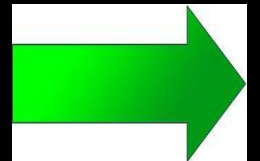


Методы изучения клетки





Методы световой микроскопии

Метод
светлого
поля и его
разновидности

Метод темного
поля и его
разновидности

Поляризационная
микроскопия

Метод
фазового
контраста

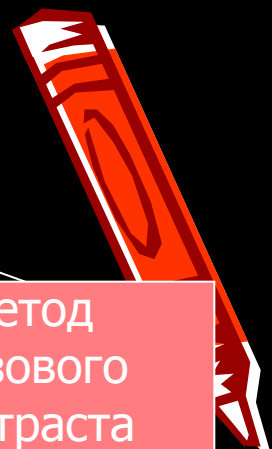
Метод
исследования
в свете
люминесценции

Метод
наблюдения
в
инфракрасных
лучах

Метод
интерференционного
контраста

Микрофотографирование
и
микрокиносъемка

Метод наблюдения в
ультрафиолетовых
лучах

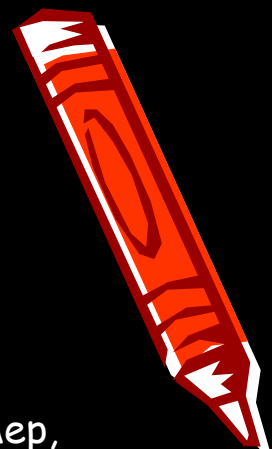


Метод световой микроскопии

Методы микроскопии выбираются (и обеспечиваются конструктивно) в зависимости от характера и свойств изучаемых объектов, так как последние влияют на контрастность изображения.



Метод светлого поля и его разновидности



Метод светлого поля в проходящем свете применяется при изучении прозрачных препаратов с включенными в них абсорбирующими (поглощающими свет) частицами и деталями. Это могут быть, например, тонкие окрашенные срезы животных и растительных тканей, тонкие шлифы минералов и т. д. В отсутствие препарата пучок света из конденсора, проходя через объектив, даёт вблизи фокальной плоскости окуляра равномерно освещенное поле. При наличии в препарате абсорбирующего элемента происходит частичное поглощение и частичное рассеивание падающего на него света, что и обуславливает появление изображения.

Метод косо́го освещения - разновидность предыдущего метода. Отличие между ними состоит в том, что свет на объект направляют под большим углом к направлению наблюдения. Иногда это помогает выявить «рельефность» объекта за счёт образования теней.

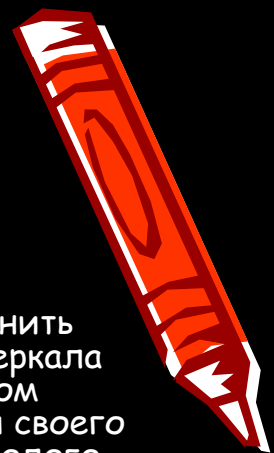
Метод светлого поля в отражённом свете применяется при исследовании непрозрачных отражающих свет объектов, например шлифов металлов или руд. Освещение препарата (от осветителя и полупрозрачного зеркала) производится сверху, через объектив, который одновременно играет и роль конденсора. В изображении, создаваемом в плоскости объективом совместно с тубусной линзой, структура препарата видна из-за различия в отражающей способности её элементов; на светлом поле выделяются также неоднородности, рассеивающие падающий на них свет.



