

## Άσκηση 5: Κλασμάτωση κυττάρου

### Σύνοψη

Με τον όρο «κλασμάτωση του κυττάρου» εννοούμε τον διαχωρισμό των δομικών συστατικών του κυττάρου με βάση το μέγεθος και την πυκνότητά τους. Σκοπός της Άσκησης 5 είναι η εκμάθηση των μεθόδων κυτταρικής κλασμάτωσης και η αναγνώριση, απομόνωση, χρώση και μικροσκοπική παρατήρηση διαφόρων υποκυτταρικών οργανιδίων. Στο εισαγωγικό μέρος της άσκησης περιγράφονται οι μέθοδοι ομογενοποίησης και κυτταρικής κλασμάτωσης (φυγοκέντρωση σε κλίση πυκνότητας, διαφορική φυγοκέντρωση, υπερφυγοκέντρωση κ.λπ.), ενώ στο πρακτικό μέρος περιγράφεται και εξηγείται η διαδικασία απομόνωσης πυρήνων και μιτοχονδρίων από ηπατικό ιστό. Επιπλέον, ο φοιτητής μελετά τη μορφολογία των βασικών υποκυτταρικών οργανιδίων στο ζωικό και στο φυτικό κύτταρο και εκπαιδεύεται στην αναγνώρισή τους με τη βοήθεια εικόνων και μόνιμων μικροσκοπικών παρασκευασμάτων ζωικών και φυτικών ιστών.

### Προαπαιτούμενη γνώση

Από το βιβλίο των Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2010), Βιολογία (τόμος Ι), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, ISBN:978-960-524-306-7, ο φοιτητής θα πρέπει να ανατρέξει στο Κεφάλαιο 6: Περιήγηση στο κύτταρο.

## 1. Εισαγωγικό μέρος

Η **κυτταρική κλασμάτωση** χρησιμεύει για την απομόνωση δομικών συστατικών του κυττάρου, όπως του πυρήνα, των μιτοχονδρίων, των ριβοσωμάτων κ.λπ., με σκοπό τη μελέτη της μορφολογίας και της λειτουργίας τους. Πραγματοποιείται σχετικά εύκολα γιατί τα υποκυτταρικά οργανίδια διαφέρουν σε μέγεθος και πυκνότητα, γεγονός που επιτρέπει τον διαχωρισμό τους με τη φυγοκέντρωση. Ο πυρήνας, για παράδειγμα, είναι το μεγαλύτερο και βαρύτερο οργανίδιο, ενώ ακολουθούν τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες (στο φυτικό κύτταρο). Τα ριβοσώματα είναι μικρότερα αλλά σχετικά πυκνά.

Προτού προχωρήσουμε στην κλασμάτωση του κυττάρου θα πρέπει προηγουμένους να διαρρήξουμε την κυτταρική μεμβράνη προκειμένου να απελευθερωθούν τα υποκυτταρικά οργανίδια. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιείται αρχικά **ομογενοποίηση** του ιστού σε ένα κατάλληλο διάλυμα.

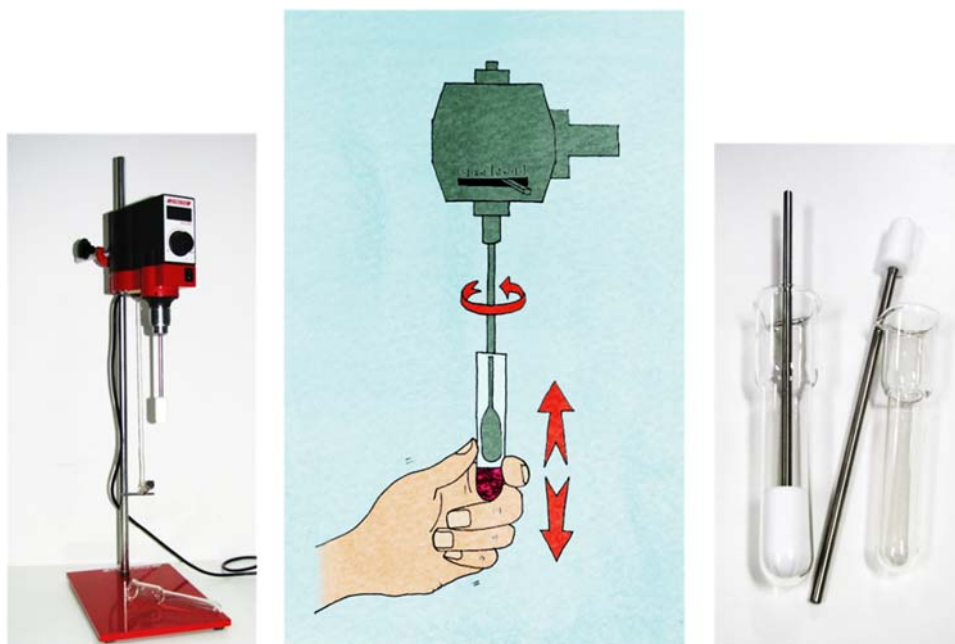
### 1.1. Μέθοδοι ομογενοποίησης

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι ομογενοποίησης και η επιλογή της πιο κατάλληλης εξαρτάται από το τι θέλουμε να μελετήσουμε, από τον ιστό που θα χρησιμοποιήσουμε και από το πιο κλάσμα μας ενδιαφέρει περισσότερο.

