Современные методы изучения биологических объектов

Современная биология располагает большим разнообразием методов, позволяющих изучать структуру и функции живых и фиксированных клеток на микроскопическом и субмикроскопическом уровнях. Наиболее широко применяются следующие методы:

- **Световая микроскопия;**
- **Электронная микроскопия;**
- **Метод дифференциального центрифугирования;**
- **Хроматография;**
- **Метод меченых атомов;**
- **Спектральный анализ;**

Световая микроскопия

Схема строения светового микроскопа представлена на рис. **1.Окуляр:** увеличивает изображение, получаемое в линзах объектива; в окуляр может быть вставлена измерительная сетка, если необходимо измерить размеры объекта. **2.Тубус**: трубка, по которой свет проводится от объектива к окуляру; может перемещаться в штативе для фокусировки изображения объекта.

3.Револьверная головка: в нее вставлены 2, 3 или 4 объектива. Головка поворачивается так, чтобы можно было использовать объективы с разным фокусным расстоянием (а значит, и с разным увеличением).

4.Объектив: увеличивает изображение объекта.

5.Объект исследования: закреплен на прозрачной стеклянной пластине (предметное стекло).

6.Предметный столик: удерживает объект в нужной позиции по отношению к оптической системе микроскопа.

7.Конденсор: фокусирует лучи света от осветителя на объекте исследования.

8.Ирисовая диафрагма: регулирует вели- чину светового потока к объекту. Лучшее разрешение достигается при уменьшении осве- щения (а не при увеличении). Для освещения чаще всего используется белый свет. Для повышения разрешения применяется свет коротковолновой части спектра (например, синий), излучаемый специальной лампой или системой фильтров. Свет на объект должен падать только из-под предметного столика. Диаметр типичной клетки приблизительно 10–20 мкм, что в 5 раз меньше размеров мельчайшей видимой частицы глазом, так как разрешающая способность человеческого глаза 100 мкм (0,1 мм).

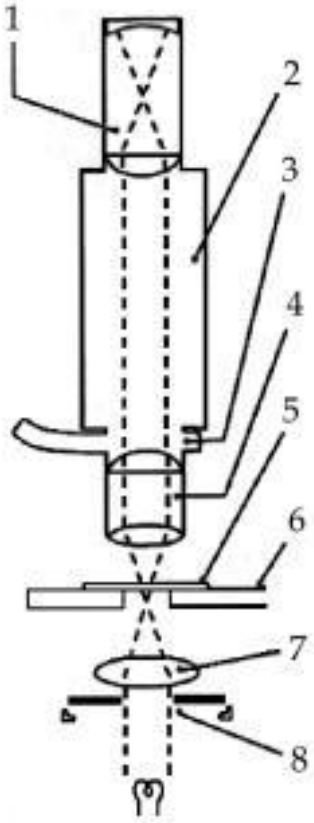


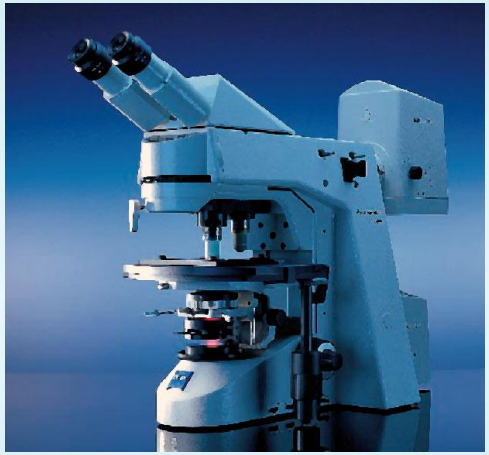
Рис. 1. Схема строения светового микроскопа: 1 – окуляр; 2 – тубус; 3 – револьверная головка; 4 – объектив; 5 – объект; 6 – предметный столик; 7 – конденсор; 8 – ирисовая диафрагма

