

# 细胞核与线粒体的分级分离



# 一、实验目的

1. 初步了解细胞内各种成分的分离方法
2. 掌握差速离心方法细胞核和线粒体的

分离方法

3. 对分离得到的细胞核及线粒体进行活性鉴定。

## 二、实验原理

### ■ 细胞器分离基本步骤

细胞破碎

分离、纯化

细胞器鉴定



## 二、实验原理



### (一) 细胞破碎的方法

- 1. 杆状玻璃匀浆器法
- 2. 高速组织捣碎机法
- 3. 超声波处理法
- 4. 化学裂介法
- 5. 反复冻融法



## 细胞破碎的注意事项：

- 1、**匀浆介质**：常用介质是缓冲的**蔗糖水溶液**（**0.25mol/L**）。它比较近细胞质的分散相，具有足够渗透压，防止颗粒膨胀破裂，对酶活性干扰小，在pH7.2-7.4的条件下细胞器不易发生聚集。
- 2、尽可能在**低温**条件下进行，避免酶失活。
- 3、若是采用**低渗方式**破碎细胞，匀浆物在低渗溶液中的时间要越短越好，通常从开始收获细胞到匀浆结束不要超过5分钟。否则匀浆物在低渗溶液中时间太长，导致细胞器破裂，溶酶体酶泄漏，各种物质降解。