Метод темного поля и его разновидности

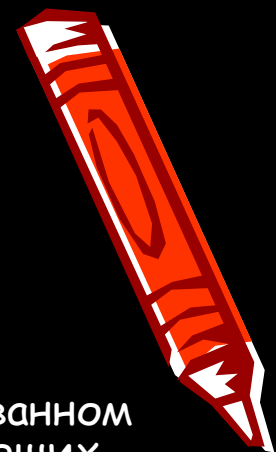
Метод тёмного поля в проходящем свете используется для получения изображений прозрачных неабсорбирующих объектов, которые не могут быть видны, если применить метод светлого поля. Зачастую это биологические объекты. Свет от осветителя и зеркала направляется на препарат конденсором специальной конструкции — т. н. конденсором тёмного поля. По выходе из конденсора основная часть лучей света, не изменившая своего направления при прохождении через прозрачный препарат, образует пучок в виде полого конуса и не попадает в объектив (который находится внутри этого конуса). Изображение в микроскопе формируется при помощи лишь небольшой части лучей, рассеянных микрочастицами находящегося на предметном стекле препарата внутри конуса и прошедшими через объектив. В поле зрения на тёмном фоне видны светлые изображения элементов структуры препарата, отличающихся от окружающей среды показателем преломления. У крупных частиц видны только светлые края, рассеивающие лучи света. Используя этот метод, нельзя определить по виду изображения, прозрачны частицы или непрозрачны, больший или меньший показатель преломления они имеют по сравнению с окружающей средой.

В основе **метода ультрамикроскопии** лежит тот же принцип - препараты в ультрамикроскопах освещаются перпендикулярно направлению наблюдения. При этом методе можно обнаружить (но не «наблюдать») чрезвычайно мелкие частицы. С помощью иммерсионных ультрамикроскопов удаётся зарегистрировать присутствие в препарате частиц размером до $2 \cdot 10^{-9}$ м. Но форму и точные размеры таких частиц с помощью этого метода определить невозможно. Непрозрачные препараты (например, шлифы металлов), наблюдаемые по **методу тёмного поля в отражённом свете** освещают сверху — через специальную кольцевую систему, расположенную вокруг объектива и называемую эпиконденсором.



Поляризационная микроскопия

Поляризационная микроскопия – это метод наблюдения в поляризованном свете для микроскопического исследования препаратов, включающих оптически анизотропные элементы (или целиком состоящих из таких элементов). Таковыми являются многие минералы, зёрна в шлифах сплавов, некоторые животные и растительные ткани и пр. Наблюдение можно проводить как в проходящем, так и в отражённом свете. Свет, излучаемый осветителем, пропускают через поляризатор. Сообщенная ему при этом поляризация меняется при последующем прохождении света через препарат (или отражении от него). Эти изменения изучаются с помощью анализатора и различных оптических компенсаторов. Анализируя такие изменения, можно судить об основных оптических характеристиках анизотропных микрообъектов: силе двойного лучепреломления, количестве оптических осей и их ориентации, вращении плоскости поляризации, дихроизме.



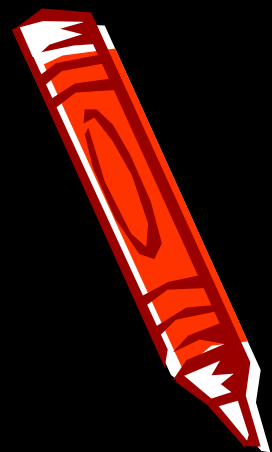
Метод фазового контраста



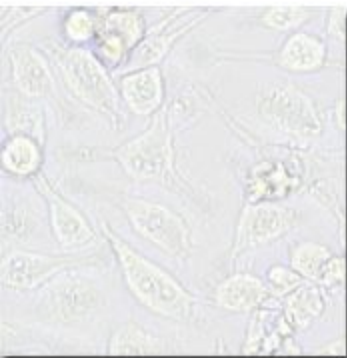
Метод фазового контраста и его разновидность — т. н. метод «аноптрального» контраста предназначены для получения изображений прозрачных и бесцветных объектов, невидимых при наблюдении по методу светлого поля. К таковым относятся, например, живые неокрашенные животные ткани. Суть метода в том, что даже при очень малых различиях в показателях преломления разных элементов препарата световая волна, проходящая через них, претерпевает разные изменения по фазе (приобретает т. н. фазовый рельеф). Не воспринимаемые непосредственно ни глазом, ни фотопластинкой, эти фазовые изменения с помощью специального оптического устройства преобразуются в изменения амплитуды световой волны, т. е. в изменения яркости («амплитудный рельеф»), которые уже различимы глазом или фиксируются на фоточувствительном слое. Иными словами, в получаемом видимом изображении распределение яркостей (амплитуд) воспроизводит фазовый рельеф. Получаемое таким образом изображение называется фазово-контрастным.



