

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ, БІОХІМІЇ ТА ГЕНЕТИКИ

ЗАГАЛЬНА ЦИТОЛОГІЯ

ЕЛЕКТРОННІ МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
до лабораторних робіт з курсу
для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
спеціальності 091 «Біологія та біохімія»

ОДЕСА
ОНУ
2024

**УДК 576.3(072)
З-14**

Укладач:

Т. Г. Алексєєва, кандидат біологічних наук, доцент кафедри молекулярної біології, біохімії та генетики Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

Рецензенти:

Т. В. Гладкій, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фізіології, здоров'я та безпеки людини та природничої освіти Одеського національного університету імені І. І. Мечникова;

М. Б. Галкін, кандидат біологічних наук, доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

*Рекомендовано вченою радою біологічного факультету
ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 1 від 28 серпня 2023 р.*

З-14 **Загальна** цитологія [Електронний ресурс] : електрон. метод. рек. до лаб. робіт з курсу для здобув. першого (бакалавр.) рівня вищ. освіти спец. 091 «Біологія та біохімія» / уклад. Т. Г. Алексєєва. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2024. – 52 с. – 5,5 МБ.

Методичні вказівки включають окремі теоретичні відомості та практичні інструкції (протокол виконання) для проведення лабораторних занять з курсу «Загальна цитологія». Методичні рекомендації призначені для здобувачів першого рівня вищої освіти спеціальності 091 Біологія та біохімія.

УДК 576.3(072)

Зміст

| | |
|---|----|
| ВСТУП..... | 4 |
| Світлова мікроскопія у біологічних дослідженнях. Біологічні препарати | 5 |
| Лабораторна робота № 1. Налаштування мікроскопа для дослідження біологічних об'єктів | 11 |
| Лабораторна робота № 2. Виготовлення тимчасових мікропрепаратів біологічних об'єктів | 15 |
| Лабораторна робота № 3. Визначення статевого хроматину людини. Проведення мікроядерного тесту | 20 |
| Лабораторна робота № 4. Ультраструктура еукаріотичних клітин..... | 24 |
| Лабораторна робота № 5. Каріотипування рослинних об'єктів..... | 39 |
| Лабораторна робота № 6. Визначення мітотичного індексу | 43 |
| Лабораторна робота № 7. Мікроспорогенез у злакових рослин | 45 |
| Лабораторне заняття № 8. Окремі проблеми клітинної біології | 48 |
| Рекомендована література | 50 |
| Корисні інтернет-ресурси | 51 |

ВСТУП

Загальна цитологія є фундаментальним розділом біології, що досліджує будову та функції еукаріотичних та прокаріотичних клітин, процеси та явища, які протікають у клітинах та забезпечують їх існування. «Загальна цитологія» є обов'язковою дисципліною для здобувачів спеціальності 091 «Біологія та біохімія» всіх форм навчання, що навчаються на біологічному факультеті Одеського національного університету імені І. І. Мечникова. Загальний обсяг лабораторних занять складає 16 академічних годин.

Унікальне становище клітини як одиниці життя диктує важливість засвоєння основ «Загальної цитології» для створення якісного фундаменту, що сприяє розумінню здобувачами фактично усіх дисциплін біологічного напрямку. Формування якісного зв'язку між теоретичними відомостями та застосуванням цієї інформації у практичній царині має вирішальне значення для підготовки будь-якого спеціаліста біологічного профілю. Тому виконання лабораторних робіт є невід'ємною частиною навчального процесу, оскільки дозволяє перевірити розуміння студентами теоретичних знань та вміння використати їх у практичній діяльності. Так, серед найважливіших навичок, якими повинен володіти біолог, є вміння працювати з мікроскопічною технікою, виготовляти та аналізувати біологічні препарати тощо. Протоколи лабораторних робіт, представлені в посібнику, допоможуть студентам отримати необхідні вміння та знання про будову та функціонування клітин, і відповідно, розуміти важливі аспекти будови та функцій живих клітин.

Методичні вказівки містять інструкції для проведення 8 лабораторних занять у вигляді детальних протоколів з прикладами виконання. Для кожного лабораторного заняття наведено тему, мету, перелік матеріалів та обладнання, а також перелік питань для контролю. Наприкінці видання наводиться список рекомендованої літератури та корисних інтернет-ресурсів, що можуть сприяти розширенню світогляду здобувачів та підвищенню якості засвоєння матеріалу.

СВІТЛОВА МІКРОСКОПІЯ У БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ. БІОЛОГІЧНІ ПРЕПАРАТИ

Теоретичні відомості

Мікроскоп – оптичний прилад, який використовується для візуальних спостережень, фотографії та точних кількісних вимірів. Цей прилад дозволяє отримати збільшене та зворотне зображення мікрооб'єкта.

В залежності від типу призначення та методу дослідження мікроскопи можуть бути спрощеними, робочими, дослідницькими, універсальними та ін. Мікроскопи бувають різні, але всі вони мають однаковий план будови: механічну і оптичну частини (рис. 1).

До **механічної частини** мікроскопа відноситься його **штатив з основою (1)** і **колонкою** (коробкою з механізмом мікрометричного фокусування) **(2)**, **тубус** (мономолекулярна насадка) – **(3)** з **голівкою (4)**, яка з'єднує тубус і **револьвер (5)**, що утримує об'єктиви. Частина штатива, яку називають **тубусотримач (6)**, також містить механізм макрометричного фокусування. Рухливий **предметний столик (7)** призначений для розміщення препаратів, має лапки для фіксування препарату і маленькі гвинти для його пересування. На **штативі** знаходяться гвинти грубого (**макрогвинт**) – **(8)** і точного (**мікрогвинт**) – **(9)** налаштування, які керують коробкою мікромеханізму. У деяких моделей мікроскопу мікрогвинт розташовано у основі. На колонці також знаходиться **гвинт конденсору – (10)**, за допомогою якого регулюють інтенсивність освітлення.

Оптична частина мікроскопа поділяється на два вузли – **оптичну та освітлювальну системи**.

Освітлювальна система призначена для освітлення препарату і складається з **конденсора – (11)** і **дзеркала – (12)** (або іншого джерела освітлення), яке розташоване під конденсатором і направляє в нього світло. В залежності від методу мікроскопії, для якого налаштований даний прилад, конденсор може бути світлопольним, темнопольним або призначеним для спостережень за методом фазового контрасту тощо.

Конденсор складається із лінз(и), ірисової діафрагми та підтримки для світлофільтрів. Важливо пам'ятати, що при роботі зі слабкими об'єктивами конденсор опускають, з сильними – піднімають. За допомогою ірисової діафрагми регулюють світловий потік. Використання світлофільтрів допомагає робити зображення більш чітким, контрастувати його. При використанні у якості джерела освітлення дзеркала необхідно пам'ятати, що його пласка сторона призначена для роботи зі слабкими об'єктивами, без конденсора і при доброму освітленні, а увігнута сторона використовується з сильними об'єктивами і при слабкому

освітленні. Часто дзеркало може бути замінено на **точкове джерело світла**, яке складається із власне освітлювача та реостата для регуляції інтенсивності світлового потоку.

