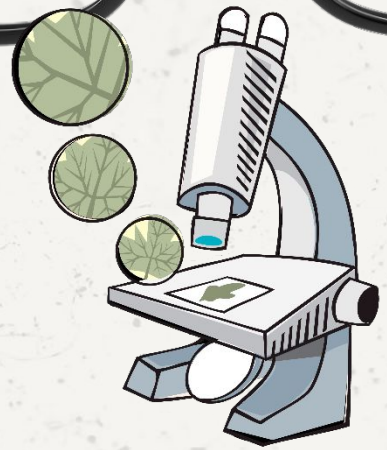
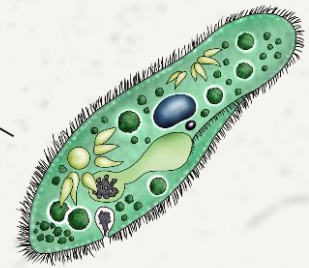
Методы изучения клетки

Микроскопия

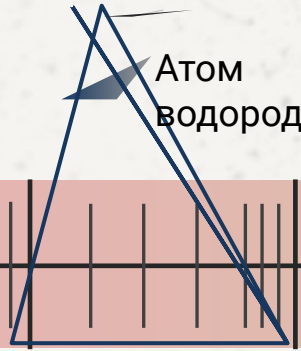
Разрешающая способность – это способность оптической системы выявлять детали структуры, т.е. различать в качестве двух дискретных образований две маленькие точки, тесно примыкающие друг к другу

VIDEOUROKI.NET

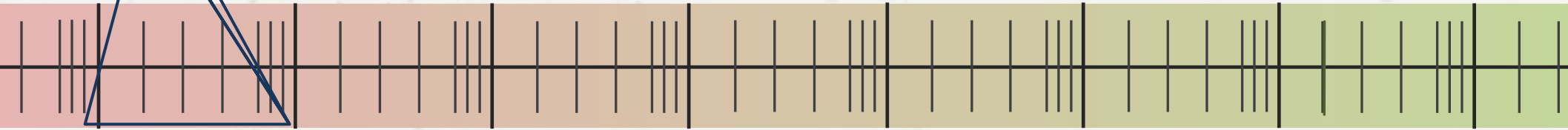




0,2 мм



Атом
водорода



0,1 нм
нанометр
10^{-10} м

1 нм
10^{-9} м

10 нм
10^{-8} м

100 нм
10^{-7} м

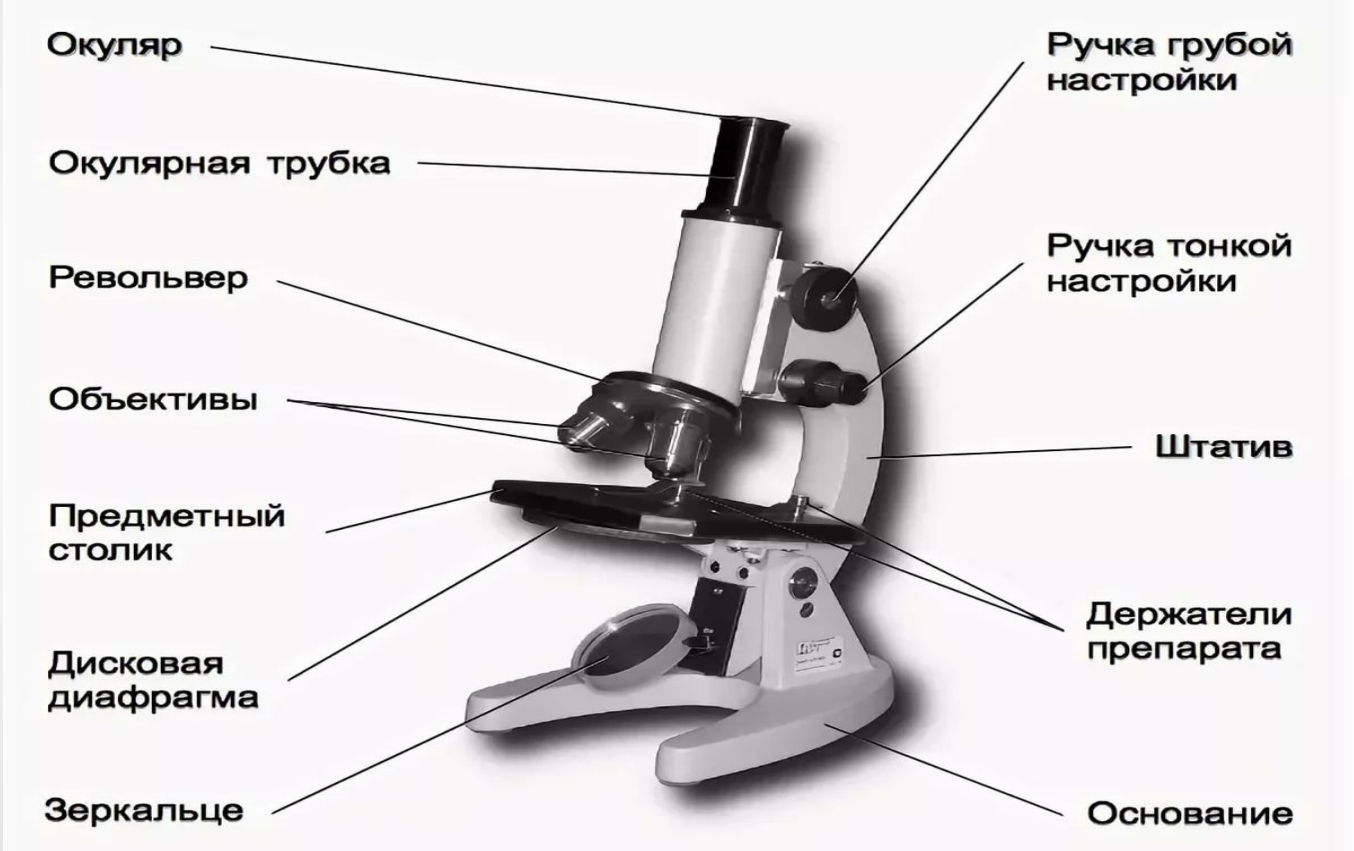
1 мкм
микрометр
10^{-6} м

10 мкм
10^{-5} м

100 мкм
10^{-4} м

1 мм
миллиметр
10^{-3} м

Световой микроскоп



Световая микроскопия

Объект рассматривается в потоке видимой части электромагнитного излучения (длина волны = 400–750 нм)

Электронная микроскопия

Объект рассматривается в потоке электронов

Разрешающая способность – это минимальное расстояние между двумя точками объекта, при котором точки видны раздельно.

$$d = \lambda / n * \sin \alpha$$

n - коэффициент преломления среды , через которую осуществляется наблюдение объекта, α - угол наклона, под которым лучи освещения входят в объектив, λ - источник освещения

Преимущества Светового микроскопа

- Легкий, Недорогой
- Не требует сложной подготовки препарата
- Живые клетки, без фиксации и окрашивания
- Цветное изображение
- Есть возможность видеть процессы: деление клетки
- Можно увидеть: ядро, вакуоль, цитоплазму, хлоропласты, митохондрии, клеточную стенку

