

Chương 4

PHƯƠNG PHÁP LY TÂM

MỤC TIÊU HỌC TẬP

1. Trình bày được nguyên lý ly tâm.
2. Liệt kê được các loại máy ly tâm và nêu ứng dụng từng loại trên lâm sàng và trong nghiên cứu.
3. Trình bày được các bước vận hành và bảo quản máy ly tâm.

NỘI DUNG

1. LY TÂM

Ly tâm là phương pháp dùng lực ly tâm ($C = mv^2/R$) để phân tách các phân tử có khối lượng riêng (ρ) khác nhau trong một dung dịch hỗn hợp nhiều thành phần.

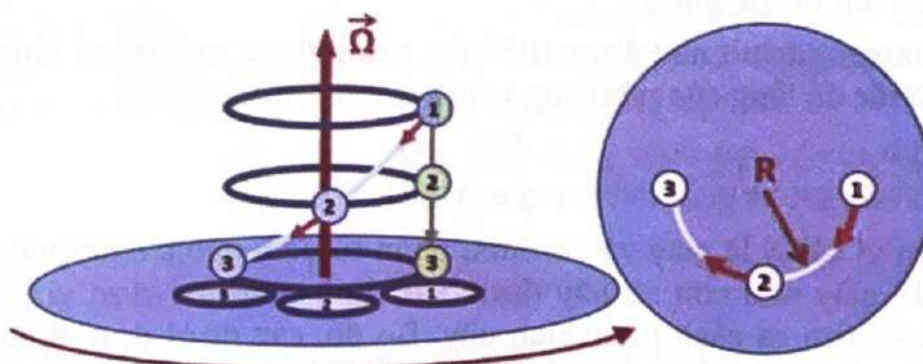
Phương pháp ly tâm là một trong các phương pháp vật lý đáng tin cậy dùng trong công nghiệp sản xuất thực phẩm, rượu bia và nghiên cứu y sinh học, tế bào. Những ứng dụng kỹ thuật của phương pháp ly tâm gồm lựa chọn và phân lập các tế bào, các bào quan và các phân tử.

Trong y học, ly tâm được ứng dụng nhiều trên lâm sàng và trong nghiên cứu. Tùy mục đích sử dụng mà người ta dùng các loại máy ly tâm khác nhau. Mặc dù vậy, các máy ly tâm này đều có những nguyên tắc hoạt động cơ bản chung.

1.1. Nguyên lý ly tâm

Sự ly tâm dựa trên cơ sở là bất kỳ một vật nào chuyển động vòng tròn ở một tốc độ góc nhất định buộc phải chịu một lực F hướng ra ngoài. Lực này được gọi là lực ly tâm. Độ lớn của lực ly tâm F phụ thuộc vào tốc độ góc ω (radian) và bán kính quay r (cm).

$$F = \omega^2 \cdot r \quad (1)$$



Hình 4.1. Sơ đồ góc quay và bán kính quay

F thường được thể hiện trong các thuật ngữ về lực hút của trái đất và sau đó được quy cho là lực ly tâm RCF hoặc được gọi chung hơn là số lần g.

$$RCF = (2)$$

Để sử dụng dễ dàng, lực ly tâm được thể hiện trong thuật ngữ số vòng quay trong một phút rpm (revolutions per minute), tốc độ hoạt động mà máy ly tâm thể hiện. Từ giá trị rpm có thể biến đổi thành radians ở phương trình:

$$\omega = (3)$$

$$\text{Ta có: } RCF = 1,119 (\text{rpm}) \times 10^{-5} (\text{rpm})^2 r (4)$$

Phương trình trên dùng để tính toán RCF của một mẫu quay trong một rotor mà mẫu này có khoảng cách r, tính từ trung tâm của rotor. Ví dụ: Một ống ly tâm quay trong một rotor cố định có $r_{\min} = 4,8$ và $r_{\max} = 8,0$ cm, được quay với tốc độ 12.000 rpm. Lực ly tâm ở ống ly tâm này là bao nhiêu?