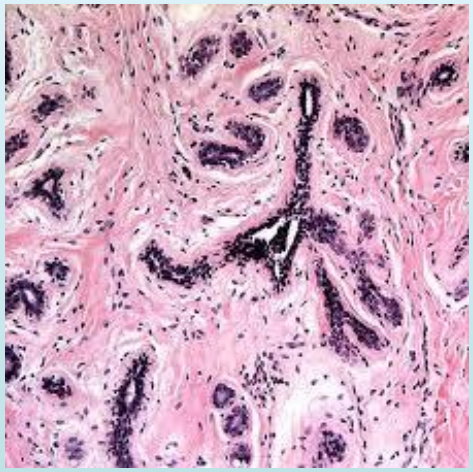
Итак, световая микроскопия обеспечивает увеличение до 2-3 тысяч раз, цветное и подвижное изображение живого объекта, возможность микрокиносъемки и длительного наблюдения одного и того же объекта, оценку его динамики и химизма.

Основными характеристиками любого микроскопа являются разрешающая способность и контраст.

Схема подготовки материала для светооптического исследования

ФИКСАЦИЯ	— Обработка материала специальными составами с целью сохранения его структуры.
ОБЕЗВОЖИВАНИЕ	— Постепенное (для сохранения структуры) удаление воды из зафиксированного материала путем проведения его через спирты повышающейся концентрации (от 50–100°).
ПРОПИТЫВАНИЕ	— Обработка материала органическими растворителями (ксилол, толуол и др.), способными замещать спирт и смешиваться с заливочными средами (парафин, целлоидин).
ЗАЛИВКА	— Обработка и закрепление материала в специальные составы (чаще всего парафин) для удобства последующей работы с ним.
ИЗГОТОВЛЕНИЕ СРЕЗОВ	— Резка материала на микротоме (толщина срезов 4–7 мкм) и наклеивание на предметное стекло.
ОКРАСКА	— Обработка материала различными реактивами, выявляющими различающиеся по химическому составу структуры (гисто- и цитохимия).
ЗАКЛЮЧЕНИЕ В БАЛЬЗАМ	— Нанесение на материал (препарат) специального состава, который впоследствии затвердевает (пихтовый, кедровый бальзам, полистирол), и наложение покровного стекла.





Электронная микроскопия

Схема строения трансмиссионного электронного микроскопа представлена на рис. **1.Катод:** металлический электрод (обычно платиновый), который излучает мощный высокоскоростной электронный луч. Электроны — отрицательно заряженные частицы (е–).

2.Анод: положительно заряженный электрод с напряжением 50 кВ относительно катода. Служит для ускорения электронного луча.

3.Конденсор: электронная линза, фокусирующая электронный луч на образце **4.**

5.Шлюзовая камера для установки образца: позволяет поместить образец (исследуемый материал) в микроскоп без потери вакуума внутри аппарата.

6.Объектив: электромагнитная линза, которая фокусирует первое изображение и увеличивает его (в зависимости от прилагаемого напряжения).

7.Флюоресцентный экран: покрыт составом, чувствительным к столкновению с электронами. Необходим для перевода электронного изображения в световое, так как преломленный электронный луч (изображение) не может наблюдаться непосредственно.

9.Фотографическая пластина: позволяет зафиксировать черно-белое изображение.

10.Бетонное основание: жестко закреплено для уменьшения вибрации и нежелательных отклонений электронного луча.

Электронная микроскопия основана на рассмотрении объекта в проходящем пучке электронов.

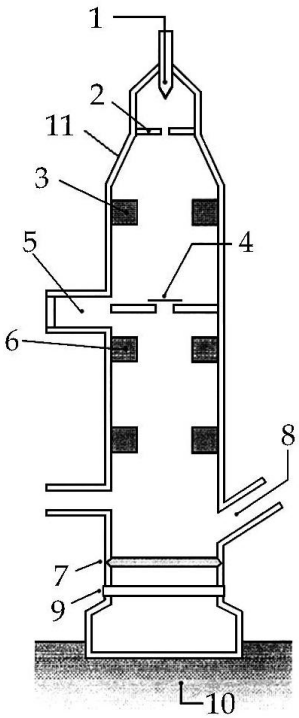


Рис. 2. Схема строения трансмиссионного электронного микроскопа: 1 — катод; 2 — анод; 3 — конденсор; 4 — образец; 5 — шлюзовая камера для установки образца; 6 — объектив; 7 — флюоресцентный экран; 8 — смотровая камера; 9 — фотографическая пластина; 10 — бетонное основание; 11 — колонна

Электронная микроскопия — это метод исследования структур, находящихся вне пределов видимости светового микроскопа и имеющих размеры менее одного микрона. Действие электронного микроскопа основано на использовании направленного потока электронов, который выполняет роль светового луча в световом микроскопе, а роль линз играют магниты (магнитные линзы).