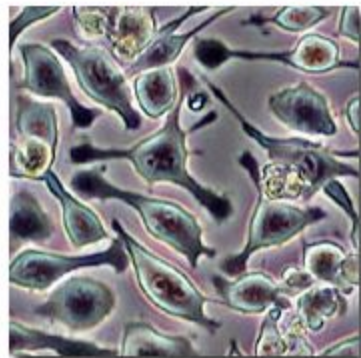
Типичная схема работы метода: в переднем фокусе конденсора устанавливается апертурная диафрагма, отверстие которой имеет форму кольца. Её изображение возникает вблизи заднего фокуса объектива, и там же устанавливается т. н. фазовая пластинка, на поверхности которой имеется кольцевой выступ или кольцевая канавка, называемая фазовым кольцом. Фазовая пластинка не всегда помещена в фокусе объектива – часто фазовое кольцо наносят прямо на поверхность одной из линз объектива. В любом случае не отклонённые в препарате лучи от осветителя, дающие изображение диафрагмы, должны полностью проходить через фазовое кольцо, которое значительно ослабляет их (его делают поглощающим) и изменяет их фазу на $\pi/4$ (π — длина волны света). А лучи, даже ненамного отклонённые (рассеянные) в препарате, проходят через фазовую пластинку, минуя фазовое кольцо, и не претерпевают дополнительного сдвига фазы. С учётом фазового сдвига в материале препарата полная разность фаз между отклонёнными и не отклонёнными лучами близка к 0 или $\pi/2$, и в результате интерференции света в плоскости изображения препарата они заметно усиливают или ослабляют друг друга, давая контрастное изображение структуры препарата. Отклонённые лучи имеют значительно меньшую амплитуду по сравнению с не отклонёнными, поэтому ослабление основного пучка в фазовом кольце, сближая значения амплитуд, также приводит к большей контрастности изображения. Метод дает возможность различать малые элементы структуры, чрезвычайно слабо контрастные в методе светлого поля. Прозрачные частицы, сравнительно не малые по размерам, рассеивают лучи света на столь небольшие углы, что эти лучи проходят вместе с не отклонёнными через фазовое кольцо. Для таких частиц фазово-контрастный эффект имеет место только вблизи их контуров, где происходит сильное рассеяние.



Клетки, освещенные по методу светлого поля (a) и методу фазового контраста (b)



(a)



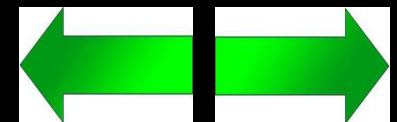
(b)



Метод наблюдения в инфракрасных лучах



- Метод наблюдения в инфракрасных (ИК) лучах также требует преобразования невидимого для глаза изображения в видимое с использованием фотографирования или с помощью электронно-оптического преобразователя. ИК микроскопия дает возможность изучать внутреннюю структуру тех объектов, которые непрозрачны в видимом свете, например темных стекол, некоторых кристаллов и минералов и пр



Метод наблюдения в ультрафиолетовых лучах



- Метод наблюдения в ультрафиолетовых (УФ) лучах делает возможным увеличение предельной разрешающей способности микроскопа. Главное преимущество метода состоит в том, что частицы многих веществ, прозрачные в видимом свете, сильно поглощают УФ излучение определённых длин волн и, следовательно, легко различимы в УФ изображениях. Характерными спектрами поглощения в УФ области обладают многие вещества, содержащиеся в растительных и животных клетках (пуриновые основания, пиримидиновые основания, большинство витаминов, ароматические аминокислоты, некоторые липиды, тироксин и др.).
- Так как ультрафиолетовые лучи невидимы для человеческого глаза, то изображения в УФ микроскопии регистрируют либо фотографически, либо с помощью электронно-оптического преобразователя или люминесцирующего экрана. Препарат фотографируется в трёх длинах волн УФ области спектра. Каждый из полученных негативов освещается видимым светом определённого цвета (например, синим, зелёным и красным), и все они одновременно проецируются на один экран. Результат - цветное изображение объекта в условных цветах, зависящих от поглощающей способности препарата в ультрафиолете.



