فصل یازدهم
ته‌نشین‌سازی[1]

ته‌نشین‌سازی یکی از تکنیک‌های فیزیکی مهم در مطالعات مولکول‌های زیستی است. کاربردهای ته‌نشین‌سازی عبارت است از: جداسازی و خالص‌سازی ماکرومولکول‌ها، تجزیه مخلوط‌ها، تعیین جرم‌های مولکولی و نیز ابعاد مولکولی.

۱۱-۱. تئوری ته‌نشین‌سازی:

ذرات معلق در یک محلول به وسیله نیروی جاذبه زمین به سمت پایین کشیده می‌شوند. این جابجایی قدری توسط خاصیت شناوری[2] ذرات جبران می‌شود. از آنجایی که نیروی جاذبه زمین ضعیف است، محلول حاوی ماکرومولکول‌ها معمولا یکنواخت است که ناشی از حرکت حرارتی تصادفی مولکول‌ها می‌باشد. سرعت ته‌نشین‌سازی ذرات با افزایش جرم ذرات افزایش می‌یابد و نسبت مستقیم نیز با قدرت میدان جاذبه دارد.

محلولی که در یک لوله سانتریفیوژ می‌چرخد را در نظر بگیرید. چنین محلولی تحت تاثیر یک میدان جاذبه قوی قرار دارد. نیروی سانتریفوگال[3] که به یک ذره حل‌شونده در این محلول وارد می‌شود برابر است با:

$$F_c = mr\omega^2 \qquad (۱-۱۱)$$

در این معادله، m جرم ذره حل‌شونده، r فاصله ذره حل‌شونده از مرکز دوران و ω سرعت زاویه‌ای چرخنده[4] بر حسب رادیان بر ثانیه است. علاوه بر نیروی سانتریفوگال، باید نیروی شناوری (ارشمیدس) که در نتیجه جابجایی مولکول‌های حلال توسط ذرات حل‌شونده ایجاد می‌شود را نیز در نظر گرفت. نیروی شناوری نیروی وارده بر ذره را به اندازه حاصل‌ضرب شتاب سانتریفوگال در جرم حلال جابجا شده کاهش می‌دهد. یعنی:

---

[1] Sedimentation
[2] Buoyancy
[3] Centrifugal Force
[4] Rotor

$$F_b = m_s r\omega^2 \qquad (۲-۱۱)$$

در این معادله، m_s جرم حلال جابجا شده و $r\omega^2$ شتاب سانتریفوگال است. بنابراین، نیروی خالص وارده بر ذره توسط معادله زیر داده می‌شود:

نیروی شناوری - نیروی سانتریفوگال = نیروی خالص

$$= mr\omega^2 - m_s r\omega^2 \qquad (۳-۱۱)$$

می‌دانیم که: $\rho = \frac{m_s}{V} \Rightarrow m_s = \rho V$

می‌توان به جای جرم حلال جابجا شده، از معادل آن یعنی ρV جاگذاری کرد:

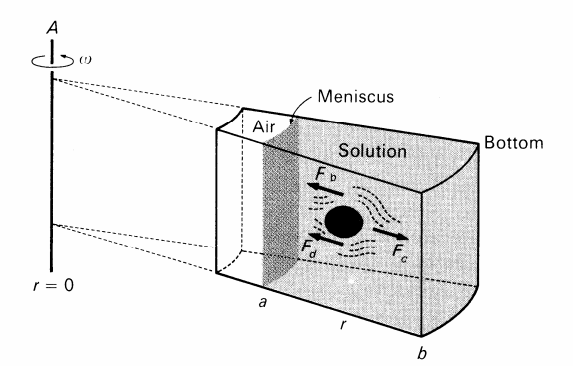
$$\text{نیروی خالص} = mr\omega^2 - \rho V r\omega^2 \qquad (۴-۱۱)$$

در این معادله، V و ρ به ترتیب حجم و چگالی حلال می‌باشد. بر طبق قانون دوم حرکت نیوتن، نیروی وارد شده به یک ذره موجب شتاب آن خواهد شد. در مورد ته‌نشین‌سازی، شتاب اولیه فقط برای مدت زمان کوتاهی (در مرتبه نانو ثانیه) تداوم دارد و پس از آن ذره با سرعت ثابت حرکت خواهد کرد. این بدان علت است که محیط بر ذره حرکت‌کننده نیروی اصطکاکی وارد می‌آورد که متناسب با سرعت ته‌نشین‌سازی (dr/dt) است. نیروی اصطکاک معادل است با حاصل‌ضرب ضریب اصطکاک (f) در سرعت ته‌نشین‌سازی. یعنی:

$$F_f = f(\frac{dr}{dt}) \qquad (۵-۱۱)$$

نیروی اصطکاک (F_d یا F_f) در جهت عکس نیروی خالص وارده بر ذره عمل می‌کند. در شکل (۱۱-۱) نیروهای وارده بر یک ذره حل‌شونده در حین یک آزمایش ته‌نشین‌سازی در یک سل قطاعی شکل[۵] نشان داده شده است:

[۵] Sector Shaped



شکل (۱۱-۱): دیاگرام یک آزمایش ته‌نشین‌سازی: یک سل قطاعی شکل، در یک چرخنده، با سرعت زاویه‌ای ω حول محور A می‌چرخد. مولکول حل‌شونده تحت تاثیر نیروهای سانتریفوگال، شناوری و اصطکاکی قرار دارد. چون ته‌نشین‌سازی در امتداد خطوط شعاعی صورت می‌گیرد، از سل قطاعی شکل استفاده شده است زیرا هر نوع سل دیگر موجب تغییر غلظت در نزدیک لبه‌ها می‌شود. سرعت زاویه‌ای معادل حاصل‌ضرب $۲\pi/۶۰$ در چرخش در دقیقه است.

در شرایط پایا[۶]، نیروی اصطکاک برابر با نیروی خالص وارده به ذره است. به عبارت دیگر، در شرایط پایا که سرعت حرکت ذره ثابت است، برآیند نیروهای وارده بر ذره برابر صفر است. یعنی:

$$F_c + F_b + F_f = ۰ \qquad (۶-۱۱)$$

$$mr\omega^۲ + (-\rho Vr\omega^۲) + (-f\frac{dr}{dt}) = ۰ \qquad (۷-۱۱)$$

یا:
$$mr\omega^۲ - \rho Vr\omega^۲ - f\frac{dr}{dt} = ۰ \;\Rightarrow\; f\frac{dr}{dt} = mr\omega^۲ - \rho Vr\omega^۲ \qquad (۸-۱۱)$$

اندازه‌گیری حجم ذره یا حجم حلال جابجا شده مشکل است. از اینرو از حجم ویژه جزیی $(\bar{\nu})$ استفاده می‌شود. کمیت $m\bar{\nu}$، معادل افزایش حجم است وقتی یک مولکول با جرم m به حلال اضافه می‌شود.

---

[۶] Steady State

به عبارت دیگر $m\bar{\nu}$ برابر با حجم ذره می‌باشد. برای بیشتر پروتئین‌ها، مقدار $\bar{\nu}$ حدود $0/74\ ml.g^{-1}$ است. حال می‌توان معادله (۱۱-۸) را به صورت زیر نوشت:

$$f\frac{dr}{dt} = mr\omega^2 - m\rho\bar{\nu}r\omega^2$$

$$= mr\omega^2(1-\bar{\nu}\rho)$$

در ایـن معادله، $(1-\bar{\nu}\rho)$ فاکتـور شناوری[۷] نامیده می‌شود. با نوآرایی این معادله می‌توان ضریب ته‌نشین‌سازی را تعریف نمود:

$$\frac{(dr/dt)}{r\omega^2} = \frac{m(1-\bar{\nu}\rho)}{f} = s = \frac{M(1-\bar{\nu}\rho)}{N_A f} \qquad (۹-۱۱)$$

در این معادله، s ضریب ته‌نشین‌سازی، M جرم مولکولی حل‌شونده و N_A عدد آووگادرو است. بدین ترتیب، ضریب ته‌نشین‌سازی به صورت نسبت سرعت ته‌نشین‌سازی به شتاب سانتریفوگال تعریف می‌شود. واحد ضریب ته‌نشین‌سازی، سودبرگ[۸] است و یک سودبرگ برابر با $10^{-13}\ s$ می‌باشد. معادله فوق می‌گوید:

۱- هر چه مولکول سنگین‌تر باشد، با سرعت بیشتری ته‌نشین خواهد شد.

۲- هر چه مولکول چگال‌تر باشد (حجم ویژه کمتری داشته باشد)، با سرعت بیشتری ته‌نشین خواهد شد.

۳- هر چه محلول چگال‌تر باشد، مولکول‌های حل‌شونده با سرعت کمتری ته‌نشین خواهد شد.

۴- هر چه ضریب اصطکاک بزرگتر باشد، مولکول ها آهسته تر ته نشین خواهند شد. از اینرو، ماکرومولکول‌های گسترده‌تر و پیچه‌های نامنظم کندتر از ماکرومولکول‌های کروی ته‌نشین خواهند شد.

برای مولکول‌های کروی، ضریب اصطکاک طبق قانون استوکس برابر است با:

---

[۷] Buoyancy Factor
[۸] Svedberg

$$f = ۶\pi\eta r$$

از معادله (۱۱-۹) داشتیم: $$M = \frac{s N_A f}{(۱-\bar{\nu}\rho)} = \frac{s N_A ۶\pi\eta r}{(۱-\bar{\nu}\rho)}$$

و طبق معادله انشتین داشتیم: $$f = \frac{kT}{D}$$

و با جاگذاری خواهیم داشت: $$M = \frac{s N_A kT}{D(۱-\bar{\nu}\rho)} = \frac{sRT}{D(۱-\bar{\nu}\rho)} \qquad (۱۰-۱۱)$$