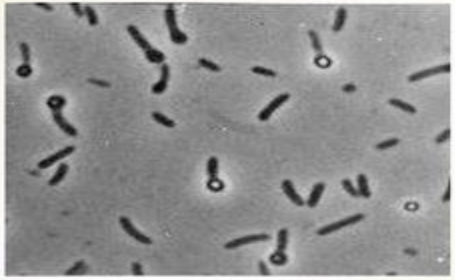
Недостатки

- Невысокое разрешение, Плоское изображение

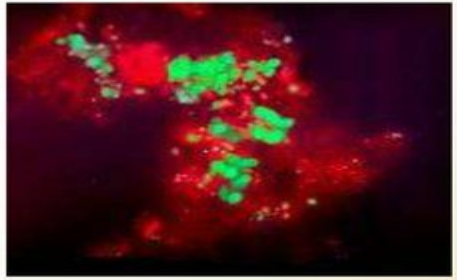
Микроскопическая техника

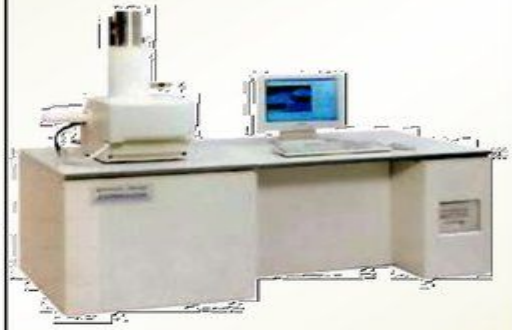
Методы микроскопирования

Обычная световая микроскопия

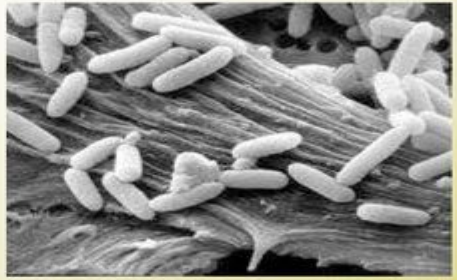


Люминисцентная микроскопия

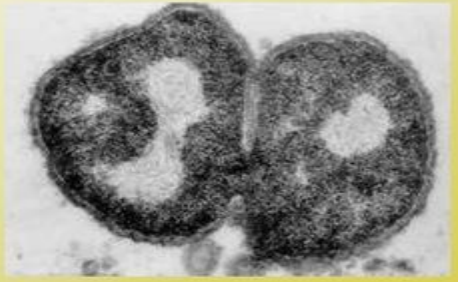




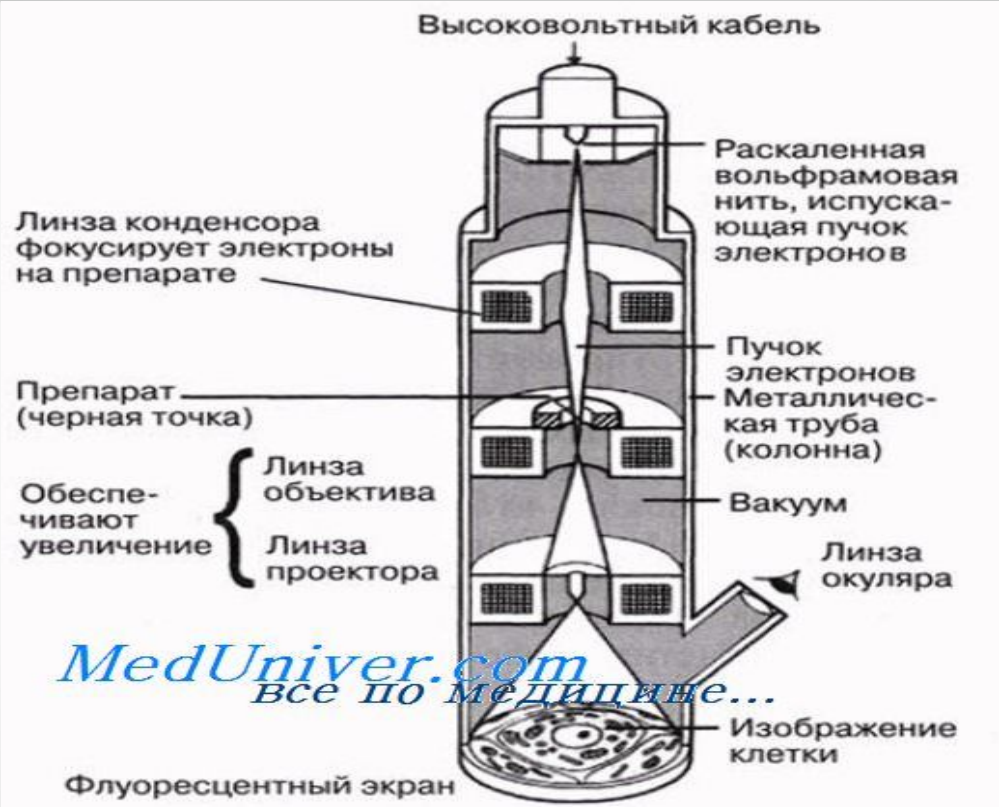
Сканирующий электронный микроскоп



Просвечивающий электронный микроскоп



Электронный микроскоп



Траектория пучка электронов в трансмиссионном электронном микроскопе.

Электронная пушка
Анод
Магнитные линзы
Образец
Изображение

VIDEOUROKI.NET
Электронный микроскоп

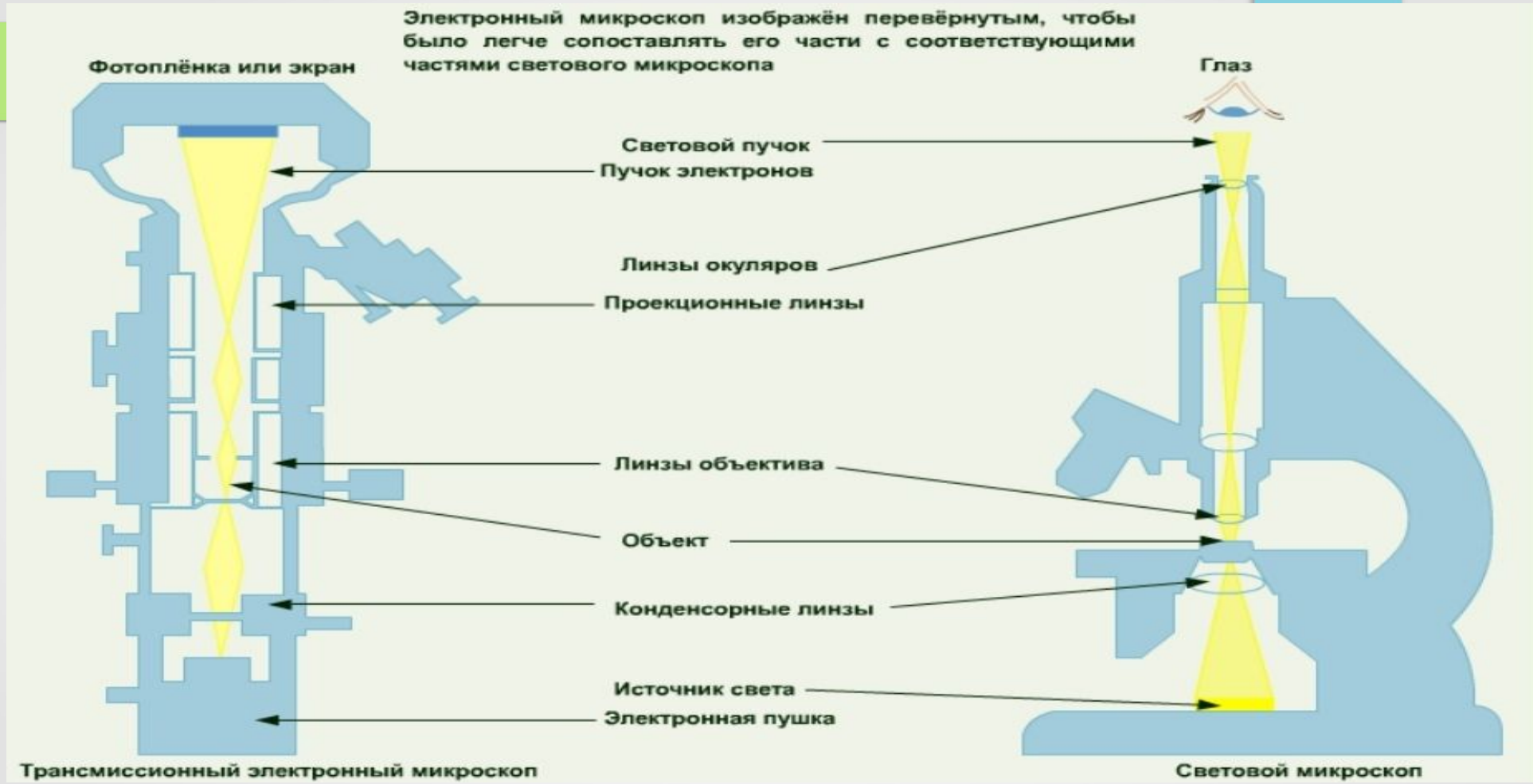
Преимущества электронного микроскопа 1930 гг

- высокое разрешение (0,5 нм на практике)
- Изучение ультраструктур клетки (детали строения отдельных органоидов: хлоропластов, митохондрий, рибосом, плазматической мембраны)

