

Лабораторная работа 2. ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА МИТОТИЧЕСКОЕ ДЕЛЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Клетка реагирует на действие радиации как единое целое. В ней нет структур и молекул, не повреждаемых при облучении. Изменение строения и функций одних органоидов или структур цитоплазмы влечёт за собой изменение метаболизма других. Поражающий эффект зависит от дозы. Последствия облучения ядра весьма существенны, поскольку оно является основным хранилищем наследственной информации клетки. Изменение структуры хромосом и генов под влиянием радиации может привести к необратимым наследственным изменениям – мутациям. Мутации могут также возникнуть под влиянием изменения генов пластид и митохондрий.

Наибольшая радиочувствительность клеток отмечается во время их деления. Для растительных клеток характерна универсальная реакция на облучение малыми дозами (менее 10 Гр) – временное прекращение деления, именуемое радиационным блокированием митоза. После прекращения действия радиации деление продолжается в обычном ритме без задержки прохождения фаз митоза, с нормальным распределением хромосом между дочерними клетками.

Самая длительная задержка деления под влиянием радиации характерна для S- и G₂-периодов интерфазы и для анафазы митоза. Механизмы задержки интерфазы до конца не выяснены. Для их объяснения разработано несколько гипотез:

- нарушение синтеза ДНК;
- повреждение хромосом и внутриклеточных структур, регулирующих деление;
- нарушение структуры веретена деления и его ориентации;
- накопление веществ, тормозящих деление клетки;
- защитно-приспособительная реакция клеток на действие внешнего фактора.

Длительность задержки деления зависит от дозы облучения. С увеличением дозы она, как правило, увеличивается. Большие дозы вызывают репродуктивную гибель клеток, т.е. потерю клетками способности к размножению после первого и второго митоза. Основной причиной гибели являются повреждения молекулы ДНК.

З а д а н и е 1. Подготовка растительных объектов к исследованиям.

Наиболее удобным объектом для изучения влияния облучения на интенсивность деления клеток являются меристемы зародышевых корешков различных культур. При изучении митозов в апикальной меристеме корешков исходный материал должен быть тщательно подготовлен для обеспечения достоверности получаемых результатов и сравнимости вариантов опыта.

Цель работы : изучить правила и методы подготовки материала для фиксации, окрашивания и приготовления временных давленных препаратов.

Материалы и оборудование: облученные и необлученные семена зерновых культур; фиксатор Карнуа или другие фиксаторы; 10%-ный раствор соляной кислоты; 45%-ная уксусная кислота; 2–4%-ный раствор железосаммонийных квасцов; раствор ацетокармина; чашки Петри; химическая посуда с притертыми пробками; колба с обратным холодильником; водяная баня; электроплитка; аналитические весы; мерный цилиндр; покровные и предметные стекла; препаровальные иглы, лезвия бритв.

Выполнение работы. Приготовление препаратов проводится по следующей схеме:

- 1) облучение семян;
- 2) проращивание облученных и необлученных семян;
- 3) фиксация зародышевых корешков;
- 4) мацерация корешков;
- 5) окрашивание корешков;
- 6) приготовление временных давленных препаратов.

1. Облучение семян. Облучение семян гамма-излучением проводится в стационарных условиях.

2. Проращивание семян. Для получения корешков облученные и необлученные семена проращивают в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге при температуре 24 °С. Хорошие результаты получаются также при проращивании семян на чистом прокаленном песке. Чтобы получить пригодные для дальнейшей работы, ровные и относительно толстые корешки, следует отбирать хорошо развитые, нетравмированные семена и раскладывать их в чашке Петри так, чтобы прорастающие семена не соприкасались между собой.

3. Фиксация зародышевых корешков. Фиксация – это обработка, которая быстро прерывает процессы жизнедеятельности клетки и по мере возможности сохраняет неизменной структуру клеток и тканей. Фиксация приводит к коагуляции цитоплазмы, укреплению клеточных оболочек и дифференцировке содержимого клетки. Для цитогенетических исследований используются фиксатор Карнуа, измененный фиксатор Карнуа, фиксатор Ньюкомера и фиксатор Навашина.