از آنجایی که D و $\bar{\nu}$ را می‌توان توسط آزمایشات مجزا تعیین نمود، تنها کمیتی که در تعیین جرم مولکولی نیاز به اندازه گیری دارد، ضریب ته نشین سازی است. ضریب ته نشین سازی را توسط ته‌نشین‌سازی مرز متحرک[۹] اندازه‌گیری می‌کنند. در این نوع ته‌نشین‌سازی که در سرعت‌های بسیار بالا انجام می‌شود، با اعمال میدان سانتریفوگال، ماکرومولکول‌ها شروع به حرکت می‌کنند و ناحیه مجاور سطح تماس هوا و محلول[۱۰] کاملا از حل‌شونده تهی می‌شود و در نتیجه یک مرز متحرک تشکیل می‌گردد که با اندازه‌گیری سرعت حرکت این مرز متحرک می‌توان ضریب ته‌نشین‌سازی را محاسبه نمود.

همان طور که گفته شد، ضریب ته‌نشین‌سازی عبارت است از نسبت سرعت ته‌نشین‌سازی به قدرت میدان سانتریفوگال. یعنی:

$$s = \frac{(dr/dt)}{r\omega^۲}$$

و یا: $$s\,dt = \frac{۱}{\omega^۲}\frac{dr}{r} \qquad (۱۱-۱۱)$$

با انتگرال‌گیری بر روی فاصله طی‌شده توسط ذره از $r = r_o (t = t_o)$ تا $r = r (t = t)$ خواهیم داشت:

[۹] Moving Boundary
[۱۰] Meniscus

$$\int_{0}^{t} s\,dt = \frac{1}{\omega^2}\int_{r_0}^{r}\frac{dr}{r} \quad \Rightarrow \quad s = \frac{1}{t\omega^2}\ln\frac{r}{r_0}$$

یا:

$$\ln\frac{r}{r_0} = s\omega^2 t \qquad (۱۲-۱۱)$$

با رسم نمودار تغییرات $\ln(r/r_0)$ در مقابل زمان می‌توان ضریب ته‌نشین‌سازی را از شیب نمودار بدست آورد.

برای تعقیب حرکت ذرات ته‌نشین‌شونده در یک زمان معین از روش‌های نوری مناسب مثل اندازه‌گیری‌های ضریب شکست نور[11] استفاده می‌شود. با دانستن سرعت زاویه‌ای چرخنده (ω)، می‌توان ضریب ته‌نشین‌سازی (s) و سپس جرم مولکولی حل‌شونده (M) را محاسبه نمود. باید توجه داشت که ضریب ته‌نشین‌سازی یک مولکول معین، مستقل از سرعت زاویه‌ای روتر است زیرا با افزایش $r\omega^2$، dr/dt نیز به نحوی افزایش می‌یابد که نسبت آنها ثابت باقی می‌ماند. جدول (۱۱-۱) خواص مهم چندین پروتئین را در آزمایشات اولترا سانتریفیوژ در آب نشان می‌دهد:

جدول (۱۱-۱): برخی از خواص فیزیکی پروتئین‌ها در آب در دمای ۲۹۳ K.

پروتئین	$S_{20,w}$ (10^{-13} s)	D $\times 10^7$ ($cm^2.s^{-1}$)	$\bar{\nu}$ ($ml.g^{-1}$)	M ($g.mol^{-1}$)
سایتوکروم C	۱/۷۱	۱۱/۴۰	۰/۷۲۸	۱۳۳۷۰
لایزوزیم	۱/۹۱	۱۱/۲۰	۰/۷۰۳	۱۳۹۳۰
رایبونوکلئاز	۲/۰۰	۱۳/۱۰	۰/۷۰۷	۱۲۶۴۰
مایوگلوبین	۲/۰۴	۱۱/۳	۰/۷۴	۱۶۸۹۰
آلبومین سرم انسانی	۴/۶۰	۶/۱۰	۰/۷۳۳	۶۸۴۶۰
الکل دهیدروژناز	۴/۸۸	۶/۵۰	۰/۷۵۱	۷۳۰۵۰

بر طبق قرارداد، ضرایب ته‌نشین‌سازی نسبت به حلال مرجع که ویسکوزیته و چگالی آب در $20^\circ C$ را دارد، تصحیح می‌گردند. زیرنویس‌های ۲۰ و w ضرایب ته‌نشین‌سازی اشاره به این تصحیح دارند.

[11] Refractive Index

۱۱-۲. فاکتورهای مؤثر بر سرعت ته‌نشین‌سازی:

ضریب ته‌نشین‌سازی بستگی به غلظت دارد و در غلظت‌های بالاتر، ضریب ته‌نشین‌سازی کوچکتر است زیرا مولکول‌ها هر چه بیشتر باشند، اصطکاک آنها بیشتر است. وقتی که مولکول‌ها نامتقارن هم باشند، آنگاه وابستگی ضریب ته‌نشین‌سازی به غلظت بیشتر خواهد بود.

ضریب ته‌نشین‌سازی ماکرومولکول‌ها بستگی به فاکتورهای مختلفی دارد:

۱- شکل ماکرومولکول که بستگی به ترکیب حلال دارد.