Недостатки электронного микроскопа

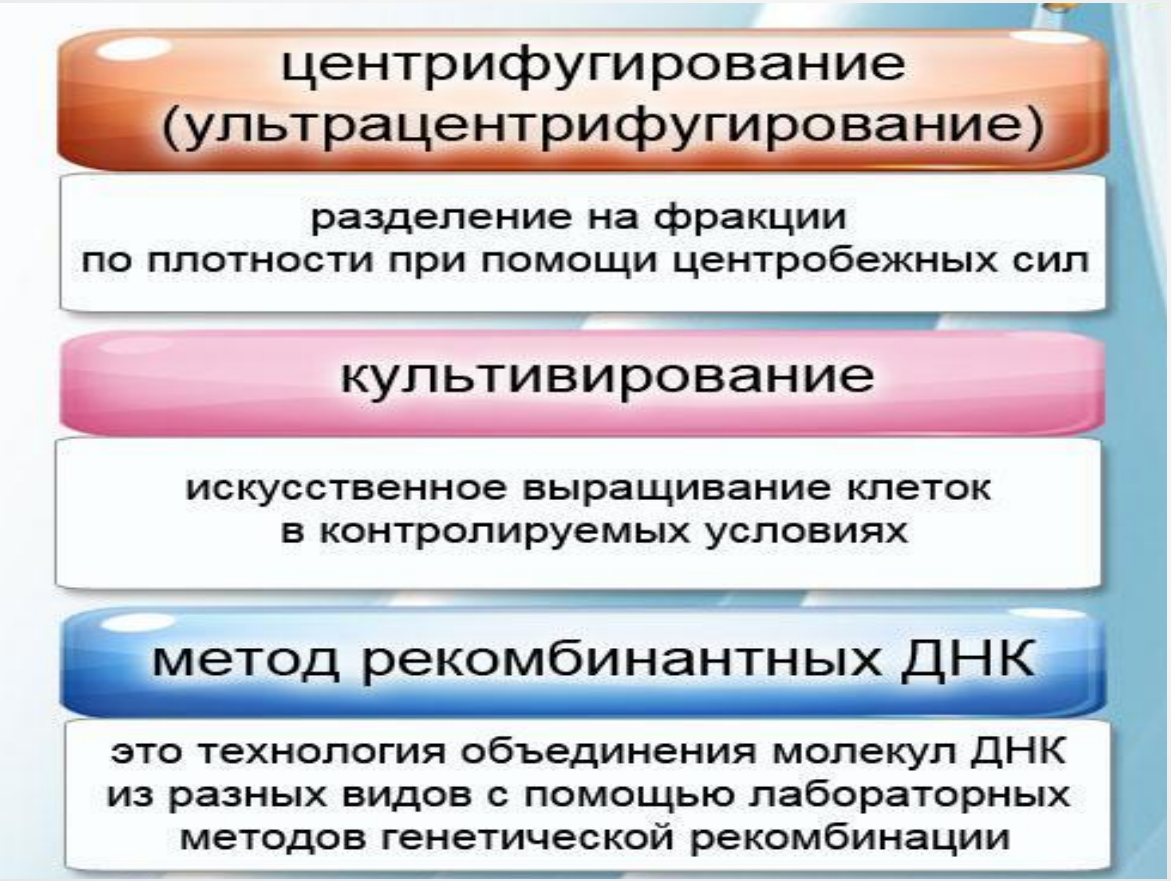
Недостатки:

- 1) подготовленный к исследованию материал должен быть мертвым, так как в процессе наблюдения он находится в вакууме;
- 2) трудно быть уверенным, что объект воспроизводит живую клетку во всех ее деталях, поскольку фиксация и окрашивание исследуемого материала могут изменить или повредить ее структуру;
- 3) дорого стоит и сам электронный микроскоп и его обслуживание;
- 4) подготовка материала для работы с микроскопом отнимает много времени и требует высокой квалификации персонала;
- 5) исследуемые образцы под действием пучка электронов постепенно разрушаются. Поэтому, если требуется детальное изучение образца, необходимо его фотографировать.


Электронный микроскоп изображён перевёрнутым, чтобы было легче сопоставлять его части с соответствующими частями светового микроскопа
Фотоплёнка или экран
Глаз
Световой пучок
Пучок электронов
Линзы окуляров
Проекционные линзы
Линзы объектива
Объект
Конденсорные линзы
Источник света
Электронная пушка
Трансмиссионный электронный микроскоп
Световой микроскоп

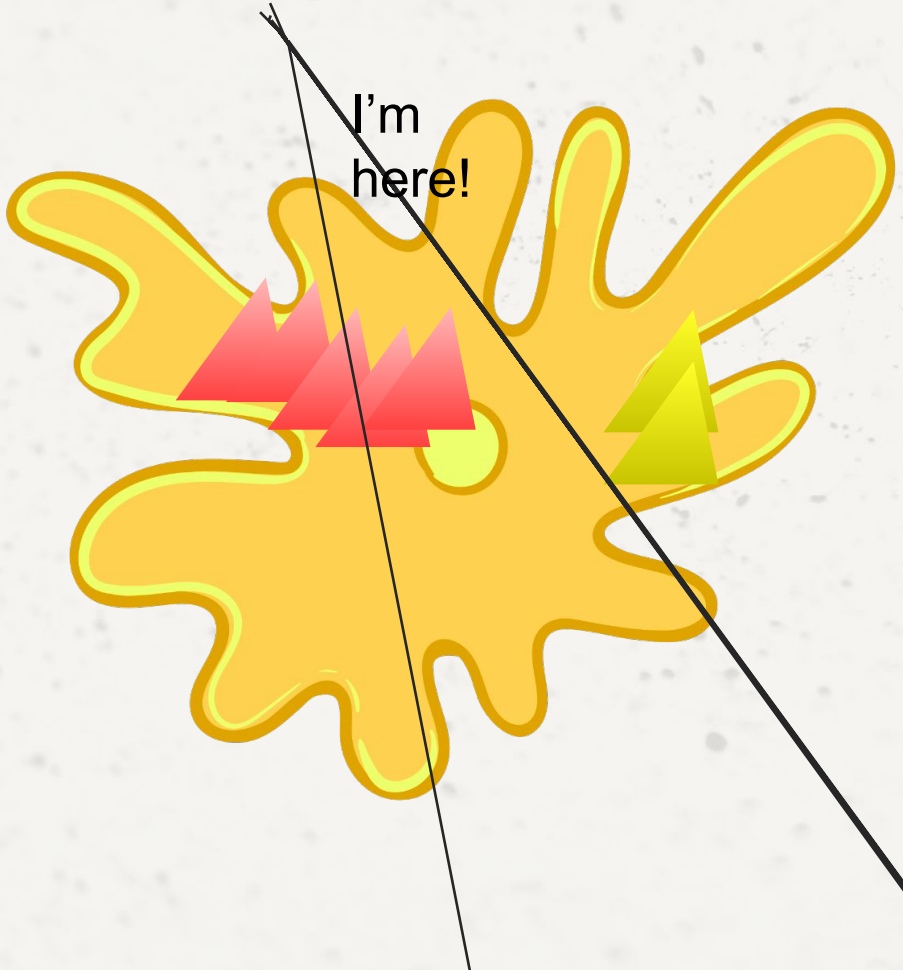
Методы изучения клетки

Методы изучения клетки



Метод меченных атомов

использование радиоактивных изотопов химических элементов для изучения локализации веществ



В качестве радиоактивной метки

чаще всего используют изотопы $^{3}\mathbf{H}$, $^{14}\mathbf{C}$, $^{32}\mathbf{P}$.

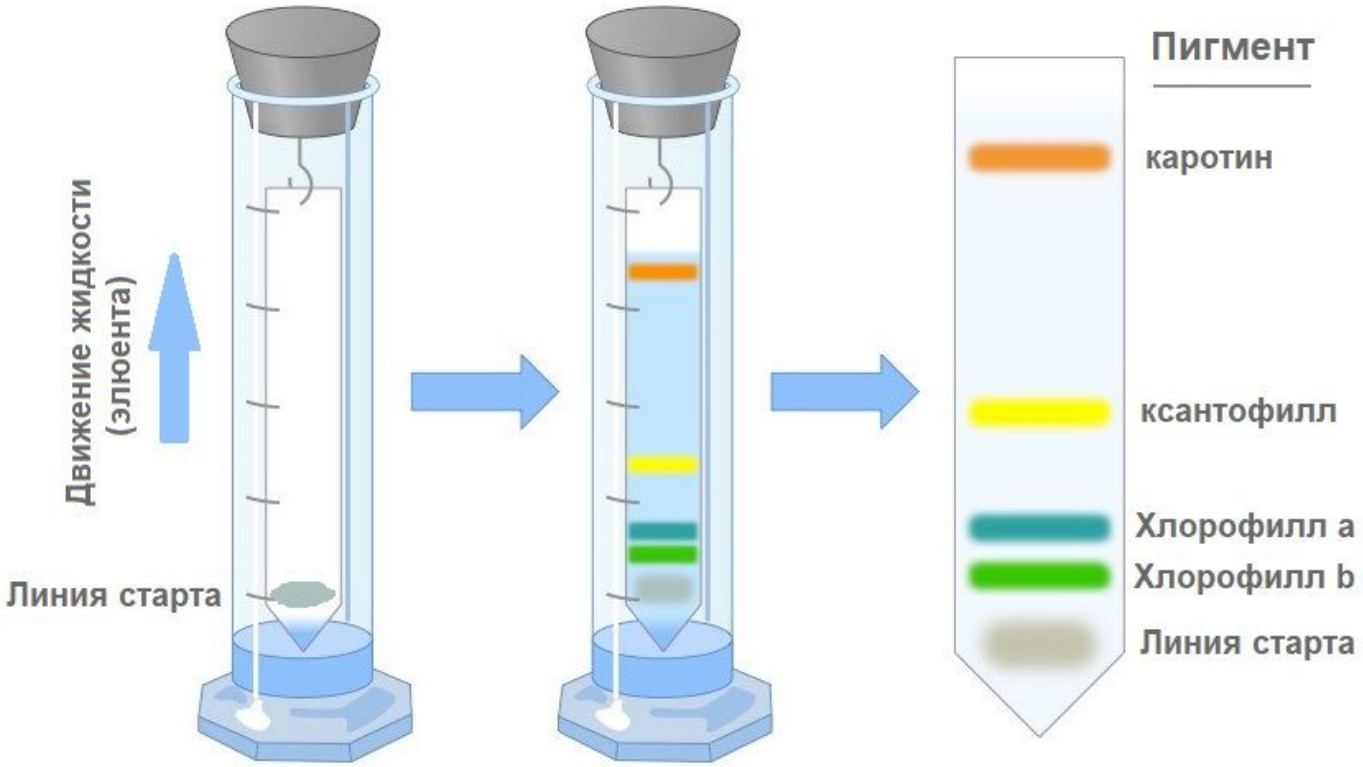
Метод замены атомов на радиоактивные – **авторадиография**

Позволяет проследить путь его превращений в клетке

Хроматография — метод разделения жидких и газообразных смесей, основанный на распределении их компонентов между двумя несмешивающимися фазами, одна из которых неподвижна, а другая - подвижна, и непрерывно протекает через неподвижную фазу.

