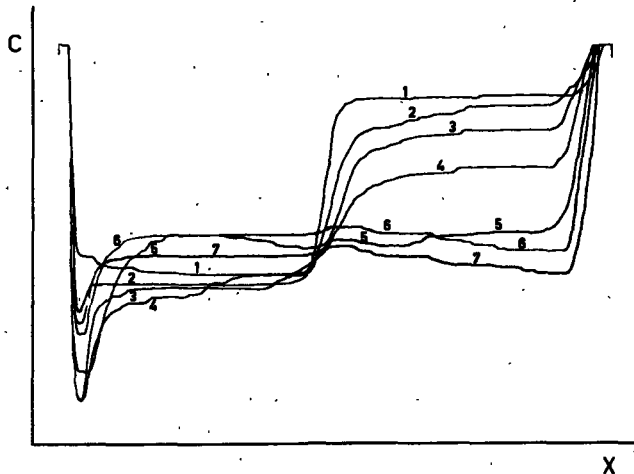
die gemeten bij een toerental waarbij plateaudaling werd waargenomen. Met de Spinco ultracentrifuge werd meestal een toename van s geconstateerd bij toenemend toerental. Dit laatste is in overeenstemming met de resultaten die door verscheidene auteurs werden vermeld (Hearst en Vinograd, 1961; Burgi en Hershey, 1961; Eigner, Schildkraut en Doty, 1962).

De reproduceerbaarheid van de gemeten s-waarde is naar onze ervaring echter slecht indien plateaudaling optreedt, zodat het moeilijk is een relatie tussen schijnbare s-waarde en toerental vast te stellen. Wellicht is hierin ten dele een verklaring te vinden voor de verschillen in de resultaten van diverse laboratoria (zie 6.2.).

- 2) De Phywé rotor bevat in het onderste gedeelte een klein kogellagertje voor de demping van zijwaartse bewegingen. Dit lager wordt slechts zeer weinig belast als de rotor en de cellen goed uitgebalanceerd zijn. Reiniging en nauwkeurig invetten van dit kogellagertje, vervanging door een nieuw exemplaar en nauwkeurig uitbalanceren van de cel en het contragewicht (verschil kleiner dan 0,2 mg) hadden geen vermindering van de plateaudaling ten gevolge. De tachometer, die een aantal kogellagers bevat, werd tijdens een ander experiment verwijderd. Hoewel in dit geval het toerental van de rotor uiteraard niet nauwkeurig bekend was doch slechts bij benadering uit de luchtdruk op de turbine kon worden afgeleid, bleek ook onder deze omstandigheden een vergelijkbare plateaudaling op te treden.
- 3) DNA dat gemerkt was met ^{32}P werd bij een hoog toerental enige tijd gecentrifugeerd. De radioactiviteit die daarna in de vloeistof gemeten werd, kwam overeen met hetgeen uit extinctiemetingen berekend was. De rest van de radioactiviteit werd kwantitatief teruggevonden op de bodem van de cel.
- 4) Op 3 manieren werd de concentratie van een DNA oplossing verlaagd tot ongeveer 50% van de oorspronkelijke waarde, namelijk door verdunning, door onvolledige sedimentatie bij een hoog toerental in een preparatieve centrifuge (Spinco, model L) en door sedimentatie in de analytische ultracentrifuge (plateaudaling). De drie oplossingen werden daarna gesedimenteerd in de Phywé ultracentrifuge bij 15.000 rpm. De gemeten sedimentatiecoëfficiënten bleken, na een kleine correctie voor concentratie verschillen (zie 6.2.), aan elkaar gelijk te zijn. Hieruit volgt dat de plateaudaling voor ongebroken moleculen geen belangrijke fractionering van het materiaal naar molecuulgrootte teweegbrengt.
- 5) Door Davison en Freifelder (1962) werden met DNA, geïsoleerd uit de bacteriofaag T7, een scherpere concentratiegradiënt

en een beter reproduceerbare sedimentatiecoëfficiënt waargenomen als het oplosmiddel 1 M aan NaCl was dan bijvoorbeeld in een 0,2 M NaCl oplossing. De plateaudaling kon in ons geval echter niet verhinderd worden door de hoge zoutconcentratie, hoewel enige verbetering waarneembaar was: de concentratievermindering per tijdseenheid was kleiner en de concentratiegradiënt tussen oplossing en oplosmiddel werd minder verstoord.

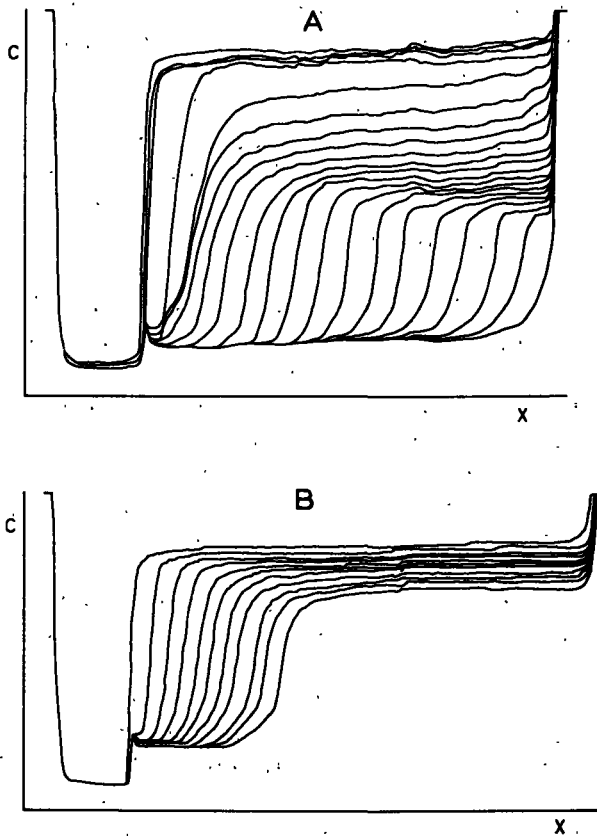
- 6) Een cel waarin kunstmatig een stelle concentratiegradiënt aangebracht kan worden ("synthetic boundary" cel, Meyerhoff, 1955) werd gevuld met DNA oplossingen die ongeveer 20 en 45 $\mu\text{g/ml}$ bevatten. Bij een laag toerental (15.000 rpm) werd een normale sedimentatie waargenomen, waarbij twee concentratiegradiënten duidelijk te volgen waren. Bij een hoog toerental werden de in figuur 11 getekende curven gevonden. De opnamen 1 - 3 werden gemaakt tijdens het versnellen van de rotor. Uit deze figuur blijkt dat aanvankelijk de concentratie zowel in het bovenste als in het onderste deel van de cel snel afnam waarbij nog een zich



Figuur 11

Proef met "synthetic boundary" cel. Voor verklaring zie tekst.

verplaatsende concentratiegradiënt in beide delen van de cel waarneembaar was (curve 2, 3 en 4). Daarna trad een snelle concentratiedaling in het aan de bodem grenzende celdeel op, gepaard gaande met een concentratie toename in het aan de meniscus grenzende deel (curve 5) waarbij de concentratie toenam tot waarden boven de oorspronkelijke concentratie in dit deel. Tenslotte was een situatie ontstaan alsof de cel gevuld was met een homogene vloeistof en zette de concentratieafname zich gelijkmatig door de hele cel voort.



Figuur 12

Sedimentatie van bacteriofaag ØX 174 - 114 S deeltjes.

A bij 36.000 rpm, B bij 15.000 rpm.

Dit wijst op het optreden van convecties, waardoor de gehele cel-inhoud vrij intensief wordt gemengd. Op de vraag waardoor convecties kunnen optreden gaf dit experiment echter geen antwoord.

- 7) Om na te gaan of de waargenomen anomale effecten alleen optraden tijdens de sedimentatie van DNA werden experimenten uitgevoerd met ribosomen (s-waarde ongeveer 50). Ook hierbij werd plateaudaling waargenomen.

Eveneens werden proeven gedaan met deeltjes van de bacteriofaag ϕ X 174 die een sedimentatiecoëfficiënt van 114 S hebben. Deze deeltjes, geïsoleerd door sedimentatie in een RbCl-gradiënt (Sinsheimer, 1959), zijn nagenoeg bolvormig. Een sedimentatie-experiment bij 36.000 rpm toonde aan dat ook hierbij plateaudaling optrad (figuur 12 A), terwijl bij 15.000 rpm (zie figuur 12 B) de concentratie vermindering in het plateaugebied vrijwel geheel verklaard kon worden door het radiale verdunningseffect. Hieruit blijkt dat de vorm van de DNA moleculen in oplossing niet de oorzaak van de verschijnselen kan zijn.

- 8) Uit de figuren 9 en 10 is te zien dat zowel in de Spinco als in de Phywé-ultracentrifuge onder bepaalde omstandigheden een ophoping van DNA op vrij grote afstand van de bodem optreedt ("pile-up-effect", Rosenbloom en Schumaker, 1963). Dit effect is niet waargenomen bij de sedimentatie van de bacteriofaag ϕ X 174 - 114 S. Met T4-DNA werd het waargenomen als de concentratie van de oplossing waarmee de cel gevuld werd tamelijk groot was en/of de sedimentatie bij een hoog toerental werd verricht.
- 9) Een verschijnsel dat doorgaans slechts gedurende hoogstens enkele opnamen te zien was en derhalve misschien vaker optrad dan het werd waargenomen, zou te beschrijven zijn als een plaatselijke en tijdelijke concentratiedaling op korte afstand tot de bodem van de cel (zie figuur 13 B, opnamen 6 - 9). Hoewel een optisch effect (bijvoorbeeld reflectie van ultraviolet licht aan het op de cel-bodem gecomprimeerde laagje DNA) niet is uit te sluiten ligt het meer voor de hand een verklaring te zoeken in combinatie met het onder 8) vermelde. Rosenbloom en Schumaker (1963) vermelden namelijk bij het "pile-up-effect" dat dit effect met de tijd afneemt, alsof het materiaal langzaam op de bodem van de

cel wordt samengeperst. Een sluitende verklaring voor dit effect werd nog niet gevonden.

- 10) Plateaudaling werd waargenomen zowel met ongebroken als met gedegradeerde DNA moleculen. Wel was het toerental waarbij het effect optrad afhankelijk van het molecuulgewicht van het DNA. Ongebroken T4-DNA gaf het effect zeer zelden bij toerentallen kleiner dan of gelijk aan 15.000 rpm, terwijl het bij 24.000 rpm (en hoger) altijd werd waargenomen. Bij 18.000 of 21.000 rpm trad het nu eens wel, dan weer niet op. Bij preparaten van gedegrademd DNA lag het overgangsgebied bij hogere toerentallen.

Er schijnt een kritisch toerental te zijn waar beneden het effect niet optreedt. Dit kritische toerental is groter naarmate het molecuulgewicht van het DNA kleiner is.