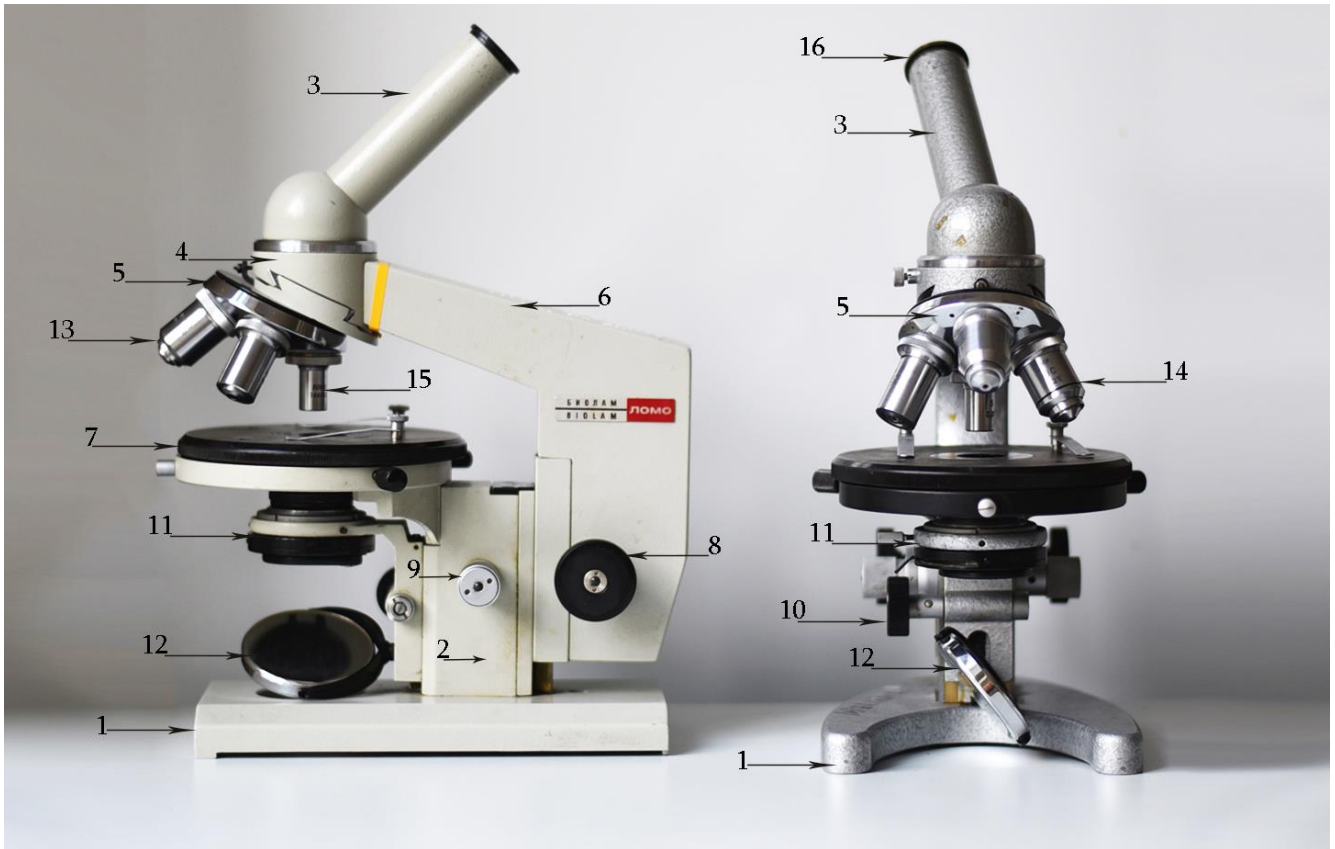


Рис. 1. Будова робочих мікроскопів Біолам і МБР (пояснення у тексті)¹

До складу **оптичної системи** входять **об'єктиви** – (13, 14, 15) і **окуляр** – (16) разом з тубусом. Окуляр побудований значно простіше об'єктива, складається тільки з двох лінз і дає уявне збільшене зображення. Об'єктиви є найбільш важливою частиною оптичної системи мікроскопа. Сучасні об'єктиви є складними багатолінзовими конструкціями; від їх якості в основному і залежить зображення об'єкта. Неякісні лінзи в об'єктивах можуть привести до аберацій (спотворення зображення об'єкта): зображення може виявитися розмазаним, викривленим або виникнути хроматизм положення – зображення різних кольорів розташовуються на неоднаковій відстані. Об'єктив дає геометрично подібне об'єкту збільшене зображення зі зворотнім розташуванням частин по відношенню до препарату.

Об'єктиви поділяються на **сухі** (середовище між об'єктивом і покривним скельцем – повітря) і **імерсійні** (такі, що потребують певного рідкого середовища між фронтальною лінзою об'єктива і покривним склом або препаратом. На оправі імерсійних об'єктивів є канавки різних кольорів в залежності від виду імерсії.

¹ Тут і далі використовуються власні зображення укладача, окрім тих рисунків, для яких вказане джерело походження

Масляна імерсія – «МИ» або канавка чорного кольору (14)

Водяна імерсія – «ВИ» або канавка білого кольору

Гліцерінова імерсія – «ГИ» або канавка жовтого кольору.

Важливо знати, що якість об'єктивів визначається не їх збільшенням, а їх роздільною здатністю. **Роздільна здатність** – це мінімальна відстань, на якій оптика мікроскопа здатна розрізнити окремо дві близько розташовані точки.

Для чіткого відокремлення двох точок, що не здатні світитися самостійно (таких, що освітлені ззовні прямим світлом) можна використовувати формулу

$d = \frac{\lambda}{A}$. При дослідженні об'єктів, що світяться самі, формула має наступний

вигляд: $d = \frac{0.61\lambda}{A}$. Роздільна здатність залежить від **довжини хвилі** λ і числової, або нумеричної **апертури** A .

Апертура – здатність оптичної системи сприймати ту чи іншу кількість світла; її визначають за формулою: $A = n \cdot \sin \alpha$, где n – показник заломлення середовища між фронтальною лінзою об'єктива і покривним склом, а α – половинний кут вхідного отвору об'єктива. Числове значення апертури вказують на об'єктиві. Якісні сухі об'єктиви можуть мати A , яка дорівнює 0,95, імерсійним властиві більш високі значення A за рахунок того, що показники заломлення рідини мають значення більше одиниці. Найвищі апертури мають олійно-імерсійні об'єктиви ($A=1,4$).

При освітленні звичайним світлом ($\lambda \sim 555$ нм) і використанні об'єктива з високою апертурою ($A = 1,4$) найменший діаметр видимих часток складає 0,24 мкм; зменшуючи довжину хвилі світла, можна покращити роздільну здатність мікроскопа і побачити ще менші частки.

Збільшення об'єктива також вказано на його оправі, наприклад, 8×, 40×, 90×. Відповідно, апертури цих об'єктивів будуть дорівнювати 0,20, 0,65 і 1,25.

Загальне збільшення мікроскопа визначають: $V = V_{об} \cdot V_{ок}$

Корисне збільшення мікроскопа вираховується так:

$$V_{корисне} = 500 A$$

Кожен об'єктив характеризується величиною **фокусної робочої відстані** (відстань від препарату до кінцевої лінзи у об'єктиві) у мм. Чим більше збільшення об'єктива, тим меншою у нього буде фокусна відстань. Так, для об'єктива зі збільшенням 8× робоча відстань буде дорівнювати ~14 мм, а для об'єктива 40× ~ 0,6 мм.

При роботі з мікроскопом важливе значення має товщина покривних і предметних скелець. Цитолог зазвичай працює з типовими предметними (завтовшки 1,2 мм) і покривними скельцями (0,17 мм).

При роботі (дослідженні, вивченні) з біологічними об'єктами на клітинному рівні дослідник стикається з необхідністю зробити мікроскопічні препарати самостійно. Нижче наведені стислі відомості про типи і методики виготовлення мікроскопічних препаратів.

За **типом зберігання** препарати можна поділити на дві великі категорії – **тимчасові** і **постійні** мікропрепарати. Біологічні об'єкти на постійних мікропрепаратах заключені у прозоре середовище, яке із часом твердіє і зверху покриті покривним склом. Вони можуть зберігатися дуже довго, роками і десятиріччями. На тимчасових препаратах біологічні об'єкти занурені у рідке середовище; час їх придатності вимірюється годинами, але з ними можна проводити досліди (наприклад, додавати реактиви, барвники тощо).

Якщо на препараті представлений організм повністю, або його невелика частина (листок, ротовий апарат комахи), такий препарат має назву **тотальний**.

За **типом об'єкта** мікропрепарати можна поділити на дві категорії: якщо досліджуваний об'єкт залишається у живому стані, то такі препарати називають **вітальними** (прижиттєвими) (рис 2). Проте у переважній більшості випадків, перш ніж приступити до вивчення об'єкта, його необхідно піддати фіксації.

Фіксація – це швидка консервація клітин в спеціальних розчинах отруйних реактивів, які незворотно переривають життєві процеси у клітині. При цьому колоїди протопласта переходять в нерозчинний стан (хімічна фіксація). Фізичній фіксації піддають об'єкти за допомогою термічної обробки, нагріваючи або заморожуючи їх. При певних методиках виготовлення препаратів об'єкти перед хімічною фіксацією піддають спеціальній обробці, яка необхідна для кращого виявлення тих чи інших структур на препараті.

Кожен фіксатор має своє призначення. Надзвичайно важливо вибрати той фіксатор, який, вбиваючи клітину, зовсім або не сильно деформує її прижиттєву структуру і відповідає цілям дослідження.

Найчастіше фіксатор – суміш реактивів, кожен з яких рідко використовується окремо завдяки односторонності своєї дії. Часто до складу фіксаторів входять розчинники (хлороформ, ацетон, різні спирти). Найчастіше використовують етанол та метанол (він дешевше, проте отруйний). Етанол має нейтральну реакцію, осаджує нуклеїнові кислоти, альбуміни, глобуліни, але розчиняє ліпоїди, викликає деформацію та розриви структур клітини, сильне зморшкування і затвердження тканин. Фіксатори готують або на спирті або на дистильованій воді безпосередньо перед використанням.

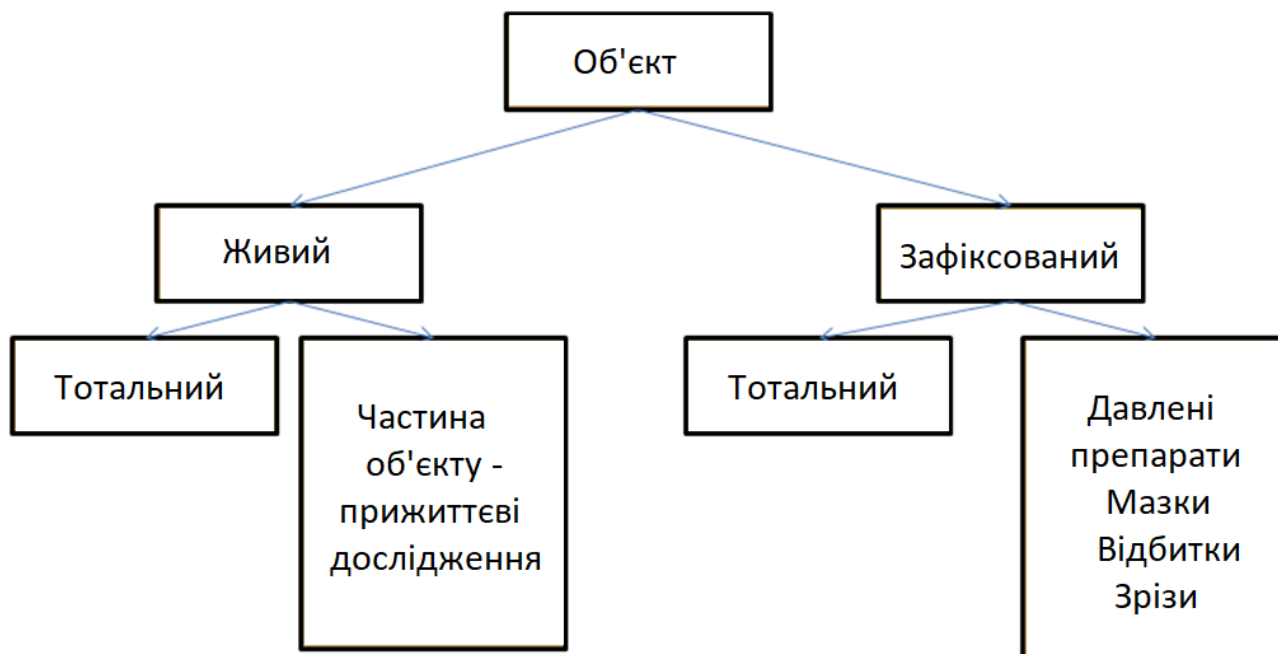


Рис. 2. Класифікація мікропрепаратів за типом об'єкта

Спиртові фіксатори швидко проникають в тканину (час фіксації від 30 хвилин до 12 годин). Вони більш грубі за своєю дією, ніж водні, їх можна готувати заздалегідь, вони більш стійкі. Водні фіксатори діють м'якше, в них об'єкти витримують протягом доби і більше. Детальніше про склад простих, проте ефективних фіксаторів можна дізнатися у додатку 4.

