اللزوجة Viscosity والكثافة Density:

قصد باللزوجة مقاومة السائل للانسياب. واللزوجة ناتجة اساساً من احتكاك الجزيئات ببعضهما البعض في السوائل.

تمتاز محاليل DNA بلزوجتها العالية، وتزداد اللزوجة مع زيادة طول جزيئات DNA وان جزيئات DNA الحلزوني المزدوج تمتلك لزوجة أكبرمن الجزيئات ذات الاشرطة المفردة **Single Strand** . أما كثافة محاليل DNA فيعتمد على تركيزمحلول DNA وعلى شكل DNA البنائي او هيأتها الفراغية فيما اذا كان مفرد الشريط او مزدوجاً او دائرياً مغلقاً او مفتوح النهايتين او فائق الألتواء **Super Coiled**.

ويمكن استخراج كثافة DNA بالطرد المركزي الفائق **Ultra Centrifugation** في محاليل متدرجة الكثافة من كلوريد السيزيوم C_sCl_2 حيث تتحرك جزيئات DNA باتجاه القوة الطاردة المركزية وتستقر في موقع محدد معين من هذا المحلول يساوي كثافته كثافة جزيئات DNA اي عند النقطة التي تتعادل فيها كثافة المحلول مع كثافة DNA والتي تسمى بـ **Isopycnic Density** ويمكن تحديد مواقع تجمع جزيئات DNA بقياس امتصاص الضوء على الطول الموجي 260 نانومتر للاجزاء متدرجة الكثافة **Density Gradient**لمحلول كلوريد السيزيوم. وتتركز الكثافة العالية لكلوريد السيزيوم باتجاه القوة الطاردة المركزية .

وكما يمكن استخدام **CsCl, Cs_2SO_4, or Cs Formate** و.**sodium bromide (NaBr)** لغرض تحضير محاليل متدرج الكثافة وذلك بوضع هذه المحاليل في انبوبة الطرد المركزي وعلى سرعة 30,000 دورة/دقيقة لفترة طويلة تصل الى عدة أيام حيث تتدرج خلالها مكونات المحلول من الاعلى الى الاسفل.

ويفيد تعيين الكثافة الطافية buoyont density لـ DNA في المجالات الاتية:

1.معرفة محتوى DNA من G+C% وذلك حسب المعادلة الاتية:

{ gm / cm^3 } (الكثافة) P = 1.66 + 0.001 (%G+C)

وهذا يعني ضمنا انه يمكن فصل الجزيئات المختلفة في محتواها من G+C% باستعمال الطرد المركزي الفائق في محلول كلوريد السيزيوم متدرج الكثافة.

2.يمكن التمييز بين اشكال DNA (ذات الاشرطة المفردة عن المزدوجة، والدائرية عن غير الدائرية، وذات الالتواءات الفائقة عن جزيئات DNA المعاملة بالانزيمات **Topoismerase** او الانزيمات القاطعة **Restriction enzymes**.

3.كما يمكن فصل DNA العاثيات **Phage** او البلازميدات **Plasmides** عن DNA البكتيري (كمضيف او عائل للعاثيات **Host**).

4.تستعمل هذه الطريقة ايضاً في تنقية الحوامض النووية من الشوائب كالبروتينات او فصل DNA عن RNA.

5.استخدمت هذه الطريقة للتعرف على العديد من الحقائق المتعلقة لتركيب DNA وآلية تكراره(لاحظ محاضرة تكرار الدنا) وغيرها من العمليات الحيوية المتعلقة بهذه الجزيئة.

