تجزئة الخلايا cell fractionation

تجزئة الخلية هو عملية تمزيق الخلايا وفصل وتعليق مكونات الخلية في وسط متساوي التوتر حيث نستخدم محاليل معينة نتحكم فيها ب PH والتركيز والحرارة من أجل دراسة تركيب الخلايا ومكوناتها الكيميائية ووظائفها.

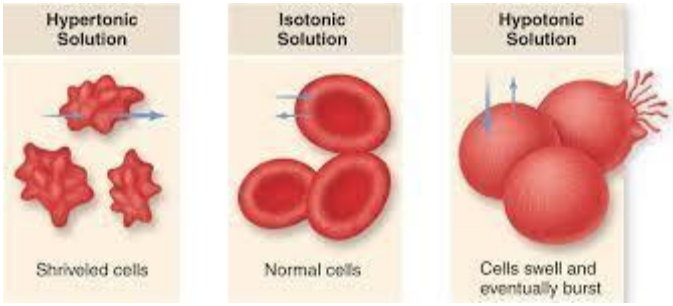
يتضمن تجزئة الخلية خطوتين رئيستين: الهضم او التجانس والطرد المركزي:

- **التجانس Homogenization :**

يتم تكسير الخلايا العالقة بالمحلول من خلال عملية التجانس وعادة ما يتم ذلك عن طريق:

١. الطحن او السحق grinding وعادة ما تستخدم هذه الطريقة مع الخلايا النباتية لسحق الجدار الخلوي واخراج المحتويات الخلوية باستخدام هاون خزفي وحبيبات الرمل للمساعدة في سرعة السحق.

٢. الضغط العالي High pressure
٣. الصدمة التناضحية او الازموزية Osmotic shock وعادة ما تستخدم هذه الطريقة مع الخلايا ذات الاغشية الرقيقة مثل كريات الدم الحمراء حيث توضع في محلول ذو تركيز واطئ مما يسبب في دخول السائل الى داخل الكريات وبالتالي انتفاخها ومن ثم انفجارها و خروج محتوياتها في السائل.



٤. استخدام الموجات فوق الصوتية (الاهتزازات بالموجات فوق الصوتية) sonication :
تنتج الموجات فوق الصوتية اهتزازات قوية تؤدي الى تمزق الخلايا وعادة ما تستخدم محاليل سكرية لمنع تكتل المحتويات الخلوية.

الطرد المركزي centrifugation :

يتم فصل (تجزئة) المكونات المختلفة للمحلول المتجانس عن طريق سلسلة من عمليات الطرد المركزي في جهاز الطرد المركزي التحضيري. يحتوي جهاز الطرد المركزي الفائق على دوار معدني يحتوي على ثقوب أسطوانية لاستيعاب أنابيب الطرد المركزي ومحرك يدور الدوار بسرعة عالية لتوليد قوى الطرد المركزي. طور ثيودور سفيدبرج (١٩٢٦) لأول مرة جهاز طرد مركزي فائق السرعة استعمله لتقدير الوزن الجزيئي للهيموغلوبين.

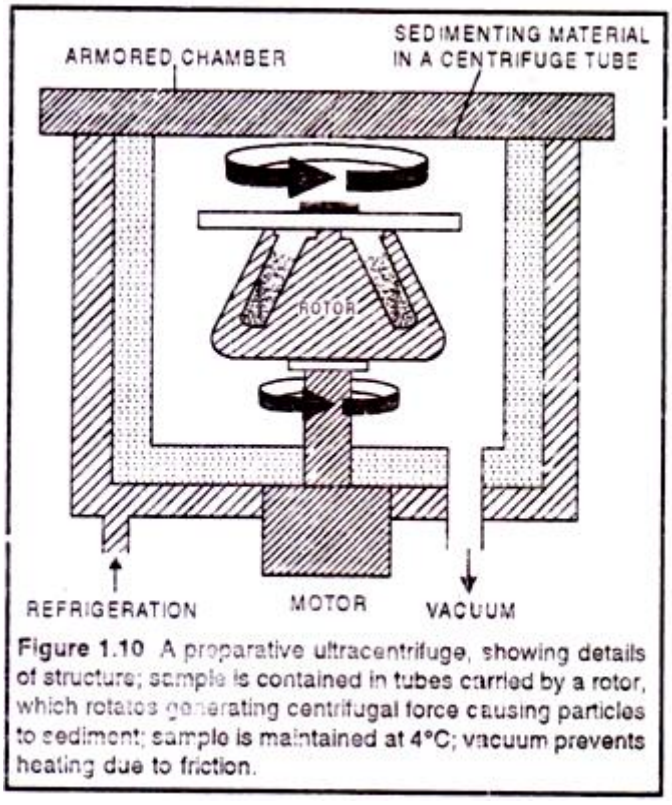


Figure 1.10 A preparative ultracentrifuge, showing details of structure; sample is contained in tubes carried by a rotor, which rotates generating centrifugal force causing particles to sediment; sample is maintained at 4°C; vacuum prevents heating due to friction.

