

Δ. Α. ΚΥΡΙΑΚΙΔΗ
Καθηγητή Βιοχημείας Α.Π.Θ.

ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΕΝΖΥΜΟΛΟΓΙΑΣ



Κάθε γνήσιο αντίτυπο υπογράφεται από το συγγραφέα

ISBN 960-431-594-3

© Copyright: Δ. Α. Κυριακίδης, Εκδόσεις Ζήτη, Φεβρουάριος 2000, Θεσσαλονίκη

Η κατά οποιονδήποτε τρόπο και μέσο αναπαραγωγή, δημοσίευση ή χρησιμοποίηση όλου ή μερών του βιβλίου αυτού απαγορεύεται χωρίς την έγγραφη άδεια του συγγραφέα και εκδότη.



Φωτοσχεδιασμός - Επίπλωση: **Π. ΖΗΤΗ & Ια Ο Ε**

18^ο χλμ Θεσσαλονίκης-Περαιάς

Τ.Θ. 171, Νέοι Επιβάτες, Θεσσαλονίκη, Τ.Κ. 570 19

☎ (0392) 72 222 ☎ (ε-αλληλ.) • Fax (0392) 72 229

Εθελονταρισμός **ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΖΗΤΗ**

Αρμενιοπόλεως 27

Τ.Κ. 546 36, Θεσσαλονίκη

☎ (031) 208 720 • Fax (031) 211 305

www.zit.gr

e-mail zit@zit.gr

Περιεχόμενα

Σκοπός των ασκήσεων ενζυμολογίας	7
--	---

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

<i>Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών</i>	11
Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός πρωτεΐνης	11
Μέθοδος διουρίας (Biuret)	11
Μέθοδος Lowry ή Folin-Ciocalteu	12
Μέθοδος Bradford	12
<i>Χρωματογραφικές τεχνικές</i>	14
Χρωματογραφία προσρόφησης	14
Χρωματογραφία ιονικής ανταλλαγής	14
Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	16
<i>Ηλεκτροφόρηση</i>	20
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτές πολυακρυλαμίδιου	20
Μη-συνεχής ηλεκτροφόρηση σε πηκτές	22
Προσδιορισμός ενζυμικής δράσης μετά την ηλεκτροφόρηση	24
Χρώση πρωτεϊνών πάνω σε πηκτές πολυακρυλαμίδιου	24
α) Με Coomassie Brilliant Blue	24
β) Με νιτρικό άργυρο	24
Ηλεκτροφόρηση κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες - ηλεκτροφόρησης με SDS	25
Ισοηλεκτρική εστίαση πρωτεϊνών	26
<i>Φυγοκέντρωση</i>	28
Φυγοκέντρωση καθίζησης ή ζώνης	30
Φυγοκέντρωση εξισορρόπησης ή ισοπυκνική φυγοκέντρωση	30
<i>Λύση των κυττάρων</i>	32
Μηχανική λύση κυττάρων	32
Χημική ή ενζυμική λύση κυττάρων	33
<i>Κλασμάτωση πρωτεϊνών με θειικό αμμώνιο</i>	34
<i>Συμπύκνωση πρωτεϊνών</i>	34

ΑΣΚΗΣΕΙΣ

Άσκηση 1^η: Εκχύλιση και μερικός καθαρισμός της ιμβερτάσης από τον μικροοργανισμό <i>S. cerevisiae</i>	37
1. Εκχύλιση και μερικός καθαρισμός της ιμβερτάσης.....	37
α) Εκχύλιση της ιμβερτάσης	37
β) Καθαρισμός με οξίνιση και θέρμανση	38
γ) Κατακρήμιση πρωτεϊνών με αιθανόλη	38
δ) Κατακρήμιση πρωτεϊνών με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	38
ε) Διαπίδυση.....	39
στ) Αραίωση των δειγμάτων	39
2. Προσδιορισμός της δράσης της ιμβερτάσης.....	39
α) Αρχή της μεθόδου	39
β) Εκτέλεση.....	40
γ) Έκφραση των αποτελεσμάτων	40
δ) Αντιδραστήρια.....	40
ε) Υπολογισμός.....	42
Άσκηση 2^η: Καθαρισμός της ιμβερτάσης με στήλες DEAE-κυτταρίνης και Sephadex G75	45
1. Χρωματογραφία της ιμβερτάσης σε στήλη DEAE-κυτταρίνη	45
2. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε στήλη Sephadex G75	45
3. Χρωματογραφία σε Sephadex G75	46
Άσκηση 3^η: Κινητική μελέτη της ιμβερτάσης	50
1. Επίδραση της συγκέντρωσης της ιμβερτάσης κατά την ενζυμική αντίδραση.....	50
2. Υπολογισμός της K_m και V_{max} της ιμβερτάσης	50
3. Υπολογισμός της K_m και V_{max} της ιμβερτάσης παρουσία αναστολέα.....	51
4. Επίδραση του pH στη δραστικότητα της ιμβερτάσης.....	51
Άσκηση 4^η: Ηλεκτροφόρηση της ιμβερτάσης σε πηκτές πολυακρυλαμίδιου	54
Άσκηση 5^η: Προσδιορισμός και μερικός καθαρισμός της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης από την <i>E. coli</i>	55
1. Αντίδραση	55

2. Αρχή της μεθόδου.....	55
3. Ανάπτυξη του βακτηρίου.....	55
4. Λύση του βακτηρίου.....	57
5. Προσδιορισμός δραστικότητας της ODC.....	57
6. Ποσοτική έκφραση και προσδιορισμός της ενζυμικής δραστικότητας της ODC.....	57
7. Μερικός καθαρισμός της ODC.....	58
α) Στάδιο θειϊκού αμμωνίου.....	58
β) Στάδιο DEAE-Biogel A.....	58
<i>Γενική βιβλιογραφία.....</i>	<i>61</i>
<i>Ειδική βιβλιογραφία.....</i>	<i>61</i>

ΣΚΟΠΟΣ ΤΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ ΕΝΖΥΜΟΛΟΓΙΑΣ

Σκοπός των ασκήσεων είναι να εξοικειωθεί ο φοιτητής με την εκχύλιση, τον καθαρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό ενζύμων. Κατά τη διάρκεια των ασκήσεων Ενζυμολογίας θα γίνει προσπάθεια:

- α) να καθαριστεί μερικώς ένα ένζυμο,
- β) να μελετηθεί η κινητική του ενζύμου παρουσία και απουσία αναστολέα και
- γ) να ελεγχθεί η καθαρότητα του παρασκευάσματος με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου.

Επίσης θα γίνει προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας με ραδιενεργό υπόστρωμα. Επιλέχθηκε να μελετηθεί αφ' ενός η ιμβερτάση (β-φρουκτοφουρανοσιδάση) από ζύμη γιατί είναι σχετικά σταθερό ένζυμο και μπορούν να γίνουν όλες οι διεργασίες καθαρισμού σε θερμοκρασία δωματίου, αφ' ετέρου η αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης από το βακτήριο της *E. coli* γιατί ο μικροοργανισμός αυτός πολλαπλασιάζεται εύκολα και η δραστηριότητα του ενζύμου στα εκχυλίσματα αυτά είναι αρκετά σταθερή.

