

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. А. М. ГОРЬКОГО

ОБЩАЯ ЦИТОЛОГИЯ

Руководство к практическим занятиям

Екатеринбург
Издательство Уральского университета
2001

ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

Цель лабораторных занятий по цитологии – овладение элементарными навыками изучения клетки, знакомство с микроскопическим и ультрамикроскопическим ее строением при помощи постоянных и временных препаратов и электронных микрофотографий.

В ходе практических занятий студентам дана возможность познакомиться с большим разнообразием строения клеток на примере прокариотов и эукариотов (растений и животных). При этом обращено внимание на структуры общего характера, свойственные всем клеткам. К каждому занятию приводится перечень литературы, рекомендуемой для подготовки и усвоения темы. При выполнении заданий необходимо строго придерживаться указаний.

Составитель *А. В. Мальцев*

З а н я т и е 1

УСТРОЙСТВО СВЕТОВОГО МИКРОСКОПА. ПРАВИЛА РАБОТЫ С МИКРОСКОПОМ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ВРЕМЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Цель работы: изучить устройство светового микроскопа, освоить навыки микроскопирования и приготовления временных препаратов.

Общие сведения о микроскопе

Основным инструментом изучения клетки является микроскоп. Микроскоп представляет собой оптико-механический прибор, который служит для рассмотрения объектов, недоступных невооруженному глазу. В зависимости от метода получения увеличенного изображения объекта различают световую, электронную и флуоресцентную микроскопию.

Главной характеристикой микроскопа как увеличительной системы является разрешающая способность. *Разрешающая способность* – это минимальное расстояние между точками, которые видны раздельно.

но. Разрешающая способность человеческого глаза составляет около 0,1 мм, т. е. 100 мкм. Максимальная разрешающая способность светового микроскопа в зависимости от используемого источника света – 0,13–0,20 мкм. Таким образом, наибольшее полезное увеличение светового микроскопа примерно 1000 раз.

В настоящее время имеется целая серия световых микроскопов различных типов и марок. На лабораторных занятиях будут использоваться микроскопы: МБР-I, МБС-I, Биолам.

Световой микроскоп состоит из оптической и механической систем. Оптическая система микроскопа включает следующие части: объектив, окуляр, конденсор, зеркало.

Объектив строит увеличенное обратное и действительное изображение. Он представляет наиболее важную часть микроскопа: именно от него зависят увеличение и четкость изображения. К микроскопу прилагается несколько объективов, дающих разное увеличение: 8-, 20-, 40-, 90-кратное.

Окуляр дает прямое, мнимое и увеличенное изображение. При этом он только увеличивает построенное объективом изображение, но не выявляет в нем новых деталей. На практических занятиях будут использоваться окуляры с увеличением 7-, 10-, 15-кратным.

Конденсор с апертурной диафрагмой служит для наилучшего освещения изучаемого объекта. Изменением положения конденсора и размера апертурной (ирисовой) диафрагмы регулируют количество и угол наклона световых лучей, падающих на объект. Уменьшение диаметра отверстия диафрагмы уменьшает освещение объекта, но увеличивает глубину резкости. Конденсор позволяет осветить объект широко расходящимся пучком лучей, что особенно необходимо при работе с большим увеличением.

Зеркало служит для направления лучей от источника света в конденсор. Оно имеет плоскую и вогнутую поверхности. Плоская сторона используется при работе с искусственным источником света, расположенным близко от микроскопа. Вогнутая – при использовании естественного освещения и при работе с большим увеличением.

Механическая часть микроскопа состоит из основания, механизма микрометрической фокусировки, предметного столика, кронштейна конденсора, тубусодержателя с механизмом макрометрической фокусировки, тубуса и револьвера.

Предметный столик служит для установки исследуемого препарата. В центре столика имеется отверстие, в которое направлена верхняя часть конденсора. У микроскопа МБР-I верхнюю часть предметного столика можно вращать вокруг оптической оси. С помощью винтов, расположенных сбоку, производят центровку предметного столика. Отверстия на поверхности столика служат для установления зажимов и препаратоводителя.

Механизм макрометрической настройки используется для грубой настройки микроскопа. Он имеет два винта и может перемещаться в вертикальном направлении в пределах 50 мм.

Механизм микрометрической настройки предназначен для тонкой фокусировки. Величина перемещения тубусодержателя с помощью микрометрического механизма равна 2,2–2,4 мм. Крайние положения тубусодержателя отмечены рисками на коробке механизма. *При работе с этим механизмом нужно быть особенно аккуратным, так как ограничители его работы легко выходят из строя.*

Порядок работы с микроскопом

В зависимости от необходимого увеличения подготовку работы с микроскопом проводят в несколько этапов. При работе с малым увеличением (объектив $\times 8$) последовательность такова:

1. Микроскоп устанавливается на столе против левого плеча, недалеко от края стола. Его ставят тубусодержателем к себе, перпендикулярно краю стола, и не сдвигают до конца занятий.
2. Поворачивая револьвер, ставят в рабочее положение объектив $\times 8$, тубусодержатель устанавливают в соответствии с рабочим расстоянием объектива (9,2 мм).
3. Конденсор поднимают в крайнее верхнее положение, полностью раскрывают апертурную диафрагму.
4. Направляют зеркало, в том случае если микроскоп оснащен зеркалом, к источнику света и устанавливают максимальную освещенность, контролируя ее через окуляр. Включают осветитель, если микроскоп оснащен им.
5. Помещают препарат на предметный столик так, чтобы оптическая ось микроскопа проходила через объект.
6. Проводят фокусировку механизмом макрометрической настройки и приступают к исследованию объекта.

Работу с большим увеличением (объектив $\times 20$, $\times 40$ и $\times 90$) начинают с настройки микроскопа на малом увеличении.

Порядок работы с микроскопом при увеличении $\times 20$, $\times 40$

Установив объект в центр поля зрения и закрепив препарат зажимами, поворачивают револьвер и ставят в рабочее положение объектив $\times 40$. Необходимо следить за тем, чтобы объектив не касался препарата. Рабочее расстояние объектива $\times 40$ – 0,6 мм. Невозможность установления объектива может быть связана с толщиной предметного стекла. Нормальная толщина предметного стекла – 1,2 мм, покровного – 0,17 мм. Фокусировку микроскопа проводят механизмами макро- и микрометрической настройки в соответствии с рабочим расстоянием объектива.

Объективы с увеличением $\times 8$, $\times 20$, $\times 40$ называют «сухими», так как при их использовании между объектом наблюдения и объективом находится воздушная среда. Объективы с увеличением ($\times 90$) называют иммерсионными, так как при работе с ними используется более плотная оптически, чем воздух, среда, чаще всего масло.

Работа с объективом масляной иммерсии при увеличении $\times 90$

1. Выполнить всю последовательность операций при работе с объективами $\times 8$ и $\times 40$.

2. Поднять тубус микроскопа и на поверхность покровного стекла препарата (не снимая его со столика микроскопа) нанести каплю иммерсионного масла.

3. Опустить иммерсионный объектив, с помощью винта микрометрической настройки очень осторожно погрузить его в масло. При этом необходимо наблюдать сбоку за погружением нижней линзы объектива в каплю иммерсионного масла, чтобы она не коснулась препарата.

4. После того как линза погрузилась в каплю масла, следует, глядя в окуляр, медленно поднимать тубус микроскопа до появления в поле зрения изображения изучаемого объекта.

5. Как только появится изображение, следует сфокусировать его с помощью винта микрометрической настройки, и далее при изучении препарата следует пользоваться только этим винтом.

6. Можно каплю иммерсионного масла нанести на поверхность верхней линзы конденсора, опустив его предварительно вниз, затем поднять конденсор до соприкосновения капли масла с нижней поверхностью предметного стекла препарата. При этом разрешающая способность иммерсионного объектива увеличивается.

7. После окончания работы сразу же следует удалить масло с объектива и конденсора. Сначала снять масло фильтровальной бумагой и после этого протереть поверхность линз мягкой тряпочкой, смоченной очищенным бензином или гексанолом; спирт для этих целей использовать нежелательно, так как он может вызвать расклеивание линз объектива и конденсора.

Принадлежности и устройства к микроскопу

Не всякий микроскоп укомплектован всем необходимым, поэтому нередко приходится применять различные вспомогательные средства, которые расширяют возможность исследования. На занятиях по общей цитологии будут использоваться следующие из них: осветитель, препаратоводитель.

Осветители ОИ-19, ОИ-9М используют для работы как в проходящем, так и в отраженном свете; эти осветители снабжены трансформатором и штативом. Осветители ОИ-25, ИО-32 и ОИ-35 размещают под конденсором вместо зеркала. Эти осветители предназначены только для проходящего света.

При микроскопировании огромное значение имеет источник света. Гораздо удобнее пользоваться искусственным источником света, который отличается от естественного тем, что он более постоянен и в то же время дает возможность добиться большей освещенности изображения при работе с большим увеличением. При установке освещения не нужно освещать объект с избытком, так как лишний свет не участвует в построении изображения, а снижает его контраст.

Приготовление временных препаратов

На лабораторных занятиях используются как постоянные, так и временные препараты. Временные препараты готовятся непосредственно в процессе занятий. Основные моменты приготовления таких препаратов сводятся к следующему:

1. Тщательно вычистить предметное и покровное стекла.
2. На середину предметного стекла капнуть воды и поместить в нее исследуемый объект.
3. Накрыть каплю покровным стеклом. При этом вода должна вытеснить воздух и заполнить все пространство под покровным стеклом. Если опускать покровное стекло резко, в препарате могут оказаться пузырьки воздуха, которые под микроскопом видны в виде сферических тел с черными контурами, что затрудняет изучение объекта. Если вода не заполняет всего пространства под покровным стеклом, то пипеткой или стеклянной палочкой сбоку покровного стекла добавляют небольшую каплю. В силу поверхностного натяжения капля втягивается под стекло и заполняет под ним все пространство. В том случае, если капля велика и вода выступает за края покровного стекла, ее следует удалить, прикладывая сбоку полоску фильтровальной бумаги.

Оформление результатов наблюдения

Результаты лабораторных работ заносятся в дневник. Для ведения дневника следует иметь альбом для рисования с бумагой хорошего качества (формат листов 20×30 см), простой остро отточенный карандаш средней твердости и мягкую резинку. При оформлении лабораторных занятий указываются: дата работы, название темы и перечень заданий.

После изучения объекта выполняется рисунок, который должен отражать результаты наблюдения и понимание изучаемого объекта. Рисунок располагается в левой стороне листа, подписывается снизу, а с правой помещаются обозначения рисунка и пояснительный текст.

Рисунок выполняется только простым карандашом, цветные карандаши применять не рекомендуется. Он должен быть четким, крупным, все детали его должны соответствовать относительным размерам объекта изучения. На занятиях выполняется черновик рисунка твердым карандашом, после занятий (дома) он оформляется окончательно мягким карандашом. Обозначения на рисунке делаются стрелкой по направлению от подписи к изображению. Биологический рисунок является одним из эффективных методов познания, так как именно в процессе зарисовки объект детально и вдумчиво анализируется. По сути дела, рисунок – это вывод, полученный в процессе

изучения объекта, и в этом отношении он существенно отличается от микрофотографии.

Дневник-альбом – это пособие при изучении практического курса цитологии и отчетный документ при сдаче зачета.

Оборудование: 1. Микроскоп. 2. Осветитель. 3. Предметное и покровное стекла. 4. Пипетка. 5. Марлевая салфетка. 6. Препаровальная игла. 7. Пинцет. 8. Бритвенные лезвия. 9. Таблица «Строение растительной клетки».

Реактивы: 1. Иммерсионная жидкость. 2. Дистиллированная вода.

Объект: Чешуя луковицы лука репчатого (красного сорта).

Задание

Приготовить временный препарат эпидермиса чешуи луковицы лука репчатого. Рассмотреть и зарисовать строение клетки. Отметить оболочку, ядро, цитоплазму, вакуоли.

Препарат № 1

Клетки эпидермиса чешуи луковицы репчатого лука

Для ознакомления со строением клеток и получения навыков работы с микроскопом можно использовать кожицу (эпидермис), покрывающую внутренние чешуи луковицы лука. Слегка надрезанная скальпелем или препаровальной иглой кожица с внутренней стороны чешуи обычно легко снимается. Ее рассматривают в воде под покровным стеклом при малом и большом увеличении микроскопа.

Клетки кожицы разных размеров, многоугольные, с тонкими, плотно сомкнутыми стенками. В некоторых местах стенки пересечены узкими канальцами – порами, которые посередине перегорожены невидимой в световой микроскоп мембраной. В клетке хорошо видно ядро с ядрышком. Ядро окружено цитоплазмой, составляющей так называемый ядерный кармашек, соединенный тяжами с постенным слоем цитоплазмы. Тяжи цитоплазмы пересекают вакуоль в разных направлениях. В цитоплазме встречаются капли эфирных масел, а в вакуолях – мелкие кубические или призматические кристаллы щавелевокислого кальция.

Основная литература

Ченцов Ю. С. Общая цитология. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. С. 32–34.

Дополнительная литература

Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 1.

Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980.

З а н я т и е 2

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ КЛЕТКИ

Цель работы: изучить основы цитохимических методов, ознакомиться со свойствами базофилии и оксифилии клеточных структур. Овладеть навыками работы с темнопольным конденсором и фазово-контрастным устройством.

Оборудование: 1. Микроскоп. 2. Осветитель. 3. Предметное и покровное стекла. 4. Пипетка. 5. Марлевая салфетка. 6. Препаровальная игла. 7. Пинцет. 8. Конденсор темного поля. 9. Фазово-контрастное устройство.

Реактивы: 1. Иммерсионная жидкость. 2. Вода.

Объекты: 1. Постоянный препарат «Кровь лягушки». 2. Чешуя лука репчатого.

Задание

1. Изучить и зарисовать клетки крови лягушки (эритроциты, эозинофиллы, лимфоциты, тромбоциты). Использовать для рассмотрения препарата метод иммерсии. Отметить ядро и цитоплазму. Указать базофильные и оксифильные структуры клетки и с чем связаны их свойства.

2. Ознакомиться с методом изучения клетки с помощью метода темного поля. Сделать описание метода.

Препарат № 2

Мазок крови лягушки

Большинство клеток мазка принадлежит эритроцитам. Они имеют овальную форму и плотное ядро, интенсивно окрашивающееся гематоксилином в сине-фиолетовый цвет. Цитоплазма этих клеток красится эозином в оранжево-красный цвет за счет гемоглобина, растворенного в цитоплазме этой клетки.