Вследствие того, что различные участки исследуемого объекта по-разному задерживают электроны, на экране электронного микроскопа получается черно-белое изображение изучаемого объекта, увеличенное в десятки и сотни тысяч раз.

Схема подготовки материала для электронно-микроскопического исследования

ФИКСАЦИЯ — Обработка материала составами с целью сохранения его структуры.

ОБЕЗВОЖИВАНИЕ — Постепенное (для сохранения структуры) удаление воды из зафиксированного материала путем проведения его через спирты повышающейся концентрации (от 50–100°).

ЗАЛИВКА — Погружение материала в синтетические смолы (эпон, аралдит и др.) с последующим помещением в термостат для затвердевания (полимеризации).

ИЗГОТОВЛЕНИЕ СРЕЗОВ — Резка материала на ультрамикротоме алмазным или стеклянным ножом с получением срезов толщиной 20–100 нм (200–1000 Å; 0,02–0,1 мкм), так как электроны имеют низкую проникающую способность.

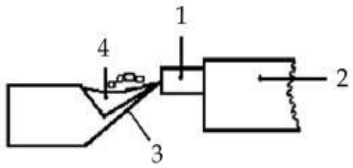
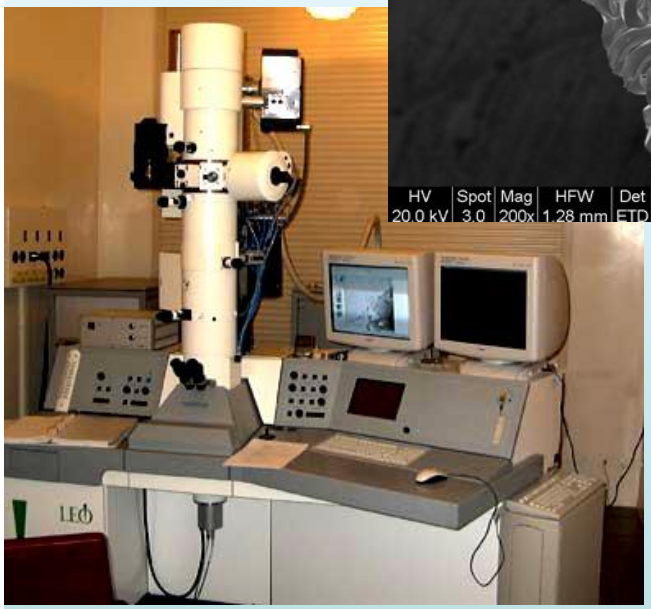
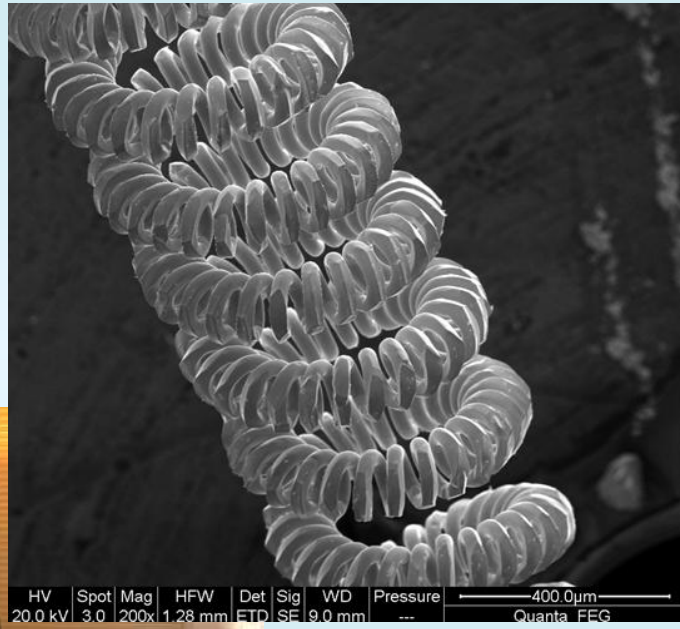