Микрофотографирование и микрокиносъёмка

Микрофотографирование и микрокиносъёмка – это получение с помощью микроскопа изображений на светочувствительных слоях. Данный метод широко применяется совместно со всеми другими методами микроскопического исследования. Для микрофото- и микрокиносъёмки требуется некоторая перестройка оптической системы микроскопа — иная по сравнению с визуальным наблюдением фокусировки окуляра относительно изображения, даваемого объективом. Микрофотография необходима при документировании исследований, при изучении объектов в невидимых для глаза УФ и ИК лучах (см. выше), а также объектов со слабой интенсивностью свечения. Микрокиносъёмка незаменима при исследовании процессов, развёртывающихся во времени (жизнедеятельности тканевых клеток и микроорганизмов, роста кристаллов, протекания простейших химических реакций и т. п.).



Метод интерференционного контраста

Метод интерференционного контраста (интерференционная микроскопия) состоит в том, что каждый луч раздваивается, входя в микроскоп. Один из полученных лучей направляется сквозь наблюдаемую частицу, другой — мимо неё по той же или дополнительной оптической ветви микроскопа. В окулярной части микроскопа оба луча вновь соединяются и интерферируют между собой. Конденсор и объектив снабжены двояко-преломляющими пластинками, из которых первая расщепляет исходный световой луч на два луча, а вторая воссоединяет их. Один из лучей, проходя через объект, запаздывает по фазе (приобретает разность хода по сравнению со вторым лучом). Величина этого запаздывания измеряется компенсатором. Этот метод даёт возможность наблюдать прозрачные и бесцветные объекты, но их изображения могут быть и разноцветными (интерференционные цвета). Этот метод пригоден для изучения живых тканей и клеток и применяется во многих случаях именно с этой целью. Метод интерференционного контраста часто применяют совместно с другими методами микроскопии, в частности с наблюдением в поляризованном свете. Его применение в сочетании с микроскопией в ультрафиолетовых лучах позволяет, к примеру, определить содержание нуклеиновых кислот в общей сухой массе объекта.



Метод исследования в свете люминесценции

Метод исследования в свете люминесценции состоит в наблюдении под микроскопом зелено-оранжевого свечения микрообъектов, которое возникает при их освещении сине-фиолетовым светом или невидимыми глазом ультрафиолетовыми лучами. В оптическую схему микроскопа вводятся два светофильтра. Один из них помещают перед конденсором. Он пропускает от источника-осветителя излучение только тех длин волн, которые возбуждают люминесценцию либо самого объекта (собственная люминесценция), либо специальных красителей, введенных в препарат и поглощенных его частицами (вторичная люминесценция). Второй светофильтр, который установлен после объектива, пропускает к глазу наблюдателя (или на фоточувствительный слой) только свет люминесценции. В люминесцентной микроскопии используют освещение препаратов как сверху (через объектив, который в этом случае служит и конденсором), так и снизу, через обычный конденсор. Метод нашел широкое применение в микробиологии, вирусологии, гистологии, цитологии, в пищевой промышленности, при исследовании почв, в микрохимическом анализе, в дефектоскопии. Такое многообразие применений объясняется очень высокой цветовой чувствительностью глаза и высокой контрастностью изображения самосветящегося объекта на темном не люминесцирующем фоне.