Хроматография происходит за счёт **разной скорости прохождения молекул** через адсорбент на основе разности их молекулярных масс.

Хроматография (тонкослойная)



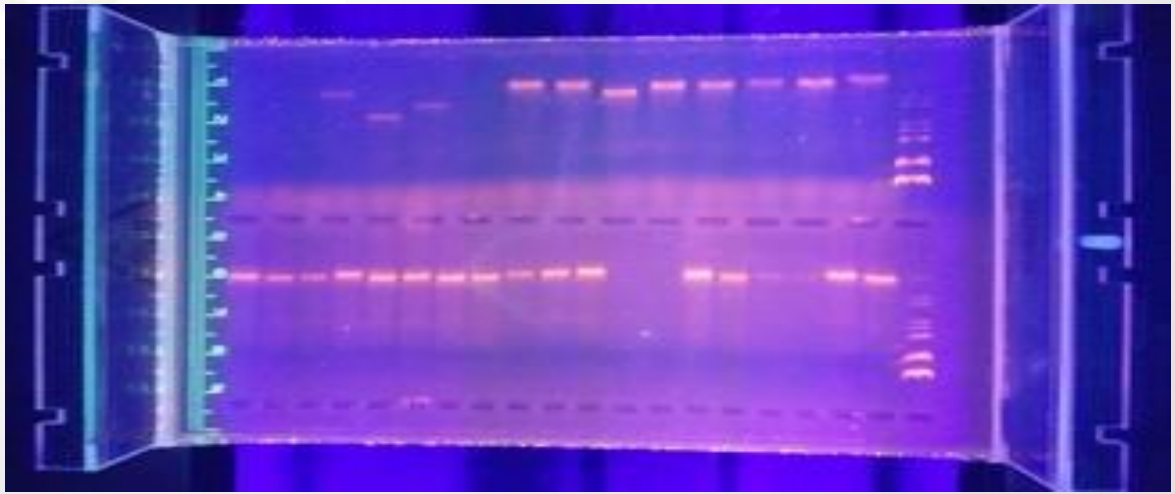
Разделение пигментов листа

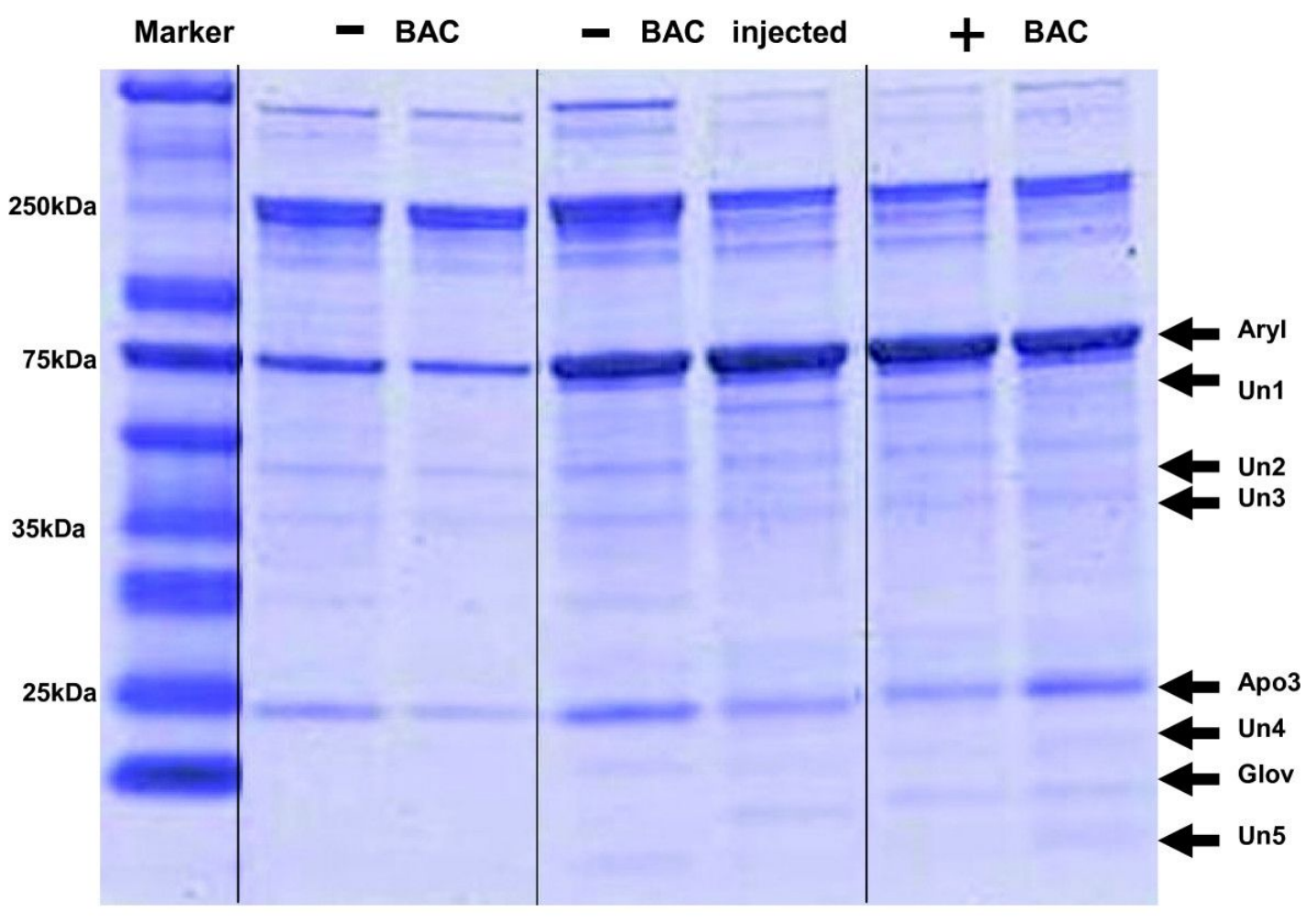
https://vk.com/biolabege

Электрофорез

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

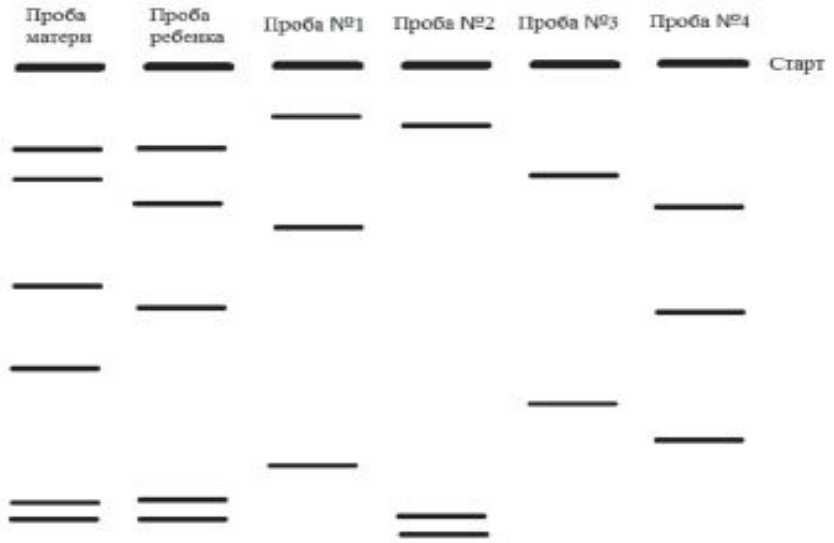
Разделение веществ происходит также **из-за разной скорости движения** (как в хроматографии) Но в электрофорезе двигаться элементы смеси будет заставлять **электрический ток.**




Marker
− BAC
− BAC injected
+ BAC
250kDa
75kDa
35kDa
25kDa
Aryl
Un1
Un2
Un3
Apo3
Un4
Glov
Un5

2б

При обучении криминалистов для симуляции проведения теста на отцовство была выделена ДНК из крови отца, матери, ребёнка и ещё трёх мужчин. Были получены ДНК-фрагменты полиморфных участков генома (участков, по которым часть имеются отличия между людьми), которые были разделены электрофорезом в агарозном геле. Результаты электрофореза представлены на рисунке.