Рис. 3. Схема изготовления ультратонких срезов: 1 — закрепленный материал; 2 — подающий стержень ультрамикротома (выдвигает материал при каждом «шаге» на 10–20 нм (100–200 Å; 0,01–0,02 мкм)); 3 — нож; 4 — капля воды

КОНТРАСТИРОВАНИЕ — Обработка материала различными реактивами, выявляющими различающиеся по химическому составу структуры (гисто- и цитохимия).

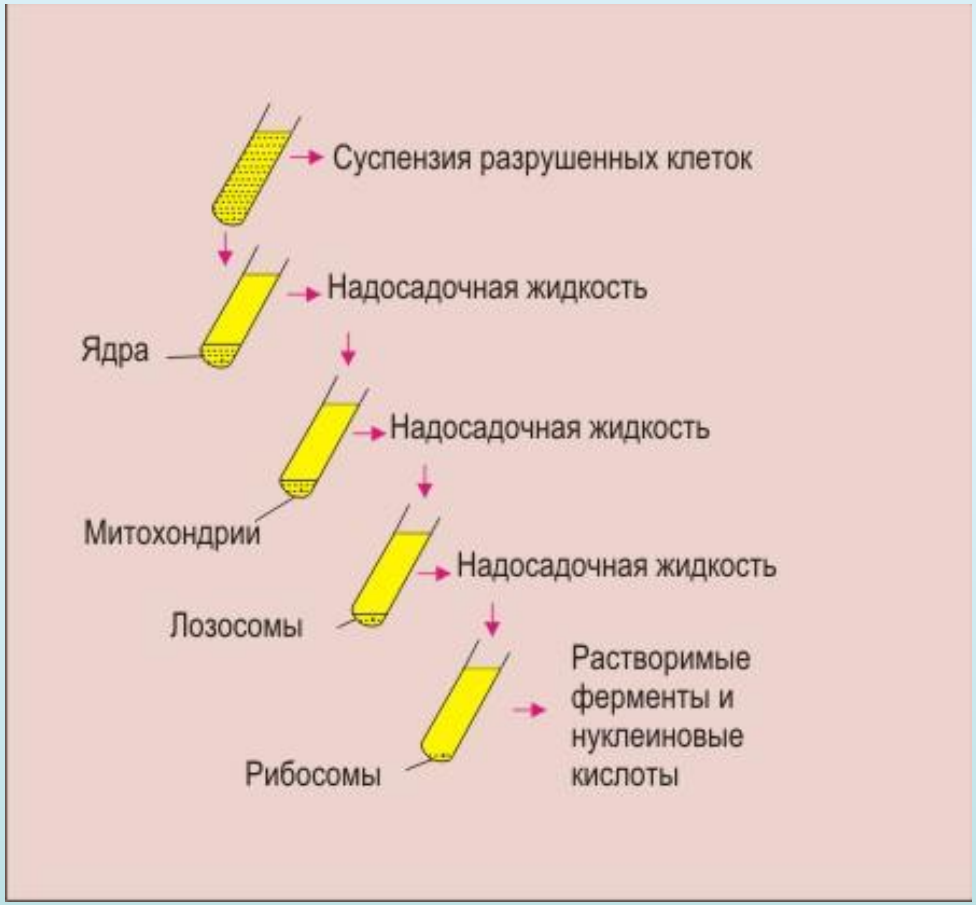
УСТАНОВКА — Закрепление срезов на сеточке (Ш ~3 мм), помещение их в специальный контейнер и введение его в колонну микроскопа через шлюзовую камеру.