Методы электронной микроскопии

Метод реплик

Метод декорирования

Амплитудная электронная микроскопия

Фазовая электронная микроскопия

Лоренцова электронная микроскопия

Количественная электронная микроскопия



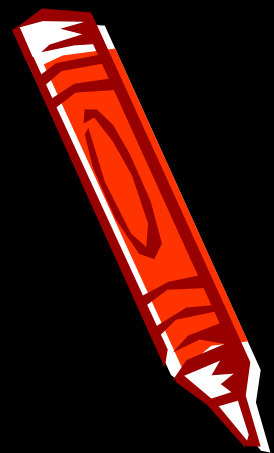
Метод реплик



- Метод реплик используют для изучения поверхностной геометрической структуры массивных тел. С поверхности такого тела снимается отпечаток в виде тонкой плёнки углерода, коллодия, формвара и др., повторяющий рельеф поверхности и рассматривается в просвечивающем электронном микроскопе. Обычно предварительно под скользящим (малым к поверхности) углом на реплику в вакууме напыляется слой сильно рассеивающего электроны тяжёлого металла, оттеняющего выступы и впадины геометрического рельефа.



Метод декорирования



- Метод декорирования исследует не только геометрическую структуру поверхностей, но и микрополя, обусловленные наличием дислокаций, скопления точечных дефектов, ступени роста кристаллических граней, доменную структуру и т. д. . Согласно этому методу на поверхность образца вначале напыляется очень тонкий слой декорирующих частиц (атомы Au, Pt и др., молекулы полупроводников или диэлектриков), осаждающихся преимущественно на участках сосредоточения микрополей, а затем снимается реплика с включениями декорирующих частиц.



Амплитудная электронная микроскопия



- Методы амплитудной электронной микроскопии могут быть использованы для обработки изображений аморфных и других тел (размеры частиц которых меньше разрешаемого в электронном микроскопе расстояния), рассеивающих электроны диффузно. В просвечивающем электронном микроскопе, например, контраст изображения, т. е. перепад яркостей изображения соседних участков объекта, в первом приближении пропорционален перепаду толщин этих участков.



Фазовая электронная микроскопия



- Для расчёта контраста изображений кристаллических тел, имеющих регулярные структуры, а также для решения обратной задачи — расчёта структуры объекта по наблюдаемому изображению — применяются методы фазовой электронной микроскопии. Рассматривается задача о дифракции электронной волны на кристаллической решетке, при решении которой дополнительно учитываются неупругие взаимодействия электронов с объектом: рассеяние на плазмах, фононах и т. п. В просвечивающих электронных микроскопах и растровых просвечивающих электронных микроскопах высокого разрешения получают изображения отдельных молекул или атомов тяжелых элементов. Привлекая методы фазовой электронной микроскопии, можно восстанавливать по изображениям трехмерную структуру кристаллов и биологических макромолекул.



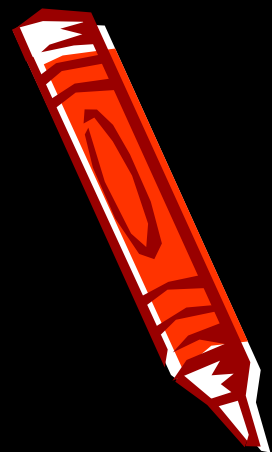
Количественная электронная микроскопия

- Методы количественной электронной микроскопии — это точное измерение различных параметров образца или исследуемого процесса, например измерение локальных электрических потенциалов, магнитных полей, микрогеометрии поверхностного рельефа и т. д.



Лоренцова электронная микроскопия

- Областью исследования Лоренцовой электронной микроскопии, в которой изучают явления, обусловленные силой Лоренца, являются внутренние магнитные и электрические поля или внешние поля рассеяния, например, поля магнитных доменов в тонких пленках, сегнетоэлектрических доменов, поля головок для магнитной записи информации и т. п.



