

Maria Lidwin i Tadeusz Wilczok  
Katedra i Zakład Chemii Ogólnej,  
Śląskiej Akademii Medycznej  
w Katowicach

KRYTERIA FIZYKO-CHEMICZNE ROZTWORÓW DNA W WISKOZYMETRYCZNYCH  
POMIARACH CIĘŻARÓW CZĄSTECZKOWYCH

**Streszczenie.** Określono ciężary cząsteczkowe kwasu dezoksyrybonukleinowego w kapilarnym wiskozymetrze Eignera i wyznaczono lepkości wewnętrzne  $[\eta]$  dla DNA w 0,2 M roztworze NaCl.

Wykazano, że lepkości wewnętrzne DNA  $[\eta]$  można wyznaczyć poprzez pomiar lepkości względnej dla jednego tylko stężenia DNA.

Stwierdzono, że dla DNA o ciężarze cząsteczkowym  $0,5 \cdot 10^6$  można pominąć dwukrotne ekstrapolowanie  $\frac{\eta_{sp}}{c}$  do stężenia DNA  $C \rightarrow 0$  i gradientu prędkości przepływu  $G \rightarrow 0$ . w przypadkach gdy  $G \cong 20 \text{ s}^{-1}$ , a wyznaczona lepkość względna  $\eta_{wzgl.} \cong 1,1$ . Postępowanie to, pozwala na wyznaczenie ciężaru cząsteczkowego DNA nawet dla 0,1 mg DNA.

Makromolekuły biologicznie aktywne, wśród nich kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA) charakteryzują się dużymi rozmiarami, wysokim ciężarem cząsteczkowym i skomplikowaną drugo- i trzeciorzędową budową przestrzenną. Podstawowym kryterium analizy II rzędowej struktury molekuł DNA jest ich ciężar cząsteczkowy.

Ciężar cząsteczkowy biopolimerów, wśród nich DNA można wyznaczyć z pomiarów natężenia rozproszenia światła [1] dla molekuł DNA o niskim ciężarze cząsteczkowym oraz z pomiarów lepkości wewnętrznej [2,3,4] i pomiarów stałej sydentacji [5], a szczególnie z połączenia wyników tych metod, w oparciu o równanie Flory-Mandelkerna [6]. Z wszystkich wymienionych metod najbardziej dogodnym wyznaczeniem ciężaru cząsteczkowego jest pomiar lepkości wewnętrznej  $[\eta]$  roztworów DNA. Pomiaru te wykonywane są przy pomocy prostej aparatury, a ich interpretacja uwzględnia wszystkie istotne fizyko-chemiczne kryteria strukturalne.

Lepkość wewnętrzną można zdefiniować przez:

$$[\eta] = \lim_{\substack{C \rightarrow 0 \\ G \rightarrow 0}} \left( \frac{\eta_{wzgl.}^{-1}}{c} \right)$$

gdzie

$$\eta_{wzgl.} = \frac{\eta_{roztw.}}{\eta_{rozp.}}$$

$c$  - stężenie roztw. DNA g/dl

$G$  - gradient prędkości przepływu  $s^{-1}$

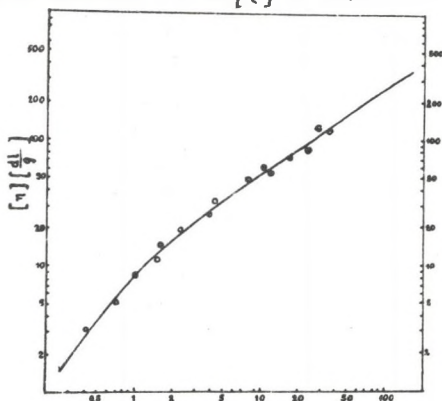
Najczęściej stosowaną jednostką lepkości wewnętrznej roztworów DNA jest dl/g. Znajomość wartości lepkości wewnętrznej roztworu DNA umożliwia obliczenia jego ciężaru cząsteczkowego  $M$ . Ciężary cząsteczkowe molekuł DNA wahają się od  $3 \cdot 10^5 \div 10^8$ , przy czym większa ilość molekuł DNA dostępnych badaniom posiada ciężar cząsteczkowy  $3 \cdot 10^5 \div 10^7$ .