## 二、实验原理



### (二) 分离纯化的方法

根据细胞器的大小、形状、密度等物理特性差异，**离心**成为亚细胞组分分离过程中最广泛应用的技术

**离心**是利用旋转运动的离心力以及物质的沉降系数或浮力密度的差异进行分离、浓缩和提纯的一种方法

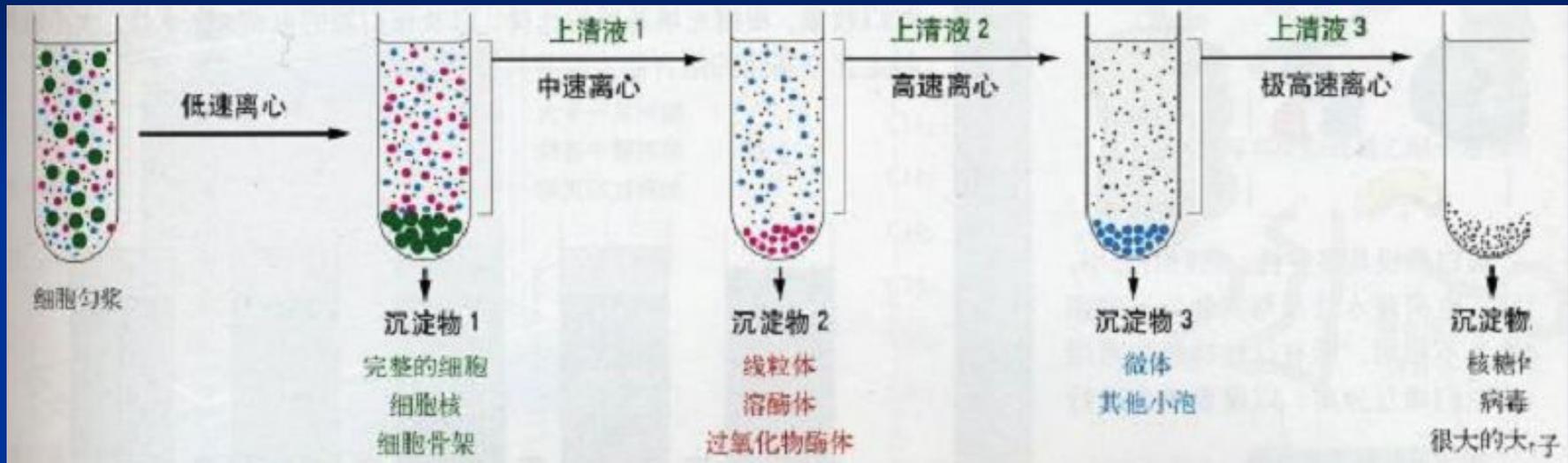
主要包括**差速离心**、**密度梯度离心**等方法。

# 差速离心法



- 根据颗粒大小和密度的不同存在的沉降速度差别，分级增加离心力，从试样中依次分离出不同组分的方法。从低速到高速逐级沉淀分离，一般用于分离沉降系数相差较大（10倍及以上）的颗粒。
- 优点是：操作简单，离心后用倾倒法即可将上清液与沉淀分开，并可使用容量较大的角式转子。
- 缺点是：①分离效果差，不能一次得到纯颗粒；须经反复悬浮和离心加以纯化。②壁效应严重，特别是当颗粒很大或浓度很高时，在离心管一侧会出现沉淀；③颗粒被挤压，离心力过大、离心时间过长会使颗粒变形、聚集而失活。





# 密度梯度离心

吉  
祥  
禮

- 下次课讲



### (三) 细胞器的鉴定分析

- 分析分级分离得到的组分，可用**细胞化学和生化方法**进行形态和功能鉴定。
- **细胞器标记酶**的测定是评价细胞器内膜组分和分离纯度的主要依据，如**线粒体内膜上分布有细胞色素氧化酶**，该酶使**詹纳斯绿B**染料保持在氧化状态呈现蓝绿色，从而使线粒体显色，而胞质中的染料被还原成无色。（也可使用罗丹明123或MitoTracker等荧光探针标记法等）
- **细胞核：DNA**——亚甲基蓝、甲苯胺蓝、Hoechst染料等

# 方法和步骤

吉祥

## (一) 细胞核的分离提取

1、**肝脏**，**剪成小块**(去除结缔组织)尽快置于盛有**0.9% NaCl**的烧杯中，反复**洗涤**，尽量除去血污，用滤纸吸去表面的液体。

2、称取肝组织**1 g**，剪碎；用预冷的**0.25mol / l蔗糖—0.003mol / l氯化钙溶液**洗涤数次。

吉祥  
吉祥  
吉祥  
吉祥  
吉祥

3、按每克肝加8ml-9ml预冷的0.25mol / L蔗糖—0.003mol / l氯化钙溶液，用**高速组织匀浆器**匀浆

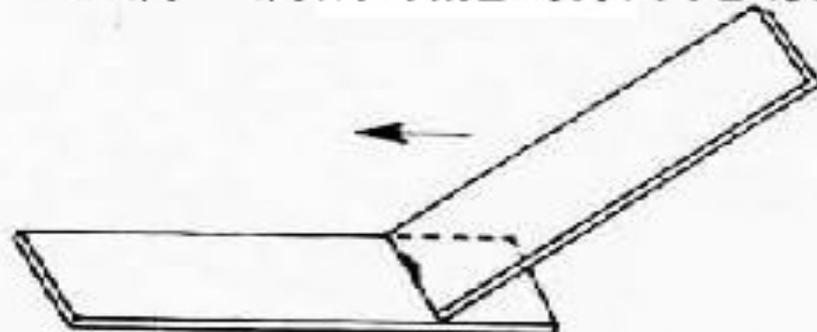
4、取一定量匀浆液，在0℃—4℃冰浴中用**玻璃匀浆器**将肝再次匀浆（匀浆器下端浸入盛有**冰块**的器皿中，左手持之，右手将匀浆捣杆垂直插入管中，上下转动研磨）