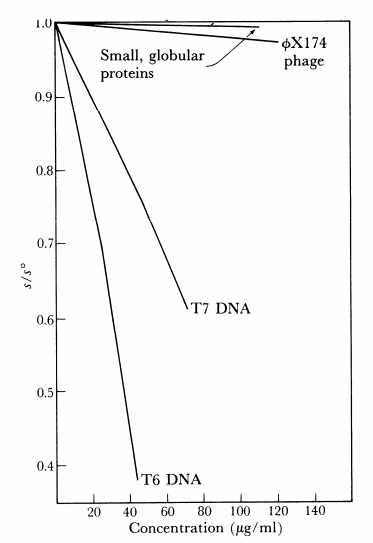
۲- بسیاری از مولکول‌ها ممکن است باردار باشند.

۳- بسیاری از ماکرومولکول‌ها ممکن است نسبت به مولکول‌های حلال بسیار بزرگ باشند.

۴- برخی از ماکرومولکول‌ها ممکن است در حین حرکت دفرمه شوند.

۱۱-۲-۱. وابستگی ضریب ته‌نشین‌سازی به غلظت:

ماکرومولکول‌های درشت و یا بسیار گسترده (مثل پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک) در محلول با یکدیگر برخورد می‌کنند زیرا در هنگام چرخش، حجم بزرگی از محلول را اشغال می‌کنند. وقتی این ماکرومولکول‌ها به یکدیگر می‌رسند، مولکول‌های حلال با مشکل برای حرکت در جهت مخالف روبرو هستند. به عبارت دیگر ویسکوزیته حلال در مجاورت ماکرومولکول‌ها افزایش می‌یابد. این افزایش ویسکوزیته موجب کاهش سرعت حرکت ماکرومولکول‌ها به سمت ته سل سانتریفیوژ می‌گردد و در نتیجه ضریب ته‌نشین‌سازی کاهش می‌یابد. در شکل (۱۱-۲) وابستگی ضریب ته‌نشین‌سازی به غلظت به صورت نمودار تغییرات s/s° در مقابل c نشان داده شده است:



شکل (۱۱-۲): وابستگی s به c که به صورت نمودار تغییرات s/s° در مقابل غلظت رسم شده است. s° مقدار s است که تا غلظت صفر برون‌یابی شده است. توجه کنید که وابستگی s به c با افزایش جرم مولکولی و همچنین گستردگی مولکول افزایش می‌یابد.

همانطور که در نمودار فوق مشاهده می‌شود برای مولکول‌های کروی مثل پروتئین‌های کوچک و DNA حلقوی فاژ ΦX۱۷۴، وابستگی s به c خیلی کم است.
وابستگی s به c را برای بسیاری از موارد می‌توان به وسیله رابطه تجربی زیر نشان داد:

$$s_c = \frac{s^{\circ}}{1+kc} \qquad (۱۳-۱۱)$$

در این رابطه، s_c مقدار s در غلظت c، s° مقدار s در غلظت صفر، c غلظت و k ثابتی است که ویژه هر مولکول است. مقدار s° به وسیله اندازه‌گیری s در غلظت‌های مختلف و رسم نمودار $1/s$ در مقابل c و تعیین $1/s^{\circ}$ به وسیله برون‌یابی کردن تا غلظت صفر بدست می‌آید.

۱۱-۲-۲. وابستگی ضریب ته‌نشین‌سازی به بار الکتریکی:

ماکرومولکول‌ها معمولا دارای بار الکتریکی هستند و یون‌هایی با بار مخالف همراه آنان می‌باشند. مقدار ضریب ته‌نشین‌سازی ماکرومولکول‌ها در مقایسه با ضریب ته‌نشین‌سازی یون‌های همراهشان بسیار بزرگ است. در نتیجه ماکرومولکول‌ها بسیار سریعتر از یون‌های همراهشان ته‌نشین می‌شوند. فرض کنید که ماکرومولکول‌های مورد آزمایش دارای بار منفی هستند. این بارهای منفی به سمت پایین سل اولتراسانتریفیوژ حرکت می‌کنند و یون‌های همراهشان که دارای بار مثبت هستند در پشت سرشان به جا می‌مانند. این جدایی بار منجر به ایجاد یک شیب پتانسیل الکتریکی علیه جهت ته‌نشین‌سازی می‌شود که موجب کاهش مقدار s خواهد شد. این مشکل را به سادگی می‌توان به وسیله اجتناب از قدرت یونی بالا از بین برد.

۱۱-۳. ضرایب ته‌نشین‌سازی استاندارد:

اگر اندازه‌گیری‌های سرعت ته‌نشین‌سازی در سیستم‌های مختلف حلال-حل‌شونده انجام شود، مقدار s اندازه‌گیری‌شده به چگالی محلول (یعنی به جمله $(1-\bar{\nu}\rho)$)، ویسکوزیته محلول و دما (که بطور اولی بر چگالی و ویسکوزیته اثر می‌گذارد) بستگی خواهد داشت.