Zależność lepkości wewnętrznej od ciężaru cząsteczkowego biopolimerów określona jest ogólnym równaniem Deby'ego  $[\eta] = K \cdot M^\alpha$ , gdzie  $K$  i  $\alpha$  są współczynnikami zależnymi od struktury biopolimeru. W przypadku roztworów DNA zależność ogólna między  $[\eta]$  i  $M$  przedstawia się następująco:  $(2) [\eta] = 1,45 \cdot 10^{-6} M^{1,12}$  a w szczególnych przypadkach wynosi odpowiednio  $[\eta]$

$$[\eta] = 1,05 \cdot 10^{-7} M^{1,32} \text{ dla } M = 3 \cdot 10^5 \div 2 \cdot 10^6$$

$$[\eta] = 6,9 \cdot 10^{-4} M^{0,70} \text{ dla } M = 2 \cdot 10^6 \div 1,3 \cdot 10^8$$

Zależność ciężaru cząsteczkowego  $M$  od lepkości wewnętrznej  $[\eta]$  możemy przedstawić graficznie jako funkcję  $M = f([\eta])$ . (Rys. 1). Lepkość względna



Rys. 1. Zależność ciężaru cząsteczkowego  $M$  DNA od lepkości wewnętrznej  $[\eta]$

roztworów DNA możemy mierzyć wiskozymetrem kapilarnym Eignera [2]. Jest to zmodyfikowany wiskozymetr kapilarny typu Ubbelohde'a przeznaczony do mierzenia lepkości cieczy nienewtonowskich, których lepkość zależy od gradientu prędkości przepływu. Wiskozymetr Eignera stosowany w naszych badaniach, opisany jest wymiarami przedstawionymi na Rys. 2.

Wiskozymetr ten, dzięki czterem kulistym naczyniom umieszczonym jedno pod drugim w pionowym rzędzie, umożliwia wyznaczenie lepkości względnej roztworów DNA przy czterech różnych gradientach prędkości przepływu. Wyznaczenie gradientów prędkości przepływu i utrzymanie ich w określonych granicach, warunkuje przydatność wiskozymetru do pomiarów lepkości roztworów DNA.



I nac., 246 s dla II nac., 281 s dla III nac., 284 s dla IV nac. Różnice temperatur w pomiarach wiskozymetrycznych nie przekraczały  $0,03^{\circ}\text{C}$ . Wszystkie pomiary lepkości względnej wykonano w temperaturze  $25^{\circ}\text{C}$ .

Jak wynika z definicji lepkości wewnętrznej  $[\eta]$ , jej wartość należy wyznaczać dla gradientu prędkości przepływu  $G \rightarrow 0$  i stężenia roztworu DNA  $C \rightarrow 0$ . Używając do wyznaczenia lepkości wewnętrznej wiskozymetru kapilarnego Eignera, staramy się osiągnąć  $G \rightarrow 0$  przez maksymalne zmniejszenie promienia kapilary  $r$  oraz przez zwiększenie długości kapilary  $L$ . Zwiększenie długości kapilary uzyskujemy przez skręcenie kapilary w spiralę. Promienia kapilary nie można zmniejszać nieograniczenie, ponieważ zgodnie z wynikami szeregu autorów (11), w przypadku promienia mniejszego od 0,4 mm- roztwory DNA ulegają degradacji podczas przepływu przez kapilarę. Lepkość względna roztworów DNA jest tym większa, im większa jest stężenie roztworu. Biorąc pod uwagę, że średni gradient prędkości przepływu  $G_{\text{sr}}$  jest funkcją odwrotnie proporcjonalną w stosunku do lepkości względnej roztworu, nie można równocześnie spełnić warunku uzyskania minimalnego  $G_{\text{sr}}$  i minimalnego stężenia  $C$  DNA w roztworze. Uwzględniając wymienione wyżej zastrzeżenia dla warunku  $G \rightarrow 0$  i  $C \rightarrow 0$ , uzyskujemy przy pomocy opisanego wiskozymetru średnie gradienty prędkości przepływu w granicach  $G_{\text{sr}} = 20\text{s}^{-1} \div 100\text{s}^{-1}$ .

