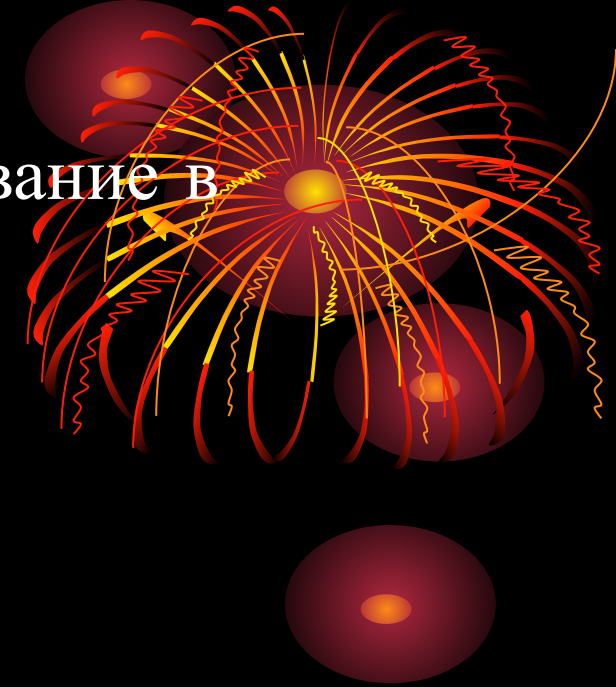
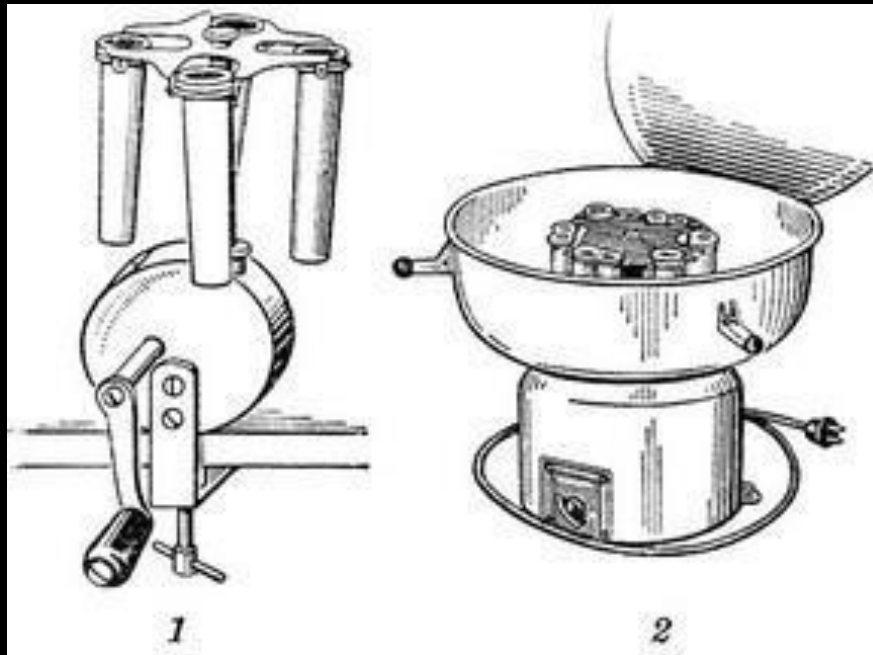


Центрифугирование. Его использование в разных направлениях биологии.