Методы фракционирования

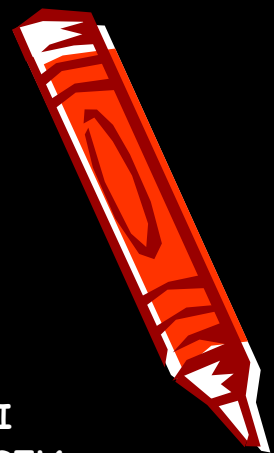
Дифференциальное
центрифугирование

Зональное
центрифугирование

Для получения клеточных фракций широко применяются различные виды центрифугирования: дифференциальное центрифугирование, зональное центрифугирование и равновесное центрифугирование в градиенте плотности. Теоретические и практические вопросы, связанные с центрифугированием, всесторонне разобраны в обзоре Сайкса.



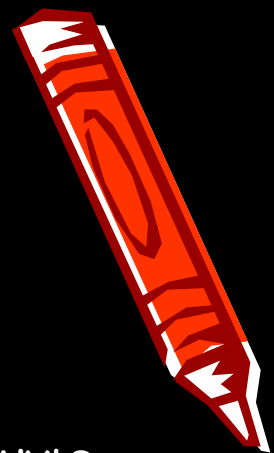
Дифференциальное центрифугирование



- В случае дифференциального центрифугирования образцы центрифугируют определенное время при заданной скорости, после чего удаляют надосадочную жидкость. Этот метод полезен для разделения частиц, сильно различающихся по скорости седиментации. Например, центрифугирование в течение 5—10 мин при 3000—5000 об/мин приводит к осаждению интактных бактериальных клеток, тогда как большинство клеточных фрагментов при этом остается в надосадочной жидкости. Фрагменты клеточной стенки и большие мембранные структуры можно осадить центрифугированием при 20 000—50 000 об/мин в течение 20 мин, в то время как маленькие мембранные везикулы и рибосомы требуют для осаждения центрифугирования при 200 000 об/мин в течение 1 ч.



Зональное центрифугирование



- Зональное центрифугирование представляет собой эффективный способ разделения структур, имеющих сходную плавучую плотность, но различающихся по форме и массе частиц. В качестве примеров можно привести разделение субъединиц рибосом, различных классов полисом, а также молекул ДНК, имеющих различную форму. Центрифугирование осуществляют либо в бакет-роторах, либо в специально устроенных зональных роторах; для предотвращения конвекции при центрифугировании в стаканах бакет-ротора или в камере зонального ротора создают слабый градиент (обычно сахарозы). Пробу наносят в виде зоны или узкой полосы в самом верху градиентного столбика. Для субклеточных частиц обычно используется градиент сахарозы от 15 до 40% (вес/объем).



Методы Рентгеноструктурного анализа

Метод Лауэ

Метод
Дебая-Шеррера



Метод Лауэ

- применяется для монокристаллов. Образец облучается пучком с непрерывным спектром, взаимная ориентация пучка и кристалла не меняется. Угловое распределение дифрагированного излучения имеет вид отдельных дифракционных пятен (лауэграмма).



Метод Дебая-Шеррера



- используется для исследования поликристаллов и их смесей. Хаотическая ориентация кристаллов в образце относительно падающего монохроматического пучка превращает дифрагированные пучки в семейство коаксиальных конусов с падающим пучком на оси. Их изображение на фотоплёнке (дебаеграмма) имеет вид концентрических колец, расположение и интенсивность которых позволяет судить о составе исследуемого вещества.



Метод клеточных культур

- . Некоторые ткани удается разделить на отдельные клетки так, что клетки при этом остаются живыми и часто способны к размножению. Этот факт окончательно подтверждает представление о клетке как единице живого. Губку, примитивный многоклеточный организм, можно разделить на клетки путем протирания сквозь сито. Через некоторое время эти клетки вновь соединяются и образуют губку. Эмбриональные ткани животных можно заставить диссоциировать с помощью ферментов или другими способами, ослабляющими связи между клетками.
- Американский эмбриолог Р.Гаррисон (1879-1959) первым показал, что эмбриональные и даже некоторые зрелые клетки могут расти и размножаться вне тела в подходящей среде. Эта техника, называемая культивированием клеток, была доведена до совершенства французским биологом А.Каррелем (1873-1959). Растительные клетки тоже можно выращивать в культуре, однако по сравнению с животными клетками они образуют большие скопления и прочнее прикрепляются друг к другу, поэтому в процессе роста культуры образуются ткани, а не отдельные клетки. В клеточной культуре из отдельной клетки можно вырастить целое взрослое растение, например морковь.