Кроме эритроцитов в мазке крови встречаются лейкоциты: из них эозинофилы – округлые клетки, по величине превышающие эритро-

циты с 3–4-сегментным плотным ядром и ярко-оранжевой зернистостью в цитоплазме. Часто попадает и другая разновидность лейкоцитов – лимфоциты. Это округлые клетки, более мелкие, чем эозинофилы с плотно округлым ядром и узкой каймой голубой (базофильной) цитоплазмы. Часто эти клетки имеют короткие, неправильной формы псевдоподии. Похожи на лимфоциты по строению и окраске – тромбоциты, которые отличаются более правильной овальной формой.

Основная литература

Ченцов Ю. С. Общая цитология, М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. С.17–41.

Дополнительная литература

Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 1.

Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980.

З а н я т и е 3

ОБЩИЙ ПЛАН СТРОЕНИЯ ЭУКАРИОТНЫХ КЛЕТОК

Цель работы: изучить общие признаки растительных и животных клеток и особенности в их строении, связанные с выполняемой функцией.

Оборудование: 1. Микроскоп. 2. Осветитель. 3. Предметное и покровное стекла. 4. Пипетка. 5. Марлевая салфетка. 6. Препаровальная игла. 7. Стеклянная палочка. 8. Таблицы «Строение растительной клетки» и «Строение животной клетки».

Реактивы: 1. Вода. 2. Ацетокармин.

Объект: лист элодеи канадской.

Задание

1. Приготовить временный препарат листа элодеи. Рассмотреть и зарисовать строение клетки. Отметить форму клеток, ядро, цитоплазму, хлоропласты и вакуоли.

2. Приготовить препарат клеток плоского эпителия полости рта человека. Провести окраску ацетокармином. Изучить и зарисовать строение клеток. Отметить размеры и форму клеток, строение ядра и цитоплазмы.

3. Указать различия в строении растительной и животной клеток, заполнив таблицу, и объяснить причины этих различий.

Препарат № 3

Строение клеток листа элодеи

Оторванный от стебля лист кладут нижней стороной в каплю воды на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и рассматривают при малом и большом увеличении микроскопа. Лист элодеи значительно больше поля зрения микроскопа, поэтому даже при работе с малым увеличением препарат приходится передвигать. Лист состоит из двух слоев клеток, причем клетки верхнего слоя, обращенного к наблюдателю, крупнее клеток нижнего слоя. Уже при малом увеличении обращает на себя внимание неравномерная окраска листовой пластинки, в середине которой вдоль листа располагается «средняя жилка», состоящая из более светлых клеток. Краевые клетки листа почти прозрачные. Некоторые клетки выступают наружу в виде острых зубчиков с концами, обращенными к верхушке листа. В клетках основания листовой пластинки зубцов нет. Наружные стенки зубчиков очень толстые, красновато-бурые.

Параллельно «средней жилке» вдоль листа проходят узкие темные полосы разной длины. Они представляют собой систему межклетников – пространств между клетками верхней и нижней сторон листа, заполненных воздухом. Под микроскопом межклетники выглядят темными из-за большой разницы в показателях преломления света воздуха ($n=1$) и клеточных оболочек ($n=1,5$). Когда вода, показатель преломления света которой близок показателю преломления оболочек ($n=1,33$), войдет в межклетники через поврежденные места и вытеснит из них воздух, межклетники станут незаметными.

Ознакомившись с общим планом строения листа, следует более детально рассмотреть особенности слагающих его клеток при большом увеличении. Клетки имеют тонкие прозрачные стенки, плотно соединенные между собой. Размеры, форма клеток, а также число содержащихся в них зеленых пластид – хлоропластов варьируют.

Клетки «средней жилки» узкие, сильно вытянутые по длине листа, пластид в них немного, большинство из них располагается вдоль боковых стенок. Очертания этих пластид овальные.

Клетки, прилегающие к «средней жилке», более широкие, квадратные, многоугольные или продолговатые. В клетках много пластид, в плане они округлые, в боковой проекции – овальные или эллиптические. Ядро, цитоплазма и вакуоль в клетке не видны, так как

показатели преломления света всех этих структур примерно одинаковы. Ядро становится заметным, если лист обработать раствором йода в водном растворе йодида калия, однако следует помнить, что этот реактив убивает клетку.

О наличии цитоплазмы и условных границах клеточной вакуоли можно судить лишь по перемещению пластид, происходящему вдоль клеточных стенок по часовой или против часовой стрелки, что характерно для кругового, или ротационного, движения. В таких клетках цитоплазма, окружающая крупную центральную вакуоль, занимает постенное положение. В клетках только что оторванного листа цитоплазма обычно не движется или движется очень медленно, но спустя несколько минут движение становится хорошо заметным сначала в клетках средней жилки, а затем и в прилегающих к ней клетках.

Клетки, расположенные по краю листовой пластинки, вытянуты в длину, но значительно короче клеток «средней жилки». Их наружные стенки толще внутренних. Клетки бедны содержимым, находящиеся в них немногочисленные пластиды значительно мельче, чем в остальных клетках. При внимательном рассмотрении в краевых клетках, в том числе и в зубцах, можно видеть ядра, представляющие собой светлые мелкозернистые тельца. Ядро, расположенное в середине клетки, обычно шаровидное, ядро, прижатое к стенке клетки, – полусферическое.

Препарат № 4

Клетки плоского эпителия полости рта человека

Для того чтобы приготовить препарат, достаточно стерильным стеклянным шпателем провести с легким нажимом по небу или деснам. При этом на кончике шпателя в капельке слюны окажутся слущенные клетки эпителия, выстилающего полость рта. Для того чтобы лучше рассмотреть особенности строения клеток эпителия, их можно окрасить ацетокармином.

На препарате видны плавающие в жидкости отдельные крупные плоские клетки, содержащие ядра, окрашенные красителем сильнее, чем цитоплазма. Так как поверхностные клетки покровного эпителия являются высокодифференцированными клетками, в которых затухают синтетические процессы, в ядрах этих клеток отсутствуют ядрышки или они очень мелкие.

Если взять соскоб этих клеток у женщины, то в ядрах многих клеток можно увидеть так называемые тельца Барра – это не что иное, как половая X-хромосома в интерфазном ядре (половой хроматин) – плотный участок хроматина, прилежащий непосредственно к периферии ядра. В цитоплазме живых клеток можно также видеть множество мелких гранул – митохондрий и мелких пузырьков.

После изучения препаратов составляют таблицу:

Характерные признаки строения растительных и животных клеток

Признаки	Растения	Животные

Основная литература

Ченцов Ю. С. Общая цитология. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. С. 6–16.

З а н я т и е 4

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ПРОКАРИОТНЫХ КЛЕТОК

Цель работы: изучить особенности строения прокариотных клеток, овладеть элементарными навыками приготовления специальных препаратов бактерий.

Оборудование: 1. Микроскоп. 2. Осветитель. 3. Предметное и покровное стекла. 4. Пипетка. 5. Марлевая салфетка. 6. Спиртовка. 7. Спички.

Реактивы: 1. Иммерсионная жидкость. 2. Вода. 3. Генциан-виолет. 4. Метиленовый синий.

Объекты: 1. Культура бактерий. 2. Микрофотографии.

Задание

1. Приготовить мазок зубного налета полости рта человека. Изучить и зарисовать бактериальные клетки разной формы.

2. Приготовить прижизненный препарат бактерий. Изучить характер движений представителей разных групп бактерий.

3. По электронным микрофотографиям сделать рисунок-схему

строения прокариотной клетки. Отметить оболочку, плазмолемму, мезосому, хроматофоры, нуклеоид, рибосомы.

4. Представить различия в строении прокариотной и эукариотной клеток в виде таблицы.

Препарат № 5

Бактериальный мазок полости рта человека

Для изучения бактериальной клетки с помощью светового микроскопа широко используется метод фиксированных окрашенных препаратов (метод мазка).

Для приготовления препарата необходимо:

1. Снять налет с зубов и, поместив его в каплю воды, растереть на предметном стекле. Подсушить мазок на воздухе.

2. Зафиксировать мазок. Для этого провести препарат над пламенем горелки 5–6 раз. В процессе фиксации бактерии погибают, а мазок прочно прикрепляется к поверхности стекла.

3. На остывший препарат нанести каплю красителя генциан-виолета и выдержать в течение 1 мин. Не допускается высыхание.

4. Окунуть препарат в стакан с водой или промыть из капельницы. Протереть препарат снизу фильтровальной бумагой и подсушить на воздухе.

5. Нанести на препарат иммерсионное масло и рассматривать с помощью объектива ×90 без покровного стекла.

На полученном препарате хорошо заметны бактериальные клетки разной формы: шаровидные – кокки, палочковидные – бациллы, извитые в виде запятой – вибрионы.

Пояснения к изучению электронных микрофотографий бактериальной клетки

Найти на фотографии оболочку бактериальной клетки, сделать заключение о принадлежности данной бактерии к группе Грам+ или Грам–.

Цитоплазма бактериальной клетки на фотографии темная, зернистая, на ее фоне в центре клетки выделяется светлая зона – нуклеотид. Следует обратить внимание на мезосомы, хорошо просматривающиеся в нескольких клетках. Расположение мезосом в разных клетках различно, что указывает на их разнообразие. При делении мезосомы располагаются посередине между дочерними, не полнос-

тью разошедшимися клетками. Сделайте заключение о функции мезосом в этом случае.

После изучения препаратов и микрофотографий составьте таблицу сравнительного строения прокариотных и эукариотных клеток.

Характерные признаки строения прокариотных и эукариотных клеток

Признак	Прокариоты	Эукариоты

Основная литература

Ченцов Ю. С. Общая цитология. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. С. 7–11, 183–187.

Заварзин А. А., Харазова А. Д. Основы общей цитологии. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. С. 54–57.

З а н я т и е 5

ПОВЕРХНОСТНЫЙ АППАРАТ КЛЕТКИ

Цель работы: изучить строение поверхностного аппарата клеток растений и животных, межклеточные взаимодействия в животной клетке. Познакомиться со свойством полупроницаемости плазматической мембраны.

Оборудование: 1. Микроскоп. 2. Осветитель. 3. Предметное и покровное стекла. 4. Пипетка. 5. Марлевая салфетка. 6. Препаровальная игла. 7. Пинцет. 8. Таблицы.

Реактивы: 1. Иммерсионная жидкость. 2. Вода. 3. Раствор NaCl (6–8 %)

Объекты: 1. Лист валлиснерии. 2. Чешуя лука репчатого. 3. Постоянный препарат «Тонкая кишка». 4. Электронные микрофотографии.

Задание

1. Изучить и зарисовать эпителиальные клетки тонкой кишки. Отметить «щеточную каемку», ядро с ядрышками и цитоплазму. Рассмотреть электронные микрофотографии микроворсинок, нарисовать схему их ультрамикроскопического строения.

2. Провести реакцию на плазмолиз и деплазмолиз в клетках эпидермиса валлиснерии и лука. Сравнить характер плазмолиза и зарисовать плазмолизованные клетки.

3. По рисункам и электронным микрофотографиям изучить и зарисовать различные клеточные контакты (простой, десмосома, плотный, щелевидный), сделать их описание.

Препарат № 6

«Тонкая кишка»

Внутренняя поверхность кишечной трубки выстлана эпителием. Эпителий кишечника состоит из цилиндрических всасывающих и бокаловидных секреторирующих клеток. В световой микроскоп на апикальной поверхности клеток всасывающего эпителия видна структура, получившая название «щеточной каемки». Она видна при любом способе фиксации и любой окраске препарата, однако железный гематоксилин позволяет получить наиболее четкую картину.

«Щеточная каемка», покрывающая каждую эпителиальную клетку, представляет собой довольно толстый слой. Данная структура является дифференцировкой клеточной мембраны, связанной с увеличением всасывающей поверхности каждой клетки. Электронный микроскоп показал, что «щеточная каемка» состоит из большого количества микроворсинок.

Ультраструктура «щеточной каемки»

Электронная микроскопия показала, что апикальная поверхность клетки кишечника покрыта многочисленными выростами плазмолеммы. Эти выросты получили название микроворсинок, они-то и образуют «щеточную каемку». Длина микроворсинок всасывающего эпителия колеблется от 1 до 3 мкм, диаметр их равен 0,1–0,2 мкм. Благодаря микроворсинкам поверхность всасывающего эпителия увеличивается в несколько десятков раз.

Предлагается рассмотреть микрофотографию фрагмента «щеточной каемки». На фотографиях видно, что микроворсинки представляют собой тесно расположенные пальцевидные выросты. Внутри микроворсинок содержатся микрофиламенты, которые в некоторых случаях правильно гексагонально упакованы. Природа микрофиламентов – активная.

На поверхности микроворсинок обнаружена сеть волоконцев, непосредственно переходящих во внешний слой плазмолеммы. Эта войлочная структура представляет собой гликокаликс. Характерным для гликокаликса является наличие в нем мукополисахаридов.

Препарат № 7

Физиологические свойства цитоплазмы и клеточного сока на примере клеток листа валлиснерии и чешуи лука

Рассмотрев и зарисовав строение клеток, следует ознакомиться с некоторыми физиологическими особенностями цитоплазмы и клеточного сока, которые можно продемонстрировать, поместив лист растения в концентрированный (гипертонический) раствор веществ, не оказывающих вредного действия на клетки. Для этой цели обычно используют 6–8%-й водный раствор хлорида калия или натрия, сахарозы или других нейтральных веществ. Каплю из этих растворов наносят на предметное стекло вплотную к покровному стеклу, под которым в воде находится кожица листа валлиснерии. С противоположной стороны также вплотную к покровному стеклу кладут полоску фильтровальной бумаги, которая должна оттягивать воду. Чтобы раствор быстрее вошел под покровное стекло, предметное стекло можно слегка наклонить.

Рассматривая лист под микроскопом, можно видеть, что сначала в краевых, а затем и в остальных клетках протопласт начинает сжиматься и отходить от клеточных стенок. Этот процесс отделения протопласта от стенок клетки называют плазмолизом. В большой степени он объясняется явлениями осмоса и диффузии. Однако поступление и выход в клетку и из клетки нельзя объяснить только явлениями диффузии и осмоса. Это активные процессы, в осуществлении которых участвует вся коллоидная система цитоплазмы.

Если клетка помещена в среду, осмотическое давление которой выше осмотического давления, а следовательно, и тургорного давления самой клетки, то вода из вакуоли будет выходить через цитоплазму и оболочку наружу. Плазмолемма и тонопласт, обладающие эластичностью, при этом сокращаются, плазмолемма отходит от стенок клетки – происходит плазмолиз. Характер плазмолиза определяется вязкостью цитоплазмы. У валлиснерии, как и у большинства водных

растений с низкой вязкостью цитоплазмы, наблюдается выпуклый плазмолиз, при котором цитоплазма более или менее равномерно отходит от клеточных стенок.