Het DNA, geïsoleerd uit de bacteriofaag ØX 174 (114 S deeltjes) onderscheidt zich in meer dan één opzicht van T4-DNA: het molecuulgewicht is slechts $1,7 \times 10^6$ en het is een enkele keten. Met ØX-DNA werd in de Phywé ultracentrifuge soms plateaudaling gevonden, soms niet. In de Spinco ultracentrifuge is met dit materiaal nooit plateaudaling geconstateerd, noch in 12 mm, noch in 30 mm cellen. Het toerental was hierbij (ongeveer) 45.000 rpm. Uit deze experimentele gegevens is echter niet ondubbelzinnig tot een essentieel, hoogstens tot een gradueel verschil tussen beide instrumenten te besluiten.

- 11) Onder punt 1) werd reeds vermeld dat de waarde van de sedimentatiecoëfficiënt slecht reproduceerbaar was zodra plateaudaling optrad en dat in de Phywé ultracentrifuge een verlaging van de s-waarde werd geconstateerd (het aantal vergelijkbare experimenten met een Spinco ultracentrifuge is te klein om deze in de onderstaande beschouwing te betrekken). Belangrijker echter dan de s-waarde is de vorm van de curve die men verkrijgt door $\ln x$ uit te zetten als functie van de tijd ((t, $\ln x$)-curve). Voor een betrouwbaar sedimentatie-experiment moet dit een rechte lijn zijn (waaruit echter niet geconcludeerd mag worden dat een rechte lijn een betrouwbaar antwoord garandeert). In vele gevallen bleek de (t, $\ln x$)-curve aanvankelijk inderdaad recht te zijn, om echter in de loop van het experiment of naar boven of naar beneden af te buigen waarna dikwijls op-

nieuw een rechte lijn met een grotere respectievelijk kleinere helling werd gevonden. Door vergelijking van een groot aantal experimenten is gebleken dat met ongebroken DNA moleculen altijd een opwaartse afwijking optreedt (dit wil zeggen $\ln x$ gaat tijdens een experiment sneller toenemen met de tijd). Met matig gebroken DNA preparaten kan zowel een afwijking naar boven als naar beneden voorkomen, terwijl voor preparaten die meer zijn gedegradéerd altijd een afbuiging naar beneden wordt gevonden (dit wil zeggen $\ln x$ gaat tijdens een experiment langzamer toenemen met de tijd).

Vooruitlopend op de resultaten die in de volgende paragraaf vermeld zullen worden is hiervoor de volgende verklaring te geven:

Indien de convecties niet zo hevig zijn dat de vorming van een concentratiegradiënt volledig wordt verhinderd (in dat geval kan uiteraard geen enkele s -waarde berekend worden), wordt de verplaatsing van die gradiënt wel zodanig belemmerd dat de schijnbare s -waarde te laag is. Naarmate de concentratie door de plateaudaling verder afneemt, neemt de s -waarde toe (zie 6.2), waardoor een afwijking van de $(t, \ln x)$ -curve naar boven wordt bewerkstelligd. Vrij ver gedegradéerde preparaten bevatten altijd nog een fractie ongebroken of in mindere mate gebroken moleculen, die sedimenteren zonder dat een duidelijke concentratiegradiënt te zien is (Markham, 1962). Doordat deze moleculen door convectie en depositie op de bodem langzamerhand uit de oplossing verdwijnen, verandert niet alleen de concentratie in het plateaugebied doch neemt ook de gemiddelde s -waarde af, resulterend in een naar beneden afbuigende $(t, \ln x)$ -curve.

Voor de matig gedegradéerde preparaten kan zowel het één als het ander optreden, afhankelijk van het toerental van de rotor en de grootte-distributie van de moleculen in het preparaat.

- 12) Indien convecties de oorzaak zouden zijn van de plateaudaling zouden deze veroorzaakt kunnen worden door dichtheidsverschillen ten gevolge van temperatuurgradiënten (Claesson, 1963). Immers, verwarming van de rotor door wrijving met gasmoleculen vindt in hoofdzaak plaats aan de buitenomtrek van de rotor, omdat hier de lineaire snelheden het grootst zijn. Bovendien kan enige afkoeling in het

centrum van de rotor optreden door adiabatiscie expansie (Waugh en Yphantis, 1952) hoewel dit effect zeer klein is. Deze effecten zouden tot gevolg hebben dat de vloeistof met de hoogste temperatuur, dus de kleinste dichtheid, zich aan de bodem van de cel bevindt. Dat dit aanleiding geeft tot instabiliteit behoeft geen betoog.

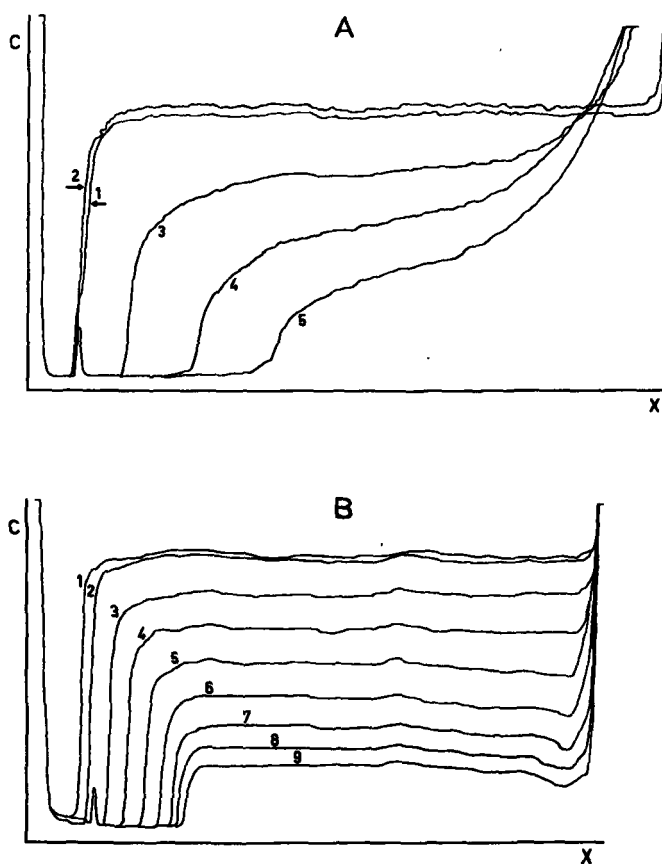
Om na te gaan of de oorzaak van de plateaudaling hierin gevonden kon worden, werd getracht de eventueel in de cel aanwezige temperatuurgradiënt te elimineren of zelfs van richting om te keren, waardoor een stabiliserende werking zou worden verkregen. Daartoe werd de koelspiraal uit de vacuümkamer van de Phywé ultracentrifuge vervangen door een andere, waarvan de diameter groter is en de noodzakelijke bochten gelijkmatiger verlopen. Het resultaat was dat met de pomp van het beschikbare koude bad veel meer vloeistof per tijdseenheid door de spiraal gepompt kon worden.

De vacuümkamer werd vóór een proef gekoeld, terwijl de rotor op kamertemperatuur was. Door het verschil tussen bad- en kamertemperatuur en door de druk van het waterstofgas in de vacuümkamer goed in te stellen, bleek het mogelijk de rotortemperatuur tijdens een proef naar verkiezing constant te houden dan wel af te doen nemen.

De resultaten van twee proeven zijn in figuur 13 weergegeven. Figuur 13 A toont een experiment tijdens welke de temperatuur van de rotor iets toenam. Figuur 13 B toont een vergelijkbare proef, echter nu met een iets dalende rotortemperatuur.

De DNA ophoping vermeld in punt 9) is in figuur 13 A duidelijk te zien, doch is in figuur 13 B afwezig. De afname van de concentratie per tijdseenheid in het plateaugebied is bij proef A aanzienlijk groter dan bij proef B.

- 13) Door de volgende proef is aangetoond dat temperatuurgradiënten dichtheidsverschillen kunnen veroorzaken die plateaudaling tot gevolg hebben. De Phywé rotor en de met een oplossing van ongebroken DNA moleculen gevulde cel werden afgekoeld tot een paar graden beneden de temperatuur van de koelspiraal in de vacuümkamer. Direct na het monteren van de rotor werd het toerental op 15.000 rpm gebracht. De concentratievermindering in het plateaugebied was nu bij dit toerental duidelijk waarneembaar. Hieruit blijkt dat de



Figuur 13

Sedimentatie van DNA bij stijgende en dalende rotortemperatuur.

A Temperatuur stijgend. Tijdsinterval 5 minuten.

Toerentallen: 25.500 rpm (1), 39.000 rpm (2), 45.000 rpm (3 - 5).

B Temperatuur dalend. Tijdsinterval 5 minuten.

Toerentallen: 4.500 rpm (1), 25.000 rpm (2), 42.000 rpm (3 - 9).

plateaudaling kan worden veroorzaakt door de temperatuurgradiënt opzettelijk ongunstig in te stellen.

Alvorens nader in te gaan op de interpretatie van de beschreven experimenten moeten enkele gegevens uit de literatuur worden vermeld.

Hearst en Vinograd (1961) beschouwden alleen de verandering van de concentratiegradiënten, omdat de hoogte van de lijn die de concentratie in het plateaugebied aangeeft, bij gebruik van de fotografische registratiemethode beïnvloed wordt door de soort film en de omstandigheden waaronder de film ontwikkeld wordt. Deze helling bleek af te nemen met toenemend toerental van de rotor en met toenemende DNA concentratie. Met TMV werd het tegengestelde waargenomen. Een bevredigende verklaring is door deze auteurs niet gevonden, doch enkele aspecten worden besproken. De belangrijkste hiervan zijn: convecties worden als mogelijke oorzaak uitgesloten geacht onder andere omdat voor de diffusiecoëfficiënt van desoxyadenylzuur, gemeten in de ultracentrifuge (met behulp van een "synthetic boundary" cel) een goede waarde werd gevonden. Invloed van de hydrostatische druk op de sedimentatie van DNA en het optreden van een druk afhankelijke aggregaatforming worden onwaarschijnlijk geacht, evenals het richten van niet-bolvormige moleculen onder invloed van hydrodynamische krachten.

Thomas en Berns (1961) noemen "the appearance of a disturbing effect of rotor speed on the sedimentation coefficient of high molecular weight DNAs and dextrans", terwijl Thomas en Pinkerton (1962) vermelden dat "T2 molecules show a pronounced sloping of the "plateau"", daarmee vermoedelijk doelend op de onder punt 8) vermelde ophoping van DNA aan de bodemzijde van de cel. Davison en Freifelder (1962) hebben een soortgelijk effect geconstateerd met DNA uit de bacteriofaag T7. Deze auteurs zijn van mening dat "the (unexplained) anomaly reflects boundary instability".