Μερικές φορές η ομογενοποίηση πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός μηχανικού ομογενοποιητή με μαχαιράκια. Στο εργαστήριο, ωστόσο, η πιο κοινή μέθοδος ομογενοποίησης είναι αυτή στην οποία χρησιμοποιείται ένας γυάλινος σωλήνας μέσα στον οποίο εφαρμόζει ακριβώς ένα έμβολο (συνήθως από teflon) που μπορεί να περιστραφεί με τη βοήθεια ενός ηλεκτρικού κινητήρα (ομογενοποιητής glass-teflon). Ο ιστός και το κατάλληλο διάλυμα ομογενοποίησης τοποθετούνται στον γυάλινο σωλήνα, τον οποίο ακολουθώντας ανεβοκατεβάζουμε κατά μήκος του άξονα περιστροφής του εμβόλου (Εικ. 5.1). Καθώς ο ιστός συμπιέζεται ανάμεσα στα τοιχώματα του σωλήνα και στο περιστρεφόμενο έμβολο, τα κύτταρά του σπάζουν. Η παραπάνω μέθοδος ομογενοποίησης χρησιμοποιείται για σχετικά μαλακούς ιστούς, όπως π.χ. ο ηπατικός ιστός και είναι αυτή που θα εφαρμόσετε κι εσείς στη συγκεκριμένη άσκηση. Για σκληρούς ιστούς και πολύ μικρά κύτταρα απαιτούνται ειδικότερες μέθοδοι, όπως εφαρμογή υπέρηχων κ.ά.

Εκτός πάντως από την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ομογενοποίησης, μία ακόμη σημαντική παράμετρος για επιτυχή κλασμάτωση είναι και η επιλογή του κατάλληλου διαλύματος μέσα στο οποίο θα γίνει η ομογενοποίηση, προκειμένου να παραμείνουν τα υποκυτταρικά οργανίδια όσο το δυνατόν πιο ανέπαφα. Διάφορα διαλύματα χρησιμοποιούνται ως μέσο ομογενοποίησης και η επιλογή γίνεται κυρίως με βάση τη συγκέντρωση ιόντων και την ιοντική ισχύ. Συχνά χρειάζεται σχετικά υψηλή οσμωτική πίεση για να μην σπάσουν οι μεμβράνες των οργανιδίων. Η πίεση αυτή εξασφαλίζεται με διάλυμα σακχαρόζης (0,32M) γιατί, απ' ενός μεν η συγκέντρωσή του είναι κατάλληλη, απ' ετέρου η σακχαρόζη δεν είναι φορτισμένη και

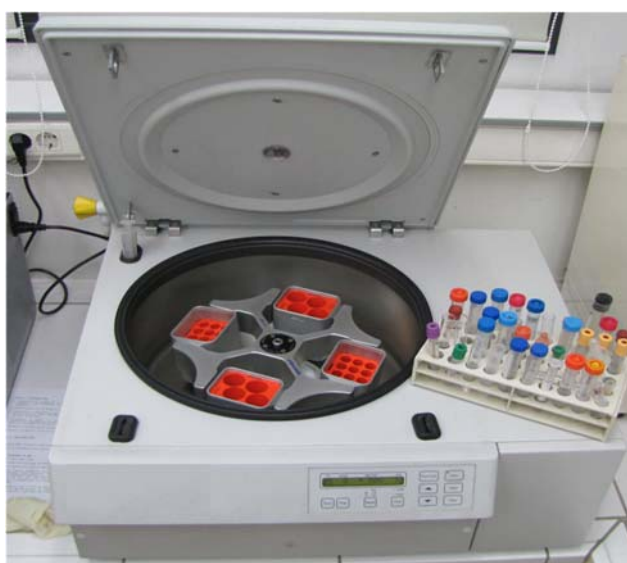
αποφεύγεται έτσι η φόρτιση και συσσωμάτωση των κυτταρικών συστατικών που θα δυσκόλευε τον διαχωρισμό τους.