Цитоплазма в клетках кожицы лука более вязкая, чем у водных растений. О высокой вязкости цитоплазмы можно судить по характеру плазмолиза. Во многих клетках плазмолиз вогнутый. Отошедшие от стенок искривленные участки протопласта обращены к стенкам вогнутыми сторонами. В некоторых местах протопласт связан с клеточными стенками тонкими цитоплазматическими тяжами – «нитеями Гехта», часть которых со временем разрывается. Лучше всего наблюдать плазмолиз в клетках лиловых чешуй лука. Окраска чешуй обусловлена наличием в клеточном соке водорастворимого пигмента – антоциана. По мере выхода из вакуоли воды концентрация пигмента увеличивается и окраска клеточного сока становится интенсивнее.

Плазмолизованную клетку можно вернуть в первоначальное состояние, заменив гипертонический раствор, в котором находится лист, водой. В этом случае клеточный сок, осмотическое давление которого окажется выше, чем в окружающей среде, будет активно всасывать воду, объем вакуоли увеличится, цитоплазма окажется отесненной к стенкам клетки – произойдет деплазмолиз.

Пояснения к изучению клеточных контактов

Простые клеточные контакты

В наиболее простом случае, когда клетки, образующие пласт, контактируют между собой без образования каких бы то ни было специфических структур, обычно бывают видны плазмолеммы двух прилежащих клеток и межклеточное пространство между ними. На большом своем протяжении связь между этими клетками осуществляется путем простых контактов. В местах изгиба поверхности одной клетки ее повторяет и соседняя клетка.

Помимо таких простых контактов существуют специальные приспособления, скрепляющие клетки друг с другом. В самом простом случае – это так называемые замки, или образования в виде складок. Эти складки возникают за счет того, что мембраны клетки образуют глубокие изгибы и изгиб поверхности одной клетки повторяется поверхностью соседней клетки.

Помимо замков имеются специальные, значительно более сложные структуры, сцепляющие клетки друг с другом, – так называемые десмосомы.

Десмосомы

Десмосомы представляют собой специальные структуры, обеспечивающие связь клеток друг с другом. В одних случаях между клетками образуется десмосомоподобная структура значительной протяженности. В других – на определенном участке контакта двух клеток со стороны клеток к плазмолемме прилежат плотные структуры – диски, от которых отходят микрофиламенты. В межклеточном пространстве на данном отрезке поверхности клеток формируется слоистое цементирующее вещество. Протяженность десмосом такого типа бывает различной.

В несколько более сложных случаях десмосомы образуются на выростах двух клеток, обращенных друг к другу. В таких десмосомах четко представлены все присущие данным образованиям компоненты. Особенно резко выступает электронноплотное вещество, образующее диски, за которые зацепляются тонкие фибриллы.

Наконец, иногда вырост одной клетки повторяется углублением соседней и в месте контакта бывают видны все компоненты десмосом.

Плотный контакт

Плотный контакт – это зона, где внешние слои двух плазматических мембран максимально сближены. При этом интегральные белки наружной цитоплазматической мембраны одной клетки соединяются с соответствующими интегральными белками плазмолеммы другой клетки. При хорошем разрешении микроскопа видно, что слияние мембран происходит не по всей площади контакта, а представляет собой ряд точечных слияний мембран. Такой контакт непроницаем для макромолекул и ионов.

Щелевидный контакт

В зоне щелевидного контакта плазматические мембраны разделены промежутком в 2–3 нм. Функциональная роль щелевидного контакта заключается в передаче молекул и ионов от клетки к клетке. Осуществляется такая передача с помощью специальных белковых комплексов – коннексонов. Коннексоны двух соседних клеток контактируют друг с другом. Образующий ими канал позволяет молеку-

лам, чьи размеры не превышают 1,5 нм в диаметре, свободно проходить из цитоплазмы одной клетки в другую. Щелевидные контакты встречаются во всех типах тканей.

Основная литература

Заварзин А. А., Харазова А. Д. Основы общей цитологии. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. С. 23–66.

Ченцов Ю. С. Общая цитология. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. С. 151–176.

Дополнительная литература

Болдырев А. А. Биологические мембраны и транспорт ионов. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1985.

Лишко В. К., Шевченко М. И. Мембраны и жизнь клетки. Киев: Наукова думка, 1987.

Межклеточные взаимодействия / Р. А. Азарниа, К. Де-Мелло, Д. А. Дос и др. М.: Медицина, 1980.

Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 1.

Строение клеточных мембран / К. П. Барна, Л. Е. Пашенко, И. И. Адали, З. И. Фабри. Ужгород, 1984.

Хоматовский А. А. Структура и функции примембранных слоев клеток (гликокаликс). Киев: Наукова думка, 1984.

З а н я т и е 6

ОБОЛОЧКА РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Цель работы: изучить микроскопическое и ультрамикроскопическое строение оболочки растительной клетки и познакомиться с ее видоизменениями. Овладеть навыками цитохимической реакции на одревеснение клеточной оболочки.

Оборудование: 1. Микроскоп. 2. Осветитель. 3. Предметное и покровное стекла. 4. Пипетка. 5. Марлевая салфетка. 6. Препаровальная игла. 7. Фильтровальная бумага. 8. Таблица «Оболочка растительной клетки».

Реактивы: 1. Раствор флороглюцина или резорцина. 2. Концентрированная соляная кислота. 3. Вода.

Объекты: 1. Постоянный препарат «Эндосперм хурмы». 2. Постоянный препарат «Лубяные волокна льна и конопли, продольное сечение». 3. Плоды дикой груши. 4. Микрофотографии.

Задание

1. Рассмотреть и зарисовать клетки эндосперма хурмы. Обозначить первичную оболочку, плазмодесменные каналы, протопласт.
2. Изучить строение клеток волокон льна в продольном разрезе. Зарисовать и отметить форму клеток, слоистость, штриховатость и поры клеточной оболочки.
3. Изучить и зарисовать каменные клетки околоплодника груши. Отметить форму клеток, слоистость клеточной оболочки, форму и строение пор. Провести и описать реакцию на одревеснение клеточной оболочки.
4. Рассмотреть на микрофотографиях ультраструктуру первичной и вторичной оболочек растительной клетки, зарисовать схему строения плазмодесм.

Препарат № 8

Эндосперм хурмы

Клетки эндосперма в очертании многоугольные, соединены плотно, без межклетников. Они имеют очень толстые оболочки, между которыми обычно хорошо заметны межклеточные пластинки. По происхождению оболочка клеток первичная. Толщина оболочек обусловлена мощным отложением в них гемицеллюлозы как вещества запаса. Во многих клетках видны пересекающиеся оболочки группы тонких канальцев с плазмодесмами, соединяющими протопласты соседних клеток.

Препарат № 9

Лубяные волокна льна на продольном сечении

Волокна представляют собой клетки, длина которых во много раз превышает их диаметр. Концы клеток заострены. Такие клетки называют прозенхимными.

С особенностями расположения макрофибрилл целлюлозы, слагающих оболочку, можно познакомиться на отпрепарированных (выделенных из стебля) волокнах. Наиболее широкое свободно лежащее волокно рассматривают при большом увеличении микроскопа.

Оболочка характеризуется косой исчерченностью, обусловленной спиральным или винтовым расположением параллельных фибрилл целлюлозы вокруг продольной оси клетки, причем завитки спиралей

сильно растянуты. Косую исчерченность оболочек обычно называют штриховатостью или полосатостью. Темные штрихи представляют собой межфибриллярные пространства, заполненные обводненным матриксом из пектиновых веществ и гемицеллюлозы, сильно преломляющими свет. Полость клетки волокон представляет канал. В оболочке волокон можно обнаружить простые поры, представляющие собой канал, идущий от полости клетки сквозь оболочку.

Препарат № 10

Каменные клетки околоплодника груши

Каменные клетки представляют собой клетки с сильно утолщенными слоистыми одревесневшими вторичными оболочками, имеющими многочисленные поровые каналы.

Группы таких клеток встречаются в мякоти плодов груши. Особенно много их в плодах дикорастущих деревьев или культурных сортов с жесткими плодами. Из кусочков таких плодов, фиксированных в спирте, делают мацерированный в воде препарат и накрывают его покровным стеклом. Группы каменных клеток с сероватыми, очень толстыми, твердыми оболочками хорошо выделяются на фоне крупных, довольно прозрачных, тонкостенных клеток, составляющих сочную мякоть плода. Твердость оболочек этих клеток обусловлена наличием в них лигнина, вызывающего одревеснение. Реактивом, позволяющим определить присутствие в оболочках лигнина, служит 0,5–1%-й спиртовой раствор флороглюцина. Взаимодействуя с лигнином, он образует соединение, которое, реагируя с соляной кислотой, приобретает малиново-красный цвет.

После проведения реакции группы склерид с красными оболочками можно видеть даже невооруженным глазом. Для выявления одревесневших оболочек вместо флороглюцина можно использовать раствор резорцина, от которого одревесневшие оболочки становятся фиолетовыми.

Рассматривая препарат, следует обратить внимание на изодиаметрическую форму клеток, размеры которых во всех направлениях примерно одинаковы, что характерно для паренхимных клеток. Такие каменные клетки называют брахисклереидами. Толстая одревесневшая вторичная оболочка этих клеток имеет хорошо выраженную слоистость. Полости клеток очень малы, содержимого в них нет – каменные клетки мертвые.

В радиальном направлении оболочки пересечены многочисленными узкими поровыми каналами. Если клетки расположены в одной плоскости, то можно видеть, что поровый канал одной клетки является продолжением канала соседней клетки. Границей между ними служит поровая мембрана. Поровые каналы иногда ветвистые. Если оболочку клетки рассматривать не в разрезе, а с поверхности, то поровые каналы имеют округлые или овальные очертания.

Реакция на одревеснение

1. На срезы, находящиеся на предметном стекле, наносят каплю раствора флороглюцина (если срезы были в воде, ее удаляют фильтровальной бумагой).

2. Через 0,5–1 мин, оттянув флороглюцин фильтровальной бумагой, на срезы наносят каплю дымящей соляной кислоты. Через 1–2 мин ее также удаляют фильтровальной бумагой,

3. Срезы заключают в глицерин и накрывают покровным стеклом. Глицерин обладает просветляющими свойствами, кроме того, он препятствует попаданию паров хлористого водорода на металлические части микроскопа, предохраняя их от коррозии.

Основная литература

Ботаника. Морфология и анатомия растений / А. Е. Васильев, Н. С. Воронин, А. Г. Еленевский и др. М.: Просвещение, 1988. С. 78–93.

Лотова Л. И. Морфология и анатомия высших растений. М.: Эдиториал УРСС, 2000. С. 45–51.

Дополнительная литература

Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 1.

Атлас ультраструктуры растительной клетки / Под ред. Г. И. Козубовой, М. Ф. Даниловой. Петрозаводск, 1972.

З а н я т и е 7

ПЛАСТИДЫ

Цель работы: изучить строение разных типов пластид под световым и электронным микроскопами.

Оборудование: 1. Микроскоп. 2. Осветитель. 3. Предметное и покровное стекла. 4. Пипетка. 5. Марлевая салфетка. 6. Препароваль-

ная игла. 7. Пинцет. 8. Бритвенные лезвия. 9. Таблицы «Пластиды», «Ультраструктура хлоропластов».

Реактивы: 1. Иммерсионная жидкость. 2. Вода.

Объекты: 1. Лист сансевьеры. 2. Лист традесканции. 3. Плоды рябины, шиповника, кизильника. 4. Микрофотографии.

Задание

1. Рассмотреть и зарисовать строение клеток мезофилла на поперечном срезе листа сансевьеры. Отметить оболочку клетки, цитоплазму, хлоропласты и грани в них. Подсчитать число хлоропластов в одной клетке.

2. Рассмотреть микрофотографии хлоропластов, зарисовать их ультраструктуру. Отметить двумембранную оболочку, строму, тилакоиды, грани, осмиофильные глобулы, зерна крахмала, рибосомы, ДНК.

3. Приготовить препарат эпидермиса листа традесканции. Рассмотреть и зарисовать клетку с ядром и лейкопластами, указать их расположение в клетке.

4. По электронным микрофотографиям зарисовать ультраструктуру лейкопластов. Отметить двумембранную оболочку, строму, тилакоиды.

5. Приготовить препарат мякоти плода рябины, шиповника, кизильника по выбору. Рассмотреть и зарисовать клетки паренхимы, отметить форму и окраску хромопластов.

6. Рассмотреть микрофотографии хромопластов, зарисовать их ультраструктуру. Отметить двумембранную оболочку, строму, тилакоиды, осмиофильные глобулы.

Препарат № 11

Поперечный срез листа сансевьеры

Срез делают параллельно поверхности листовой пластинки, рассматривают в воде или глицерине при малом и большом увеличении микроскопа.

Хлоропласты находятся в клетках мезофилла – ассимиляционной ткани листа. На срезах хлорофиллоносные клетки округлые, между ними хорошо заметны межклетники. В клетках много хлоропластов, имеющих правильную округлую форму. При малом увеличении они выглядят почти гомогенными, при большом кажутся зернистыми, так как сквозь прозрачную оболочку пластиды просвечивают

многочисленные граны. Граны очень мелкие (0,30–0,35 мкм в диаметре), поэтому их лучше рассматривать при максимальных увеличениях микроскопа, используя иммерсионный объектив. Пластиды имеют округлые или овальные очертания в зависимости от того, какой стороной они обращены к наблюдателю. Иногда встречаются пластиды с перетяжкой посередине, по которой в дальнейшем могло бы произойти разделение пластиды.

Ультраструктура хлоропластов

Электронномикроскопическое изучение показывает, что пластиды имеют оболочку, состоящую из двух мембран, разделенных небольшим промежутком. В строму погружены многочисленные граны, составленные большим числом дисковидных тилакоидов. На фотографиях видно, что пространства между двумя мембранами одного тилакоида и двумя соседними тилакоидами граны примерно одинаковы. Граны соединены тилакоидами стромы, которые имеют вид длинных прямых или слегка изогнутых двойных мембран. Некоторые из тилакоидов стромы разрезаны поперек или косо. В строме пластиды (матрикс) находятся многочисленные рибосомы, несколько осмиофильных глобул и отложения первичного, или ассимиляционного, крахмала. Такое строение пластид характерно для клеток ассимиляционной ткани.

Препарат № 12

Эпидермис листа традесканции

С нижней стороны листа традесканции снимают кусочек кожицы, кладут его на предметное стекло в каплю воды, накрывают покровным стеклом и рассматривают при малом и большом увеличении микроскопа.