Rosenbloom en Schumaker (1963) hebben de plateaudaling uitvoerig onderzocht met behulp van ongebroken T4-DNA en concluderen tot "a phase transition which occurs in the presence of a high centrifugal field". Bij hun experimenten werd in de cel van de ultracentrifuge een stabiliserende concentratiegradiënt van sucrose (4,1 - 6,3%) aangebracht om storingen ten gevolge van convecties te voorkomen. Voor "controle"-experimenten werd een

oplosmiddel gebruikt dat 5% sucrose bevatte. Merkwaardigerwijze vonden zij bij gebruik van de gradiënt een sedimentatiepatroon, dat veel overeenkomst vertoont met het onze in geval van sterke plateaudaling (zie bijvoorbeeld figuur 13 A), terwijl de controle-experimenten een in onze ogen minder abnormaal beeld te zien gaven, vergelijkbaar met bijvoorbeeld figuur 13 B. Deze discrepantie is vooralsnog onverklaarbaar.

Burgi en Hershey (1963) veronderstellen de aanwezigheid van aggregaten in DNA oplossingen. De invloed van convecties door temperatuurgradiënten is door deze auteurs als volgt aangetoond: de sedimentatiecoëfficiënt werd kleiner en de concentratiegradiënt steiler door de rotor tijdens de proef langzaam te verwarmen (bij de Spinco ultracentrifuge gebeurt dit door middel van een weerstandsdraad die zich tamelijk dicht bij het centrum van de rotor bevindt. De omstandigheden waren dus vergelijkbaar met de onder punt 12) genoemde). De sedimentatie van gebroken DNA moleculen werd niet beïnvloed. Het toerental van de rotor en het molecuulgewicht van het gebroken DNA wordt niet vermeld. Kwalitatief zijn de genoemde experimenten echter geheel in overeenstemming met onze resultaten.

Indien alle beschikbare experimentele gegevens worden vergeleken, blijkt een bevredigende verklaring voor de gevonden anomalieën nog niet mogelijk. Onze experimenten wijzen echter sterk in de richting van convectie als voornaamste oorzaak.

6.2. *Sedimentatie-experimenten bij 15.000 rpm.*

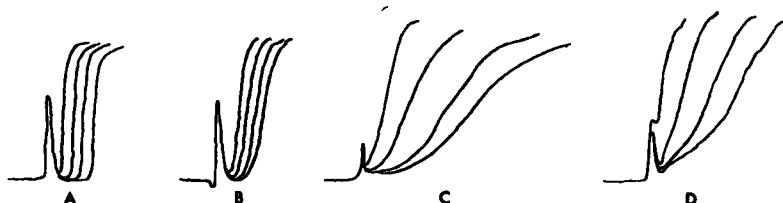
Om het optreden van de in de vorige paragraaf beschreven anomale effecten te voorkomen, werden de meeste sedimentatie-experimenten uitgevoerd bij een toerental van 15.000 rpm. Hiertegen zijn in principe twee bezwaren aan te voeren, namelijk een mogelijke instabiliteit van de concentratiegradiënt en het betrekkelijk kleine scheidend vermogen, dat immers evenredig is met het kwadraat van het toerental (Svedberg en Pedersen, 1940).

Wat het eerste bezwaar betreft: Door Eigner (1960) is vermeld dat een toerental kleiner dan 20.000 rpm aanleiding geeft tot instabiliteit. Door andere auteurs (bijvoorbeeld Hearst en Vinograd, 1961; Rosenbloom en Schumaker, 1963) zijn echter expe-

rimenten beschreven bij toerentallen kleiner dan 10.000 rpm, waarbij zich geen problemen voordeden die op instabiliteit wezen. Onze ervaring is met dit laatste geheel in overeenstemming.

Met betrekking tot het tweede bezwaar: Een klein scheidend vermogen zou tot gevolg kunnen hebben dat een preparaat, op grond van de vorm van de concentratiegradiënt tijdens sedimentatie, beschouwd werd als een homogeen, vrijwel monodispers systeem, terwijl het in werkelijkheid paucidispers of polydispers zou kunnen zijn.

In hoeverre de concentratiegradiënten, geregistreerd bij 15.000 rpm, een indruk geven van de sedimentatiecoëfficiënten-distributie, zal hierna nog ter sprake komen. Een kwalitatieve indruk verkrijgt men echter reeds door onderlinge vergelijking van concentratiegradiënten van DNA preparaten die op verschillende manieren zijn afgebroken. In figuur 14 zijn een aantal voorbeelden van waargenomen concentratiegradiënten getekend. A geeft een



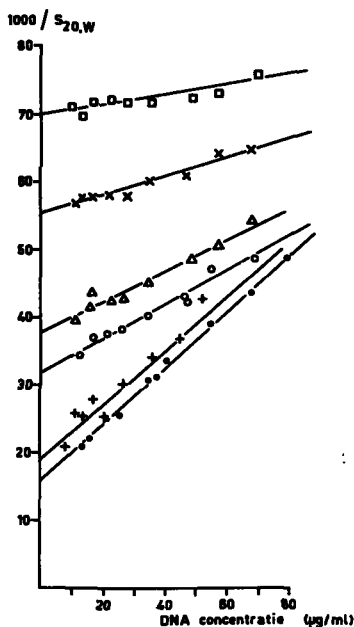
Figuur 14

Concentratieverloop in de grenslaag tijdens sedimentatie van

- A ongebroken DNA moleculen
- B gebroken DNA moleculen
- C DNA na behandeling met DNase
- D DNA na blootstelling aan ultrasonore trillingen.

beeld van de sedimentatie van DNA dat zo voorzichtig mogelijk uit de bacteriofaag T4 is geïsoleerd. B heeft betrekking op hetzelfde preparaat nadat hydrodynamische schuifspanningen breuk hebben teweeggebracht. Omdat de moleculen hierbij ongeveer in het midden gebroken worden (Levinthal en Davison, 1961) moeten deze preparaten tamelijk homogeen zijn. C en D geven een indruk van het effect van de inwerking van DNase en ultrasonore trillingen waarbij

breuken op willekeurige plaatsen in de moleculen zijn aangebracht. Hieruit blijkt dat het scheidend vermogen van de ultracentrifuge bij 15.000 rpm groot genoeg is om belangrijke verschillen in heterogeniteit van de DNA preparaten aan te tonen.



Figuur 15

Sedimentatiecoëfficiënten van ongebroken en gebroken T4-DNA moleculen bij verscheidene concentraties.

Toerental 15.000 rpm.

- Ongebroken DNA (Tabel II, preparaat no. 6).
- + Gebroken DNA (Tabel II, preparaat no. 9).
- Gebroken DNA (Tabel II, preparaat no. 12).
- △ Gebroken DNA (Tabel II, preparaat no. 13).
- x Gebroken DNA (Tabel II, preparaat no. 15).
- Gebroken DNA (Tabel II, preparaat no. 16).

Naast de invloed van het registrerende ultraviolet absorptie systeem op de schijnbare breedte van de concentratiegradiënt tijdens sedimentatie, die reeds onder 4.2.4. is besproken, is er

nog een factor die deze breedte kan beïnvloeden, namelijk de diffusie van DNA moleculen. Door Fleischman (1960) is aangetoond dat de verbreding van de concentratiegradiënt door diffusie niet geheel verwaarloosbaar doch wel klein is. De invloed van diffusie verschijnselen op de waarde van $s_{20,w}$ is zo gering dat zelfs voor heterogene preparaten hiermee geen rekening behoeft te worden gehouden.

De waarden van $1/s_{20,w}$ als functie van de DNA concentratie zijn voor een aantal intacte en gebroken preparaten weergegeven in figuur 15. Zoals reeds eerder werd opgemerkt (zie 2.1.2.) zijn de concentraties in het algemeen gebaseerd op waarnemingen, verricht met het registrerende ultraviolet absorptie systeem van de Phywé ultracentrifuge. De nauwkeurigheid waarmee deze concentratie bekend is, bepaalt de spreiding van de punten om de in figuur 15 getekende rechten.

Experimenten in duplo (met monsters uit dezelfde homogene DNA oplossing) leverden $s_{20,w}$ -waarden, die altijd minder dan 1%, vaak zelfs minder dan 0,1 Svedberg-eenheid, verschilden. Daarentegen bleken de sedimentatiecoëfficiënten van DNA in oplossingen met dezelfde concentratie, afkomstig van verschillende verdunningen van één preparaat, vaak enkele Svedberg-eenheden (tot ongeveer 5%) te verschillen. Dit is vermoedelijk voor een deel toe te schrijven aan de moeilijkheid van een nauwkeurige concentratiebepaling, welke uiteraard des te meer invloed heeft naarmate s sterker van c afhangt.

Indien uitsluitend de naar $c=0$ geëxtrapoleerde waarde s_0 gezocht wordt, kan een nauwkeuriger resultaat bereikt worden door de concentraties te berekenen uit de gebruikte verdunningsfactoren en $1/s_{20,w}$ uit te zetten tegen de relatieve concentraties. De spreiding van de meetpunten om een rechte lijn wordt hierdoor aanmerkelijk kleiner.

De waarden van s_0 , ten dele berekend met behulp van de methode der kleinste kwadraten, en bijbehorende 95% betrouwbaarheidsgrenzen zijn voor een aantal preparaten vermeld in tabel II, kolom (3) en (4).

De concentratie-afhankelijkheid van $s_{20,w}$ wordt in de literatuur herhaaldelijk beschreven. De conclusies zijn echter niet eensluidend, zowel ten aanzien van de vorm van een (c,s) - of $(c, 1/s)$ -curve als wat de helling van een (eventuele) rechte betreft. Een volledige opsomming van de tegenstrijdigheden is bijna onmo-

gelijk. Enkele recente gegevens mogen echter niet onvermeld blijven.

Fleischman (1960) nam in navolging van Litt (1958) aan dat $s_{20,w}$ slechts weinig afhankelijk was van de concentratie. Voor het door hem gebruikte, vermoedelijk sterk gebroken materiaal was deze veronderstelling wellicht gerechtvaardigd. Thomas en Pinkerton (1962) vonden echter voor ongebroken T2-DNA ook een vrijwel constante $s_{20,w}$ -waarde, waarvan de grootte over een groot concentratietraject overeenkomt met onze s_0 -waarde. Vermoedelijk speelde de plateaudaling ten gevolge van het hoge toerental dat deze auteurs bij hun experimenten gebruikten hierbij een rol, waardoor (zie 6.1) met de Spinco ultracentrifuge te grote s -waarden worden gevonden. Vele anderen hebben de laatste tijd hun s -waarden gemeten bij een lager toerental van de rotor en komen tot resultaten die in redelijke tot zeer goede overeenstemming zijn met het in figuur 15 voor intact DNA weergegevene, zowel wat de helling van de lijnen als de naar $c=0$ geëxtrapoleerde s -waarden betreft (Eigner, Schildkraut en Doty, 1962; Schumaker en Bennett, 1962; Rosenbloom en Schumaker, 1963; Davison en Freifelder, 1964; Crothers en Zimm, 1965). De resultaten, vermeld door Hearst en Vinograd (1961), wijken echter op verscheidene punten van deze gegevens af. De redenen hiervan zijn niet duidelijk. Ook de curven van Ganguli en Bhattacharyya (1962) vertonen geen gelijkenis met onze resultaten.