Фиксатор Карнуа состоит из 6 частей 96%-ного спирта, 3 частей хлороформа и 1 части ледяной уксусной кислоты. Экспозиция обработки корешков составляет 4–8 часов.

Измененный фиксатор Карнуа: 3 части 96%-ного спирта и 1 часть ледяной уксусной кислоты. Экспозиция обработки – 4–8 часов.

Фиксатор Ньюкомера: 6 частей изопропилового спирта, 3 части пропиловой кислоты, 1 часть диоксана, 1 часть ацетона и 1 часть петролейного эфира. Фиксатор ядовит, используется свежеприготовленным. Экспозиция обработки – 24 часа.

Фиксатор Навашина: 10 частей 1% - ной хромовой кислоты, 4 части 16%-ного формалина и 1 часть ледяной уксусной кислоты. Используют свежеприготовленным. Экспозиция обработки – 16–20 часов.

Для фиксации берут корешки длиной 0,5 – 2 см в зависимости от вида растений (0,5–0,8 см – для ячменя; 0,8–1,0 см – для пшеницы; 1,0–1,5 см – для ржи). Корешки аккуратно обрезают лезвием и помещают в фиксатор. Фиксацию лучше проводить в утреннее время, когда наиболее высока интенсивность митотических делений.

При фиксации необходимо соблюдать следующие правила:

- 1) фиксируемый материал должен иметь малый объем;
- 2) объем фиксатора не менее чем в 10 раз должен превосходить объем фиксируемого материала;
- 3) фиксируемый объект не должен плавать на поверхности фиксатора;
- 4) необходимо выдерживать время фиксации, т.е. экспозицию обработки;
- 5) фиксация должна проводиться в темноте. Зафиксированный материал может храниться в 70% - ном спирте.

4. Мацерация корешков. При приготовлении временных давленных препаратов большое значение имеет мацерация тканей перед окрашиванием. Мацерирующие жидкости просветляют цитоплазму и растворяют межклетники тканей, способствуя разъединению клеток и созданию их монослоя. Для мацерации применяют 10%-ную соляную кислоту, в которой корешки после фиксации выдерживают в течение 4–5 мин. при температуре 58–60° С. Для этих же целей можно использовать фермент цитазу.

5. Окрашивание корешков. Окрашивание применяют для оптической дифференциации клеточных структур. В качестве красителей для ядра и хромосом используются ацетокармин, ацетоорсеин, фуксинсернистая кислота (реактив Шиффа).

Для приготовления ацетокармина берут 45 мл ледяной уксусной кислоты, приливают 55 мл дистиллированной воды и добавляют 2–4 г кармина. Раствор кипятят 30–60 мин. в колбе с обратным холодильником, затем охлаждают, фильтруют и добавляют 1–2 капли раствора уксуснокислого железа или помещают в раствор железную скрепку.

Для лучшего окрашивания хромосом корешки можно выдержать 5–10 мин. в 2–4 %-ном водном растворе железоаммонийных квасцов.

При окрашивании ацетокармином корешки помещают в фарфоровый тигель и заливают ацетокармином на несколько часов. Затем тигель осторожно нагревают в течение 6–12 мин., не доводя краситель до кипения.

6. Приготовление временных давленных препаратов. Окрашенный корешок помещают на предметное стекло и отрезают кончик длиной 1–3 мм, окрашенный в темно-карминовый цвет. Этот участок относится к зоне деления и содержит максимальное количество делящихся клеток. Остальную часть удаляют.

На корешок капают 1 каплю 45 %-ной уксусной кислоты и осторожно накрывают покровным стеклом. Затем, придерживая покровное стекло пинцетом, осторожно раздавливают корешок постукиванием ручкой препаровальной иглы или спички. Избыток уксусной кислоты удаляют с предметного стекла фильтровальной бумагой.

Готовый препарат окантовывают разогретым парафином или лаком для ногтей. Это защитит препарат от высыхания. Однако препараты не подлежат длительному хранению, поскольку уксусная кислота приводит к обесцвечиванию окрашенных клеточных структур.

Внимание! Приготовление рабочих растворов и препаратов должно проводиться в хорошо вентилируемом помещении при соблюдении правил техники безопасности при работе с ядовитыми жидкостями.