Клетки кожицы крупные, тонкостенные, обычно многоугольные, плотно соединенные между собой. Почти во всех клетках хорошо заметны ядра. Ядро окружено цитоплазматическим ядерным кармашком, от него к постенному слою цитоплазмы отходят тяжи, толщина которых и число в клетках варьируют. Вокруг ядра и в цитоплазматических тяжах, пересекающих клетку, находятся мелкие шаровидные тельца – лейкопласты. Показатели преломления света у лейкопластов, ядра и цитоплазмы примерно одинаковы, поэтому пластиды лучше

рассматривать при почти закрытой диафрагме. Функция лейкопластов в клетках кожицы не ясна.

Кроме клеток эпидермиса можно видеть многочисленные устьица, представляющие собой две замыкающие клетки, обращенные одна к другой вогнутыми внутренними сторонами так, что между ними возникает межклетник – устьичная щель. Замыкающие клетки содержат хлоропласты. Четыре окружающие их околоустьичные клетки по строению почти не отличаются от остальных клеток кожицы.

Для рассматривания лейкопластов пригодны любые виды традесканции.

Ультраструктура лейкопластов

Для изучения ультраструктуры подходят электронные фотографии лейкопластов молодых, недифференцированных клеток любых растений, у которых лейкопласты не выполняют функцию запаса.

На фотографиях хорошо видны оболочки пластид, представленные двумя мембранами. От внутренней мембраны в строму отходят тилакоиды в виде двойных мембран. Они пересекают пластиду в разных направлениях, поэтому на фотографиях некоторые из них оказываются перерезанными.

Препарат № 13

Клетки околоплодника плода рябины

Небольшой кусочек мякоти зрелого плода рябины переносят препаровальной иглой в каплю воды на предметное стекло, слегка размешивают, чтобы на препарате не было комков, накрывают покровным стеклом и рассматривают при малом и большом увеличении микроскопа.

Созревание плодов обычно сопровождается разъединением клеток вследствие растворения находящихся между ними пектиновых веществ. Этот процесс называют мацерацией. Мацерированные клетки околоплодников имеют округлые, овальные или слегка угловатые очертания. Клетки очень тонкостенные, поэтому при приготовлении препарата покровное стекло надо опускать осторожно, чтобы на оболочках не образовались складки. Клетки богаты клеточным соком, однако границы между цитоплазмой и вакуолями, как правило, не видны. В цитоплазму погружены многочисленные желто-оранжевого цвета игольчатой формы пластиды – хромопласты.

У разных растений хромопласты различаются размерами и формой. Наиболее причудливые очертания характерны для хромопластов черноплодного кизильника. У этих растений при формировании хромопласта происходит кристаллизация каротина и образовавшиеся кристаллы растягивают строму пластиды. В клетках томатов наряду с пластидами, имеющими более или менее округлые очертания и содержащими небольшие кристаллы, встречаются и одиночные, видимо, не окруженные стромой довольно крупные кристаллы каротина.

Очень сильная кристаллизация каротина, который накапливается в хромопластах, происходит в клетках корнеплодов моркови, которые следует рассматривать на тонких поперечных или продольных срезах. Кристаллы обычно свободно лежат в цитоплазме клеток.

Ультраструктура хромопластов

Более детально со строением хромопластов можно познакомиться на примере клеток семязачатков томатов или лепестков лютика едкого.

В хромопластах лютика тилакоиды развиты слабо, в некоторых местах они расширены. В строме пластиды много осмиофильных глобул, образование которых происходит синхронно с разрушением внутренних мембран. Кристаллы каротина возникают не во всех пластидах.

В молодых хромопластах семязачатков томатов видны грани и зерна ассимиляционного крахмала, представляющие собой остатки внутренней структуры хлоропластов, из которых они развиваются. Кристаллы каротина крупные, на фотографии контуры кристаллов несколько сглажены.

Основная литература

Ботаника. Анатомия и морфология растений / А. Е. Васильев, Н. С. Воронин, А. Г. Еленевский и др. М.: Просвещение, 1988. С. 51–59.

Ченцов Ю. С. Общая цитология, М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. С. 235–247.

Заварзин А. А., Харазова А. Д. Основа общей цитологии. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. С. 54–57.

Дополнительная литература

Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 1.

Атлас ультраструктуры растительной клетки / Под ред. Г. И. Козубовой, М. Ф. Даниловой. Петрозаводск, 1972.

Цель работы: изучить строение митохондрий под световым и электронным микроскопами. Познакомиться с цитохимической реакцией на митохондрии.

Оборудование: 1. Микроскоп. 2. Осветитель. 3. Предметное и покровное стекла. 4. Марлевая салфетка. 5. Таблица «Митохондрии».

Реактивы: 1. Иммерсионная жидкость. 2. Вода.

Объекты: 1. Постоянные препараты: «Митохондрии в клетках печени», «Митохондрии в клетках почечных канальцев», «Митохондрии в клетках кишечного эпителия». 2. Микрофотография.

Задание

1. Изучить и зарисовать строение клеток печени – гепатоцитов. Отметить ядро, ядрышко, плазматическую мембрану, митохондрии, цитоплазму и липидные включения. Указать цитохимическую реакцию на митохондрии (реакция Альтмана).

2. Познакомиться со строением митохондрий в клетках кишечного эпителия и почечных канальцев (демонстрационные препараты).

3. По электронным микрофотографиям составить схему ультрамикроскопического строения митохондрий. Отметить наружную и внутреннюю мембраны, кристы, грибовидные тела, матрикс, рибосомы, ДНК.

4. Указать признаки, свидетельствующие об автономии митохондрий в клетке.

Препарат № 14

Митохондрии в клетках печени

При малом увеличении микроскопа в печени видны крупные клетки, имеющие многоугольную форму (5–6-угольную), которые располагаются не очень четко выраженными рядами (тяжами) – это гепатоциты. В каждой клетке имеется 1–2 ядра. Между рядами печеночных клеток часто встречаются широкие кровеносные капилляры с тонкими стенками, выстланными одним рядом веретенновидных клеток. Митохондрии в печеночных клетках следует рассматривать с иммерсионным объективом. В цитоплазме на желтоватом фоне четко выступают красно-розовые митохондрии, имеющие круглую фор-

му (окраска Альтмана). Митохондрии рассеяны в цитоплазме в виде одиночных тел, они нередко образуют скопления. Среди зернистых митохондрий изредка попадаются короткие палочки. Митохондрии могут выстраиваться в короткие цепочки из нескольких штук.

Ультраструктурная организация митохондрий

При применении электронного микроскопа было установлено, что митохондрии клеток печени отличаются от митохондрий клеток других органов тем, что они относительно бедны кристами и имеют плотный матрикс. Этот факт получил особое значение в раскрытии функционального значения органоида, особенно при сравнительной оценке дыхательной активности выделенных митохондрий из клеток разных органов. Оказалось, что митохондрии, содержащие меньше крист, имеют более низкую дыхательную активность и отличаются более низким уровнем окислительного фосфорилирования.

Гладкая наружная мембрана митохондрий близко подходит к внутренней мембране. Между ними видна очень узкая, светлая наружная камера. Кристы в митохондриях клеток печени представляют собой короткие, доходящие приблизительно до середины матрикса, выросты внутренней мембраны. Внутрикристное пространство светлое. Число крист невелико. Матрикс плотный; он структурирован и заполнен мелкими, неравномерно распределенными зернами. В отдельных митохондриях видны плотные включения округлой формы.

Электронномикроскопическое изучение митохондрий показывает, что наружная и внутренняя мембраны митохондрий отличаются по своей организации.

При использовании метода негативного контрастирования было обнаружено, что поверхность внутренней мембраны митохондрий покрыта однотипными глобулярными частицами. Диаметр таких частиц равен 8–10 нм. Каждая частица сидит на ножке, с помощью которой глобула прикрепляется к мембране митохондрий. Расположение частиц на мембране регулярно и повторяется через равные промежутки, на 1 митохондрию приходится от 10 000 до 100 000 таких частиц. Частицы были названы грибовидными тельцами, или элементарными структурными единицами митохондрий (F_1 -частицы).

Метод выявления митохондрий (по Альтману)

Для приготовления препаратов используют мелкие кусочки печени млекопитающих, при этом:

1. Проводят фиксацию кальций-формолом в течение 24 ч.
2. Промывают сутки проточной водой
3. Помещают в 3%-й двуххромовокислый калий на 48 ч в темноте.
4. Промывают сутки проточной водой.
5. С помощью заливки в парафин готовят срезы толщиной 4–5 мкм.
6. Проводят окрашивание кислым фуксином.
7. Дифференцируют окраску двумя спиртовыми растворами пикриновой кислоты.

Основная литература

- Ченцов Ю. С. Общая цитология. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. С. 218–235.
Заварзин А. А., Харазова А. Д. Основы общей цитологии. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. С. 102–115.

Дополнительная литература

- Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 1.

З а н я т и е 9

ВАКУОЛЯРНАЯ СИСТЕМА КЛЕТКИ

Цель работы: изучить ультраструктуру эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, строение лизосом под световым и электронным микроскопами. Познакомиться с основами цитохимических реакций на базофильность цитоплазмы, кислую фосфатазу и импергнацию тяжелыми металлами.

Оборудование: 1. Микроскоп. 2. Осветитель. 3. Марлевая салфетка. 4. Таблицы: «Аппарат Гольджи», «Лизосомы», «Эндоплазматический ретикулум».

Реактивы: 1. Иммерсионная жидкость. 2. Вода.

Объекты: 1. Постоянные препараты спинального ганглия. 2. Препарат реакции на кислую фосфатазу. 3. Микрофотографии.

Задание

1. Рассмотреть электронные микрофотографии и зарисовать схему ультраструктуры гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума. Указать, с чем связана базофильность эргастоплазмы.

2. Изучить и зарисовать нейроны спинального ганглия млекопитающих. Отметить аппарат Гольджи, ядро, ядрышко, цитоплазму, плазматическую мембрану.

3. Рассмотреть электронные микрофотографии аппарата Гольджи. Зарисовать схему ультраструктуры диктиосом.

4. Познакомиться с постоянным препаратом реакции на кислую фосфатазу в клетках печени, указать методику проведения реакции.

5. Рассмотреть электронные микрофотографии лизосом. Зарисовать схему образования и превращения лизосом в клетке.

Электронная микрофотография гранулярного эндоплазматического ретикулума в клетках печени

Под электронным микроскопом в цитоплазме паренхиматозных клеток печени обнаруживаются скопления каналов гранулярного эндоплазматического ретикулума, которые представляют собой «тельца Берга», описанные при светооптическом излучении препаратов. Вместе с этим в печеночной клетке часть цитоплазмы не содержит таких образований. В этих местах находятся сильно ветвящиеся каналы агранулярной эндоплазматической сети. Вблизи последних скапливается гликоген, который на электронных микрофотографиях выглядит в виде темных неправильных гранул диаметром 30–50 нм, часто собирающихся в скопления.

Препарат № 15

Аппарат Гольджи в спинальном ганглии млекопитающих

В спинальных ганглиях, или спинно-мозговых узлах, расположенных по ходу задних корешков спинного мозга, локализуются чувствительные нервные клетки. Они представляют собой первый нейрон рефлекторной дуги. Ганглий с поверхности одет соединительной капсулой, от которой внутрь узла проникают тонкие прослойки соединительной ткани. Крупные нейроны располагаются главным образом группами в периферических отделах узла.

В результате фиксации и импрегнации ганглия осмиевой кислотой при малом увеличении микроскопа видно, что нервные клетки выглядят по-разному. Некоторые из них оказываются сплошь окрашенными в черный цвет, а аппарат Гольджи виден в них очень плохо. На таких клетках не стоит останавливать внимание. Надо найти такие нейроны, в которых уже при небольшом увеличении были бы видны и ядро, и границы клетки, и светлая цитоплазма. На фоне светлой цитоплазмы таких клеток видны черные «ниши».

На препарате при работе с иммерсионным объективом видно следующее: в некоторых клетках на светлом фоне выделяется черная петлистая сеть, локализуемая вокруг ядра. Она состоит из изогнутых и анастомозирующих между собой нитей и перекладин. Иногда эта сеть вплотную прилегает к ядру, в других случаях она располагается несколько отступив от него.

В других клетках аппарат Гольджи не образует сплошной сети, а состоит из отдельных палочек, чешуек, фрагментов разнообразной формы, не связанных между собой. Такие отдельные черные структуры бывают разбросаны по всей цитоплазме клетки.

Ультраструктура аппарата Гольджи

На ультратонких срезах разнообразных клеток видно, что общий план строения этого комплекса одинаков. Это мембранный органоид, образующий стопку сплюснутых цистерн, окруженную мелкими вакуолями. Совокупность таких образований называется диктосомой. Независимо от объекта ультраструктура системы аппарата Гольджи складывается из этих компонентов (диктосом), развитых в большей или меньшей степени.

В клетках животных диктосомы располагаются плотными группами, как правило, вблизи ядра и образуют сетчатый аппарат. В клетках растений диктосомы располагаются диффузно по цитоплазме, поэтому с помощью светового микроскопа аппарат Гольджи увидеть нельзя.

Для строения диктосомы характерна полярность. Полус образования, или цис-полус, обращен к шероховатому эндоплазматическому ретикулуму, с которым он имеет генетическую связь. Полус созревания, или транс-полус, окружен секреторными вакуолями, которые образуют аппарат Гольджи.

Препарат № 16

Лизосомы в клетках печени мышцы

В результате проведения реакции на кислую фосфатазу в цитоплазме гепатоцитов обнаруживаются зерна черно-красного цвета, соответствующие местам проявления активности фермента. Этих зерен в клетках печени немного, и они четко выделяются на фоне светлой плазмы и соответствуют лизосомам. Купферовские клетки

(небольшие, удлинённой формы) целиком окрашиваются в черно-коричневый цвет, так как забиты лизосомами. В них нельзя различить ядер, в то время как в гепатоцитах ядра четко видны, однако их окраска не связана с кислой фосфатазой.

Электронная микрофотография лизосом в клетках печени

Для лизосом характерно то, что их окружает одинарная мембрана, а ультраструктура их очень разнообразна. В их скоплении представлены и первичные лизосомы (мелкие), и вторичные лизосомы (крупные). Первые, как правило, значительно меньших размеров по сравнению со вторыми и отличаются плотным гомогенным содержанием с узким светлым ободком по периферии. По мере дифференцировки лизосом в них появляются мелкие вакуоли. Эти лизосомы на фотографии крупные, без периферического ободка, с электронно-плотным содержанием, на фоне которого видны вакуоли. Эти вакуоли различной величины и электронной плотности и не всегда правильной формы.