Voor vele polymeren wordt dikwijls de relatie tussen $s_{20,w}$ en c als volgt weergegeven:

$$1/s_{20,w} = (1 + K_s c)/s_0$$

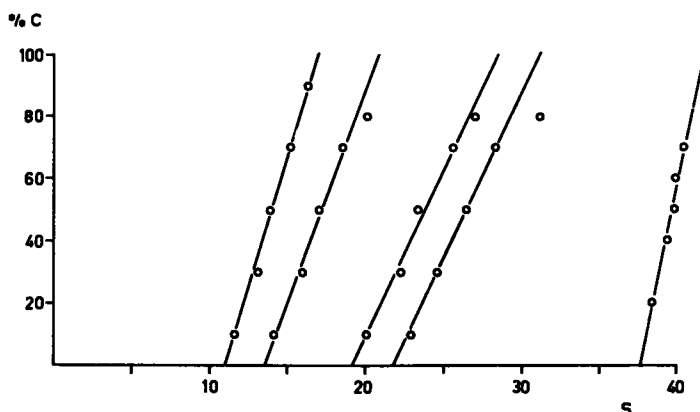
waarin K_s een constante voorstelt. Eigner, Schildkraut en Doty (1962) hebben aangetoond dat de waarde van $K_s/[\eta]$ nagenoeg constant is voor een groot traject van molecuulgewichten ($M < 15 \times 10^6$) en wel gelijk aan $0,80 \pm 0,10$. Zowel de waarden van K_s als van $K_s/[\eta]$ zijn voor een aantal preparaten vermeld in tabel II, kolom (5) en (6). De gemiddelde waarde van $K_s/[\eta]$ is 0,97. Zoals uit de tabel blijkt is er in het door Eigner, Schildkraut en Doty beschouwde gebied van molecuulgewichten een goede overeenstemming, terwijl er geen duidelijke afhankelijkheid van het molecuulgewicht blijkt te bestaan.

Uit statistische berekeningen, die werden uitgevoerd door Dr M. Wijnans, waren de volgende conclusies te trekken:

- a) Over het onderzochte concentratietraject (ongeveer 10 tot 70 $\mu\text{g/ml}$) is een lineaire relatie tussen $1/s$ en c een zeer goede benadering.
- b) Er is een duidelijk afnemende helling met afnemende molecuulgrootte, hoewel het verschil in helling voor twee preparaten, die weinig in molecuulgewicht verschillen, niet altijd significant is.
- c) De reproduceerbaarheid van de $s_{20,w}$ -waarden is zeer goed; de grote waarde van het 95% betrouwbaarheidsinterval wordt veroorzaakt door de onnauwkeurigheid van de concentratiemeting. Als gevolg van het verband tussen $s_{20,w}$ en c is het in het algemeen zinloos sedimentatiecoëfficiënten met decimalen op te geven.
- d) s_0 -waarden van ongebroken DNA preparaten, door verschillende personen dan wel op verschillende tijdstippen geïsoleerd, zijn niet significant verschillend; met andere woorden de gebruikte isolatieprocedure levert onderling vergelijkbare DNA preparaten.

Zoals onder 2.1.2. werd meegedeeld zijn de sedimentatiecoëfficiënten berekend voor het 50% punt van de concentratie tijdens sedimentatie. Het is vanzelfsprekend even goed mogelijk sedimentatiecoëfficiënten te berekenen voor andere relatieve concentraties. Deze s -waarden kunnen een indruk geven van de heterogeniteit van de preparaten mits de invloed van diffusieverschijnselen verwaarloosd mag worden. Voor enkele experimenten zijn de $s_{20,w}$ -waarden berekend voor zoveel mogelijk relatieve concentraties. De resultaten zijn weergegeven in figuur 16. Hieruit volgt dat na breuk ten gevolge van schuifspanningen het percentage ongebroken moleculen gering moet zijn. Bovendien blijkt uit de helling van de lijnen dat de heterogeniteit van de preparaten ten gevolge van schuifspanningen eerst toeneemt, terwijl preparaten die aan grote schuifspanningen werden blootgesteld weer minder heterogeen zijn. Dit zou ook te verwachten zijn als de breuk ongeveer in het midden van het molecuul c.q. brokstuk plaatsvindt. Deze waarnemingen zijn bevestigd door Van der Schans en Knijnenburg (1964) die zonecentrifugatie uitvoerden in een oplosmiddel waarin door middel van sucrose een viscositeits- en dichtheidsgradiënt was aangebracht. Bij gebruik van deze methode is de

breedte van de zone een maat voor de heterogeniteit in molecuulgrootte. Deze breedte bleek voor ongebroken en sterk gedegradeerde moleculen veel kleiner te zijn dan voor de matig gebroken preparaten. Aangezien er een duidelijke relatie tussen sedimentatiecoëfficiënt en molecuulgewicht bestaat (hiervoor zijn vele argumenten aan te voeren), volgt hieruit dat het concentratieverloop



Figuur 16

Sedimentatiecoëfficiënten van ongebroken en gebroken T4-DNA moleculen bij enkele relatieve concentraties. 100% correspondeert met ongeveer 20 $\mu\text{g/ml}$. Molecuulgewichten (van rechts naar links) ongeveer 130, 20, 13, 5 en 2 miljoen.

in de grenslaag tijdens sedimentatie, ook bij 15.000 rpm, een indruk geeft van de heterogeniteit van de preparaten.

Het feit dat de concentratie van ongebroken DNA moleculen de waarde van $s_{20,w}$ sterk beïnvloedt, heeft een fout ten gevolge waarvoor, voor zover ons bekend, nooit wordt gecorrigeerd. Door de radiale verdunning neemt de DNA concentratie tijdens een experiment namelijk voortdurend af, zodat de momentane waarde van de sedimentatiecoëfficiënt moet toenemen. Hoewel de $(t, \ln x)$ -curve recht blijkt te zijn, zal de helling van deze rechte iets te groot zijn. Immers, het verdunningsproces voltrekt zich gelijkmatig, waardoor de afwijking van de punten van de ware rechte groter wordt naarmate t toeneemt. Berekenen we de verandering van $s_{20,w}$ voor een bepaalde situatie, bijvoorbeeld als de concentratiegradiënt zich halverwege de sedimentatieweg in de ultracentri-

fugecel bevindt (dit wil zeggen de concentratie bedraagt nog ongeveer 80% van de oorspronkelijke waarde), met behulp van de vergelijking $1/s = (1 + K_s c)/s_0$ en $K_s = 3,2 \times 10^{-2}$ (voor een intact preparaat), dan blijken voor concentraties van 40, 20, 10 en 5 $\mu\text{g/ml}$ de s -waarden respectievelijk ongeveer 27, 8, 5 en 3% groter te zijn dan de waarden dicht bij de meniscus.

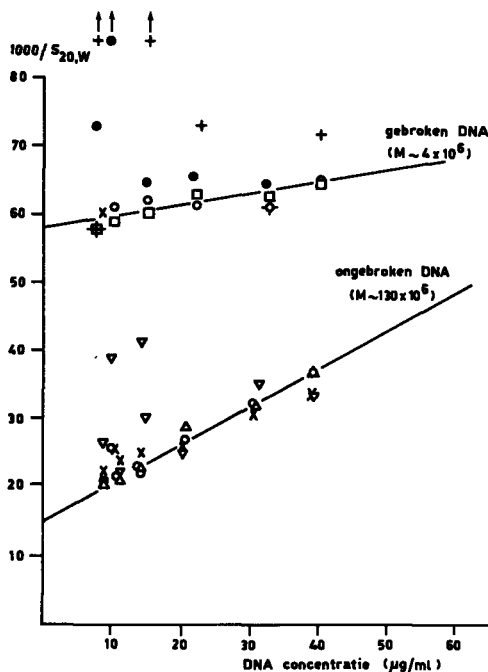
Uiteraard zullen deze systematische fouten geen invloed hebben op de waarde van s_0 , doch wel op die van K_s . Aangezien enerzijds de waarde van K_s nodig is voor het bepalen van de correctie die aangebracht moet worden bij de berekening van s en anderzijds de s -waarde bekend moet zijn om K_s te kunnen berekenen kan de bedoelde fout slechts geëlimineerd worden door het toepassen van een iteratiemethode. In de praktijk zijn de correcties meestal kleiner dan in het bovenstaande werd geschat, omdat sedimentatie-experimenten slechts zelden worden voortgezet tot de concentratiegradiënt zich in het midden van de cel bevindt. Bovendien gelden de berekende correcties slechts voor oplossingen van intacte DNA moleculen. Voor gebroken DNA moleculen nemen de correcties snel af met een toenemend aantal breuken per intact molecuul. Ten gevolge van deze fouten kunnen de waarden van K_s en $K_s/[\eta]$ in tabel II voor niet of weinig gedegradeerde moleculen te laag zijn. De fluctuaties in de berekende waarden van $K_s/[\eta]$ zijn te groot om het uitvoeren van tijdrovende berekeningen voor het bepalen van meer betrouwbare K_s -waarden te rechtvaardigen.

Uit de resultaten vermeld in tabel II blijkt dat s_0 afneemt naarmate de preparaten aan grotere schuifspanningen werden blootgesteld (zie ook hoofdstuk 7). De invloed van de waarde van s_0 op het molecuulgewicht zal in hoofdstuk 8 besproken worden.

6.3. *De invloed van het toerental van de rotor op $s_{20,w}$*

Ten aanzien van de invloed die het toerental van de rotor heeft op de waarde van de sedimentatiecoëfficiënt zijn de literatuurgegevens al evenzeer met elkaar in strijd als over de concentratie-afhankelijkheid, die in de vorige paragraaf werd beschreven. Koenig en Perrings (1953), Goring en Chepeswick (1956) en Kahler en Shack (1957) die gebruik maakten van een optisch systeem volgens Philpot en Svensson, dus bij "zeer hoge" concentraties werkten, vonden geen enkele invloed van het toerental op $s_{20,w}$.

Schumaker en Schachman (1957) gebruikten een ultraviolet absorptie systeem en vonden ook geen effect. Eigner (1960) en Eigner, Schildkraut en Doty (1962) vonden geen invloed tussen 20.000 en 40.000 rpm, doch boven 40.000 rpm bleek de s-waarde toe te nemen. Hearst en Vinograd (1961) vonden een duidelijke toename van s met toenemend toerental, evenals Burgi en Hershey (1961). Rosenbloom en Schumaker (1963) vonden geen toerental effect. Zij voerden de sedimentaties uit in een dichtheidsgradiënt van sucrose.