Theo phương trình (4), ta có:

$$RCF_{\text{miệng ống}} = (1,119 \times 10^{-5}) (12.000)^2 \times 4,8$$

$$RCF_{\text{đáy ống}} = (1,119 \times 10^{-5}) (12.000)^2 \times 8,0$$

Như vậy ta thấy ở đây lực ly tâm ở miệng và đáy ống ly tâm khác nhau gần gấp đôi. Để tính toán, các giá trị RCF có thể được thể hiện như giá trị trung bình của RCF, nghĩa là giá trị này là số trung bình của các giá trị của lực ly tâm ở miệng và đáy ống ly tâm.

1.2. Đơn vị ly tâm – hệ số lắng

Vật chất khi quay quanh một trục sẽ chịu một lực ly tâm F. Dưới ảnh hưởng của lực này, chúng bị lắng về phía đáy của ống ly tâm với một tốc độ v, được tính toán bởi phương trình sau:

$$v = \omega^2 r (5)$$

r: khoảng cách từ trục của sự quay đến phần tử hoặc phân tử lắng (cm)

F: thể tích của phần tử (cm^3)

Pp: tỷ trọng của phần tử (g/cm^3)

Pm: tỷ trọng của môi trường (g/cm^3)

f là hệ số ma sát ($\text{g}/\text{giây}$)

Dạng phương trình này được thể hiện trong thuật ngữ hệ số lắng S của phần tử lắng, đó là tốc độ lắng của nó trong 1 đơn vị của trường lực F.

$$S = (6)$$

$$S = \omega^2 r (7)$$

Các đơn vị của S là giây và vì nhiều phân tử có ý nghĩa sinh học có các hệ số lắng hơn 10^{-3} giây nên con số này được xác định như là 1 đơn vị Svedberg- tên người đầu tiên tìm ra cách phân tích này. Do đó, các dưới đơn vị của Ribosome hoặc các tiểu phần khác có 1 hệ số lắng 18×10^{-3} giây được gọi là 18S.

Hệ số ma sát của một phân tử phụ thuộc vào kích thước, hình dạng của nó và vào độ nhớt của môi trường chứa nó. Đối với một phân tử hình cầu có bán kính r_m , hệ số ma sát có thể được tính toán bởi phương trình sau:

$$f = 6\pi\eta r_m \quad (8)$$

η : độ nhớt của môi trường (g/cm.giây)

r_m : bán kính của phân tử

Như vậy, hệ số lắng được tăng lên bởi kích thước, hình dạng và tỷ trọng của môi trường trong đó chúng đang chuyển động. Vì có nhiều điều kiện khác nhau nên việc hiệu chỉnh nó là cần thiết. Hệ số lắng thường được hiệu chỉnh thành một giá trị sẽ đạt được trong môi trường với một tỷ trọng và độ nhớt của nước ở 20 độ C. Sự hiệu chỉnh này có thể được thực hiện bởi toán học khi sử dụng phương trình:

$$S_{20,w} = S_{t,m} \quad (9)$$

$S_{t,m}$: hệ số lắng không được hiệu chỉnh trong môi trường m và nhiệt độ t

$\eta_{t,m}$: độ nhớt của môi trường ở nhiệt độ ly tâm

$\eta_{20,w}$: độ nhớt của nước ở nhiệt độ 20°C

ρ_p : tỷ trọng của phần tử hoặc phân tử trong dung dịch

$\rho_{20,w}$: tỷ trọng của nước ở 20°C

Tích phân trong khoảng t_0 đến t thì:

$$S =$$

$t_t - t_0$: khoảng thời gian để một phân tử chuyển động từ vị trí r_0 đến r_t

$$t_t - t_0 =$$

Nếu r_t và r_0 là ngang bằng nghiêm ngặt cho các giá trị bán kính ở miệng và đáy ống ly tâm thì $T = t_t - t_0$ là thời gian đòi hỏi để làm lắng các phân tử với một hệ số lắng đã biết.