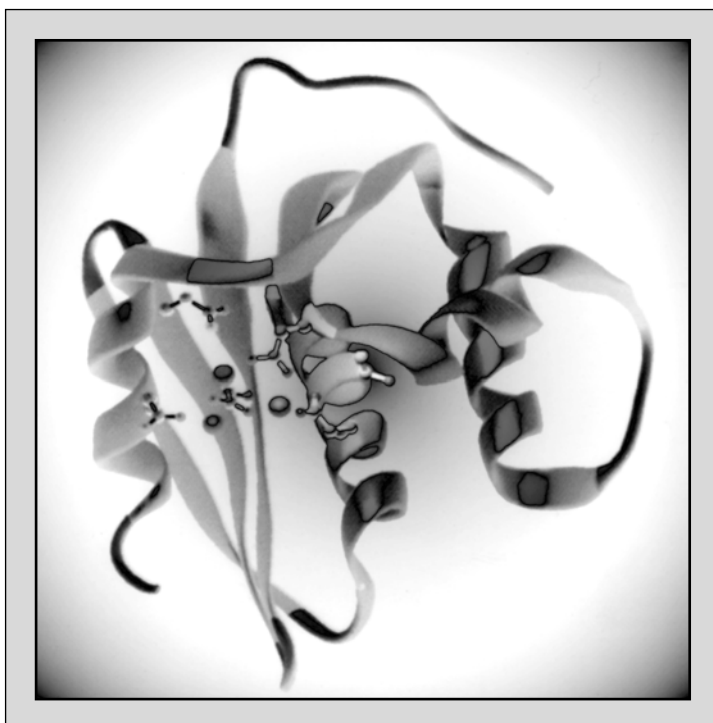
Ευχαριστώ τους συνεργάτες μου για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους ως και τον Β.Α. Κυριακίδη για τη διόρθωση των κειμένων.

Κάθε υπόδειξη ή κριτική είναι ευπρόσδεκτη.

Δ.Α. Κυριακίδης

Θεσσαλονίκη, Φεβρουάριος 2000

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών μπορεί να γίνει είτε απευθείας με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 280 nm ή με διάφορες μεθόδους σχηματισμού χρώματος.

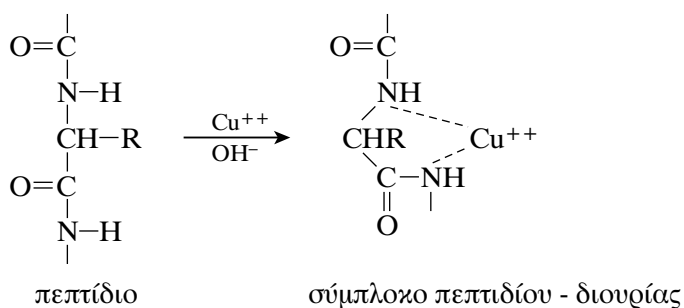
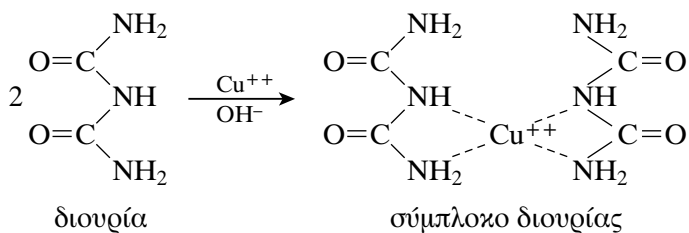
Φασματομετρικός προσδιορισμός πρωτεΐνης

Η μέθοδος του φασματομετρικού προσδιορισμού πρωτεΐνης στηρίζεται στην ιδιότητα των πρωτεϊνών να απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή με μέγιστο στα 280 nm, λόγω της παρουσίας των αρωματικών αμινοξέων τυροσίνης και κυρίως τρυπτοφάνης. Η μέθοδος έχει αρκετά μειονεκτήματα όπως τη μη ικανοποιητική ακρίβεια και εξειδίκευση, δεδομένου ότι και άλλες ουσίες εκτός από τις πρωτεΐνες απορροφούν στα 280 nm. Έχει όμως το μεγάλο πλεονέκτημα ότι κατά τη μέτρηση το πρωτεϊνικό παρασκεύασμα δεν καταστρέφεται. Καθαρά διαλύματα πρωτεϊνών συγκέντρωσης 1 mg/ml πρωτεΐνης, παρουσιάζουν απορρόφηση στα 280 nm περίπου 1,0 όταν προσδιορίζονται σε κυψελίδα 1 cm. Τα νουκλεϊνικά οξέα με μέγιστο απορρόφησης στα 260 nm παρουσιάζουν αρκετή απορρόφηση και στα 280 nm. Μπορεί να γίνουν οι κατάλληλες διορθώσεις, δεδομένου ότι ξέρουμε για καθαρές πρωτεΐνες ο λόγος της απορρόφησης στο 280/260 nm είναι περίπου 1,75, ενώ για καθαρά νουκλεϊνικά οξέα ο λόγος 280/260 nm είναι 0,5. Υπάρχουν πίνακες που δίδουν τις ενδιάμεσες τιμές και αντιστοιχούν σε μίγματα πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων.

Μέθοδος διουρίας (Biuret)

Οι πεπτιδικό δεσμοί των πρωτεϊνών όταν αντιδράσουν με αραιό διάλυμα θειϊκού χαλκού σε αλκαλικό περιβάλλον σχηματίζουν εσωτερικά σύμπλοκα με χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα. Η μέθοδος αναφέρεται ως Biuret μέθοδος διότι η διουρία δίνει θετική αντίδραση με το χαλκό.

Η ευαισθησία της μεθόδου δεν είναι πολύ ικανοποιητική και απαιτεί για το σχηματισμό συμπλόκου 1-20 mg πρωτεΐνης.



Μέθοδος Lowry ή Folin - Ciocalteu⁽⁵⁾

Η μέθοδος αυτή που χρησιμοποιείται από το 1951 απαιτεί την παρασκευή δύο διαλυμάτων και χρόνο περίπου 1,5-2 ώρες. Το χρώμα που δημιουργείται ύστερα από αντίδραση της πρωτεΐνης με το αλκαλικό διάλυμα του χαλκού, όπως στην περίπτωση διουρίας, και την περαιτέρω αναγωγή των φωσφορομολυβδαινικών και φωσφοροβολφραμικών αλάτων από την τυροσίνη και τρυπτοφάνη των πρωτεϊνών. Επειδή οι διάφορες πρωτεΐνες περιέχουν διάφορα ποσά τυροσίνης και τρυπτοφάνης θα πρέπει να αναφέρεται η πρωτεΐνη με την οποία βγαίνει η πρότυπος ευθεία. Η ευαισθησία της μεθόδου απαιτεί μέχρι και 5 mg πρωτεΐνης.

Μέθοδος Bradford⁽¹⁾

Η μέθοδος Bradford στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα 595 nm. Η μέθοδος αυτή έχει τα εξής πλεονεκτήματα:

- είναι απλή γιατί η μέτρηση γίνεται από ανάμειξη του διαλύματος της πρωτεΐνης με ένα μόνο διάλυμα χρωστικής,
- είναι πολύ γρήγορη,

γ) είναι πολύ ευαίσθητη γιατί επιτρέπει τον προσδιορισμό μέχρι και 1 mg πρωτεΐνης και

δ) οι παράγοντες που την παρεμποδίζουν είναι πολύ λιγότεροι.

Από κάθε μίγμα μεταφέρουμε ορισμένα ml (π.χ. 100 ml) ενζυμικού διαλύματος σε σωλήνα, συμπληρώνεται στα 2 ml με απεσταγμένο νερό και προστίθεται 2 ml αντιδραστήριου Bradford. Το τυφλό περιέχει 2 ml H₂O και 2 ml αντιδραστήριου Bradford. Ανακινούνται τα δείγματα και ύστερα από μερικά λεπτά μετρείται η απορρόφηση στα 595 nm. Τα δείγματα δεν πρέπει να μείνουν περισσότερο από 1 ώρα. Από την πρότυπη καμπύλη υπολογίζονται τα mg πρωτεΐνης του κάθε ενζυμικού παρασκευάσματος.

Παρασκευή του αντιδραστήριου Bradford: Διαλύονται 0,2 gr Coomassie Brilliant Blue G250 σε 200 ml H₃PO₄ 85%. Αναδεύεται καλά για μία νύχτα και στη συνέχεια αραιώνεται με H₂O μέχρι 1 lit. Δηθείται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Η χρωματογραφία, μία απ' τις καλύτερες τεχνικές διαχωρισμού πρωτεϊνών και γενικά βιολογικών μορίων, αναπτύχθηκε με εξαιρετική ταχύτητα τα τελευταία πενήντα χρόνια. Στη χρωματογραφία τα συστατικά του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος διαχωρίζονται λόγω της χημικής συγγένειας προς τη στερεά φάση (στήλες προσρόφησης, ανταλλαγής ιόντων κ.λ.π) ή την κινούμενη φάση (αέριος ή υγρή χρωματογραφία).