**Εικόνα 5.1** – Ηλεκτρικός κινητήρας και ομογενοποιητής glass-teflon. Καθώς το έμβολο περιστρέφεται γύρω από τον άξονά του ανεβοκατεβάζουμε τον γυάλινο σωλήνα προκειμένου να συνθλίβουμε τον ιστό.

## 1.2. Μέθοδοι κλασμάτωσης

Η κυτταρική κλασμάτωση επιτυγχάνεται με **φυγοκέντρωση** σε ειδικό όργανο (Εικ. 5.2) και μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους. Στη μια περίπτωση ο διαχωρισμός των κυτταρικών συστατικών γίνεται με **φυγοκέντρωση σε κλίση πικνότητας**, συνήθως σακχαρόζης (sucrose density gradient centrifugation), και στην άλλη με **διαφορική φυγοκέντρωση** (differential centrifugation).

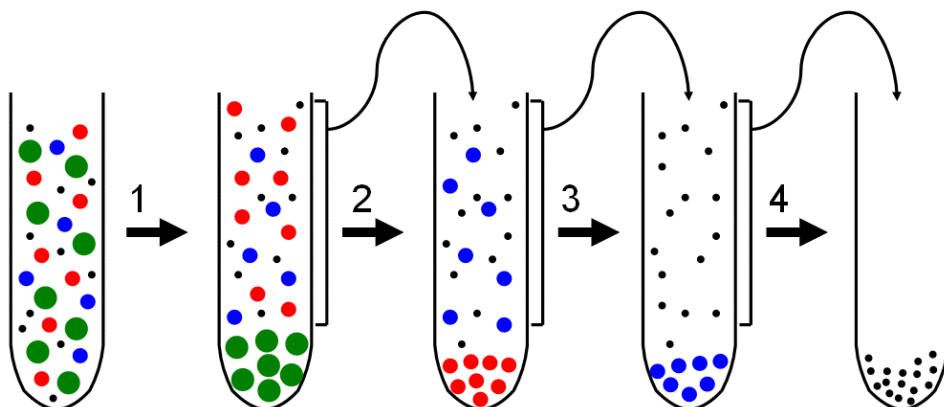


**Εικόνα 5.2** – Εργαστηριακή φυγόκεντρος και σωλήνες φυγοκέντρου.

Στην περίπτωση της **φυγοκέντρωσης σε κλίση πυκνότητας**, προετοιμάζονται κλίσεις πυκνότητας σακχαρόζης μέσα σε σωλήνες φυγοκέντρου με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαττώνεται προοδευτικά η συγκέντρωση της σακχαρόζης καθώς γεμίζει ο σωλήνας. Το ομογενοποίημα του ιστού επιστοιβάζεται στη συνέχεια στην επιφάνεια της κλίσης. Με την επίδραση του φυγοκεντρικού πεδίου, τα διάφορα οργανίδια καθιζάνουν μέσα στην κλίση με διαφορετική ταχύτητα, η οποία καθορίζεται βασικά από την πυκνότητα και το σχήμα του κάθε οργανιδίου.

Στην περίπτωση της **διαφορικής φυγοκέντρωσης**, το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται επαναληπτικά κάθε φορά με μεγαλύτερη ταχύτητα μέσα σε ομογενές διάλυμα σακχαρόζης. Έτσι, μετά από φυγοκέντρωση σε χαμηλές στροφές καθιζάνουν πρώτα τα μεγαλύτερα σε μέγεθος και πυκνότητα οργανίδια (*πυρήνες*), στη συνέχεια με φυγοκέντρωση σε υψηλότερες στροφές καθιζάνουν τα αμέσως μεγαλύτερα και πυκνά οργανίδια κ.ο.κ. (Εικ. 5.3).

Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να διαχωριστούν με τη σειρά τα παρακάτω κλάσματα: 1) *πυρηνικό*, 2) *μιτοχονδριακό*, 3) *μικροσωμικό (ριβοσώματα)* και 4) το *τελικό υπερκείμενο*. Ωστόσο, κανένα από τα κλάσματα αυτά δεν είναι απολύτως καθαρό. Έτσι, το πυρηνικό κλάσμα περιέχει συχνά και αρκετά άσπαστα μικρά κύτταρα, όπως ερυθρά αιμοσφαίρια αν έχει χρησιμοποιηθεί ζωικός ιστός (π.χ. ηπατικός ιστός). Επίσης, μπορεί να περιέχει και μεγάλα μιτοχόνδρια ή/και χλωροπλάστες (εφόσον πρόκειται για φυτικό ιστό). Το μιτοχονδριακό κλάσμα πάλι μπορεί να περιέχει μικρούς πυρήνες και πλαστίδια, ενώ το μικροσωμικό να περιέχει μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου, στοιχεία *Golgi*, λυσώματα και μικρά μιτοχόνδρια. Το υπερκείμενο είναι το πιο ετερογενές κλάσμα. Περιλαμβάνει ότι δεν έχει απομονωθεί κατά τις προηγούμενες διαδικασίες, όπως σπασμένα οργανίδια, ελεύθερες πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, διάφορους μικρομοριακούς μεταβολίτες και ανόργανα συστατικά. Μπορούμε πάντως να πετύχουμε μεγαλύτερη ομοιογένεια/καθαρότητα των παραπάνω κλασμάτων αν τα φυγοκεντρήσουμε στη συνέχεια σε μεγάλες ταχύτητες σε ειδική φυγόκεντρο, την *υπερφυγόκεντρο*.