Figuur 17

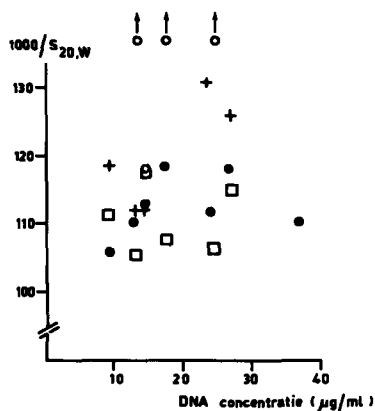
Sedimentatiecoëfficiënten van T4-DNA bij enkele concentraties en toerentallen.

Molecuulgewichten: ongeveer 130×10^6 en 4×10^6 .

$\triangle$ 12.000 rpm; $\circ$ 15.000 rpm; $\times$ 18.000 rpm; ∇ 21.000 rpm;
 $\square$ 24.000 rpm; $\bullet$ 36.000 rpm; $+$ 42.000 rpm.

Zoals reeds onder 6.1. werd opgemerkt zijn de waarden van de sedimentatiecoëfficiënt slecht reproduceerbaar zodra plateau-dalingseffecten optreden. Aangezien plateau-daling bij sedimentatie van ongebroken DNA moleculen reeds bij vrij lage toerentallen

optreedt, kan de invloed van het toerental slechts over een betrekkelijk klein traject worden onderzocht. In figuur 17 en 18 is een aantal waarnemingen weergegeven. De lijnen in figuur 17 zijn gebaseerd op vele experimenten bij lage toerentallen. Slechts een klein aantal van de beschikbare punten is in de figuur opgenomen vanwege de overzichtelijkheid. De concentratie, uitgezet langs de abscis, heeft betrekking op de DNA concentratie bij het begin van de proef. Met een eventuele concentratievermindering door plateaudaling kon uiteraard geen rekening worden gehouden. De s-waarden zijn berekend uit de plaats van het 50% punt van de concentratie zoals die bij de opname werd waargenomen.



Figuur 18

Sedimentatiecoëfficiënten van T4-DNA, in een glazen verstuiver gedegradieerd, bij enkele concentraties en toerentallen.

Molecuulgewicht kleiner dan 1×10^6 .

□ 24.000 rpm; ● 36.000 rpm; + 42.000 rpm; ○ 48.000 rpm.

Indien we veronderstellen dat de waarden van s_0 en K_s onafhankelijk zijn van ieder toerental effect dan is het in principe mogelijk met behulp van de gegevens uit tabel II of figuur 15 de s-waarden te corrigeren voor de concentratieverandering ten gevolge van plateaudaling. Uit de vergelijking $1/s = (1 + K_s c)/s_0$ volgt direct, als we met "te groot" en "te klein" een s-waarde bedoelen die in dezelfde zin afwijkt van de s-waarden van een

(c, l/s)-lijn bij 15.000 rpm, dat door het aanbrengen van een dergelijke correctie een te grote s-waarde verkleind wordt, doch dat een te kleine s nog meer van de verwachte waarde gaat afwijken. Om deze redenen zijn geen correcties op de s- en c-waarden aangebracht (met uitzondering van de correctie, genoemd onder 2.1.1.). Uit de figuren 17 en 18 blijkt dat in het beperkte toerental traject, waarin plateaudalingseffecten niet optreden, geen invloed van het toerental op de waarde van de sedimentatiecoëfficiënt waarneembaar is. Indien er al van een invloed sprake mocht zijn, dan vindt slechts een afname van de s-waarde met toenemend toerental plaats. Een toename van $s_{20,w}$ is slechts zelden waargenomen. De toename was dan zó gering dat deze verklaard kon worden uit de normale spreiding van punten. Bovendien zou reeds een kleine concentratievermindering ten gevolge van plateaudaling een iets te grote s-waarde kunnen veroorzaken.

HOOFDSTUK 7

DE INVLOED VAN SCHUIFSPANNINGEN OP DE WAARDE VAN s_0 EN $[\eta]$

Uit experimenten, waarbij DNA door een capillair werd geperst, is gebleken dat er een drempelwaarde bestaat voor de snelheidsgradiënt die breuk van DNA moleculen tot gevolg heeft. Deze waarde blijkt ongeveer 25.000 sec^{-1} te zijn (Davison, 1959; Levinthal en Davison, 1961).

Voor enkele van de voor ons onderzoek gebruikte preparaten is, met behulp van de formule van Kroepelin (zie 2.3.), de gemiddelde snelheidsgradiënt berekend. De resultaten, opgenomen in tabel II, kolom (8), hebben betrekking op 2 reeksen van experimenten, waarbij de oplossingen bij verschillende zuigersnelheden hetzij door een injectienaald (diameter 0,01 cm) hetzij door een glazen capillair (diameter 0,0167 cm) geperst werden (zie tabel II, kolom (7)). De diameter van de naald werd gemeten met een microscoop die voorzien was van een meetoculair. Het is gebleken dat het inwendige oppervlak van een injectienaald ruw is. De diameter is daardoor slechts bij benadering bekend. De capillair diameter werd berekend uit het gewicht van een kwikdraad waarvan de lengte gemeten was.

Voor de experimenten waarbij de injectienaald gebruikt is, werd Q/t berekend uit de lineaire zuigersnelheid. Bij grote zuigersnelheden trad enig materiaalverlies langs de zuiger op, waardoor de werkelijke snelheidsgradiënt, inzonderheid die vermeld voor preparaat no. 15 en 16, kleiner was dan de berekende waarde, vermeld in kolom (8). Voor de reeks, waarbij het glazen capillair gebruikt werd, is Q/t experimenteel bepaald.

Uit tabel II, kolom (2), (3) en (8) blijkt dat in elk der beide reeksen s_0 en $[\eta]$ afnemen met toenemende waarde van de gemiddelde snelheidsgradiënt $\bar{q}$ doch dat de waarde van $\bar{q}$, behorende bij een bepaalde s_0 of $[\eta]$ waarde, voor beide reeksen geenszins gelijk is. Uit andere niet in de tabel opgenomen experimenten is gebleken dat het breken van DNA moleculen door schuifspanningen

moeilijk is te reproduceren. Vermoedelijk moet dit toegeschreven worden aan kleine onregelmatigheden in naalden en capillairen of aan de aanwezigheid van stofdeeltjes in de oplossing, waardoor het resultaat in belangrijke mate kan worden beïnvloed.

Wel blijkt uit tabel II dat, in redelijke overeenstemming met de resultaten vermeld door Davison en Levinthal, bij de laagste gemiddelde snelheidsgradiënt die gebruikt werd, namelijk 28.000 sec^{-1} , een geringe daling van s_0 en $[\eta]$ is waar te nemen. Aangezien de maximale snelheidsgradiënt bij viscositeitsmetingen in de capillairviscosimeter 420 sec^{-1} bedroeg (zie hoofdstuk 5) is hierbij geen breuk van DNA moleculen te verwachten.

HOOFDSTUK 8

BEREKENING VAN HET MOLECUULGEWICHT VAN DNA UIT s_0 EN $[\eta]$

Zoals reeds in 2.4. en 6.2. werd vermeld, zijn er tegenstrijdige gegevens in de literatuur over de waarde van de sedimentatiecoëfficiënt en de conclusies die hieruit te trekken zijn over het molecuulgewicht van DNA.

De vraag rijst nu in hoeverre de eliminatie van storende invloeden bij de sedimentatie een sedimentatiecoëfficiënt oplevert waaruit het molecuulgewicht berekend kan worden.

In 1.2. werd reeds aangegeven dat de Svedberg vergelijking niet goed bruikbaar is voor de bepaling van grote molecuulgewichten in verband met de moeilijkheden, verbonden aan de meting van de diffusiecoëfficiënt, terwijl ook aan andere methoden veelal bezwaren verbonden zijn. De berekening van het molecuulgewicht uit s_0 en/of $[\eta]$ is daarom alleen mogelijk met behulp van een empirische relatie tussen M en s_0 en/of $[\eta]$. Zulke relaties (zie 2.4. en figuur 1) zijn ten dele opgesteld voor molecuulgewichten kleiner dan ongeveer 10×10^6 , ten dele voor molecuulgewichten van de orde van 100×10^6 , doch de mogelijkheid dat zij ook geldig zijn buiten het traject van molecuulgewichten waarvoor ze werden opgesteld is niet zonder meer uit te sluiten.

Om de bruikbaarheid der verschillende geponeerde relaties te toetsen zijn de s_0 en $[\eta]$ waarden van tabel II, kolom (2) en (3), hierin gesubstitueerd. De resultaten zijn weergegeven in tabel II, kolom (9) tot en met (20). In de Mandelkern-Flory vergelijking (2.4.1.) is gesubstitueerd: $\beta = 2,5 \times 10^6$, $\eta_0 = 0,01$, $\rho = 0,9982$ en $V = 0,55$.

Bij de beoordeling van de verkregen waarden van het molecuulgewicht kunnen de volgende criteria worden aangelegd:

- a) Voor ongebroken T4-DNA moet een molecuulgewicht gevonden worden van $(130 \pm 30) \times 10^6$ (zie 1.4.).
- b) Voor molecuulgewichten kleiner dan ongeveer 10×10^6 (vermoedelijk zelfs kleiner dan 3×10^6) worden die empirische rela-

ties tussen s_0 , $[\eta]$ en M aanvaardbaar geacht waarin de waarde van M gebaseerd is op nauwkeurige bepalingen van het molecuulgewicht door middel van strooilichtmetingen.

Uit de in tabel II vermelde molecuulgewichten blijkt nu dat zowel de Mandelkern-Flory vergelijking (2.4.1.) met $\beta = 2,5 \times 10^6$ als de Doty-McGill-Rice relatie (2.4.3.) aan de criteria voldoen.

In hoofdstuk 5 werd opgemerkt dat onze waarde van $[\eta]$ voor ongebroken moleculen vermoedelijk ongeveer 10% te laag is. Dit betekent echter slechts een verhoging van het met (2.4.1.) berekende molecuulgewicht van ongeveer 3%.

De relaties (2.4.1.) en (2.4.3.) blijken ook in het traject van 10×10^6 tot 130×10^6 resultaten te geven die in redelijke overeenstemming met elkaar zijn. Welke van de beide relaties de voorkeur verdient is niet aan te geven, omdat hiervoor het molecuulgewicht van T4-DNA niet nauwkeurig genoeg bekend is.