Метод микрохирургии



- С помощью микроманипулятора отдельные части клетки можно удалять, добавлять или каким-то образом видоизменять. Крупную клетку амебы удается разделить на три основных компонента - клеточную мембрану, цитоплазму и ядро, а затем эти компоненты можно вновь собрать и получить живую клетку. Таким путем могут быть получены искусственные клетки, состоящие из компонентов разных видов амеб.
- Если принять во внимание, что некоторые клеточные компоненты представляется возможным синтезировать искусственно, то опыты по сборке искусственных клеток могут оказаться первым шагом на пути к созданию в лабораторных условиях новых форм жизни. Поскольку каждый организм развивается из одной единственной клетки, метод получения искусственных клеток в принципе позволяет конструировать организмы заданного типа, если при этом использовать компоненты, несколько отличающиеся от тех, которые имеются у ныне существующих клеток. В действительности, однако, полного синтеза всех клеточных компонентов не требуется. Структура большинства, если не всех компонентов клетки, определяется нуклеиновыми кислотами. Таким образом, проблема создания новых организмов сводится к синтезу новых типов нуклеиновых кислот и замене ими природных нуклеиновых кислот в определенных клетках.



Метод слияния клеток



- Другой тип искусственных клеток может быть получен в результате слияния клеток одного или разных видов. Чтобы добиться слияния, клетки подвергают воздействию вирусных ферментов; при этом наружные поверхности двух клеток склеиваются вместе, а мембрана между ними разрушается, и образуется клетка, в которой два набора хромосом заключены в одном ядре. Можно слить клетки разных типов или на разных стадиях деления. Используя этот метод, удалось получить гибридные клетки мыши и цыпленка, человека и мыши, человека и жабы. Такие клетки являются гибридными лишь изначально, а после многочисленных клеточных делений теряют большинство хромосом либо одного, либо другого вида. Конечный продукт становится, например, по существу клеткой мыши, где человеческие гены отсутствуют или имеются лишь в незначительном количестве. Особый интерес представляет слияние нормальных и злокачественных клеток. В некоторых случаях гибриды становятся злокачественными, в других нет, т.е. оба свойства могут проявляться и как доминантные, и как рецессивные. Этот результат не является неожиданным, так как злокачественность может вызываться различными факторами и имеет сложный механизм.

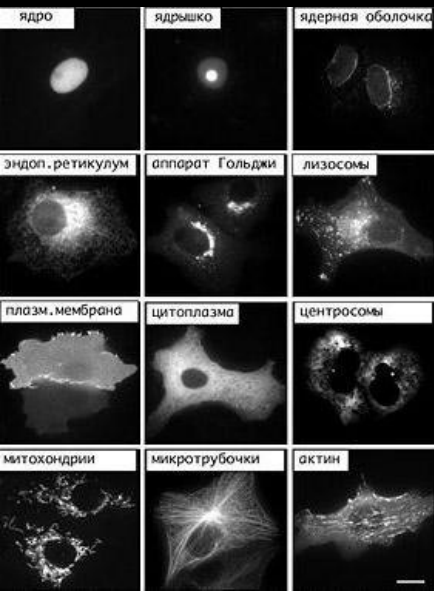


The Kameu :)



Просмотреть ещё раз

Закончить просмотр



Список использованной литературы:

<http://www.mikroskopia.ru>

<http://www.rdio.ru>

<http://ru.wikipedia.org>

<http://www.Google.com>

<http://www.krugosvet.ru>



Молекулы воды:

