

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
«Иркутский государственный университет»
БИОЛОГО-ПОЧВЕННЫЙ ФАКУЛЬТЕТ

ОСНОВЫ ЦИТОЛОГИИ

Малый практикум



Печатается по решению учебно-методической комиссии
биолого-почвенного факультета
Иркутского государственного университета

Рецензент

д-р биол. наук, проф. *И. Б. Книжнин*

Составитель

доцент кафедры физиологии растений,
клеточной биологии и генетики *О. В. Музалевская*

Включает практические занятия по дисциплине «Цитология» с обязательной теоретической частью, оформлением отчетов с целью закрепления и углубления знаний учащихся, развития у них практических навыков работы в лабораториях.

Предназначен как для бакалавров первого года обучения направлений «Экология и природопользование» и «Биология», так и для курса углубленного изучения общей биологии (раздел «Цитология») в специализированных биохимических классах в системе модульного обучения. Может быть рекомендован студентам 2-го курса в качестве пособия по цитологии и учителям биологии.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Правила оформления практической работы	4
Химические вещества в природе и живых организмах	5
Основные группы органических веществ клетки.....	6
Ферменты	11
Методы цитологии и молекулярной биологии	13
Строение клеток.....	14
Ядро клеток	19
Биология клетки.....	22
Биоэнергетика растений. Фотосинтез	27
Деление клеток	28
Рекомендуемая литература	31

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ

Для выполнения практических работ надо иметь альбом или тетрадь для записи текстового материала и выполнения схем.

Необходимым элементом микроскопического изучения объекта является его зарисовка в альбом или тетрадь.

1. Рисовать можно только на одной стороне листа.
2. До начала зарисовки вверху страницы записать название темы.
3. Направо от микроскопа на столе располагают необходимые реактивы, инструмент, предметные и покровные стекла, тетрадь для записи.
4. Рисунок должен правильно отображать формы; соотношение объема и размеров отдельных частей и целого. Сначала надо нарисовать контур объекта (крупно), затем внутри контуры деталей, и после этого четко вырисовать их.
5. Рисовать, четко повторяя все линии объекта. Для этого надо не отрывать глаз от микроскопа, а только переключать внимание с объекта на рисунок. При зарисовке препарата смотреть в окуляр левым глазом.
6. К каждому рисунку надо дать обозначение частей. Все надписи должны быть параллельны друг другу. К отдельным частям объекта ставят стрелочки, против каждой писать название.

ХИМИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА В ПРИРОДЕ И ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ

ЗАНЯТИЕ I

Теоретическая часть

Живые формы обладают признаками, которые отсутствуют у большинства неживых систем. К основным свойствам живого относят способность к движению, т. е. перемещению особи или ее части в пространстве. У животных движение осуществляется в основном путем локомоции (совокупность согласованных движений и напряжений мышц и др. тканей, благодаря чему особь меняет свое положение в пространстве). У большинства растений движение происходит путем роста растяжением. Объем клеток при этом иногда увеличивается в 10–100 раз. Различают активное (с помощью органов тела или роста растяжением) и пассивное движение (перенос спор, пыльцы потоком воздуха, животными и т. д.). В каждой живой клетке происходит перемещение содержимого, известное под названием движение цитоплазмы. Считают, что в основе механизма движения цитоплазмы лежат фазовые переходы участков цитоплазмы из золя в гель и наоборот. Такие переходы происходят в результате полимеризации и распада микротрубочек и микрофиламентов, формирующих опорно-двигательную систему клетки. Источником энергии для движения цитоплазмы служит АТФ. Движение цитоплазмы и внутриклеточные процессы обмена веществ взаимосвязаны, так как изменения интенсивности метаболизма всегда сопровождаются соответствующими изменениями в перемещении внутриклеточных структур.

Тропизмами называют ростовые движения, обусловленные неравномерным ростом двух противоположных сторон какого-либо органа, причем быстрее растущая сторона становится выпуклой. Один из видов тропизмов – гидротропизм (изгибание растущих частей растения под влиянием одностороннего водоснабжения). Тропизм может быть положительным (изгиб в сторону раздражителя) или отрицательным (изгиб в противоположную сторону). Способность к положительным гидротропическим изгибам хорошо выражена у корней, которые при неравномерном распределении влаги в почве направляются в более влажные места.

Практическая работа 1

Гидротропизм

Задание 1. Подготовить два варианта опыта. Для этого две стеклянные пластинки, уместяющиеся в стакане в наклонном положении, оборачивают фильтровальной бумагой. На смоченную водой бумагу раскладывают на одной стороне рядами семена овса, пшеницы или других растений. Семена смачиваются и прилипают к бумаге. В два стакана наливают немного воды и помещают в них наклонно пластинки так, чтобы семена оказались на нижней стороне пластинки. Один стакан плотно закрывают стеклом (для создания насыщенной парами атмосферы), другой оставляют на 1–2 дня открытым.

Задание 2. Рассмотреть и зарисовать положение корешков в обоих стаканах. Объяснить причины неодинакового роста корней в разных вариантах.

ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ КЛЕТКИ

ЗАНЯТИЕ II

Теоретическая часть

Белки содержатся в составе цитоплазмы, ядра и различных органоидов клетки. Для выявления белков в клетке или растворе используют специфическую биуретовую реакцию. Эта реакция основана на способности пептидной связи в щелочной среде образовывать с сульфатом меди окрашенные комплексные соединения (розовая, фиолетовая окраска). Хорошие результаты дает эта реакция на меристемах (на примере зародыша). Поскольку окрашивание может возникнуть не только с белками, но и в присутствии таких аминокислот, как аспарагин и гистидин, необходимо провести предобработку материала 5%-ной трихлоруксусной кислотой. Пептидная связь – это ковалентная азот-углеродная связь, которая образуется в результате выделения молекулы воды при взаимодействии аминогруппы одной аминокислоты с карбоксильной группой другой.

Белки построены из аминокислот. Все клетки содержат белки, а следовательно, и аминокислоты. Растения синтезируют все известные аминокислоты. Нингидриновая реакция свидетельствует о присутствии аминогрупп. Окрашенное соединение (синее, фиолетовое) возникает после присоединения азота аминокислоты к нингидрину.

Практическая работа 2

Качественные реакции на белки

Задание 1. Провести биуретовую реакцию для выявления в молекулах белков пептидных связей. Для этого объекты помещают на 5–15 мин в 7%-ный медный купорос в часовом стекле, отсасывают раствор фильтровальной бумагой. Затем промывают объекты в воде и переносят их на предметное стекло в каплю 30%-ного раствора NaOH или KOH на 10–40 мин до появления окраски.

Задание 2. Провести нингидриновую реакцию на аминокруппы. Реакцию проводят в двух вариантах: с предобработкой материала трихлоруксусной кислотой в течение 10–15 мин и последующей промывкой водой и без предобработки. Сохранение окраски объекта после обработки кислотой указывает на выявление аминокруппы белка. Реакция без предобработки выявляет все аминокруппы как белка, так и свободных аминокислот.

ЗАНЯТИЕ III

Теоретическая часть

Вещества, нарушающие структурную организацию белковой молекулы (т. е. четвертичную, третичную и далее вторичную структуры), приводят к изменению физико-химических и биологических свойств белка. Это явление называется денатурацией.