Метод импрегнации для выявления аппарата Гольджи

Для выявления аппарата Гольджи в животной клетке используют нервную ткань (спинной мозг) млекопитающих.

1. Кусочки ткани фиксируют в смеси Шампи (1%-я хромовая кислота – 7 ч, 3%-й бихромат калия – 7 ч, 2%-й раствор четырехокси осмия – 4 ч).

2. Сутки промывают в проточной воде.

3. Импрегнируют 1%-м раствором четырехокси осмия в течение 6 дней при комнатной температуре и 6 дней – при температуре 37 °С в темноте.

4. Промывают 1 ч дистиллированной водой.

5. Стандартным способом получают тонкие микротомные срезы и приготавливают постоянные препараты. Аппарат Гольджи хорошо заметен в клетках в виде темных скоплений в центральной части клетки.

Реакция на кислую фосфатазу

Выявление фермента «кислая фосфатаза» основано на действии его на субстрат, содержащий остаток фосфорной кислоты. Чаще всего в качестве такого субстрата берут глицерофосфат натрия. В состав инкубационной смеси помимо глицерофосфата входит азотнокислый

свинец. Освобождаемая в результате действия фермента фосфорная кислота связывается свинцом с образованием нерастворимого в кислой среде фосфата свинца. Соль фосфата свинца неокрашенная, поэтому для проявления окраски проводят ионообменную реакцию с сульфидом натрия или аммония, при этом образуется темно-коричневый сульфид свинца. Таким образом, становится ясным, почему в местах проявления активности фермента появляется осадок сульфида свинца.

1. Фиксируют кусочки ткани кальций-формолом на холоде в течение 18 ч.

2. Промывают в проточной воде 2–3 ч.

3. Делают срезы на замораживающем микротоме.

4. Помещают срезы в инкубационную смесь глицерата натрия, ацетатного буфера, нитрата свинца на 30 мин–2 ч.

5. После промывки помещают в раствор сульфида натрия на 1–2 мин.

6. Закljučают срезы в глицерин-желатину.

Основная литература

Ченцов Ю. С. Общая цитология. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. С. 187–215.

Заварзин А. А., Харазова А. Д. Основы общей цитологии. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. С. 102–127.

Дополнительная литература

Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 1.

З а н я т и е 10

ВКЛЮЧЕНИЯ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

Цель работы: изучить разнообразие запасных веществ и способов их отложения в растительной и животной клетках.

Оборудование: 1. Микроскоп. 2. Осветитель. 3. Предметное и покровное стекла. 4. Марлевая салфетка. 5. Скальпель. 6. Пипетка. 7. Таблицы: «Крахмальные зерна», «Отложение крахмала и белка в семенах фасоли», «Кристаллы в растительной клетке».

Реактивы: 1. Иммерсионная жидкость. 2. Вода. 3. Спиртовой раствор йода.

Объекты: 1. Клубень картофеля (свежий). 2. Семена фасоли (замоченные в воде). 3. Постоянный препарат «Жировые включения в клетках печени». 4. Наружные чешуи луковицы репчатого лука, хранящиеся в глицерине. 5. Постоянный препарат «Гликоген в клетках печени».

Задание

1. Рассмотреть и зарисовать крахмальные зерна клубня картофеля. Отметить форму зерен, определить тип слоистости, сложения и возраст зерен.

2. Рассмотреть и зарисовать крахмальные и алейроновые зерна в семени фасоли. Провести цитохимическую реакцию на крахмал и белок. Отметить различия в строении крахмальных зерен картофеля и фасоли.

3. Рассмотреть и зарисовать жировые включения в клетках печени – аксалотля. Отметить различную форму жировых включений.

4. Рассмотреть постоянный препарат печени с реакцией на гликоген (окраска по методу Шабадаша). Зарисовать клетку, отметить плазмолемму, цитоплазму, глыбки гликогена, ядро.

5. Рассмотреть и зарисовать кристаллы в клетках наружных чешуй луковицы лука.

Препарат № 17

Крахмальные зерна в клубне картофеля

Для приготовления препарата нужно разрезать клубень. Небольшое количество выступившей на поверхности разреза мутной белой жидкости скальпелем или препаровальной иглой переносят на предметное стекло. При малом и большом увеличении микроскопа обычно хорошо видны многочисленные зерна, размеры и очертания которых очень варьируют. При широко открытой диафрагме они выглядят почти прозрачными, при несколько закрытой диафрагме контуры зерна и его структура видны более резко.

Центры образования крахмальных зерен обычно имеют вид сильно преломляющих свет блестящих точек, вокруг которых располагаются слои крахмала разной ширины. Если центр образования находится в середине округлой пластиды, то обычно возникают концентрические слои, если в наружной части стромы пластиды, – образуются эксцентрические крахмальные слои. Большинство зерен имеют по од-

ному центру образования. Такие зерна называют простыми. Четкая граница между отдельными слоями крахмала обусловлена различиями в показателях преломления света между внутренней и наружной зонами двух соседних слоев, что объясняется разной обводненностью этих зон. Крахмальное зерно картофеля формируется в течение нескольких дней. Если по каким-либо причинам в лейкопласт поступает мало сахаров, то образующийся в это время крахмал оказывается более обводненным. В каждом слое периферическая часть содержит больше воды, чем внутренняя, она сильнее преломляет свет, поэтому выглядит более темной.

Нередко в препарате можно видеть зерна с двумя центрами образования и больше (до пяти), каждый из центров окружен собственными крахмальными слоями. Такие зерна называют сложными. Часто в них видна трещина, по которой может произойти разделение зерен. Если вокруг каждого из формирующихся в лейкопласте зерен затем возникают общие слои, окружающие эти зерна, то образуется полусложное зерно.

Препарат № 18

Крахмальные и алейроновые зерна в клетках семядолей фасоли

Для изучения запасных веществ пригодны сухие семена, которые за одни сутки до занятий замачивают в воде, или семена, фиксированные спиртом.

Сняв семенную кожуру, с мясистых семядолей делают бритвой тонкий срез, кладут его в каплю воды на предметное стекло, добавляют раствор йода в растворе йодида калия и накрывают покровным стеклом. Под микроскопом рассматривают наиболее тонкую часть среза, где клетки лежат в один слой.

Семядоли состоят из довольно крупных округлых или овальных клеток, между которыми находятся межклетники. В клетках видны посиневшие от йода крахмальные зерна и многочисленные, заполняющие всю клетку очень мелкие угловатые зерна запасного белка (алеярона). От йода белок приобрел золотисто-желтый цвет. Некоторые клетки могут оказаться пустыми, так как при приготовлении среза из них нередко выпадает содержимое.

Вместо фасоли можно использовать семена гороха, кормовых бобов и других бобовых.

Препарат № 19

Жировые включения в клетках печени аксолотля

Жир в том или ином количестве может накапливаться в различных клетках животного организма. Иногда в клетках печени откладывается большое количество жировых включений. При обработке ткани четырехокисью осмия с последующей докраской срезов кармином или другим ядерным красителем видно, что в цитоплазме гепатоцитов локализуются черные (адсорбировавшие осмий) жировые капли. Эти капли могут быть разного размера, количество их тоже варьирует. Первоначально синтезированный в клетках жир откладывается в них в виде мельчайших капель. Эти капли, сливаясь между собой, образуют капли большого размера.

Препарат № 20

Включения гликогена в клетках печени

Печень представляет собой орган, в котором депонируются сахара и все время идут процессы синтеза и расщепления гликогена. При проведении реакции на гликоген (метод Шабадаша) в клетках паренхимы печени обнаруживается большое количество глыбок гликогена, окрашенных в красно-фиолетовый цвет. Глыбки имеют различную величину и форму. На периферии среза глыбки концентрируются ближе к одной из сторон клетки, а в центре среза они равномерно распределяются по всей цитоплазме клетки. Смещение гликогена представляет собой артефакт, связанный с проникновением фиксатора в клетку. В цитоплазме клеток, свободных от гликогена, видны пустые неокрашенные вакуоли различной величины. Они представляют собой полости, оставшиеся на месте жировых включений.

Препарат № 21

Кристаллы в клетках наружных чешуй луковицы репчатого лука

Большое количество кристаллов оксалата кальция находится в сухих пленчатых чешуях, окружающих снаружи луковицу. Снятые с луковицы мелко нарезанные чешуи длительное время выдерживают в глицерине. Для рассмотрения кристаллов кусочки этих чешуй переносят в глицерин на предметное стекло и накрывают покровным стеклом.

Чешуя состоит из нескольких слоев клеток, форма, размеры и ориентация которых в каждом слое сильно варьируют. Кристаллы оксалата кальция в клетках растений возникают как результат нейтрализации щавелевой кислоты, образующейся в процессе обмена веществ. В больших количествах щавелевая кислота $H_2C_2O_4$ действует на растение в связанной форме – в виде солей кальция, магния или калия. Такая связанная в виде оксалатов щавелевая кислота рассматривается обычно уже как отброс, могущий служить защитным средством от поедания животными. Моногидраты оксалата кальция $CaC_2O_4 \cdot H_2O$ представлены крупными одиночными кристаллами призматической формы, дигидраты $CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$ – сростками кристаллов, называемыми друзами и разгидами – игольчатыми кристаллами, составляющими плотные компактные почки, тригидраты $CaC_2O_4 \cdot 3H_2O$ имеют кубическую форму кристаллов.

Реакция на крахмал

Раствор йода в водном растворе йодида калия – реактив на крахмал – дает с ним сине-фиолетовое окрашивание.

На объект, находящийся на предметном стекле, наносят каплю реактива и накрывают покровным стеклом. Реактив действует моментально.

Реакция на гликоген (метод Шабадаша)

Метод выявления гликогена основан на том, что периодат калия или натрия при воздействии на полисахариды избирательно окисляет спиртовые группы до альдегидных, которые, реагируя с фуксинсернистой кислотой, дают красно-фиолетовое окрашивание.

1. Приготовленные срезы промывают в двух сменах дистиллированной воды.
2. Выдерживают 10–15 мин. в 0,01 М растворе периодата калия или натрия.
3. Промывают в 3 сменах дистиллированной воды.
4. Помещают в реактив Шиффа (специально приготовленный раствор фуксинсернистой кислоты) на 20–25 мин.
5. Промывают в трех сменах сернистой воды.
6. Промывают в трех сменах дистиллированной воды.
7. Закljučают срезы в бальзам.

Основная литература

Ботаника. Анатомия и морфология растений / А. Н. Васильев, Н. С. Воронин, А. Г. Еленевский и др. М.: Просвещение, 1988. С. 73–78.

Дополнительная литература

Эсау К. Анатомия семенных растений. М.: Мир, 1980. Т. 1.

З а н я т и е 11

ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА ЯДРА

Цель работы: познакомиться с гистохимическими реакциями на нуклеиновые кислоты и основами радиоавтографического метода изучения ядра.

Оборудование: 1. Микроскоп. 2. Осветитель. 3. Марлевая салфетка. 4. Таблицы: «Ультраструктура ядра», «Реакция на РНК».

Реактивы: 1. Иммерсионная жидкость. 2. Вода.

Объекты: Постоянные препараты: «ДНК печени», «РНК поджелудочной железы», «Метка ^3H -тимидин в клетках культуры СПЭВ», «Метка ^3H -уридин 15 мин», «Метка ^3H -уридин 2 ч».

Задание

1. Рассмотреть и зарисовать строение клетки печени. Отметить ядро, цитоплазму, ядрышко, гетерохроматин и эухроматин. Указать гистохимическую реакцию на ДНК (реакция Фельгена).

2. Рассмотреть и зарисовать строение клеток поджелудочной железы. Отметить ядро, ядрышко, цитоплазму. Указать гистохимическую реакцию на РНК (метод Браше).

3. Рассмотреть и зарисовать клетки культуры СПЭВ (почки эмбриона свиньи) с меткой ^3H -тимидина и ^3H -уридина через 15 мин и 2 ч после ввода метки. Отметить ядро, ядрышко, цитоплазму, зерна серебра.

Препарат № 22

Дезоксирибонуклеиновая кислота в ядрах клеток печени

Как известно, ДНК, заключающая в себе генетическую информацию, является основным и важнейшим химическим компонентом хромосомного материала. Реакция Фельгена позволяет не только иден-

тифицировать ДНК, но и представить ее внутриядерное распределение. Эта реакция была предложена Фельгеном и Россенбеком в 1922 г. в качестве специфической реакции на ДНК.

Под иммерсионным объективом следует рассмотреть структуру ядер печеночных клеток – гепатоцитов, которые составляют массу паренхимы печени. ДНК в ядрах окрашивается, а цитоплазма остается бесцветной, так как концентрация митохондриальной ДНК слишком невелика.

Гепатоцит – это довольно крупная клетка, на срезе имеющая прямоугольные или шестиугольные очертания. В центре клетки лежит одно округлое ядро, иногда встречаются двуядерные клетки. Ядра содержат множество красно-фиолетовых глыбок, зерен и тонкоструктурированную сеть. Так выражается неравномерность распределения ДНК, а значит и хроматина, по ядру. Часть глыбок располагается по периферии ядра. В ядрах гепатоцитов обычно одно-два ядрышка, которые, по Фельгену, не окрашиваются. По границе ядрышка лежат несколько крупных интенсивно окрашенных в пурпурно-фиолетовый цвет глыбок – так выявляется конденсированный околоядрышковый хроматин.

Реакция Фельгена относится к числу количественных методов, так как существует количественная зависимость между содержанием ДНК в ядре и интенсивностью окраски. Метод цитофотоспектрометрии позволяет определить степень окрашенности препарата и сравнить ее с эталоном, например гаплоидным ядром спермия, диплоидным ядром лимфоцита и др. Таким образом определяются относительные количества ДНК в ядре, которые чаще всего в соответствии с эталоном выражают в единицах пloidности. Измерение содержания ДНК в гепатоцитах показывает, что количества ДНК в них различаются в 2, 4, 8 раз и т. д., что соответствует ди-, тетра-, октаплоидному набору хромосом и говорит о том, что многие гепатоциты печени являются полиплоидными клетками. Интересно, что в гепатоцитах есть корреляция между размером ядра и количеством ДНК, поэтому, рассматривая препарат, можно выделить ядра различных классов пloidности.

Препарат № 23

Выявление РНК по Браше в клетках печени

В методе Браше используется окраска метиловым зеленым и пиронином, которые по разному адсорбируются на нуклеиновых кислотах. ДНК хроматина ядра окрашивается метиловым зеленым в зеленый цвет, РНК ядрышка и цитоплазмы окрашивается пиронином в розовый цвет. Метод Браше основан на сравнении двух препаратов. Первый препарат контрольный, второй обрабатывают РНК-азой (0,1 мг/мл, рН 5,5, 2 ч). Затем оба препарата окрашивают метиловым зеленым – пиронином. На контрольном препарате метиловый зеленый окрашивает ядро в зеленый цвет, пиронин окрашивает ядрышко и цитоплазму в розовый цвет. На препарате, обработанном РНК-азой, хроматин выглядит без изменений, ядрышко становится бесцветным, цитоплазма имеет очень слабое окрашивание в розовый цвет, так как пиронин окрашивает и углеводы. Только сравнение двух препаратов позволяет определить распределение РНК в клетке достаточно достоверно.

