

第三章

细胞生物学实验技术



METHODS AND TECHNIQUES

第三节 细胞分离技术

一、离心技术

- 是分离细胞器（如细胞核、线粒体、高尔基体）及各种大分子基本手段。
- 转速为**10~25kr/min**的离心机称为高速离心机。
- 转速**>25kr/min**，离心力**>89K g**者称为超速离心机。
- 目前超速离心机的最高转速可达**100000r/min**，离心力超过**500Kg**。

（一）差速离心 Differential centrifugation

➤ 特点：

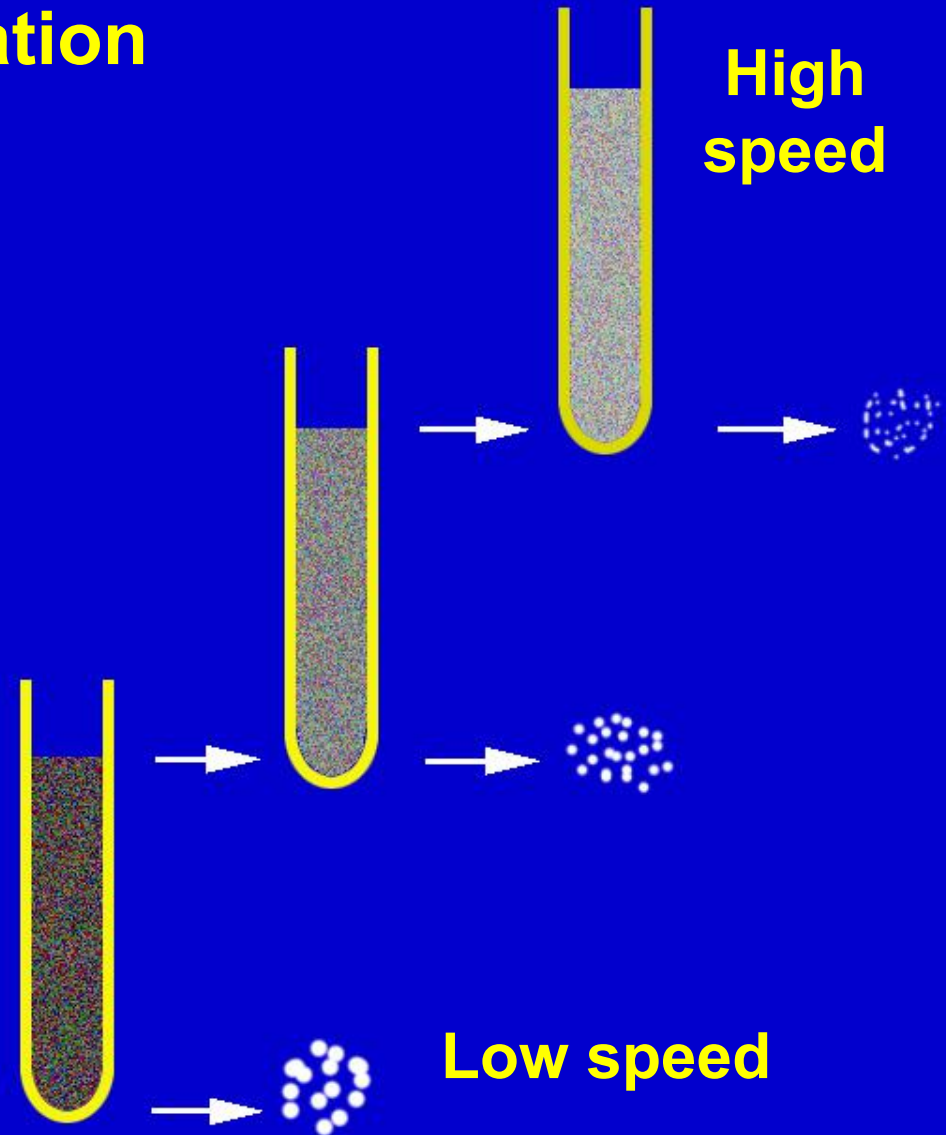
- 介质密度均一；
- 速度由低向高，逐级离心。

➤ 用途：分离大小相差悬殊的细胞和细胞器。

➤ 沉降顺序：核——线粒体——溶酶体与过氧化物酶体——内质网与高基体——核蛋白体。

➤ 可将细胞器初步分离，常需进一步通过密度梯离心再行分离纯化。

Differential centrifugation



（二）密度梯度离心

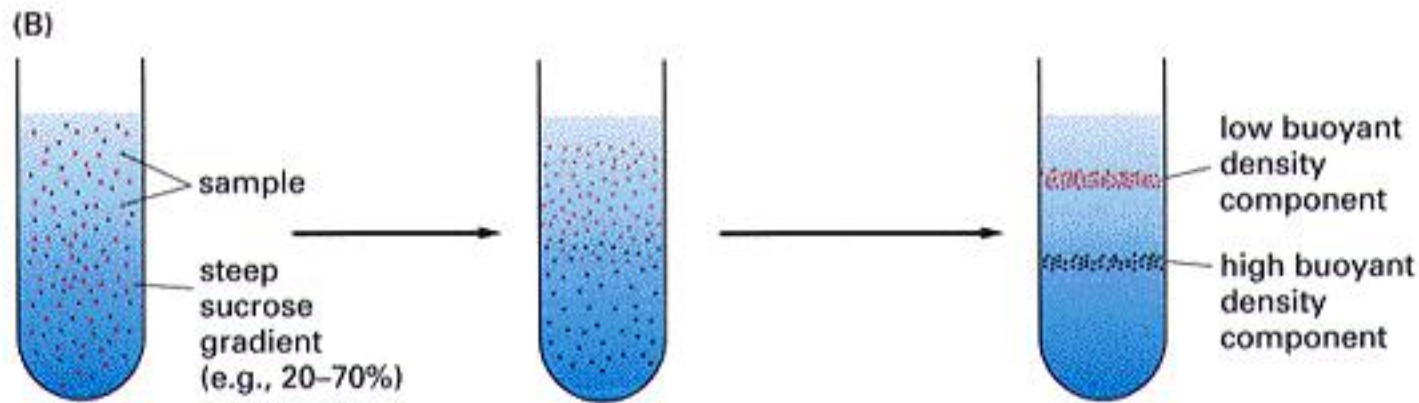