Ook de relaties (2.4.9.) tot (2.4.12.) voldoen aan de criteria. Dit is echter niet verwonderlijk, want ze zijn ten dele gebaseerd op onze s_0 en $[\eta]$ waarden uit tabel II en op een molecuulgewicht van ongeveer 130×10^6 voor ongebroken T4-DNA. De molecuulgewichten van ongebroken DNA, vermeld in de kolommen (17), (18), (19) en (20) zouden kunnen doen vermoeden dat de $[\eta]$, M relaties lagere waarden gaven dan de s_0 , M relaties. De overeenstemming wordt echter zeer goed als onze $[\eta]$ waarden met 10% worden verhoogd.

Uit het bovenstaande volgt dat een tamelijk betrouwbare schatting van het molecuulgewicht van DNA op grond van sedimentatie- en viscositeitsgegevens mogelijk is indien men als volgt te werk gaat:

- a) Bij het hanteren van DNA oplossingen moet rekening worden gehouden met de mogelijke breuk van DNA moleculen door schuifspanningen.
- b) Sedimentatie-experimenten moeten zo mogelijk bij een aantal verschillende, inzonderheid lage concentraties worden uitgevoerd; waarbij het toerental laag genoeg moet zijn om plateau-daling te verhinderen. Door extrapolatie naar $c=0$ wordt de waarde van s_0 bepaald.
- c) Viscositeitsmetingen moeten uitgevoerd worden onder zodanige omstandigheden dat extrapolatie naar $\tau = 0$ en $c=0$ mogelijk is. Uit dergelijke metingen volgt de waarde van $[\eta]$.

- d) Zijn zowel s_0 als $[\eta]$ bepaald dan kan het molecuulgewicht berekend worden uit (2.4.1.), de Mandelkern-Flory vergelijking met $\beta = 2,5 \times 10^6$, (2.4.9.) en (2.4.10.), de relaties van Crothers en Zimm, of (2.4.11.) en (2.4.12.), de relaties van Eigner en Doty.
- e) Is alleen s_0 bekend dan kan het molecuulgewicht berekend worden met de reeds genoemde relaties (2.4.10.) en (2.4.11.) en met de Doty-McGill-Rice relatie (2.4.3.).
- f) Is alleen $[\eta]$ bekend dan zijn alleen de relaties (2.4.9.) en (2.4.12.) toe te passen.

Uiteraard geldt het bovenstaande slechts voor de omstandigheden waaronder de beschreven experimenten werden uitgevoerd:

- a) Het DNA dat tweestrengig is en een Watson en Crick structuur heeft, werd opgelost in een oplosmiddel van bepaalde samenstelling (0,14 M NaCl + 0,02 M natriumcitraat).
- b) De waarden van $[\eta]$ werden verkregen door viscositeitsmetingen bij lage snelheidsgradiënten uit te voeren.
- c) De waarden van s_0 werden berekend uit experimenten, uitgevoerd bij verschillende concentraties en onder zodanige omstandigheden dat sedimentatie-anomalieën niet optraden.

Voor DNA dat uit één keten bestaat (zoals DNA van bacteriofaag ØX 174) of dat een ringstructuur bezit (bijvoorbeeld DNA van de "Replicative Form" van bacteriofaag ØX 174 of DNA van polyoma- of SV 40 virus) zullen andere relaties gebruikt moeten worden.

Het is bekend dat de waarde van s_0 niet of in geringe mate beïnvloed wordt door de ionensterkte of pH binnen zekere grenzen te variëren (bijvoorbeeld tussen 0,01 en 1 M NaCl en pH waarden tussen 5 en 9, zie Studier, 1965). Hieruit volgt dat vorm en grootte van de DNA moleculen door wijzigingen binnen de genoemde grenzen geen veranderingen ondergaan. De aangegeven relaties kunnen dus ook onder dergelijke van de onze afwijkende omstandigheden gebruikt worden voor de berekening van molecuulgewichten.

Tenslotte moeten nog enige opmerkingen worden gemaakt over de betekenis van enkele nieuwe technieken voor de bepaling van molecuulgewichten.

In hoofdstuk 5 werd reeds opgemerkt dat de door Zimm en Crothers (1962) en Schumaker en Bennet (1962) beschreven viscosimeters voor ongebroken T4-DNA een waarde van $[\eta]$ geven die ongeveer 10% groter is dan de door ons bepaalde waarde. De viscosimeter van Zimm en Crothers heeft door de eenvoudige constructie

voordelen boven de capillairviscosimeter, terwijl tevens extrapolatie onzekerheden worden geëlimineerd. De nauwkeurigheid waarmee molecuulgewichten bepaald kunnen worden blijft echter begrensd door de onzekerheid in de beschikbare ijkpunten waarop de empirische relaties gebaseerd zijn.

Bij onze sedimentatie-experimenten werd uitsluitend gebruik gemaakt van grenslaag sedimentatie. Hierbij is gebleken dat toepassing van een ultraviolet absorptie systeem met foto-elektrische registratie vele voordelen heeft boven de fotografische registratiemethode. Het verdient echter aanbeveling hiernaast enkele andere technieken toe te passen, waarvan de volgende met name genoemd moeten worden.

De band centrifugatie van Vinograd, Bruner, Kent en Weigle (1963) heeft als voordelen boven grenslaag sedimentatie dat de waarde van s_0 uit één experiment volgt en dat hiervoor slechts zeer kleine hoeveelheden DNA nodig zijn. Vooral voor biologische onderzoeken, waarbij in vele gevallen niet voldoende materiaal voor een grenslaag experiment beschikbaar is, kan deze methode van groot belang zijn.

De zone sedimentatie van DNA in een sucrose-gradiënt (Burgi en Hershey, 1963) heeft niet alleen het voordeel dat de experimenten in een minder kostbare preparatieve centrifuge uitgevoerd kunnen worden, maar geeft bovendien een zeer goede verdeling van de moleculaire grootte te zien. Sedimentatiecoëfficiënten kunnen hieruit berekend worden. Er is echter een niet opgehelderde discrepantie tussen de waarde van s_0 , bepaald met een analytische ultracentrifuge en die berekend uit een experiment in een sucrose-gradiënt. Bovendien moet het onderzochte DNA gemerkt zijn met een radioactief nuclide om experimenten met kleine hoeveelheden DNA mogelijk te maken. Hoewel deze methode belangrijke additionele informatie kan verschaffen zal toepassing niet onbeperkt mogelijk zijn.

SAMENVATTING

De mogelijkheid is onderzocht door middel van viscositeitsmetingen en sedimentatie-experimenten molecuulgewichten te bepalen van DNA, dat volgens de door Mandell en Hershey (1960) aangegeven methode was geïsoleerd uit bacteriofaag T4 en van T4-DNA dat door middel van hydrodynamische schuifspanningen (Davison, 1959) was gebroken.

De waarde van het grensviscositeitsgetal $[\eta]$ is bepaald door viscositeitsmetingen uit te voeren bij lage concentraties en kleine snelheidsgradiënten met behulp van een gemodificeerde Ubbelohde viscosimeter (4.3., figuur 5). Berekende waarden van $[\eta]$ zijn vermeld in tabel II, kolom (2). Het grensviscositeitsgetal van ongebroken T4-DNA (preparaat no. 5 en 6) is ongeveer 10% lager dan de hoogste tot nu toe in de literatuur vermelde waarden (Schumaker en Bennett, 1962; Crothers en Zimm, 1965). Dit moet toegeschreven worden aan het feit dat deze auteurs hun metingen bij zeer kleine snelheidsgradiënten verrichtten, waardoor de onnauwkeurigheid bij de extrapolatie naar snelheidsgradiënt nul aanmerkelijk kleiner wordt.

Voor de bepaling van sedimentatiecoëfficiënten werd voornamelijk gebruik gemaakt van een Phywé ultracentrifuge, die voor dit doel geschikt was gemaakt.

De modificaties bestonden in de ijking van de temperatuur-aanwijzing en in het aanbrengen van een ultraviolet absorptie systeem, waarbij een foto-elektrische registratiemethode is toegepast (Aten en Schouten, 1961).

Bij hoge toerentallen van de rotor zijn anomalieën geconstateerd, hoofdzakelijk bestaande uit een sterke daling van de concentratie in het plateaugebied en een verstoring van het concentratieverloop in de grenslaag tijdens sedimentatie. Experimenten, die werden opgezet om deze effecten te verklaren, wezen erop dat wellicht convecties de voornaamste oorzaak van deze verschijnselen vormen.

Deze anormale effecten kunnen worden vermeden door te werken bij lage toerentallen (bijvoorbeeld 15.000 rpm) waarbij reproduceerbare sedimentatiecoëfficiënten gevonden worden. Waarden van de sedimentatiecoëfficiënt bij oneindige verdunning, s_0 , vermeld in tabel II, kolom (3), zijn voor ongebroken DNA in goede overeenstemming met gegevens uit recente literatuur.

De onder de genoemde restricties bepaalde s_0 en $[\eta]$ waarden kunnen nu gebruikt worden om empirische relaties tussen M , s_0 en/of $[\eta]$, vermeld in 2.4. en ten dele weergegeven in figuur 1, te toetsen. De berekende waarden van het molecuulgewicht zijn vermeld in tabel II, kolom (9) tot en met (20).

Voor de beoordeling van de toepasbaarheid van de verschillende relaties zijn de volgende criteria aangelegd:

- a) Voor ongebroken T4-DNA moet voor het molecuulgewicht een waarde van $(130 \pm 30) \times 10^6$ worden gevonden. Deze waarde komt voort uit bepalingen van het molecuulgewicht langs chemische, autoradiografische en elektronenmicroscopische weg.
- b) Voor sterk gedegradeerde produkten met een molecuulgewicht kleiner dan ongeveer 10×10^6 worden die empirische relaties tussen s_0 , $[\eta]$ en M aanvaardbaar geacht waarbij de waarde van M gebaseerd is op nauwkeurige bepalingen van het molecuulgewicht door middel van strooilichtmetingen.

Uit tabel II blijkt dat de volgende relaties hieraan voldoen:

- (2.4.1.), de vergelijking van Mandelkern en Flory, waarin $\beta = 2,5 \times 10^6$ is gesubstitueerd.
- (2.4.3.), de relatie van Doty, McGill en Rice.
- (2.4.9.) en (2.4.10.), de relaties van Crothers en Zimm.
- (2.4.11.) en (2.4.12), de relaties van Eigner en Doty.

Uit dit onderzoek volgt dat het mogelijk is door middel van hydrodynamische methoden (met name door bepaling van s_0 en $[\eta]$) het molecuulgewicht van DNA, dat een dubbel-spiraal structuur volgens Watson en Crick heeft, op bevredigende wijze vast te stellen voor molecuulgewichten tussen 2 en 130 miljoen.

SUMMARY

The object of this investigation was to check whether it is possible to calculate molecular weights from sedimentation and viscosity data of large size deoxyribonucleic acid (DNA), such as can be isolated from the E.coli B bacteriophage T4 by means of the phenol extraction method (Mandell and Hershey, 1960) and of T4-DNA fragments of different sizes, obtained by forcing DNA solutions at various speeds through a hypodermic needle ($\varnothing$ 0.01 cm) or a glass capillary ($\varnothing$ 0.0167 cm) connected to a motor driven syringe (Davison, 1959).