- **Выполнил:**
- **Левиков, Д.А.**

Центрифугирование

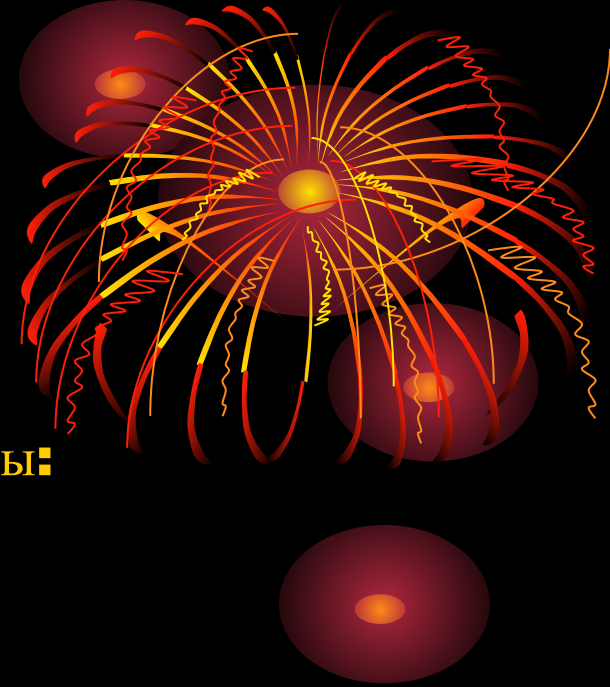


- Это разделение механических смесей на составные части действием центробежной силы. Приборы, применяемые для этой цели, называют центрифугами.
- Основной частью центрифуги является ротор с монтированными в нем гнездами для центрифужных пробирок. Ротор вращается с большой скоростью, вследствие чего создаются значительные по величине центробежные силы, под действием которых происходит разделение механических смесей, например осаждение взвешенных в жидкости частиц.



Процессы, происходящие в центрифуге

- В центрифугах разделяют следующие процессы:
- **1) Центробежное фильтрование.**
- **2) Центробежное отстаивание.**
- **3) Центробежное осветление.**



Центробежное фильтрование



- Центробежное фильтрование представляет собой процесс разделения суспензий в центрифугах с дырчатыми барабанами. Внутренняя поверхность такого барабана покрыта фильтровальной тканью. Суспензия центробежной силой отбрасывается к стенкам барабана, при этом твёрдая фаза остаётся на поверхности ткани, а жидкость под действием центробежной силы проходит сквозь слой осадка и ткань удаляется наружу через отверстия в барабане.
- Центробежное фильтрование обычно складывается из трёх последовательных физических процессов:
- **1) фильтрование с образованием осадка;**
- **2) уплотнение осадка;**
- **3) удаление из осадка жидкости, удерживаемой молекулярными силами;**

Центробежное отстаивание



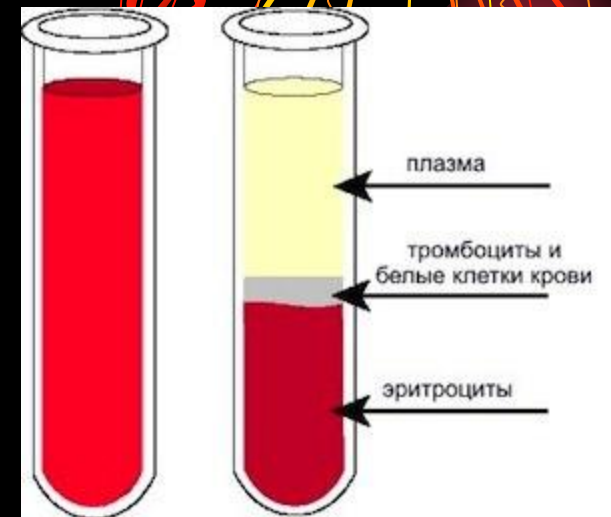
- Центробежное отстаивание - процесс разделения суспензий в центрифугах, имеющих барабаны со сплошными стенками. Суспензия вводится в нижнюю часть барабана и под действием центробежной силы отбрасывается к стенкам. У стенок образуется слой осадка, а жидкость образует внутренний слой и вытесняется из барабана поступающей на разделение суспензией. Жидкость при этом поднимается кверху, переливается через закраину барабана и удаляется наружу.
- При этом происходит два физических процесса:
- **1)**Осаждение твёрдой фазы.
- **2)**Уплотнение осадка.