Денатурация изменяет физико-химические свойства белка, в частности его растворимость. При этом белок становится менее гидрофильным и легко осаждается. Денатурация чаще всего необратима, но в ряде случаев удаление денатурирующих агентов приводит к восстановлению исходной конформации молекулы белка и его природных свойств – ренатурации.

При необратимых реакциях осаждения белки претерпевают глубокие изменения и не могут быть растворимы в первоначальном растворителе. К необратимым реакциям относятся: осаждение белка солями тяжелых металлов, минеральными и органическими кислотами, алкалоидными реактивами и осаждение при кипячении.

Осаждение белков солями тяжелых металлов, в отличие от высаливания, происходит при небольших концентрациях солей. Белки при взаимодействии с солями тяжелых металлов (свинца, меди, ртути и др.) адсорбируют их, образуя солеобразные и комплексные соединения, растворимые в избытке этих солей, но нерастворимые в

воде. Растворение осадка в избытке солей называется адсорбционной пептизацией. Данное явление происходит вследствие возникновения одноименного положительного заряда на частицах белка. Способность белка прочно связывать ионы тяжелого металла в виде нерастворимых осадков в воде используется как противоядие при отравлении солями ртути, меди, свинца и др.

Концентрированные минеральные кислоты вызывают денатурацию белка и образуют комплексные соли белка с кислотами. В избытке всех минеральных кислот, за исключением азотной, выпавший осадок белка растворяется.

Для органических кислот характерен сложный механизм денатурации, связанный с воздействием на водородные связи, с блокированием полярных группировок и с нейтрализацией заряда молекулы белка, что приводит к нарушению пространственной структуры и осаждению белка.

Органические растворители приводят к денатурации белков в результате резкого уменьшения диэлектрической константы их водных растворов. При этом нарушаются их гидрофобные взаимодействия в молекулах белков. Кроме того, увеличиваются электростатические силы взаимодействия между заряженными группами, образование прочных внутри- и межмолекулярных связей приводит к денатурации белков.

Практическая работа 3

Физико-химические свойства белков

Задание 1. Осаждение белка при нагревании.

В пробирку наливают 10 капель 1%-ного раствора яичного белка. Содержимое пробирки нагревают над пламенем спиртовки и наблюдают появление опалесценции (помутнение раствора). Объяснить, с чем связано осаждение белка.

Задание 2. Осаждение белков:

а) *Осаждение белка органическими растворителями:* К 5 каплям 1%-ного раствора яичного белка прибавить 20–25 капель 96%-ного этилового спирта или ацетона. Добавить 1 каплю насыщенного раствора хлористого натрия.

б) *Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами:*

В пробирку налить 10–15 капель концентрированной азотной кислоты и, наклонив ее под углом 45° , осторожно, по стенке пробир-

ки добавить из пипетки равный объем 1%-ного раствора какого-либо белка. То же можно проделать, взяв вместо азотной кислоты концентрированную серную или соляную кислоты.

в) *Осаждение белка некоторыми органическими кислотами:*

К 5 каплям раствора яичного белка добавить 1–2 капли 10%-ного раствора сульфосалициловой кислоты. То же проделать с 10%-ным раствором трихлоруксусной кислоты.

г) *Осаждение белка солями тяжелых металлов.*

В три пробирки налить по 5 капель 1%-ного раствора яичного белка и прибавить в первую 1 каплю 5%-ного раствора хлорного железа, во вторую – 1 каплю 5%-ного раствора уксуснокислого свинца, в третью – 1 каплю 7%-ного раствора сернокислой меди. К такой же порции белка прибавить вначале 1 каплю раствора соли тяжелого металла, а затем еще 5–6 капель. Пронаблюдать ход реакций и объяснить.

Результаты работы по осаждению белка различными реактивами зафиксировать в таблице 1.

Таблица 1

Реакции осаждения белка

Название группы веществ, осаждающих белки	Употребляемые реактивы	Чем обусловлена реакция
Органические растворители		
Концентрированные минеральные кислоты		
Органические кислоты		
Соли тяжелых металлов		

Контрольные вопросы: Какова первая помощь при отравлении человека солями тяжелых металлов, основанная на необратимых реакциях осаждения белков?

ЗАНЯТИЕ IV

Теоретическая часть

В составе клетки углеводы встречаются в виде сахаров (моносахариды и дисахариды) в клеточном соке, представлены запасными питательными веществами (крахмал), входят в состав клеточной оболочки. Крахмал встречается в виде зерен, величина и форма которых неодинакова у различных растений. В клубнях картофеля крахмальные зерна слоистые, неправильной формы, простые и реже сложные, крупные (45–110 мкм). Намного мельче крахмальные зерна эндосперма пшеницы, ржи, капусты. У бобовых культур крахмаль-

ные зерна овальные, ветвистой формы. В клетке крахмал образуется с участием пластид.

Все моносахара, а также дисахариды типа мальтозы благодаря присутствию альдегидной или кетонной группы являются редуцирующими, т. е. обладают восстанавливающими свойствами. Весьма распространенная в растениях сахароза – нередуцирующий углевод, так как её молекула состоит из остатков глюкозы и фруктозы, соединенных за счет альдегидной группы глюкозы и кетонной группы фруктозы.

Для обнаружения редуцирующих сахаров, т. е. сахаров, имеющих альдегидную или кетонную группу, приливают к исследуемому раствору равный объем фелинговой жидкости и доводят до кипения. При этом окись меди восстанавливается в закись, выпадающую в виде кирпично-красного осадка.

Для обнаружения сахарозы необходимо подвергнуть ее гидролизу на глюкозу и фруктозу, а затем провести пробу Фелинга. По количеству осадка закиси меди можно судить о количестве редуцирующих сахаров, как содержащихся в исходном материале, так и образовавшихся в результате гидролиза сахарозы.

Практическая работа 4 **Обнаружение углеводов в биологических объектах**

Реакции на сахара обычно проводят на свежем материале. Срезы не должны быть тонкими, чтобы можно было выбрать неповрежденные слои клеток для исследования.

Задание 1. Провести йодную реакцию на крахмал. Для наблюдения реакции используют раствор йода в йодиде калия. На объект, находящийся на предметном стекле, наносят каплю реактива и накрывают покровным стеклом. Реактив действует моментально, окрашивая крахмал в сине-фиолетовый цвет.

Задание 2. Провести реакцию с L-нафтолом на простые и сложные углеводы. Объект помещают на предметное стекло в раствор L-нафтола в 96%-ном этиловом спирте, добавляют две капли серной кислоты и накрывают покровным стеклом. При наличии глюкозы быстро появляется фиолетовая окраска. Если реакция наблюдается через 30–45 мин, то это свидетельствует о том, что под действием кислоты другие углеводы превратились в глюкозу. Данная реакция не является специфичной.

Задание 3. Прodelайте следующие качественные реакции:

1) поместите в пробирку немного глюкозы, растворите в небольшом количестве воды, прилейте равный объем фелинговой жидкости, доведя полученную смесь до кипения;

2) растворите в воде небольшое количество сахарозы, добавив равный объем реактива Фелинга, и доведите до кипения;

3) приготовьте в пробирке раствор сахарозы, добавьте 2–3 капли 20%-ной HCl и кипятите в течение 1 мин, нейтрализуя кислоту содой (сыпать до прекращения выделения CO₂). Далее прилейте равный объем реактива Фелинга и вновь доведите до кипения. Отметьте, образуется ли в пробирках кирпично-красный осадок, и сделайте выводы о причинах наблюдаемых явлений.