При фіксації необхідно дотримуватися наступних принципів:

- Об'єм рідини для фіксації повинен в 50-100 разів перевищувати об'єм матеріалу.
- Фіксують тільки свіжі об'єкти. Непотрібні частини великих об'єктів (пелюстки, ості і т. п.) видаляють до фіксації
- Час фіксації краще підбирати відповідно до об'єкта (його розміру, походженню тощо).

Із зафіксованих об'єктів можна виготовити як тимчасові, так і постійні мікротомні мікропрепарати.

Виготовлення постійних мікротомних препаратів складається із тривалої процедури, яка включає в себе особливий етап – заключення м'якого біологічного об'єкта у тверде середовище (наприклад, лабораторний парафін або спеціалізовані смоли), яке просочує об'єкт повністю і дозволяє отримати дуже тонкі зрізи – від 25 до 5 мкм завтовшки. Дуже стисло процедуру виготовлення постійних препаратів можна описати наступним чином:

1. Підготовка об'єктів до фіксації.
2. Фіксація об'єктів.
3. Повне збездвоження об'єктів за допомогою серії розчинів етилового спирту.
4. Просочування об'єктів розчинниками твердого середовища (хлороформ, ксилол чи ін. розчинники парафіну).
5. Просочування об'єктів парафіном.
6. Заливання досліджуваного матеріалу в парафін – виготовлення так званих «пряників».
7. Виготовлення блоків із об'єктів, просочених парафіном.
8. Отримання тонких серійних зрізів за допомогою спеціального приладу – мікротома.
9. Наклеювання тонких парафінових зрізів на предметне скло – формування препарату.
10. Видалення парафіну із зрізів ксилолом, ксилолу – етиловим спиртом, а спирту – дистильованою водою.
11. Забарвлення препаратів за обраною методикою забарвлення.
12. Заключення забарвлених зрізів у канадський бальзам або інше середовище.
13. Етикетування препаратів.

Виготовлення тимчасових препаратів є значно простішим. Залежно від типу об'єкта розрізняють такі типи тимчасових препаратів – мазки, зрізи, відбитки, давлені препарати та їх різновиди.

Препарати-**мазки** зазвичай готують із рідких тканин, наприклад, крові. Невелику краплину досліджуваної рідини наносять на предметне скло, чистим шліфованим склом обережно торкаються краплини, і проводять по поверхні предметного скла, «розмазуючи» рідину. Грубі препарати-**зрізи**, виготовлені вручну, без застосування мікротомів, є придатними для приблизного аналізу структур органів і тканин; бувають поздовжними та поперечними. Ще один тип препарату, який дозволяє вивчати рельєф поверхні непрозорого біологічного об'єкта – це **репліка**. Для отримання репліки на поверхню об'єкта наносять тонкий шар прозорої речовини (можна навіть використовувати прозорий лак для нігтів), чекають висихання – утворення плівки) і відокремлюють його від об'єкта. Отриману таким чином репліку поверхні досліджують під мікроскопом. Препарати-**відбитки** готують шляхом доторкання (впродовж 1–2 секунд) чистого предметного скла до досліджуваної тканини чи органа. Після нанесення препарату на скло його зазвичай висушують, фіксують, при необхідності забарвлюють і піддають аналізу. Особливістю виготовлення **давлених** препаратів є роздавлювання підготовлених біологічних об'єктів між предметним і покривним скельцями безпосередньо перед аналізом препарату. Метою роздавлювання є отримання моношару клітин, що полегшує їх аналіз.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 1

Налаштування мікроскопа для дослідження біологічних об'єктів

Мета роботи: ознайомитися з правилами налаштування світлопольного біологічного мікроскопа та отримати навички аналізу мікропрепаратів.

Матеріали та обладнання:

Мікроскопи біологічні.

Набори постійних мікропрепаратів біологічних об'єктів.

Завдання 1. Засвоїти принципи налаштування світлопольного біологічного мікроскопа. Розрахувати загальне і корисне збільшення для кожного з наявних об'єктивів та окуляра.

Хід роботи:

1. Переносити мікроскопи можна лише двома руками – однією рукою тримають за підшву мікроскопу, а другою притримують його за тубусотримач. Мікроскоп розташовують ближче до лівого плеча, з тим, щоб правою рукою було зручно робити малюнки в робочому зошиті.
2. Уважно роздивіться мікроскоп, запам'ятайте розташування та назви вузлів оптичної системи, визначте загальне збільшення і корисне збільшення мікроскопу для різних об'єктивів
3. Для налаштування освітлення необхідно встановити (відцентрувати) на револьвері мікроскопа об'єktiv малого збільшення. Після цього, дивлячись в окуляр, необхідно повертати дзеркало у напрямку променів світла, добиваючись максимально рівномірного і яскравого освітлення поля зору.
4. Препарат кладуть на предметний столик мікроскопу покривним склом наверх і розташовують так, щоб об'єкт, призначений для розгляду, знаходився точно під об'єktivом малого збільшення.
5. Дивлячись на препарат збоку, опускають об'єktiv за допомогою макрогвинта так, щоби відстань між фронтальною лінзою об'єктива малого збільшення і покривним склом була приблизно 1 см. Потім, дивлячись в окуляр, за допомогою макрогвинта підіймають об'єktiv до появи чіткого зображення препарату. На цьому етапі зручно регулювати освітлення за допомогою конденсора.
6. Для переведення на велике збільшення необхідно змінити об'єktiv шляхом обертання револьвера. Відцентрувавши об'єktiv великого збільшення (коли об'єktiv стане на місце, почуєте клацання), дивлячись збоку, максимально опустіть об'єktiv вниз, так, щоб відстань між фронтальною лінзою об'єктиву і покривним склом була меншою за 1 мм. Переконавшись у цьому, переводять

погляд в окуляр і повільно підіймають тубус вгору до появи чіткого зображення. При необхідності регулюють освітлення за допомогою конденсора. Важливо пам'ятати, що мікрогвинт не потрібно повертати більше, ніж на півоберта – він призначений для дуже точного налаштування.

7. Для роботи з імерсійним олійним об'єктивом необхідно зсунути об'єктив великого збільшення, на поверхню покривного скла нанести краплину спеціальної мінеральної імерсійної олії і обертом револьверу встановити імерсійний об'єктив. Він повинен зануритися у олійну краплю. Іноді олійну краплину наносять і на лінзу об'єктива. Робоча відстань імерсійного об'єктива складає 0,6 мм, тому налаштування його потрібно проводити особливо обережно, для уникнення пошкодження лінзи об'єктива і препарату. Важливо пам'ятати, що після закінчення роботи з імерсійним об'єктивом, необхідно протерти його спочатку сухою, а потім змоченою у етиловому спирті серветкою.
8. Після закінчення роботи мікроскоп переводять на мале збільшення, а потім у неробочий стан.

Завдання 2. Розглянути у мікроскоп постійні мікропрепарати рослинних і тваринних об'єктів. Знайти загальні і відмінні риси клітин різного походження

Хід роботи

1. Налаштувавши мікроскоп на мале, а потім велике збільшення, роздивитися постійні мікропрепарати рослинних об'єктів із запропонованого набору. Необхідно уважно роздивитися обраний рослинний об'єкт, замалювавши його у зошит на великому і на малому збільшенні. На малюнках необхідно знайти і позначити усі компоненти рослинних клітин, які можна розгледіти і ідентифікувати при даних збільшеннях. При можливості студенти можуть сфотографувати препарати, використовуючи власні смартфони (рис. 2, 3). В залежності від типу та якості камери смартфона зображення можуть різнитися, проте майже завжди можна отримати більш-менш якісну світлинку. Звичайно, фотографії, зроблені таким чином, не є придатними для проведення цитометричних досліджень та цитологічного аналізу, проте вони надають чудову можливість зафіксувати зображення об'єкта під мікроскопом.

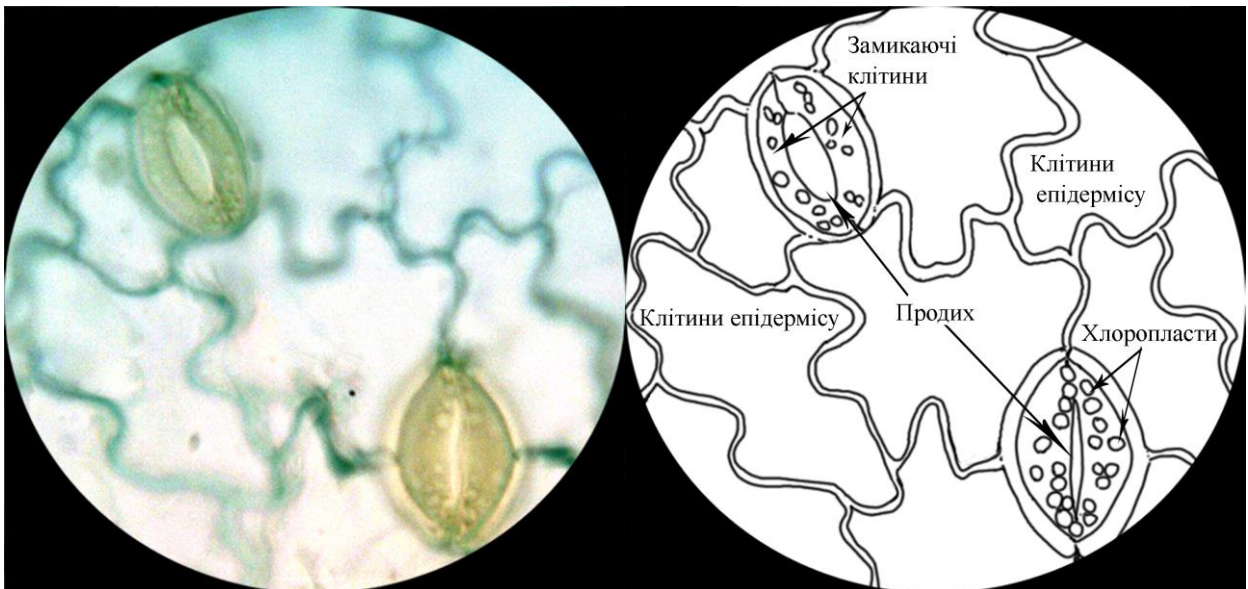


Рис. 3. Приклади виконання завдання 1 лабораторної роботи № 1

2. За тим же принципом роздивитися постійні мікропрепарати тваринних об'єктів із запропонованого набору. Необхідно уважно роздивитися обраний препарат, замалювавши його у зошит на великому і на малому збільшенні і проаналізувавши зображення. При можливості студенти можуть сфотографувати препарати, використовуючи власні смартфони (рис. 4).