Определите, в какой из проб находится ДНК отца ребёнка. Объясните, как Вы это определили.

Элементы ответа: 1) ДНК отца находится в четвёртой пробе; 2) ребёнок имеет полосы ДНК, не совпадающие с ДНК матери; 3) в пробах 1–3 нет полос, аналогичных полосам ДНК ребенка, которые не совпадают с ДНК матери; 4) в пробе 4 присутствуют все эти полосы ДНК (отсутствующие у матери)	
Ответ включает в себя все названные выше элементы	3
Ответ включает в себя любые три из названных выше элементов	2
Ответ включает в себя любые два из названных выше элементов	1
Ответ не соответствует правилам выставления 3, 2 или 1 балла	0
Максимальный балл	*3*

Метод центрифугирования

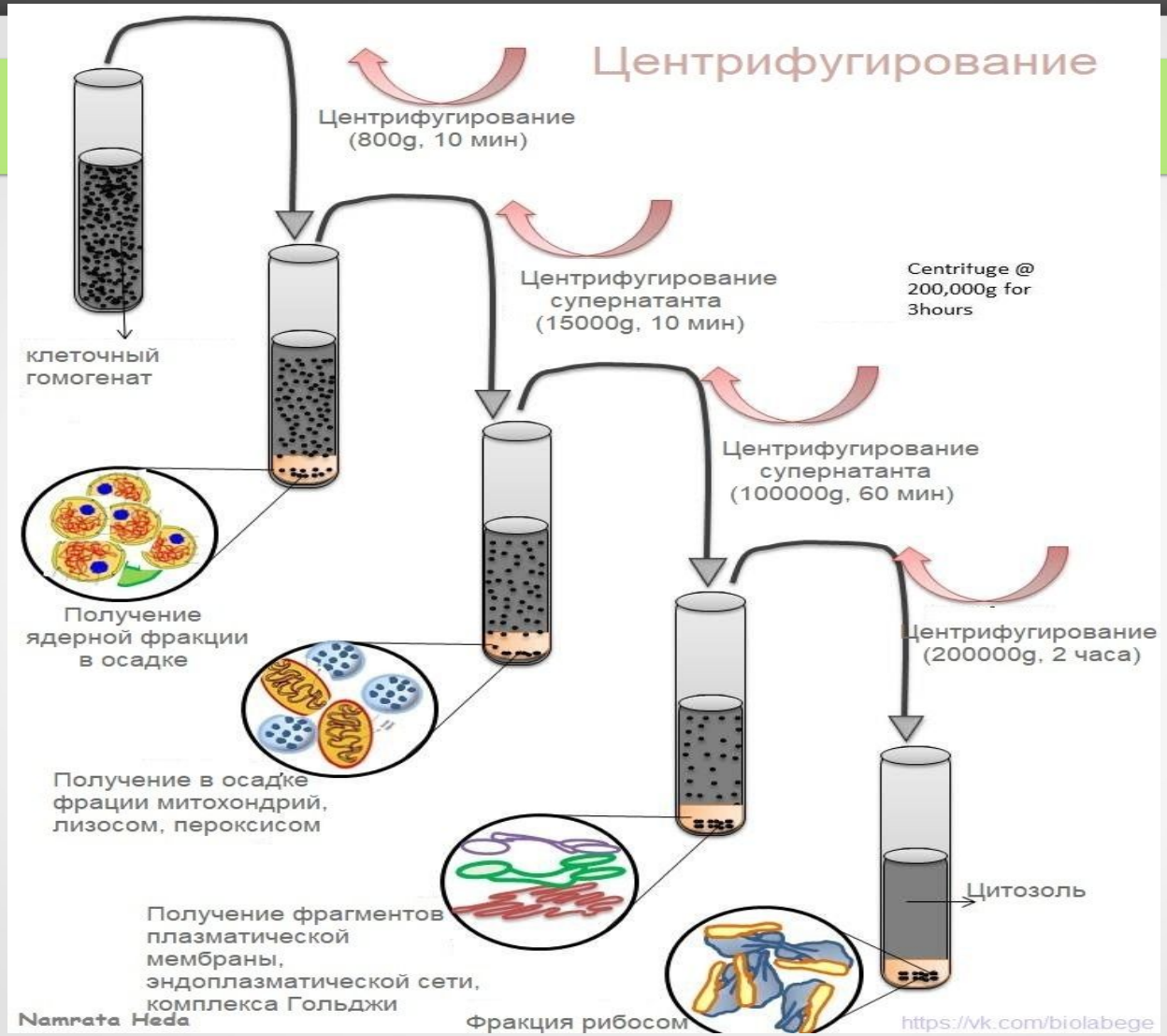
разделение на фракции
по плотности при помощи центробежных сил

От латинского **ultra – «больше», «сверх», «за пределами», centrum – «средоточие», «центр» и fuga – «бегство», «бег».**

При помощи **ультрацентрифугирования** разделяют органоиды клетки: митохондрии, рибосомы и другие, что позволяет их выделить и изучать

Основан метод на разной плотности органоидов и скорости вращения центрифуги

Лабораторная центрифуга


Центрифугирование
Центрифугирование
(800g, 10 мин)
клеточный
гомогенат
Центрифугирование
супернатанта
(15000g, 10 мин)
Centrituge @
200,000g for
3hours
Получение
ядерной фракции
в осадке
Центрифугирование
супернатанта
(100000g, 60 мин)
Центрифугирование
(200000g, 2 часа)
Получение в осадке
фракции митохондрий,
лизосом, пероксисом
Цитозоль
Получение фрагментов
плазматической
мембраны,
эндоплазматической сети,
комплекса Гольджи
Фракция рибосом
Namrata Heda
https://vk.com/biolabege

Биохимический метод

Исследование процессов, происходящих в организме, основанный на анализе химического состава молекул

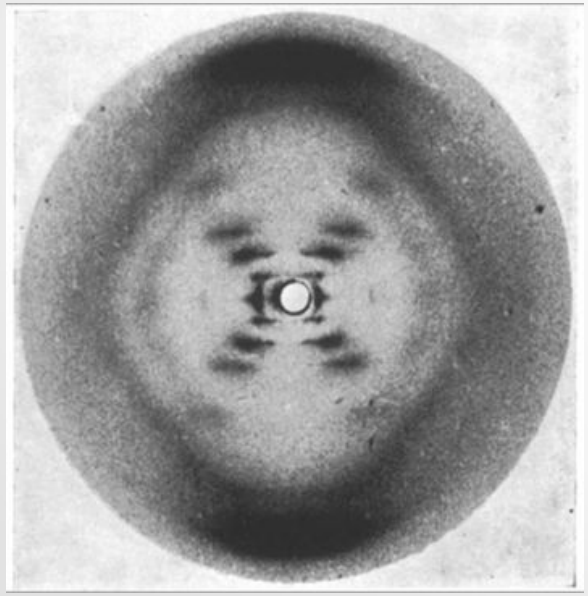
- Биохимический анализ крови
- Частный метод генетики
- Используется для выявления болезней обмена веществ (сахарный диабет)

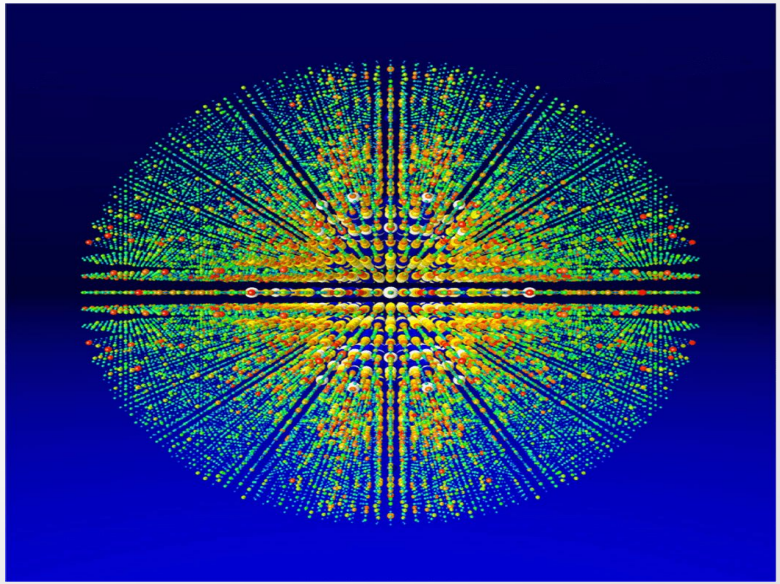
Иммуногистохимия

Если к антителам прикрепить маркеры, а затем ввести в клетку, то они соединяются с антигенами и можно будет обнаружить их местоположение

