

Μέρος 1^ο: Παρασκευή υπερκείμενου Β (τυρόγαλα) - Στοιχεία θεωρίας

1. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗΣ

Η φυγόκεντρος είναι ένα όργανο που θα συναντήστε σε κάθε βιοχημικό εργαστήριο. Η κύρια χρήση των οργάνων αυτών έχει να κάνει με την παρασκευή βιολογικών δειγμάτων και την αναλυτική μέτρηση υδροδυναμικών ιδιοτήτων όπως σχήμα, μέγεθος, πυκνότητα, κ.τ.λ. σε μακρομόρια ή κυτταρικά οργανίδια που έχουν απομονωθεί. Αυτό γίνεται εφαρμόζοντας μια ισχυρή δύναμη (*φυγοκεντρική, centrifugal*) στο βιολογικό δείγμα, περιστρέφοντάς το με μεγάλη ταχύτητα. Οι συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες προκαλούν καθίζηση σωματιδίων, κυτταρικών οργανιδίων ή μακρομορίων και ο ρυθμός καθίζησης εξαρτάται από τη μάζα, το μέγεθος και την πυκνότητά τους.

Η δύναμη αυτή περιγράφεται από την εξίσωση 1:

$$F = m\omega^2r \quad (\text{εξίσωση 1})$$

Όπου

F = φυγοκεντρική δύναμη

m = μάζα του σωματιδίου που καθιζάνει

ω = γωνιακή ταχύτητα περιστροφής σε rad/sec

r = απόσταση των σωματιδίων που καθιζάνουν από τον άξονα περιστροφής

Μια απλή φυγόκεντρος αποτελείται από δύο μέρη: το μηχανισμό περιστροφής του δείγματος και τον χώρο τοποθέτησής του δηλαδή την *κεφαλή (rotor)*, μέσα στην οποία τοποθετούνται οι σωλήνες που περιέχουν το δείγμα (Εικόνα 1).

Όπως φαίνεται από την εξίσωση 1 η δύναμη που εφαρμόζεται σε ένα σωματίδιο στις παραπάνω συνθήκες, αυξάνεται όσο μεγαλώνει η ταχύτητα περιστροφής και η απόσταση r των σωματιδίων από τον άξονα περιστροφής. Πρακτικά χρησιμοποιείται η τιμή του r στο μέσο της απόστασης από την κορυφή έως τη βάση του χώρου τοποθέτησης του δείγματος (r_{av}) (Εικόνα 1). Το μέγεθος ω^2r ονομάζεται και επιτάχυνση λόγω του φυγοκεντρικού πεδίου, a_c , και δεν είναι τίποτε άλλο από μια μεγάλη 'ενίσχυση' της επίδρασης του βαρυτικού πεδίου της γης ($g = 9,80 \text{ m/sec}^2$). Ο λόγος a_c/g μας δίνει το μέγεθος αυτής της ενίσχυσης σε μια συγκεκριμένη φυγοκέντριση. Για παράδειγμα, έστω ένα δείγμα με r_{av} ίσο με 0,0375m και $\omega=356$

rad/sec. Σύμφωνα με τα παραπάνω, ο λόγος a_c/g ή η σχετική φυγοκεντρική δύναμη, RCF, όπως λέγεται, είναι 485g.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι φυγόκεντροι είναι απαραίτητος εξοπλισμός κάθε βιοχημικού εργαστηρίου και είναι διαθέσιμες σε διάφορους τύπους. Για παράδειγμα, υπάρχουν οι φυγόκεντροι χαμηλής ταχύτητας που χρησιμοποιούνται σε παρασκευές ρουτίνας (κατακρήμιση βαρέων σωματιδίων) καθώς και φυγόκεντροι που περιλαμβάνουν εξαιρετικά ευαίσθητα όργανα για την πραγματοποίηση αναλυτικών μετρήσεων κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης. Εδώ θα αναφερθούμε μόνο στις *φυγοκέντρους υψηλής ταχύτητας* οι οποίες χρησιμοποιούνται σε βιολογικές παρασκευές όπου απαιτείται ρύθμιση της θερμοκρασίας του θαλάμου των δειγμάτων και υψηλές ταχύτητες. Μια τέτοια περίπτωση είναι και το πρώτο στάδιο στη διαδικασία απομόνωσης της α -λακταλβουμίνης στο πείραμα που ακολουθεί.

II. ΚΑΝΟΝΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΣΩΣΤΗ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΕΦΑΛΩΝ

Οι φυγόκεντροι είναι από τα πιο ακριβά όργανα που θα συναντήσετε στο εργαστήριο επομένως είναι ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ η σωστή χρήση και συντήρησή τους. Οι παρακάτω οδηγίες είναι γενικές και πρέπει να εφαρμόζονται σχολαστικά όποτε πρέπει να κάνετε φυγοκέντρωση. Πιο συγκεκριμένες οδηγίες που αφορούν τα είδη φυγοκέντρων που θα χρησιμοποιήσετε θα σας δοθούν από τους επιβλέποντες της άσκησης.

- Πριν χρησιμοποιήσετε οποιαδήποτε φυγόκεντρο διαβάστε προσεκτικά τις οδηγίες χρήσης από το αντίστοιχο φυλλάδιο της εταιρίας κατασκευής του οργάνου ή/και ζητήστε βοήθεια από κάποιον που ήδη χειρίζεται (σωστά) το μηχάνημα.