Препарат № 24

Печень эмбриона свиньи (СПЭВ)

Препарат представляет собой клеточную культуру, выращенную на специальной питательной среде. Клетки культуры, находящиеся на поверхности стекла, способны делиться до тех пор, пока не займут всю площадь и не образуют монослой.

При исследовании метода радиоавтографа для обнаружения молекулы ДНК используют нуклеотид тимидин, меченный изотопом тритий ^3H .

На препарате видны полигональные клетки культуры СПЭВ, которая зафиксирована сразу после 10-минутного контакта с ^3H -тимидином. Границы клеток заметны плохо. Хорошо видны округлые и овальные ядра, содержащие 1–3 ядрышка и мелкие глыбки хроматина. Над частью ядер видны черные гранулы восстановленного серебра фотоэмульсии (метки). Наличие этих меток говорит о том, что в ДНК этих ядер включился ^3H -тимидин, следовательно, эти клетки в момент контакта с меченым тимидином находились в синтетическом периоде клеточного цикла.

Препарат № 25

Автограф включения ^3H -уридина в ядрышко и выход метки в цитоплазму. Культура ткани СПЭВ

Ядрышко – клеточный органоид, обеспечивающий синтез рибосомных РНК. Этот факт установлен целой серией биохимических и цитологических экспериментов. Можно проанализировать один из простейших цитологических опытов, демонстрирующих участие ядрышка в синтезе цитоплазматических РНК.

Культуру ткани выращивают на покровных стеклах. В среду культивирования вводят предшественник синтеза РНК – ^3H -уридин в концентрации 10 мкюри/мл (уд. активность 10–20 кюри/мМоль). Через 10 мин фиксируют первый препарат. Остальные клетки отмывают от изотопа, трижды споласкивая в чистой среде культивирования, затем продолжают культивировать в среде, не содержащей радиоактивного предшественника. Затем препараты фиксируют через 20 мин, 1 и 2 ч. Для приготовления препаратов и получения автографа используют стандартную методику. Хорошим для демонстрации можно считать автограф, у которого над ядрами выявляются 20–30 зерен серебра. После получения автографа препарат красят метил-пиронином по Браше.

На автографе клеток, фиксированных через 10 мин (метка в виде зерен серебра располагается во всех клетках в основном над ядрышками), можно насчитать до 10–15 зерен, и отдельные зерна видны над кариоплазмой. Через 20 мин после импульсного мечения число зерен над кариоплазмой резко возрастает и достигает своего максимума через 1 ч. Значит, к этому сроку РНК, синтезированная в ядрышке, выходит в кариоплазму, однако часть меченой РНК остается в ядрышке. На автографах клеток, фиксированных через 2 и 4 ч, помимо ядрышка и ядер сильно меченой оказывается цитоплазма, интенсивность мечения которой превосходит ядерную метку. Таким образом, по расположению зерен серебра на автографах клеток, фиксированных через различные сроки после короткого пребывания изотопа в среде культивирования, можно проследить перемещение РНК, включившей радиоактивный предшественник, от места синтеза – ядрышка – к месту работы – в цитоплазму.

Реакция Фельгена на ДНК

В основе реакции Фельгена лежит мягкий кислотный гидролиз, при этом разрываются гликозидные связи между дезоксирибозой и пуриновыми основаниями (тимин и цитозин). После отщепления азотистого основания выявляется потенциальная альдегидная группа ($\text{OH}=\text{C}=\text{OH}$) при первом атоме углевода. Эта группа способна реагировать с фуксинсернистой кислотой так, что одна молекула фуксинсернистой кислоты соединяется с двумя молекулами потенциально альдегида. При этом в хроматине и только в нем развивается пурпурная или пурпурно-малиновая окраска.

1. Депарафинированные срезы опускают в 1 N HCl.
2. Выдерживают в 1 N HCl при 60 °C в течение 4–6 мин.
3. Споласкивают дистиллированной водой.
4. Выдерживают в фуксинсернистой кислоте (реактив Шиффа) 20–40 мин.
5. Промывают в 4 сменах сернистой воды.
6. Готовят постоянные препараты, заключая срезы в бальзам.

Выявление РНК (метод Браше)

Фосфатные группы нуклеиновых кислот при $\text{pH}=2$ имеют отрицательный заряд и реагируют с катионными группами основных красителей – на этом их свойстве основана базофилия. По методу Браше используют смесь двух основных красителей: метилового зеленого и пиронина. Пиронин, реагируя с фосфатными группами РНК и другими кислыми радикалами, окрашивает в клетке все кислые продукты в розовый цвет, кроме высокополимерной ДНК. Метилловый зеленый связывается только с ДНК, так как расстояние между двумя фосфатными остатками в молекуле ДНК соответствует расстоянию между двумя положительными зарядами в молекуле метилового зеленого.

1. Фиксируют кусочки поджелудочной железы в спиртовых фиксаторах.
2. Обычным способом пропитывают ткань парафином и получают срезы на микротоме.
3. Депарафинированные срезы окрашивают смесью метилловый зеленый – пиронин в течение 20–40 мин.
4. После покраски помещают препараты в изамиловый спирт на 1–2 мин.
5. Заключают срезы в бальзам.

Метод радиоавтографии

Применяя этот метод для обнаружения нуклеиновых кислот, используют радиоактивные изотопы трития – ^3H , которые в случае РНК включаются в нуклеотид уридин, а в случае ДНК – в нуклеотид тимидин. Период полураспада ^3H – 12,2 года, средняя длина пробега альфа-излучения в эмульсии 1 мкм.

1. Изотоп вводят в культуру клеток на 10–20 мин.
2. Клетки фиксируют, промывают и сушат.
3. Приклеивают бальзамом к покровным стеклам клетками вверх.
4. Наносят специальный фотоэмульсионный слой.
5. Проводят экспонирование в холодильнике при $t=4$ °C в течение 7–30 дней.
6. Проводят фотографическую обработку автографа.
7. Проводят дополнительную окраску препаратов по Браше.

Основная литература

Ченцов Ю. С. Общая цитология. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. С. 52–69.

Дополнительная литература

Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 2.

Збарский И. Б. Организация клеточного ядра. М.: Медицина, 1988.

Молекулярная биология: Структура и биосинтез нуклеиновых кислот / Под ред. А. С. Спирина. М.: Высш. шк., 1989.

З а н я т и е 12

ИНТЕРФАЗНОЕ ЯДРО

Цель работы: изучить микроскопическое и ультрамикроскопическое строение ядра клетки и интерфазных (политенных) хромосом.

Оборудование: 1. Микроскоп. 2. Осветитель. 3. Марлевая салфетка. 4. Таблицы: «Ультроструктура ядра», «Политенные хромосомы».

Реактивы: 1. Иммерсионная жидкость. 2. Вода. 3. Ацетокармин.

Объекты: 1. Постоянный препарат «Кариокинез в кончике корня лука». 2. Личинки мотыля (живые). 3. Микрофотографии ультроструктуры ядра.

Задание

1. Рассмотреть и зарисовать клетки меристемы растений в интерфазном состоянии. Отметить оболочку клетки, цитоплазму, ядро, ядрышко, гетерохроматин и эухроматин.

2. Приготовить препарат слюнных желез личинки мотыля. Рассмотреть и зарисовать политенные хромосомы. Отметить диски и междиски.

3. Рассмотреть микрофотографии ядер в растительных и животных клетках. Зарисовать схему ультраструктуры ядра.

Препарат № 26

Интерфазные клетки меристемы растений

Ядра растительных клеток по своей структуре отличаются от ядер клеток животных несколько иной упаковкой в них хроматина. В качестве объекта для наблюдения можно использовать кончик корня лука.

Под малым увеличением микроскопа в кончике корня можно видеть чехлик, состоящий из многоугольных уплотненных клеток и верхушечную образовательную ткань, представленную столбцами клеток в основном прямоугольных или близких к прямоугольным очертаний. Интересно, что клетки одного ряда представляют потомство одной клетки. Форма и структура ядер в меристематических клетках и клетках чехлика различны.

Под иммерсионным объективом в центре меристематической клетки видно крупное шаровидное или слегка вытянутое ядро с одним или двумя большими сферическими ядрышками. В отличие от ядер многих клеток животных организмов ядра клеток растений часто имеют в своем составе так называемую хроматиновую сеть. Она представляет собой скопление тонких нитей, очень плотных и интенсивно красящихся. Видны глыбки и зерна хроматина разных размеров. Крупные глыбки называют хромоцентрами. Некоторые хромоцентры располагаются вблизи ядрышка.

Ультраструктура ядра растительной клетки

Наиболее характерный для растительных клеток рисунок интерфазного ядра представлен на электронной микрофотографии. Ядро растительной клетки окружено ядерной оболочкой, состоящей из двух мембран, разделенных межмембранным пространством, и порового комплекса.

В ядре растительной клетки, так же как и в животной клетке, различают диффузный и конденсированный хроматин. В конденсированном хроматине элементарные хромосомные фибриллы толщиной 20–30 нм упакованы в толстые хроматиновые нити разного диаметра – хромонемы (хроматиновая сеть). В некоторых ядрах хромонемный характер конденсированного хроматина неотчетлив, видны не нити, а множество глыбок неправильной формы и разной величины. Выраженность хромонем, их толщина, морфологическая однородность связаны с положением клетки в митотическом цикле. Упаковка конденсированного хроматина в форме хромонем и его расположение не по всей внутренней поверхности ядерной оболочки характерны для тонкой организации ядра растительной клетки.

Препарат № 27

Ядра Бальбиани из слюнных желез двукрылых

Интенсификация ядерных синтетических процессов может сопровождаться специфической организацией генетического материала. Ярким примером такой особой структуризации ядра будут политенные хромосомы в ядрах Бальбиани, которые обнаруживаются в личиночных тканях различных представителей двукрылых (мошки, комары, мухи). Политенные хромосомы интерфазны, способны к синтетической деятельности. Они приобрели гигантские размеры и стали видимыми благодаря серии многократных редупликаций, элементарных хромосомных нитей, не сопровождающихся их расхождением. Знакомясь со строением политенных хромосом, можно получить представление о структуре хромосомных локусов, активных и неактивных в отношении синтеза РНК.

Выделение слюнных желез проводят под бинокулярной лупой. Личинку комара (мотыль) помещают на предметное стекло, придерживают пинцетом и острой бритвой отрезают первые два сегмента головного конца. При этом слюнные железы, имеющие вид мелких прозрачных беловатых телец овальной формы, выходят из тела личинки вместе с гемолимфой. Выделенные слюнные железы помещают в каплю гемолимфы на предметное стекло, что приводит к некоторому уплощению клеток и ядер. Рассматривать ядра следует после окраски ацетокармином. При малом увеличении видны сероватая мелкозернистая цитоплазма и очень большие ядра с крупными хромосомами и прозрачной кариоплазмой. Хромосом всего 4, что соот-

МИТОЗ В РАСТИТЕЛЬНЫХ И ЖИВОТНЫХ КЛЕТКАХ

Цель работы: изучить митотическое деление в растительной и животных клетках. Познакомиться с методами исследования митоза.

Оборудование: 1. Микроскоп. 2. Осветитель. 3. Марлевая салфетка. 4. Таблица «Кариокинез».

Реактивы: 1. Иммерсионная жидкость. 2. Вода.

Объекты: Постоянные препараты «Кариокинез в корне лука», «Митоз в дробящихся яйцах аскариды».

Задание

1. Рассмотреть и зарисовать фазы митотического деления в клетках апикальной меристемы корня лука. Дать краткую характеристику каждой фазы, определить относительную длительность фаз и вычислить митотический индекс. Подсчитать число хромосом.

2. Рассмотреть и зарисовать фазы митотического деления в яйцах аскариды. Отметить хромосомы, центриоли, сияние вокруг центриолей, веретено деления, оболочку яйцеклетки. Подсчитать число хромосом.

*Препарат № 28***Кариокинез в клетках корешка лука**

Деление клеток происходит в кончике корня, где располагается верхушечная образовательная ткань. При большом увеличении микроскопа в ней можно найти как неделящиеся клетки (стадия интерфазы), так и клетки во всех стадиях митоза.

В интерфазе клетки имеют прямоугольные очертания, окружены хорошо заметной оболочкой. Ядра округлые и овальные, в них видны 1–2 окрашенных в черный цвет округлых крупных ядрышка и мелкие глыбки хроматина.

В профазе в ядре заметны более крупные глыбки хроматина. Затем в результате дальнейшей конденсации хромосом в ядре появляется клубок вначале тонких, а позднее более толстых и коротких нитей. В ранней профазе еще хорошо заметны ядрышки и ядерная оболочка, а к концу профазы ядрышко и ядерная оболочка исчезают. Хромосомы в виде коротких нитей оказываются лежащими в центральной части цитоплазмы.

ветствует гаплоидному набору. При образовании хромосом помимо политенизации происходит соматическая конъюгация, заключающаяся в том, что гомологи объединяются попарно и число хромосом, равное 8, в диплоидном наборе соматических клеток становится в 2 раза меньше. На 4-й хромосоме, самой короткой, расположено ядрышко – крупное темное тельце неправильной формы.

Длина хромосом различна. Они часто переплетены между собой, образуя клубок. Работая микровинтом, можно проследить за строением каждой хромосомы. Хромосомы имеют вид лент со вздутиями и поперечной исчерченностью. Темные полосы – это диски. Они чередуются со светлыми полосами – междисковыми пространствами. Ширина дисков и междисков варьирует. В каждой хромосоме помимо темных и светлых полос видны сферические вздутия, называемые пухами. В некоторых участках 4-я хромосома как бы раздваивается и образует кольцеобразное вздутие. Это наиболее развитые пухи, которые называют кольцами Бальбиани. В каждой хромосоме число и ширина дисков и междисков, а также число, положение и величина пухов строго специфичны для данной стадии развития личинки.

Структурной основой политенных хромосом служат фибриллы хроматина, плотность укладки которых различна в дисках и междисках, и пухах. Пухи представляют собой активные локусы политенных хромосом, ответственные за синтез информационной РНК. Ядрышко рассматривают как специализированный пух, синтезирующий рибосомальную РНК. В междисковых пространствах также отмечают синтетические процессы. В дисках синтеза РНК не происходит.