Εικόνα 5.3 – Η μέθοδος της διαφορικής φυγοκέντρωσης.

### 1.3. Υπερφυγοκέντρωση

Η **υπερφυγοκέντρωση** χρησιμοποιείται όχι μόνο για τον διαχωρισμό οργανιδίων αλλά και για τον διαχωρισμό μακρομορίων, όπως DNA, RNA και πρωτεϊνών και για τον προσδιορισμό των μοριακών τους βαρών. Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι υπερφυγοκέντρωσης:

1. Ανάλυση με καθίζηση
2. Ανάλυση σε κλίσεις πυκνότητας

Ο πρώτος τύπος χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί το μέγεθος (μοριακό βάρος) και το σχήμα ενός μακρομορίου καθώς και οι αλληλεπιδράσεις του με άλλα μακρομόρια. Ο δεύτερος τύπος χρησιμοποιείται κυρίως για τον διαχωρισμό οργανιδίων ή μακρομορίων μεταξύ τους. Σε κάθε τύπο διακρίνουμε δύο βασικές μεθόδους:

- τη μέθοδο ταχύτητας,
- τη μέθοδο ισορροπίας.

Κάθε μια από τις δύο αυτές μεθόδους αναφέρεται στη συνέχεια περιληπτικά.

### 1.3.1. Ανάλυση με καθίζηση

#### 1.3.1α. Μέθοδος ταχύτητας

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται μεγάλες ταχύτητες, με αποτέλεσμα ο ρυθμός καθίζησης να είναι πολύ μεγαλύτερος από την αντίθετη δύναμη της διάχυσης, δηλαδή από τη δύναμη εκείνη που τείνει να διατηρήσει τα μόρια σε κατάσταση διασποράς. Τα μόρια κινούνται προς τον πυθμένα αφήνοντας πίσω τους καθαρό διαλύτη.

Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται ο συντελεστής καθίζησης του μακρομορίου (συντελεστής Svedberg,  $S$ ), ενώ με ορισμένα πρόσθετα δεδομένα και εφαρμογή κατάλληλης εξίσωσης (εξίσωση Svedberg) μπορεί να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος του μακρομορίου.

#### 1.3.1β. Μέθοδος ισορροπίας

Η μέθοδος ισορροπίας χρησιμοποιείται και αυτή για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των μακρομορίων. Σε αντίθεση με τη μέθοδο ταχύτητας, στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται σχετικά μικρές ταχύτητες, ώστε το σύστημα να φτάσει σε κατάσταση ισορροπίας όπου ο ρυθμός καθίζησης εξισώνεται με την αντίθετη δύναμη της διάχυσης.

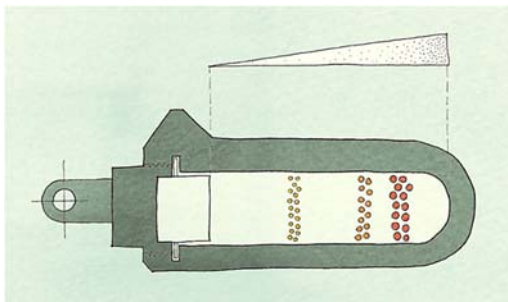
Κατά την ισορροπία δεν υπάρχει καθαρός διαλύτης ούτε στην περιοχή του μηνίσκου. Αντίθετα, κατά μήκος του φυγοκεντρικού σωλήνα δημιουργείται μια κλίση συγκέντρωσης των μακρομορίων, όπου η συγκέντρωση στον πυθμένα μπορεί να είναι διπλάσια απ' ό,τι στον μηνίσκο. Μετρώντας τη συγκέντρωση του μακρομορίου ως συνάρτηση της απόστασής του από το κέντρο της περιστροφής, μπορεί, με κατάλληλες εξισώσεις, να προσδιοριστεί το μοριακό του βάρος.

### 1.3.2. Ανάλυση σε κλίσεις πυκνότητας

#### 1.3.2α. Μέθοδος ταχύτητας

Η φυγοκέντρωση σε κλίση αυξανόμενης συγκέντρωσης σακχαρόζης, ή άλλων ενώσεων, είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται πάρα πολύ για τον διαχωρισμό οργανιδίων και μακρομορίων, με τις ανάλογες τροποποιήσεις κάθε φορά, που εξαρτώνται από το τι υλικό διαχωρίζεται. Στην πιο συνηθισμένη διαδικασία, μια συνεχής κλίση σακχαρόζης προετοιμάζεται μέσα σε έναν πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου με τη βοήθεια μιας συσκευής που αναμιγνύει ένα διάλυμα σακχαρόζης με ένα ρυθμιστικό διάλυμα σε αναλογίες που ελαττώνονται προοδευτικά καθώς ο σωλήνας γεμίζει. Έτσι, στον πυθμένα του φυγοκεντρικού σωλήνα υπάρχει το πυκνότερο διάλυμα και στην κορυφή το αραιότερο. Το μίγμα των οργανιδίων ή μακρομορίων που πρόκειται να διαχωριστούν επιστοιβάξεται στην επιφάνεια της κλίσης.

Η φυγοκέντρωση γίνεται σε μεγάλες ταχύτητες χρησιμοποιώντας μία κεφαλή φυγοκέντρου όπου οι σωλήνες παίρνουν θέση κάθετη ως προς το άξονα περιστροφής. Με την επίδραση του φυγοκεντρικού πεδίου τα οργανίδια ή τα μακρομόρια καθιζάνουν μέσα στην κλίση σακχαρόζης με τη δική τους ταχύτητα το καθένα, η οποία καθορίζεται κυρίως από το βάρος τους αλλά και από την πυκνότητα και το σχήμα τους, με τη μορφή ζωνών (Εικ. 5.4). Η φυγοκέντρωση διακόπτεται πριν φτάσουμε σε κατάσταση ισορροπίας. Αν η φυγοκέντρωση συνεχιστεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, όλα τα οργανίδια ή τα μακρομόρια καθιζάνουν τελικώς στον πυθμένα. Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη και για τον υπολογισμό του συντελεστή καθίζησης  $S$  ενός μακρομορίου.



**Εικόνα 5.4** – Υπερφυγοκέντρωση σε κλίση πυκνότητας. Στο σχήμα ο φυγοκεντρικός σωλήνας βρίσκεται σε θέση περιστροφής και οι μικροί κύκλοι συμβολίζουν τις ουσίες που διαχωρίστηκαν με την κλίση πυκνότητας του διαλύματος του σωλήνα.

Μετά το πέρας της υπερφυγοκέντρωσης γίνεται συλλογή των κλασμάτων, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε από τον πυθμένα (αφού τρυπηθεί ο σωλήνας) είτε από την κορυφή και συνήθως μετρίεται η οπτική τους πυκνότητα και η ραδιενέργεια, εφόσον έχει γίνει σήμανση με ραδιενεργά ισότοπα. Σε περίπτωση διαχωρισμού οργανιδίων είναι απαραίτητη η εξέταση των κλασμάτων με μικροσκοπία προκειμένου να διαπιστωθεί ο βαθμός καθαρότητας του παρασκευάσματος.

### 1.3.2β. Μέθοδος ισοροπίας σε CsCl

Με τη μέθοδο αυτή (ειδική για νουκλεϊκά οξέα) επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μακρομορίων σε ζώνες ανάλογα με την ανωτική τους πυκνότητα (buoyant density). *Ανωτική πυκνότητα* ενός μορίου είναι η πυκνότητα του διαλύματος σε εκείνη τη θέση του σωλήνα όπου η συνισταμένη των δυνάμεων που εξασκούνται πάνω στο μόριο είναι μηδέν. Η μέθοδος ισοροπίας διαφέρει από τη μέθοδο ταχύτητας στο ότι η κλίση δεν είναι έτοιμη αλλά σχηματίζεται κατά τη φυγοκέντρωση. Το σύστημα που φυγοκεντρείται αποτελείται από τον διαλύτη, στον οποίο προστίθεται CsCl σε μεγάλες συγκεντρώσεις (6-8 M) και φυσικά και το δείγμα που πρόκειται να διαχωριστεί. Κατά την περιστροφή του συστήματος σε μεγάλες ταχύτητες και για αρκετό χρονικό διάστημα αποκαθίσταται ισοροπία ανάμεσα στην καθίζηση και στη διάχυση, οπότε η συγκέντρωση του CsCl αυξάνει με την απόσταση από το κέντρο περιστροφής και δημιουργεί μια κλίση συγκέντρωσης. Τα μακρομόρια διατάσσονται σε ζώνες μέσα στην κλίση εκεί που η ανωτική τους πυκνότητα είναι ίση με την πυκνότητα της κλίσης. Οι ζώνες μετά την αποκατάσταση της ισοροπίας δεν μετακινούνται όσο χρονικό διάστημα και αν κρατήσει η φυγοκέντρωση.

