فصل دهم
ویسکوزیته[1]

از بین تکنیک‌های فیزیکی که برای تعیین شکل و اندازه ماکرومولکول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، ویسکومتری منحصربفرد است زیرا بسیار ساده انجام می‌شود ولی تفسیر نتایج آن دشوار است. محلول‌های حاوی ماکرومولکول‌ها دارای ویسکوزیته بیشتری از حلال این ماکرومولکول‌ها می‌باشد. افزایش ویسکوزیته محلول ماکرومولکول‌ها نسبت به حلال تابعی از چند پارامتر مولکول‌های حل‌شونده است:

۱- حجمی از حلال که توسط ماکرومولکول‌ها اشغال می‌شود.

۲- نسبت طول به پهنای ماکرومولکول (نسبت محوری ماکرومولکول).

۳- صلبیت و یا انعطاف‌پذیری ماکرومولکول.

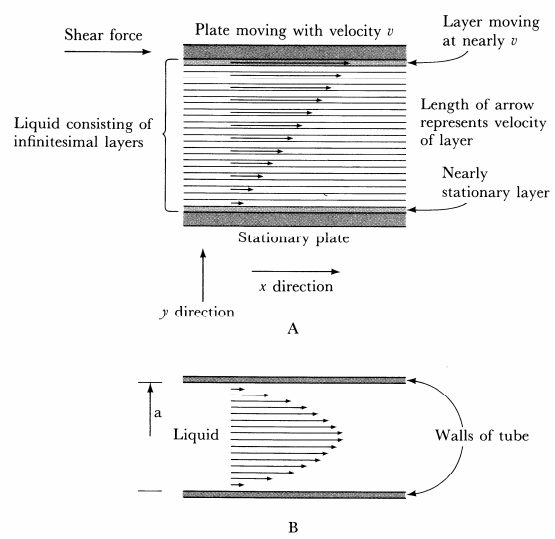
برای مولکول‌های کروی مثل اکثر پروتئین‌ها، اثر اصلی بر ویسکوزیته توسط حجم ماکرومولکول اعمال می‌شود که در ارتباط مستقیم با وزن مولکولی ماکرومولکول است. برای مولکول‌های صلب و نازک از قبیل DNA، فاکتور اصلی نسبت محوری ماکرومولکول است که این فاکتور نیز تابعی از جرم مولکولی می‌باشد. از اینرو، ویسکومتری را می‌توان برای تعیین جرم مولکولی و از طرف دیگر اگر جرم مولکولی معلوم باشد، برای بدست آوردن اطلاعاتی در مورد شکل کلی ماکرومولکول بکار برد. پس دو کاربرد اصلی ویسکومتری تعیین جرم مولکولی و شکل ماکرومولکول‌هاست.

۱۰-۱. تئوری ساده ویسکوزیته:

ویسکوزیته تحت عنوان چسبندگی درونی تعریف می‌شود. یک مایع را که در بین دو صفحه موازی بزرگ قرار گرفته در نظر بگیرید. یکی ازصفحات، ثابت و دیگری در جهت x با سرعت v حرکت می‌کند. لایه مجاور هر صفحه با مقاومت اصطکاکی در مقابل حرکت مواجه است. بنابراین، صفحه متحرک مایع را در جهت x با سرعتی تقریبا معادل با v حمل می‌کند و لایه مایع مجاور صفحه ثابت بسیار کند حرکت می‌کند. در این صورت می‌توان مایع را متشکل از تعداد زیادی لایه دانست که هر لایه در امتداد لایه‌های مجاورش می‌لغزد و مقاومت اصطکاکی بین لایه‌های مجاور تولید یک شیب سرعت می‌کند (شکل ۱۰-۱):

---

[1] Viscosity



شکل (۱۰-۱): (A) جاری شدن یک مایع در بین دو صفحه موازی که یکی ثابت و دیگری با سرعت v حرکت می کند. (B) نمودار سرعت یک مایع که در درون یک استوانه به شعاع a جاری می‌شود.

نوعی از دفرمه شدن مایع که به وسیله شیب سرعت بوجود می‌آید، شیر[۲] نامیده می‌شود. نیوتن نشان داد که نیروی اصطکاک بین لایه‌ها متناسب با سطح لایه‌ها و شیب سرعت بین آنهاست:

$$f \propto A\frac{dv}{dy} \quad \Rightarrow \quad f = \eta A\frac{dv}{dy} \qquad (۱-۱۰)$$

که در این رابطه، A سطح لایه ها، dv/dy شیب سرعت و η ضریب ویسکوزیته است که برای سادگی ویسکوزیته نامیده می شود. $f/A = F$، استرس شیر[۳] و $dv/dy = G$، شیب شیر[۴] و یا سرعت شیر نامیده می‌شود.