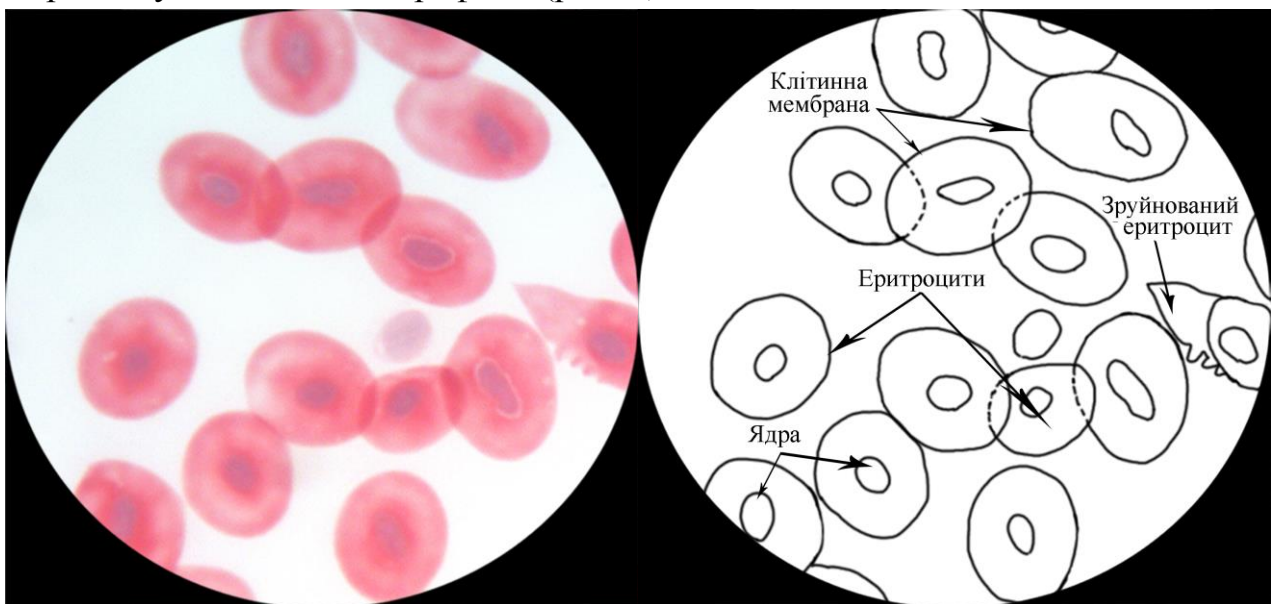


Рис. 4. Приклади виконання завдання 2 лабораторної роботи № 1

Завдання 3. Зробити висновок про спільні і відмінні риси будови рослинних і тваринних клітин.

Питання для контролю

1. Перелічіть відомі вам методи мікроскопії.
2. Назвіть головні вузли у будові світлового мікроскопа.
3. Як визначити якість оптичних систем?
4. Для дослідження яких об'єктів і процесів краще використовувати світлопольну мікроскопію?
5. Для дослідження яких об'єктів і процесів краще використовувати темнопольну мікроскопію?
6. Для дослідження яких об'єктів і процесів краще використовувати фазово-контрастну мікроскопію?
7. На яких принципах базована флуоресцентна мікроскопія?
8. Які переваги має метод конфокальної мікроскопії?
9. Наведіть алгоритм роботи з універсальним світлопольним мікроскопом.

Перелік рекомендованої літератури

1. Варенюк І. М., Держинський М. Е. Методи цито-гістологічної діагностики: навчальний посібник. Київ: Інтерсервіс, 2019. 256 с.
2. Ликова І. О. Лабораторний практикум з загальної цитології: навчальний посібник. Харків, 2017. 56 с.
3. Білий Р. О., Ковалишин В. І., Челпанова І. В., Єлісеєва О. П., Балущ Л. В., Наконечна О. В., Ященко А. М., Луцик О. Д. Цитологія, ембріологія та загальна гістологія: навчальний посібник-атлас. Львів: Кварт, 2017. 59 с.
4. MicroscopyU: The source for microscopy education.
URL: <https://www.microscopyu.com>: (дата звернення 22.08.2023)

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

Виготовлення тимчасових мікропрепаратів біологічних об'єктів

Мета роботи: ознайомитися з методикою виготовлення різних типів тимчасових мікропрепаратів для дослідження представників еукаріот (царства Рослини, Тварини, Гриби) і прокаріот (ціанобактерії).

Матеріали та обладнання:

Мікроскопи біологічні.

Предметні і покривні скельця.

Крапельниці з водою.

Вітальний барвник – водний розчин метиленового синього.

Пінцети.

Препарувальні голки.

Фільтрувальний папір.

Біологічні об'єкти (тваринні, рослинні, плісняві гриби, синьо-зелені водорості (ціанобактерії)).

Завдання 1. Виготовити тимчасовий давлений препарат клітин слинних залоз личинки дрозофіли *Drosophila melanogaster*.

Хід роботи:

1. Підготувати предметне скло, протерти його і нанести краплину фізіологічного розчину посередині, покласти всередину краплини личинку дрозофіли.
2. Обережно за допомогою пінцета і препарувальної голки виділити слинні залози личинки. Прибрати зайві тканини личинки.
3. Нанести краплину ацетоорсеїну (Додаток 3) і почекати 15 хвилин для кращого забарвлення тканини.
4. Обережно фільтрувальним папером відтягнути барвник, нанести на препарат краплину 45 % оцтової кислоти.
5. Тримаючи покривне скло під кутом до краплини, акуратно опустити його на залози.
6. Обережно тупим кінцем препарувальної голки постучати по препарату для розправлення клітин залоз.
7. Роздивитися препарат на малому 8× і великому 40× збільшенні.
8. Зробити замальовки та фотографії, позначити на рисунку окремі клітини слинних залоз та ядра. При фотографуванні слід використовувати велике збільшення мікроскопа.

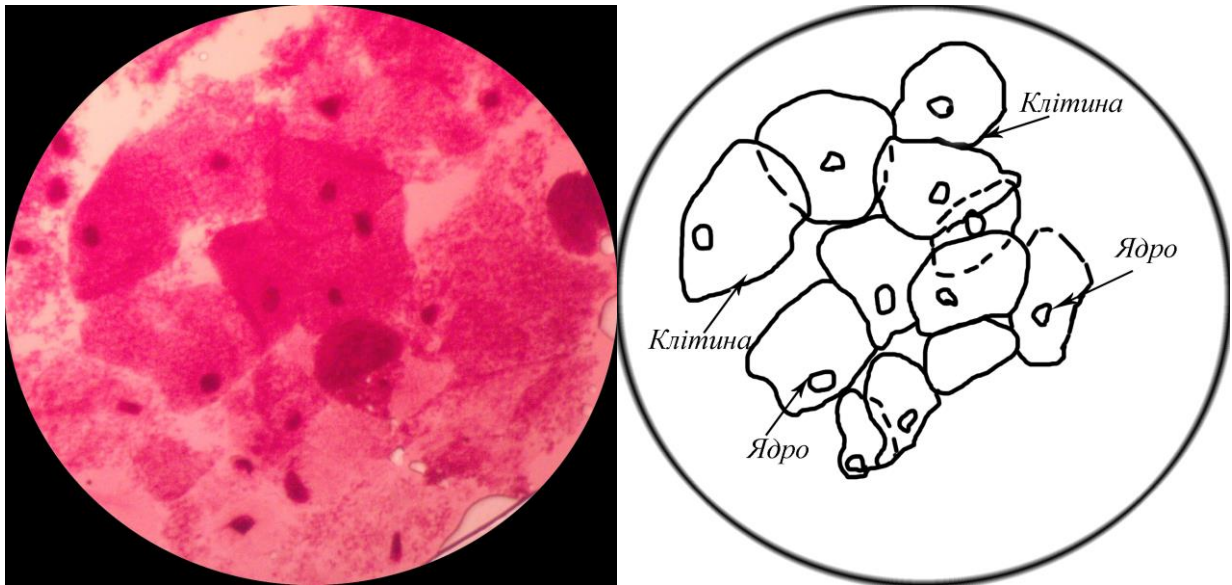


Рис. 5. Приклади виконання завдання 1 лабораторної роботи № 2

Завдання 2. Виготовити тимчасовий препарат ціанобактерій (синьо-зелених водоростей)

Хід роботи:

1. Підготувати предметне скло, протерти його і нанести краплину води посередині.
2. Обережно пінцетом взяти шматок талому печінкового моху або іншої водної рослини із акваріума зі стабільною біотою, розрівняти його і покласти у краплину води.
3. Тримаючи покривне скло під кутом до краплини води, акуратно опустити його на препарат.
4. Уважно розглянути поверхню рослини, шукаючи обростання – зеленими та синьо-зеленими водоростями.