Viscosity measurements were made by means of an Ubbelohde type viscometer, in which the bulbs had been replaced by a calibrated tube of uniform diameter (4.3., Figure 5). Measurements at velocity gradients down to about 10 sec^{-1} are possible with this instrument. Specific viscosities of many samples were measured at various concentrations. The calculated limiting viscosity numbers are tabulated in Table II, column (2). The value of the limiting viscosity number of unbroken T4-DNA (samples 5 and 6) is about 10% lower than the values reported by Schumaker and Bennett (1962) and by Crothers and Zimm (1965). This difference must be attributed to the very small velocity gradients used by these authors, eliminating the uncertainties in the extrapolation to zero velocity gradient.

In almost all sedimentation experiments a modified air driven Phywé ultracentrifuge was employed.

The main modifications were a calibration of the rotor temperature indication, the result of which is given in Table I and Figure 2 (4.2.3.) and the construction of an ultra-violet absorption optical system for which a photoelectric recording method has been developed (Aten and Schouten, 1961).

At high rotor speeds a "plateau effect" was observed. This effect may be described as a loss of DNA from the plateau which cannot be accounted for by the radial dilution effect. The sedi-

mentation boundaries broaden and the plateau shows a pronounced slope, accompanied by a "pile-up" of DNA at the cell bottom. The effect has been observed both in the Phywé and in a Spinco ultracentrifuge (6.1., Figures 9 and 10).

The effect increases with increasing molecular weight and increasing rotor speed. At relatively low rotor speeds (e.g. 15,000 rpm) the anomalies and boundary instabilities are not observed.

The concentration decrease in the plateau region has also been observed with purified bacteriophage ØX 174- 114 S particles which are nearly spherical (6.1., Figure 12).

An experiment with a synthetic boundary cell suggests that at high rotor speeds convections occur throughout the cell (6.1., Figure 11). Moreover the plateau effect decreases when the rotor is cooled during an experiment (6.1., Figure 13 B), as is shown by a smaller concentration decrease per unit of time and a smaller "pile-up" effect.

The evidence given in the preceding paragraphs seems to point to convection as the main cause of the phenomenon.

Reciprocal values of sedimentation coefficients, measured at 15,000 rpm, are plotted versus concentration in Figure 15 (6.2.) for some DNA samples. s_0 values and 95% confidence limits are tabulated in Table II, columns (3) and (4). The s_0 values for intact T4-DNA (samples 5 and 6) are in excellent agreement with the values reported in some recent publications.

The values of s_0 and $[\eta]$ have been used to calculate molecular weights according to the empirical relations, mentioned in 2.4. Some of them have been plotted in Figure 1. The calculated values of the molecular weight are given in Table II, columns (9) up to (20) inclusive.

The validity of the relations for a large molecular weight range has been checked against the following criteria:

- a. The calculated molecular weight of intact T4-DNA should yield a value of $(130 \pm 30) \times 10^6$. This value is based on results obtained by chemical analysis, autoradiography and electron-microscopy, which have been published in the past few years.
- b. For strongly degraded products with molecular weights below about 10×10^6 only those empirical relations between s_0 , $[\eta]$ and M are acceptable in which the value of M has been established by means of accurate light-scattering measurements.

It follows from the calculated molecular weights in Table II that these requirements are met by the relations:

(2.4.1.), the Mandelkern-Flory (1952) equation, substituting $\beta = 2.5 \times 10^6$,

(2.4.3.), the Doty-McGill-Rice (1958) relation,

(2.4.9.) and (2.4.10.), the Crothers-Zimm (1965) relations and

(2.4.11.) and (2.4.12.), the Eigner-Doty (1965) relations.

This result shows that it is possible to assess the molecular weight of double-stranded DNA with a Watson and Crick configuration by means of hydrodynamic methods, particularly from sedimentation and viscosity data, in the molecular weight range of 2 to 130 million.

LITERATUURLIJST

- Aten, J.B.T., Altona, C., Weterings, C.A.M., (1961), MBL rapport 1961/12
- Aten, J.B.T., Schouten, A., (1960), M.B.L. rapport 1960/21
- Aten, J.B.T., Schouten, A., (1961), J.Sci.Inst., 38, 325
- Bon, W.F., (1955), Dissertatie Amsterdam
- Bozorth, R.M., (1951), Ferromagnetism, D. v. Nostrand, Toronto, New York, London
- Burgi, E., Hershey, A.D., (1961), J.Mol.Biol., 3, 458
- Burgi, E., Hershey, A.D., (1963), Biophysical J., 3, 309
- Butler, J.A.V., Phillips, D.M., Shooter, K.V., (1957), Arch.Biochem.Biophys., 71, 423
- Cairns, J., (1961), J.Mol.Biol., 3, 756
- Cavalieri, L.F., Rosenberg, B.H., (1959), J.Amer.Chem.Soc., 81, 5136
- Claesson, S., (1963), Persoonlijke mededeling
- Crothers, D.M., Zimm, B.H., (1965), J.Mol.Biol., (Ter perse)
- Cummings, D.J., (1963), Virology, 21, 575
- Cummings, D.J., Kozloff, L.M., (1960), Biochim.Biophys.Acta, 44, 445
- Davison, P.F., (1959), Proc.Natl.Acad.Sci., 45, 1560
- Davison, P.F., (1960), Nature, 185, 918
- Davison, P.F., Freifelder, D., (1962), J.Mol.Biol., 5, 643
- Davison, P.F., Freifelder, D., (1964), Biopolymers, 2, 15
- Doty, P., (1957), J.Cell.Comp.Physiol., 49, suppl. 1, pag. 27
- Doty, P., McGill, B.B., Rice, S.A., (1958), Proc.Natl.Acad.Sci., 44, 432

- Duin, P.J. van, (1957), Dissertatie Leiden
- Eigner, J., (1960), Thesis Harvard University
- Eigner, J., (1961), Persoonlijke mededeling
- Eigner, J., Doty, P., (1965), J.Mol.Biol., (Ter perse)
- Eigner, J., Schildkraut, C., Doty, P., (1962), Biochim.Biophys. Acta, 55, 13
- Fleischman, J.B., (1960), J.Mol.Biol., 2, 226
- Froelich, D., Strazielle, C., Bernardi, G., Benoit, H., (1963), Biophysical J., 3, 115
- Ganguli, P.K., Bhattacharyya, A.L., (1962), Nature, 196, 1201
- Goodgal, S.H., Herriott, R.M., (1961), J.Gen.Physiology, 44, 1229
- Goring, D.A.I., Chepeswick, C., (1956), J.Phys.Chem., 60, 506
- Hearst, J.E., Vinograd, J., (1961), Arch.Biochem.Biophys., 92, 206
- Hermans, J., (1958), Dissertatie Leiden
- Hershey, A.D., Burgi, E., (1960), J.Mol.Biol., 2, 143
- Iso, K., Watanabe, I., (1957), J.Chem.Soc.Japan, Pure Chem.Sect., 78, 1268
- Kahler, H., Shack, J., (1957), J.Phys.Chem., 61, 649
- Kasha, M., (1948), J.Opt.Soc.Am., 38, 929
- Kay, E.R.M., Simmons, N.S., Dounce, A.L., (1952), J.Amer.Chem. Soc., 74, 1724
- Kleinschmidt, A.K., Lang, D., Jacherts, D., Zahn, R.K., (1962), Biochim.Biophys.Acta, 61, 857
- Koenig, V.L., Perrings, J.D., (1953), J.Colloid Sci., 8, 452
- Kroepelin, H., (1929), Kolloid Zeitschrift XLVII, 294
- Lett, J.T., Stacey, K.A., (1960), Makromol.Chem., 38, 204-
- Levinthal, C., Davison, P.F., (1961), J.Mol.Biol., 3, 674
- Litt, M., (1958), Thesis Harvard University
- Mandelkern, L., Flory, P.J., (1952), J.Chem.Phys., 20, 212
- Mandelkern, L., Krigbaum, W.R., Scheraga, H.A., Flory, P.J., (1952), J.Chem.Phys., 20, 1392
- Mandell, J.D., Hershey, A.D., (1960), Anal.Biochem., 1, 66

- Markham, R., (1962), *Advances in Virus Research* 9, (Acad. Press Inc., New York, London)
- Marmur, J., (1961), *J. Mol. Biol.*, 3, 208
- Meyerhoff, G., (1955), *Makromol. Chem.*, 15, 68
- Philpot, J.S.L., (1938), *Nature*, 141, 283
- Rosenbloom, J., Schumaker, V.N., (1963), *Biochemistry*, 2, 1206
- Rosenkranz, H.S., Bendich, A., (1960), *J. Amer. Chem. Soc.*, 82, 3198
- Rubenstein, I., Thomas, Jr., C.A., Hershey, A.D., (1961), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 47, 1113
- Sadron, C., Pouyet, J., (1958), *IVe Intern. Congres Biochemie, Wenen, Symposium IX, voordracht 9*
- Schachman, H.K., (1959), *Ultracentrifugation in Biochemistry*, Academic Press, New York, London
- Schans, G.P. van der, Knijnenburg, C.M., (1964), *Persoonlijke mededeling*
- Scheraga, H.A., Mandelkern, L., (1953), *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 179
- Schumaker, V.N., Bennett, C., (1962), *J. Mol. Biol.*, 5, 384
- Schumaker, V.N., Schachman, H.K., (1957), *Biochim. Biophys. Acta*, 23, 628
- Shooter, K.V., Butler, J.A.V., (1955), *Nature*, 175, 500
- Shooter, K.V., Butler, J.A.V., (1956), *Trans. Far. Soc.*, 52, 734
- Sinsheimer, R.L., (1959), *J. Mol. Biol.*, 1, 37
- Sinsheimer, R.L., (1960), in: *Chargaff, E., Davidson, J.N., The Nucleic Acids III*, Academic Press, New York, London
- Stäblein, F., (1934), *Techn. Mitt. Krupp*, 2, 127
- Studier, F.W., (1965), *J. Mol. Biol.*, 11, 373
- Sueoka, N., (1959), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 45, 1480
- Svedberg, T., (1925), *Kolloid Z.*, 36, 53
- Svedberg, T., Pedersen, K.O., (1940), *Die Ultrazentrifuge (Handbuch der Kolloidwissenschaft VII, Th. Steinkopff, Dresden, Leipzig)*
- Svensson, H., (1939), *Kolloid Z.*, 87, 181

- Svensson, H., (1940), Kolloid Z., 90, 141
- Tennent, H.G., Vilbrandt, C.F., (1943), J.Amer.Chem.Soc., 65, 424
- Thomas, Jr., C.A., Berns, K.I., (1961), J.Mol.Biol., 3, 277
- Thomas, Jr., C.A., Pinkerton, T.C., (1962), J.Mol.Biol., 5, 356
- Veldhuisen, G., Jansz, H.S., Aten, J.B.T., Pouwels, P.H., Oosterbaan, R.A., Cohen, J.A., (1962), Biochim.Biophys.Acta, 61, 630
- Ven, A.M. van de, (1959), MBL rapport 1959/13
- Vinograd, J., Bruner, R., Kent, R., Weigle, J., (1963), Proc. Natl.Acad.Sci., 49, 902
- Watson, J.D., Crick, F.H.C., (1953),
a) Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 18, 123
b) Nature, 171, 737, 964
- Waugh, D.F., Yphantis, D.A., (1952), Rev.Sci.Inst., 23, 609
- Zimm, B.H., Crothers, D.M., (1962), Proc.Natl.Acad.Sci., 48, 905.