برای مقایسه مقدار تجربی s بدست آمده در حلال‌ها و دماهای مختلف، می‌توان مقادیر s مشاهده شده را با استفاده از رابطه (۱۱-۱۴) به مقدار s استاندارد که برای حلال و دمای استاندارد تعریف شده است، تبدیل نمود. بر طبق قرارداد، حالت استاندارد برای حلال آب و در $20^{\circ}C$ تعریف شده است:

$$s_{20,w} = s_{\text{Observed}} \frac{(1-\bar{\nu}\rho)_{20,w}}{(1-\bar{\nu}\rho)_T} \frac{\eta_T}{\eta_{20}} \frac{\eta}{\eta_0} \qquad (11-14)$$

در این رابطه، $s_{20,w}$ مقدار s استاندارد در آب ۲۰ درجه، $\bar{\nu}$ حجم ویژه جزیی حل‌شونده، η/η_0 ویسکوزیته نسبی حلال به آب، $\rho_{20,w}$ چگالی آب ۲۰ درجه، η_T/η_{20} ویسکوزیته نسبی آب در دمای T نسبت به آب در دمای ۲۰ درجه و ρ چگالی حلال می‌باشد.

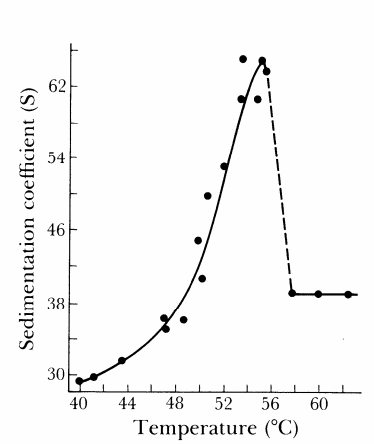
مقدار η را برای بسیاری از سیستم‌های حل‌شونده-حلال می‌توان در منابع مختلف پیدا نمود و η_{20}، η_T و η_0 را نیز به وسیله ویسکومتری اندازه‌گیری کرد.

۱۱-۴. فاکتورهای مؤثر بر ضریب ته نشین‌سازی استاندارد

۱۱-۴-۱. فاکتور شکل (اصطکاک):

اگر یک توپ و یک میله با جرم و چگالی یکسان در یک محیط ویسکوز سانتریفیوژ شوند، توپ چون فشرده‌تر است سریع‌تر حرکت خواهد کرد. اگر میله بتواند بچرخد به نحوی که در امتداد محورش حرکت کند، بحث فوق دیگر صادق نخواهد بود ولی به خاطر حرکات تصادفی مولکولی، مولکول میله‌ای شکل در حین حرکت چرخش هم خواهد داشت و در نتیجه سرعت آن از سرعت حرکت توپ کمتر خواهد بود. قانون کلی این است که هر چه یک جسم گسترده‌تر باشد، مقاومتش در برابر حرکت بیشتر و در نتیجه ضریب اصطکاکش بیشتر خواهد بود.

مثال: صلبیت DNA به واسطه ساختمان مارپیچی دو رشته ای آن است که در آن بازهای نوکلئوتیدها بر روی یکدیگر انباشته شده‌اند و جفت‌بازهای مقابل هم در دو رشته با هم پیوند هیدروژنی تشکیل داده‌اند. با افزایش دمای یک محلول DNA، پیوندهای هیدروژنی بین جفت‌بازها شکسته می‌شود و تمایل جفت‌بازهای مجاور به انباشتگی کاهش می‌یابد. در نتیجه، در نواحی که در آنها پیوندهای هیدروژنی و انباشتگی بازها از بین می‌رود، صلبیت مولکول کاهش یافته و در این نواحی مولـکول DNA می‌تواند پیچ خوردگی پیدا کند. این پیچ خوردگی موجب می‌شود که گستردگی مولکول کاهش یافته و در نتیجه s افزایش یابد. هرچه تعداد پیوندهای هیدروژنی بیشتری شکسته شوند و انباشتگی بازها بیشتر از بین برود، DNA انعطاف‌پذیرتر خواهد شد و گستردگی کمتری خواهد داشت و در نتیجه مقدار s بیشتری خواهد داشت. ایـن روند ادامه پیدا می‌کند تا آخرین پیوند هیدروژنی نیز شکسته شود. در این زمان دو رشته DNA از هم جدا خواهند شد و دو رشته DNA تک‌رشته‌ای که نصف جرم مولی اولیه را دارد به وجود خواهد آمد. در شکل (۱۱-۳) تغییرات ضریب ته‌نشین‌سازی T_7 DNA با جرم مولکولی ۲۵×۱۰^۶ به صورت تابعی از دما رسم شده است. این اندازه‌گیری‌های ساده یکی از اولین مشاهداتی بود که نشان می‌داد دو رشته DNA می‌توانند از هم جدا شوند.