Основная литература

Ченцов Ю. С. Общая цитология. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. С. 69–138.

Заварзин А. А., Харазова А. Д. Основы общей цитологии. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. С. 162–200.

Дополнительная литература

Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рефф М. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 2.

Збарский И. Б. Организация клеточного ядра. М.: Медицина, 1988.

Ролан Ж.-К., Селюши А., Селюши Д. Атлас по биологии клетки. М.: Мир, 1978.

Ченцов Ю. С., Поляков В. Ю. Ультраструктура клеточного ядра. М.: Наука, 1974.

Для следующей стадии деления метафазы характерны два процесса:
– завершение образования (начавшегося еще в профазе) митотического аппарата деления, состоящего из тонких нитей, тянущихся от одного полюса клетки к другому. Следует обратить внимание на то, что в клетках высших растений митотический аппарат деления формируется без участия клеточного центра;

– перемещение хромосом к центру клетки (метакинез) и расположение их в виде экваториальной пластинки. При этом часть нитей веретена (так называемые прикрепленные нити) оканчиваются на лежащих в центральной области хромосом – кинетохорах. Остальные нити веретена деления идут через всю клетку от одного ее полюса к другому. Хромосомы в экваториальной пластинке располагаются центромерными участками друг к другу, а концы их обращены наружу. Поэтому при рассмотрении их сверху видно, что они образуют фигуру, напоминающую звезду (стадия материнской звезды).

В метафазе каждая хромосома состоит из двух хроматид (сестринских хромосом). Следует помнить, что удвоение хромосом происходит в интерфазе в синтетическом периоде. Условно концом метафазы можно считать тот момент, когда хроматиды начинают отходить друг от друга и соединены лишь в области центромеров.

В анафазе обеспечивается равномерное распределение генетического материала по дочерним клеткам. В ранней анафазе хромосомы повернуты центромерами к полюсам клетки, а концы их обращены к центру клетки. В поздней анафазе хромосомы уже собираются на полюсах клетки. Расхождение хромосом происходит очень быстро.

В телофазе хромосомы начинают деконденсироваться, становятся заметным матрикс хромосом. Появляется ядерная оболочка и восстанавливаются ядрышки. Одновременно в поздней анафазе и ранней телофазе в центре клетки, в области веретена, начинает образовываться перегородка, которая растет от центра клетки к периферии и делит клетку на две дочерние.

Препарат № 29

Митоз в дробящихся яйцеклетках аскариды

Срез проходит через тело матки лошадиной аскариды. Полость матки заполнена яйцеклетками, находящимися на разных стадиях дробления. Для изучения следует выбирать деление на стадии яйце-

клетки или двух бластомеров. На более поздних стадиях дробления клетки мелкие, и изучение на них митоза менее удобно.

Каждая яйцеклетка окружена толстой гомогенной оболочкой, имеющей более темнокрашенный наружный контур. Эта оболочка обычно светлой полосой отделена от дробящейся яйцеклетки. При большом увеличении микроскопа видно, что цитоплазма яйцеклетки заполнена мелкими вакуолями и в ней лежит округлое ядро. Ядро окружено оболочкой, содержит ядрышко и мелкие глыбки хроматина. Около ядра иногда удается рассмотреть клеточный центр, состоящий из центриолей и центросферы.

В профазе митоза происходит конденсация хромосом, и они становятся видны, растворяется ядрышко. В клеточном центре между центриолями протягиваются тонкие нити – это начало формирования клеточного аппарата (ахроматинового веретена) деления. В поздней профазе ядерная оболочка разрушается, и в цитоплазме лежат две или четыре (в зависимости от вида аскариды) хромосомы, имеющие форму длинных изогнутых палочек.

В метафазе митотический аппарат деления уже четко виден. Он состоит из веретена и лучистого сияния, которые образованы микротрубочками, отходящими от центриолей. Хромосомы располагаются по экватору веретена. Каждая хромосома состоит из двух хроматид (сестринских хромосом), образование которых произошло путем редупликации в синтетическом периоде интерфазы. Часть нитей веретена отходит от центриолей и оканчивается на кинетохорах хромосом в месте их перегиба.

В анафазе сестринские хромосомы расходятся к противоположным полюсам клетки, при этом они сначала поворачиваются так, что концы их обращены к экватору веретена, а затем двигаются к полюсам клетки. В конце анафазы по периферии клетки, в ее центральной части, появляется борозда, которая постепенно углубляется и делит в телофазе клетку на две части. Одновременно с этим в телофазе идет реконструкция дочерних ядер. При этом хромосомы деконденсируются, образуются ядрышко и ядерная оболочка.

Митотическое деление яйцеклеток аскариды в принципе не отличается от митоза в других клетках животных. Однако у аскариды очень хорошо видны веретено деления, центриоли и сияние вокруг центриолей, поэтому, рассматривая этот препарат, особое внимание

надо уделить стадиям метафазы и анафазы. На этих стадиях митоза митотический аппарат деления выражен наиболее четко.

Основная литература

Ченцов Ю. С. Общая цитология. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. С. 290–310.
Заварзин А. А., Харазова А. Д. Основы общей цитологии. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. С. 200–215.

Дополнительная литература

Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 3.
Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980.
Ролан Ж.-К., Селюши А., Селюши Д. Атлас по биологии клетки. М.: Мир, 1978.

З а н я т и е 14 МЕЙОЗ

Цель работы: изучить деление клетки путем мейоза на примере микроспорозитов злаков. Овладеть навыками эмбриологических исследований.

Оборудование: 1. Микроскоп. 2. Осветитель. 3. Марлевая салфетка. 4. Предметные и покровные стекла. 5. Препаровальные иглы.

Реактивы: 1. Ацетокармин. 2. Вода.

Объекты: 1. Колоски злака (фиксированные). 2. Микрофотографии.

Задание

1. Приготовить давленные препараты пыльников цветка злака. Найти и зарисовать разные фазы мейоза микроспорозитов.
2. Изучить микрофотографии и по ним зарисовать не найденные на препарате фазы мейоза.
3. Составить сравнительную таблицу деления ядра путем митоза и мейоза.

Препарат № 30

Мейоз в микроспорозитах пыльников злаков

Мейоз очень удобно изучать на давленных ацетокарминовых препаратах, приготовленных из молодых пыльников. Для этого выделенные из цветка молодые пыльники целиком помещают в каплю

ацетокармина и накрывают покровным стеклом. Препарат можно слегка нагреть, не доводя до кипения, и раздавить легким постукиванием обратной стороной препаровальной иглы по покровному стеклу. Микроспорозиты окажутся в капле красителя. Цитоплазма их окрасится в розовый цвет, а хромосомы – в темно-карминнокрасный.

При изучении фаз мейоза следует обратить внимание на следующие особенности.

Профаза I. Чаще всего представлена стадией плотного синаптического сжатия хроматинового материала. Хроматиновый клубок интенсивно и гомогенно окрашивается, имеет четкие контуры шара. Ядро представляется оптически пустым. Могут встречаться микроспорозиты в стадии раскручивания синаптического клубка. Последний разрыхляется, приобретает неопределенную форму. Обнаруживаются ранее замаскированное крупное ядрышко и концы хроматиновых нитей.

Реже встречается стадия пахинемы – следующая за синапсисом, когда тонкие нити беспорядочно располагаются по всему объему ядра, еще реже – диакинез с утолщенными, укороченными бивалентами. При работе с иммерсионным объективом в пахинеме можно увидеть вздутия – хромомеры на хромосомах, а в диакинезе – хиазмы.

Метафаза I. В этой фазе исчезают ядерная оболочка и ядрышко, и появляются нити веретена деления. Они отчетливо видны, если слегка прикрыть диафрагму конденсора. Укороченные биваленты выстраиваются строго по экватору веретена.

Анафаза I. Расхождение компонентов бивалентов происходит, как правило, синхронно. К каждому полюсу отходит половинное число хромосом (гаплоидное). Обратите внимание, что размеры и конфигурация гомологичных, расходящихся хромосом одинаковы.

Телофаза I. В дочерних клетках начинает формироваться ядерная оболочка вокруг спирализованных хромосом. Цитокинез приводит к образованию двух дочерних клеток, которые отличаются от материнской по форме, имея вид плоско-выпуклой линзы. В силу того, что хромосомы не деспирализованы, клетка сразу вступает в профазу 2, минуя интерфазное состояние.

Метафаза II. Обратите внимание на то, как в обеих клетках синхронно образуются две метафазные пластинки, т. е. хромосомы, теперь уже в половинном числе, выстраиваются в экваториальной плоскости каждого веретена. Каждая хромосома состоит из двух хроматид.

Анафаза II. В каждой клетке диады можно увидеть по две группы хромосом, синхронно расходящихся от экватора к полюсам клетки.

Телофаза II. Эта фаза наиболее часто встречается на микропрепаратах, поэтому можно предположить, что она по времени прохождения самая продолжительная. В период этой фазы хромосомы завершают свое движение к полюсам, деспирализуются и образуют четыре дочерних гаплоидных ядра. После завершения цитокинеза возникают четыре гаплоидных микроспоры, которые некоторое время остаются соединенными между собой, образуя структуру, называемую тетрадой.

Основная литература

Ченцов Ю. С. Общая цитология. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. С. 320–337.
Атабекова А. И., Устинова Е. И. Цитология растений. М.: Агропромиздат, 1987. С. 106–112.

Дополнительная литература

Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980.

З а н я т и е 15

ПРОИЗВОДНЫЕ КЛЕТОК: СИНЦИТИЙ, СИМПЛАСТ

Цель работы: изучить особенности строения производных клеток синцития, симпласта и межклеточного вещества у растительных и животных организмов.

Оборудование: 1. Микроскоп. 2. Осветитель. 3. Марлевая салфетка.

Реактивы: 1. Иммерсионная жидкость. 2. Вода.

Объекты: 1. Постоянные препараты «Поперечнополосатые мышечные волокна», «Нуклеарный эндосперм злака». 2. Микрофотографии.

Задание

1. Изучить строение поперечно-полосатых мышечных волокон. Зарисовать миофибриллу, отметить ядра, светлые и темные диски.

2. Рассмотреть строение клеток эндосперма злаков. Зарисовать часть ткани, отметить цитоплазму и ядра. Определить особенности деления клеток эндосперма на ранних стадиях его развития.

Препарат № 31

Поперечно-полосатая мышечная ткань

Большинство клеток имеют по одному ядру. Нередко можно наблюдать два-три ядра в одной клетке (например, в гепатоцитах, эпителиях слюнных желез, мезотелиях, культуре ткани). Но есть случаи, когда в цитоплазматической массе, окруженной единой клеточной мембраной, заключено множество ядер. Такое образование называется симпластом. Примером симпласта могут служить: плазмодии грибов миксомицетов, эндосперм тюльпана, гигантские клетки инородных тел высших животных, ворсинки хориона крысы, поперечно-полосатое мышечное волокно, пучки которого составляют толщину языка. Поверхность языка выстлана многослойным плоским ороговевающим эпителием, образующим характерные выступы – сосочки языка. Под эпителием расположена волокнистая соединительная ткань. Непосредственно под соединительной тканью лежат поперечно-полосатые мышечные волокна, составляющие главную массу языка. Мышечные волокна проходят в трех взаимно перпендикулярных направлениях: вдоль языка, поперек и вертикально. Поэтому на одном и том же препарате можно видеть продольные и поперечные срезы мышечного волокна. Основное внимание следует обратить на продольные срезы мышечного волокна.

На продольном срезе через волокно при малом увеличении микроскопа видно, что волокно представляет собой длинное вытянутое цилиндрическое образование, сужающееся только на концах. С поверхности волокно одето тонкой оболочкой – сарколеммой. Центральная часть волокна заполнена пучками поперечно исчерченных миофибрилл. В каждом волокне имеется много овальных ядер, лежащих на периферии волокна под сарколеммой. Следовательно, поперечно-полосатое мышечное волокно представляет собой симпласт – гигантскую клетку со множеством ядер.

Препарат № 32

Эндосперм зерновки злаков на ранних стадиях развития

После оплодотворения яйцеклетки у злаков триплоидное ядро центральной клетки раньше приступает к делению, чем зигота. Первые деления ядер в эндосперме идут синхронно. Они не сопровождаются образованием клеточных стенок, что приводит к образованию

синцития. Образующиеся эндоспермальные ядра располагаются в плазме зародышевого мешка, смещаясь к его периферии. Такое расположение ядер определяется большой центральной вакуолей и, вероятно, облегчает обмен между эндоспермом и окружающими зародышевым мешком тканями. Отметим, что ядра эндосперма в большой массе концентрируются вокруг формирующегося зародыша, т. е. в микропилярной зоне, образуя сплошной массив. После образования определенного количества ядер, различного для разных видов злаков, в эндосперме наблюдается переход в клеточную фазу.

Литература

Атабекова А. И., Устинова Е. И. Цитология растений. М.: Агропромиздат, 1987.

Елесеев В. Г., Афанасьев Ю. М., Котовский Е. Ф. Атлас микроскопического строения клеток, тканей и органов. М.: Медицина, 1970.

СЕМИНАРСКИЕ ЗАНЯТИЯ

Тема 1

ИСТОРИЯ КЛЕТЧНОГО УЧЕНИЯ

1. Положение клеточной теории Шванна и Шлейдена. «Заблуждение» авторов клеточной теории относительно происхождения клетки. Труды Р. Вихрова и его тезис «*cellula omnis cellula*».

2. Критика клеточной теории на рубеже XIX и XX веков. Сторонники теории «клеточного государства». Объяснение фактов, не укладывающихся в клеточную теорию, с современных позиций. Формулировка третьего положения клеточной теории.

3. Взгляды Н. К. Кольцова на организацию клетки. Новые подходы к проблемам изучения морфологии клетки.

4. Антинаучные взгляды О. Б. Лепешинской на происхождение клетки. Несостоятельность попыток лысенковцев «модернизировать» клеточное учение.

Литература

Вермель Е. М. История учения о клетке. М.: Наука, 1970.

Вильсон Э. Клетка: В 2 т. М.; Л.: Биомедгиз, 1936.

Кацнельсон З. С. Клеточная теория в ее историческом развитии. Л.: Наука, 1963.

Кольцов Н. К. Физико-химические основы морфологии. М.; Л.: Госиздат, 1929.

Кольцов Н. К. Организация клетки // Сборник экспериментальных исследований, статей и речей, 1903–1935 гг. М.; Л.: Госиздат, 1936.

Лепешинская О. Б. Клетка: ее жизнь и происхождение. М.: Госкультпросветиздат, 1952.

