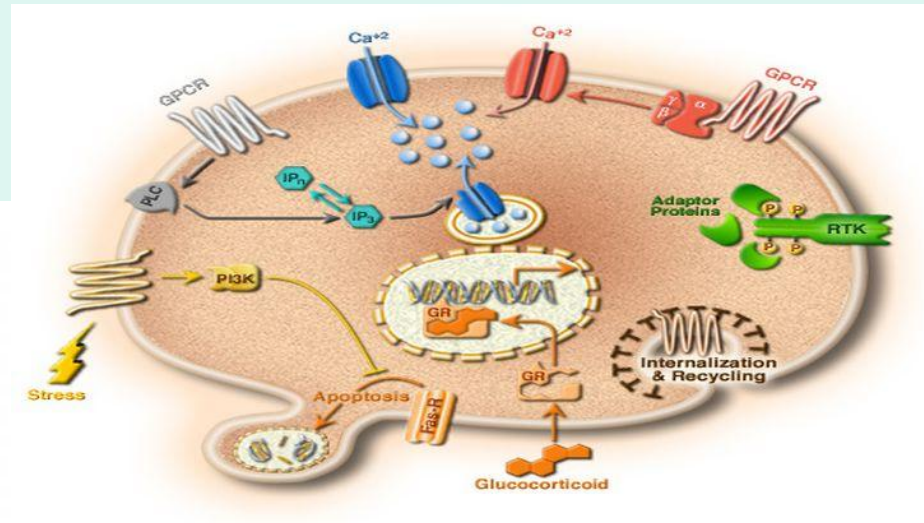


Центрифугирование В ЦИТОЛОГИИ



Котюкова Е. М.
Голубкова А. В.
Группа Б41-1

Метод дифференциального центрифугирования

Метод дифференциального центрифугирования используется для фракционирования клеток, т. е. расслоения их содержимого на фракции в зависимости от удельного веса различных органоидов и клеточных включений.

В результате центрифугирования компоненты клеток выпадают в осадок из раствора, располагаясь в соответствии со своей плотностью. Более плотные структуры осаждаются при более низких скоростях центрифугирования, а менее плотные – при высоких скоростях.

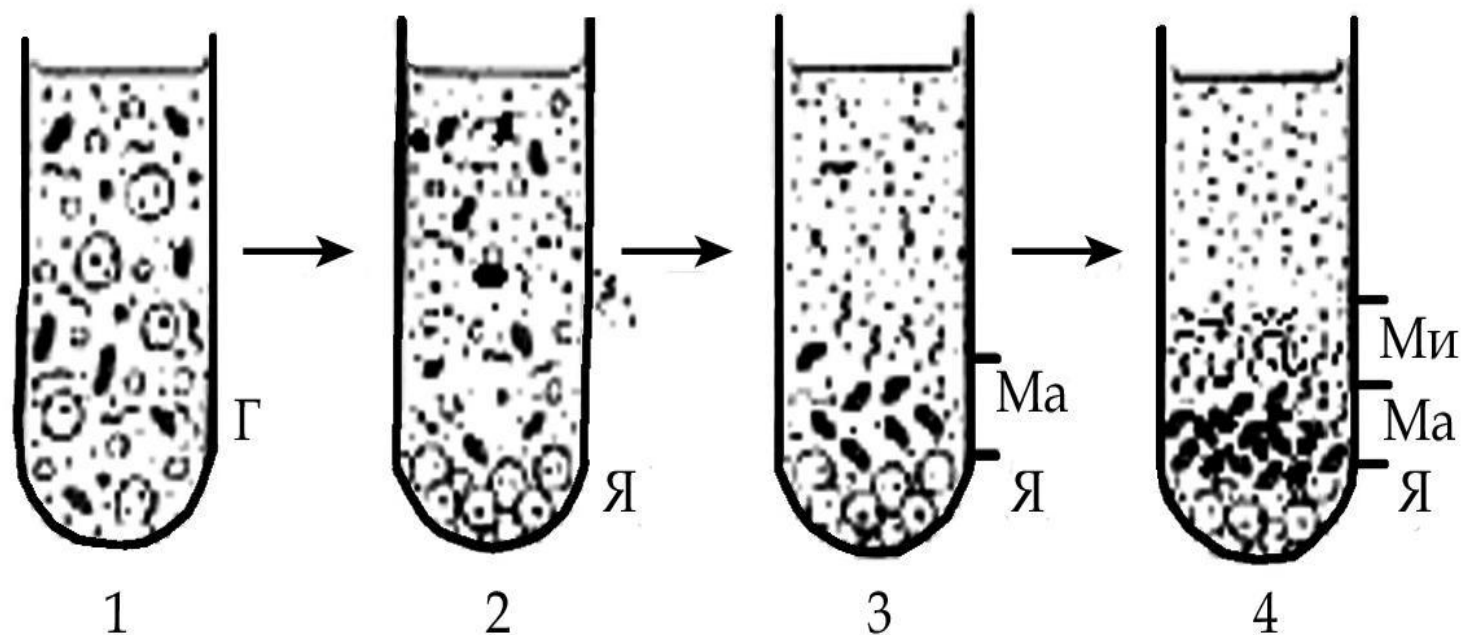


Рис. 5. Схема дифференциального центрифугирования: Г — гомогенат; Я — ядерная фракция; Ма — макросомальная фракция (митохондрии, лизосомы); Ми — микросомальная фракция (фрагменты мембран, микропузырьки, рибосомы)