Η επιλογή του στερεού φορέα εξαρτάται από την ίδια την φύση των πρωτεϊνών που πρόκειται να διαχωριστούν. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη το μέγεθος των σφαιριδίων του φορέα, η επιφάνεια του φορέα, η χημική σύσταση καθώς και ο λόγος των υδρόφοβων προς τις υδρόφιλες ομάδες που περιέχει ο φορέας. Ως φορείς για την καθήλωση πρωτεϊνών έχουν περισσότερο χρησιμοποιηθεί η κυτταρίνη, τα δεξτράνια, η αγαρόζη και το πολυακρυλαμίδιο.

Χρωματογραφία προσρόφησης

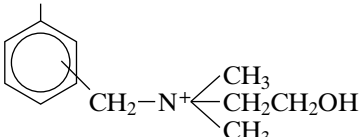
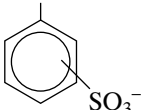
Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη φυσική προσρόφηση των πρωτεϊνών στην επιφάνεια του αδιάλυτου φορέα. Έχουν χρησιμοποιηθεί ανόργανοι φορείς (αλουμίνα, υδροξυαπατίτης, καολίνη, φωσφορικό ασβέστιο, μπεντονίτης) και οργανικοί φορείς (ενεργός άνθρακας, άμυλο, κονκαναβαλίνη Α, κυτταρίνη). Μεινέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι πολλές προσροφημένες πρωτεΐνες αποκολλώνται εύκολα, γιατί οι δυνάμεις προσρόφησης είναι πολύ ασθενείς. Έχει όμως το πλεονέκτημα στην περίπτωση των ενζύμων, γιατί ελάχιστη ή σχεδόν καμία αλλαγή στη δομή της πρωτεΐνης ή του ενεργού κέντρου δεν παρατηρείται.

Χρωματογραφία ιονικής ανταλλαγής

Οι ιονικοί ανταλλάκτες αποτελούνται από ένα υλικό που είναι αδιάλυτο στο νερό και περιέχει ηλεκτρικά φορτισμένες ομάδες, συνδεδεμένες ομοιοπολικά με το πλέγμα του. Οι φορτισμένες ομάδες του ανταλλάκτη μπορούν να δεσμεύουν αμφίδρομα από το περιβάλλον ιόντα αντιθέτου φορτίου. Έτσι οι πρωτεΐνες ως μεγαλομόρια με διάφορα φορτία θα δεσμεύονται και θα διαχωρίζονται με τις στήλες ιονικής ανταλλαγής ανάλογα με το ποσό των ηλεκτρικών τους φορτίων. Όταν ο φορέας περιέχει ομάδες θετικά φορτισμένες και συνεπώς δεσμεύει αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες ονομάζεται **ανιονικός ανταλλάκτης** και η χρωματογραφία ανιονικής ανταλλαγής. Η αντίστροφη διαδικασία, όταν

δηλαδή ο φορέας περιέχει αρνητικά φορτισμένες ομάδες ονομάζεται **κατιονικός ανταλλάκτης** και η χρωματογραφία κατιονικής ανταλλαγής (Πίνακας 1).

Πίνακας 1

Όνομα φορέα	Ιδιότητα ανταλλάκτη	Ενεργός ομάδα
Dowex 2	ανιονικός (ισχυρός)	
DEAE-κυταρίνη ή DEAE-Sephadex	ανιονικός (ασθενής)	$-OCH_2CH_2N^+ \begin{cases} C_2H_5 \\ H \\ C_2H_5 \end{cases}$
TEAE-κυταρίνη	ανιονικός (ισχυρός)	$-OCH_2CH_2N^+ \begin{cases} C_2H_5 \\ C_2H_5 \\ C_2H_5 \end{cases}$
ECTEOLA-κυταρίνη	ανιονικός (ασθενής)	$CH_2CH(OH)CH_2OCH_2CH_2N^+ \begin{cases} C_2H_4OH \\ H \\ C_2H_4OH \end{cases}$
Octylamino-Sephadex	ανιονικός (ασθενής)	$-HN(CH_2)_8NH_3^+$
CM-κυταρίνη	κατιονικός (ασθενής)	$-OCH_2COO^-$
P-κυταρίνη	κατιονικός (ισχυρός)	$-O-P(=O)(O^-)-$
Dowex 50	κατιονικός (ισχυρός)	

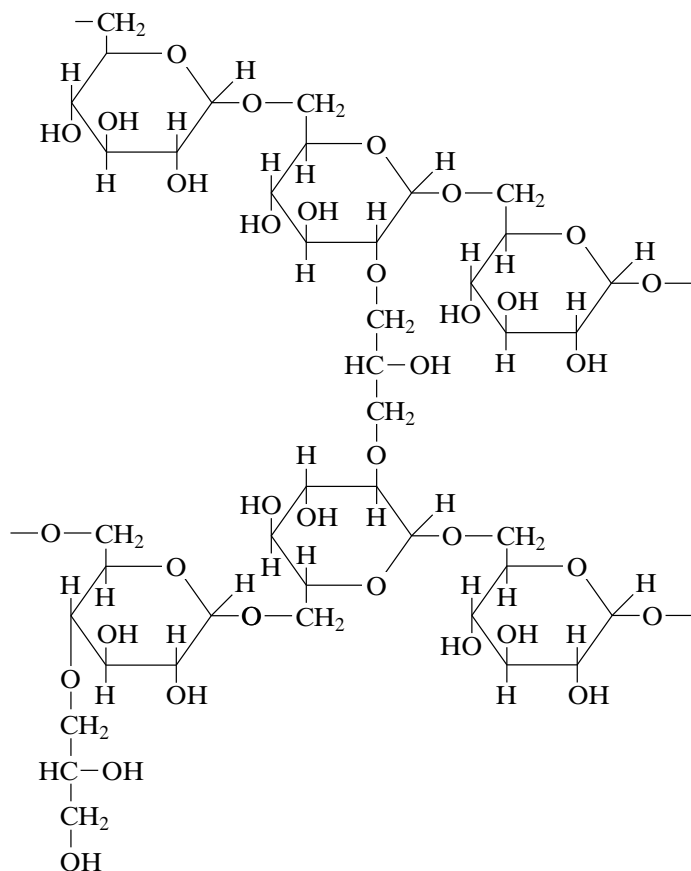
Πριν από κάθε χρήση οι ανιονικοί ανταλλάκτες προετοιμάζονται ως εξής: Αιωρούνται διαδοχικά σε 0,5 N NaOH, 0,5 N HCl και 0,5 N NaOH. Μετά από κάθε αιώρηση πλένονται πάνω σε χωνί Buchner με άφθονο νερό μέχρι να σταθεροποιηθεί το pH. Τέλος αιωρούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν. Η κατεργασία αυτή ονομάζεται αναγέννηση του ανταλλάκτη. Καλά αναγεννημένοι ανταλλάκτες προστίθενται σε στήλη επιθυμητού μεγέ-

θους. Όταν η στήλη πληρωθεί, ξεπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα τουλάχιστον 5 φορές τον όγκο της στήλης. Προστίθεται στη συνέχεια το δείγμα και κατόπιν ξεπλένεται μέχρις ότου η απορρόφηση φτάσει στο μηδέν. Οι πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν από τη στήλη μπορεί να εκλουσθούν είτε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις αλάτων (NaCl ή KCl) ή μεταβάλλοντας το pH του διαλύματος.

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Η μέθοδος στηρίζεται στις ιδιότητες των πολυμερών δεξτρανίων ή ακρυλαμιδίων να επιτρέπουν ή να αποκλείουν τη διέλευση μορίων μέσω των σφαιριδίων του πηκτώματος, ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού τους. Οι μεγάλοι μοριακού βάρους ουσίες βγαίνουν πρώτες από τη στήλη και ακολουθούν οι μικρότερου μοριακού βάρους ουσίες. Η μέθοδος αυτή μας επιτρέπει να προσδιορίζουμε και το μοριακό βάρος διαφόρων πρωτεϊνών.