العوامل المؤثرة في قيمة T_m:

من العوامل المهمة التي تؤثر في قيمة T_m المحاليل التي يتم تعليق الدنا فيها. فعند تعليق الدنا في محلول ملحي NaCl بتركيز 0.15 *M* فإنه يزيد من ثباتية الدنا لتكوينه تداخلات و تآثرات مع مجاميع الفوسفات السالبة والمتوزعة على مدى السطح الخارجي، او طول الجزئية من الجهة الخارجية. عليه فإن قيمة T_m للدنا في هذا المحلول الملحي يكون أعلى بحوالي ٢٠ م° مقارنة مع قيمتها المقدرة في محلول دارىء الفوسفات بتركيز 0.01*M* ، على أن الماء النقى يسبب المسخ للدنا في درجة حرارة الغرفة. كما أن الارقام الهيدروجينية المتطرفة تؤدي الى سرعة المسخ ولاسيما المحاليل القاعدية، إذ أنها تؤدي الى سرعة إنفصال الأشرطة المزدوجة في الدنا دون تحللها الى وحداتها من النيوكلتيدات ، بخلاف الرنا التي تتحلل وحداتها من 2`-mononucleotides بتأثير المحاليل القاعدية على نحو كامل.

كما أن بعض المركبات العضوية، مثل اليوريا و Formamide ، تتسبب في إنخفاض درجة حرارة المسخ وتمنع إعادة أزواج القواعد في الاشرطة المفصولة عند التبريد ، لقدرتها على تكوين أواصرهيدروجينية مع القواعد النتروجينية تنافس تلك التي يفترض أن تتكون بين القواعد المكملة لبعضها في الأشرطة المتقابلة.

وتؤدي المركبات التي تزيد من ذائبية القواعد النتروجينية مثل الميثانول، او التي تؤدي الى تشتيت الماء من المنطقة المحيطة بها، مثل Trifluoroacetate، الى إنخفاض التداخلات الهيدروفوبية بين القواعد النتروجينية مما تتسبب في إنخفاض درجة حرارة المسخ أو قيمة T_m. غير أن معظم التداخلات بين البروتين و الدنا يزيد من ثباتية هذا الاخير.

الطرد المركزي وبعض إستخداماته في علم الحياة الجزيئي:

للطرد او النبذ المركزي، ولاسيما تلك التي تتميز بسرعتها الفائقة إستخدامات عديدة في علم الحياة الجزيئي، بل يمكن القول أن الجانب الاكبر من التطورات التي شهدها هذا العلم يعود الى إبتكار أجهزة الطرد المركزي وما رافقتها من تحسينات.

إذ أن العديد من خواص الجزيئات الكبيرة كالأحماض النووية والجسيمات الصغيرة كالرايبوسومات يمكن تعينها بالاعتماد على عملية الترسيب بالطرد المركزي فائق السرعة والتي تصل الى حوالي g 700 000 (700 000 مرة بقدر جاذبية الكرة الأرضية).

إن النسبة بين سرعة حركة جزيئة في محلول ما الى قوة الطرد المركزي تسمى بمكافئ الترسيب Sedimentation Coefficient ويعبر عنه بالثواني seconds ويرمز له بـ (s) وغالباً ما تكون هذه القيمة ثابتة في العديد من المحاليل المستخدمة لفصل الجزيئات الكبيرة او الجسيمات الصغيرة. عليه يمكن اعتبارها قيمة تعبر عن خاصية ثابتة ، وهي في الغالب خاصية وصفية، تجمع بين صفتي الشكل والحجم معاً. بمعنى ان ايّ تغيير يطرأ على هذه الجزيئات الكبيرة او تلك الجسيمات (بالانزيمات او بفعل عوامل فيزياوية) فانها تنعكس على قيمة (s) .

إن قيمة (s) لمعظم الجزيئات الكبيرة او الجسيمات الصغيرة تتراوح ما بين 1×10^{-13} الى 100×10^{-13} . وقد اعتبر Svedberg ، الذي يعود إليه الفضل في ابتكار اجهزة الطرد المركزي فائق السرعة ، الرقم 10^{-13} وحدة لقياس مكافئ الترسيب أسماها بوحدة سويد برج، ورمز لها بالحرف (S). عليه فعند وصف Ig G بـ 7S فهذا يعني ان مكافئ ترسيب بروتين المناعة هذه يبلغ $7x10^{-13}$

ويتم استخراج قيمة (s) بطريقة الطرد المركزي الموقعي **Zonal Centrifugation** وفيه يستخدم سكروز متدرج الكثافة (او الكليسرول أحياناً). و يحضر السكروز متدرج الكثافة بمزج محلولين منه، أحدهما بتركيز عالٍ والثاني بتركيز واطيء ، في حاوية مؤلفة من مقطعين موصولين ببعضهما من الأسفل بحيث يسمح بإنسياب المحلولين وإمتزاجهما بالتدريج إعتماداً على لزوجتهما. يتم استقبال المزيج المتدرج في انبوبة الطرد المركزي.