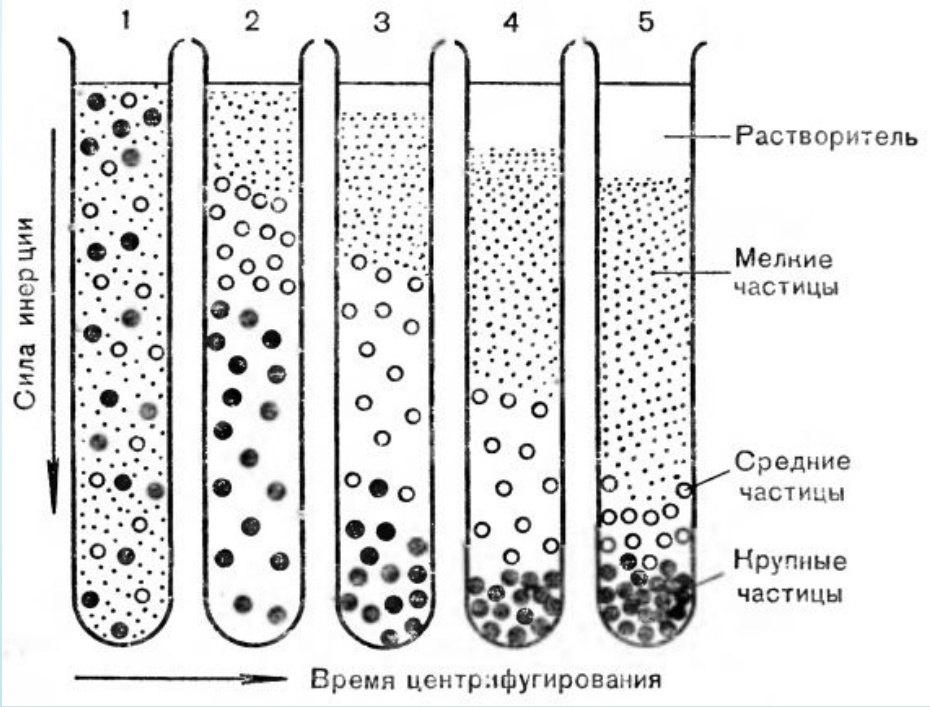




Метод дифференциального центрифугирования

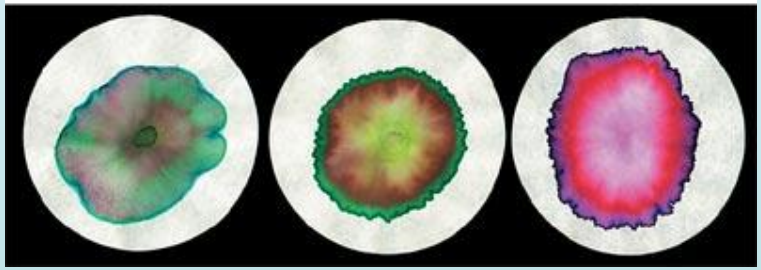
Для того чтобы изучить состав и функции тех или иных клеток, применяют метод дифференциального центрифугирования. Он основан на том, что различные клеточные органеллы и включения имеют различную плотность. При очень быстром вращении в специальном приборе - ультрацентрифуге - органеллы тонко измельченных клеток выпадают в осадок из раствора, располагаясь слоями в соответствии со своей плотностью: более плотные компоненты осаждаются при более низких скоростях центрифугирования, а менее плотные - при более высоких скоростях. Эти слои разделяют и изучают отдельно.