Тема 2

ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЭУКАРИОТНОЙ КЛЕТКИ

1. История взглядов на симбиотическое происхождение организмов и клетки. Работы А. С. Фамицина, К. С. Мережковского и Б. М. Козо-Полянского.

2. Современные представления о роли симбиоза в эволюции клетки. Подходы и решения к этой проблеме в работах Л. Маргелис, А. Н. Студитского, М. В. Гусева и Г. Б. Гохлернера.

3. Взгляды, противоположные теории симбиогенеза – теории сегрегациогенеза. Доказательства обеих теорий о возможных путях эволюции клетки.

Литература

Гусев М. В., Гохлернер Г. Б. Свободный кислород и эволюция клетки: Теоретические исследования. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1980.

Маргелис Л. Роль симбиоза в эволюции клетки. М.: Мир, 1983.

Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1986. Т. 1.

Хахина Л. Н. Проблема симбиогенеза // Историко-критический очерк исследований отечественных ботаников. Л.: Наука, 1979.

Хохлов С. С. Симбиогенез. История проблемы происхождения клетки и организмов путем симбиоза. Саратов, 1977.

ПРОГРАММА КУРСА

Введение

Клетка – элементарная единица живого. Клетки прокариот и эукариот. Клеточная теория: клетка – единица живой материи, увеличение числа клеток происходит путем деления исходной клетки, гомологичность в строении клеток, многоклеточный организм – сложный ансамбль клеток, объединенных в целостные интегрированные системы тканей и органов, соподчиненных и связанных между собой межклеточными, гуморальными и нервными формами регуляции. Клетка как единица строения, функционирования, развития и патологических изменений организмов.

Значение цитологии для медицины и сельского хозяйства. Место среди других биологических дисциплин. Связь цитологии с молекулярной биологией, генетикой, эмбриологией, систематикой, физиологией, биохимией, медициной и биотехнологией.

Методы исследования клеток и тканей

Арсенал методов цитологии: от живых клеток до макромолекулярных комплексов. Прижизненные наблюдения клеток. Культура клеток вне организма. Метод темного поля. Фазово-контрастная микроскопия. Цейтраферная микросъемка. Микроманипулятор и микрохирургия. Методы исследования физических свойств клеток. Сравнительная люминисцентная микроскопия. Витальные красители.

Изучение фиксированных клеток. Принципы окрашивания клеточных структур. Цитохимические качественные методы исследования: реакция на белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды, жиры, липиды, соли; реакция на одревеснение клеточной оболочки растений.

Основы физических методов определения локализации и количества вещества в клетке, микроспектрометрия, цитофотометрия, интерференционная и люминисцентная микроскопия.

Автографическое изучение локализации, динамики синтеза и транспорта веществ в клетке. Иммунохимические методы изучения клеточных компонентов, реакция Кунса, гибридомы и получение моноклональных антител.

Электронные микроскопы просвечивающего и сканирующего типов. Мегавольтная электронная микроскопия.

Дифференциальное центрифугирование – метод получения отдельных клеточных компонентов для цитохимического и биохимического анализов.

Краткая история цитологии

Связь цитологии с успехами развития оптики. Первое описание «ячеек» Р. Гуком. Наблюдения А. Левенгука над живыми микроскопическими объектами. Исследование микроанатомии растений и животных (Мальпиги, Грю, Фонтана Я. Пуркинье). Открытие ядра, протопласта, митохондрий, платид. Клеточная теория М. Шлейдена и Т. Шванна, ее историческое развитие. Работы Р. Вихрова. Отечественные цитологи: А. Бабухин, И. Мечников, Н.К. Кольцов, Д. Н. Носонов, Б. В. Кедровский.

Строение и функции клеток

Клетки прокариот и эукариот. Особенности и различия в их строении. Единство строения и функции клетки, ее органоидов и других структурных элементов.

Поверхностный аппарат клетки. Строение поверхностного аппарата: плазматическая мембрана, надмембранный комплекс, субмембранная система гиалоплазмы. Плазматическая мембрана, ее структура. Роль липидов и белков в составе организации клеточных мембран. Разнообразие липидов в составе мембран и их значение. Интегральные, полуинтегральные и периферические белки мембран. Подвижность составляющих мембран молекул белков и липидов. Ассиметрия мембран: структурная и функциональная.

Надмембранный комплекс клетки. Гликокаликс животных клеток, его химическая природа и функции. Оболочка бактериальной клетки. Оболочка растительной клетки, ее химический состав, микростроение и ультрастроение. Матрикс и каркас оболочки. Формирование и рост клеточной оболочки, первичная и вторичная оболочки. Клеточные связи. Поры, типы пор (простые и окаймленные), их строение. Перфорации: простые и множественные. Плазмодесмы. Видоизменения целлюлозной оболочки: одревесневшая, пробковевшая.

Субмембранная система гиалоплазмы. Микротрубочки и микрофиламенты, их химический состав, строение и функции. Связь цитоскелетных элементов с плазматической мембраной и другими клеточными органеллами.

Основные функции поверхностного аппарата клетки, проявляющиеся в интеграции его структурных компонентов. Роль плазматической мембраны в клеточной проницаемости. Пассивный и активный транспорт веществ через мембрану. Транспорт макро- и микромолекул в клетку и выведение из нее продуктов клеточного метаболизма. Роль плазматической мембраны над- и субмембранного комплекса в процессах фагоцитоза и пиноцитоза, связь этих процессов с лизосомами. Рецепторная функция поверхностного аппарата. Белковые и полисахаридные рецепторы клеточной поверхности. Иммунохимические реакции. Антитела и лектины. Явление агрегации рецепторов и чистка клеточной поверхности. Межклеточные взаимодействия: контакты сцепления, изолирующие контакты, коммуникационные контакты.

Участие поверхностного аппарата в движении клеток. Типы движения клеток. Актин – миозиновый комплекс и механизм мышечного сокращения. Реснички и жгутики, их строение и механизм движения. Различия жгутиков бактерий и эукариотных клеток. Другие специализированные образования поверхностного аппарата клетки – микроворсинки, миелиновая оболочка.

Цитоплазма. Общий химический состав цитоплазмы. Физико-химические свойства цитоплазмы: движение, раздражимость, полупроницаемость, коагуляция, коацервация, плазмолиз. Цитоплазма как сложноструктурированная система. Матрикс цитоплазмы, или гиалоплазма. Трабекулярная система гиалоплазмы. Плазмолемма, гонопласт.

Митохондрии. Структура митохондрий: мембраны, кристы, матрикс. Их роль в синтезе и накоплении АТФ. Строение крист, локализация в липопротеидных мембранах звеньев окислительного фосфорилирования. Изменение структуры митохондрий в зависимости от их функционального состояния. Матрикс митохондрий: РНК, рибосомы, ДНК и белки митохондрий. Проблема происхождения митохондрий. Аналоги митохондрий у бактерий.

Пластиды. Пигменты и типы пластид: хлоропласты, хромопласты, лейкопласты. Форма, размер, число. Ультраструктура пластид:

граны, тилакоиды, строма, осмиофильные глобулы. Особенности ультраструктуры пластид разных типов и различия в их функциях. Локализация процессов фотосинтеза в хлоропластах. Взаимосвязь пластид разных типов. Полуавтономность пластид. Пластидный геном. Онтогенез пластид. Проблема происхождения пластид.

Эндоплазматическая сеть. Понятие и общая характеристика. Гранулярная эндоплазматическая сеть – эргастоплазма, ее строение, химическая композиция и основная роль как структуры, участвующей в синтезе экспортируемых белков. Рибосомы, их строение и химия. Синтез белков в гиалоплазме. Синтез, накопление и транспорт синтезированного белка в системе эндоплазматической сети. Связь гранулярной эндоплазматической сети с ядерной оболочкой. Роль гранулярного эндоплазматического ретикула в синтезе белков и липидов мембран и в их сборке. Взаимосвязь мембранных компонентов в клетке.

Гладкая эндоплазматическая сеть: структурная характеристика и химия. Связь гладкой эндоплазматической сети с синтезом полисахаридов, жиров, стероидов и других молекул. Роль гладкой эндоплазматической сети в дезактивации различных химических агентов. Саркоплазматический ретикулум в поперечно-полосатой мышечной ткани и его функции.

Аппарат Гольджи. Пластинчатый комплекс: общая характеристика, локализация в клетке, микроскопическое строение, ультраструктура и химия. Диктиосома. Функции аппарата Гольджи: сегрегация, созревание и выведение секретов и других веществ из клетки. Автордиографические данные о путях синтеза и выведения секреторных продуктов в клетке. Синтетические процессы в аппарате Гольджи.

Лизосомы. История открытия лизосом, их структура и химическая природа. Типы лизосом. Функциональное значение лизосом, их происхождение. Связь лизосом с процессами внутриклеточного пищеварения, фагоцитозом и работой аппарата Гольджи. Аутофагосомы.

Цитоскелет. Основные компоненты цитоскелета: микротрубочки и микрофибриллы. Каркасная роль цитоплазматических микротрубочек. Центры организации микротрубочек в клетке. Центриоль – встречаемость среди клеток животных и растений. Ультраструктура центриолей, связь с базальными тельцами. Микрофибриллы: состав, строение, функции. Микрофиламенты и промежуточные микрофиламенты, их характеристика и роль в клетке. Топофибриллы.

Включения в цитоплазму клеток животных и растений, их разнообразие. Происхождение и значение включений. Крахмальные зерна и другие виды углеродных включений. Липидные и жировые капли. Белковые включения. Минеральные включения в клетках растений.

Ядерный аппарат клетки. Центральная догма молекулярной биологии. Роль ядра в жизни клетки и его значение в переносе информации от ДНК к белку. Интерфазное ядро, основные элементы его структуры: хроматин (хромосомы), ядрышко, ядерный сок (кариоплазма), ядерная оболочка, матрикс.

Хроматин, его химическая характеристика. Диффузный и конденсированный хроматин, эухроматин и гетерохроматин, их функциональное значение. Сателлитная ДНК. Ультраструктура хроматина, строение элементарных хроматиновых фибрилл. Строение и химический состав нуклеосом и нуклеомеров. Строение активного и репрессированного хроматина. Ядро в процессе редупликации и перераспределения генетического материала. Два состояния главных структур – хромосом. Поведение хроматина (хромосом) во время митоза. Концепция о непрерывности хромосом в течение всего жизненного цикла клетки. Общее строение, типы и формы митотических хромосом. Дифференцировка хромосом по длине: центромера, вторичная перетяжка, теломера. Дифференциальная окраска хромосом. Понятие о кариотипе. Представления о тонкой организации хромосом. Хромомеры – промежуточный уровень компактизации хроматина. Вопрос об осевых элементах в составе митотических и интерфазных хромосом. Хромонема, понятие о субхроматидных структурах митотических хромосом.

Ядрышко. Ядрышковый организатор. Число ядрышек и ядрышковых организаторов в ядре. Ультраструктура и химический состав ядрышка. Гранулярный и фибриллярный компоненты. Образование рибосом – основная функция ядрышка. Предшественники рибосомальной РНК. Пути синтеза рибосом. ДНК ядрышка. Строение генов рибосомальных РНК, полицистронность. Амплификация генов рибосомальных РНК. Цикл изменения структуры ядрышка в связи с его функцией. Судьба ядрышка в митозе и его связь с митотическими хромосомами.

Ядерная оболочка, ее строение и функциональное значение. Строение ядерных поровых комплексов. Связь ядерной оболочки с ци-

топлазматическими структурами и хромосомами, связь с ядерным белковым матриксом. Ядерная пластинка.

Кариоплазма (ядерный сок). Нерибосомальные рибонуклеопротеидные структуры ядра.

Воспроизведение клеток

Жизненный цикл клетки. Интерфаза (пресинтетическая, синтетическая и постсинтетическая стадии) и митоз. Значение этих фаз в жизни клеток. Регуляция митоза, вопрос о пусковом механизме митоза. Процесс репликации ДНК. Репликон. Мультирепликационный характер удвоения хромосом в эукариотной клетке.

Общая схема непрямого деления (митоза) эукариотных клеток. Стадии митоза, их продолжительность и характеристика. Участие центриолей в делении клетки. Строение веретена деления. Роль разных групп микротрубочек в механизме расхождения хромосом. Репликация центриолей и центриольный цикл. Цитокинез у животных и растительных клеток: образование клеточной перетяжки и фрагмопласта.

Деление прокариотных клеток и эволюция митотического деления у эукариотных клеток.

Амитоз – прямое деление клетки. Частота встречаемости и разновидности амитоза.

Мейоз. Зиготный и гаметный типы мейоза. Характеристика фаз мейоза. Стадии профазы первого деления: лептотена, зиготена, пахитена, диплотена, диакинез. Образование синаптонемального комплекса. Конъюгация и кроссинговер хромосом. Хромосомы типа ламповых щеток. Редукция числа хромосом в процессе мейоза. Биологический смысл мейоза.

Нарушения в воспроизведении клеток. Эндорепродукция. Незавершенность митоза – путь, ведущий к полиплоидии ядер. Политенные хромосомы. Эндомитоз.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

Занятие 1. Устройство светового микроскопа. Правила работы с микроскопом. Приготовление временных препаратов	3
Занятие 2. Методы изучения клетки	10
Занятие 3. Общий план строения эукариотных клеток	11
Занятие 4. Особенности строения прокариотных клеток	14
Занятие 5. Поверхностный аппарат клетки	16
Занятие 6. Оболочка растительной клетки	21
Занятие 7. Пластиды	24
Занятие 8. Митохондрии	29
Занятие 9. Вакуолярная система клетки	31
Занятие 10. Включения в клетках растений и животных	35
Занятие 11. Химическая природа ядра	40
Занятие 12. Интерфазное ядро	45
Занятие 13. Митоз в растительных и животных клетках	49
Занятие 14. Мейоз	52
Занятие 15. Производные клеток: синцитий, симпласт	54
СЕМИНАРСКИЕ ЗАНЯТИЯ	
Тема 1. История клеточного учения	56
Тема 2. Происхождение эукариотной клетки	57
ПРОГРАММА КУРСА	58

Учебное издание

ОБЩАЯ ЦИТОЛОГИЯ

Руководство к практическим занятиям

Составитель *Алексей Владимирович Мальцев*

Редактор и корректор В. И. Попова
Компьютерная верстка Н. В. Комардиной

ЛР № 020257 от 22.11.96. Подписано к печати 17.09.2001. Формат 60x84 ¹/₁₆.

Бумага для множительных аппаратов. Гарнитура Times.

Уч.-изд. л. 3,24. Усл. печ. л. 3,72. Тираж 300 экз. Заказ .

Издательство Уральского университета. 620083, Екатеринбург, пр. Ленина, 51.

Отпечатано в ИПЦ «Издательство УрГУ». 620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4.