Η μέθοδος αυτή είναι πολύτιμη για τον διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων. Χρησιμοποιήθηκε αρχικά από τους Meselson-Stahl στη μελέτη του μηχανισμού αντιγραφής του DNA.

## 2. Πρακτικό μέρος

### 2.1. Κατάλογος εφοδίων

#### 2.1.1. Συσκευές

- μικροσκόπια,
- ηλεκτρικός κινητήρας και ομογενοποιητές glass-teflon,
- φυγόκεντρος.

#### 2.1.2. Υλικά

- συκώτι,
- δοχεία με πάγο,
- ψαλίδι, λαβίδα,
- ποτήρια ζέσεως, γυάλινες κάψες ωρολογίου,
- διηθητικό χαρτί,
- τουλουπάνι,
- σωλήνες φυγοκέντρου,
- πιπέτες Pasteur,
- οδοντογλυφίδες,
- σταγονόμετρα,
- αντικειμενοφόροι, καλυπτρίδες,
- μόνιμα παρασκευάσματα.

#### 2.1.3. Διαλύματα

- 0,32M σακχαρόζη – 1mM MgCl<sub>2</sub>,
- χρωστική οξικό καρμίνιο (ή ορσεΐνη),
- χρωστική κνανού του μεθυλενίου (Methyl Blue),
- χρωστική Janus green B.

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Η χρωστική οξικό καρμίνιο παρασκευάζεται με το ακόλουθο τρόπο: Διαλύονται 1-2 g καρμινίου σε 100 ml οξικό οξύ (45% CH<sub>3</sub>COOH). Ακολουθεί παρατεταμένος βρασμός με ταυτόχρονη ψύξη και τελικά παίρνεται η χρωστική ως διήθημα. Η χρωστική ορσεΐνη παρασκευάζεται με την ίδια διαδικασία που αναφέρθηκε για το καρμίνιο (συνηθισμένη περιεκτικότητα 1-1,5%). Οι χρωστικές κυανού του μεθυλενίου (0,5%) και Janus green B (0,01%) διαλύονται σε 0,9% NaCl.

## 2.2. Πειραματική διαδικασία

### 2.2.1. Απομόνωση, χρώση και παρατήρηση πυρήνων και μιτοχονδρίων από ηπατικό ιστό

Στην άσκηση θα απομονώσετε πυρήνες και μιτοχόνδρια από ηπατικό ιστό με τη μέθοδο της διαφορικής φυγοκέντρησης. Μετά την απομόνωση, θα ελέγξετε μικροσκοπικά την καθαρότητα των κλασμάτων που απομονώσατε.

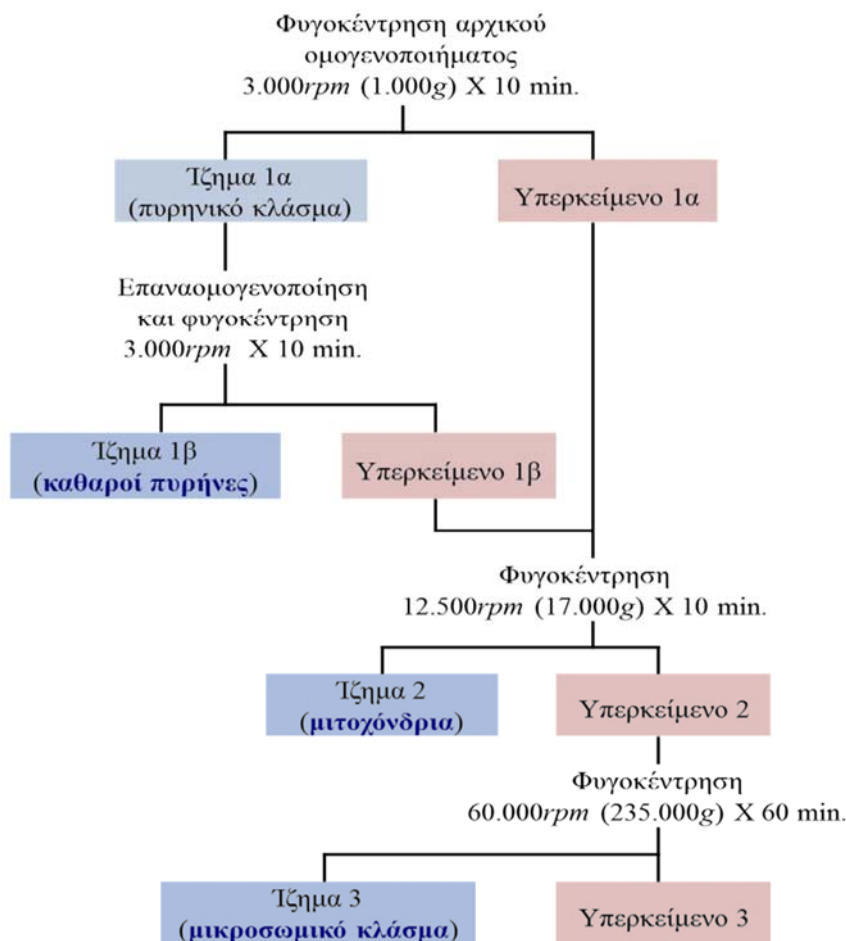
1. Χρησιμοποιώντας τη λαβίδα και το ψαλίδι σας κόψτε ένα κομμάτι ηπατικού ιστού (περίπου 5 g) που θα βρείτε στον πάγκο σας τοποθετημένο μέσα σε ένα ποτήρι ζέσεως με παγωμένο φυσιολογικό ορό.
2. Τοποθετήστε τον ιστό σε μία γυάλινη κάψα ωρολογίου πάνω σε διηθητικό χαρτί και τεμαχίστε τον σε μικρά κομμάτια.
3. Μεταφέρετε τα κομμάτια στον σωλήνα του ομογενοποιητή και προσθέστε 25 ml παγωμένου διαλύματος σακχαρόζης.
4. Ομογενοποιήστε τον ιστό χρησιμοποιώντας το έμβολο από teflon, αρχικά ανεβοκατεβάζοντας το έμβολο με το χέρι (2-3 φορές ώστε να συνθλίψετε τον ιστό) και στη συνέχεια με τη βοήθεια του ηλεκτρικού κινητήρα (αφού σταθεροποιήσετε το έμβολο που θα αρχίσει να περιστρέφεται με ταχύτητα ανεβοκατεβάζοντας τον σωλήνα του ομογενοποιητή (15-20 φορές).