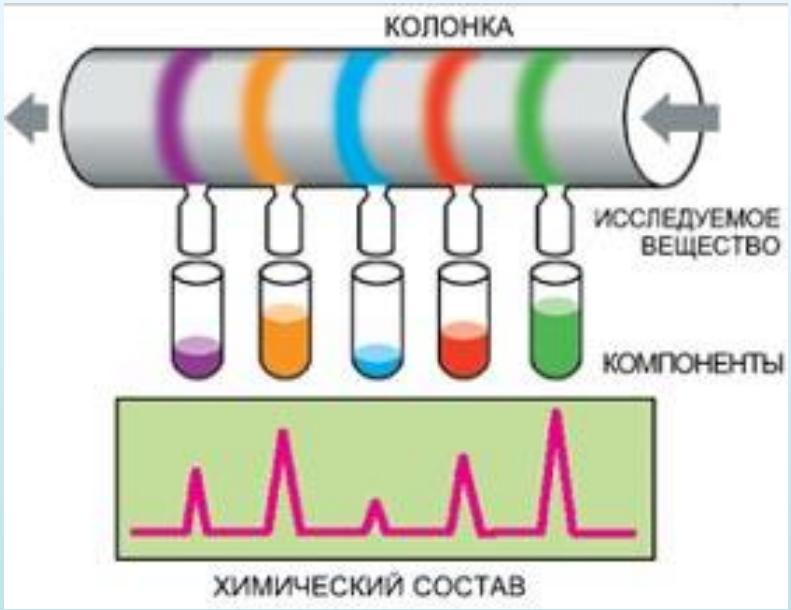




Хроматография

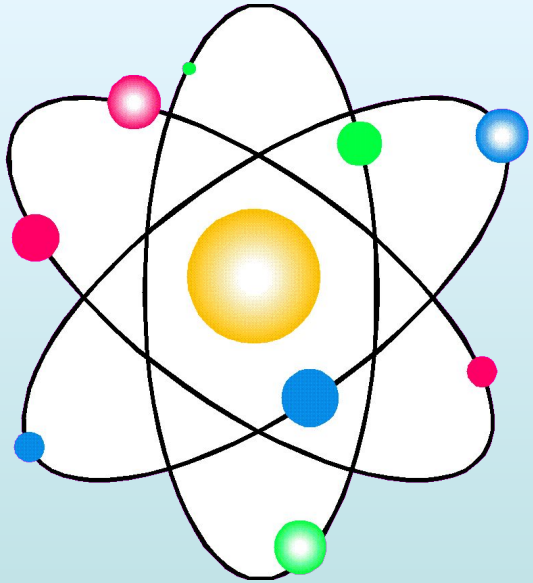
Хроматография физико-химический метод разделения и анализа смесей, основанный на распределении их компонентов между двумя фазами - неподвижной и подвижной (элюент), протекающей через неподвижную. Хроматографический анализ является критерием однородности вещества: если каким-либо хроматографическим способом анализируемое вещество не разделилось, то его считают однородным (без примесей). Принципиальным отличием хроматографических методов от других физико-химических методов анализа является возможность разделения близких по свойствам веществ. После разделения компоненты анализируемой смеси можно идентифицировать (установить природу) и количественно определять (массу, концентрацию) любыми химическими, физическими и физико-химическими методами.





Метод меченых атомов

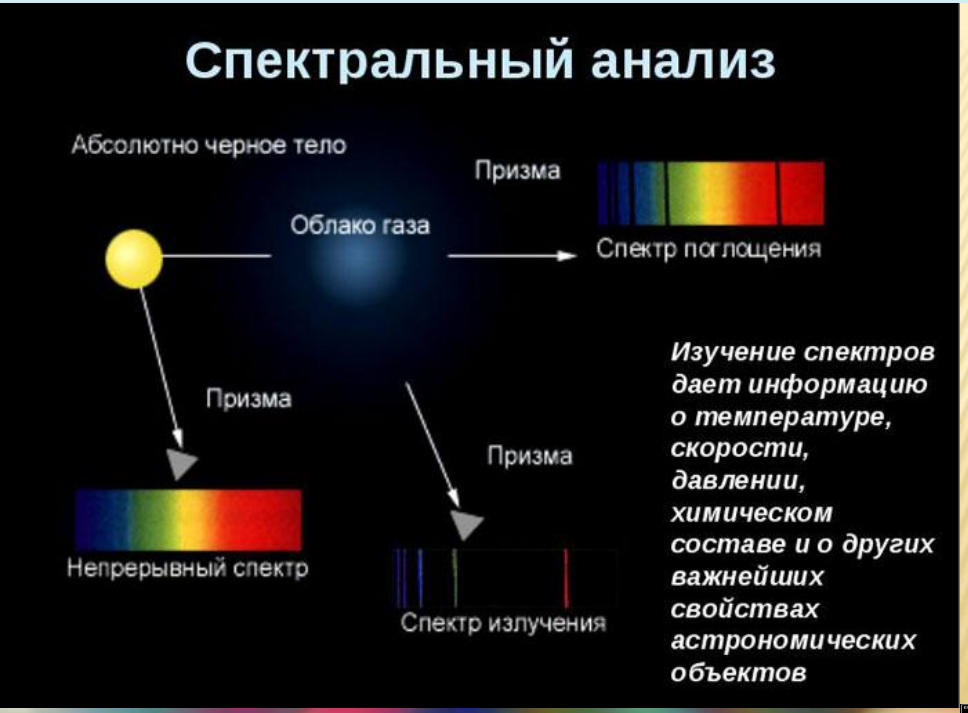
Метод меченых атомов применяется при изучении биохимических процессов, происходящих в живых клетках. Чтобы проследить за превращениями какого-либо вещества, в него вводят радиоактивную метку, т. е. заменяют в его молекуле один из атомов соответствующим радиоактивным изотопом (3H,32P,14C). Как известно, по химическим свойствам изотопы одного и того же элемента не отличаются друг от друга, но зато радиоактивный изотоп сигнализирует о своем местонахождении радиоактивным излучением. Это позволяет проследить за определенным химическим веществом, установить последовательность этапов его химических превращений, продолжительность их во времени, зависимость от условий и т. д.

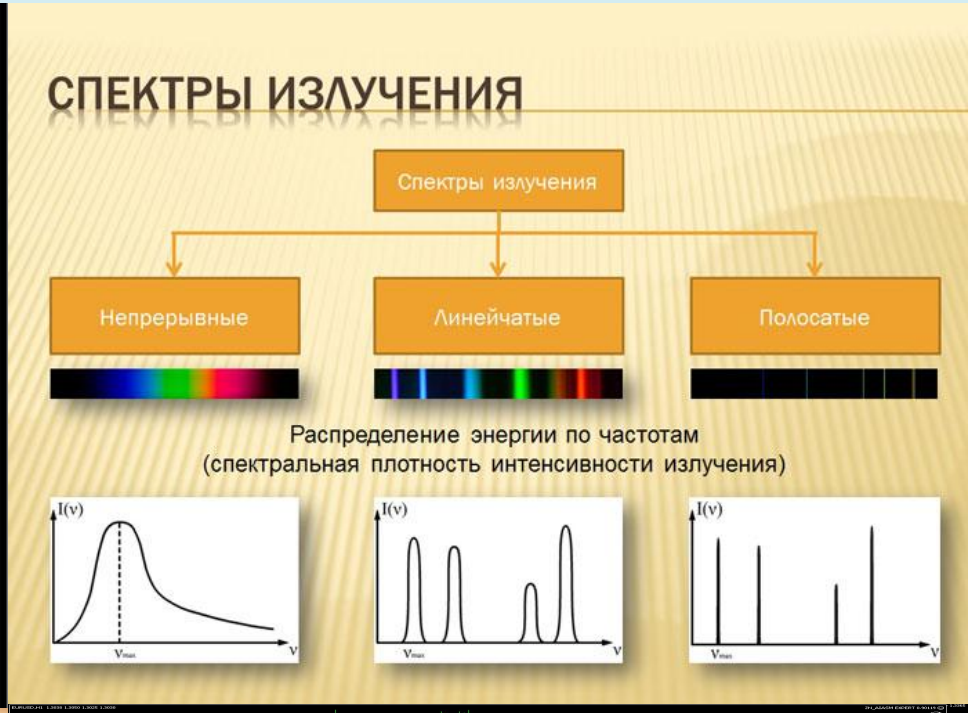


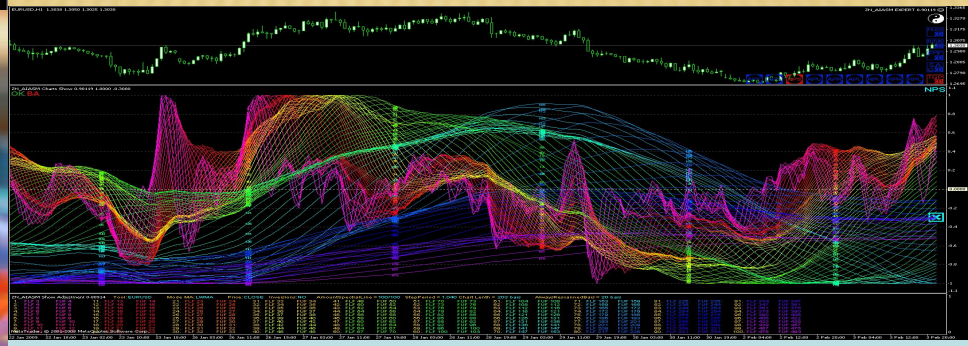
Г. Е. Владимиров (1901—1960), известный биохимик, одним из первых применил радиоактивные изотопы (меченые соединения) для изучения обменных процессов в нервной и мышечной тканях. Метод меченых атомов применяют вхимии, биологии, медицини, металлургии . Они позволяют проследить круговорот какого-либо элемента в природе, в процессе обмена веществ в организме, в химических реакциях, в производственных процессах.

Спектральный анализ

Спектральный анализ (спектроскопия) изучает химический состав веществ на основе их способностей по испусканию и поглощению света. Известно, что каждый химический элемент испускает и поглощает характерный только для него световой спектр, при условии, что его можно привести к газообразному состоянию. В соответствии с этим, возможно определение наличия этих веществ в том или ином материале по присущему только им спектру. Современные методы спектрального анализа позволяют установить наличие вещества массой до миллиардных долей грамма в пробе – за это ответственен показатель интенсивности излучения. Уникальность испускаемого спектра атомом характеризует его глубокую взаимосвязь с физической структурой.







- **Метод прижизненного (витального) окрашивания** основан на использовании очень низких концентраций красителя (растворы от 0,1% до 0,01%). В такой концентрации красители являются малотоксичными для клеток. Метод позволяет судить о жизнедеятельности клеток при различных внешних воздействиях.
- **Метод микроскопирования в темном поле (темнопольная микроскопия)** используется для рассматривания особо мелких структур (менее 0,2 мкм). Метод основан на том, что мелкие структуры, невидимые при обычном микроскопировании, светятся в отраженных лучах
- **Флуоресцентная микроскопия** основана на том, что некоторые вещества и структуры.способны светиться (флуоресцировать, люминисцировать) при поглощении световой энергии. Метод позволяет изучать локализацию различных химических веществ в живой и фиксированной клетке. Существуют флуорохромы, избирательно связывающиеся с липидами, полисахаридами, кератином и др.