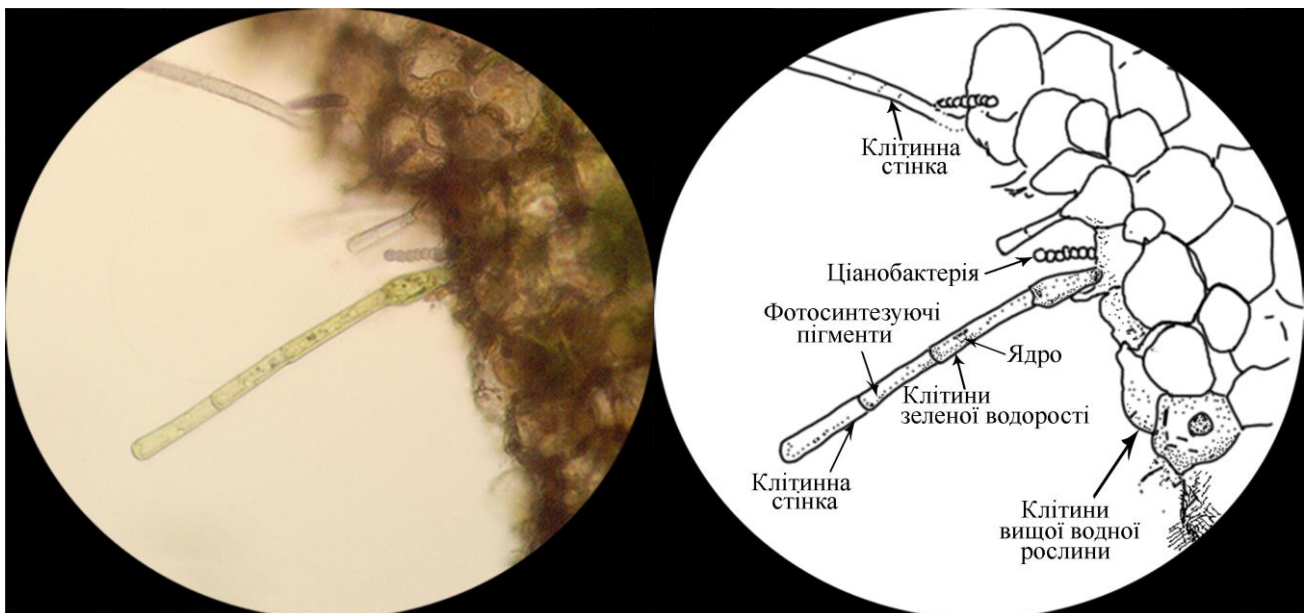


Рис. 6. Приклад виконання завдання 2 лабораторної роботи № 2

- Зробити замальовки та фотографії (40×), позначити на рисунку клітини, клітинну стінку, звернути увагу на відсутність оформленого ядра у клітинах.
- Порівняти будову клітин зелених водоростей (еукаріот) та ціанобактерій (прокаріот).

Завдання 3. Виготовити тимчасовий препарат вищої водної рослини *Ceratophyllum spp.*

Хід роботи:

- Підготувати предметне скло, протерти його і нанести краплину води посередині.
- Обережно пінцетом взяти листок куширу (*Ceratophyllum*), розрівняти його і покласти у краплину води.
- Тримаючи покривне скло під кутом до краплини води, акуратно опустити його на препарат.
- Зробити замальовки та фотографії (40×), позначити на рисунку клітини, хлоропласти, ядра, клітинні стінки, вакуолі.

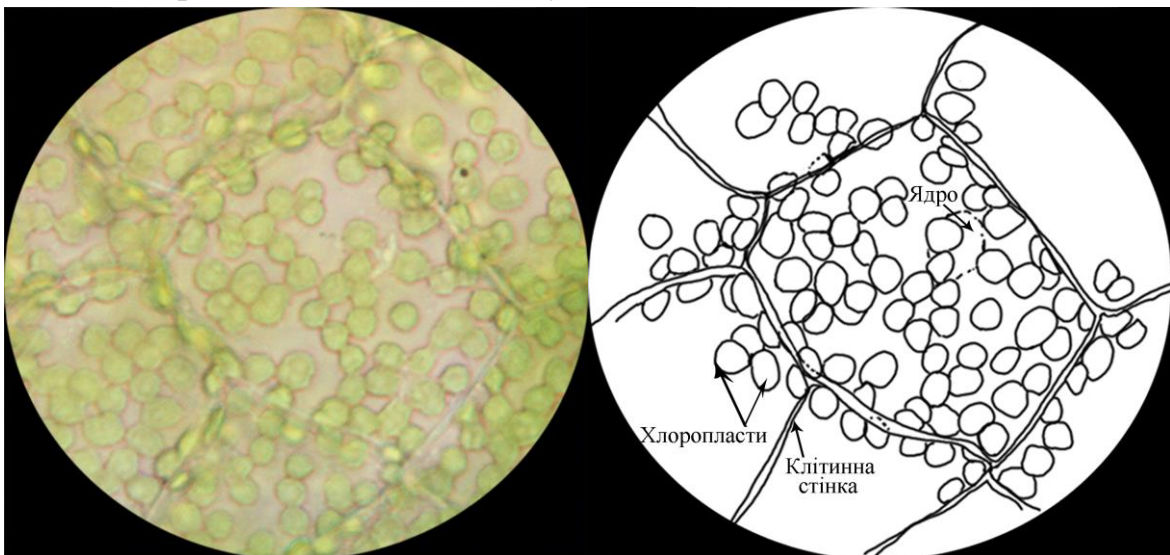


Рис. 7. Приклад виконання завдання 3 лабораторної роботи № 2

Завдання 4. Виготовити тимчасовий препарат пліснявих грибів *Aspergillus sp.*

Хід роботи:

- Підготувати предметне скло, протерти його і нанести краплину води посередині.
- Обережно пінцетом підхопити частину міцелію з ураженого цвіллю продукту і покласти у краплину води.
- Додати краплину метиленового синього. Прибрати залишки води і барвника фільтрувальним папером.
- Тримаючи покривне скло під кутом до забарвленого об'єкта, акуратно опустити його на препарат.

5. Зробити замальовки та фотографії (40×), позначити на рисунку гіфи міцелію, ядра, клітинні стінки, спори грибів тощо

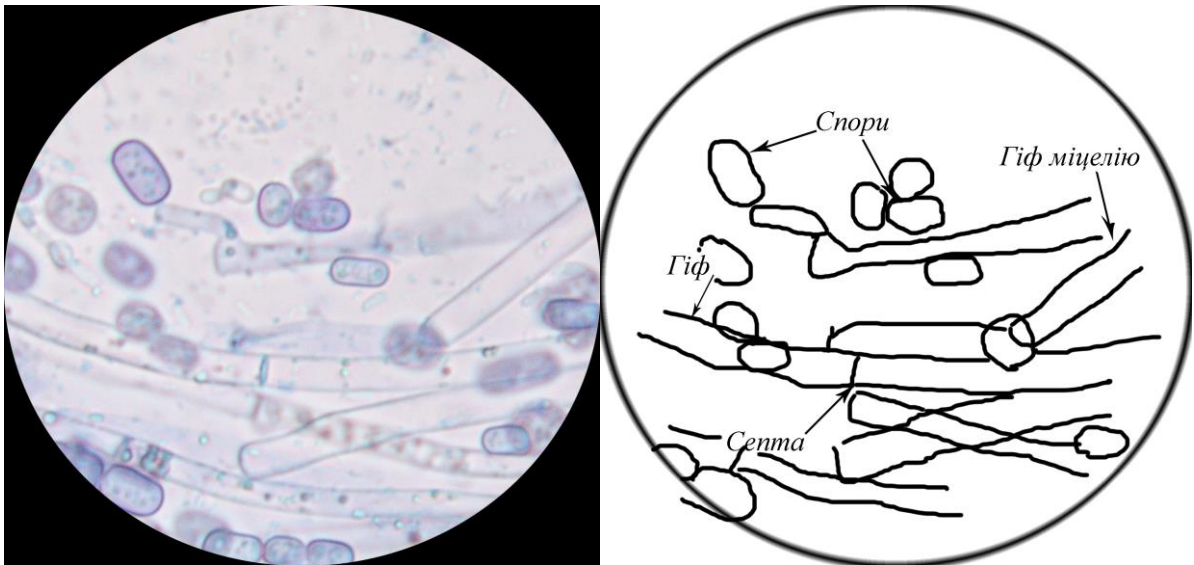


Рис. 8. Приклад виконання завдання 4 лабораторної роботи № 2

Завдання 5. Виготовити препарат-репліку поверхні листа покритонасінної рослини

Хід роботи:

1. Підготувати лист *Sansevieria sp.* На поверхню листа прикріпити невеличку смугу скотчу (прозорої липкої стрічки).
2. Обережно нанести товстий шар прозорого лаку для нігтів так, щоб шар лаку починався на стрічці скотчу. Дочекатися висихання лаку.
3. Пінцетом підчепити скотч і зняти шар лаку. Покласти його на предметне скло тією стороною, яка була звернута до поверхні листа і обережно розправити отриману плівку.

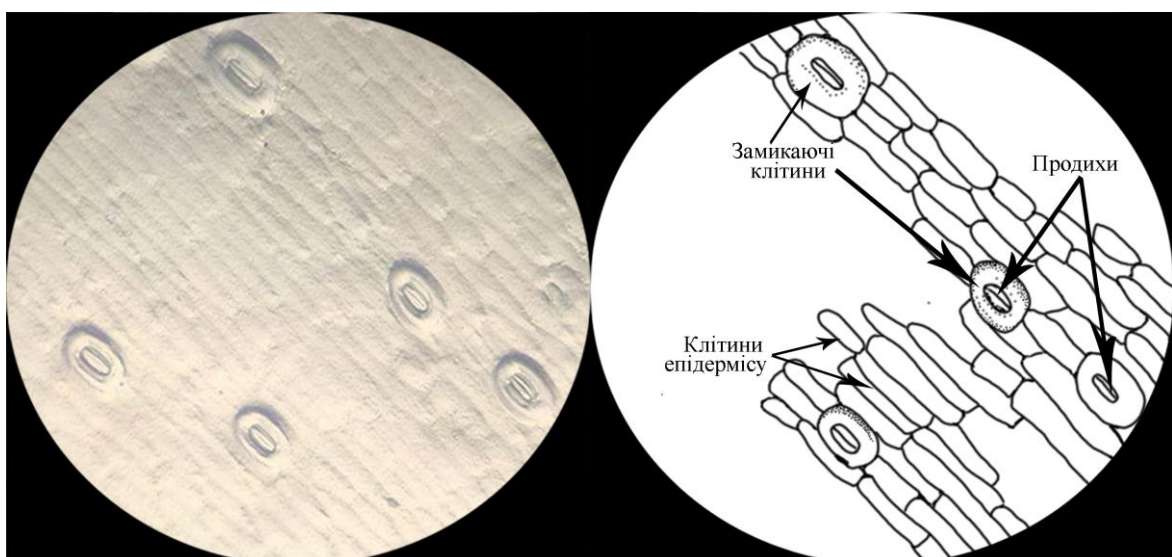


Рис. 9. Приклад виконання завдання 5 лабораторної роботи № 2

4. Зробити замальовки та фотографії (8×), позначити на рисунку клітини епідермісу, продихи, замикаючі клітини продихів тощо.
5. Підрахувати кількість продихів у полі зору, звернути увагу на взаємне розташування продихів та жилок листя.