Центробежное осветление



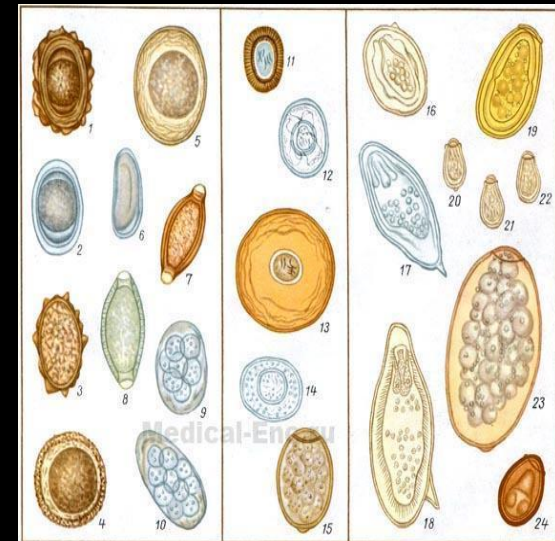
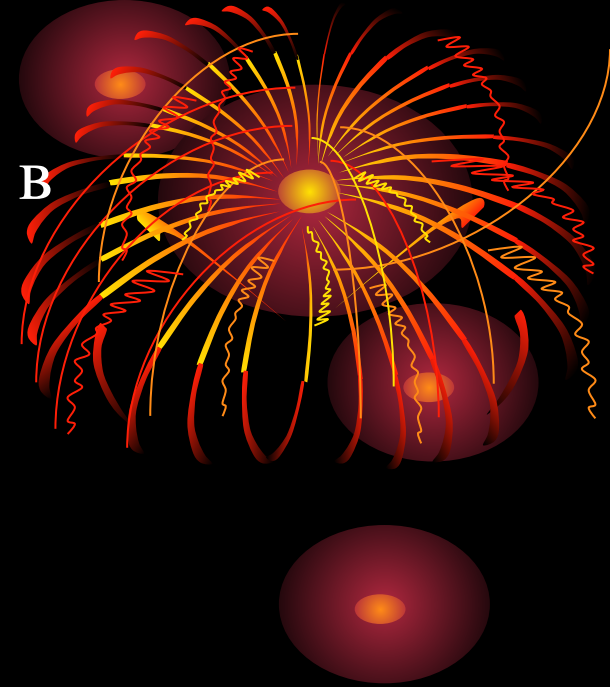
- Центробежное осветление - процесс разделения тонких суспензий и коллоидных растворов. Так же проводится в сплошных барабанах.
- По физической сущности центробежное осветление представляет собой процесс свободного осаждения твёрдых частиц в поле центробежных сил.
- В барабанах со сплошными стенками производится так же разделение эмульсий. Под действием центробежной силы компоненты эмульсии в соответствии с плотностью располагаются в виде разграниченных слоев: наружного слоя жидкости с большей плотностью и внутреннего слоя более лёгкой жидкости. Жидкости выводятся из барабана порознь.

- В клинических и санитарно-гигиенических лабораториях центрифугирование используют для отделения эритроцитов от плазмы крови, сгустков крови от сыворотки, плотных частиц от жидкой части мочи и т. д. Для этой цели применяют или ручные центрифуги, или центрифуги с электроприводом, скорость вращения которых можно регулировать. Ультрацентрифуги, скорость вращения роторов которых превышает **40 000 об/мин**, применяют обычно в экспериментальной практике для разделения органелл клеток, отделения коллоидных частиц, макромолекул, полимеров.