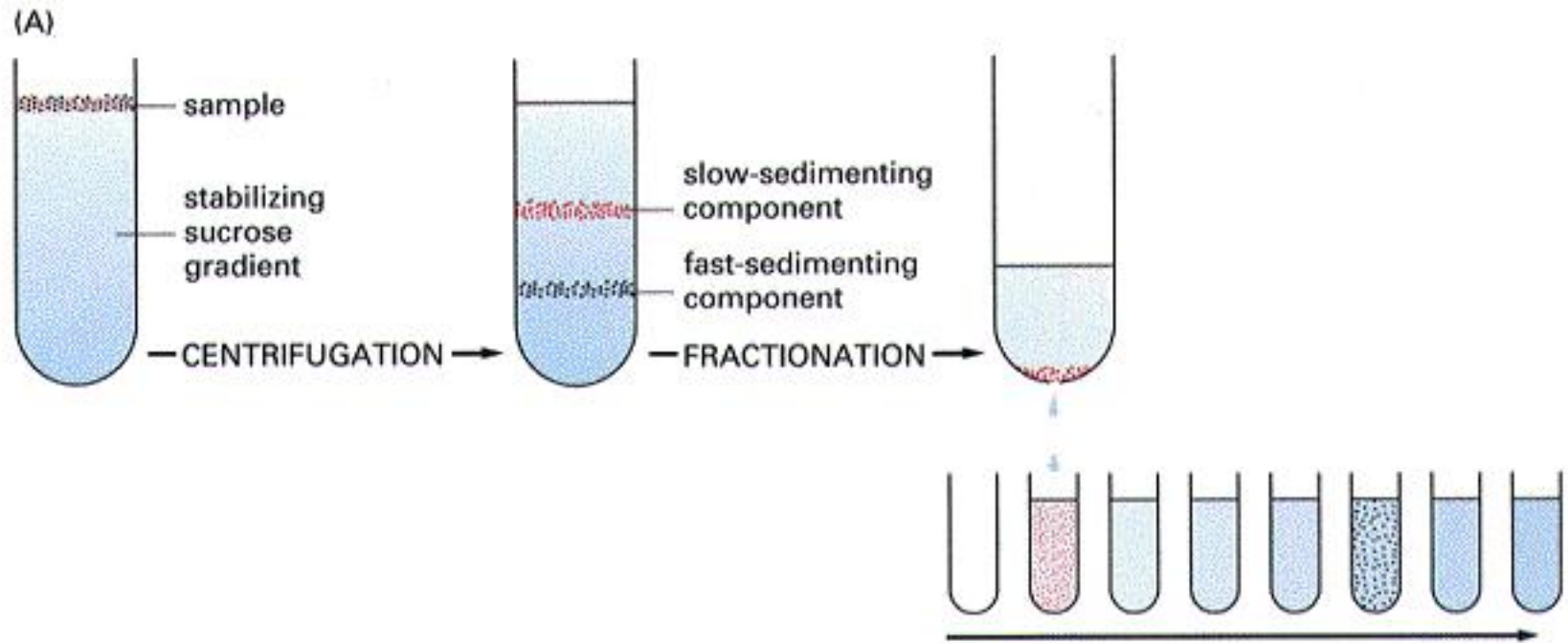
- 用介质在离心管内形成一连续或不连续的密度梯度，将细胞混悬液或匀浆置于介质的顶部，通过离心力场的作用使细胞分层、分离。
- 类型：速度沉降、等密度沉降。
- 常用介质：氯化铯、蔗糖、多聚蔗糖。
- 分离活细胞的介质要求：
 - 1) 能产生密度梯度，且密度高时，粘度不高；
 - 2) PH中性或易调为中性；
 - 3) 浓度大时渗透压不大；
 - 4) 对细胞无毒。