Завдання 6. Зробити узагальнюючий висновок про структури клітини, які можна спостерігати у світловий мікроскоп при малому (8×) та великому (40×) збільшенні.

Питання для контролю

1. Для чого застосовують фіксацію у цитологічних дослідженнях?
2. Назвіть відомі вам типи фіксаторів та надайте їх характеристику.
3. Назвіть принципи фіксації біологічних об'єктів.
4. Наведіть класифікацію барвників, які використовують у мікроскопії.
5. Охарактеризуйте зв'язок між фіксатором і барвником.
6. Що мають на увазі під поняттям «кількісний барвник»?
7. Які типи тимчасових біологічних препаратів ви знаєте?
8. Дайте порівняльну характеристику тимчасових і постійних препаратів.
9. Перелічіть етапи виготовлення постійних мікропрепаратів.

Перелік рекомендованої літератури

1. Варенюк І. М., Держинський М. Е. Методи цито-гістологічної діагностики: навчальний посібник. Київ: Інтерсервіс, 2019. 256 с.
2. Держинський М. Е., Скрипник Н. В., Гарматіна С. М., Островська Г. В., Варенюк І. М., Пустовалов А. С., Вороніна О. К., Пазюк Л. М., Бузинська Н. О. Загальна цитологія та гістологія. Частина І: Загальна цитологія: навчальний посібник. К. : Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2006. 275 с.
3. Ликова І. О. Лабораторний практикум з загальної цитології: навчальний посібник. Харків, 2017. 56 с.
4. Білий Р. О., Ковалишин В. І., Челпанова І. В., Єлісеєва О. П., Балуш Л. В., Наконечна О. В., Яценко А. М., Луцик О. Д. Цитологія, ембріологія та загальна гістологія: навчальний посібник-атлас. Львів: Кварт, 2017. 59 с.
5. MicroscopyU: The source for microscopy education.
URL: <https://www.microscopyu.com>: (дата звернення 22.08.2023)

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

Визначення статевого хроматину людини. Проведення мікроядерного тесту букального епітелію

Обладнання:

Мікроскопи біологічні.
Одноразові шпатель.
Етиловий спирт 96 %.
Марлеві серветки.
Фільтрувальний папір.
Рутинний барвник ацетокармін.
Препарувальні голки.
Предметні і покривні скельця.

Мета роботи: навчитися робити препарат булакального епітелію та оволодіти навичками цитологічного аналізу з метою біологічного моніторингу, аналізувати препарат під мікроскопом; підраховувати кількість клітин, що мають статевий хроматин або аномалії ядерної будови.

Завдання 1. Виготовити тимчасовий давлений препарат клітин булакального епітелію слизової оболонки щоки людини. Провести тест на наявність статевого хроматину.

Хід роботи:

1. Підготувати предметне і покривне скельця, ретельно протерти їх, особі-піддослідному необхідно прополоскати рота.
2. Одноразовим шпателем зробити обережний швидкий ковзаючий рух по внутрішній слизовій оболонці щоки – провести зішкріб.
3. Отриманий матеріал перенести на предметне скло і зробити тонкий мазок, обережно розподіливши біологічний матеріал.
4. На мазок капнути краплю рутинного барвника і накрити покривним склом. Зверху покласти шар фільтрувального папера і злегка натиснути пальцем протягом декількох секунд. Видалити залишки фарби, не допускаючи зрушення покривного скла.
5. Вивчення препарату проводити під світловим мікроскопом на великому збільшенні. На препараті статевий хроматин видно у вигляді тільця Барра, забарвленого у темний колір, яке може бути оточене більш світлим ореолом. Розмір його близько 1 мкм. Найчастіше тільце Барра розташоване під ядерною мембраною, на периферії ядра. Форма статевого хроматину може бути овальною або трикутною, рідше іншою.

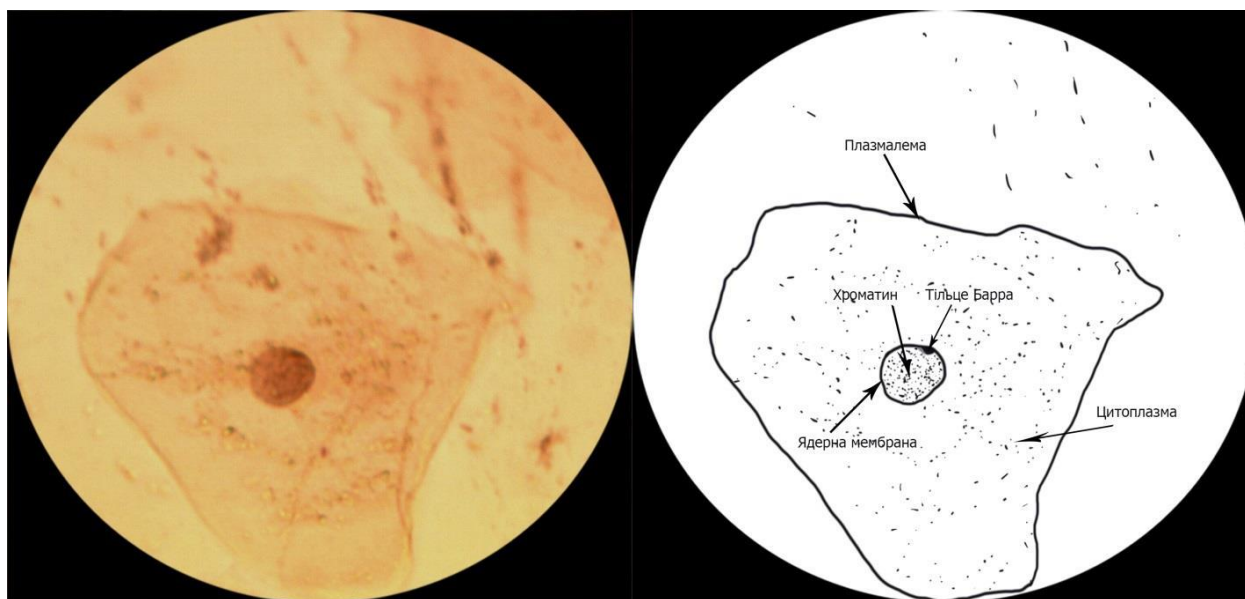



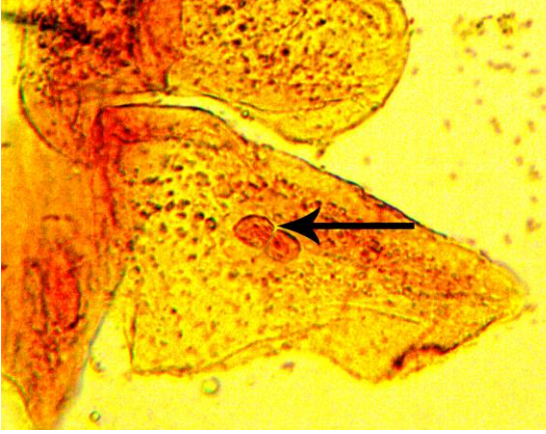


Рис. 10. Приклади виконання завдання 1 лабораторної роботи № 3

6. У нормі статевий хроматин визначається в середньому у 30 % клітин жінок. Тому необхідно переглянути кілька полів зору в різних місцях препарату і прорахувати не менше 50-70 ядер.
7. Зробити замальовки та фотографії, позначити на рисунках окремі клітини, ядра, ядерця та тільця Барра
8. Розрахувати відсоток клітин з тільцями Барра серед усіх досліджених клітин зразка.
9. Зробити висновок про наявність та частоту стривальності статевого хроматину у досліджуваному біологічному матеріалі.

Завдання 2. Проаналізувати тимчасовий давлений препарат клітин букального епітелію слизової оболонки на наявність ядерних аномалій епітеліоцитів.

1. Серед проаналізованих клітин-епітеліоцитів знайти зразки клітин з певними аномаліями ядер епітеліоцитів, визначити тип аномалії (категорії наведено у таблиці 1).
2. Заповнити таблицю частоти стривальності ядерних аномалій (у відсотках). Для цього необхідно підрахувати кількість клітин з ядерними аномаліями, розподіливши їх по категоріям (табл. 1) і визначити загальну кількість проаналізованих клітин.

Мікроядерний тест букального епітелію людини

| Зображення | Тип аномалії | Кількість |
|---|---------------------------|-----------|
|  | Клітина з мікроядром | |
|  | Ядро клітини з протрузією | |
|  | Ядро з насічкою | |
|  | Двоядерні клітини | |

Завдання 3. Зробити висновок про наявність, тип і частоту стривальності аномалій ядерної будови епітеліоцитів у досліджуваному біологічному матеріалі².

Питання для контролю

1. Що собою представляє статевий хроматин?
2. Яку будову має ядро еукаріотичної клітини?
3. Які аномалії ядерної будови вам відомі?
4. Що є предметом дослідження у цитогенетиці?
5. Поясніть що таке і для чого використовують цитологічний скринінг?
6. Розкажіть про використання цитологічних та цитогенетичних досліджень у сільськогосподарській, екологічній та медичній практиці.