Η δομή του Sephadex (δεξτρανή, πολυγλυκόζη), είναι η κάτωθι:

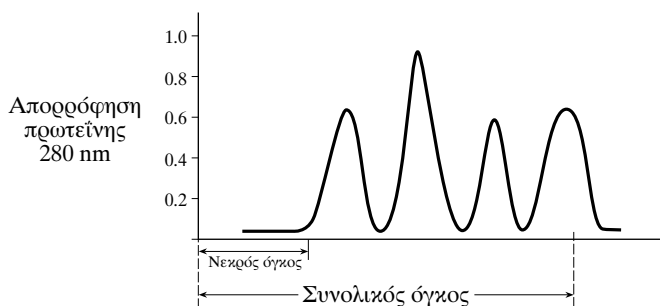
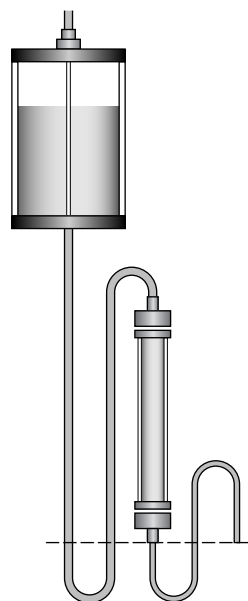


Τα υλικά για τις στήλες μοριακής διήθησης πρέπει να παραμένουν σε απιονισμένο νερό από 1 μέχρι 4 ημέρες ή να θερμαίνονται στους 90 °C από 1 μέχρι 4 ώρες, ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού των σφαιριδίων. Αποχύνονται τα μικρά σφαιρίδια του υπερκειμένου 3-4 φορές, γίνεται απαέρωση και η στήλη συνήθως πληρώνεται στη θερμοκρασία δωματίου. Τέλος η στήλη ξεπλένεται με το ρυθμιστικό διάλυμα όγκου τουλάχιστον 2 φορές τον όγκο της στήλης.

Η ροή στη στήλη ελέγχεται είτε με διαφορά της υδροστατικής πίεσης ή με αντλία. Η ακριβής ροή της στήλης έχει σημασία τόσο για τον καλό διαχωρισμό όσο και για την επαναληψιμότητα της μεθόδου.

Το δείγμα (συνήθως 2-5 ml) προστίθεται προσεκτικά πάνω στη στήλη, αφήνεται να περάσει μέσα στην πηκτή και αμέσως προστίθενται 5-10 ml του ρυθμιστικού διαλύματος. Η στήλη στη συνέχεια συνδέεται με το ρεξερβουάρ της στο καθορισμένο ύψος και η συλλογή των κλασμάτων γίνεται με αυτόματο κλασματοσυλλέκτη.

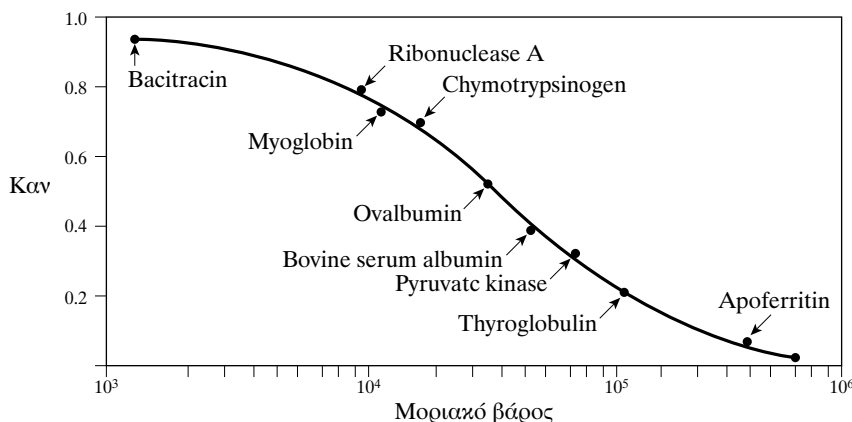
Εάν προστεθεί ένα μίγμα πρωτεϊνών π.χ. 10 mg/ml αλβουμίνης MB = 67.000, 10 mg/ml οβαλβουμίνης MB = 43.000, 10 mg/ml κυτόχρωμα c MB = 12.300 και 5 mg/ml $K_2C_2O_4$ MB = 200 από μία στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex G75 θα πάρουμε το διαχωρισμό που φαίνεται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1. Διαχωρισμός πρωτεϊνών σε στήλη μοριακής διήθησης Sephadex G75.

Εάν γίνει μια άλλη γραφική παράσταση σε ημιλογαριθμικό χαρτί όπου στον κάθετο άξονα βάζουμε τα MB των πρωτεϊνών και στον οριζόντιο τον αριθμό κλάσματος κάθε κορυφής, βλέπουμε ότι παίρνουμε μία ευθεία γραμμή (Σχή-

μα 2). Από το διάγραμμα αυτό, χρησιμοποιώντας την ίδια στήλη με τις ίδιες συνθήκες, μπορούμε να χρωματογραφήσουμε ένα άγνωστο πρωτεϊνικό εκχύλισμα και να βρούμε με αρκετή ακρίβεια το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών κάτω από μη-μετουσιωτικές συνθήκες.



Σχήμα 2. Επιλεκτική καμπύλη μοριακής διήθησης σε Sephadex G-200 που δείχνει την κίνηση της πρωτεΐνης μέσα στη στήλη K_{av} συναρτήσει του Μοριακού Βάρους.

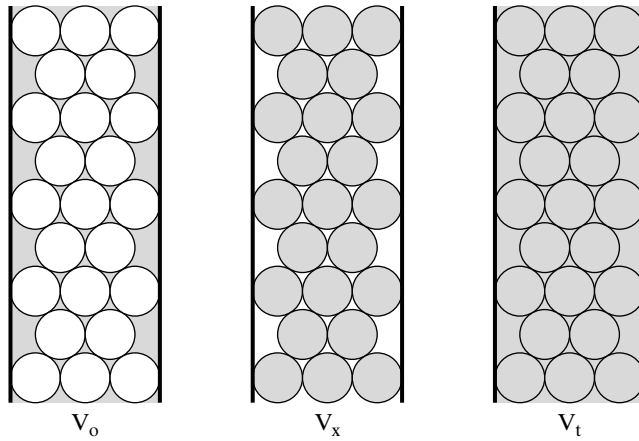
Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης διέπεται από απλές μαθηματικές σχέσεις που πολλές φορές μας βοηθούν στην εξαγωγή συμπερασμάτων με αρκετή ακρίβεια. Όπως φαίνεται στο σχήμα 3, ο συνολικός όγκος του υλικού πλήρωσης της στήλης, V_t , αποτελείται από τον χώρο που καταλαμβάνουν τα σφαιρίδια της πηκτής, V_x , και το χώρο που καταλαμβάνει το υγρό γύρω από τα σφαιρίδια, V_o , που ονομάζεται και νεκρός όγκος της στήλης και είναι συνήθως το 35% του συνολικού όγκου V_t .

$$V_t = V_o + V_x$$

Ο όγκος έκλουσης, V_c , μιας διαλελυμένης ουσίας είναι το ποσό του διαλύματος έκπλυσης που βγαίνει από την στήλη μεταξύ του χρόνου που η διαλελυμένη ουσία εισέρχεται στην επιφάνεια της στήλης και του χρόνου της εμφάνισης στο ξέπλυμα της στήλης. Στην πράξη το V_c μετράται από το μέσον της κορυφής που εμφανίζεται η ουσία. Οι παράμετροι αυτοί χρησιμοποιούνται συνήθως με τρεις τρόπους για να περιγράψουν το βαθμό κατά τον οποίο μία διαλελυμένη ουσία καθυστερεί μέσα στην πηκτή της στήλης.

Ο σχετικός όγκος έκλουσης ισούται με το λόγο:

$$\frac{V_c}{V_o}$$



Σχήμα 3.