Задание 4. Нарезьте на мелкие кусочки луковицу лука или корнеплоды моркови. Поместите материал в отдельные пробирки (примерно 1/4 пробирки), залейте небольшим количеством воды и нагрейте не менее 5 мин в кипящей водяной бане. Полученную вытяжку профильтруйте и перенесите при помощи пипетки одинаковые порции фильтрата в две чистые пробирки. С одной порцией проделайте реакции на редуцирующие сахара, во второй пробирке проведите гидролиз сахарозы соляной кислотой, после нейтрализации кислоты прилейте равный объем фелинговой жидкости и вновь нагрейте до $t = 100^{\circ}\text{C}$.

Полученные результаты запишите в таблицу 2, оценивая количество закиси меди в баллах.

Таблица 2

Выявление в растительном материале редуцирующих сахаров и сахарозы

Материал исследования	Количество закиси меди	
	без гидролиза	после гидролиза

Выводы:

ФЕРМЕНТЫ

ЗАНЯТИЕ V

Теоретическая часть

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы. Главное отличие ферментов от катализаторов небиологической природы состоит в высокой каталитической активности и ярко выраженной специфичности действия. Под влиянием различных факторов

действие ферментов может усиливаться, ослабевать или совсем прекращаться. В последнем случае говорят об инактивации ферментов, которая бывает обратимая или необратимая. Кипячение вызывает необратимое инактивирование ферментов. Как правило, ферментативные процессы не могут протекать при температуре выше 70 °С, что связано с денатурацией биокатализатора. Специфичность действия лежит в основе классификации ферментов. Одним из распространенных классов ферментов являются оксидоредуктазы, катализирующие окислительно-восстановительные реакции разных типов.

Практическая работа 5

Функционирование белков как биокатализаторов

Задание 1. Провести реакцию с метиленовой синей для выявления дегидрогеназ. Для этого свежий материал (картофель, капуста) помещают на 15 мин в 0,05%-ный раствор красителя в воде. В присутствии ферментов идет обесцвечивание клеток.

Задание 2. Оцените влияние температуры на активность ферментов. В 2 пронумерованные пробирки наливают по 5 капель слюны и 20 капель дистиллированной воды. В одной пробирке раствор слюны кипятят в течение 2–3 мин и охлаждают, в другой – оставляют без кипячения. В обе пробирки добавляют по 10 капель 0,5–1%-ного раствора крахмала. Жидкость в пробирках перемешивают и оставляют при комнатной температуре. Через 5 мин содержимое каждой пробирки делят на две части. С одной частью проводят реакцию на крахмал, с другой – пробу Фелинга. В пробирке, где фермент разрушен кипячением, расщеплением крахмала не происходит.

Результаты наблюдений оформите в таблицу 3.

Таблица 3

Термоллабильность ферментов				
Материал исследования	Субстрат	Реакция на крахмал с йодом	Проба Фелинга на сахар	Чем обусловлена реакция
Свежая слюна Прокипяченная слюна	Крахмал Крахмал			

Выводы:

МЕТОДЫ ЦИТОЛОГИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ЗАНЯТИЕ VI

Теоретическая часть

В 1609–1610 гг. итальянский ученый Галилей изобрел оптический прибор, состоящий из объектива и окуляра. Немецкий ученый Фабер в 1625 г. назвал этот прибор микроскопом.

Микроскоп – это оптический прибор, дающий увеличенное изображение мелких объектов и их деталей. В настоящее время микроскопы используются для визуальных наблюдений, фотографирования, точных количественных измерений. Хотя различные марки световых микроскопов имеют конструктивные отличия, в каждом из них существуют механические и оптические узлы. Осветительная система (*конденсор и зеркало*), объективы и окуляры вместе с тубусом составляют оптический узел.

Конденсор с ирисовой диафрагмой и зеркало расположены под столиком микроскопа. *Конденсор* состоит из двух или трех линз. Различают несколько типов конденсоров в зависимости от метода наблюдения в микроскопе: конденсор светлого поля, конденсор темного поля, конденсор для наблюдения по методу фазового контраста и т. д.

Зеркало микроскопа имеет две поверхности – плоскую и вогнутую. Оно располагается под конденсором, направляя в него свет. Из конденсора свет попадает на препарат, находящийся на столике микроскопа, а затем входит в объектив.

Объективы – наиболее важная составная часть оптического узла микроскопа. Современные объективы – это многолинзовые системы, от качества которых зависит в основном изображение объекта. Недостатки (абберации) линз могут привести к тому, что изображение в какой-то мере окажется окрашенным или размазанным, искривленным. Назначение объектива можно сформулировать так: объектив строит геометрически подобное объекту увеличенное изображение с обратным расположением частей по отношению к препарату и в то же время выявляет подробности, недоступные глазу человека (или как говорят, «разрешает» структуры).

Практическая работа 6

Устройство световых микроскопов и техника микроскопирования

Правила работы с микроскопом:

1. Установите микроскоп штативом к себе, предметным столиком – от себя.
2. Поставьте в рабочее положение объектив малого увеличения.
3. Глядя в окуляр левым глазом, вращайте зеркало в разных направлениях. Пока поле зрения не будет освещено ярко и равномерно.
4. Положите на предметный столик приготовленный препарат, чтобы объект находился в центре отверстия предметного стекла.
5. Медленно опустите тубус с помощью макровинта, чтобы объектив находился на расстоянии 2 мм от препарата.
6. Смотрите в окуляр и одновременно медленно поднимайте тубус до тех пор, пока в поле зрения не появится изображение объекта.
7. Вращая револьвер, переведите в рабочее положение объектив большого увеличения.
8. Опустите тубус под контролем глаза почти до прикосновения с препаратом.
9. Глядя в окуляр, медленно поднимайте тубус, пока не появится изображение.
10. При зарисовке препарата смотрите в окуляр левым глазом.

Задание 1. Схематически зарисуйте в альбом микроскоп, обозначив его основные части.

Задание 2. Рассчитайте, чему равно увеличение микроскопа, если увеличение объектива равно $\times 20$, а окуляра – $\times 15$.

СТРОЕНИЕ КЛЕТОК

ЗАНЯТИЕ VII

Теоретическая часть

Клетка – элементарная единица живого. Это центральное положение клеточной теории, значение которой состоит в признании универсальности клеточного строения. Клетки по особенностям организации делят на два типа: прокариотические (клетки бактерий и сине-зеленых водорослей) и эукариотические (клетки растений, животных и грибов). В основу такого деления положена организация

ядра. Прокариотические клетки не содержат оформленного ядра, так что генетический материал в виде ДНК не ограничен от цитоплазмы оболочкой. Генетический аппарат представлен ДНК – единственной кольцевой хромосомы, которая лишена основных белков (гистонов). Нуклеоид располагается в клетке вблизи цитоплазматической мембраны и прикреплен к ней в нескольких местах. Помимо основной молекулы ДНК, бактериальная клетка может содержать плазмиды – кольцевые двуцепочечные молекулы ДНК, содержащие всего несколько тысяч пар нуклеотидов и размножающиеся независимо от основной молекулы ДНК.

Клетки прокариотического типа отличаются от эукариотических еще и размерами, отсутствием специализированных внутренних мембранных структур: пластид, митохондрий, лизосом, эндоплазматической сети, аппарата Гольджи, и др. Плазматическая мембрана бактерий имеет сходство с цитоплазматической мембраной эукариот, но лишена холестерина, содержит больше белков и фосфолипиды одного только типа.

Структуры, расположенные снаружи от плазматической мембраны (клеточная стенка, капсула, слизистый чехол, жгутики, ворсинки), называют поверхностными. Состав и организация клеточной стенки служат основой для деления бактерий на таксономические группы: грамм-положительные и грамм-отрицательные бактерии. В состав клеточной стенки могут входить муреин, близкий по составу к хитину, полисахариды, белки и липиды. Функции клеточной стенки очень сложны. Она способна регулировать обмен между клеткой и окружающей средой. Внутри стенки и на ее поверхности находятся ферменты, способные расщеплять полимерные соединения до низкомолекулярных, которые затем через цитоплазматическую мембрану поступают внутрь клетки. Здесь же находятся ферменты, синтезирующие внеклеточные полисахариды. Часто клеточная стенка бывает одета слизистой капсулой или чехлом. На клеточной поверхности многих бактерий имеются жгутики, благодаря которым клетки перемещаются в жидкой среде. Их основу составляет фибриллярный белок флагеллин.

Внутреннее пространство прокариотической клетки занимает цитоплазма. У фотосинтезирующих прокариот имеются интрацитоплазматические мембраны, которые в процессе своего развития могут срастаться или соприкасаться с плазматической мембраной. Иногда имеются мембраны, окружающие газовые вакуоли, включения серы, пигменты, но они отличаются от цитоплазматической.

К немембранным органоидам прокариотической клетки относят рибосомы с константой седиментации 70S, которые осуществляют белковый синтез. Они образованы двумя субъединицами: большой и малой, имеющими константы седиментации 50S и 30S соответственно.

В отличие от прокариотической, эукариотическая клетка имеет ядро и органоиды, ограниченные мембранами. Мембранные системы в цитоплазме и органоидах формируют замкнутые образования – компартменты.

Ядро – самая крупная органелла клетки, содержащая большую часть генетической информации. Ядро эукариот имеет оболочку, состоящую из двух мембран, разделенных околоядерным пространством, и матрикс – внутреннюю среду, называемую кариоплазмой. В матриксе сосредоточены хроматиновые нити, включающие в себя ДНК и белки, относящиеся в основном к классу гистонов. В ядре может быть одно или несколько ядрышек, в которых происходит образование и созревание рибосомальных РНК (рРНК).

Рибосомы эукариот по составу и функции схожи с рибосомами прокариот. Рибосомы цитоплазмы имеют константу седиментации 80S, большая и малая субъединицы – 60S и 40S соответственно. Субъединицы образованы рРНК, на которые приходится до 50 % их массы, и особыми белками (до 80 различных видов).

Рибосомы могут присоединяться к эндоплазматической сети (ЭПС), образуя шероховатую цитоплазматическую сеть. ЭПС – органелла, имеющая мембранное строение и состоящая из системы уплощенных, удлинённых, трубчатых и везикулярных образований. В области шероховатой ЭПС происходит образование белков и липидов цитоплазматических мембран, их сборка, а также синтез белков, удаляемых из клетки, например, секретируемых клетками желез. Мембраны гладкой ЭПС лишены рибосом. Функционально эта сеть связана с обменом углеводов, жиров и других веществ небелковой природы, например, стероидных гормонов.

Аппарат Гольджи обычно представлен в клетке целой системой связанных между собой или изолированных мембранных комплексов, расположенных в разных участках цитоплазмы. В аппарате Гольджи синтезируются полисахариды, а также их комплексы с белками и жирами, идет накопление синтезированных на мембранах ЭПС продуктов, превращение и сортировка поступивших веществ, образуются секреторные пузырьки или вакуоли.

Лизосомы – мелкие пузырьки, ограниченные мембраной, содержащие набор ферментов, катализирующих гидролитическое рас-

щепление нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов, жиров. Лизосомы принимают участие в аутофагии, т. е. самопереваривании отдельных органоидов и участков цитоплазмы клеток, поврежденных или изменившихся в результате старения.

Митохондрии – органеллы, имеющие вытянутую форму и окруженные двойной мембраной. Внутренняя мембрана образует кристы. Мембранная структура митохондрий образует два компартмента: пространство между внутренней и внешней мембраной и внутренний матрикс. Матрикс ограничен внутренней мембраной, в нем содержится кольцевая молекула ДНК, рибосомы, РНК, ферменты. Основной функцией митохондрий является извлечение энергии из определенных химических веществ в процессе окисления и накопление ее в форме АТФ.

Цитоплазма представлена основным веществом (матриксом, гиалоплазмой), которое заполняет пространство между плазмалеммой, ядерной оболочкой и другими внутриклеточными структурами. Гиалоплазма объединяет все внутриклеточные структуры и обеспечивает взаимодействие их друг с другом, являясь сложной коллоидной системой. Цитоплазма содержит также пероксисомы и другие микротельца, микрофиламенты, микротрубочки, клеточный центр, центриоли, включения.

Хлоропласты – зеленые пластиды автотрофных клеток. Хлоропласты высших растений подобно митохондриям имеют наружную и внутреннюю мембраны, различающиеся по проницаемости. Внутри хлоропласт содержит систему тилакоидов – тонких, напоминающих плоские мешочки структур, ограниченных однослойной мембраной, которые располагаются поодиночке или собраны в граны. Тилакоиды содержат хлорофилл и компоненты, принимающие участие в фотохимических реакциях фотосинтеза. Внутреннее пространство хлоропласта заполнено стромой, в которой содержится ДНК, рибосомы, ферменты, аминокислоты, РНК, включения.

Вакуоль – специфический для растительной клетки органоид. В зрелой клетке вакуоль занимает большую ее часть. Она окружена тонопластом, избирательно проницаемой мембраной, и содержит водный раствор солей и органических соединений. Вакуоль формируется в процессе роста клетки. Минеральные вещества, находящиеся в вакуоли, являются запасными и могут использоваться по мере необходимости. Значительную роль вакуоль играет в водном режиме клетки, с ней связано формирование осмотического потенциала клетки и тургорного давления.

Клеточная стенка – надмембранная структура поверхностного аппарата клеток. В состав клеточных стенок растений входят целлюлоза, гемицеллюлоза, гликопротеины, пектиновые вещества, лигнин. Целлюлоза образует микрофибриллы, которые составляют каркас клеточной стенки. Он погружен в матрикс из пектина и гемицеллюлозы. Клеточная стенка достаточно прочна, но в то же время пластична и эластична. Клеточная стенка выполняет опорную, защитную и транспортную функции, сохраняет определенный запас воды и участвует в ионном обмене, поглощении веществ клеткой.