Рентгеноструктурный анализ

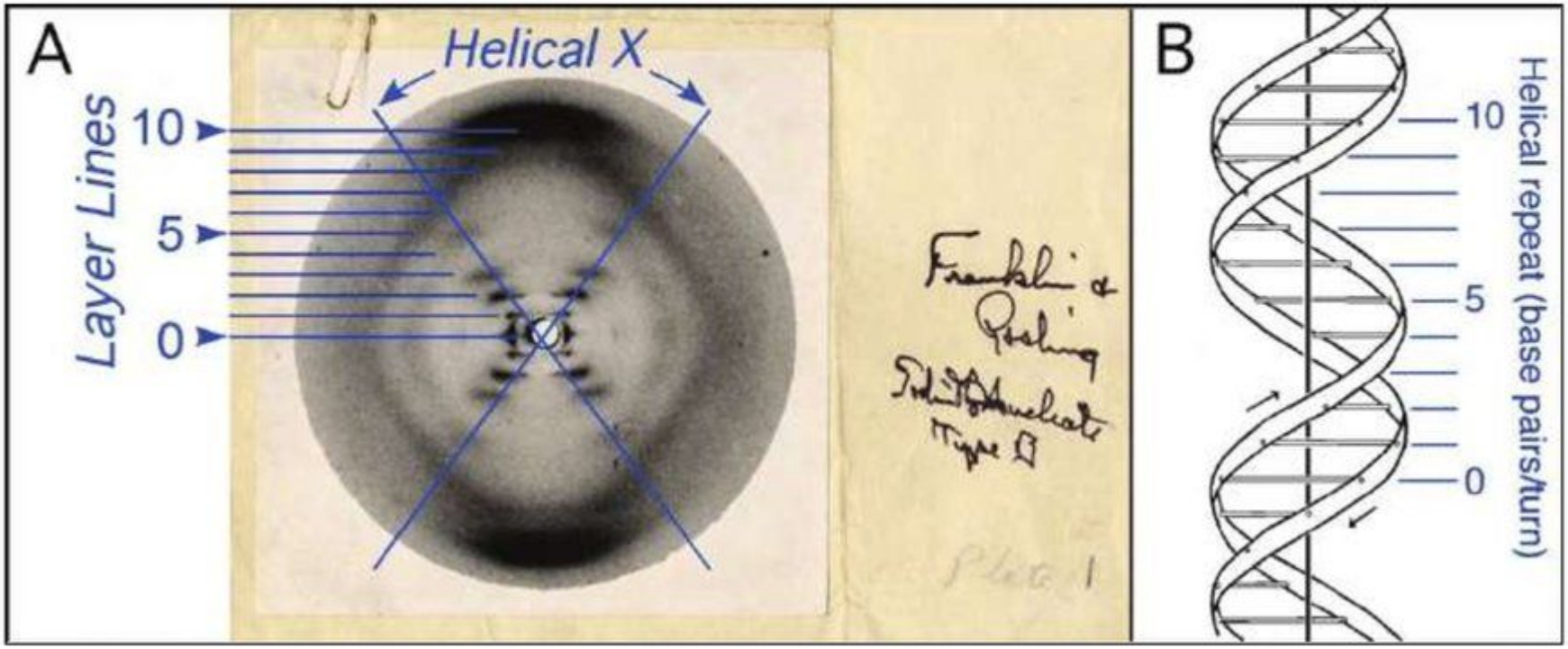
дает возможность определять пространственное расположение и физические свойства молекул;





Структура ДНК

Рентгеноструктурный анализ (x-ray crystallography) – дифракционный метод исследования структуры вещества.



MPT

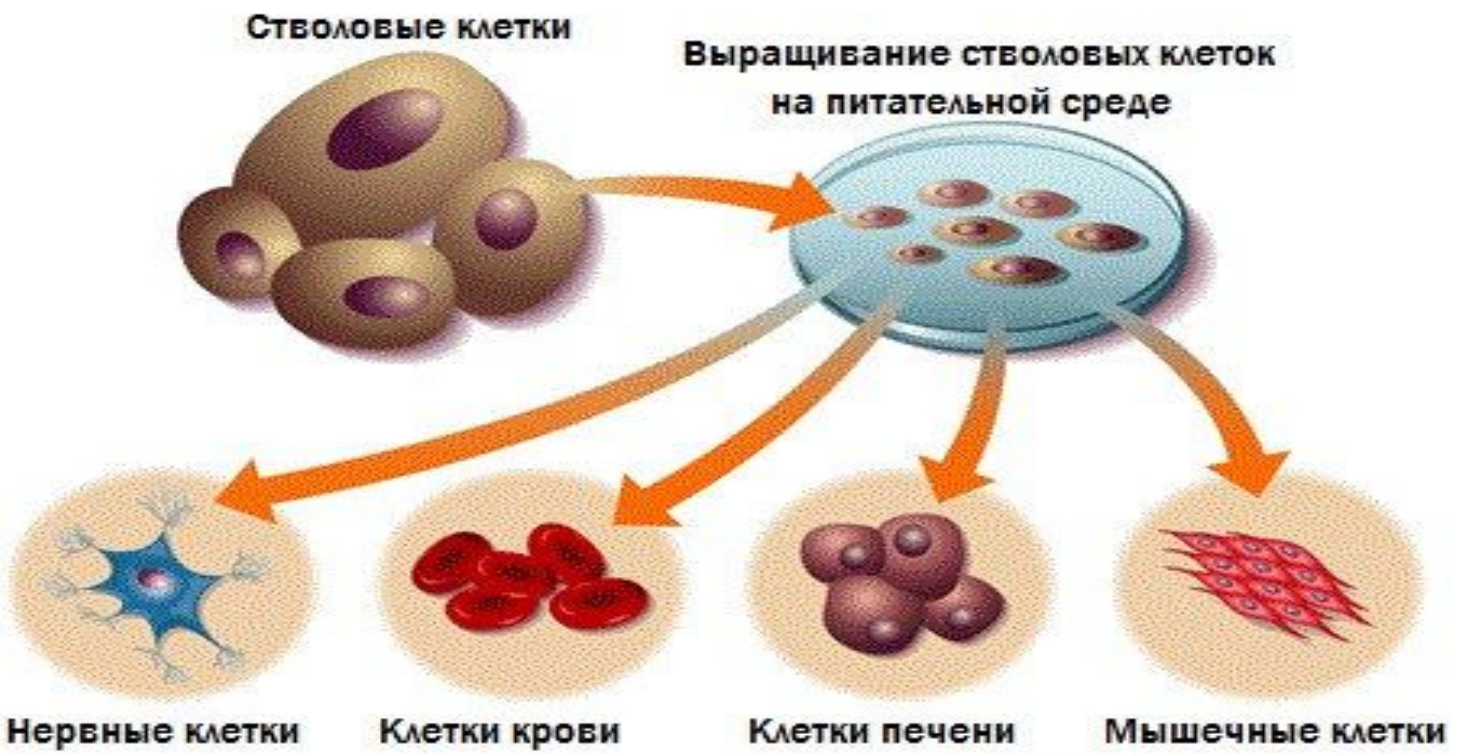
Метод **клеточных культур**

Микроклональное размножение –

выращивание клеток и тканей многоклеточных организмов на питательных средах в контролируемых условиях. Позволяет создавать клоны и быстро увеличивать численность организмов, способных к быстрому росту, устанавливать влияние различных веществ