σταθερά καθυστέρησης R , που είναι το αντίστροφο του σχετικού όγκου έκλυσης:

$$R = \left(\frac{V_c}{V_o} \right)^{-1} = \frac{V_o}{V_c}$$

και ο συντελεστής κατανομής:

$$K_{av} = \frac{V_c - V_o}{V_x}$$

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Ηλεκτροφόρηση είναι η διεργασία κατά την οποία φορτισμένα μόρια όπως DNA, RNA και πρωτεΐνες κινούνται σε ηλεκτρικά πεδία μέσα σε διαλύματα ή πηκτές. Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί πάρα πολύ και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ή ταυτοποίηση όλων των βιολογικών μορίων. Τεράστιες εφαρμογές της ηλεκτροφόρησης σε πηκτές έχουμε κυρίως κατά τον καθαρισμό πρωτεϊνών.

Εάν ένα μόριο με φορτίο q τοποθετείται σε ηλεκτρικό πεδίο, μία δύναμη εφαρμόζεται η οποία εξαρτάται από το φορτίο του μορίου και την ισχύ του πεδίου. Η σχέση αυτή εκφράζεται ως εξής:

$$F = \frac{E}{d} \cdot q$$

όπου E η διαφορά δυναμικού μεταξύ του ηλεκτροδίου και d η απόσταση μεταξύ τους. Ο λόγος $\frac{E}{d}$ συνήθως αναφέρεται ως δυναμικό του πεδίου.

Η δύναμη F , όπως εκφράζεται από την εξίσωση του Stokes, εξαρτάται από το μέγεθος και το σχήμα του μορίου και το ιξώδες διά μέσω του οποίου κινούνται τα μόρια $F = 6\pi\eta r v$ όπου r είναι η ακτίνα του σφαιρικού μορίου, η το ιξώδες και v η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα μόρια. Συνεπώς:

$$\frac{E}{d} = 6\pi\eta r v$$

Η σχέση αυτή μπορεί να μετατραπεί ως εξής:

$$v = \frac{E \cdot q}{6 \cdot d \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

που δείχνει ότι η ταχύτητα κίνησης των μορίων είναι ανάλογος της τάσης και του φορτίου των μορίων αλλά είναι αντιστρόφως ανάλογος του μεγέθους του μορίου και του ιξώδους του διαλύματος. Εφόσον κάθε μόριο αναμένεται να έχει χαρακτηριστικό μέγεθος και φορτίο, μεταναστεύει σε συγκεκριμένη θέση μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο για δεδομένο χρόνο.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου

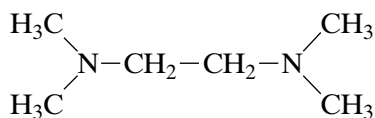
Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ή νουκλεϊνικών οξέων, ανάλογα με το μοριακό βάρος και το φορτίο τους.

Τα πηκτώματα του πολυακρυλαμιδίου δημιουργούνται με πολυμερισμό του

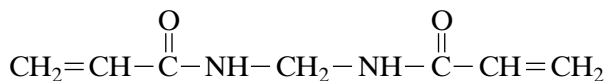
ακρυλαμίδιου και του N, N' μεθυλενοδισακρυλαμίδιου.



Ακρυλαμίδιο

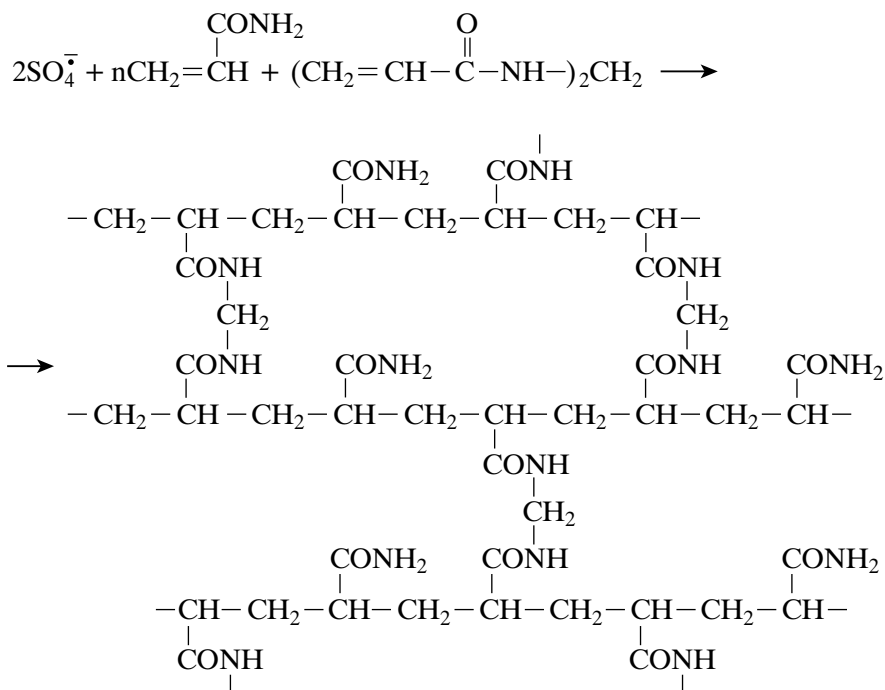


Τετραμεθυλενοδιαμίνη (TEDMED)



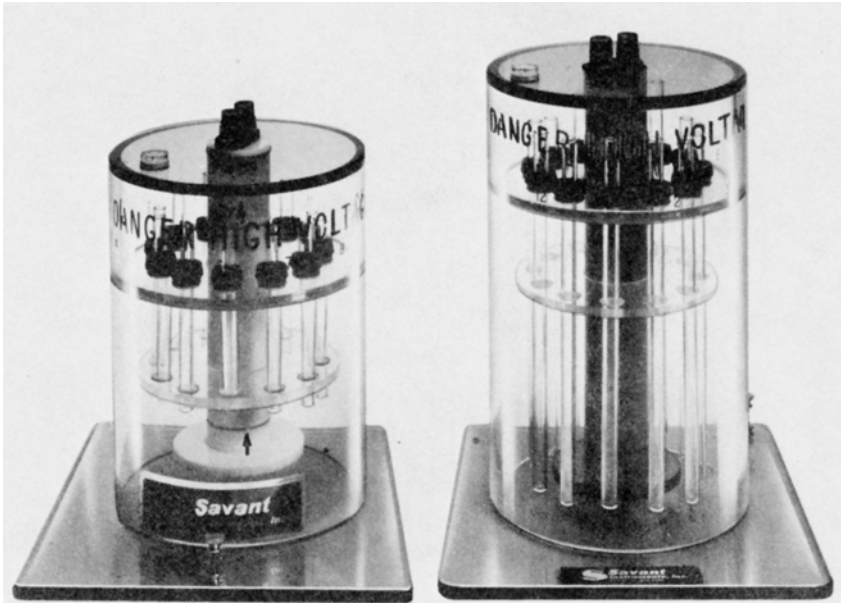
N, N'μεθυλενοδισακρυλαμίδιο

Το μέγεθος των πόρων του πολυμερούς που προκύπτει είναι συνάρτηση του βαθμού του πολυμερισμού, ο οποίος ποικίλει ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των μονομερών. Η αντίδραση πολυμερισμού αρχίζει με την προσθήκη του υπερθειϊκού αμμωνίου που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες: $\text{S}_2\text{O}_8^{2-} \rightarrow 2\text{SO}_4^{\cdot-}$ που μαζί με το φωτοχημικό καταλύτη το TEMED διαδίδονται στο σύστημα πολυμερισμού σύμφωνα με την αντίδραση:

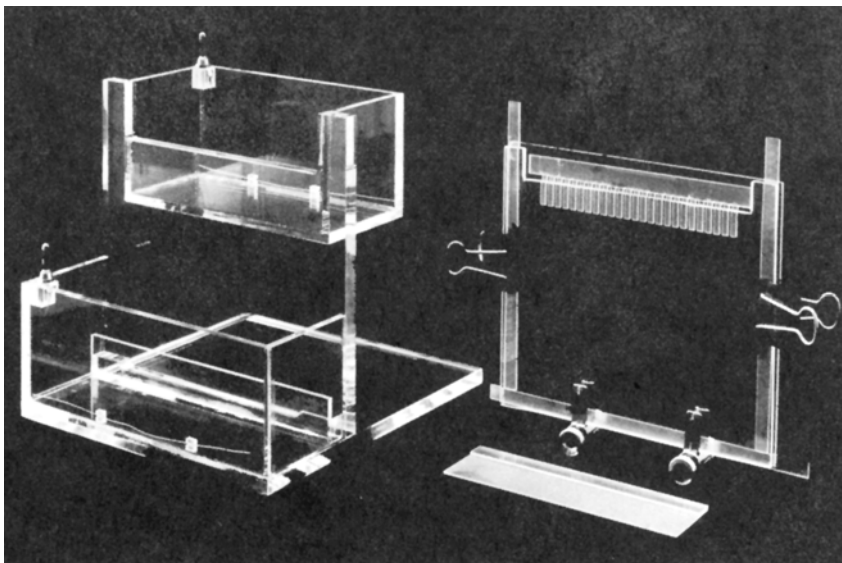


Μη - συνεχής ηλεκτροφόρηση⁽²⁾

Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει σε δύο ειδών συσκευές (Σχήμα 4). Είτε



Σχήμα 4Α. Συσκευή ηλεκτροφόρησης σε κυλινδρικούς σωλήνες.



Σχήμα 4Β. Συσκευή ηλεκτροφόρησης σε επίπεδη πλάκα.

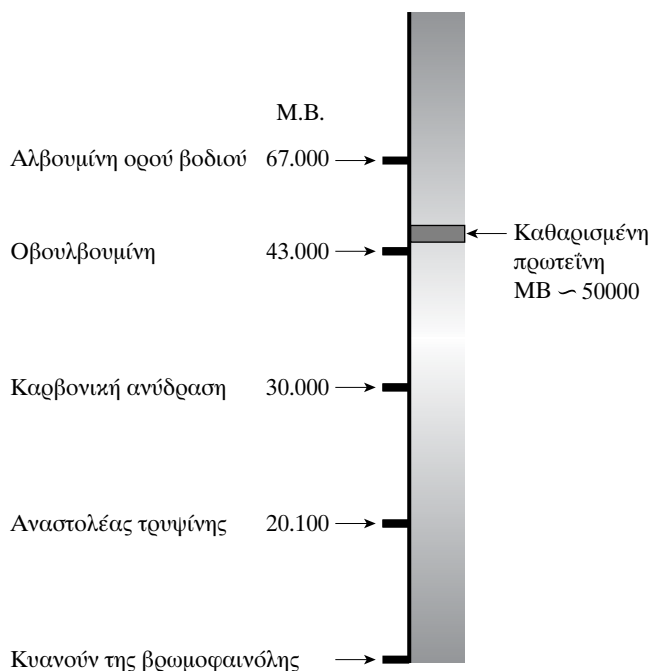
σε συσκευή με κυλινδρικούς σωλήνες (σχήμα 4A) ή σε συσκευή με επίπεδες γυάλινες πλάκες (σχήμα 4B). Ο πολυμερισμός των πηκτωμάτων γίνεται σε κυλινδρικούς σωλήνες (4×100 mm). Η σύσταση του διαλύματος πριν τον πολυμερισμό είναι 10% w/v ακρυλαμίδιο, 0,16% w/v δις-ακρυλαμίδιο, 0,35 M Tris-HCl pH 8,9. Ο πολυμερισμός γίνεται με την προσθήκη σε τελική συγκέντρωση 0,023% v/v TEMED και 0,07% w/v υπερθειϊκό αμμώνιο. Αφού γίνει ο πολυμερισμός, σχηματίζεται πήκτωμα του οποίου το ύψος είναι 7,5 cm (πήκτωμα διαχωρισμού). Στην επάνω επιφάνεια του πηκτώματος προστίθεται διάλυμα που η σύστασή του είναι 4,5% w/v ακρυλαμίδιο, 0,21% w/v δις-ακρυλαμίδιο, 0,125 M Tris-HCl pH 6,7. Ο πολυμερισμός του νέου διαλύματος γίνεται με την προσθήκη TEMED και υπερθειϊκού αμμωνίου στις προηγούμενες συγκεντρώσεις, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του πηκτώματος επιστοιβάξης που το ύψος του είναι 1 cm.

Η σύσταση του διαλύματος των πρωτεϊνών που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν είναι 25 mM Tris-HCl pH 8,3 και περιέχει 20% v/v γλυκερίνης και 0,02% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης είναι 190 mM γλυκίνη, 0,05 mM EDTA, 5 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 25 mM Tris-HCl pH 8,3.

Η ηλεκτροφόρηση αρχίζει με ρεύμα έντασης 0,5 mA/πηκτή. Μετά από 20 λεπτά ανεβαίνει στο 3 mA/πηκτή. Η ηλεκτροφόρηση συνεχίζεται μέχρις ότου η χρωστική φτάσει στην έξοδο του πηκτώματος.

Στην αρχή τα ανιόντα γλυκίνης κινούνται μέσα στο δείγμα και στην πηκτική συσσώρευση. Εκεί τα ανιόντα γλυκίνης αντιδρούν με το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl χαμηλότερου pH και τιτλοδοτούνται. Η τιτλοδότηση αυτή μειώνει το μέσο αρνητικό φορτίο των ανιόντων και τους προσδίδει μικρότερη κινητικότητα. Αντίθετα, στο pH 6,9 οι περισσότερες πρωτεΐνες μεταφέρουν αρκετά μεγάλο αρνητικό φορτίο ώστε να υπερπηδούν τις δυνάμεις τριβής και να παρουσιάζουν μεγαλύτερη κινητικότητα απ' αυτή των ιόντων γλυκίνης. Έτσι γίνεται συσσώρευση των πρωτεϊνών πιο μπροστά από τα ιόντα γλυκίνης. Οι πρωτεΐνες καθώς εισέρχονται στην πηκτική διαχωρισμού τιτλοδοτούνται σε pH 8,9 και προκαλείται μία υστέρηση στην κινητικότητά της λόγω τριβών, που έχει ως αποτέλεσμα κάθε πρωτεΐνη να μετατοπίζεται ανάλογα με το φορτίο και το μέγεθος της σε pH 8,9.

Με βάση τα παραπάνω κάθε πρωτεΐνη ξεχωρίζει και μετακινείται σε διαφορετικό σημείο (Σχήμα 5). Ο ακριβής καθορισμός των ζωνών των πρωτεϊνών ανιχνεύεται με πολλές μεθόδους βαφής.



Σχήμα 5. Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση μέσω μη-συνεχούς πηκτής πολυακρυλαμίδιο.

Προσδιορισμός ενζυμικής δράσης μετά την ηλεκτροφόρηση

Εάν θέλουμε να προσδιορίσουμε και ενζυμική δράση ώστε να βρεθεί σε ποια πρωτεϊνική ζώνη αντιστοιχεί το ένζυμο που μελετούμε, ορισμένες από τις πηκτές μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης κόβονται σε κομμάτια των 0,5 ή 1,0 mm. Κάθε κομμάτι εμβαπτίζεται σε 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος και προσδιορίζεται η ενζυμική του δράση.

Χρώση πρωτεϊνών πάνω σε πηκτές πολυακρυλαμίδιο

α) Με Coomassie Brilliant Blue

Γίνεται κατ' αρχάς στερέωση των πρωτεϊνών με διάλυμα 20% w/v τριχλωροξικού οξέος για 30 min και χρώση με διάλυμα 50% v/v μεθανόλης, 10% v/v οξικού οξέος και 0,1 w/v Coomassie Brilliant Blue R 250 για 12 h. Ο αποχρωματισμός του πηκτώματος γίνεται με διάλυμα 7% v/v οξικού οξέος και 10% v/v μεθανόλης. Η διατήρηση του πηκτώματος γίνεται σε διάλυμα 7% οξικού οξέος.