توضع العينة على سطح محلول السكروز متدرج الكثافة وتخضع للطرد المركزي فائق السرعة لمدة معينة. تتحرك الجزيئات والجسيمات الموجودة في العينة بسرع متباينة إعتماداً على كتلها و حجومها او أشكالها، ومدى مقاومتها للزوجة محلول السكروز في اية نقطة. الامر الذي يؤدي الى ابتعادها و إنفصالها عن بعضها البعض.

يتم توزيع محتويات أنبوبة الطرد المركزي وبكميات محددة في انابيب أختبار من خلال ثقب صغيرة يتم فتحها أسفل أنبوبة الطرد المركزي. وبقياس امتصاصية المحاليل في أنابيب الأختبار يمكن التعرف على موقع العينة لتحديد المسافة التي قطعتها (x) خلال فترة الطرد المركزي (t)، اي سرعتها داخل محلول السكروز متدرج الكثافة وبتأثير من القوة الطاردة المركزية.

وبالاعتماد على المعادلة التالية يمكن استخراج قيمة (s)

$$s = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{wr2}$$

حيث :

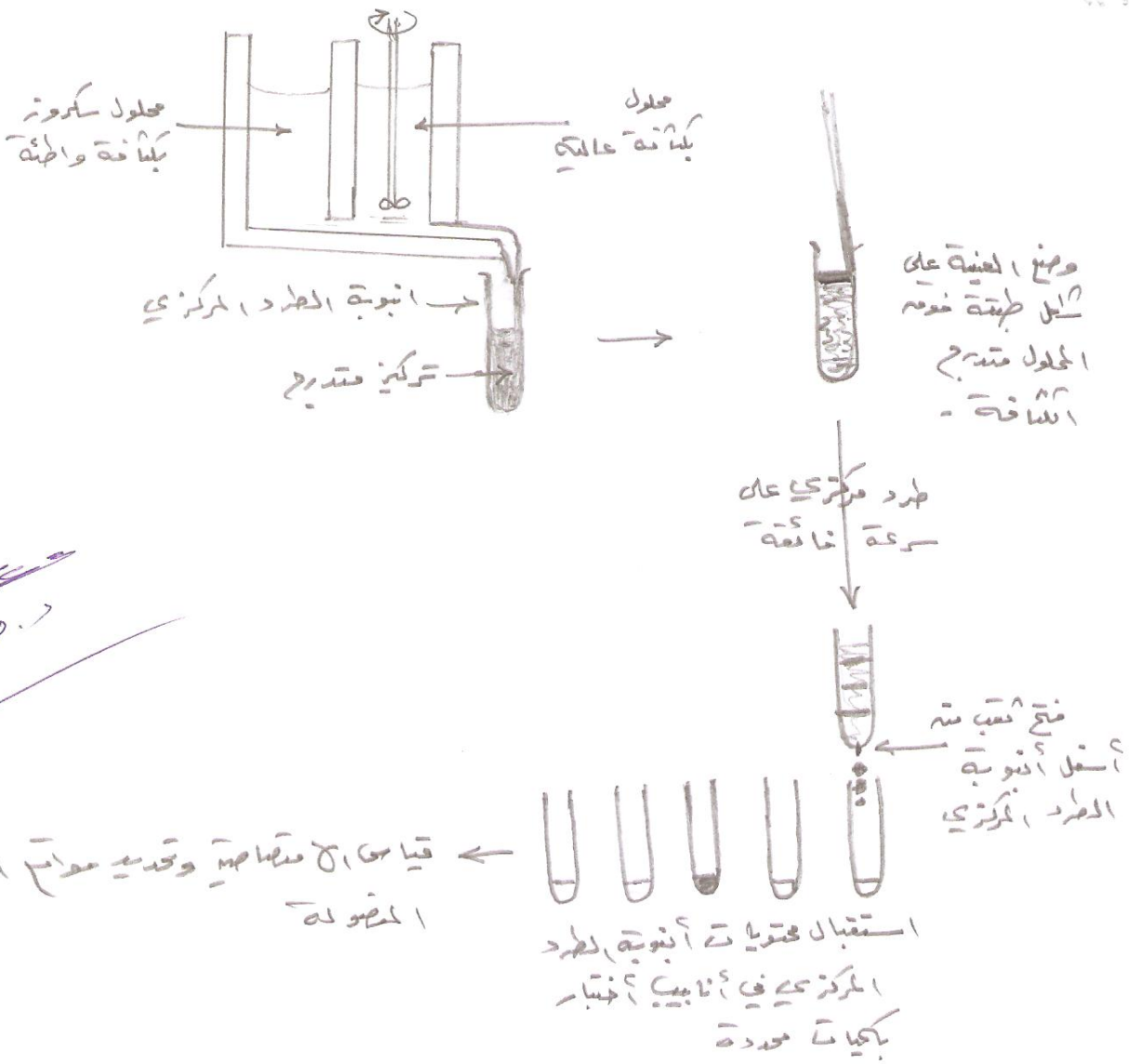
$\frac{dx}{dt}$ = سرعة الترسيب (سرعة حركة الجزيئة) في مجال الطرد المركزي