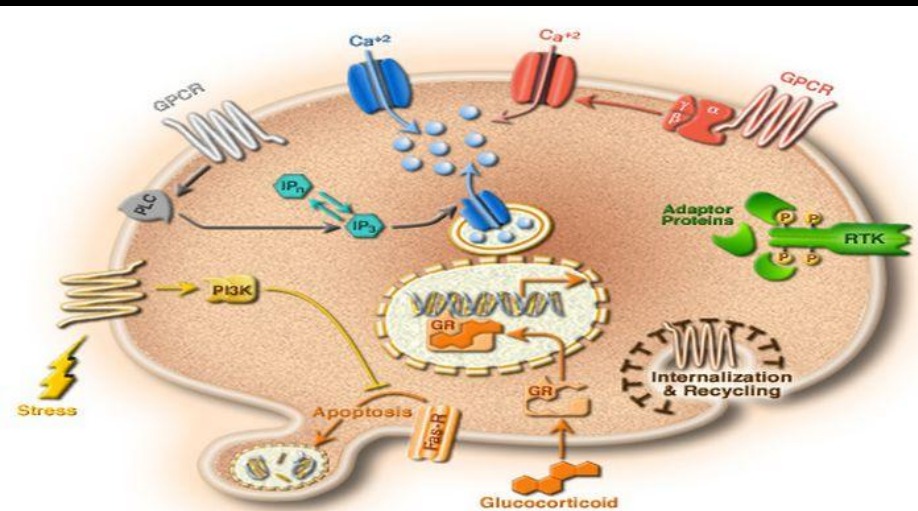
Использование центрифугирования в паразитологии

- Метод используется для дифференцировки сложной кровяной смеси, мочи или кала, с последующим выделением из нее гельминтов для дальнейшего изучения под микроскопом и фиксации материала. В процессе центрифугирования имеющиеся в пробе паразиты проходят через фильтр и скапливаются в нижнем коническом отсеке пробирки. Сетка фильтра со специально подобранными по размеру ячейками в пробирке расположена вертикально, в результате чего происходит горизонтальная (латеральная) фильтрация пробы. В результате чего, грубые частицы непереваренной пищи, клетчатка оседают в смесительной камере, а паразиты и их яйца беспрепятственно проходят через фильтр. Таким образом, паразиты концентрируются в поверхностном слое мелкодисперсного осадка, и врачу-лаборанту остается только аккуратно отобрать образец для микроскопирования с помощью автоматической пипетки и нанести его на предметное стекло.

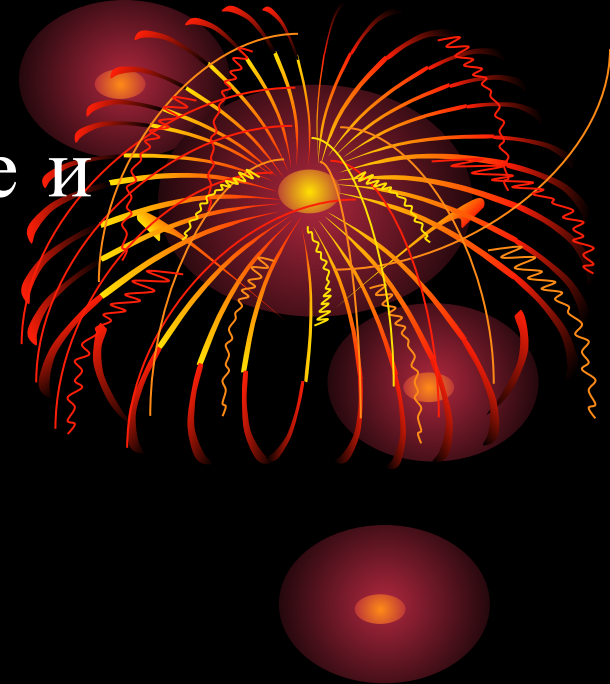


Метод центрифугирования в цитологии

- *Метод дифференциального центрифугирования* используется для фракционирования клеток, т. е. расслоения их содержимого на фракции в зависимости от удельного веса различных органоидов и клеточных включений. Для этого тонко измельченные клетки вращают в специальном аппарате – ультрацентрифуге. 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. Полученные слои разделяют и изучают отдельно.