5、肝匀浆用2-3层纱布过滤（已完成）

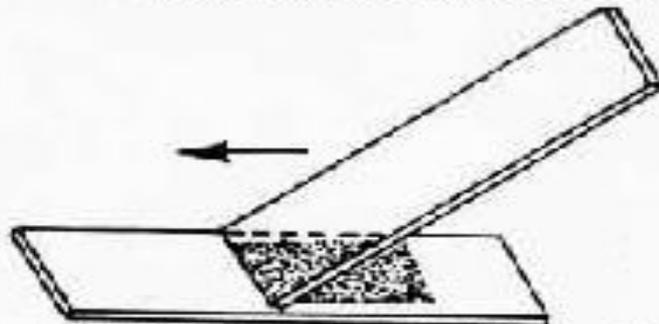
6、取肝细胞匀浆液，制一张**涂片**①，自然干燥。



(1) 滴一滴肝细胞匀浆或悬液



(2) 用推片之端缘接触匀浆



(3) 推片与载片成30-45度角向载片之另一端推进



(4) 制成薄膜



7、滤液以2500rpm，离心15分钟；

- (1) 缓缓取**上清液**，移入另一支高速离心管中，保存于有冰块的烧杯中，待分离线粒体用；
- (2) 同时涂一张**上清液片**②做好标记，自然干燥；
- (3) 余下的**沉淀物**进行下一步骤。

- 8、0.25mol / l蔗糖—0.003mol / l氯化钙溶液重新悬浮沉淀物，以2500rpm离心15分钟弃上清，将残留液体用吸管吹打成悬液，滴一滴于干净的载玻片上，涂片③，自然干燥。

- 9、将①、②、③涂片用1%甲苯胺兰（或亚甲基蓝）染色后盖片即可观察。

## (二) 高速离心分离提取线粒体

- 1、将装有上清液的高速离心管，从装有冰块的烧杯中取出，配平后，以**17000g**离心4 °C**20分钟**弃上清，留取沉淀物。
- 2、加入蔗糖-氯化钙溶液 1ml，用吸管吹打成悬液，以**17000g** 4 °C**离心20分钟**，将上清吸入另一试管中，留取沉淀物，加入**0.1ml**蔗糖-氯化钙溶液混匀成悬液(可用牙签)。

- 3、取上清液和沉淀物悬液，分别滴一滴于干净载玻片上(分别**标记④**、**⑤**涂片)，各滴一滴**1%詹纳斯绿b染液染20分钟**，盖片观察。

- 4、油镜观察。



# 油镜的观察具体操作:

(1)先使用低倍镜: 看清物象, 粗细准焦螺旋

(2)再高倍镜观察: 看清物像, 细准焦螺旋

(3)油镜观察





### ■ (3) 油镜观察

- A. 在高倍镜找到清楚物象后，将高倍镜转出必要时可下降载物台
- B. 在镜检部位滴上一滴香柏油。
- C. 从侧面注视，将油镜转入光路，用粗准焦螺旋将载物台缓缓地上升，使油浸物镜浸入香柏油中，使**镜头几乎与标本接触**。
- D. 从目镜内观察，放大孔径光栏，使光线充分照明，用**细调节旋钮**调节至物象清晰（注意方向不能反向调节）。



- E.观察完毕，下降载物台，将油镜头转出，先用擦镜纸擦去镜头上的油，再用擦镜纸蘸二甲苯或少许乙醚酒精混合液，擦去镜头上残留油迹，最后再用擦镜纸擦拭2~3下即可。（注意盖玻片上也要擦拭）。

- 使用后显微镜检查了才能走

# 注意事项



- 1、各步骤加入的溶液的量需根据离心管的大小自行调整。
- 2、线粒体的染色必须先染色20分钟后盖盖片，以便充分氧化。
- 3、油镜使用时千万要小心细致。
- 4、两人一组，使用两台显微镜，油镜只能使用一台，检查后才能离开



# 实验报告

吉祥如意

- 方法：按照**实际的操作**记录
- 结果：描述**5张**涂片镜下情况，
- 注意：要记录细胞器的形态、颜色、数量、分离效果如何。各涂片间要有比较。



# 实验报告



## ■ 讨论：

1、①——⑤的预期结果是什么？你们组的实验结果与预期是否符合？分析原因。

2、本实验中细胞核的分离步骤与实验指导上  
有何区别，该改动有何意义？

3、如需分离效果更好，还可以改进哪些步骤？