شکل (۱۱-۳): نمودار تغییرات ضریب ته‌نشین‌سازی T_7 DNA با دما در بافر فسفات M ۰/۱ و pH ۷/۸ در حضور فرم آلدئید. فرم آلدئید از تشکیل دوباره پیوندهای هیدروژنی وقتی که محلول تا $20^{\circ}C$ جهت سانتریفیوژ کردن سرد می‌شود، جلوگیری می‌کند. خط منقطع نشان‌دهنده جدا شدن رشته‌های DNA می‌باشد.

۱۱-۴-۲. وزن مولکولی:

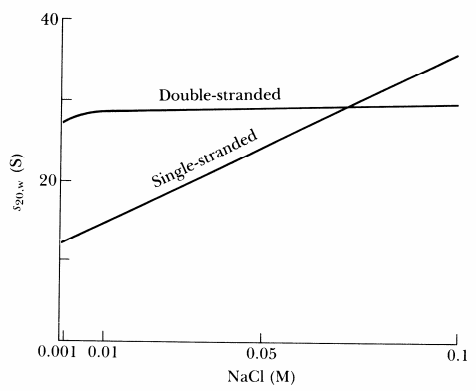
معادله $s = M(1-\bar{\nu}\rho)/N_A f$ نشان می‌دهد که اگر حجم ویژه جزیی $(\bar{\nu})$ و ضریب اصطکاک (f) ثابت باشند، با افزایش M، s نیز افزایش می‌یابد. مقادیر حجم ویژه جزیی تغییر زیادی با جرم مولکولی نمی‌کند، هر چند که با ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین‌ها تغییر می‌کند. از طرف دیگر ضریب اصطکاک تابع قوی M است. تلاش‌های زیادی برای بدست آوردن ارتباط بین s و M صورت گرفته است. برای کره‌ها و میله‌های صلب، یافتن این رابطه کار مشکلی نخواهد بود ولی برای میله‌های انعطاف‌پذیر مثل DNA این کوشش‌ها چندان موفق نبوده است. بهترین معادله‌ای که در پی این تلاش‌ها برای NaDNA در pH خنثی و در محلول M NaCl ۱ بدست آمده به صورت زیر می‌باشد:

$$s^{\circ}_{20,w} = 2/8 + 0/0834 M^{0/497} \qquad (15-11)$$

یک نکته مهم که باید مورد توجه قرار گیرد این است که ضریب ته‌نشین‌سازی با سرعت کمتری از جرم مولکولی تغییر می‌کند و ۵٪ خطا در تعیین s موجب ۱۰٪ خطا در تعیین M می‌شود.

۱۱-۴-۳. اثرات حل‌شونده:

مولکول‌های حل‌شونده متصل‌شده به ماکرومولکول‌ها بر مقدار s اثر می‌گذارند زیرا مولکول‌های حل‌شونده بر وزن مولکولی و نیز در برخی موارد بر شکل ماکرومولکول تاثیر می‌گذارند. برای مثال، DNA در محلول NaCl به صورت NaDNA می‌باشد در حالی که در محلول CsCl به صورت CsDNA است که وزن مولکولی بیشتر و در نتیجه مقدار s بالاتری دارد. بار الکتریکی موجود در ماکرومولکول های باردار انعطاف پذیر می تواند اثرات زیادی بر شکل ماکرومولکول داشته باشد. ماکرومولکول‌های با بار زیاد و انعطاف‌پذیر مثل RNA و یا DNA تک‌رشته‌ای که حامل یک بار منفی در هر نوکلئوتید هستند، در یک محلول با قدرت یونی خیلی کم دارای ساختمان بسیار گسترده‌ای می‌باشند زیرا بین بارهای منفی همنام دافعه الکتریکی وجود دارد. در قدرت‌های یونی بالاتر، بارها توسط یون‌های همراه خنثی شده و ماکرومولکول به واسطه انعطاف‌پذیری‌اش یک بنای فضایی فشرده را تقبل می‌کند. بنابراین، تفاوت زیادی در مقدار s در ۰/۰۰۱ M NaCl و ۰/۰۵ M NaCl وجود خواهد داشت. این اثر حل‌شونده بر روی ضریب ته‌نشین‌سازی در شکل (۱۱-۴) نشان داده شده است:



شکل (۱۱-۴): نمودار وابستگی $s_{20,w}$ مولکول DNA تک‌رشته‌ای و دو رشته‌ای به غلظت NaCl.

توجه داشته باشید که مقدار ضریب ته‌نشین‌سازی DNA تک‌رشته‌ای به مقدار زیادی با غلظت NaCl تغییر می‌کند ولی مقدار ضریب ته‌نشین‌سازی DNA دو رشته‌ای که انعطاف‌پذیری بسیار کمتری دارد بستگی به غلظت NaCl ندارد.