يدور جهاز الطرد المركزي الفائق في الوقت الحاضر بسرعات تصل إلى ٨٠٠٠٠ دورة في الدقيقة بحيث يمكن حتى للجزيئات الصغيرة مثل t-RNA ، الإنزيمات أن ترسب وتفصل عن

المكونات الأخرى. يتم الاحتفاظ بغرفة الطرد المركزي الفائق في فراغ عالي لتقليل الاحتكاك ، ومنع التسخين والحفاظ على العينة عند ٤-٠ درجة مئوية.

يعتمد المعدل الذي يستقر فيه كل مكون اثناء الطرد المركزي على حجمه وشكله وكثافته اضافة الى سرعة الدوران في الجهاز.

تتضمن تقنية عزل المكونات الخلوية الطريقتين التاليتين:

(أ) الطرد المركزي التفريقي differentiation centrifugation:

يتم من خلالها فصل العضيات المختلفة اعتمادا على الاختلافات في حجمها. حيث يرشح الخليط في البداية باستعمال قطعة من الشاش لإزالة كتل الخلايا غير المقطوعة وجمعها في أنبوب الطرد المركزي. اما السائل المتجانس المرشح يخضع لسلسلة من الخطوات بسرعات أعلى متتالية في جهاز الطرد المركزي ، كل خطوة تنتج راشح وراسب حيث يتم إزالة الراشح في كل خطوة إلى أنبوب جديد للطرد المركزي ويؤخذ الراسب للفحص تحت المجهر. على سبيل المثال ، عند سرعة منخفضة (٦٠٠rpm. لمدة: ١٠ دقائق) ، فإن الجدران الخلوية أو الانوية سوف ترسب، وعند سرعة متوسطة (١٥٠٠٠rpm لمدة ٢٠دقيقة) تترسب الميتوكوندريا وبسرعة عالية (١٠٠٠٠٠ rpm لمدة ٦٠ دقيقة) تترسب الشبكة الاندوبلازمية وجهازكولجي.