اگر η یک ثابت باشد سیال، سیال نیوتنی نامیده می‌شود ولی اگر η تابعی از F و یا G باشد سیال، سیال غیرنیوتنی نامیده می شود. محلول های حاوی مولکول های کوچک، سیال های نیوتنی

[۲] Shear
[۳] Shear Stress
[۴] Shear Gradient

محسوب می‌شوند در حالی که محلول ماکرومولکول‌ها معمولا خواص غیرنیوتنی نشان می‌دهند و به علت صف بندی[۵] ماکرومولکول‌ها با افزایش F، ویسکوزیته‌شان کاهش پیدا می‌کند. برای یک سیال نیوتنی می‌توان با رسم تغییرات F در مقابل تغییرات شیب شیر (G)، ضریب ویسکوزیته را از شیب خط بدست آورد. واحد ویسکوزیته در دستگاه SI، پاسکال بر ثانیه و در دستگاه CGS، پویز است (۱ Poise = ۱ $dyn.cm^{-۲}.s$). اگر مایع به‌عوض این که در بین دو صفحه ثابت و متحرک جاری شود، در یک لوله استوانه‌ای جریان پیدا کند، مایع در تماس با دیواره های لوله با اصطکاک مواجه خواهد شد و در این صورت، سرعت در امتداد محور لوله بیشینه و در مجاورت دیواره‌های لوله کمینه خواهد بود. در این صورت شیب شیر (G) به جای این که خطی باشد، سهمی[۶] خواهد بود.

اگر شیب سرعت خیلی زیاد نباشد، این جریان لایه‌ای[۷] نامیده می‌شود که در این حالت سیال از قانون ویسکوزیته نیوتن تبعیت می‌کند ولی اگر شیب شیر خیلی زیاد باشد، چنین جریانی، جریان توربولانس[۸] نامیده می‌شود. جریان توربولانس، حالت پیچیده‌ای است که در فیزیک سیالات مورد بحث قرار می‌گیرد.

۱۰-۲. اثرات ماکرومولکول‌ها بر ویسکوزیته محلول:

افزایش ماکرومولکول‌ها به یک حلال، که ویسکوزیته‌اش $\eta_{\circ}$ است، باعث می‌شود که ویسکوزیته محلول، که η نامیده می‌شود، افزایش یابد. این افزایش ویسکوزیته حاصل افزایش اصطکاک بین صفحات مایع تک مولکولی مجاور است زیرا ماکرومولکول‌ها بزرگتر از مولکول‌های حلالند و از اینرو در بین چندین لایه از مولکول‌های حلال گسترده شده‌اند.

تغییر در ویسکوزیته معمولا به صورت ویسکوزیته نسبی بیان می‌شود:

$$\eta_{r} = \frac{\eta}{\eta_{\circ}} \qquad (۲-۱۰)$$

---

[۵] Alignment
[۶] Parabolic
[۷] Laminar
[۸] Turbulence

انشتین نشان داد که ویسکوزیته نسبی تابعی از اندازه و شکل ماکرومولکول‌هاست و از معادله زیر بدست می‌آید:

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} = 1 + a\varphi + b\varphi^2 + \cdots \qquad (3-10)$$

که در این رابطه، a یک ثابت وابسته به شکل (مثلا برای مولکول‌های کروی $a = 2/5$ است) و φ، کسری از حجم محلول است که توسط ماکرومولکول اشغال شده است. b نیز یک ثابت دیگر وابسته به شکل است. این معادله را می‌توان بر حسب غلظت ماکرومولکول (c) نیز نوشت. اگر $\overline{V}$ حجم ویژه یک مولکول (حجم واحد وزن ماده) باشد، حاصل‌ضرب $\overline{V}$ در غلظت برابر φ خواهد بود $(\varphi = \overline{V}c)$. حجم ویژه مولکول را حجم موثر هیدرودینامیکی حل‌شونده نیز می‌نامند.
حال با جاگذاری به جای φ در رابطه (۱۰-۳) می‌توان نوشت:

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} = 1 + a\overline{V}c + b\overline{V}^2c^2 + \cdots \qquad (4-10)$$

ویسکوزیته غالبا به صورت ویسکوزیته ویژه[9] (η_{SP}) بیان می‌شود. ویسکوزیته ویژه عبارت است از تغییرات جزیی در ویسکوزیته که در اثر افزودن حل‌شونده ایجاد می‌شود. ویسکوزیته ویژه به صورت زیر تعریف می‌شود:

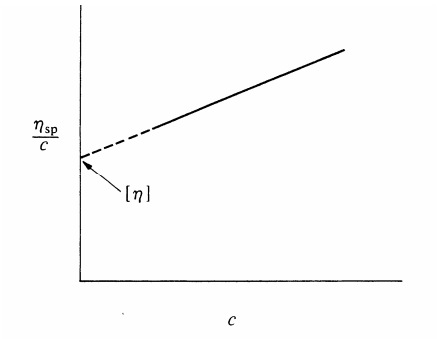
$$\eta_{SP} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{\eta}{\eta_0} - 1 = \eta_r - 1 = a\overline{V}c + b\overline{V}^2c^2 + \cdots \qquad (5-10)$$

ویسکوزیته نسبی و ویسکوزیته ویژه را نمی‌توان به سادگی به پارامترهای مولکولی (مثل شکل و اندازه) ارتباط داد زیرا بین مولکول‌ها میان‌کنش‌هایی از قبیل برخورد، آشفتگی و غیره وجود دارد. برای حل این مشکل باید در غلظت بسیار کم کار کرد و بدین منظور ویسکوزیته ذاتی[10] $([\eta])$ به صورت زیر تعریف می‌شود:

[9] Specific Viscosity
[10] Intrinsic Viscosity

$$[\eta] = \lim_{c \to 0} (\frac{\eta_{SP}}{c}) = \lim_{c \to 0} (a\overline{V} + b\overline{V}c^{2} + \cdots) \approx a\overline{V} \qquad (۶ \quad ۱۰)$$

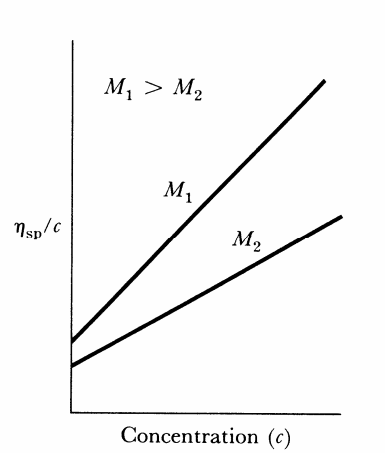
بنابراین، ویسکوزیته ذاتی بستگی به ثابت a (که تابع شکل است) و حجم ویژه $(\overline{V})$ دارد. ویسکوزیته ذاتی در عمل به وسیله اندازه‌گیری η_{SP} در غلظت‌های مختلف ماکرومولکول و رسم نمودار η_{SP}/c در مقابل c و برون‌یابی تا غلظت صفر بدست می‌آید (شکل ۱۰-۲):



شکل (۱۰-۲): تعیین ویسکوزیته ذاتی.

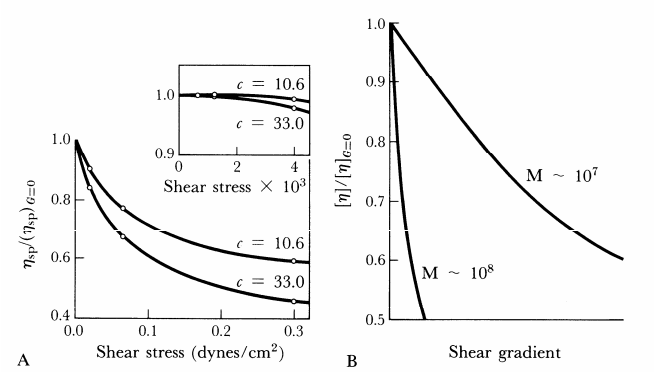
η_{SP}/c را ویسکوزیته کاهش یافته[۱۱] می‌نامند. نمونه‌ای از تعیین ویسکوزیته ذاتی برای دو مولکول DNA مختلف را در شکل (۱۰-۳) می‌بینید:

[۱۱] Reduced Viscosity



شکل (۱۰-۳): نمودار η_{SP}/c در مقابل c برای دو مولکول DNA مختلف. منحنی‌ها خطی هستند و با افزایش جرم مولکولی شیب منحنی بیشتر می‌شود. هر چند که در این نمودار نشان داده نشده است ولی برای مولکول‌های کروی متقارن، منحنی‌ها مسطح‌تر خواهد بود.

همان طور که گفته شد، ویسکوزیته ذاتی همیشه پارامتر مفیدی نخواهد بود که به علت وابستگی غیرنیوتنی $[\eta]$ به G می باشد. وقتی یک ماکرومولکول دارای نسبت محوری بزرگی باشد (مثل مولکول طویل و نازک DNA) و محلول آن جاری شود، مولکول‌ها تمایل دارند به نحوی جهت‌یابی کنند که محور بزرگشان با جهت جریان محلول موازی شود. این جهت‌یابی فضایی موجب کاهش η_r می‌شود زیرا سهم مقاومت ماکرومولکول‌ها در لغزیدن لایه‌ها بر روی یکدیگر کاهش می‌یابد که به علت گستردگی مولکول‌ها در تعداد لایه‌های کمتری است. قدرت و میزان وابستگی η_r به شیب شیر (G)، با افزایش نسبت محوری افزایش می‌یابد زیرا یک مولکول بلند و نازک نسبت به یک مولکول کوتاه و ضخیم راحت‌تر می‌تواند جهت‌یابی کند. این اثر را می‌توان در شکل (۱۰-۴-A) مشاهده نمود:



شکل (۱۰-۴): (A) وابستگی ویسکوزیته ویژه T_2 DNA ($M = ۱۰۶\times۱۰^۶$) به استرس شیر (F) در دو غلظت متفاوت که به صورت درصدی از میزان شیر صفر بیان شده است. نمودار کوچک بالایی نشان‌دهنده تغییر شکل در شیر پایین است. (B) اثر وزن مولکولی بر وابستگی ویسکوزیته ذاتی به G.

در شکل(۱۰-۴-B)، نمودار تغییرات $[\eta]/[\eta]_{G=۰}$ در مقابل G برای دو مولکول DNA با وزن‌های مولکولی متفاوت رسم شده است. هر چه وزن مولکولی (M) بیشتر باشد (که در مورد DNA به معنی بزرگتر بودن نسبت محوری است)، دریک G معین $[\eta]$ کوچکتر خواهد بود.

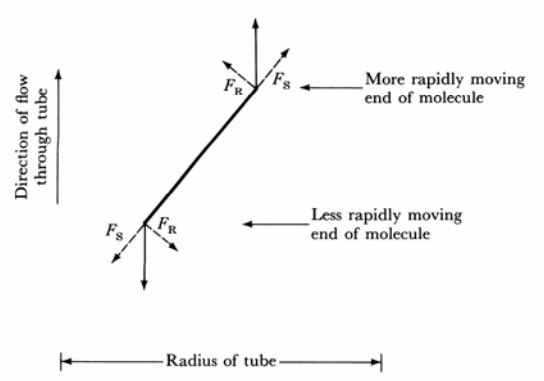
اگر شکل ماکرومولکول وابسته به شیب شیر باشد (یعنی ماکرومولکول توسط جاری شدن تغییر شکل داده و دفرمه شود)، آنگاه ویسکوزیته ذاتی که بستگی به شکل ماکرومولکول دارد، با افزایش G کاهش خواهد یافت. بنابراین برای تعیین پارامترهای مولکولی با استفاده از $[\eta]$، اندازه‌گیری $[\eta]$ به عنوان تابعی از G و برون‌یابی تا $G = ۰$ ضروری است.

برای تخمین نسبت محوری یک ماکرومولکول باید دو نکته را در نظر داشت:

۱- اگر η_r در غلظت‌های کم، بزرگ باشد، ماکرومولکول نسبت محوری بزرگی دارد و بالعکس اگر η_r در غلظت‌های زیاد کوچک باشد، ماکرومولکول بایستی قدری فشرده باشد.

۲- اگر η_r با افزایش G به مقدار قابل توجهی کاهش پیدا کند، نسبت محوری ماکرومولکول باید بزرگ باشد.

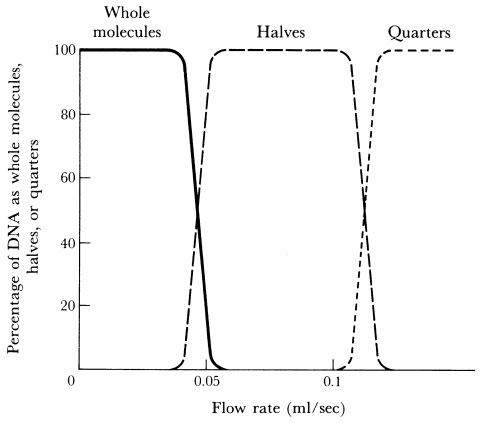
دو اثر دیگر شیر بر روی η_r، اضمحلال[۱۲] و رئوپکسی[۱۳] نامیده می‌شوند. اضمحلال اشاره بر این حقیقت دارد که در استرس شیر (F)های بالا، مولکول‌های طویل و نازک شکسته خواهند شد. شکل (۱۰-۵) نشان‌دهنده وضعیت چنین مولکول طویل و نازکی در یک شیب شیر است. توجه داشته باشید چون سرعت جریان در عرض لوله ثابت نیست، دو انتهای این مولکول با توجه به زاویه‌ای که با خطوط جریان دارد با دو سرعت متفاوت حرکت خواهد کرد. در نتیجه مولکول تمایل به چرخش دارد تا اینکه با یک خط جریان همسو شود و در این حالت نیرویی بر آن وارد نشود. بنابراین، وقتی یک مولکول طویل و نازک با زاویه‌ای نسبت به خطوط نیرو قرار دارد، نیروهایی که بر دو انتهای مولکول وارد می‌شوند، یکسان نیستند. این نیروها را می‌توان به یک نیروی عمودی (که موجب چرخش می‌شود) و یک نیروی موازی (که موجب کشیده شدن می‌شود) تجزیه نمود (شکل ۱۰-۵):