w= السرعة الزاوية (نصف قطر الدوران / ثانية)

r^2 = مربع المسافة بين العين و محور الدوران (سم^2)

ويمكن التعبير عن قيمة (s) بوحدة سويد برج (S). وتستخدم هذه الطريقة لاستخراج مكافئ ترسيب الجسيمات الصغيرة

ثمة طريقة أخرى تدعى بالطرد المركزي متدرج الكثافة المتعادل **Equilibrium Density-Gradient Centrifugation** وفيه يتم تعليق الجزيئات الكبيرة مثل الحوامض النووية او دقائق الفايروسات في محلول كلوريد السيزيوم CsC1 . يعتمد اختيار تركيز كلوريد السيزيوم على حجم الجزيئات الكبيرة وشكلها وبالتالي على كثافتها الطافية **Buoyant density**. وخلال عملية الطرد المركزي تعيد جزئيات كلوريد السيزيوم ترتيب نفسها جراء قوة الطرد المركزي المسلطة عليها فيكوّن محلولاً متدرج الكثافة داخل الانبوبة من الأعلى (أقل كثافة) الى الأسفل (اكثر كثافة). وحال تكون التدرج المذكور في محلول كلوريد السيزيوم تبدأ مكونات العينة بالحركة الى المواقع التي تضمن لها الاستقرار او المواقع التي تكون فيها كثافة كلوريد السيزيوم مساوياً لكثافة مكونات العينة الطافية كلا على حده. وبذلك تنفصل هذه المكونات (الجزئيات) عن بعضها البعض. والتي تشكل في مواقعها حزماً، تزداد درجة وضوحها مع اطالة فترة الطرد المركزي التي قد تستغرق يوماً كاملاً. ويتم التعرف على مواقع الحزم بطريقة ممثالة لما ذكر أعلاه.. وكما سبق فإن لهذه الطريقة إستخدامات واسعة في فصل الدنا والتعرف على محتواها من القواعد النيتروجينية. ويستخدم في تجارب فصل جزيئات الدنا محلول كلوريد السيزيوم بتركيز 0.2M في الغالب والذي يكوّن تدرجاً في الكثافة يتراوح من ١.١ الى 1.8 غم/ سم٣ .



شكل ( ) : تحضير محلول متدرج الكثافة من السكروز واستخدامه في فصل الجزيئات او الكميات الصغيرة من مستخلص خلوي باستخدام الطرد المركزي المنطقي . Zonal centrifugation

شكل ( ): تأثير القوة الأيونية لمحلول الدنا في درجة حرارة المسخ . (Tm)