Dla roztworów DNA o lepkości wewnętrznej  $[\eta] < 60 \frac{\text{dl}}{\text{g}}$  wartość  $\frac{[\eta]_{\text{wzgl}}^{-1}}{C} = \frac{[\eta]_{\text{sp}}}{C}$  zależy jedynie w małym stopniu od gradientu prędkości przepływu, pod warunkiem, że  $G < 25\text{s}^{-1}$ . Dla wyższych wartości gradientu obserwujemy zmniejszenie się wartości  $\frac{[\eta]_{\text{sp}}}{C}$ . Zależność lepkości wewnętrznej  $[\eta]$  od gradientu prędkości przepływu przedstawiona jest równaniem

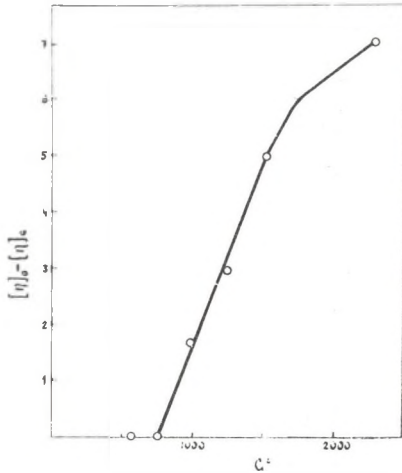
$$[\eta]_G = [\eta]_0 (1 - aG^2 + bG^4 + \dots)$$

gdzie lepkość wewnętrzna roztworu DNA dla danego gradientu prędkości przepływu  $[\eta]_G, [\eta]_0$  jest lepkością wewnętrzną dla  $G \rightarrow 0$ , a wartości  $a$  i  $b$  są stałymi zależnymi od struktury makromolekuł (11). Zależność lepkości wewnętrznej od gradientu prędkości przepływu można również przedstawić jako:

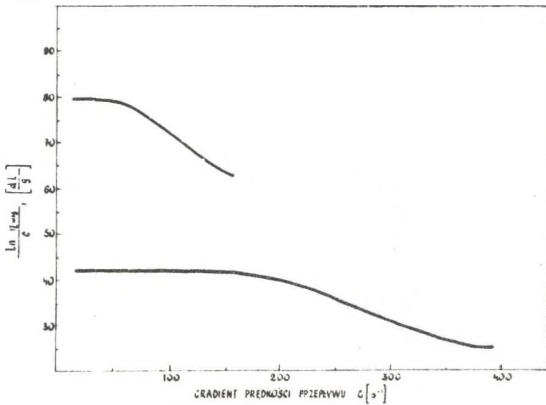
$$\frac{[\eta]_0 - [\eta]_G}{G^2} = K[\eta]_0^{\alpha}$$

gdzie  $K$  i  $\alpha$  są stałymi zależnymi od struktury makromolekuł (11).

Z przedstawionej na rys. 3 zależności  $[\eta]_0 - [\eta]_G = f(G^2)$  wynika, że do wartości  $G = 25\text{s}^{-1} \div 30\text{s}^{-1}$  roztwory DNA zachowują się jak ciecze newtonowskie, natomiast wyższe gradienty prędkości przepływu wpływają na orientację makromolekuł w przepływającym roztworze. Bardziej przydatne praktycznie jest przedstawienie zależności lepkości wewnętrznej od gra-



Rys. 3. Wpływ gradientu prędkości przepływu  $G$  na wartość lepkości wewnętrznej  $[\eta]$   
 $[\eta]_0$  - lepkość wewnętrzna DNA dla  $G = 0$ ,  $[\eta]_G$  - lepkość wewnętrzna dla  $G > 0$ ,  $G^2$  - kwadrat gradientu prędkości przepływu



Rys. 4. Zależność  $\ln \frac{\eta_{wzgl}}{\eta_0}$  od gradientu prędkości przepływu  $G$  dla preparatów DNA o lepkości wewnętrznej  $[\eta] = 43$  dl/g i  $[\eta] = 80$  dl/g

dientu prędkości przepływu jako  $\ln \frac{\eta_{wzgl}}{\eta_0} = f(G)$ . Zależność ta przedstawiona jest na Rys. 4.