Практическая работа 7

Изучение прокариотической и эукариотической клеток

Задание 1. Приготовьте временный препарат бактерий. Для этого за 3–5 дней помещают в колбу на 100 мл небольшое количество измельченного материала (мясо, рыба, белки яйца и пр.), добавив на кончике скальпеля немного мела. Перемешивая, заливают водопроводной водой на 2/3 объема. Колбу с настоем выдерживают в термостате при 25–28 °С или в теплом помещении в темноте 3–5 дней. Каплю настоя, содержащего разнообразные бактерии, помещают на предметное стекло. После этого закрывают препарат покровным стеклом и рассматривают под микроскопом. Можно приготовить негативный препарат, добавив в каплю настоя тушь.

Задание 2. Рассмотрите и зарисуйте клетки бактерий.

Задание 3. Для более детального изучения прокариотической клетки рассмотрите постоянные препараты чистых культур бактерий.

Задание 4. Приготовьте, изучите и зарисуйте препараты растительной клетки:

а) чешуйки лука. Для этого отделяют от дольки луковицы мясистую чешую, снимают пинцетом тонкую пленку, покрывающую чешую с внутренней стороны. Отрезают ножницами кусочек пленки в несколько квадратных миллиметров и помещают на предметное стекло в каплю раствора йода в йодистом калии. Препарат рассматривают при большом ($\times 40$) и малом увеличении ($\times 10$ и $\times 20$);

б) листа элодеи. В этом случае ножницами отрезают половину листа элодеи, помещают в каплю воды на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и рассматривают сначала при малом, а затем при большом увеличении. Хорошо видны хлоропласты, ядра в неокрашенных клетках не видны;

в) клубня картофеля. Для приготовления временного препарата делают тонкий срез или соскоб с кусочка клубня картофеля, помещают на предметное стекло в каплю воды, накрыв покровным стеклом. Рассматривают при малом и большом увеличении.

Задание 5. Изучите постоянные препараты животных клеток и зарисуйте их на примере клеток эпителия кожи лягушки, клеток крови хладнокровных и теплокровных животных, половых клеток и т. д. По результатам работы заполните таблицу 4.

Таблица 4

Сравнительная характеристика
прокариотической и эукариотической клеток

Особенности	Прокариоты	Эукариоты
Размеры клеток		
Генетический материал		
Синтез белка		
Клеточные стенки		
Дыхание		
Фотосинтез		
Фиксация азота		

ЯДРО КЛЕТОК

ЗАНЯТИЕ VIII

Теоретическая часть

У эукариотических клеток ядро – самая крупная и морфологически обособленная органелла. В отличие от цитоплазмы, выполняющей много различных функций, у ядра функции сводятся к длительному хранению и воспроизведению генетической информации и опосредованному через РНК синтезу белка. Ядро имеет диаметр порядка 10 нм, форма его может варьировать.

Ядро эукариот имеет оболочку, состоящую из двух мембран, разделенных перинуклеарным пространством, и матрикс – внутреннюю среду, называемую нуклеоплазмой. Ядерная оболочка имеет множество пор, через которые транспортируются нуклеиновые кислоты и белки, и образует длинные выросты, проникающие в цитоплазму.

В нуклеоплазме сосредоточены хроматиновые нити, включающие в себя ДНК и белки, относящиеся в основном к классу гистонов. ДНК играет роль матрицы при собственном воспроизведении, поэтому она обеспечивает передачу наследственных свойств от клетки

к клетке. Через синтез ферментов осуществляется регуляция ДНК клеточного метаболизма. Хроматин является интерфазной формой существования хромосом клетки. Число и форма хромосом специфичны для вида.

Ядрышко выявляется в интерфазном ядре на светооптическом уровне как мелкая плотная гранула, интенсивно окрашивающаяся основными красителями. Размеры и число ядрышек увеличивается при повышении функциональной активности клетки. Функции ядрышка заключаются в синтезе рРНК и ее сборке в предшественники рибосомальных субъединиц.

Практическая работа 8

Обнаружение ядер в клетках

Задание 1. Рассмотрите при малом увеличении светового микроскопа фиксированные и окрашенные ядра в нервных и глиальных клетках спинномозгового узла. (Срез спинального ганглия; окраска гематоксилин–эозином.)

Задание 2. Изучите строение ядра нервных клеток при большом увеличении микроскопа. Обратите внимание, что содержимое ядер представлено: глыбками хроматина, окрашивающимися основными красителями, бесцветным ядерным соком (наиболее жидкой частью ядра) и одним или двумя плотными ядрышками. От цитоплазмы ядро отделено ядерной оболочкой.

Задание 3. Зарисуйте нервную клетку. На рисунке обозначьте:

а) ядро (в нём – ядерную оболочку, ядрышко, глыбки хроматина и ядерный сок); б) цитоплазму; в) капсулу.

В крупных ядрах глыбки хроматина находятся на большом расстоянии друг от друга. Промежутки между ними заполнены неокрашенным ядерным соком. Такие ядра на препарате выглядят светлыми, их называют пузырьчатыми. У мелких ядер то же количество хроматина расположено значительно плотнее (компактные ядра).

Задание 4. Рассмотрите препарат «Сегментированные ядра клеток крови» при большом увеличении микроскопа (мазок крови человека; окраска азур–эозином). Изучите форму ядер лейкоцитов. У нейтрофильных лейкоцитов на фоне бледно-розовой цитоплазмы хорошо видно ядро, разделённое на 2–5 сегментов, соединённых друг с другом тонкими перемычками ядерного вещества. Компактное ядро лимфоцитов обладает округлой формой. Оно окружено узким ободком базофильной цитоплазмы.

Задание 5. Зарисуйте нейтрофилы и лимфоциты, на рисунке обозначьте: а) нейтрофильный (сегментоядерный) лейкоцит; б) лимфоцит.

Под рисунком отметьте: форма ядер чаще всего зависит от формы клеток.

Задание 6. Методика исследования полового хроматина в ядрах клеток слизистой полости рта. Для приготовления давленных препаратов возьмите шпателем соскоб из полости рта и сделайте мазок на предметном стекле. Мазок окрасьте в ацетоорсеине, и через 5 минут препарат просмотрите под микроскопом. Найдите интерфазные ядра. Тельца полового хроматина имеют неодинаковую форму и хорошо видны на фоне мелкозернистой нуклеоплазмы.

Задание 7. Рассмотрите ядра в клетках печени (срез печени лягушки, окраска гематоксилин-эозином). Печеночные клетки (гепатоциты) плотно прилегают друг к другу и имеют многоугольную форму. В клетках хорошо видны ядро, окрашенное гематоксилином в темно-синий цвет, и цитоплазма, окрашенная эозином – в розовый. Зарисуйте несколько гепатоцитов, обозначив: а) ядро, б) цитоплазму, в) глыбки гликогена.

Задание 8. Рассмотрите ядра в клетках растений, на примере листа элодеи канадской (*Elodea canadensis Michx*).

Элодея – пресноводное растение с мутовками продолговато-овальных листьев на тонком стебле, с помощью которого можно познакомиться с клетками, находящимися на разных стадиях развития. Наиболее молодые клетки, структура которых еще не сформирована, составляют мелкие зачатки листьев, расположенных на верхушке побега близ конуса нарастания.