۱۱-۵. ته‌نشین‌سازی تعادلی[۱۲]:

در یک آزمایش ته‌نشین‌سازی سرعتی یک شیب غلظت به وجود می‌آید. وقتی سرعت چرخنده به اندازه کافی زیاد باشد، تمام مولکول‌های حل‌شونده نهایتا در ته لوله سانتریفیوژ ته‌نشین خواهند شد. ولی اگر سرعت چرخنده به جای ۶۰۰۰۰ دور در دقیقه به حدود ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه کاهش یابد، توازن بین ته‌نشین‌سازی و نفوذ برقرار خواهد شد.

در فرآیند نفوذ، مولکول‌های حل‌شونده از غلظت بالاتر به غلظت پایین‌تر می‌روند در حالی که در ته‌نشین‌سازی، این فرآیند به صورت معکوس است. وقتی تعادل بین این دو فرآیند برقرار شود، هیچ جریان خالصی وجود نخواهد داشت. طبق قانون اول فیک، تعداد مولکول‌های حل‌شونده که در یک ثانیه از واحد سطح عبور می‌کنند توسط معادله زیر داده می‌شود:

$$\frac{dn}{dt} = D\frac{dc}{dr} = \frac{kT}{f}\frac{dc}{dr} = \frac{RT}{fN_A}\frac{dc}{dr} \qquad (۱۶-۱۱)$$

توجه داشته باشید که در اینجا شیب غلظت به جای dc/dx، به صورت dc/dr بیان شده است. از طرف دیگر، سرعت ته‌نشین‌سازی محلولی به غلظت c توسط معادله زیر داده می‌شود:

$$\frac{dr}{dt} = \frac{mr\omega^2}{f}(1-\bar{\nu}\rho)$$

با ضرب کردن طرفین این معادله در c خواهیم داشت:

$$c\frac{dr}{dt} = \frac{cmr\omega^2}{f}(1-\bar{\nu}\rho) \qquad (۱۷-۱۱)$$

در حالت تعادل، سرعت نفوذ برابر با سرعت ته‌نشین‌سازی است. پس می‌توان نوشت:

$$c\frac{dr}{dt} = \frac{RT}{fN_A}\frac{dc}{dr} \qquad (۱۸-۱۱)$$

---

[۱۲] Equilibrium Sedimentation

یا:

$$cmr\omega^{۲}(۱-\bar{\nu}\rho)=\frac{RT}{N_{\mathrm{A}}}\frac{dc}{dr}$$

با جابجایی خواهیم داشت:

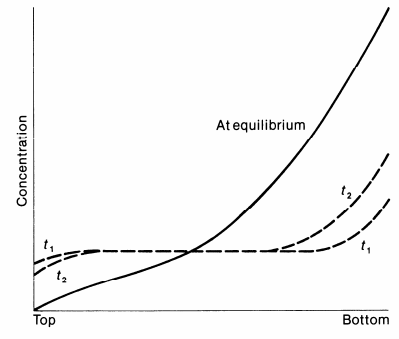
$$\frac{dc}{c}=\frac{Mr\omega^{۲}(۱-\bar{\nu}\rho)}{RT}dr \qquad \text{و} \qquad M=mN_{\mathrm{A}}$$

با انتگرال‌گیری بین $r_{۱}$ $(c_{۱})$ و $r_{۲}$ $(c_{۲})$ خواهیم داشت:

$$\int_{c_{۱}}^{c_{۲}}\frac{dc}{c}=\frac{M\omega^{۲}(۱-\bar{\nu}\rho)}{RT}\int_{r_{۱}}^{r_{۲}}r\,dr$$

$$\ln\frac{c_{۲}}{c_{۱}}=\frac{M\omega^{۲}(۱-\bar{\nu}\rho)}{۲RT}(r_{۲}^{۲}-r_{۱}^{۲}) \qquad (۱۹-۱۱)$$

در ته‌نشین‌سازی تعادلی نیز اگر مقادیر $\bar{\nu}$، ρ و ω معلوم باشند، می‌توان غلظت حل‌شونده $c_{۱}$ و $c_{۲}$ را به ترتیب در $r_{۱}$ و $r_{۲}$ با استفاده از روش‌های نوری اندازه‌گیری نمود (شکل ۱۱-۵):



شکل (۱۱-۵): توزیع غلظت یک پروتئین در یک سل سانتریفیوژ در دو زمان $t_{۱}$ و $t_{۲}$ پس از شروع سانتریفیوژ و نیز پس از رسیدن به حالت تعادل.

برخلاف ته‌نشین‌سازی سرعتی، روش ته‌نشین‌سازی تعادلی نیازی به دانستن شکل مولکول و یا ضریب نفوذ آن ندارد. از اینرو این روش یکی از دقیق‌ترین روش‌های تعیین جرم مولکولی ماکرومولکول‌ها محسوب می‌شود.