**Βίντεο 5.1** – Ομογενοποίηση ιστού.

5. Διηθήστε το ομογενοποίημα μέσα από τριπλό τουλουπάνι και στη συνέχεια μεταφέρετε το διήθημα σε έναν σωλήνα φυγοκέντρου. Κρατήστε λίγο από το διήθημα στον πάγο για μετέπειτα μικροσκοπική παρατήρηση.
6. Φυγοκεντρήστε το αρχικό αυτό ομογενοποίημα σε 3.000 rpm (1.000 g) για 10 λεπτά.  
**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Θα χρησιμοποιηθεί αυτόματη ψυχόμενη φυγόκεντρος που θα μπει σε λειτουργία σύμφωνα με τις υποδείξεις του επιβλέποντος.
7. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, μεταφέρετε το υπερκείμενο (με τη βοήθεια μιας πιπέτας Pasteur) σε έναν δεύτερο σωλήνα φυγοκέντρου, προσέχοντας ώστε να μην απομακρυνθεί και ίζημα. Φυλάξτε το υπερκείμενο αυτό στον πάγο.
8. Προσθέστε στο ίζημα (πυρηνικό κλάσμα) 20 ml διαλύματος σακχαρόζης, αιωρήστε και επανομογενοποιήστε το εναιώρημα.
9. Φυγοκεντρήστε το ομογενοποίημα αυτό όπως και προηγουμένως (3.000 rpm X 10 min).
10. Κρατήστε τον σωλήνα με το ίζημα (πυρήνες) στον πάγο και προσθέστε το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης αυτής στον σωλήνα με το υπερκείμενο της πρώτης φυγοκέντρησης.