Для приготовления препарата, верхушку побега (не более 1 см длиной) с почкой кладут на предметное стекло в большую каплю воды и осторожно под биноклем или лупой двумя препаровальными иглами удаляют все сформированные листья. Самые мелкие чешуевидные листья, скученные на верхушке побега, отрывают от стебля, расправляют, накрывают покровным стеклом и рассматривают при малом, а затем – большом увеличении микроскопа.

Размеры и форма клеток зависят от размеров развивающейся листовой пластинки. Самые молодые листовые зачатки, которые удается отделить от стебля, состоят из клеток, очертания которых довольно сильно варьируют. Большинство клеток многоугольные, некоторые клетки узкие, удлинённые. Часто встречаются клетки,

только что возникшие в результате деления. Оболочки клеток очень тонкие, плотно сомкнутые. Мелкие тельца, также расположенные в цитоплазме, представляют собой формирующиеся хлоропласты. В нижерасположенных листьях по мере увеличения клеток число пластид и их размеры увеличиваются, содержимое клеток становится более светлым, прозрачным вследствие появления вакуолей с водянистым клеточным соком. Клетки заполнены густой цитоплазмой, окружающей крупное хорошо заметное ядро. Для рассмотрения ядер листья можно обработать раствором йода в йодистом калии.

БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

ЗАНЯТИЕ IX

Теоретическая часть

Для каждой клетки можно подобрать следующие растворы: 1) гипотонический, у которого осмотическое давление меньше осмотического давления клеточного сока; 2) изотонический, имеющий осмотическое давление, равное осмотическому давлению клеточного сока; 3) гипертонический, у которого осмотическое давление больше осмотического давления клеточного сока.

При погружении клеток в гипертонический раствор происходит отсасывание воды из клеток до тех пор, пока не сравняются концентрации клеточного сока и наружного раствора. При этом клеточные стенки сокращаются до полной потери тургора, после чего начинается плазмолиз, т. е. отставание цитоплазмы от оболочки.

Сначала цитоплазма отстает от оболочки в уголках (уголковый плазмолиз), затем во многих местах с образованием вогнутых поверхностей (вогнутый плазмолиз) и, наконец, принимает округлую форму (выпуклый плазмолиз).

В качестве плазмолитиков (веществ, растворы которых вызывают плазмолиз) используют неядовитые вещества, плохо проникающие через цитоплазму в вакуоль. Обратный процесс восстановления тургора клетки называется деплазмолизом.

Цитоплазма не является идеальной полупроницаемой мембраной, она свободно пропускает не только воду, но и многие вещества, причем некоторые из них со значительной скоростью. К числу таких веществ относится краситель нейтральный красный, который способен проникать в живые клетки и накапливаться в них в больших количествах. Отмирание цитоплазмы при этом не происходит, в чем

можно убедиться, вызвав плазмолиз окрашенных клеток (плазмолизироваться могут только живые клетки). Нейтральный красный – двухцветный индикатор: в кислой среде при рН меньше 6, он имеет малиновую окраску, а в щелочной – желтую.

Практическая работа 9

Явление плазмолиза и деплазмолиза

Задание 1. Сделайте бритвой срез эпидермиса, клетки которого содержат антоциан. Во избежание повреждения клеток эпидермиса желательно, чтобы срезы состояли из двух слоев клеток.

Поместите срез в каплю воды на предметное стекло, накройте покровным стеклом и рассмотрите в микроскоп клетки с окрашенным клеточным соком. Затем, замените воду на 1 М раствор сахарозы, для чего нанести на предметное стекло рядом с покровным стеклом большую каплю раствора и уберите воду кусочком фильтровальной бумаги, прикладывая его с другой стороны покровного стекла. Повторите этот прием 2–3 раза до полной замены воды раствором. Все время следите в микроскоп за тем, что происходит в клетках.

Через 15–20 минут, когда плазмолиз будет хорошо заметен, ввести под покровное стекло каплю воды, отсасывая раствор фильтровальной бумагой, и вновь наблюдайте за изменениями, происходящими в клетках.

Приготовьте второй срез эпидермиса, поместите его в большую каплю воды на предметное стекло и убейте клетки, нагревая препарат на пламени спиртовки (**нагревать следует осторожно, не допуская полного испарения воды**). Отсосать воду фильтровальной бумагой, нанести на срез каплю 1 М раствора сахарозы, закройте покровным стеклом и, рассматривая препарат в микроскоп, установите, происходит ли плазмолиз.

Запишите результаты наблюдений и сделайте схематические рисунки клеток в воде, и после пребывания в растворе, обозначив основные составные части клеток, укажите стрелками процессы плазмолиза и деплазмолиза.

Задание 2. Приготовьте 2–3 среза эпидермиса чешуи лука или листьев каких-либо других растений и поместите их на предметное стекло в большую каплю 0,02%-ного водного раствора нейтрального красного. Через 10 мин отсосать раствор фильтровальной бумагой, перенести срезы в каплю воды, закрыть покровным стеклом и рас-

смотреть в микроскоп. Замените воду на раствор KNO_3 и продолжайте наблюдение сначала при малом, а затем при большом увеличении.

Зарисуйте плазмолизированную клетку, отметив, какая часть окрашена красителем (оболочка, цитоплазма или вакуоль) и в какой цвет.

Сделайте вывод о проницаемости цитоплазмы для нейтрального красного и о реакции (рН) содержимого вакуоли исследованных клеток.

ЗАНЯТИЕ X

Теоретическая часть

Особенностью строения растительной клетки, отличающей ее от клеток животных организмов, является наличие вакуоли, которая содержит воду, различные органические и минеральные вещества, многие из которых находятся в растворенном состоянии. В вакуоли могут накапливаться сахара, органические кислоты, белки, оксалат кальция, антоцианы. Вакуолярный (или клеточный) сок кислый (рН 5,0–6,0), большинство ферментов вакуоли также имеют оптимум в кислой среде. В зрелых растительных клетках имеется одна большая вакуоль, на долю которой приходится до 90 % объема клетки. Вакуоль формируется путем слияния мембран ЭПС (эндоплазматическая сеть) в вакуолярную мембрану (тонопласт). Тонопласт обладает избирательной проницаемостью и поэтому участвует в регуляции осмотических процессов, связанных с вакуолью, особенно в поддержании тургора. Избирательная проницаемость мембраны зависит от химических особенностей составляющих ее компонентов, от ее структуры, а также от наличия специфических систем транспорта веществ. Между цитоплазмой и средой существует значительный градиент рН. Его поддержание связывают с существованием системы протонных АТФаз, перекачивающих ионы водорода из цитоплазмы в вакуоль, в чем заключается одна из функций вакуоли.

Проницаемость тонопласта отличается от проницаемости плазмалеммы (наружная мембрана). Так, гипертоничный раствор KNO_3 проникает через плазмалемму, но не проникает через тонопласт, что можно заключить по отсутствию увеличения объема вакуоли.

Практическая работа 10

Обнаружение тонопласта (по де-Фризу)

Задание 1. Эпидермис вогнутой (морфологически верхней) стороны неокрашенного лука поместите на предметном стекле в каплю 1 М раствора KNO_3 с эозином. Через 3–5 мин начинайте наблюдения

под микроскопом. Хорошо заметно уменьшение объема вакуоли. Вначале протоплазма окружает вакуоль тонким слоем, однако вскоре начинается набухание протоплазмы, а затем и отмирание, вызванные совместным действием KNO_3 и эозина, которые проникли в мезоплазму. Участки отмершей протоплазмы, окрашенные в ярко-розовый цвет, хорошо заметны.