β) Με νιτρικό άργυρο⁽⁶⁾

Η βαφή με νιτρικό άργυρο, αν και πιο πολύπλοκη, έχει περίπου 100 φορές

μεγαλύτερη ευαισθησία από ότι η βαφή με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 και μπορεί να ανιχνεύσει ποσότητες πρωτεϊνών μέχρι 1 ng.

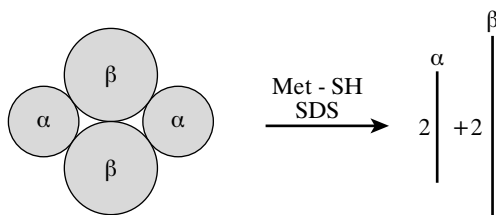
Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί στερέωση των πρωτεϊνών για 30 λεπτά σε υδατικό διάλυμα που περιέχει 50% v/v μεθανόλη, 10% v/v οξικό οξύ και στη συνέχεια για άλλα 30 λεπτά σε διάλυμα 10% v/v γλουταραλδεϋδης και πλύσιμο της πηκτής με άφθονο απιονισμένο νερό, κατά προτίμηση όλο το βράδυ. Αφού ξεπλυθεί καλά αφήνεται για 30 λεπτά σε διάλυμα 5 mg/ml διθειοθρεϊτόλης και αμέσως μετά σε διάλυμα 0,1 w/v νιτρικού αργύρου, για άλλα 30 λεπτά. Τέλος γίνεται η εμφάνιση των ζωνών με διάλυμα που περιέχει 50 ml 37% (v/v) φορμαλδεϋδη σε 100 ml 3% (w/v) ανθρακικό νάτριο.

Όταν εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες η βαφή σταματά με τη προσθήκη 5 ml διαλύματος 2,3 M κιτρικού οξέος ανά 100 ml υγρού εμφάνισης. Πρέπει να σημειωθεί ότι σ' όλα τα παραπάνω στάδια χρειάζεται ήπια αλλά συνεχής ανακίνηση της πηκτής.

Ηλεκτροφόρηση κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες - Ηλεκτροφόρηση με SDS⁽⁴⁾

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου με το μετά νατρίου άλας του θειϊκού δωδεκυλίου (Sodium docetyl sulfate, SDS) χρησιμοποιείται για τον έλεγχο καθαρότητας διαφόρων παρασκευασμάτων, το χαρακτηρισμό υπομονάδων μιας πρωτεΐνης και την εύρεση μοριακών βαρών πρωτεϊνικών αλυσίδων.

Το πρωτεϊνικό παρασκεύασμα αντιδρά κατ' αρχάς με περίσσεια μερκαπτοαιθανόλης (HOCH₂CH₂SH) και SDS. Κάτω απ' αυτές τις συνθήκες οι γέφυρες -S - S - που υπάρχουν στις πρωτεΐνες ανάγονται και το SDS ενώνεται με τις πρωτεΐνες δημιουργώντας ανιονικά σύμπλοκα. Οι ανιονικές αποδιαταγμένες πρωτεΐνες διαχωρίζονται στη συνέχεια ηλεκτροφορητικά σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου σε περιβάλλον που περιέχει SDS. Το SDS δίδει σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου της πρωτεΐνης προς τη μάζα της πρωτεΐνης και με βάση το λόγο αυτού και το μέγεθος των πόρων της πηκτών κινούνται και διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες. Συνεπώς η κινητικότητα του SDS-πρωτεΐνης εξαρτάται λογαριθμικά από το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης.



Σχήμα 6. Αποδιάταξη αλυσίδων πρωτεϊνών με μερκαπτοαιθανόλη και SDS.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται με επιτυχία για διαχωρισμό πρωτεϊνών με SDS-ηλεκτροφόρηση είναι αυτή που περιγράφηκε από τον Leammli⁽⁴⁾.

Η πηκτή για την SDS-ηλεκτροφόρηση αποτελείται από δύο μέρη:

- α) Την πηκτή διαχωρισμού 9 cm που είναι 7,5% w/v σε ακρυλαμίδιο, πολυμερισμένη χημικά με TEMED 0,025% v/v και υπερθειικό αμμώνιο 0,0025% w/v, σε διάλυμα τελικής συγκέντρωσης Tris-HCl 375 mM pH 8,8 και SDS 0,1% και
- β) Την πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel) 1 cm ύψους που είναι 3% w/v σε ακρυλαμίδιο σε διάλυμα Tris-HCl 125 mM pH 6,8 και 0,1% SDS, πολυμερισμένη όπως και στην προηγούμενη περίπτωση με TEMED και θειικό αμμώνιο. Το διάλυμα του ακρυλαμιδίου (pH 8,3) περιέχει Tris (βάση) 0,025 M, γλυκίνη 0,192 M και SDS 0,1%.

Το δείγμα (0,1 - 0,2 ml) περιέχει σε τελική συγκέντρωση Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% γλυκερόλη 10%, 2-μερκαπτοαιθανόλη 5% και κυανού της βρωμοφαινόλης 0,001% ως δείκτη. Οι πρωτεΐνες διαλυτοποιούνται τελείως με βράσιμο του δείγματος για 1,5 λεπτά. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται με 3 mA/πηκτή, ώσπου να φθάσει ο δείκτης στο τέλος των πηκτών προς την άνοδο. Μετά το τέλος της ηλεκτοφόρησης οι πηκτές δέχονται κατεργασία με 50% TCA για 12 ώρες και οι πρωτεΐνες βάφονται για μία ώρα στους 37 °C με διάλυμα 0,1% Coomassie Blue σε 50% TCA. Οι πηκτές τελικά ξεβάφονται με επανειλημμένες εκπλύσεις με 7% οξικό οξύ.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται και για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών.

Ισοηλεκτρική εστίαση πρωτεϊνών⁽³⁾

Η μέθοδος της ισοηλεκτρικής εστίασης είναι τεχνική ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών, με τη διαφορά ότι ο διαχωρισμός γίνεται σε μία σταθερή διαβάθμιση pH, που δημιουργείται ανάμεσα στα δύο ηλεκτρόδια και σταθεροποιείται από αμφολύτες. Οι πρωτεΐνες κινούνται μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο βάση του φορτίου τους και εστιάζονται σε περιοχή της πηκτής όπου το pH είναι ίδιο με το ισοηλεκτρικό τους σημείο μιας και εκεί το καθαρό τους φορτίο εξουδετερώνεται. Οι αμφολύτες είναι πολυαμινοπολυκαρβοξυλικές ενώσεις, με μικρό μοριακό βάρος (500-1.000), καλή αγωγιμότητα και καλή ρυθμιστική ικανότητα του pH στην περιοχή του ισοηλεκτρικού τους σημείου.

Η τεχνική χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του ισοηλεκτρικού σημείου (pI) μιας πρωτεΐνης ή για το διαχωρισμό πρωτεϊνών βάση του pI τους. Η κίνηση των πρωτεϊνών στην ισοηλεκτρική εστίαση πρέπει να γίνει ανεμπόδιστα, με βάση δηλαδή μόνο το φορτίο τους, γι' αυτό και χρησιμοποιούνται πηκτές πο-

λυακρυλαμίδιου με όσο το δυνατόν μεγαλύτερους πόρους, δηλαδή μικρής συγγέντρωσης ακρυλαμίδιου. Η εστίαση γίνεται μέσα σε ψυγείο (4 °C) για να μην αναπτύσσεται μεγάλη θερμοκρασία πάνω στην πηκτή. Όλα τα διαλύματα πριν χρησιμοποιηθούν, απαερώνονται ώστε να απομακρυνθεί το διαλυμένο CO₂, η παρουσία του οποίου επηρεάζει την ανάπτυξη της διαβάθμισης του pH.