Центрифугирование в ботанике и физиологии растений



- Центрифугирование позволяет получить различные фракции субклеточных частиц и исследовать свойства и функции каждой фракции в отдельности. Например, из листьев шпината можно выделить хлоропласты, отмыть их с помощью повторного центрифугирования в соответствующей среде от клеточных фрагментов и исследовать их поведение в различных экспериментальных условиях или же определить их химический состав.
- Далее можно, применяя различные модификации методики, разрушить эти пластиды и выделить посредством дифференциального центрифугирования (повторного осаждения частиц при различных величинах ускорения) составляющие их элементы. Таким путем удалось показать, что пластиды содержат структуры, отличающиеся очень упорядоченным строением, — так называемые граны; все граны находятся внутри ограничивающей хлоропласт мембраны (оболочка хлоропласта). Достоинства этого метода просто неопределимы, поскольку он позволяет выявить существование функциональных субъединиц, входящих в состав более крупных субклеточных частиц; в частности, используя метод дифференциального центрифугирования, удалось показать, что граны являются основным структурным элементом хлоропласта.

Метод центрифугирования в вирусологии



- Метод центрифугирования в градиенте плотности Брак-ке можно использовать как для выделения, так и для получения количественных характеристик вирусов растений. Как оказалось, этот метод таит в себе многие возможности и в настоящее время широко используется в области вирусологии и молекулярной биологии. При проведении исследований методом центрифугирования в градиенте плотности центрифужную пробирку частично наполняют раствором, плотность которого уменьшается в направлении от дна к мениску. Для создания градиента при фракционировании вирусов растений наиболее часто используют сахарозу. Перед началом центрифугирования частицы вируса могут быть либо распределены во всем объеме раствора, либо нанесены на вершину градиента. Бракке предложил три различных приема центрифугирования в градиенте плотности. При изопикническом (равновесном) центрифугировании процесс продолжается до тех пор, пока все частицы в градиенте не достигнут уровня, где плотность среды равна их собственной плотности. Таким образом, фракционирование частиц происходит в этом случае в соответствии с различиями в их плотности. Растворы сахарозы не обладают достаточной плотностью для изопикнического разделения многих вирусов. При скоростном зональном центрифугировании вирус сначала наносят на предварительно созданный градиент. Частицы каждого типа седиментируют при этом через градиент в виде зоны, или полосы, со скоростью, зависящей от их размера, формы и плотности. Центрифугирование при этом заканчивают, когда частицы еще продолжают седиментировать. Равновесное зональное центрифугирование сходно со скоростным зональным центрифугированием, но в этом случае центрифугирование продолжается до достижения изопикнического состояния. Роль градиента плотности при скоростном центрифугировании заключается в том, чтобы препятствовать конвекции и фиксировать различные виды молекул в определенных зонах. Теория центрифугирования в градиенте плотности сложна и не совсем понятна. На практике же это простой и изящный метод, который широко применяется при работе с вирусами растений.

Трудности в использовании метода центрифугирования



- **Применение** метода дифференциального центрифугирования сопряжено со многими методическими трудностями. Во первых, при выделении частиц можно повредить их структуру. Поэтому потребовалось разработать специальные методы разрушения клеток, которые бы не вызывали повреждения структуры субклеточных фракций. Во вторых, поскольку субклеточные частицы обладают мембранами, в процессе их выделения могут возникать разнообразные осмотические эффекты. Следовательно, для того чтобы ультраструктура исследуемых объектов не была разрушена еще при их выделении, необходимо тщательно подбирать состав среды, в которой производится разрушение клеток и осаждение частиц. И наконец, отмывание субклеточных частиц (ресуспендирование их в среде и последующее повторное центрифугирование) может приводить к потере некоторых содержащихся в них веществ, которые под действием сил диффузии переходят в раствор.
- В связи с этим иногда бывает трудно понять, какие из малых молекул действительно являются элементами исследуемых структур, а какие просто были адсорбированы их поверхностью в процессе выделения. Такое положение затрудняет точное определение некоторых функциональных свойств выделенных объектов.