NAWOORD

Overeenkomstig de wens van de Faculteit der Wiskunde en Natuurwetenschappen volgt hier een kort overzicht van het verloop van mijn studie.

Na het afleggen van het eindexamen H.B.S.-B aan de Christelijke H.B.S. (thans Lyceum) te Stadskanaal werd ik in 1938 als student in de Wis- en Natuurkundige Faculteit aan de Vrije Universiteit te Amsterdam ingeschreven. Na een langdurige onderbreking van de studie tijdens de Tweede Wereldoorlog legde ik het kandidaatsexamen, letter d, af in 1948. Het doctoraal examen volgde in 1952. Het experimentele werk voor het uitgebreide hoofdvak Experimentele Natuurkunde stond onder leiding van Professor Dr G.J. Sizoo, dat voor het bijvak Scheikunde (Radiochemie) werd verricht bij het Instituut voor Kernfysisch Onderzoek onder leiding van Professor Dr A.H.W. Aten Jr.

Gedurende enkele jaren kende de Stichting voor Fundamenteel Onderzoek der Materie mij een studietoelage toe, die later werd gewijzigd in een honorarium.

Alle Hoogleraren en Lectoren, wier onderwijs ik mocht ontvangen, ben ik zeer erkentelijk voor de wijze waarop zij aan mijn wetenschappelijke vorming hebben bijgedragen.

In 1953 werd ik aangesteld tot fysicus bij het Medisch Biologisch Laboratorium der RVO-TNO, waar onderwerpen van zeer uiteenlopende aard, de Rijksverdediging betreffende, de aandacht vroegen. De contacten met militaire autoriteiten waren hierbij doorgaans even aangenaam als onmisbaar.

De veiligheidsmaatregelen bij het gebruik van radioactieve stoffen, in het Medisch Biologisch Laboratorium der RVO-TNO en ook herhaaldelijk daarbuiten, hadden mijn bijzondere aandacht. De waarde van de aangename verstandhouding met vele personen en instanties, zoals de Gezondheidsraad, de Arbeidsinspectie en de (Hoofd-)Inspectie voor de Hygiëne van het Milieu, is niet in gangbare eenheden uit te drukken.

Dat ik naast de genoemde werkzaamheden nog gelegenheid vond het in dit proefschrift beschreven onderzoek te verrichten was slechts mogelijk dank zij de stimulerende invloed van mijn Promotor, Professor Dr J.A. Cohen, en de prettige samenwerking met een reeks van deskundigen, die gedurende een gedeelte van hun militaire diensttijd bij het M.B.L. werden gedetacheerd, te weten Dr A.M. van de Ven, Dr C. Altona, Drs J.B.M. Laauwen, Drs J.A. van Velthuyzen en Ir K.J. Huisman. De vaardige assistentie van Mej. J.W. van der Kamp en de Heren C.A.M. Weterings en D.H.C. Meun heb ik zeer gewaardeerd.

Voor al de vele discussies met Dr J. Blok hebben zeer veel bijgedragen tot de uiteindelijke vorm van dit proefschrift. Zowel de genoten leiding als de ondervonden vriendschap stemmen tot dankbaarheid.

Het is mij een genoegen U, Hooggeleerde Sizoo, nog steeds in hoogste instantie boven mij te weten. U en het Bestuur der RVO-TNO betuig ik gaarne mijn dank voor de toestemming het in dit proefschrift beschreven onderzoek in deze vorm te publiceren.

TABEL II

Samenvatting van de experimentele resultaten en berekende molecuulgewichten

Kolom	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)
Prep. No.	DNA geïsoleerd uit	$[\eta]$ in dl/g	s_0 in Svedberg eenheden	95 % betrouwbaarheidsgrenzen van s_0	K_s	$K_s/[\eta]$	Straal van naald of capillair (cm)	Gemiddelde snelheidsgradiënt (sec^{-1})	Molecuulgewichten $\times 10^{-6}$, berekend met behulp van de relatie											
									2.4.1.	2.4.2.	2.4.3.	2.4.4.	2.4.5.	2.4.6.	2.4.7.	2.4.8.	2.4.9.	2.4.10.	2.4.11.	2.4.12.
1	H. influenzae	94	29	niet berekend	-	-	-	-	19	12	16	9,4	29	8,5	32	21	20	19	17	22
2	Kalf thymus	225	42	niet berekend	-	-	-	-	51	30	43	21	95	20	63	59	72	47	43	75
3	" "	124	30	niet berekend	-	-	-	-	23	15	17	12	32	11	34	23	30	21	19	32
4	Bacteriofaag T4	219	61	niet berekend	-	-	-	-	87	48	118	20	319	20	126	172	69	114	108	72
5	" "	296	65	61 - 69	$3,209 \times 10^{-2}$	1,08	-	0	112	60	140	26	391	27	141	206	108	132	126	111
6	" "	294	63	55 - 73	$2,701 \times 10^{-2}$	0,92	-	0	106	57	128	26	354	27	133	190	107	123	117	110
7	" "	278	61	58 - 64	$2,896 \times 10^{-2}$	1,04	0,0167	28000	98	53	118	25	319	25	126	172	98	114	108	102
8	" "	233	59	50 - 71	$2,586 \times 10^{-2}$	1,11	0,0167	47000	86	47	107	21	286	21	118	156	76	105	100	79
9	" "	220	53	47 - 62	$2,326 \times 10^{-2}$	1,06	0,01	32000	71	40	80	20	203	20	97	115	70	82	76	73
10	" "	170	48	44 - 52	$1,923 \times 10^{-2}$	1,13	0,0167	83000	54	31	62	16	147	15	81	87	47	64	60	50
11	" "	151	43	37 - 51	$1,644 \times 10^{-2}$	1,09	0,0167	132000	43	26	46	14	103	14	66	63	40	50	46	43
12	" "	100	31	30 - 33	$7,810 \times 10^{-3}$	0,78	0,01	41000	21	14	19	10,0	36	9,1	36	25	22	22	20	24
13	" "	70	26	25 - 28	$6,194 \times 10^{-3}$	0,88	0,01	73000	14	9	12	7,3	20	6,3	26	15	13	15	13	14
14	" "	-	23	niet berekend	-	-	-	-	-	-	8,4	-	14	-	21	11	-	11	9,7	-
15	" "	28	18	17,8 - 18,5	$2,500 \times 10^{-3}$	0,89	0,01	144000	5,0	3,8	4,3	3,2	6,2	2,5	13	5,3	3,9	5,6	5,3	3,8
16	" "	15	14,3	14,1 - 14,6	$0,996 \times 10^{-3}$	0,67	0,01	289000	2,6	2,1	2,3	1,8	3,0	1,3	8,7	2,7	1,8	4,6	2,7	1,5
17	" "	28	17,5	niet berekend	-	-	-	-	4,8	3,7	4,0	3,2	5,9	2,5	13	4,9	3,9	5,2	4,9	3,8
18	" "	53	24	niet berekend	-	-	-	-	10	7,3	9,2	5,6	16	4,8	22	12	9,0	12	11	9,4

Toelichting.

Kolom (1): Preparaten 1 - 4 werden geïsoleerd met de detergens methode, voor alle andere preparaten werd de fenol-extractie toegepast (zie 3.1. en 3.2.). Tijdens de isolatie van No. 2 en 4 werden schuifspanningen zoveel mogelijk vermeden. De preparaten 9, 12, 13, 15 en 16 werden gemaakt door degradatie van No. 6 (figuur 15 heeft betrekking op deze reeks), evenzo No. 7, 8, 10, 11 en 14 uit No. 5. De preparaten 17 en 18 zijn degradatieprodukten van een niet in de tabel opgenomen preparaat.

Kolom (2): zie hoofdstuk 5. Kolom (3) tot en met (6): zie 6.2. Kolom (7) en (8): zie hoofdstuk 7. Kolom (9) tot en met (20): De relaties zijn (zie 2.4., figuur 1 en hoofdstuk 8):

$$2.4.1. \quad (\text{Mandelkern en Flory, 1952}) \quad M = \left[\frac{s_0 [\eta]^{1/3} \eta_0 N 10^{-13}}{\beta (1 - V\rho)} \right]^{3/2}$$

$$2.4.7. \quad (\text{Rubenstein, Thomas en Hershey, 1961})$$

$$s = 0,00244 M^{0,543}$$

$$2.4.2. \quad (\text{Eigner, 1960}) \quad \log M_w = 4,269 + 1,33 \log (s_0 [\eta]^{1/3})$$

$$2.4.8. \quad (\text{Burgi en Hershey, 1963})$$

$$s_0 = 0,080 M^{0,35}$$

$$2.4.3. \quad (\text{Doty, McGill, Rice, 1958}) \quad s_0 = 0,063 M_w^{0,37}$$

$$2.4.9. \quad (\text{Crothers en Zimm, 1965})$$

$$0,665 \log M = 2,863 + \log ([\eta] + 5)$$

$$2.4.4. \quad (\text{Doty, McGill, Rice, 1958}) \quad [\eta] = 1,45 \times 10^{-6} M_w^{1,12}$$

$$2.4.10. \quad (\text{Crothers en Zimm, 1965})$$

$$0,445 \log M = 1,819 + \log (s_0 - 2,7)$$

$$2.4.5. \quad (\text{Cavaliere en Rosenberg, 1959}) \quad s = 0,141 M_w^{0,31}$$

$$2.4.11. \quad (\text{Eigner en Doty, 1965})$$

$$s_0 = 0,116 M^{0,325} \text{ of } s_0 = 0,034 M^{0,405}$$

$$2.4.6. \quad (\text{Lett en Stacey, 1960}) \quad [\eta] = 1,1 \times 10^{-5} M_w$$

$$2.4.12. \quad (\text{Eigner en Doty, 1965})$$

$$[\eta] = 1,05 \times 10^{-7} M^{1,32} \text{ of } [\eta] = 6,9 \times 10^{-4} M^{0,70}$$