Po wyznaczeniu wartości stosunku lepkości specyficznej do stężenia  $\frac{\eta_{sp}}{C}$  dla  $G \rightarrow 0$  należy zekstrapolować otrzymane wartości dla stężenia roztworu DNA  $C \rightarrow 0$ . Ekstrapolację tę możemy dokonać przez wykreślenie zależności  $\lim_{C \rightarrow 0} (\frac{\eta_{sp}}{C})$  lub  $\lim_{C \rightarrow 0} (\ln \frac{\eta_{wzgl}}{\eta_0})$  od stężenia roztworu DNA



Wykazano, że dla lepkości względnych  $\eta_{wzgl} < 2$  funkcje te są w zasadzie liniami prostymi i możemy przedstawić je następującymi równaniami:

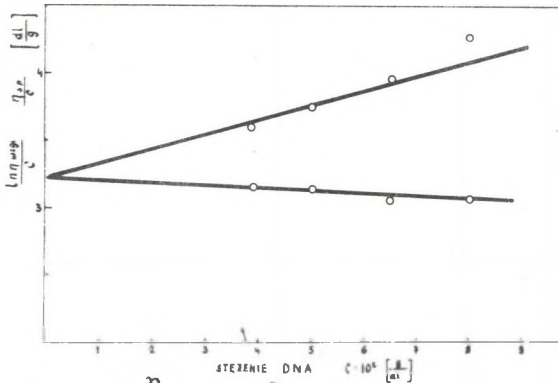
$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + K' [\eta]^2 C$$

$$\frac{\ln \eta_{wzgl}}{C} = [\eta] + K'' [\eta]^2 C$$

gdzie  $K'$  i  $K''$  są wartościami stałymi tak że  $K' + K'' = 0,5$  (2).

Wg Eignera i Doty'ego  $[\eta]$   $K'$  i  $K''$  wynoszą odpowiednio  $K' = 0,45, K'' = 0,05$  dla niskich wartości gradientu prędkości przepływu.

Wyznaczenie lepkości wewnętrznej roztworu DNA  $[\eta]$  poprzez graficzne znalezienie  $\frac{\ln \eta_{wzgl}}{C}$  i  $\frac{\eta_{sp}}{C}$  dla  $C \rightarrow 0$  przedstawione jest na Rys. 5.

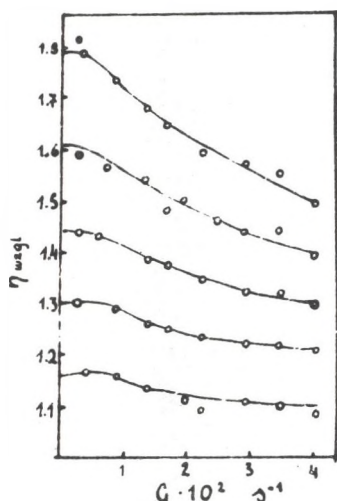


Rys. 5. Zależność  $\frac{\ln \eta_{wzgl}}{C}$  i  $\frac{\eta_{sp}}{C}$  od stężenia  $C$  roztworu DNA

Ponieważ  $K'' < K'$ , wyznaczenie lepkości wewnętrznej  $[\eta]$  w oparciu o wykreślenie zależności  $\frac{\ln \eta_{wzgl}}{C} = f(C)$ , jest obarczone mniejszym błędem niż w oparciu o zależność  $\frac{\eta_{sp}}{C} = f(C)$ .