1、速度沉降 **velocity sedimentation**

- 用途：分离密度相近而大小不等的细胞或细胞器。
- 特点：介质密度较低，介质的最大密度应小于被分离生物颗粒的最小密度。
- 原理：介质密度梯度平缓，分离物按各自的沉降系数以不同的速度沉降而达到分离。

2.等密度沉降 **isopycnic sedimentation**

- 用途：分离密度不等的颗粒。
- 特点：
 - 介质密度较高，陡度大，介质的最高密度应大于被分离组分的最大密度。
 - 所需的力场通常比速率沉降法大10~100倍，往往需要高速或超速离心。
- 原理：样品各成分在连续梯度的介质中经过一定时间的离心则沉降到与自身密度相等的介质处，并停留在那里达到平衡，从而将不同密度的成分分离。

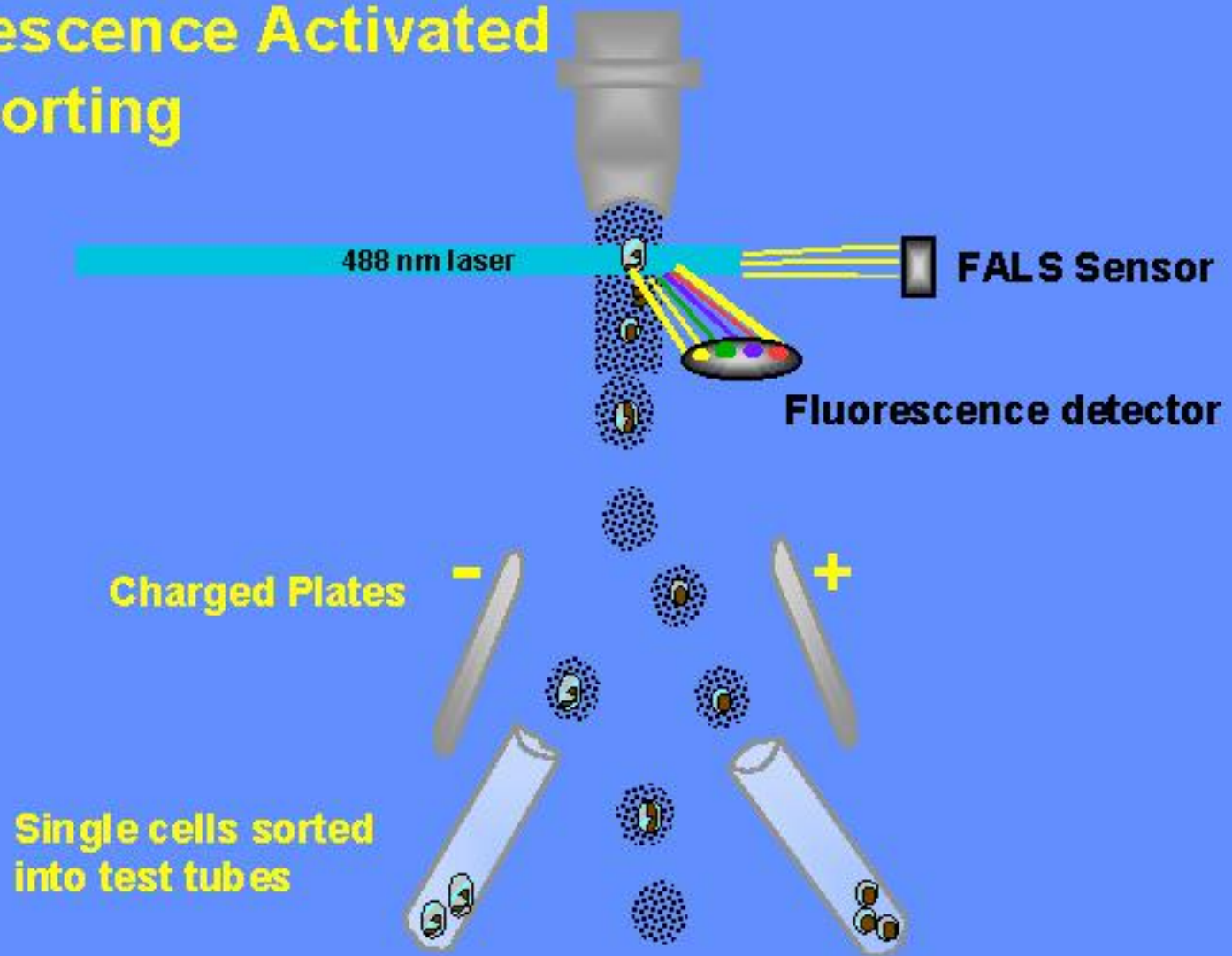


From The Art of MBoC³ © 1995 Garland Publishing, Inc.

二、流式细胞术

- 用途：对单个细胞进行快速定量分析与分选的一门技术。
- 原理：包在鞘液中的细胞通过高频振荡控制的喷嘴，形成包含单个细胞的液滴，在激光束的照射下，这些细胞发出散射光和荧光，经探测器检测，转换为电信号，送入计算机处理，输出统计结果，并可根据这些性质分选出高纯度的细胞亚群，分离纯度可达99%。包被细胞的液流称为鞘液，所用仪器称为流式细胞计（**flow cytometer**）。

Fluorescence Activated Cell Sorting



三、细胞电泳

- 原理：在一定PH值下细胞表面带有净的正或负电荷，能在外加电场的作用下发生泳动。
- 各种细胞或处于不同生理状态的同种细胞荷电量有所不同，故在一定的电场中的泳动速度不同。
- 用途：检测细胞生理状态和病理状态、分离不同种类的细胞，如分离哺乳动物的XY精子。