- **Фазово-контрастная микроскопия** основана на том, что отдельные структуры прозрачной в целом клетки отличаются друг от друга по плотности и светопреломлению. Проходя через структуры различной плотности, луч света изменяет свою фазу, но наш глаз не способен улавливать этот сдвиг фазы. Глаз чувствителен только к изменениям интенсивности света (яркости), последняя зависит от величины амплитуды световой волны. Специальный объектив вызы- вает дополнительный сдвиг фазы колебания. При построении изображения взаимодействуют уже лучи, находящиеся в одной фазе, но обладающие разной амплитудой. Тем самым создается черно-белое контрастное изображение объекта.
- **Методы цито- и гистохимииоснованы** на способности красителей избирательно окрашивать химические вещества. Методы используются для изучения химического состава тканей и клеток при сохранении их структуры, а также для определения локализации химических веществ.
- **Метод цитоспектрофотометрии** основан на том, что интенсивность поглощения лучей прямо пропорциональна концентрации вещества. При помощи специального прибора (микроспектрофотометра) измеряется оптическая плотность окрашенных цито- и гисто- химическими методиками субстратов (нуклеиновых кислот, белков, углеводов, ферментов). Метод применяется для изучения плоидности ядер, для изучения концентрации РНК, полисахаридов, белков и других веществ при развитии патологического процесса или при экспериментальном воздействии.
- **Метод гистоавторадиографии** основан на использовании радиоактивных изотопов. Метод используется для изучения обменных процессов (репликации ДНК, синтеза белка) на клеточном и тканевом уровнях.
- **Метод культивирования клеток и тканей** основан на выращивании (эксплантации) изолированных клеток, кусочков тканей, органов вне организма.Различают клеточное, тканевое и органное культивирование. При клеточном и тканевом культивировании отдельные клетки или кусочки ткани выращивают погруженными в питательную среду.