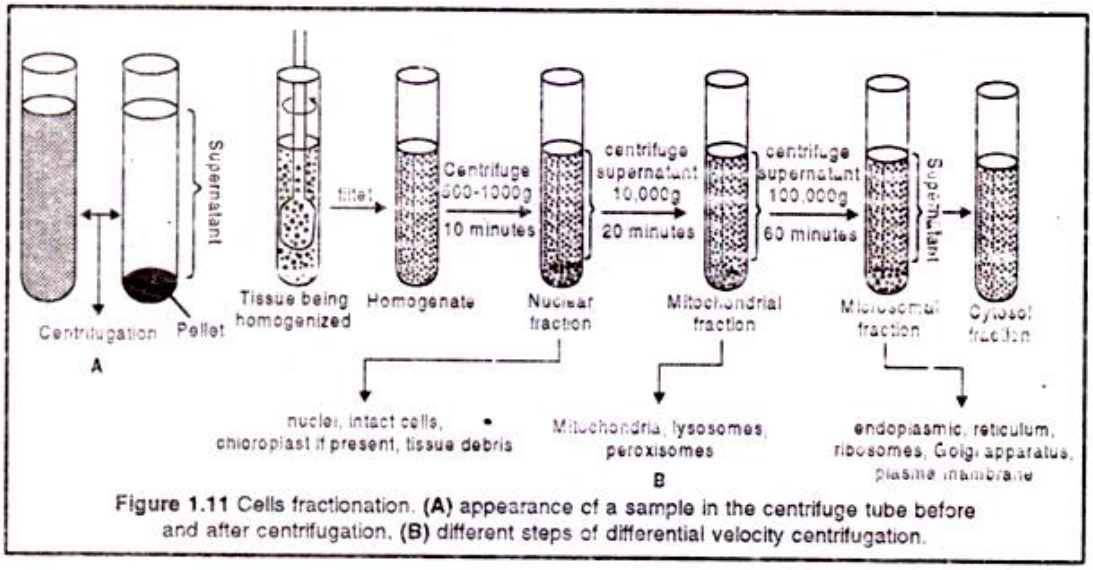
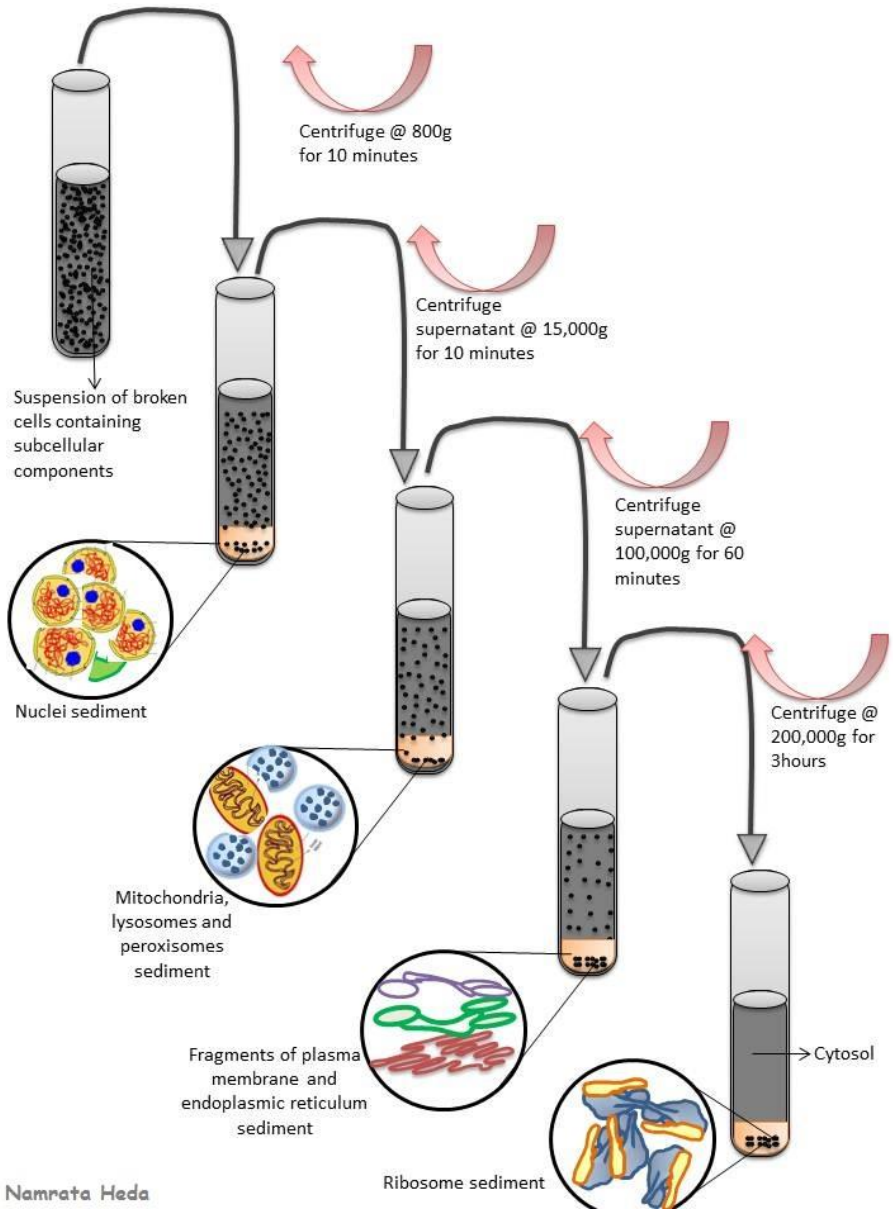


Figure 1.11 Cells fractionation. **(A)** appearance of a sample in the centrifuge tube before and after centrifugation. **(B)** different steps of differential velocity centrifugation.



(ب) الطرد المركزي المتدرج الكثافة **Density-gradient centrifugation**

يتم تنقية العضيات عن طريق الطرد المركزي المتدرج الكثافة حيث يتم فصل العضيات اعتمادا على كثافتها وليس حجمها.

يضاف العالق الخلوي على قمة محلول متدرج ، مثل محلول السكروز أو محلول الجلسرين. يكون المحلول أكثر تركيزًا (كثيفًا) في الجزء السفلي من أنبوب الطرد المركزي ، وينخفض التركيز تدريجيًا نحو الأعلى. الأنبوب عند الطرد المركزي بسرعة عالية تنفصل العضيات المختلفة حيث تكون كثافتها مساوية لكثافة الوسط. استخدم(Meselson و Stahl و Vinograd 1957) تدرج كلوريد السيزيوم الأكثر كثافة لفصل جزيئات الحمض النووي DNAلتقديم دليل على تضاعف الحمض النووي شبه المحافظ.

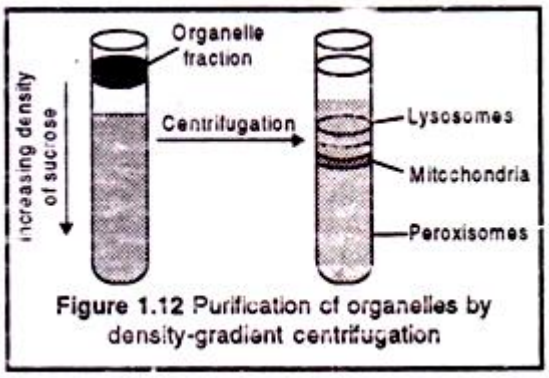


Figure 1.12 Purification of organelles by density-gradient centrifugation