Τα συστατικά του συστήματος είναι τα εξής:

Διάλυμα καθόδου:	10 mM αιθανολαμίνης
Διάλυμα ανόδου:	10 mM φωσφορικό οξύ
Πηκτή:	5,76% ακρυλαμίδιο
	0,24% δισ-ακρυλαμίδιο
	10% σορβιτόλη
	2% αμφολύτες εύρους pH 3-10
	0,05% (NH) ₂ S ₂ O ₈
	0,04% v/v TEMED

Τα δείγματα περιέχουν 40% σορβιτόλη, 2% αμφολύτες και 0,001% ερυθρό του μεθυλενίου (pI: 3,75).

Η πηκτή προεσιάζεται υπό σταθερή ένταση ρεύματος 3 mA για 30 λεπτά και μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων ακολουθεί εστίαση με σταθερή τάση 100 V για 1 ώρα και 350 V για 5 ώρες.

Για τον προσδιορισμό της τιμής του pH κατά μήκος της πηκτής, μία διαδρομή της επίπεδης πηκτής κόβεται σε κομμάτια μήκους 3 mm από τα οποία εκχυλίζονται οι αμφολύτες με 1 ml δις-απιονισμένο και απαερωμένο νερό με ανάδευση για 2 ώρες στους 4 °C. Μετά το τέλος της ανάδευσης γίνεται μέτρηση του pH με μικρο-ηλεκτρόδιο.

Για τον προσδιορισμό της δραστικότητας ενζύμου κατά μήκος της πηκτής, μία άλλη διαδρομή της επίπεδης πηκτής κόβεται σε κομμάτια μήκους 3 mm και τα κομμάτια τοποθετούνται σε κωνικά σωληνάκια φυγοκέντρισης (erppendorf). Στα erppendorf προστίθενται 250 μl 4 φορές πυκνότερο ρυθμιστικό διάλυμα, 50 μl διαλύματος BSA (1μg/μl), 92,5 μl H₂O και παραμένουν για 12 ώρες στους 4 °C. Στη συνέχεια γίνεται ο προσδιορισμός της δραστικότητας του ενζύμου.

Σε περίπτωση που θέλουμε να γίνεται χρώση των ζωνών των πρωτεϊνών οι αμφολύτες απομακρύνονται με συνεχείς εναλλαγές της πηκτής σε 7% οξικό οξύ για 48 ώρες. Στη συνέχεια γίνεται η χρώση των πρωτεϊνών όπως περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ

Η τεχνική που βοήθησε πάρα πολύ στην κατανόηση των υποκυτταρικών στοιχείων είναι η φυγοκέντρωση. Μία μεγάλη ποικιλία οργάνων υπάρχει σήμερα στην αγορά που επιτρέπουν να γίνει η φυγοκέντρωση κυτταρικών εκχυλισμάτων με σχετική ευκολία, από λίγα ml μέχρι χιλιάδες λίτρα. Στην απλή τους μορφή οι φυγόκεντροι είναι όργανα που αποτελούνται από ένα μεταλλικό ρότορα με οπές όπου μπαίνουν τα σωληνάκια με τα κυτταρικά παρασκευάσματα και έναν κινητήρα περιστροφής στις κατάλληλες ταχύτητες. Όλα τα άλλα που βλέπουμε σήμερα γύρω από μία φυγόκεντρο είναι εξαρτήματα που επιτρέπουν διάφορους χειρισμούς. Σε βιοχημικά εργαστήρια δύο βασικοί τύποι φυγόκεντρων χρησιμοποιούνται: της αναλυτικής κλίμακας και παρασκευαστικής κλίμακας. Οι αναλυτικές φυγόκεντροι που χρησιμοποιούνται για δείγματα της τάξεως των ml ονομάζονται και υπερφυγόκεντροι διότι μπορούν και φτάνουν υψηλές στροφές (πάνω από 30.000 στροφές/λεπτό). Αντίθετα, οι παρασκευαστικές φυγόκεντροι λειτουργούν με μεγαλύτερα δείγματα 10-20.000 ml και δεν φτάνουν σε πολύ υψηλές στροφές.

Η φυγοκέντρωση βασίζεται στο γεγονός ότι οποιοδήποτε αντικείμενο κινούμε κυκλικά υπόκειται σε μια φυγόκεντρη δύναμη F . Το μέγεθος της δύναμης F εξαρτάται από τη γωνιακή ταχύτητα ω , και την ακτίνα περιστροφής r . Η δύναμη F εκφράζεται συνήθως ως σχετική

$$F = \omega^2 \cdot r$$

φυγόκεντρος δύναμη (Φ) ή αριθμός πολλαπλάσιος του g και ισούται με

$$\Phi = \frac{\omega^2 \cdot r}{980}$$

Για να χρησιμοποιηθεί όμως ως στροφές ανά λεπτό (revolution per minute, rpm), η γωνιακή ταχύτητα θα πρέπει να εκφρασθεί ως

$$\omega = \frac{\pi \cdot (\text{rpm})}{30}$$

$$\frac{(\pi \cdot \text{rpm})^2}{30^2} \cdot r$$

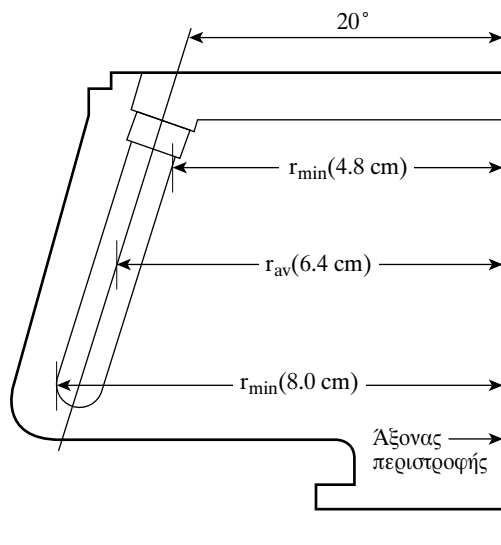
Επομένως:
$$\Phi = \frac{(\pi \cdot \text{rpm})^2}{980 \cdot 30^2} \cdot r = (1.1 \cdot 10^{-5})(\text{rpm})^2 \cdot r$$

Εάν θέλαμε να υπολογίσουμε την τιμή Φ στην κορυφή του δοκιμαστικού σωλήνα που έχει ακτίνα 4,8 cm από το κέντρο και την τιμή Φ στον πυθμένα του

σωλήνα όπου η ακτίνα 8,0 cm (Σχήμα 7) θα πάρουμε τις εξής τιμές:

$$\Phi_{\text{κορυφής}} = 7,73 \times g$$

$$\Phi_{\text{πυθμένα}} = 12,89 \times g$$



Σχήμα 7. Διάγραμμα τομής ρότορα σταθερής γωνίας που δείχνει τις αποστάσεις από τον άξονα περιστροφής της κορυφής, του μέσου και του πυθμένα του σωλήνα φυγοκέντρου.

Συνεπώς η φυγόκεντρη δύναμη που ασκείται στην κορυφή είναι μικρότερη από τη φυγόκεντρο δύναμη που ασκείται στον πυθμένα. Γι' αυτό ως τιμή Φ λαμβάνεται ο μέσος όρος των τιμών της κορυφής και του πυθμένα του ίδιου σωλήνα. Το σημαντικότερο στην περίπτωση αυτή είναι να καθοριστεί με ακρίβεια η τιμή r .

Η φυγόκεντρος δύναμη που προκύπτει σε κάθε ταχύτητα ή στις αντίστοιχες στροφές ανά λεπτό, rpm, σε σχέση με τον άξονα περιστροφής, ορίζεται ως “πόσες φορές τη δύναμη της βαρύτητας” ή “επί πόσες φορές το g”. Υπάρχουν συνεπώς πίνακες για κάθε τύπου ρότορα όπου μπορεί ο κάθε ερευνητής να βρει την αντιστοιχία μεταξύ του rpm και “επί φορές το g”. Έτσι το “επί φορές το g” μας διευκολύνει να χρησιμοποιήσουμε συσκευές με άλλου τύπου ρότορες αλλάζοντας την ταχύτητα και το χρόνο φυγοκέντισης ώστε να έχουμε τον ίδιο αριθμό “επί φορές το g”.