- Βάλτε τις απαραίτητες παραμέτρους για τη φυγοκέντρωση στο όργανο. Εάν είναι απαραίτητο τα δείγματα να παραμένουν σε συγκεκριμένη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια του πειράματος, τοποθετήστε την κεφαλή στη φυγόκεντρο και ρυθμίστε τη θερμοκρασία στην επιθυμητή τιμή τουλάχιστον μισή ώρα πριν τη φυγοκέντρωση.

- Ελέγξτε την καθαριότητα του κάδου στη φυγόκεντρο πριν και μετά το πείραμά σας. Καθαρίστε τον με απιονισμένο νερό και στεγνώστε τον καλά.

- Διαλέξτε την κατάλληλη κεφαλή (rotor) ανάλογα με τους φυγοκεντρικούς σωλήνες που θα χρησιμοποιήσετε. Κάθε φυγόκεντρος μπορεί να δεχτεί πολλά είδη κεφαλών. Βεβαιωθείτε ότι έχετε αποθηκεύσει τον σωστό κωδικό κεφαλής στο μηχάνημα.

- Ελέγξτε την κεφαλή για τυχόν φθορές (γρατζουνιές, γδαρσίματα) ή ακαθαρσίες πριν και μετά τη χρήση. Εάν είναι βρώμικη μπορείτε να την καθαρίσετε με νερό και ένα

ήπιο απορρυπαντικό, να την ξεπλύνετε με απιονισμένο νερό και να τη στεγνώσετε προσεκτικά.

- Το δείγμα πρέπει να είναι συμβατό με το υλικό κατασκευής των σωλήνων φυγοκέντρισης (π.χ. δεν επιτρέπεται να βάλετε οργανικούς διαλύτες όπως ακετόνη ή χλωροφόρμιο σε σωλήνες πολυστυρενίου).

- Κάθε σωλήνας συγκεκριμένου όγκου έχει ένα όριο όσον αφορά τη στάθμη του δείγματος στο εσωτερικό του. Αυτό δεν πρέπει να το ξεπερνάτε ΠΟΤΕ.

- Οι σωλήνες τοποθετούνται ανά δύο απέναντι μέσα στην κεφαλή. Τα ζευγάρια αυτά πρέπει να έχουν το ίδιο βάρος (με ακρίβεια δεύτερου δεκαδικού ψηφίου). Γι' αυτό μόλις γεμίσετε τους σωλήνες πρέπει να τους ζυγίζετε προσεκτικά. Στο ζύγισμα πρέπει να περιλαμβάνεται και το βάρος από το καπάκι του κάθε σωλήνα.

- Η κάθε εταιρεία κατασκευής κεφαλών δίνει ένα όριο ταχύτητας για κάθε κεφαλή. Μην υπερβείτε **ΠΟΤΕ** το όριο αυτό.

- Εάν ακούσετε κάποιο περίεργο θόρυβο ή αν ανάψει κάποια ένδειξη (π.χ. error, imbalance) κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρισης διακόψτε αμέσως τη λειτουργία του μηχανήματος πατώντας το stop ή το quick stop.

ΕΙΚΟΝΑ 1. Διαφοροποίηση της τιμής της RCF ανάλογα με την τιμή της r

Πείραμα 1^ο: Παρασκευή υπερκείμενου Β (τυρόγαλα)

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Αποβουτυρωμένο γάλα, φρέσκο ή παστεριωμένο, 20ml
- HCl, 8 M
- HCl, 0,5 M
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος και σωλήνες (16000g)
- Πεχάμετρο
- Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας
- Φίλτρα σύριγγας, 0,8 μm

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Παρασκευή υπερκείμενου Β (τυρόγαλα) (Το οργανόγραμμα για το μέρος Α σας δίνεται ως δείγμα για τα υπόλοιπα που θα πρέπει να σχεδιάσετε εσείς).

20ml αποβουτυρωμένου γάλατος φυγοκεντρούνται σε 16000g για 45 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Αδειάστε το υπερκείμενο σε ένα μικρό ποτήρι. Το ίζημα και η επιπλέουσα λιπιδική στοιβάδα θα πρέπει να μείνουν στον φυγοκεντρικό σωλήνα και να πεταχτούν. Ρυθμίστε το pH του υπερκείμενου στα 4,6 σε δύο στάδια:

Ρυθμίστε το pH περίπου στο 5 με προσθήκη σταγόνων 8 M HCl.

Ρυθμίστε στο επιθυμητό pH (4,6) με προσθήκη σταγόνων 0,5 M HCl.

Θερμάνετε το διάλυμα, το οποίο περιέχει τα συσσωματώματα, στους 40 °C για 30 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση. Φυγοκεντρίστε το διάλυμα στα 16000g για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο (τυρόγαλα) φιλτράρεται από ένα φίλτρο 0,8μm. Το τυρόγαλα διατηρείται για μικρό διάστημα (ώρες) σε πάγο ή για μεγαλύτερα διαστήματα στον καταψύκτη.

ΟΡΓΑΝΟΓΡΑΜΑ