В течение длительного времени вакуоль остается сокращенной и не окрашенной в розовый цвет. Следовательно, ни KNO_3 , ни эозин не проникают через тонопласт.

Зарисуйте одну клетку и сделайте вывод по результатам работы.

ЗАНЯТИЕ XI

Теоретическая часть

Мембраны живых клеток возникают, развиваются и разрушаются на протяжении всей жизни клеток. Состав, структура и свойства мембраны определяются их природой и зависят от условий окружающей среды. Изменчивость мембран играет важную роль в жизнедеятельности клетки.

Одним из наиболее общих, неспецифических и быстрых ответов растительного организма на воздействие различных факторов внешней среды является изменение проницаемости клеточных мембран. Степень проницаемости мембран меняется при росте клеток, старении тканей, под влиянием гормонов, температуры, физических, химических факторов и т. д. Одним из факторов внешней среды, определяющих степень проницаемости клеточных мембран, является температура. Обобщая данные по действию субоптимальных температур на растение, можно сделать вывод, что повреждения мембран являются первичным (прямым) действием повышения температуры. Повреждение может быть вызвано дегидратацией молекул белков в мембранах, нарушением водородных связей. Увеличение кинетической энергии молекул воды может привести к тому, что ранее адсорбированные молекулы переходят в свободную форму. Это позволяет молекулам белка сблизиться настолько, что могут возникнуть новые связи и произойти агрегация молекул. Кроме того, изменение температуры приводит к изменению состояния липидов в клеточных мембранах. Ферментативная активность многих мембранных белков, проницаемость и транспортная активность мембран резко меняются при переходе липидов из «жидкого» состояния в «твердое». Повреждения растений низкими положительными температурами также ха-

рактизуется изменением физического состояния и проницаемости мембран.

Проницаемость мембран может быть использована как показатель устойчивости растений в экстремальных условиях.

Определить влияние каких-либо условий или веществ на проницаемость клеточных мембран можно, используя разные методы, в частности, с помощью деплазмолиза или, измеряя выход различных метаболитов из клетки.

Практическая работа 11

Проницаемость мембран клеток

Задание 1. Делают тонкие срезы эпидермиса выпуклой стороны чешуи окрашенного лука. Помещают 4–5 срезов в бюкс, содержащий 10%-ную мочевины, отмечая время помещения срезов на раствор. Бюкс закрывают крышкой, чтобы избежать испарения раствора и повышения его концентрации. Оставляют бюкс при комнатной температуре. Определяют время плазмолиза и деплазмолиза для всех срезов. Для этого через каждые 5–10 мин вынимают срез из бюкса и помещают в каплю этого же раствора мочевины на предметном стекле, закрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом при малом увеличении. Когда 50 % клеток на срезе будут находиться в стадии выпуклого плазмолиза, отмечают время наступления плазмолиза для данного среза. После просмотра срез помещают обратно в бюкс и затем в этих же срезах определяют время деплазмолиза, т. е. исчезновения картины плазмолиза после проникновения мочевины в вакуоль. Время наступления деплазмолиза отмечают, когда 50 % клеток на срезе будет находиться в этой стадии. Проводят подобные опыты, помещая срезы в бюкс, находящийся в холодильнике при температуре +3 °С, и в две пробирки, одна из которых находится в водяной бане при температуре +35 °С, другая – +45 °С. Определяют время плазмолиза и деплазмолиза при этих температурах и делают выводы о влиянии температуры на проницаемость клеток лука для мочевины.

БИОЭНЕРГЕТИКА РАСТЕНИЙ. ФОТОСИНТЕЗ

ЗАНЯТИЕ XII

Теоретическая часть

Фотосинтез – это образование органических веществ из углекислоты и воды с использованием световой энергии. Данный процесс происходит в зеленых пластидах, хлоропластах, в две стадии: световую и темновую. Световая фаза осуществляется в тилакоидах гран, а темновая – в строме хлоропластов. Аккумуляция солнечной энергии осуществляется набором фоторецепторных молекул – пигментов, использующих разные части светового спектра. Пигменты встроены в мембраны хлоропластов. В состав хлоропластов входят следующие пигменты:

хлорофилл «а»: $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ – зеленый с синеватым оттенком,
хлорофилл «б»: $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ – зеленый с желтоватым оттенком,
каротин: $C_{40}H_{56}$ – желто-оранжевый,
ксантофилл: $C_{40}H_{56}O_2$ – золотисто-желтый.

Хлорофилл – это основной пигмент, участвующий в фотосинтезе и обуславливающий зеленый свет листьев. Максимум поглощения света хлорофиллами лежит в красной и синей части спектра; зелёные лучи совсем не поглощаются.

Вторая группа пигментов, присутствующих в хлоропластах всех растений, называется каротиноидами. В неё входят жирорастворимые соединения жёлтого, оранжевого и красного цветов.

Все эти пигменты нерастворимы в воде, но растворимы в органических растворителях (спирт, ацетон и др.). Задача данной работы – получение спиртовой вытяжки из зеленых листьев и ознакомление с некоторыми физическими и химическими свойствами пигментов.

Практическая работа 12

Выделение и изучение свойств пигментов зеленого листа

Задание 1. Извлечение пигментов.

Листья проростков кукурузы нарезать в фарфоровую ступку и растереть с небольшим количеством этилового спирта, прибавив на кончике скальпеля $CaCO_3$ (для нейтрализации кислот клеточного сока). Носик ступки с наружной стороны смазать вазелином. После небольшого отстаивания зеленый раствор осторожно по палочке сливают в воронку с сухим фильтром. Оставшуюся в ступке густую массу снова растирают со спиртом. После отстаивания жидкость

переносят на фильтр. Эту операцию повторяют несколько раз, пока раствор не станет бесцветен. С полученной вытяжкой проводят ряд опытов.

Задание 2. Флуоресценция хлорофилла.

Флуоресценция – явление свечения веществ при поглощении ими света. При этом в большинстве случаев излучаемый свет имеет длину волны большую, чем поглощаемый. Флуоресценция – признак фотохимической активности вещества.

Вытяжку пигментов помещают на черном фоне у электролампы (лучше синего цвета), рассматривают окраску вытяжки в отраженном свете. Вишнево-красный цвет вытяжки в отраженном свете свидетельствует о способности хлорофилла флуоресцировать.

Задание 3. Разделение пигментов по Краусу.

Этот метод основан на различной растворимости пигментов в спирте и бензине. В пробирку наливают 2–3 мл спиртовой вытяжки, прибавляют примерно полуторный объем бензина и несколько капель воды, для того чтобы спирт не смешивался с бензином. Пробирку накрывают и несколько раз сильно встряхивают, а затем дают 2–3 мин постоять. При этом происходит разделение слоев: верхний зеленый слой (бензиновый) содержит оба зеленых пигмента и каротин, а нижний желтый слой (спиртовой) содержит ксантофилл.

ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК

ЗАНЯТИЕ XIII

Теоретическая часть

Клеточное деление относится к числу важнейших биологических процессов, так как с ним связана передача наследственной информации. Период существования клетки от момента ее образования путем деления материнской клетки до собственного деления или смерти называют клеточным циклом (жизненным циклом).