شکل (۱۰-۵): وضعیت یک مولکول میله‌ای شکل در یک شیب سرعت ایجاد شده توسط جاری شدن. در یک لوله، خطوط جریان در نزدیکی مرکز لوله سریع‌تر از خطوط جریان در مجاورت دیواره‌های لوله حرکت می‌کند. بنابراین، مولکول در معرض یک نیروی پیش‌برنده[۱۴] در یک انتها و یک نیروی کندکننده[۱۵] در انتهای دیگرش می‌باشد. این نیروها را می‌توان به دو نیروی F_R که موجب چرخش مولکول می‌شود و F_S که تمایل به کشیدن مولکول و شکستن آن در مرکز مولکول دارد، تجزیه نمود.

[۱۲] Degradation
[۱۳] Rheopexy
[۱۴] Driving Force
[۱۵] Retarding Force

می‌توان نشان داد که نیروی کشنده در مرکز مولکول و همچنین وقتی مولکول در زاویه ۴۵ درجه نسبت به خطوط جریان قرار داشته باشد، بیشینه است. چون نیرو در وسط مولکول بزرگترین مقدار خود را دارد، احتمال شکسته‌شدن مولکول در نیمه آن محتمل‌ترین حالت است. دراین مورد مطالعات زیادی بر روی DNA انجام شده است و برخی نتایج آن درشکل (۱۰-۶) نشان داده شده است:



شکل (۱۰-۶): شکسته شدن T_2 DNA توسط عبور دادن محلول آن از درون یک لوله نازک به قطر ۰/۲۵ mm در سرعت‌های مختلف جاری‌شدن. در یک سرعت بحرانی، نیم‌مولکول‌های ایجاد شده خود به یک چهارم اندازه اولیه شکسته می‌شوند.

به طور عملی، پدیده اضمحلال توسط سقوط شدید η_r در یک مقدار معین G در نمودار تغییرات η_r در مقابل G و یا کاهش η_r در اندازه‌گیری‌های مکرر η_r در یک مقدار معین G شناسایی می‌شود. این پدیده در مورد مولکول‌های DNA با جرم‌های مولکولی بالا مشاهده می‌شود. پدیده رئوپکسی اشاره بر این حقیقت دارد که در غلظت و استرس شیر نسبتا بالا، η_r با گذشت زمان افزایش می‌یابد. این پدیده را در مورد مولکول های با جرم بسیار زیاد مثل DNA کروموزوم های یوکاریوت می توان مشاهده نمود و علت آن مشخص نیست.

۱۰-۳. رابطه بین ویسکوزیته ذاتی و وزن مولکولی:

برای پلی‌مرهایی که ساختمانشان شبیه به پیچه نامنظم است، رابطه $[\eta] = KM^a$ صادق است. K و a ثابت‌های وابسته به حلال هستند. این ثابت‌ها را معمولا به‌صورت تجربی برای هر سیستم

حلال-حل‌شونده (با استفاده از مولکول‌هایی که جرم مولکولی‌شان معلوم است) تعیین می‌کنند. چنین معادلاتی برای تعیین پارامترهای مولکولی ماکرومولکول‌های بسیار فشرده‌ای مثل ویروس‌ها به کار نمی‌رود زیرا ویسکوزیته ذاتی آنان تابعی پیچیده از نسبت حجم مولکولی به جرم مولکولی‌شان است. به طور کلی دریک مقدار M ثابت، $[\eta]$ برای مولکول‌های فشرده کوچکتر از پیچه‌های نامنظم است. در واقع ویسکومتری به ندرت برای تعیین پارامترهای مولکولی شکل و اندازه مولکول‌های فشرده به کار می‌رود زیرا تکنیک‌های دیگر مثل ته‌نشین سازی ارزش بیشتری برای تعیین پارامترهای مولکولی این نوع مولکول‌ها دارند.

برای پروتئین‌های غیرطبیعی شده در گوانیدین هایدروکلراید M ۶ که به صورت پیچه نامنظم درآمده‌اند و به شرطی که دارای پیوندهای دی‌سولفید درون‌زنجیری نباشند، مقادیر a و K تعیین شده‌اند و رابطه زیر صادق است:

$$[\eta] = ۰/۷۱۶\, n^{۰/۶۶} \qquad (۷-۱۰)$$

در این معادله، n تعداد باقی‌مانده‌های اسیدآمینه موجود در ساختمان پروتئین است. بدین روش می‌توان متوسط جرم مولکولی به ازاء باقی‌مانده اسیدآمینه را با استفاده از ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین تعیین کرد و جرم مولکولی پروتئین را با استفاده از ویسکوزیته آن محاسبه نمود.