З а д а н и е 2. Подготовка оптического микроскопа к работе

Изучение влияния облучения на интенсивность деления клеток осуществляется при помощи биологических рабочих микроскопов серии "Биолам-Р".

Цель работы: изучить устройство оптического микроскопа и осветителя, научиться самостоятельно производить настройку микроскопа при работе с осветителем.

Материалы и оборудование: оптические микроскопы, осветители и трансформаторы к ним.

Выполнение работы. 1. Изучение устройства светового микроскопа и его оптических характеристик. Оптический микроскоп состоит из трех систем: оптической, механической и осветительной.

Оптическая система микроскопа представляет собой совокупность линз объектива и окуляра и предназначена для построения увеличенного перевернутого изображения наблюдаемого объекта на сетчатке глаза наблюдателя. Объектив строит действительное увеличенное и перевернутое изображение препарата в плоскости, лежащей около фокуса окуляра, но на расстоянии, меньшем фокусного расстояния окуляра. Изображение, построенное объективом, является предметом для окуляра. Окуляр образует его мнимое, прямое и вторично увеличенное изображение. В результате микроскоп дает увеличенное изображение, перевернутое относительно препарата. Оптическая система микроскопа характеризуется общим увеличением, разрешающей способностью, глубиной резкого изображения и степенью исправления аберраций.

Общее увеличение (V) – это отношение размеров мнимого изображения, строящегося оптической системой микроскопа, к размерам наблюдаемого объекта. Оно равно произведению увеличения объектива на увеличение окуляра:

$$V = V_{\text{объектива}} \times V_{\text{окуляра}}$$

Если микроскоп снабжен тубусом, имеющим собственное увеличение, тогда:

$$V = V_{\text{объектива}} \times V_{\text{окуляра}} \times V_{\text{тубуса}}$$

Разрешающая способность (d) – это наименьшее видимое расстояние между двумя точками на наблюдаемом объекте. Она зависит от длины волны используемого света (λ) и числовой (нумерической) апертуры объектива (NA), которая указана на оправе объектива. Разрешающая способность рассчитывается по формуле

$$d = \lambda / NA.$$

Чем меньше значение d , тем выше качество оптической системы микроскопа. Нумерическая апертура объектива зависит от величины угла вхождения пучка света во фронтальную линзу объектива (α) и от коэффициента преломления света (n) в среде между фронтальной линзой объектива и покровным стеклом препарата:

$$NA = n \cdot \sin \alpha / 2.$$

Тогда формула разрешающей способности будет иметь вид

$$d = \lambda / n \cdot \sin \alpha / 2.$$

Значение разрешающей способности может быть изменено за счет использования красных ($\lambda = 0,60-0,70$ мкм), бесцветных ($\lambda = 0,55$ мкм) или синих ($\lambda = 0,50-0,40$ мкм) светофильтров и применения воздушной ($n = 1,00$), водной ($n = 1,33$) или масляной ($n = 1,52$) иммерсий.

Глубина резкого изображения (T) – это расстояние между двумя плоскостями, лежащими одна над другой, между которыми все объекты препарата просматриваются одинаково четко:

$$T = 1000 / V \cdot 7 \cdot NA + \lambda / 2 \cdot NA^2.$$

Для увеличения глубины изображения можно уменьшить NA и V , применив желтые и красные светофильтры.

Для подбора правильного сочетания окуляра и объектива микроскопа рассчитывают полезное увеличение окуляра ($V_{п.}$):

$$V_{п.} = (500 NA - 1000 NA) / V_{объектива}.$$

Увеличение взятого для работы окуляра должно находиться в пределах полезного увеличения.

У используемых в микроскопии объективов в разной степени исправлены оптические aberrации. Поэтому для каждого типа объективов применяются свои окуляры. Для работы с объективами планахроматами малых увеличений и ахроматами малых и средних увеличений, не имеющими специальной маркировки, применяют окуляры Гюйгенса, также не имеющие специальной маркировки. Объективы апохроматы, планахроматы и ахроматы больших увеличений должны комплектоваться с компенсационным окуляром, имеющим метку "К". Для микрофотографии используют окуляры, имеющие метку "фото".

Механическая система микроскопа состоит из основания, тубусодержателя, тубуса с револьвером для крепления объективов, механизмов грубой и точной настройки микроскопа, предметного столика с препаратодателем.

Осветительная система микроскопа. При использовании искусственного освещения в осветительную систему включается осветитель с полевой ирисовой диафрагмой, зеркало, конденсатор с апертурной диафрагмой.

2. Установка рационального освещения по принципу Келера.

Смысл установки рационального освещения заключается в уравнивании апертуры осветителя, конденсора и объектива.

Порядок установки рационального освещения:

1. Установить микроскоп в удобное для работы положение. Затем:

- конденсор поднять вверх;
- закрыть диафрагму конденсора;
- вывести светособирающую линзу и светофильтр из-под конденсора;
- установить объектив малого увеличения.

2. Соединить осветитель с трансформатором. Включить трансформатор в сеть. Регулятором трансформатора установить минимальное освещение.

3. Установить осветитель на расстоянии 15 см от микроскопа. Диафрагму осветителя открыть на 5–8 мм.

4. Поворотом осветителя направить пучок света на середину плоского зеркала. Поместить на зеркало кусок белой бумаги и, перемещая лампочку вдоль своей оси и вдоль оси коллектора осветителя, добиться четкого изображения спирали лампочки осветителя на бумаге.

5. Приоткрыть диафрагму конденсора и настроить микроскоп на резкость на любом препарате с помощью макро- и микровинтов. Немного опустить конденсор, при этом появится неровное освещение поля зрения. Перемещением конденсора добиться четкого изображения границы между темным и светлым полем. Поворотом зеркала направить освещенный круг в центр поля зрения микроскопа.

6. Открыть диафрагму осветителя до совмещения ее изображения (освещенный круг) с полем зрения микроскопа. Расположение освещенного круга подкорректировать поворотом зеркала. При работе с малыми объективами диафрагму открыть до прекращения увеличения её изображения.

7. Вынуть окуляр из тубуса и, глядя в микроскоп с расстояния 10–20 см, открыть диафрагму конденсора до совмещения освещенного круга с полем зрения окуляра.

8. Окуляр поставить в тубус. Для получения равномерного освещения поля зрения ввести матовый светофильтр в ход лучей света под конденсором.

При переходе на работу с более сильным объективом настройку освещения повторяют заново, начиная с пункта 4. Для повышения контрастности изображения можно слегка опустить конденсор или прикрыть его диафрагму. Однако при этом разрешающая способность объектива не будет использована полностью.

З а д а н и е 3. Влияние облучения на митотическую активность клеток меристемы зародышевых корешков

Жизнь клетки состоит из последовательного ряда биохимических и структурных изменений, которые протекают от момента её образования до естественной гибели. В меристематических тканях жизненный цикл соответствует клеточному, когда продолжительность жизни клетки определяется временем, необходимым для подготовки её к делению и деления.

Подготовка клетки к делению осуществляется в интерфазе. Интерфаза характеризуется высокой метаболической активностью, которая обеспечивает:

1) подготовку клетки к синтезу ДНК и белков, необходимых для построения сестринских хроматид (G₁- период);

2) синтез ДНК (S-период);

3) построение двуххроматидных хромосом, способных к последующему митотическому делению (G₂-период);

По мере завершения подготовки к делению клетки меристемы вступают в митоз, состоящий из четырёх фаз: профазы, метафазы, анафазы и телофазы. Некоторая асинхронность вступления клеток в деление повышает устойчивость клеточной популяции к действию неблагоприятных факторов внешней среды.

Облучение ионизирующим излучением делящихся клеток вызывает различные хромосомные нарушения, которые являются одной из основных причин задержки митоза. В связи с этим митотическая активность ткани и относительная длительность фаз митоза могут быть использованы в качестве показателей реакции растений на действие внешних факторов. Митотическая активность оценивается величиной митотического индекса (МИ), измеряемого в промилле (‰):

$$\text{МИ} = (\text{П} + \text{М} + \text{А} + \text{Т})1000 / \text{N}$$

где П, М, А, Т - количество делящихся клеток в профазе, метафазе, анафазе и телофазе митоза;

N – общее число клеток в исследуемой клеточной популяции.