Митотический цикл состоит из четырех основных периодов: G_1 (пресинтетический), S (синтетический), G_2 (постсинтетический) и митоз. Интерфаза – период между делением, в котором происходят взаимосвязанные, согласованные во времени, важнейшие события, в частности удвоение хромосом. Интерфаза – наиболее продолжительный период в жизненном цикле меристематической клетки, и после его завершения она вступает в митоз.

Митоз включает в себя сложное деление ядра (кариокинез), которое проходит в несколько стадий: профазы, метафазы, анафазы и телофазы.

В профазе ядро увеличивается, и в нём становятся отчётливо видны хромосомные нити, которые в это время уже спирализованы. Каждая хромосома после редупликации в интерфазе состоит из двух сестринских хроматид, соединённых одной центромерой. В конце профазы обычно исчезают ядерная оболочка и ядрышки. На препаратах можно найти раннюю и позднюю профазы и сравнить их между собой. Хромосомные нити более чётко видны в поздней профазе, и нередко можно заметить, что они удвоены. В профазе наблюдается также расхождение центриолей, которые образуют два полюса клетки.

После того как исчезнет ядерная оболочка, видно, что хромосомы достигли максимальной спирализации, стали короче и перемещаются к экватору клетки, располагаясь в одной плоскости. Этот период в митозе называется метафазой. Клетка уже имеет митотическое веретено, состоящее из опорных и тянущих нитей. Первые из них протянуты от одного полюса к другому, а вторые связывают центромеры хромосом с полюсами.

На препаратах, окрашенных гематоксилином, нити митотического веретена не всегда видны, так как данный краситель ядерный, но хорошо заметно, что каждая хромосома, прикреплённая к митотическому веретену, состоит из двух сильно спирализованных и параллельно расположенных хроматид. Удвоенная хромосома располагается перпендикулярно нитям митотического веретена на равном расстоянии от полюсов. Центромеры всех хромосом находятся в одной экваториальной плоскости.

Анафаза начинается с деления центромер. Сестринские хроматиды каждой хромосомы расходятся к разным полюсам. Так происходит точное распределение генетического материала и на каждом полюсе оказывается такое же число хромосом, какое было у исходной клетки до их удвоения. После разделения центромеры каждая хроматида приобретает функции самостоятельной хромосомы. Перемещение хроматид к полюсам происходит вследствие сокращения тянущих нитей и удлинения опорных нитей митотического веретена.

В телофазе хромосомы на каждом полюсе претерпевают деспирализацию, т. е. процесс, противоположный происходящему в профазе. Контур хромосом теряют свою чёткость, митотическое веретено разрушается, восстанавливается ядерная оболочка, и появляются ядрышки.

Практическая работа 13

Митоз в клетках корешка лука (*Allium cepa* L.)

Задание 1. Наиболее удобным объектом для изучения митоза и его отдельных фаз являются корни репчатого лука. При малом увеличении рассмотрите в корешке лука 3 зоны: 1) концевая часть – чехлик, состоящая из отмирающих клеток; 2) зона размножения клеток – меристема; 3) зона роста, состоящая из вытянутых прямоугольных клеток. Деление клеток идет во второй зоне, где можно найти неделящиеся клетки (стадия интерфазы) и все фазы митоза.

Задание 2. Приготовьте давленные препараты, для этого отрезают скальпелем кончики корешков длиной 0,5–1 см. Отрезанные корешки фиксируют смесью ледяная уксусная кислота и этиловый спирт (в соотношении 1: 3) в течение 24 часов в защищенном от света месте. После пребывания клеток в фиксаторе их переносят в чашку Петри и отмывают в течение 5 мин. Затем один корешок помещают на предметное стекло, на него наносят 3–4 капли красителя (метиленовый синий). Слегка подогревают препарат с красителем над спиртовкой (**не доводя до кипения!**). Нагрев повторяют 2–3 раза. Корешки лука переносят из раствора красителя в дистиллированную воду и оставляют на 5 мин. Отрезают скальпелем концевой, наиболее окрашенный участок длиной 1–2 мм. Эту часть корешка лука помещают на предметное стекло, накрывают покровным стеклом, затем несколькими листами фильтровальной бумаги и сильно нажимают через нее на покровное стекло подушечкой большого пальца. Готовый препарат изучите под микроскопом при малом и большом увеличении и найдите клетки, находящиеся на разных стадиях митоза.

Задание 3. Рассмотрите постоянный препарат с продольным срезом корней лука при малом и большом увеличении микроскопа (с объективом $\times 40$). Зарисуйте фазы митоза, подпишите рисунки. Найдите на препаратах раннюю и позднюю профазы, сравните их между собой. На кончике корня хорошо заметен чехлик, предохраняющий конус нарастания от повреждений во время роста в почве. Далее следует конус нарастания корня или зона деления клеток (около 2 мм). Митоз изучают на клетках конуса нарастания корня, где имеется много делящихся клеток.

Сделайте выводы по результатам работы.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Быков В. Л.* Цитология и общая гистология (функциональная морфология клеток и тканей) / В. Л. Быков. – СПб. : СОТИС, 2002. – 520 с.
2. Биология клетки : учеб. пособие / И. А. Райгородская, М. В. Ясько, А. В. Одинцов, В. М. Антипов. – Иркутск : Репроцентр А1. – 99 с.
3. *Верещагина В. А.* Основы общей цитологии : учеб. пособие / В. А. Верещагина. – М. : Издат. центр «Академия», 2007. – 176 с.
4. *Дерябин Д. Г.* Функциональная морфология клетки : учеб. пособие / Д. Г. Дерябин. – М. : КДУ, 2005. – 320 с.
5. *Комов В. П.* Биохимия : учебник / В. П. Комов, В. Н. Шведова. – М. : Дрофа, 2008. – 640 с.
6. Лабораторные занятия по курсу гистологии, цитологии и эмбриологии : учеб. пособие / под ред. Ю. И. Афанасьева. – М. : Медицина, 2004. – 328 с.
7. Малый практикум по цитологии / под. ред. Н. М. Глазкова. – М. : Изд-во МГУ, 1977. – 287 с.
8. *Саляева М. П.* Цитология : метод. указания / М. П. Саляева, О. В. Музалевская, Б. Э. Богданов. – Иркутск : Изд-во ИГУ, 1996. – 60 с.
9. *Цаценко Л. В.* Цитология : учеб. пособие / Л. В. Цаценко, Ю. С. Бойко. – Ростов н/Д : Феникс, 2009. – 186 с.
10. *Ченцов Ю. С.* Введение в клеточную биологию : учебник. – 4-е изд., перераб. и доп. / Ю. С. Ченцов. – М. : Академкнига, 2005. – 495 с.

Учебное издание

ОСНОВЫ ЦИТОЛОГИИ

Малый практикум

Составитель **Музалевская** Ольга Васильевна

Подготовила к печати *Э. А. Невзорова*

Темплан 2012. Поз. 8

Подписано в печать 30.05.12. Формат 60×90 1/16.
Уч.-изд. л. 1,4. Усл. печ. л. 1,9. Тираж 50 экз. Заказ 55

ИЗДАТЕЛЬСТВО ИГУ
664003, Иркутск, бульвар Гагарина, 36