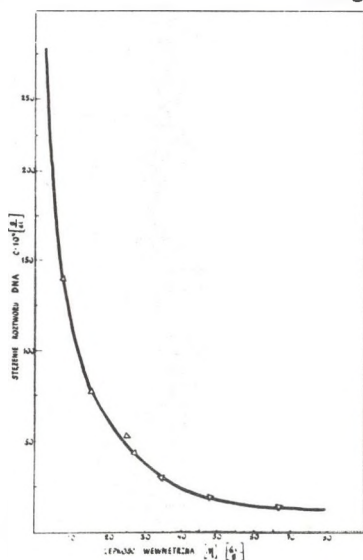
DNA będący podstawowym materiałem genetycznym jest w wielu przypadkach preparatem trudnych do wyizolowania w ilościach umożliwiającym wyznaczenie lepkości względnej dla kilku stężeń roztworu DNA. Małe ilości DNA, dostępne dla oznaczeń, określają sposób postępowania umożliwiając wyznaczenie lepkości wewnętrznej  $[\eta]$  roztworu DNA z pomiaru lepkości względnej dla jednego tylko stężenia roztworu.

Na podstawie dotychczas opublikowanych wyników wykazano, że błąd wynikający z dokładności pomiaru czasu wypływu roztworu DNA jak i wynikający ze zmniejszenia się wartości  $\frac{\eta_{sp}}{C}$  jest najmniejszy dla stężenia roztworu DNA o  $\eta_{wzgl} = 1,1$  i odpowiednio  $\eta_{sp} = 0,1$ . Wpływ gradientu prędkości przepływu  $G$  na wartość lepkości względnej przedstawiony jest na Rys. 6.



Rys. 6. Wpływ gradientu pręd-  
kości przepływu  $G$  na wartość  
lepkości względnej  $\eta_{wzgl}$  roz-  
tworu DNA

walają po wyznaczeniu jednej tylko wartości  $\eta_{wzgl}$ , znaleźć rozcieńczenie roztworu DNA- dla którego  $\eta_{wzgl} = 1.1$ .



Rys. 7. Zależność stężenia  $C$  roz-  
tworu DNA od lepkości wewnątrz-  
nej  $[\eta]$  dla  $\eta_{wzgl} = 1,1$ .

Z wykresu wynika, że im lepkość wzglę-  
dna jest mniejsza tym wpływ gradientu  
prędkości przepływu jest mniejszy, a tym  
samym uwzględniając wpływ  $G$  wybranie  
lepkości względnej  $\eta_{wzgl} = 1,1$  do wy-  
znaczenia lepkości wewnętrznej  $[\eta]$  roz-  
tworu DNA jest obciążone najmniejszym  
błędem. Lepkość wewnętrzna roztworu DNA  
 $[\eta]$  wyliczona z równania  $\eta_{sp}^0 = [\eta] +$   
 $K[\eta]^2 C$ , - przyjmując, że  $K' = 0,5$ , - dla  
 $\eta_{wzgl} = 1,1$  różni się jedynie o około 5%  
od wartości  $[\eta]$  wyznaczonej graficznie.

Przy pomocy opisanego wiskozymetru  
Eignera, przebadano zależność lepkości  
względnej  $\eta_{wzgl}$  od stężenia  $C$  roztworu  
DNA o różnej lepkości wewnętrznej  $[\eta]$  w  
zakresie  $[\eta] = 3-60$  dl/g, dla różnych  
wartości gradientu prędkości przepływu  
 $G$ . Uzyskane przez nas wartości lepkości  
względnej i odpowiednich stężeń DNA, poz-

walają po wyznaczeniu jednej tylko wartości  $\eta_{wzgl}$ , znaleźć rozcieńczenie roztworu DNA- dla którego  $\eta_{wzgl} = 1.1$ .  
Zależność stężenia  $C$  roztworu DNA,  
dla którego lepkość względna wynosi  
 $\eta_{wzgl} = 1,1$ , od lepkości wewnętrznej  $[\eta]$   
DNA przedstawiona jest na Rys. 7. Warto-  
ści te wyznaczone dla gradientu przepły-  
wu  $G = 20s^{-1}$ .