Перелік рекомендованої літератури

1. Саляк Н. О. Практикум з медичної біології: навчальний посібник. 2-ге видання. К. : ВСВ «Медицина», 2015. 152 с.
2. Лановенко О. Г. Мікроядерний тест букального епітелію ротової порожнини людини та особливості його використання. Херсон, 2020.
URL: <http://bitly.ws/RzE6> (дата звернення 22.08.2023).
3. The Human MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol / S. Bonassi, E. Coskun, M. Ceppi et [al.]. *Mutation Research*. 2011. V.728, № 3. P. 88–97.
4. Evaluation of genotoxicity through micronuclei test in workers of car and battery repair garages /Martino-Roth M.G., Viégas J., Amaral M. et al. *Genet. Mol. Biol.* 2002. 25, 4. P. 495–500.
5. Increase in epithelial buccal cell micronuclei in students exposed to embalming solution vapor / Wunnapuk K., Ruangyuttikarn W., Anusri Y., Prapamontol T. *Chiang Mai Med. J.* 2008. 47, 3. P. 115– 123.

² Проведена спроба аналізу не має медичного значення, виконується у навчальних цілях

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

Ультроструктура еукаріотичних клітин

Мета роботи: ознайомитися з ультроструктурною будовою компонентів еукаріотичних клітин різної таксономічної належності.

Матеріали та обладнання

Набір електронномікроскопічних фотографій еукаріотичних клітин.

Завдання 1. Ознайомитися з наданим набором мікрофотографій еукаріотичних клітин, зроблених за допомогою різних методів електронної мікроскопії, з'ясувати елементи будови і навчитися визначати характерні риси різних складових клітинних систем. За необхідності зробити відповідні замальовки у робочих зошитах.

Біологічна мембрана

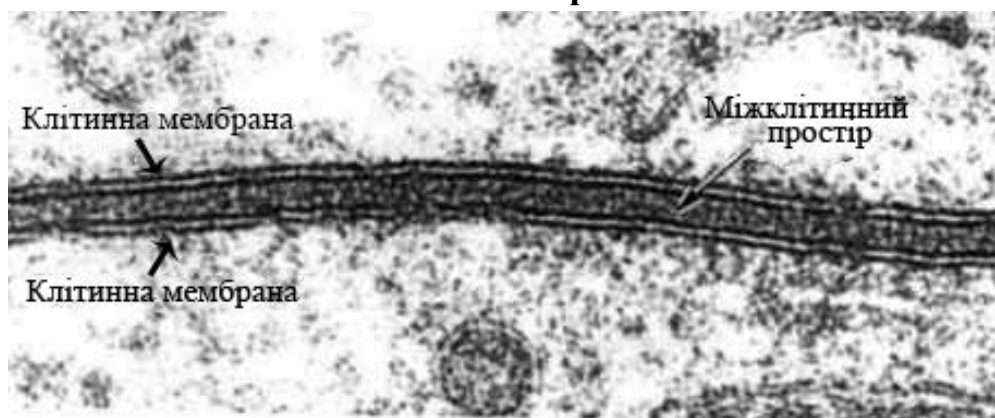


Рис. 11. Електронна мікрофотографія ділянок цитоплазматичної мембрани суміжних клітин (цит. за Bloom and Fawcett, A Textbook of Histology, Chapman and Hall, N.Y., 12th edition, 1994, Figure 1-2, з модифікаціями)

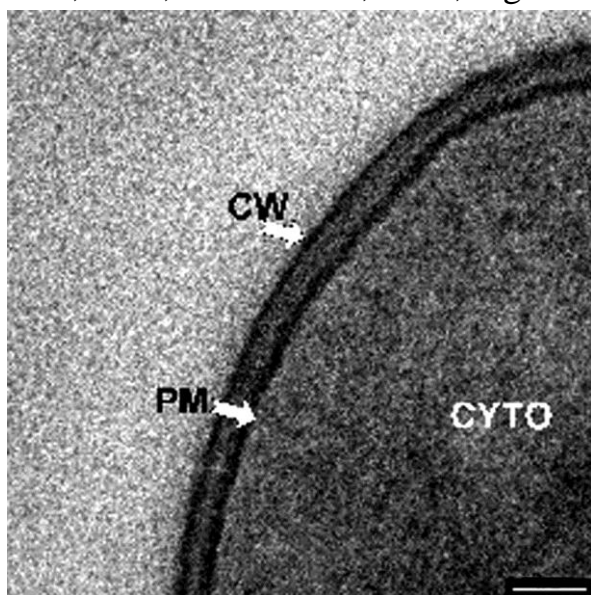


Рис. 12. Електронна мікрофотографія бактерії *S. aureus*, зроблена за допомогою трансмісійного електронного мікроскопу. CW – клітинна стінка, PM – плазматична мембрана. Шкала = 50 нм (цит. за А. Touhami, M. H. Jericho, Terry J. Beveridge Atomic Force Microscopy of Cell Growth and Division in *Staphylococcus aureus* <https://doi.org/10.1128/jb.186.11.3286-3295.2004>)

Вакуолярна система клітини

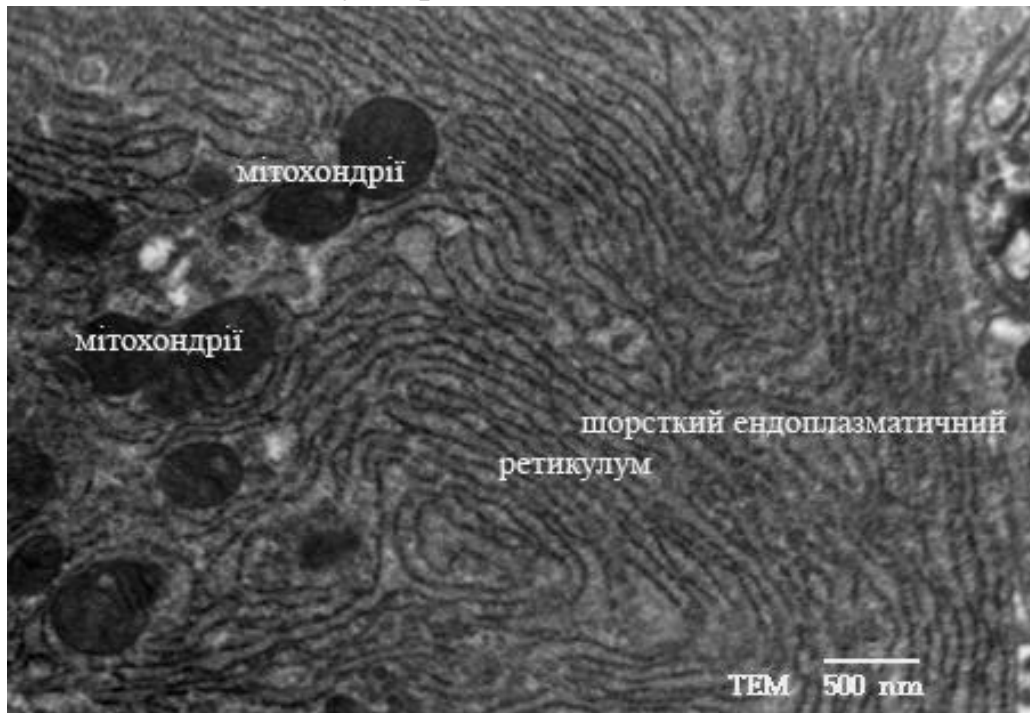


Рис. 13. Шорсткий ендоплазматичний ретикулум у клітинах Клара легень ссавця (автор – Louisa Howard; джерело – *Wikimedia Commons*, з модифікаціями, <https://bit.ly/3ezv0Vn>)

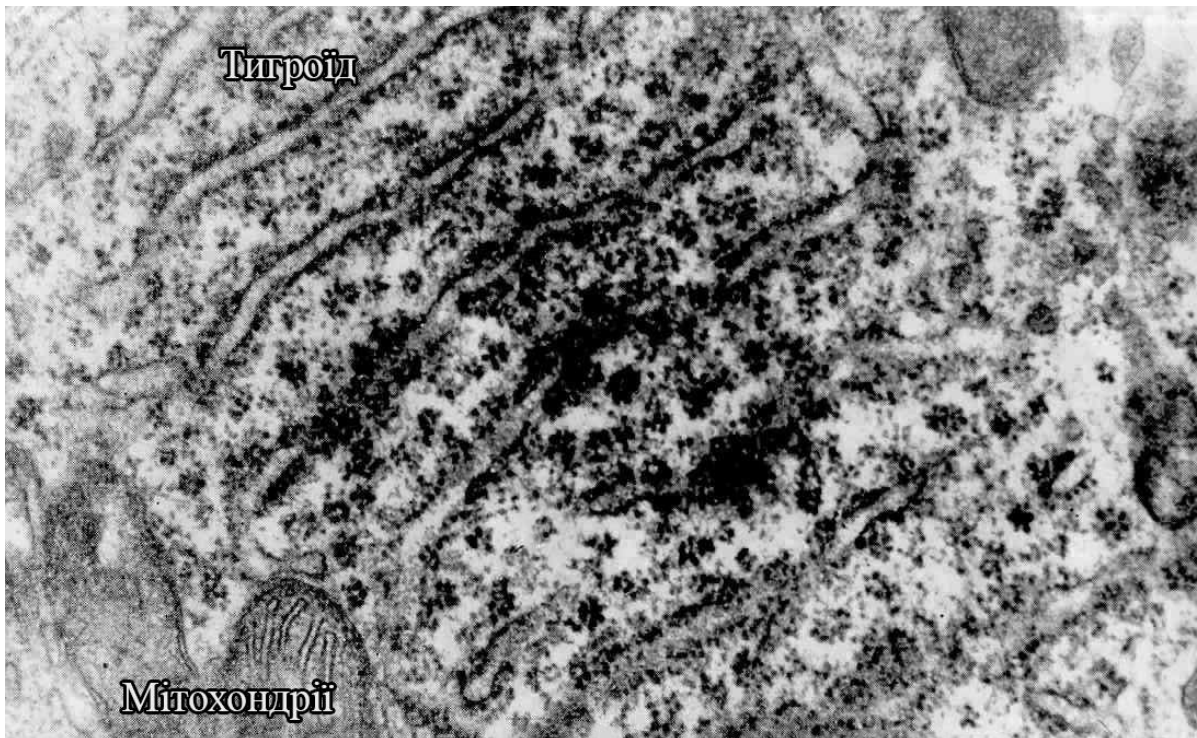


Рис. 14. Тигроїд або тільця Ніссля, або хроматофільна субстанція – специфічний компонент нервових клітин, який являє собою цистерни гранулярного ендоплазматичного ретикулуму (фото із архівів кафедри генетики і молекулярної біології ОНУ імені І. І. Мечникова)