۱۱-۶. ته‌نشین‌سازی شیب چگالی[۱۳]:

در ته‌نشین‌سازی مرزی، محلول ماکرومولکول‌ها در ابتدا به صورت یک محلول یکنواخت است و تمامی اطلاعات از مشاهده مرزهای متحرک ماکرومولکول‌ها بدست می‌آید. عیب بزرگ این روش این است که در آن، مولکول‌هایی که ضریب ته‌نشین‌سازی متفاوتی دارند از یکدیگر جدا نمی‌شوند. در روشی موسوم به ته‌نشین‌سازی شیب چگالی، محلول ماکرومولکول با محلول کلرید سزیم غلیظ (حدود ۶ M) مخلوط می‌شود و در یک لوله سانتریفیوژ می‌چرخد تا اینکه به تعادل برسد. در حالت تعادل، یک شیب چگالی در امتداد لوله شکل می‌گیرد. همچنین می‌توان از ابتدا به وسیله به دقت روی هم قرار دادن لایه‌های با چگالی‌های متفاوت از پایین به بالا در لوله سانتریفیوژ، این شیب چگالی را ایجاد نمود. داشتیم:

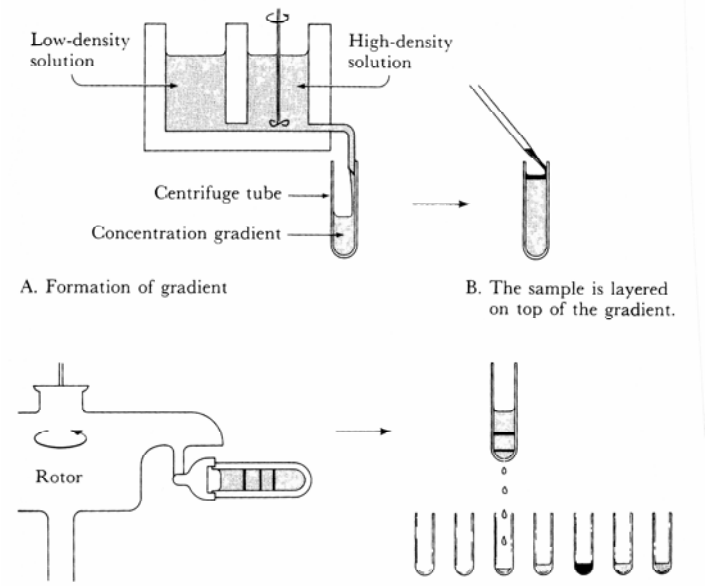
$$v = \frac{dr}{dt} = \frac{mr\omega^2}{f}(1-\bar{v}\rho)$$

در فاصله r از محور چرخش، چگالی محلول (ρ) با عکس حجم ویژه جزیی حل‌شونده برابر است (یعنی $\rho = 1/\bar{v}$). این بدان معنی است که در این فاصله، $(1-\bar{v}\rho) = 0$ خواهد بود و در نتیجه، سرعت ته‌نشین‌سازی (dr/dt) برابر صفر است. برای مخلوط ماکرومولکول‌ها در حالت تعادل، در rهای مختلف، عکس حجم ویژه جزیی هر ماکرومولکول با چگالی محلول کلرید سزیم در آن r برابر می‌شود و بند هر ماکرومولکول ثابت باقی خواهد ماند و دیگر حرکت نخواهد کرد. بالاتر از هر بند (نزدیکتر به محور چرخش)، $\rho < 1/\bar{v}$ است و $(1-\bar{v}\rho)$ یک مقدار مثبت خواهد بود و در نتیجه نیروی سانتریفوگال ماکرومولکول‌ها را به سمت پایین (به سمت بند مربوط به خود) خواهد راند. در زیر هر بند (نزدیکتر به ته لوله سانتریفیوژ)، $\rho > 1/\bar{v}$ است و $(1-\bar{v}\rho)$ یک مقدار منفی خواهد بود و درنتیجه، نیروی ارشمیدس ماکرومولکول‌ها را به سمت بالا (به سمت بند مربوط به خود) خواهد راند.

---

[۱۳] Density Gradient Sedimentation

حضور شیب چگالی کلرید سزیم به عنوان یک نیروی پایدارکننده عمل می‌کند که از مخلوط شدن بندهای مختلف جلوگیری می‌نماید. با استفاده از این تکنیک می‌توان مولکول‌های DNA حاوی ایزوتوپ‌های N^{14} و N^{15} را از هم جدا کرد. امتیاز دیگر روش ته‌نشین‌سازی تعادلی این است که وقتی حالت تعادل برقرار شد، می‌توان لوله سانتریفیوژ را از دستگاه خارج کرد و به وسیله سوراخ کردن ته لوله‌های سلولزی سانتریفیوژ، بندهای مختلف را از یکدیگر جدا نموده و هر بخش را در لوله آزمایش جداگانه‌ای جمع‌آوری کرد. در این روش برای جدا کردن اسیدهای نوکلئیک از شیب چگالی کلرید سزیم و برای جدا کردن پروتئین‌ها از شیب چگالی سوکروز استفاده می‌گردد. جزء‌به‌جزء کردن[۱۴] محتوای یک لوله سانتریفیوژ توسط روش جمع‌آوری قطره‌ای در شکل (۱۱-۶) نشان داده شده است:



شکل (۱۱-۶): جداسازی اجزاء در ته‌نشین‌سازی شیب چگالی.

[۱۴] Fractionation