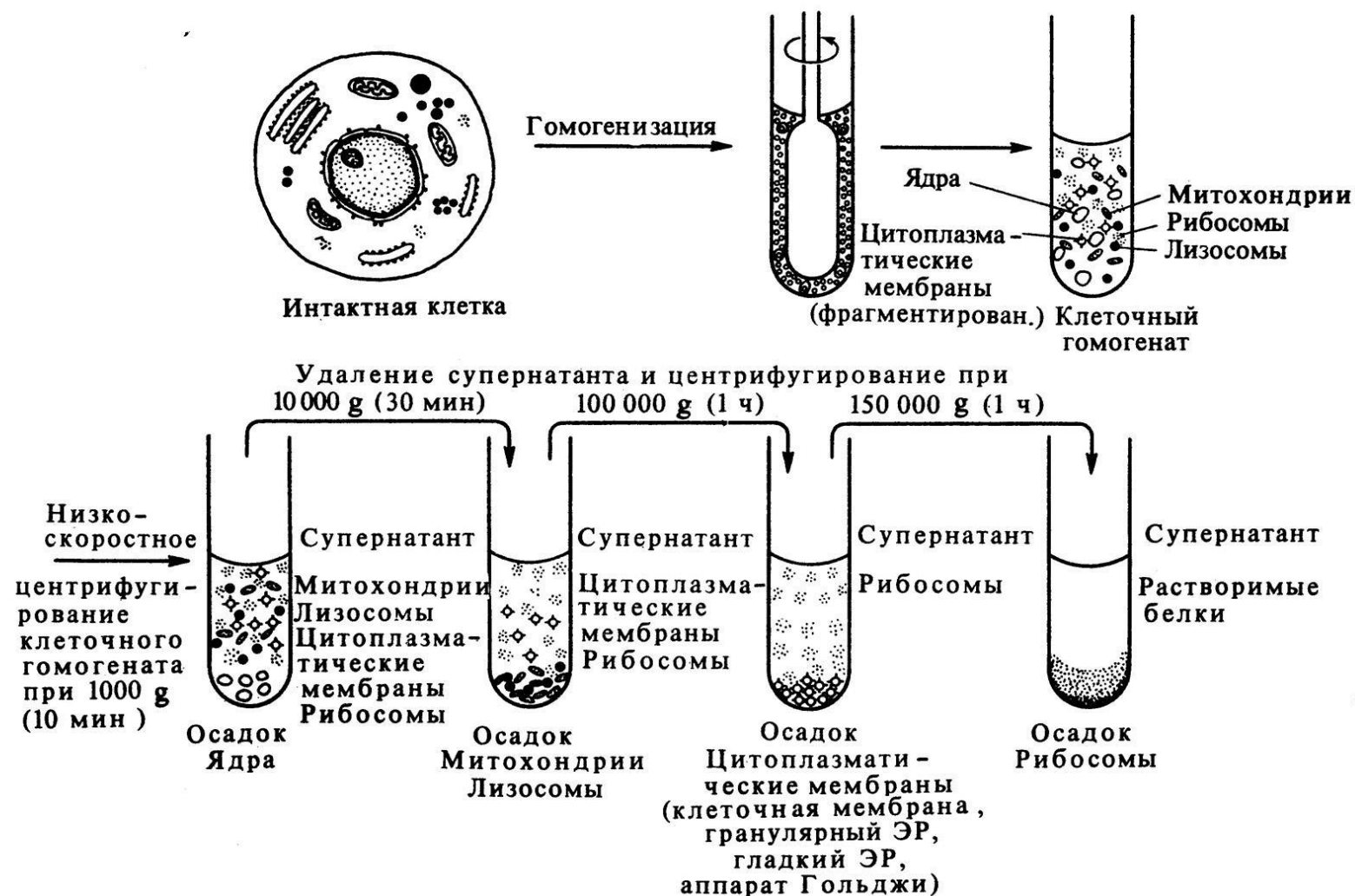


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая последовательные этапы фракционирования клетки.

Этапы дифференциального центрифугирования:

1. Метод, с помощью которого органеллы выделяют из клеток, называют фракционированием. Этот метод оказался очень плодотворным, дав биохимикам возможность выделять разные органеллы клетки в относительно чистом виде. Он позволяет, кроме того, определять химический состав органелл и содержащиеся в них ферменты и на основании получаемых данных делать выводы об их функциях в клетке. В качестве первого шага клетки разрушают путем гомогенизации в какой-нибудь подходящей среде, которая обеспечивает сохранность органелл и предотвращает их агрегацию.
2. На следующем этапе клеточный гомогенат подвергают ряду центрифугирований, скорость и продолжительность которых всякий раз возрастает; этот процесс называется **дифференциальным центрифугированием**. Разные органеллы клетки осаждаются на дне центрифужных пробирок при различных скоростях центрифугирования, что зависит от размеров, плотности и формы органелл.

Этапы дифференциального центрифугирования:

3. Образующийся осадок можно отобрать и исследовать. Быстрее всех осаждаются такие крупные и плотные структуры, как ядра, а для осаждения более мелких и менее плотных структур, таких, как пузырьки эндоплазматического ретикулума, требуются более высокие скорости и более длительное время. Поэтому при низких скоростях центрифугирования ядра осаждаются, а другие клеточные органеллы остаются в суспензии.

Этапы дифференциального центрифугирования:

4. При центрифугировании раньше всего и при небольших (1-3 тыс. g) ускорениях оседают ядра и неразрушенные клетки, при 15-30 тыс. g оседают крупные частицы, макросомы, состоящие из митохондрий, мелких пластид, пероксисом, лизосом и др., при 50 тыс. g оседают микросомы, фрагменты вакуолярной системы клетки.

Осадки можно исследовать с помощью электронного микроскопа, чтобы определить чистоту полученных фракций. Все фракции до некоторой степени загрязнены другими органеллами. Если тем не менее удастся добиться достаточной чистоты фракций, то их подвергают затем биохимическому анализу, чтобы определить химический состав и ферментативную активность выделенных органелл.

Центрифугирование в градиенте плотности

Сравнительно недавно был создан другой метод **фракционирования клеток – центрифугирование в градиенте плотности**; при этом центрифугирование производят в пробирке, в которой предварительно наслаивают друг на друга растворы сахарозы все возрастающей концентрации, а следовательно, и возрастающей плотности. При центрифугировании содержащиеся в гомогенате органеллы располагаются в центрифужной пробирке на тех уровнях, на которых находятся растворы сахарозы, соответствующие им по плотности.