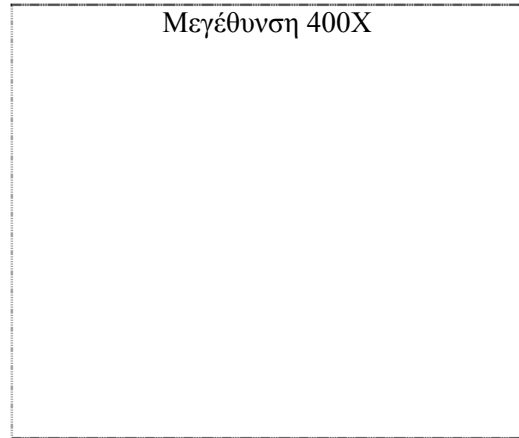
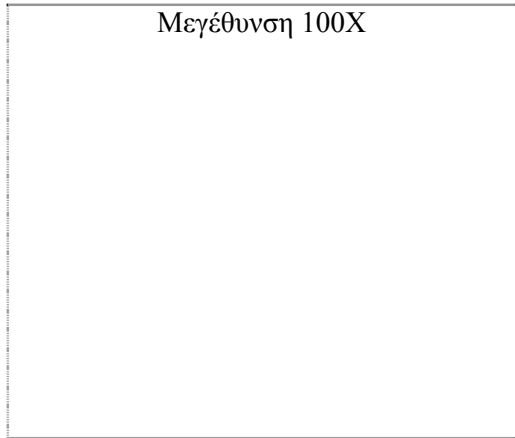
11. Φυγοκεντρήστε τον σωλήνα με τα δύο υπερκείμενα σε 12.500 rpm (17.000 g) για 10 λεπτά, προκειμένου να κατακρημνιστούν τα μιτοχόνδρια. Συμβουλευτείτε την Εικόνα/διάγραμμα 5.5.
12. Κάθε ίζημα το επαναδιαλύετε σε λίγο διάλυμα σακχαρόζης και το κρατάτε στο δοχείο με τον πάγο μέχρι να τελειώσει η όλη πορεία. Έτσι, τελικά θα έχετε τέσσερα δείγματα:
  - το αρχικό ομογενοποίημα,
  - το εναιώρημα των πυρήνων (ίζημα 1β),
  - το εναιώρημα των μιτοχονδρίων (ίζημα 2),
  - το υπερκείμενο 2.
13. Ελέγξτε μικροσκοπικά τα αποτελέσματα της κλασμάτωσης για να διαπιστώσετε την παρουσία ή μη πυρήνων και μιτοχονδρίων (βλέπε παρακάτω) σε κάθε ένα από τα δείγματα που συλλέξατε.



Εικόνα 5.5 – Πορεία διαφορετικής φυγοκέντρησης.

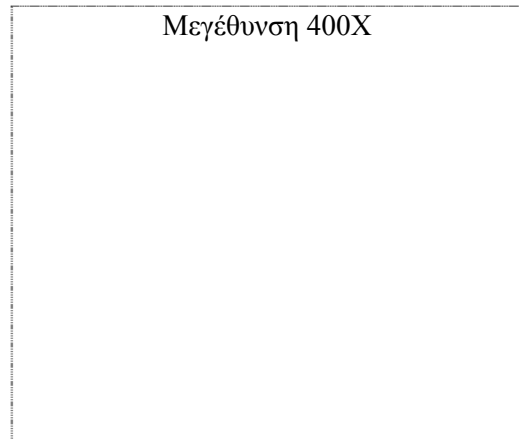
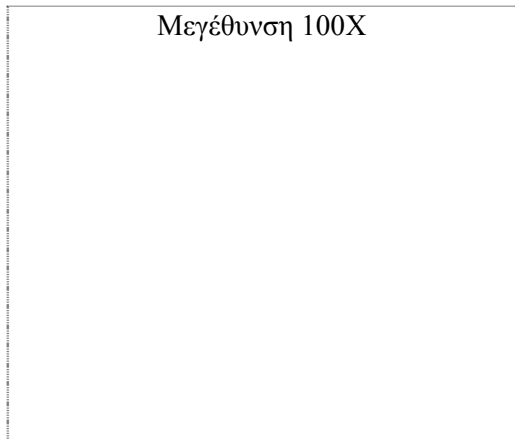
#### Α. Έλεγχος πυρήνων

Τοποθετήστε μια μικρή ποσότητα των εναιωρήματος των πυρήνων σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα και προσθέστε 1-2 σταγόνες χρωστικής οξικό καρμίνιο ή χρωστικής κυανού του μεθυλενίου. Σκεπάστε με καλυπτρίδα και παρατηρήστε στο μικροσκόπιο χρησιμοποιώντας αντικειμενικό φακό 10X και 40X. Σχεδιάστε την εικόνα που βλέπετε στο μικροσκόπιο και σχολιάστε την καθαρότητα του παρασκευάσματος.



### **B. Έλεγχος μιτοχονδρίων**

Τοποθετήστε μια μικρή ποσότητα των εναιωρήματος των μιτοχονδρίων σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα και προσθέστε 1-2 σταγόνες χρωστικής *janus green B*. Σκεπάστε με καλυπτρίδα και παρατηρήστε στο μικροσκόπιο χρησιμοποιώντας αντικειμενικό φακό 40X και 100X. Σχεδιάστε την εικόνα που βλέπετε στο μικροσκόπιο. Διαπιστώνετε προσμίξεις από άλλα οργανίδια στο παρασκεύασμα αυτό;



### **2.2.1. Παρατήρηση μιτοχονδρίων και χλωροπλαστών σε μόνιμα παρασκευάσματα φυτικών ιστών**

**A.** Σε μόνιμο παρασκεύασμα ακρορριζίων κρεμμυδιού που έχουν υποστεί ειδική χρώση θα παρατηρήσετε τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Αναγνωρίστε τα μιτοχόνδρια και σχεδιάστε την εικόνα που βλέπετε.