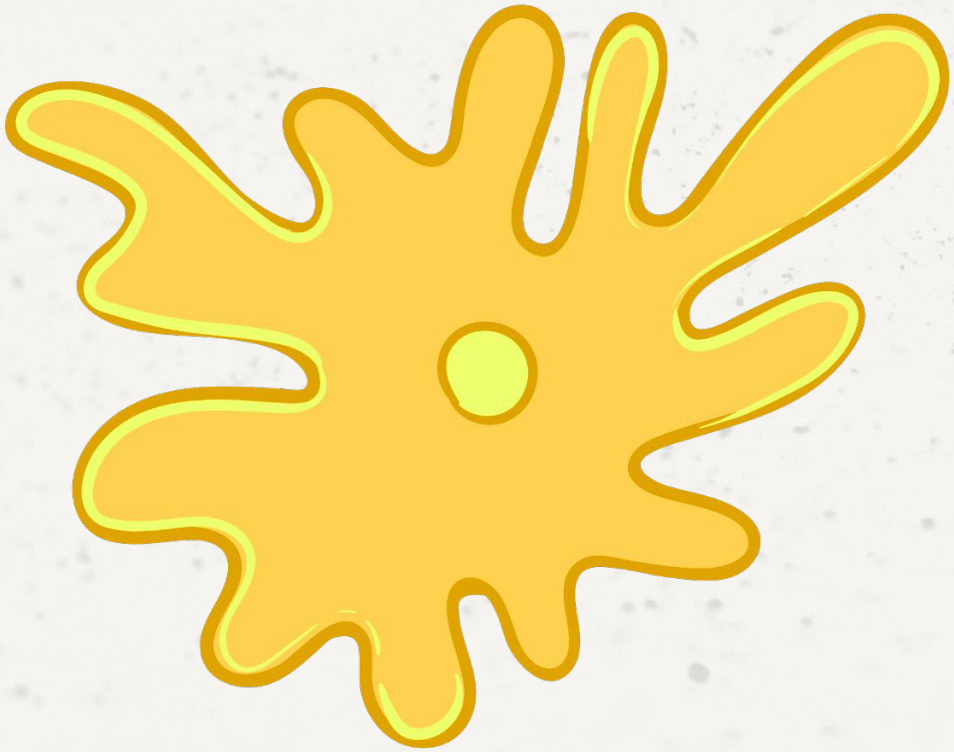
Метод культуры клеток и тканей

Метод культуры тканей у человека



VIDEOUROKI.NET

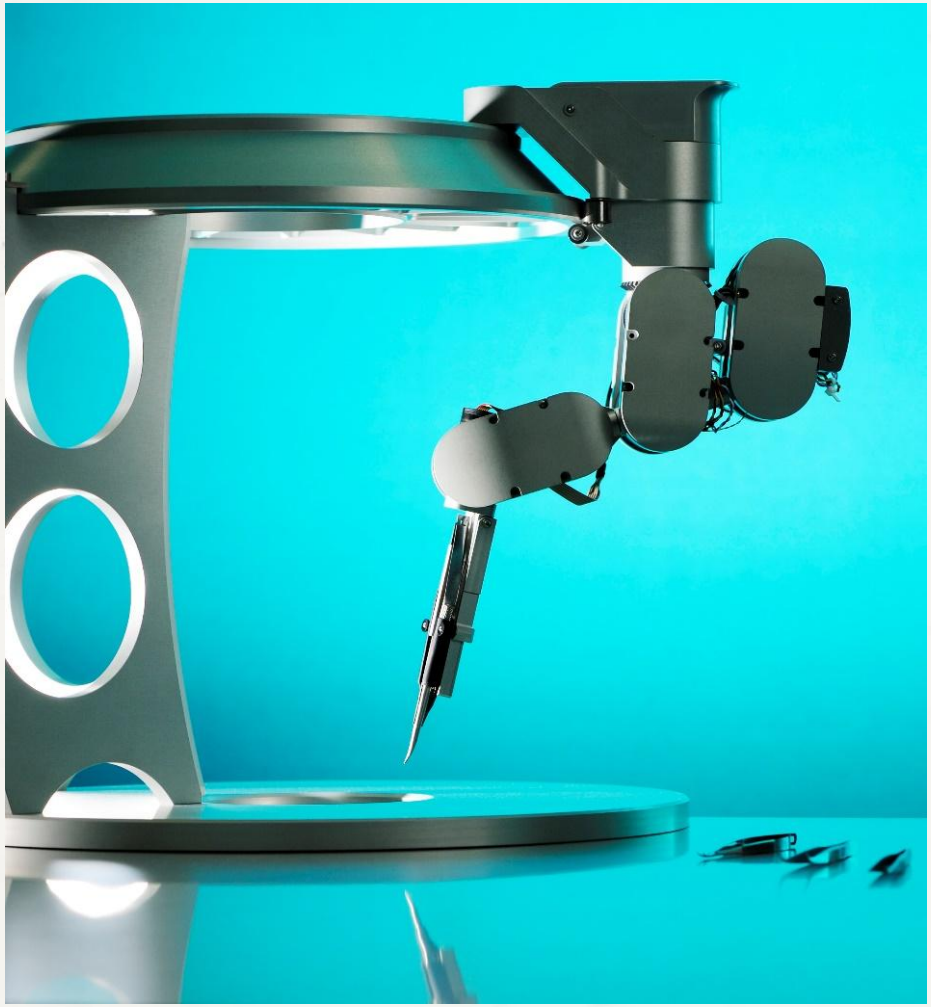
Кино- или видеосъёмка



Для изучения процессов жизнедеятельности клетки применяют **замедленную кино- или видеосъёмку** через микроскопы (деление клетки)

VIDEOUROKI.NET

Методы микрохирургии: удаление, пересадка отдельных клеточных органелл, инъекции различных веществ с применением микрохирургических инструментов и оптических средств.



Основная волна 2018 г

1. Для изучения митохондриальных ДНК учёному необходимо выделить митохондрии из животных клеток методом центрифугирования.

На чём основан этот метод? После каких структур клетки он может получить митохондриальную фракцию? Ответ поясните.

Элементы ответа:
1) метод центрифугирования основан на разделении объектов разной плотности или массы за счёт разной скорости оседания объектов (за счёт разной скорости вращения центрифуги);
2) митохондриальная фракция может быть получена после осаждения ядер как самых плотных (тяжелых) клеточных структур (плотность митохондрий ниже плотности ядер, но выше плотности всех остальных структур)

Основная волна 2019

2. В 1958 г. учёными в мроцессе эксперимента был установлен полуконсервативный принцип репликации ДНК. В качестве объекта эксперимента использовали бактерию кишечную палочку. Бактерии длительное время выращивали на питательной среде, содержащей нуклеотиды с тяжёлым изотопом азота ^{15}N, а затем перевели на среду с лёгким изотопом ^{14}N. Как называется используемый в эксперименте метод? Какие изотопы азота (N) содержали цепи новых молекул ДНК после первого деления клетки на новой питательной среде?

Содержание верного ответа и указания по оцениванию (допускаются иные формулировки ответа, не искажающие его смысла)	**Баллы**
Элементы ответа: 1) использовался метод меченых атомов; 2) новые молекулы ДНК содержали одну цепь с изотопом ^{15}N (исходная) и одну цепь с изотопом ^{14}N (новая)	
Ответ включает в себя два названных выше элемента и не содержит биологических ошибок	2
Ответ включает в себя только один из названных выше элементов, **ИЛИ** ответ включает в себя два названных выше элемента, но содержит биологические ошибки	1
Ответ неправильный	0
Максимальный балл	*2*

Основная волна 2019

3. У большинства сортов декоративных растений с махровыми цветками (розы, гвоздики, хризантемы) отсутствуют тычинки и пестики. Каким способом их размножают? Какой современный метод биотехнологии позволяет быстро получить многочисленное потомство?

Элементы ответа:
1) вегетативное размножение (черенками, делением куста, отводками);
2) метод культуры тканей (микроклональное размножение)

Вопросы части С

4. Для выделения и изучения органоидов, входящих в состав цитоплазмы клетки, применяют скоростное центрифугирование. Измельченные клетки в растворе сахарозы при температуре 0‘ С помещают в центрифуги, скорость вращения которых достигает 15-40 тыс. оборотов в минуту. Предположите, при каких скоростях центрифугирования (малых, средних или больших) будут осаждаться ядра, митохондрии, рибосомы клетки. Какие свойства органоидов лежат в основе их разделения при центрифугировании?

Ответ: при малых скоростях центрифугирования осаждаются самые тяжелые органоиды клетки — ядра; при средних скоростях — митохондрии, пластиды; самые легкие органоиды, такие как рибосомы, осаждаются при высоких скоростях вращения, т. к. в основе способа выделения органоидов методом скоростного центрифугирования лежит их различие по плотности

Вопросы части С

5. Каким экспериментальным методом можно установить скорость прохождения веществ через клеточную мембрану при исследовании функций щитовидной железы? На чем основан данный метод?

1) метод меченных атомов; необходимо ввести пациенту порцию радиоактивного йода

2) по химическим свойствам изотопы одного и того же элемента не отличаются друг от друга, но радиоактивное излучение позволяет отследить этапы перемещения радиоактивного йода и скорость его накопления в клетках железы.

Вопросы части С

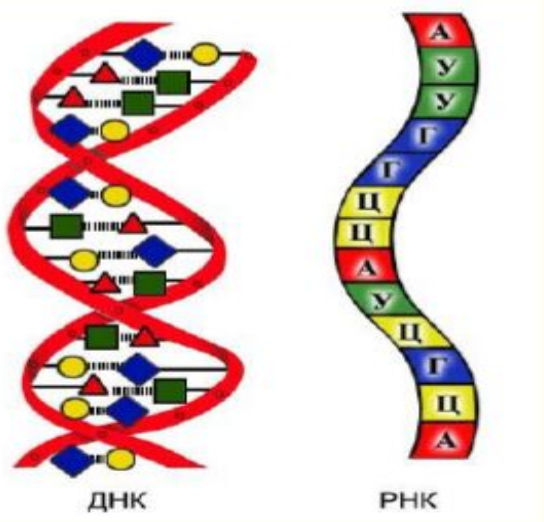
6. Раньше считалось, что кислород,выделенный растениями в процессе фотосинтеза образуется из углекислого газа, а не воды. Первым ученым, доказавшим происхождение атмосферного кислорода из воды, был русский ученый А.П. Виноградов. Какой метод он применил для установления данного факта? На чем основан этот метод?

1) метод меченных атомов

2) применил тяжелый изотоп ^{18}O, поливал растение водой с этим изотопом, чем больше вода содержала данный изотоп, тем больше его находили в выделяющемся кислороде. Опыт показал, что при фотосинтезе кислород получается за счет разложения воды.

Основная волна 2018

С помощью какого метода отличают РНК-содержащие вирусы от ДНК-содержащих? На определении каких отличий в молекулах этих веществ основан этот метод? Ответ поясните.



1) биохимический метод, основанный на анализе химического состава молекул;

2) РНК-вирусы содержат рибозу и урацил, а ДНК-вирусы содержат дезоксирибозу и тимин

Основная волна 2019

Для изучения митохондриальных ДНК ученому необходимо выделить митохондрии из животных клеток методом центрифугирования. На чем основан этот метод? После каких структур клетки он может получить митохондриальную фракцию?

1) Метод центрифугирован основан на разделении объектов разной плотности и массы за счет разной скорости оседания объектов (за счет разной скорости вращения центрифуги)

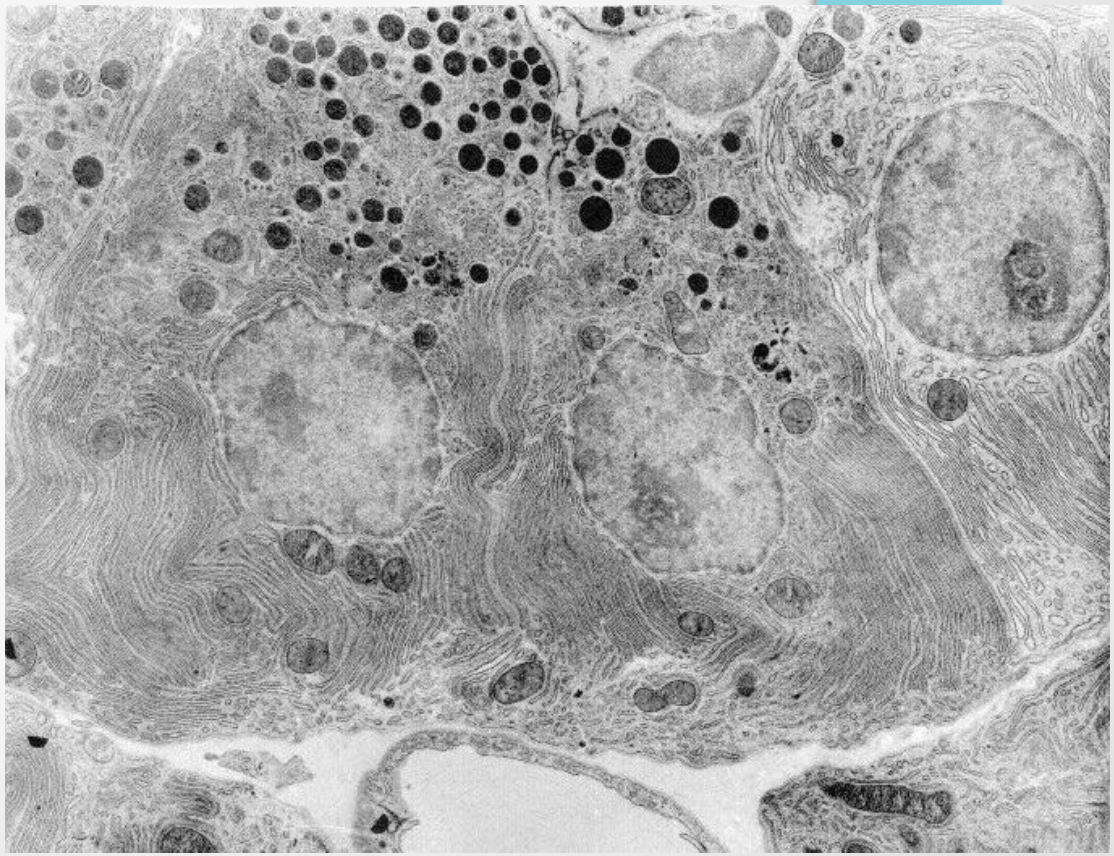
2) Митохондриальная фракция может быть получена после осаждения ядер как самых плотных (тяжелых) клеточных структур (плотность митохондрий ниже плотности ядер, но выше плотности всех остальных структур)

Известно, что в растительных клетках присутствует два вида хлорофилла: хлорофилл a и хлорофилл b. Учёному для изучения их структуры необходимо разделить эти пигменты. Какой метод он должен использовать для их разделения? На чём основан этот метод?

1) метод хроматографии;

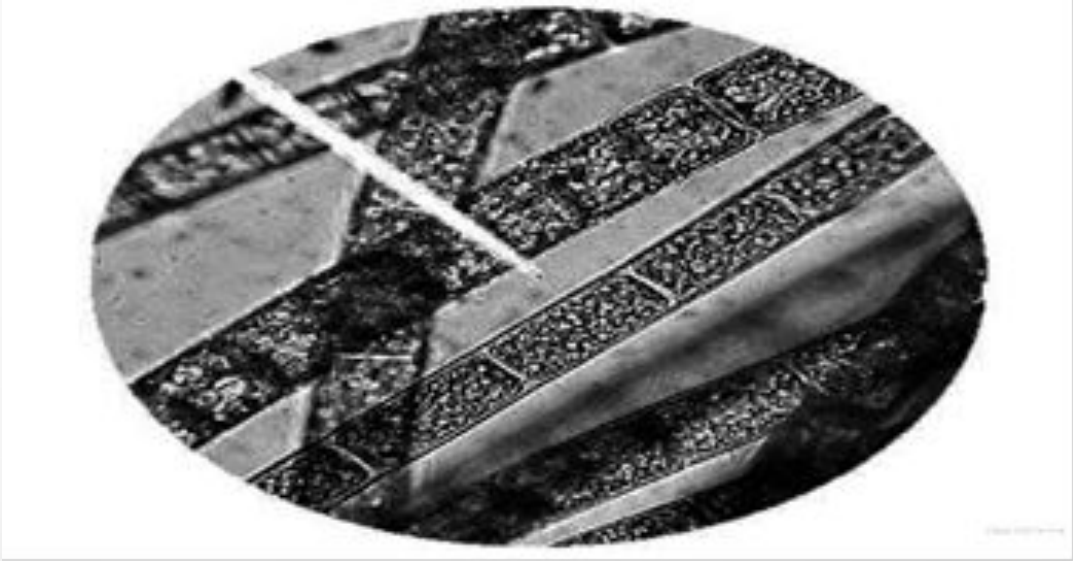
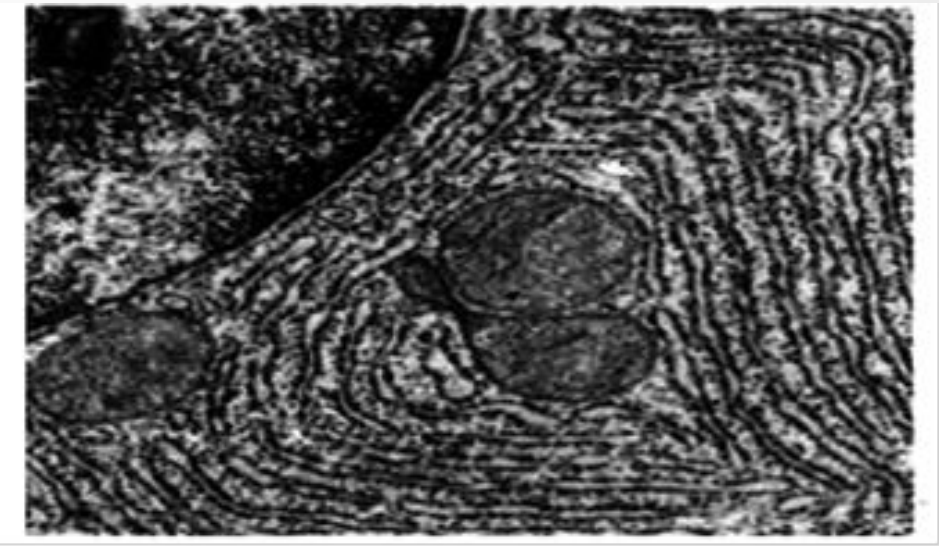
2) метод основан на разной скорости движения веществ смеси через адсорбент в зависимости от их способности связываться с его частицами

Хорошо развитая ЭПС в клетках поджелудочной железы была обнаружена методом?



Рассмотрите внимательно рисунок и ответьте на вопросы.

1. Что изображено на рисунке?
2. Каким методом получено это изображение?
3. Какие преимущества и недостатки есть у этого метода по сравнению с альтернативными методами?



1. Что изображено на рисунке?
2. Каким методом получено это изображение?
3. Какие преимущества и недостатки есть у этого метода по сравнению с альтернативными методами?