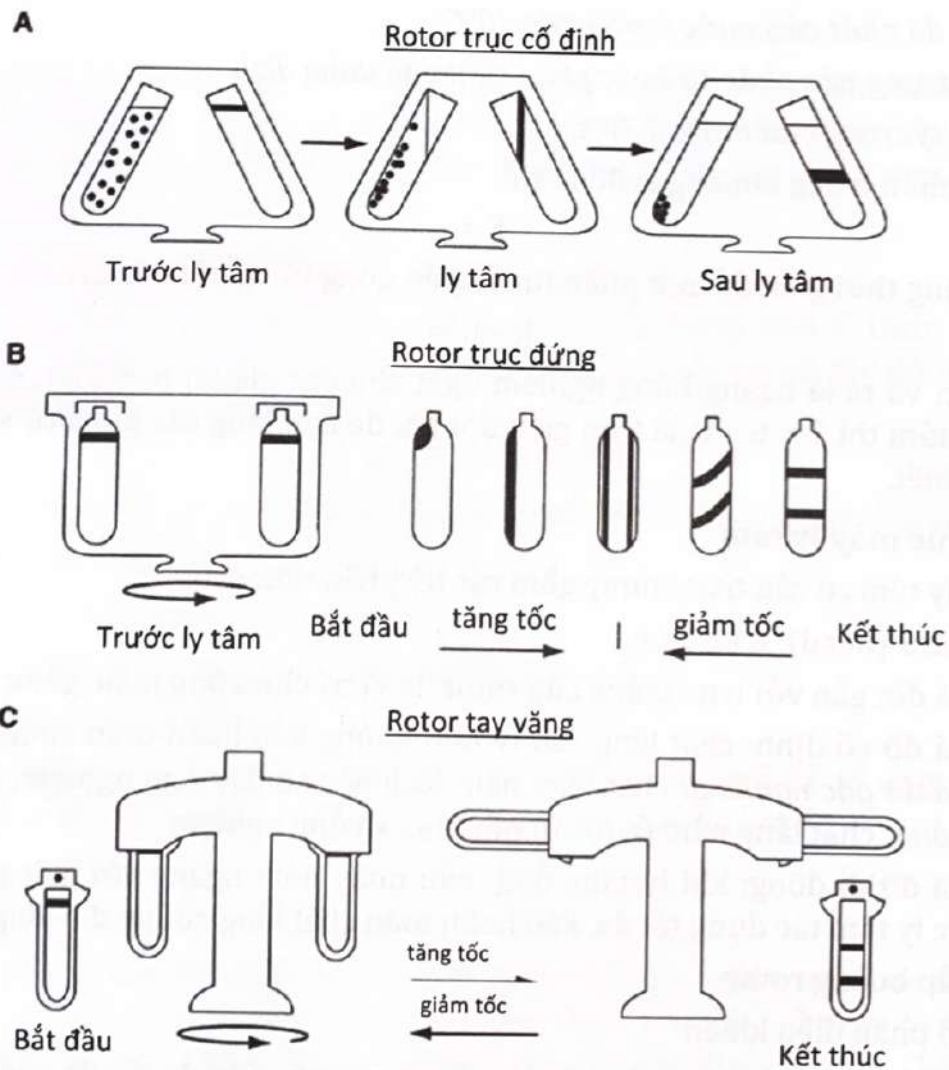
1.3. Cấu trúc máy ly tâm

Máy ly tâm có cấu trúc chung gồm các bộ phận như sau:

- Rotor (head): trục quay
- Giá đỡ: gắn với trục thẳng của rotor, là vị trí chứa ống mẫu, gồm:
 - + Giá đỡ cố định: chất lắng sau ly tâm không kéo hoàn toàn xuống đáy ống.
 - Giá đỡ góc nghiêng*: chất lắng nằm lệch góc xa đáy ống nghiệm.
 - Giá đỡ góc thẳng*: chất lắng nằm ở dọc thành phía xa ống nghiệm
- + Giá đỡ di động: khi ly tâm, ống mẫu quay nằm ngang với mặt phẳng nền, lực ly tâm tác dụng tối đa, kéo hoàn toàn chất lắng xuống đáy ống
- Nắp buồng rotor
- Bộ phận điều khiển
- Một số máy có thêm bộ phận làm lạnh, phanh, máy đo tốc độ góc



Hình 4.2. Máy ly tâm



Hình 4.3. Nguyên lý tách mẫu của các loại rotor

- **Rotor trục cố định (fixed-angle):** Khoảng cách từ môi trường đến vị trí lắng ngắn, Rút ngắn thời gian ly tâm, Được ứng dụng rộng rãi.

- **Rotor văng (swinging-bucket rotor):** Khoảng cách từ môi trường đến vị trí lắng dài, Phân tách tốt hơn, Dễ dàng loại bỏ dịch nổi. ít ảnh hưởng đến cặn.