Ciążar cząsteczkowy DNA jest tym wię-  
kszy im większa jest lepkość wewnętrzna  
roztworu DNA, tym samym  $\eta_{wzgl} = 1,1$ ,  
dla roztworów DNA o dużym ciężarze czą-  
steczkowym, będzie spełnione nawet przy  
stosunkowo niskich stężeniach DNA. Wnio-  
sek ten ma bardzo istotne znaczenie przy  
pomiarach bardzo małych ilości DNA. Z  
drugiej strony, dokładność wyznaczenia  
lepkości wewnętrznej  $[\eta]$  z jednego po-  
miaru  $\eta_{wzgl} = 1,1$ , jest tym większa im  
ciężar cząsteczkowy DNA jest mniejszy.  
Ze względu na to, że lepkość wewnętrzna  
 $[\eta]$  roztworów DNA bywa najczęściej sto-  
sowana dla określenia ciężarów cząstecz-

kowych DNA, nie przestrzeganie warunków pozwalających na pomiary  $\eta_{wzgl}$ , przy  $C \rightarrow 0$  i  $G \rightarrow 0$  prowadzi do wyznaczenia błędnych wartości ciężarów cząsteczkowych.

#### LITERATURA

- [1] Butler J.A.V., Laurence D.I.R., Robins A.B., Shooter K.V., - Proc. Royal. Soc. A, 250, 1. 1959.
- [2] Eigner J. - Thesis Harvard University 1960
- [3] Crothers D.M., Zimm B.H. - J.Mol.Biol. 12, 525, 1965
- [4] Aten J.B.T., Cohen J.A. - J.Mol.Biol. 12, 537, 1965
- [5] Doty P., McGill B.B., Rice S.A., - Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 44, 432, 1958
- [6] Mandelkern L., Flory P.J. - J.Chem.Phys. 20, 212, 1952
- [7] Eigner J., Doty P., - J.Mol.Biol. 12, 549, 1965
- [8] Kay E.R.M. Simmons N.S., Dounce A.L. - J.Amer.Chem.Soc. 74, 1724, 1952
- [9] Georgiew G.P. Biochimija 24, 472, 1959
- [10] Wardas W., Praca doktorska 1967
- [11] Robins A.B., - Trans.Far.Soc. 60, 1344, 1964

#### PHYSICO-CHEMICAL CRITERIA OF DNA SOLUTIONS IN VISCOMETRIC MOLECULAR WEIGHTS DETERMINATIONS

##### Summary

The molecular weight of DNA was measured using a Eigner type viscometer in 0,2 M NaCl by intrinsic viscosity determination. It was shown that intrinsic viscosities  $[\eta]$  can be determined through only one measurement at selected DNA concentration. When DNA preparations with M.W.  $0,5-6 \cdot 10^6$  are investigated, the repeated extrapolation  $\frac{\eta_{sp}}{C}$  to zero DNA concentration and zero shear gradient can be omitted if  $G \approx 20 \text{ s}^{-1}$  and  $\eta_{rel} \approx 1,1$ .

For such M.W. determination only 0,1 mg of DNA is necessary.

#### ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ РАСТВОРОВ ДНК В ВИСКОЗИМЕТРИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЯХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЕСОВ

##### Резюме

Определено молекулярные веса ДНК при помощи капиллярного вискозиметра Эйгнера и обозначено характерическую вязкость  $[\eta]$  ДНК в 0,2 M растворе NaCl.

Указано, что характеристические вязкости ДНК  $[\eta]$  можно обозначать измеряя относительную вязкость для одной только концентрации ДНК.



Подтверждено, что для ДНК с молекулярном весе  $0,5-6 \cdot 10^6$  можно спустить двукратную экстраполяцию  $\frac{\eta_{sp}}{C}$  к значению концентрации ДНК  $C \rightarrow 0$  и градиента скорости потока  $G \rightarrow 0$ , в случаях когда  $G \approx 20 \text{ }^{-1}$  а обозначена относительная вязкость  $\eta_{rel} \approx 1,1$ .

Это дает возможность обозначения молекулярного веса ДНК в растворах содержащих 0,1 мг ДНК.