Митотический индекс показывает относительное количество клеток, находящихся в митозе. Митотический индекс определяют для каждого поля зрения, затем находят его среднее арифметическое значение для всего препарата. При облучении малыми дозами деление задерживается, но через несколько часов митотический индекс возрастает выше исходного уровня. При очень высоких дозах митотический индекс становится ниже

исходного, потому что часть клеток прекращает деление и теряет способность к размножению.

Относительная длительность фаз митоза (И) определяется в процентах по следующим формулам:

$$\text{индекс профазы} - I^P = \frac{P \cdot 100}{(P + M + A + T)};$$

$$\text{индекс метафазы} - I^M = \frac{M \cdot 100}{(P + M + A + T)};$$

$$\text{индекс анафазы} - I^A = \frac{A \cdot 100}{(P + M + A + T)};$$

$$\text{индекс телофазы} - I^T = \frac{T \cdot 100}{(P + M + A + T)}.$$

Для определения относительной длительности фаз митоза производится подсчет числа делящихся клеток в нескольких полях зрения микроскопа.

Цель работы: изучить влияние гамма - излучения на митотическую активность и относительную длительность фаз митоза в клетках меристемы зародышевых корешков у зерновых культур.

Материалы и оборудование: препараты облученных и необлученных корешков; микроскоп с осветителем; трансформатор.

Выполнение работы: 1. Произвести настройку микроскопа.

2. Произвести цитологический анализ препаратов путем подсчета делящихся и неделящихся клеток в 10 полях зрения. Результаты подсчета записать в таблицу 2 по двум вариантам опыта.

3. Определить митотический индекс и относительную длительность фаз митоза у облученных и необлученных корешков. При обнаружении хромосомных нарушений указать их количество, тип (чаще всего просматриваются фрагменты и дицентрические мосты), сделать рисунки.

Данные таблицы 2 используются для расчёта относительной длительности фаз митоза, которая записывается в таблицу 3.

Т а б л и ц а 2. Митотическая активность клеток меристемы зародышевых корешков

Поле зрения	Количество клеток в фазе						Митоти-ческий индекс
	И	П	М	А	Т	Всего	
Облученные корешки							
1-10							
Необлученные корешки							
1-10							

Т а б л и ц а 3. Влияние облучения на относительную длительность фаз митоза в зародышевых корешках

Вариант опыта	Относительная длительность фаз митоза, %			
	I^P	I^M	I^A	I^T
Контроль				
Облученные семена				

Сделать выводы по результатам исследований и записать в тетрадь.

Контрольные вопросы

1. На каких уровнях осуществляется изучение радиобиологических эффектов у растений?
2. Как начинаются первичные процессы действия облучения на организм?
3. Что понимается под прямым и косвенным действием радиации?
4. Назовите общие черты радиационного синдрома растений и организма животных?
5. Клетки каких тканей растения наиболее чувствительные к действию облучения?
6. К каким последствиям приводит повреждение меристем?
7. От чего зависит реакция клеток на облучение?
8. Какие клеточные структуры и молекулы наиболее радиочувствительны?
9. Когда клетка наиболее чувствительна к облучению?
10. Назовите радиочувствительные стадии деления клетки?
11. При каких дозах облучения наблюдается временная задержка деления?
12. В чем заключается причина задержки деления?
13. Как клетка реагирует на большие дозы облучения?
14. Что такое репродуктивная гибель клетки?
15. Назовите причины репродуктивной гибели клеток.
16. На каких объектах удобно изучать влияние облучения на интенсивность деления клеток?
17. В какой последовательности готовят препараты для исследования интенсивности деления клеток?
18. Как производится проращивание семян для изучения особенностей митоза?
19. В чем заключается сущность фиксации корешков ?
20. Как проводится фиксация корешков?
21. Назовите основные фиксаторы и правила фиксации.
22. Как производится мацерация корешков ?
23. Для чего производят окрашивание корешков?
24. Какие красители используют для окрашивания ядер и хромосом?
25. Что такое разрешающая способность микроскопа?
26. Из каких стадий состоит клеточный цикл?
27. Охарактеризуйте периоды интерфазы и фазы митоза.
28. По какому показателю определяется митотическая активность?
29. Как определяется относительная длительность фаз митоза?
30. Как различается митотическая активность клеток облученных и необлученных корешков?
31. Какие хромосомные нарушения обнаружены в опыте? В каких фазах митоза?