برای مولکول‌های خطی DNA دو رشته‌ای نیز، ارتباط زیر بین M و $[\eta]$ مشاهده شده است:

$$۰/۶۶۵ \log M = ۲/۸۶۳ + \log([\eta] + ۵) \qquad (۸-۱۰)$$

۱۰-۴. مثال‌هایی از کاربرد ویسکومتری

۱۰-۴-۱. تخمین شکل کلی پروتئین‌ها:

ساختمان یک پروتئین می‌تواند به صورت کاملا فشرده، پیچه نامنظم، مارپیچی و یا نیمه صلب (و یا ترکیبی از سه شکل آخری) باشد. با مقایسه ویسکوزیته پروتئین طبیعی و غیرطبیعی‌شده می‌توان شکل کلی پروتئین را حدس زد. چون ساختمان پروتئین غیرطبیعی‌شده معمولا به صورت پیچه نامنظم و یا نزدیک به پیچه نامنظم است، با مقایسه ویسکوزیته حالت طبیعی و غیرطبیعی‌شده پروتئین می‌توان بیان کرد که حالت طبیعی فشرده‌تر و یا گسترده‌تر از یک پیچه نامنظم است. به عنوان مثال، η_r

آنزیم رایبونوکلئاز در اثر غیرطبیعی‌شدن حرارتی در محیط اسیدی افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد، رایبونوکلئاز طبیعی دارای ساختمان فشرده‌ای است. از طرف دیگر، ویسکوزیته پلی-گاما-بنزیل-ال-گلوتامات[۱۶] در شکل میله صلب اگر در شرایطی قرار گیرد که به صورت پیچه نامنظم درآید، چهار برابر کاهش می‌یابد. به طور مشابه ویسکوزیته پروتئین کلاژن که یک مارپیچ سه‌تایی صلب است و DNA که یک مارپیچ مضاعف است، در اثر غیرطبیعی‌شدن کاهش می‌یابد.

۱۰-۴-۲. تعیین وجود یا عدم وجود پیوندهای دی‌سولفید درون زنجیری در پروتئین‌ها:

باقی‌مانده‌های سیستئین در پروتئین‌ها غالبا توسط پل‌های دی‌سولفید به یکدیگر متصل شده‌اند. این پل‌های دی‌سولفیدی وقتی که پروتئین غیرطبیعی می‌شود، از پذیرش بنای فضایی پیچه نامنظم توسط پروتئین جلوگیری می‌کنند مخصوصا اگر باقی‌مانده‌های سیستئین‌ها توسط تعداد زیادی اسیدآمینه از یکدیگر جدا شده باشند. چنین مولکولی را می‌توان نزدیک به پیچه نامنظم توصیف کرد زیرا فشرده‌تر از یک پیچه نامنظم حقیقی است. پیوندهای دی‌سولفید را توسط احیاء به وسیله بتامرکاپتواتانول از بین می‌برند و برای جلوگیری از تشکیل مجدد آنها از عوامل الکیله‌کننده مثل آیدواستات استفاده می‌کنند. بنابراین، اگر پیوندهای دی سولفید درساختمان طبیعی وجود داشته باشند، ویسکوزیته پروتئین در محلول M ۶ گوانیدین هایدروکلراید پس از افزون بتامرکاپتواتانول بیشتر خواهد شد زیرا مولکول فشردگی کمتری خواهد داشت. به عنوان مثال، توبولین مغز گوساله قبل از احیاء توسط بتامرکاپتواتانول دارای $[\eta] = ۳۶\ ml.g^{-1}$ است و بعد از احیاء توسط بتامرکاپتواتانول ویسکوزیته ذاتی آن برابر با $۴۴\ ml.g^{-1}$ می‌شود. این تفاوت در مقادیر ویسکوزیته ذاتی نشان می‌دهد در این پروتئین پیوندهای دی‌سولفید حضور داشته است.

۱۰-۴-۳. تعیین موقعیت پیوندهای دی‌سولفید درون زنجیری در پروتئین‌ها:

از مقادیر ویسکوزیته ذاتی شکل‌های احیاءشده و احیاءنشده پروتئین می‌توان در مورد فاصله بین باقی‌مانده‌های سیستئین شرکت‌کننده در پل‌های دی‌سولفیدی اطلاعاتی بدست آورد. نشان داده شده است که نسبت ویسکوزیته ذاتی برای یک پلی‌مر خطی در یک بنای فضایی پیچه نامنظم راست خط به ویسکوزیته ذاتی همین پلی‌مر در بنای فضایی حلقوی، برابر ۱/۶ است. یعنی:

---

[۱۶] poly-γ-benzyl-L- glutamate

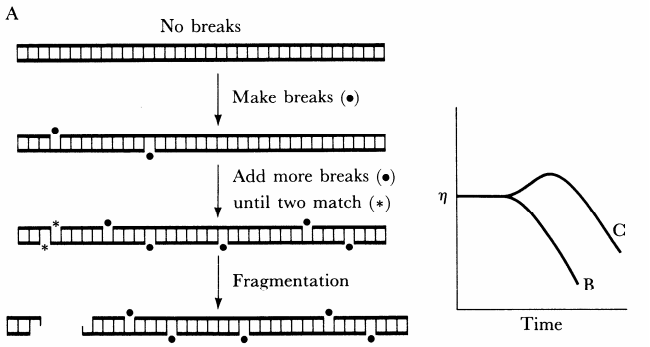
$$\frac{[\eta]_{\text{Linear}}}{[\eta]_{\text{Circular}}} = ۱/۶$$

به عنوان مثال، در توبولین چون مقدار $[\eta] = ۴۴$ نشان‌دهنده زنجیر خطی است (یعنی بدون پل‌های دی‌سولفیدی)، برای یک حلقه (یعنی وقتی پیوندهای دی‌سولفیدی بین دو اسید آمینه انتهایی باشد) باید $[\eta]_{\text{Circular}} = \frac{۴۴}{۱/۶} = ۲۷/۵$ باشد. چون مقدار مشاهده‌شده برابر ۳۶ است، به طور آشکار می‌توان فهمید که پیوند دی‌سولفید بین اسیدهای آمینه انتهایی نبوده است. اگر پیوند دی‌سولفید بین دو اسیدآمینه مجاور باشد، شکستن این پیوند آثار کمی خواهد داشت و مقادیر $[\eta]$ باید خیلی نزدیک به هم باشد. بنابراین، پیوند دی‌سولفید بین دو سیستئین که به یکدیگر نزدیک می‌باشند نیز نبوده است. چون $[\eta]$ تقریبا در وسط ۲۷/۵ و ۴۴ قرار دارد، می‌توان نتیجه گرفت سیستئین‌ها به مقدار قابل توجهی در امتداد زنجیر پلی‌پپتیدی از یکدیگر دور می‌باشند ولی خیلی هم نزدیک به دو انتهای زنجیر نیستند.

۱۰-۴-۴. حلقوی و یا خطی بودن مولکول‌های DNA:

در سال ۱۹۶۱ نشان داده شد که DNA فاژ $T_۲$ حلقوی است. چون در آن زمان مشاهده DNA توسط میکروسکوپ الکترونی امکان‌پذیر نبود تا حلقوی یا خطی بودن آن را نشان داد، تغییر در ویسکوزیته نسبی یک نمونه $T_۲$ DNA که به طور مداوم مورد هضم آنزیمی توسط Dnase پانکراس قرار گرفته بود، مورد تعقیب قرار گرفت. این آنزیم موجب شکست تک‌رشته‌ای در پیوندهای فسفودی استر می‌شود که در اثر زیاد شدن این شکست‌های تک‌رشته‌ای سرانجام DNA دچار شکست دو رشته خواهد شد (شکل ۱۰-۷-A). شکست‌های تک‌رشته‌ای به تنهایی اثری بر ویسکوزیته DNA ندارند (شکل ۱۰-۷-B) زیرا صلبیت مولکول حاصل انباشتگی بازهای آن است. بنابراین، برای یک مولکول خطی در حین فرآیند ایجاد شکست‌های تک رشته‌ای η_r ثابت است و وقتی مقدار آن کاهش می‌یابد که جفت شدن[۱۷] دو شکست تک‌رشته‌ای روی دهد و کاهش متعاقب η_r به دلیل کاهش وزن مولکولی DNA است (شکل ۱۰-۷-B):

[۱۷] Matching

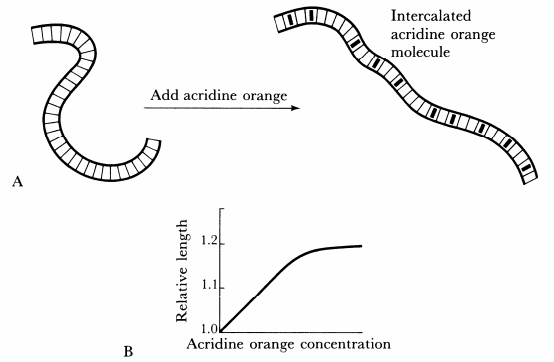


شکل (۱۰-۷): (A) جفت شدن شکست‌های تک‌رشته‌ای در DNA منجر به شکست دو رشته‌ای می‌شود. نقطه‌ها نشان‌دهنده موقعیت شکست‌ها می‌باشند. ستاره‌ها نشان می‌دهند که یک جفت شکست تک‌رشته‌ای مقابل هم تولید یک شکست دو رشته‌ای می‌کند. نمودار سمت راست نشان‌دهنده تغییرات ویسکوزیته T_2 DNA به عنوان تابعی از زمان هضم توسط Dnase پانکراس می‌باشد. (B) منحنی مورد انتظار اگر DNA خطی باشد و (C) منحنی مورد انتظار اگر DNA حلقوی باشد.

نمودار تغییرات ویسکوزیته T_2 DNA به صورت تابعی از زمان هضم توسط Dnase در ابتدا خطی است زیرا شکست‌های تک‌رشته‌ای اثری بر ویسکوزیته ندارد. اگر DNA حلقوی باشد، نمودار تغییرات ویسکوزیته‌اش در مقابل زمان به صورت C خواهد بود. وقتی که اولین شکست دو رشته‌ای روی می‌دهد DNA حلقوی، خطی می‌شود و ویسکوزیته‌اش افزایش خواهد یافت (به علت افزایش نسبت محوری) تا اینکه دومین شکست تک‌رشته‌ای روی دهد که با کاهش وزن مولکولی و در نتیجه کاهش ویسکوزیته همراه است. شکست‌های دو رشته‌ای بعدی نیز موجب کاهش بیشتر ویسکوزیته خواهد شد. برای مولکول‌های خطی DNA، η_r پس از چند ساعت هضم آنزیمی ثابت است و سپس کاهش می‌یابد که نشان دهنده خطی بودن DNA است.

۱۰-۴-۵. شواهد ویسکومتری دال بر توانایی ترکیبات معین برای درج شدن[۱۸] بین بازهای نوکلئوتیدهای DNA:

رنگ آکریدین‌آرنج به طور محکم به مارپیچ مضاعف DNA متصل می‌شود. در اثر اتصال رنگ، ضریب‌ته‌نشین سازی کمپلکس رنگ-DNA در مقایسه با DNA آزاد کاهش می‌یابد. کاهش ضریب ته‌نشین‌سازی می‌تواند ناشی از دپلی‌مریزاسیون و یا افزایش ضریب اصطکاک به واسطه افزایش در نسبت محوری باشد. اگر کاهش ضریب ته‌نشین‌سازی به واسطه دپلی‌مریزاسیون باشد، ویسکوزیته ویژه باید کاهش یابد ولی اگر کاهش ضریب ته‌نشین‌سازی به واسطه افزایش ضریب اصطکاک باشد، ویسکوزیته ذاتی باید افزایش پیدا کند. به طور تجربی، ویسکوزیته ذاتی کمپلکس بزرگتر از ویسکوزیته ذاتی DNA آزاد است. پس نسبت محوری کمپلکس باید از نسبت محوری DNA آزاد بزرگتر باشد. بنابراین، طول DNA باید وقتی که رنگ به آن متصل می شود افزایش یافته باشد. مطالعات پلاریزاسیون فلوئورسانس نشان داده است که رنگ در صفحه جفت بازها تثبیت شده است. پس می‌توان نتیجه‌گیری نمود که رنگ بین جفت بازهای DNA درج شده و طول DNA افزایش یافته است (شکل ۱۰-۸). این نتیجه‌گیری توسط میکروسکوپ الکترونی مورد تایید قرار گرفته است.



شکل (۱۰-۸): (A) مولکول‌های آکریدین آرنج بین جفت‌بازهای DNA درج می‌شوند در نتیجه مولکول DNA طویل‌تر شده و صلبیت آن افزایش می‌یابد. (B) طول DNA باکتریوفاژ λ به صورت تابعی از غلظت آکریدین آرنج.

[۱۸] Intercalation

۱۰-۴-۶. بنای فضایی کمپلکس‌های DNA - هیستون:

هیستون‌ها پروتئین‌های قلیایی هستند که به DNA متصل می‌شوند. وقتی هیستون به DNA متصل می‌شود، ضریب ته‌نشین‌سازی کمپلکس هیستون-DNA افزایش می‌یابد. افزایش ضریب ته‌نشین‌سازی می‌تواند به علت افزایش جرم مولکولی و یا کاهش ضریب اصطکاک (به علت کاهش نسبت محوری) باشد. ویسکوزیته ذاتی کمپلکس نیز افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده افزایش در جرم مولکولی و یا افزایش در نسبت محوری کمپلکس است. به طور کیفی این دو نتیجه پیشنهاد می‌کنند که جرم مولکولی کمپلکس افزایش یافته است. هر چه تعداد هیستون بیشتری به DNA متصل می‌شود، نسبت $s/[\eta]$ به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد با افزایش تعداد هیستون‌های متصل‌شده، نسبت محوری همچنان کاهش می‌یابد. بنابراین افزایش در جرم مولکولی که به واسطه اتصال هیستون‌هاست، همراه با تاخوردگی DNA می‌باشد.