- **Rotor trục thẳng đứng (vertical rotor):** Phân tách hỗn hợp theo chiều thẳng song song thành ống, được ứng dụng trong isopycnic (một kỹ thuật phân tích mà chúng ta có thể sử dụng để tách các hạt của dung dịch tùy thuộc vào mật độ, nhưng không phụ thuộc vào kích thước).

2. CÁC LOẠI MÁY LY TÂM

2.1. Máy ly tâm để bàn sử dụng trong lâm sàng

Đây là các máy ly tâm đơn giản và giá rẻ nhất. Các máy này được sử dụng để làm cô đọng hoặc tập trung một số nhỏ các chất có thể lắng nhanh (hồng cầu, các chất thô hoặc các chất kết tủa lớn và các tế bào men). Tốc độ tối đa của phần lớn các máy ly tâm để bàn là dưới 3.000 rpm và đều hoạt động ở nhiệt độ phòng. Mặc dù tốc độ cao và nhiệt độ vận hành không được điều chỉnh nhưng những máy này vẫn được sử dụng một cách rộng rãi cho nhiều mục đích khác nhau mà không cần phải sử dụng đến những máy lớn hơn và phức tạp hơn.

2.2. Máy ly tâm tốc độ cao (highspeed centrifuge)

Các máy ly tâm tốc độ cao là các máy được sử dụng ở tốc độ tối đa từ 15.000 đến 25.000 rpm. Các máy này chiếm số lượng lớn các máy được sử dụng, thường được trang bị thiết bị làm lạnh buồng rotor.

Có 2 loại máy chủ yếu:

- Loại đầu tiên có khả năng ly tâm liên tục thường được áp dụng trong việc thu gộp nấm hoặc vi khuẩn từ một thể tích môi trường lớn.

- Loại thứ hai của máy ly tâm tốc độ cao thường có dung tích nhỏ hơn và được làm lạnh. Kiểu này được sử dụng trong phần lớn các kỹ thuật nghiên cứu và được thấy ở hầu hết các phòng thí nghiệm hóa sinh, tách chiết DNA, RNA, protein.

Nhiệt độ của buồng rotor thường được duy trì dễ dàng trong khoảng từ 0 độ C đến 4 độ C. Các máy này thường được sử dụng để thu lượm các vi khuẩn, các mảnh vỡ của tế bào, các tế bào, các bào quan lớn của tế bào, kết tủa miễn dịch.

2.3. Máy siêu ly tâm (ultracentrifuge)

Là các máy ly tâm có thể đạt được tốc độ 75.000 rpm, máy siêu ly tâm đã mở ra những lĩnh vực hoàn toàn mới trong nghiên cứu hóa sinh học. Ứng dụng để tách riêng biệt các bào quan dưới tế bào, định lượng các cấu tử enzym của các bào quan, tách virus ở dạng tinh khiết. Các máy siêu ly tâm thường gồm 4 bộ phận chủ yếu sau đây: (1) Bộ kiểm tra vận hành và tốc độ, (2) Bộ phận kiểm tra nhiệt độ, (3) Hệ thống bơm hút chân không (4) Rotor.

Do quay với tốc độ cao nên buồng máy dễ sinh nhiệt lớn do bởi ma sát với không khí nên máy siêu ly tâm cần bộ phận hút chân không để đảm bảo tốc độ quay và giảm sinh nhiệt, hỏng hóc và cháy nổ.

3. ỨNG DỤNG CỦA LY TÂM TRONG PHÒNG XÉT NGHIỆM Y HỌC

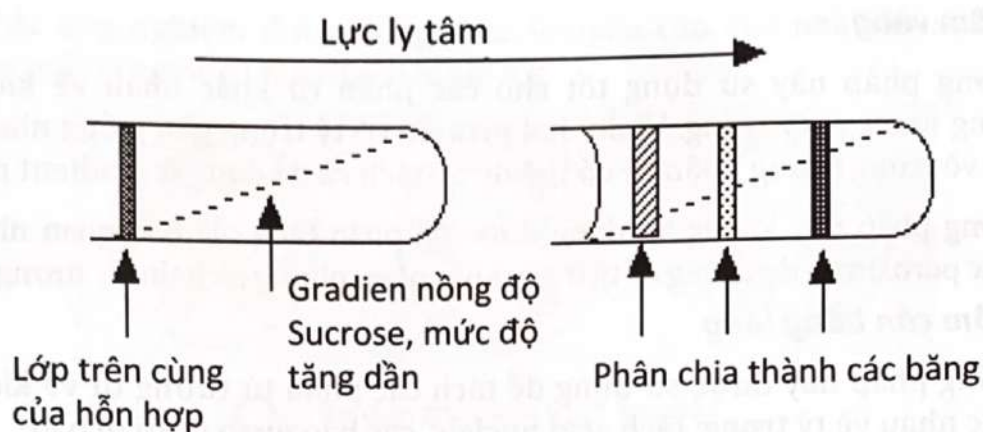
3.1. Ứng dụng lâm sàng

Máy ly tâm dùng trong lâm sàng với nhiều mục đích:

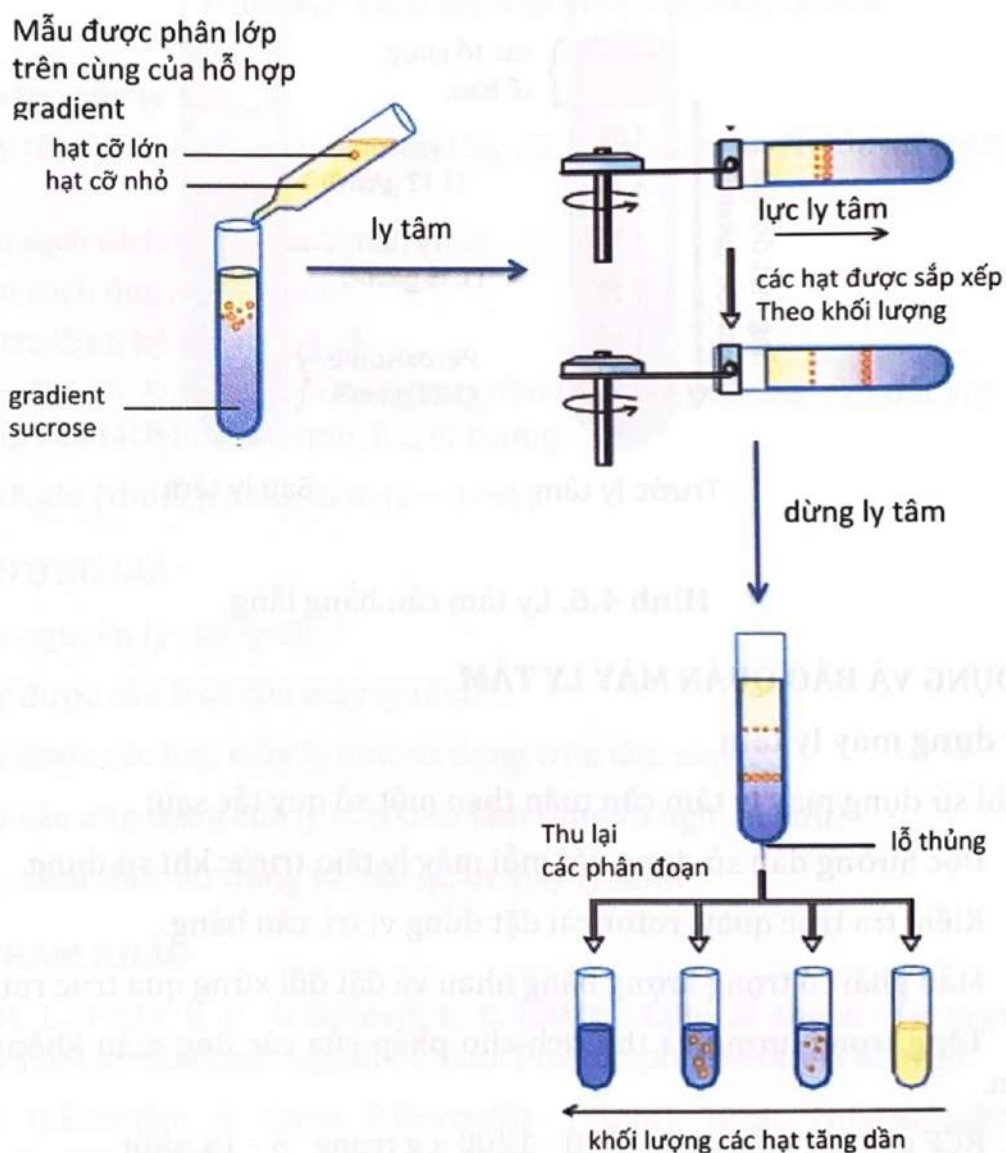
- Loại bỏ thành phần tế bào khỏi máu toàn phần để lấy huyết tương hoặc huyết thanh phân tích (làm xét nghiệm sinh hóa, miễn dịch...).
- Cô đặc thành phần tế bào hay các thành phần khác của dịch sinh vật để soi kính hay phân tích hóa học (nước tiểu, dịch ổ bụng...).
- Loại bỏ tủa protein (bị kết tủa hóa học) của mẫu phân tích.
- Phân tách các chất gắn protein hay kháng thể khỏi các chất gắn tự do trong các xét nghiệm miễn dịch.
- Tách các chất tan trong dịch sinh vật từ môi trường nước sang dung môi hữu cơ.
- Tách các thành phần lipid ra khỏi các thành phần khác của huyết tương hay huyết thanh, ví dụ: tách chylomycron làm trong huyết thanh.

3.2. Ứng dụng trong nghiên cứu

Phương pháp ly tâm là một phương pháp đáng tin cậy trong nghiên cứu giúp phân tách các tiểu phần nhỏ như các bào quan, enzym, protein... Tuy nhiên với cách ly tâm thông thường sự phân tách chỉ dựa vào lực ly tâm tác động vào những tiểu phần có trọng lượng, tỷ trọng khác nhau không thể ứng dụng được với mục đích này. Các phần tử khi ly tâm khó có thể lắng xuống êm dịu trong một môi trường đồng nhất do sự di chuyển của các phần tử qua một dung dịch đồng nhất bị làm xáo trộn bởi sự rung cơ học, gradient và sự đối lưu. Những xáo trộn này có thể bị loại trừ hoặc được làm giảm bớt nhờ tạo một gradient dung dịch một chất khuếch tán nhanh chóng trong ống ly tâm. Nhiều chất khuếch tán có thể được sử dụng như: sucrose, glycerol, cesium chloride, cesium sunfat, ficoll, metrizamid. Gradient này có thể được tạo thành một cách cơ học khi sử dụng một thiết bị tạo gradient hoặc bởi sự ly tâm. Dung dịch đặc nhất hay tỷ trọng lớn nhất ở đáy ống ly tâm và tỷ trọng giảm ở miệng ống. Tính chất đặc trưng của mỗi kiểu gradient tùy thuộc vào mục đích phân tách. Có hai kỹ thuật ly tâm được sử dụng: ly tâm vùng và ly tâm cân bằng lắng.



Hình 4.4. Gradient tỷ trọng



Hình 4.5. Sự ly tâm vùng

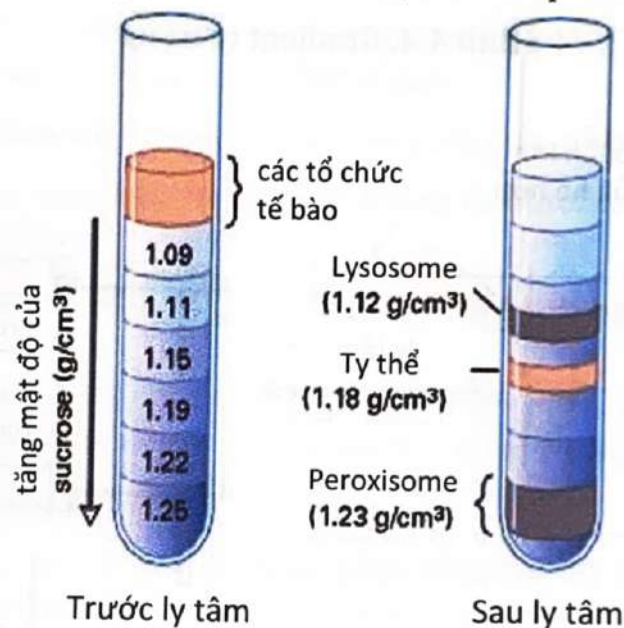
3.2.1. Ly tâm vùng

Phương pháp này sử dụng tốt cho các phân tử khác nhau về kích thước nhưng giống nhau về tỷ trọng. Ví dụ: hai protein có tỷ trọng gần giống nhau nhưng khác nhau về trọng lượng phân tử có thể được tách ra dễ dàng ở gradient như thế.

Phương pháp này không áp dụng được để phân tách các bào quan như ty thể, lysosom, các peroxisom do chúng có tỷ trọng khác nhau nhưng kích thước tương tự nhau.

3.2.2. Ly tâm cân bằng lắng

Phương pháp này được sử dụng để tách các phần tử tương tự về kích thước nhưng khác nhau về tỷ trọng: tách acid nucleic, các bào quan dưới tế bào.



Hình 4.6. Ly tâm cân bằng lắng

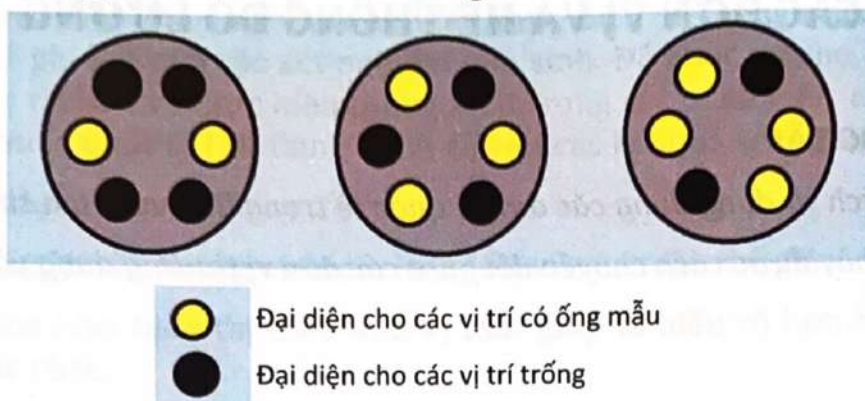
4. SỬ DỤNG VÀ BẢO QUẢN MÁY LY TÂM

4.1. Sử dụng máy ly tâm

Khi sử dụng máy ly tâm cần tuân theo một số quy tắc sau:

- Đọc hướng dẫn sử dụng với mỗi máy ly tâm trước khi sử dụng.
- Kiểm tra trực quay, rotor cài đặt đúng vị trí, cân bằng.
- Mẫu phải có trọng lượng bằng nhau và đặt đối xứng qua trục rotor.
- Tổng trọng lượng và thể tích cho phép của các ống mẫu không vượt quá giới hạn.
- RCF cho các mẫu máu 1000 - 1200 x g trong 5 - 15 phút.
- Chỉ mở nắp máy ly tâm khi máy đã dừng hẳn tránh phát tán các hạt khí dung gây bệnh.

- Các ống nghiệm được dùng theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Thường dùng tube polypropylen chịu RCF = 5000 x g.



Hình 4.7. Cách sắp xếp mẫu trên máy ly tâm

4.2. Bảo quản máy ly tâm

Máy ly tâm phải luôn sạch sẽ tránh lây nhiễm theo nguyên tắc an toàn phòng thí nghiệm.

- Lau sạch dịch tràn mẫu bệnh phẩm.
- Dọn sạch ống nghiệm vỡ.

Kiểm tra định kỳ các thông số:

- *Tốc độ máy ly tâm*: ít nhất 3 tháng/lần ($p < 5\%$), không cần đối với máy ly tâm chỉ dùng cho tách huyết thanh, huyết tương.
- *Định giờ (timer)*: hàng tuần ($p < 10\%$).

CÂU HỎI LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên lý của ly tâm?
2. Trình bày được cấu trúc của máy ly tâm?
3. Phân biệt được các loại máy ly tâm sử dụng trên lâm sàng?
4. Trình bày các ứng dụng của ly tâm trên lâm sàng và nghiên cứu?
5. Trình bày cách thức sử dụng và bảo quản máy ly tâm?

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bishop, M. L., Fody, E. P., & Schoeff, L. E. (2018). Clinical chemistry: principles, techniques, and correlations. Eighth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer.
2. Barbara H.Estridge & Anna P.Reynolds. (2008). Basic clinical laboratory techniques, pp 365 – 378
3. Bộ môn Hóa sinh, Trường Đại học Y Hà Nội (2003). Thực tập Hóa sinh. Nhà xuất bản Y học