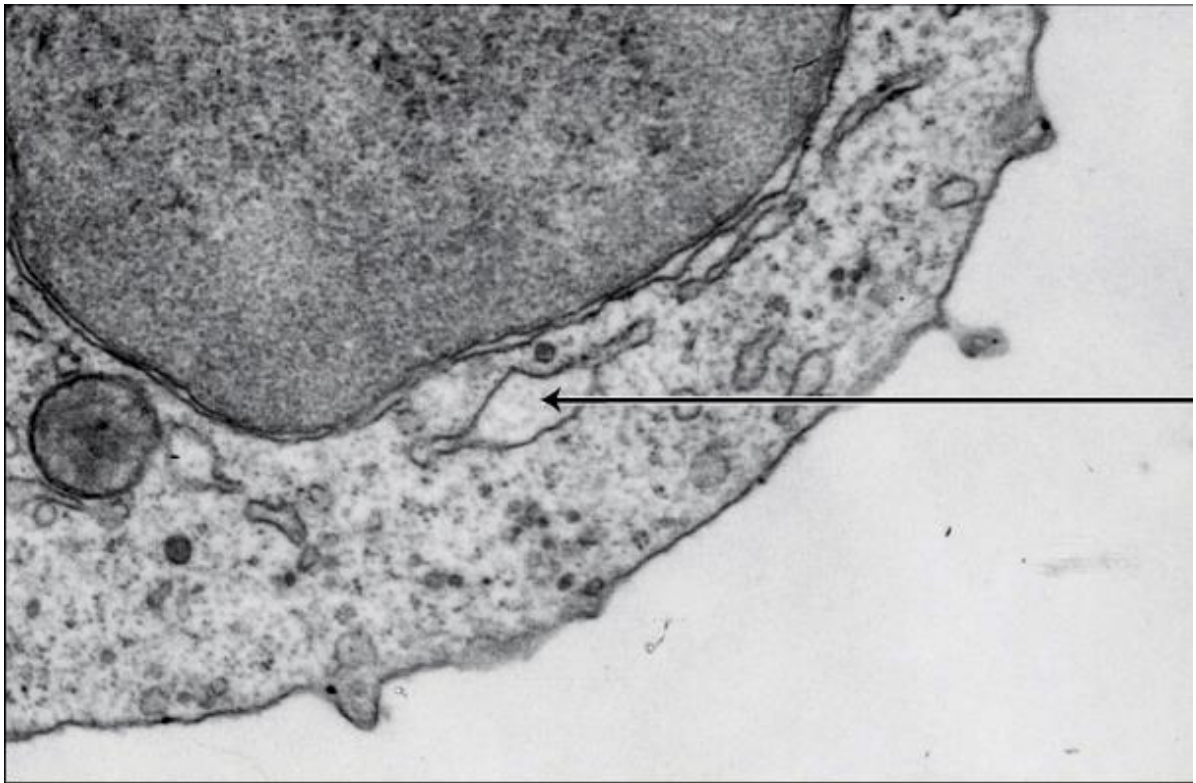


Рис. 15. Цистерна гладенького ендоплазматичного ретикулуму у клітинах миші вказана стрілкою (автор – OpenStax; джерело – Wikimedia Commons, <https://bit.ly/3ezv0Vn> OpenStax - <https://bit.ly/3cq21Rr>).

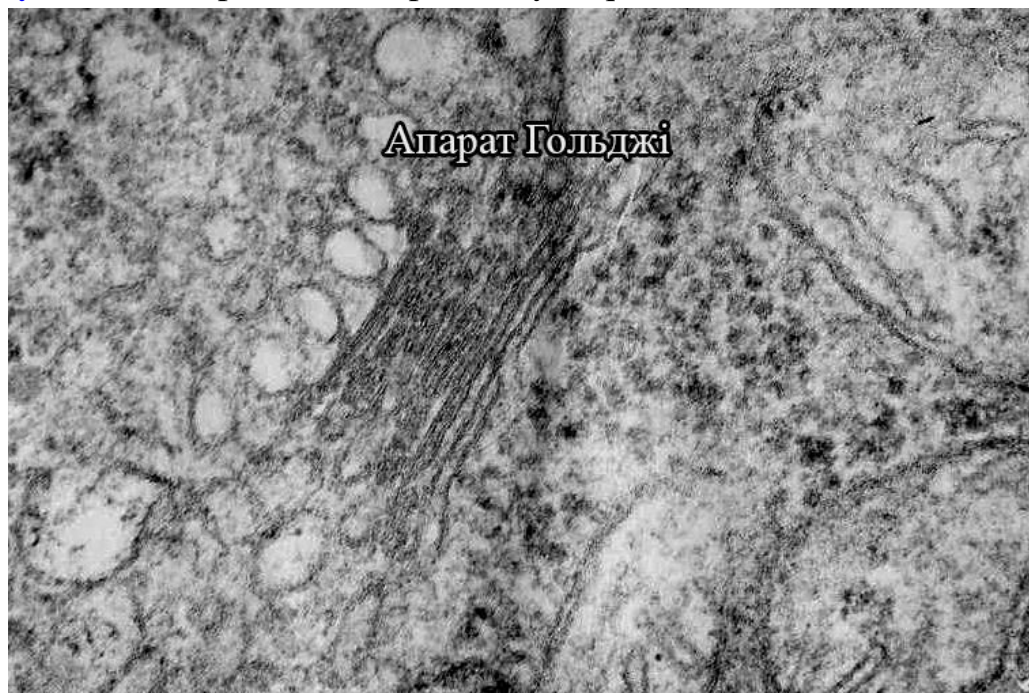


Рис. 16. Апарат Гольджі у клітинах тапетуму пиляків злаку (м'якої пшениці) (фото д. біол. наук В. К. Симоненко (СГІ), люб'язно надане для кафедри генетики і молекулярної біології ОНУ імені І. І. Мечникова).

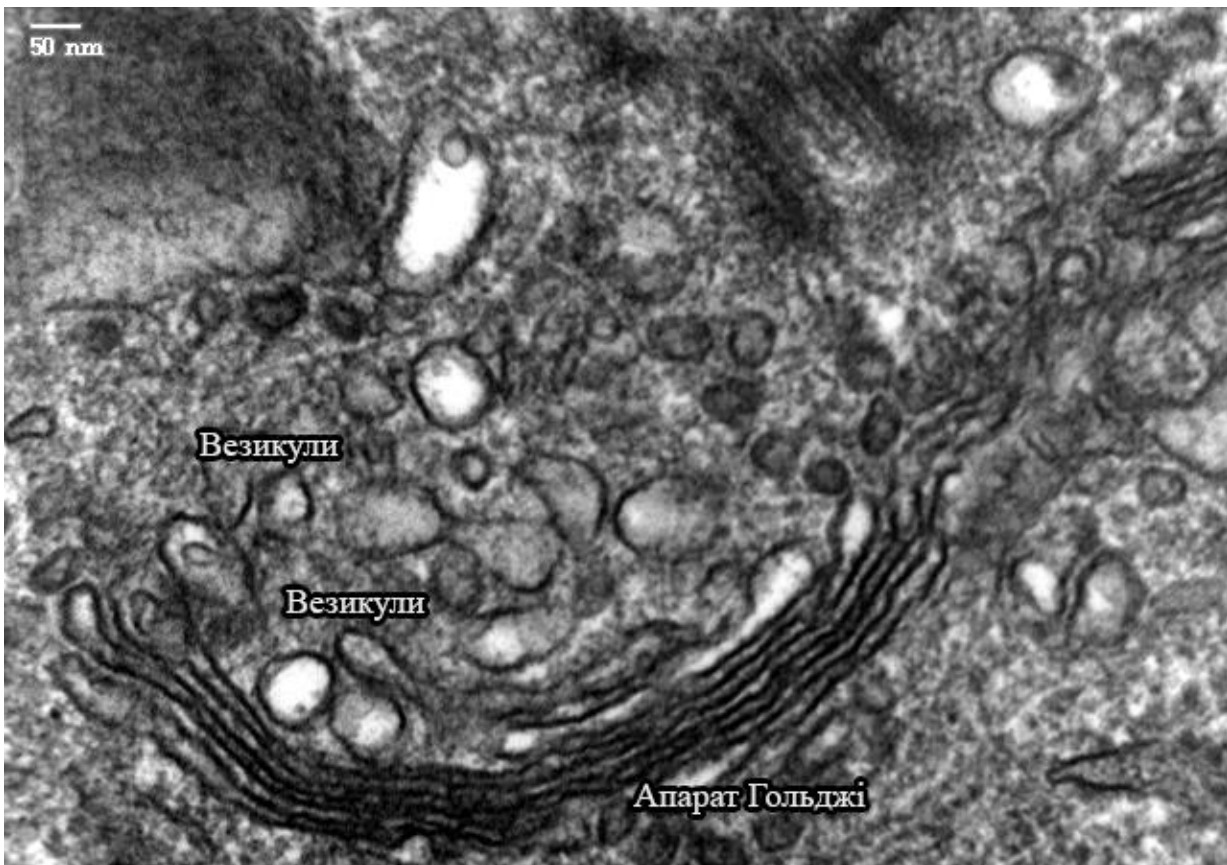


Рис. 17. Апарат Гольджі у лейкоциті людини (фото – Louisa Howard; Wikimedia Commons, <https://bit.ly/38tBtgI>, з модифікаціями).

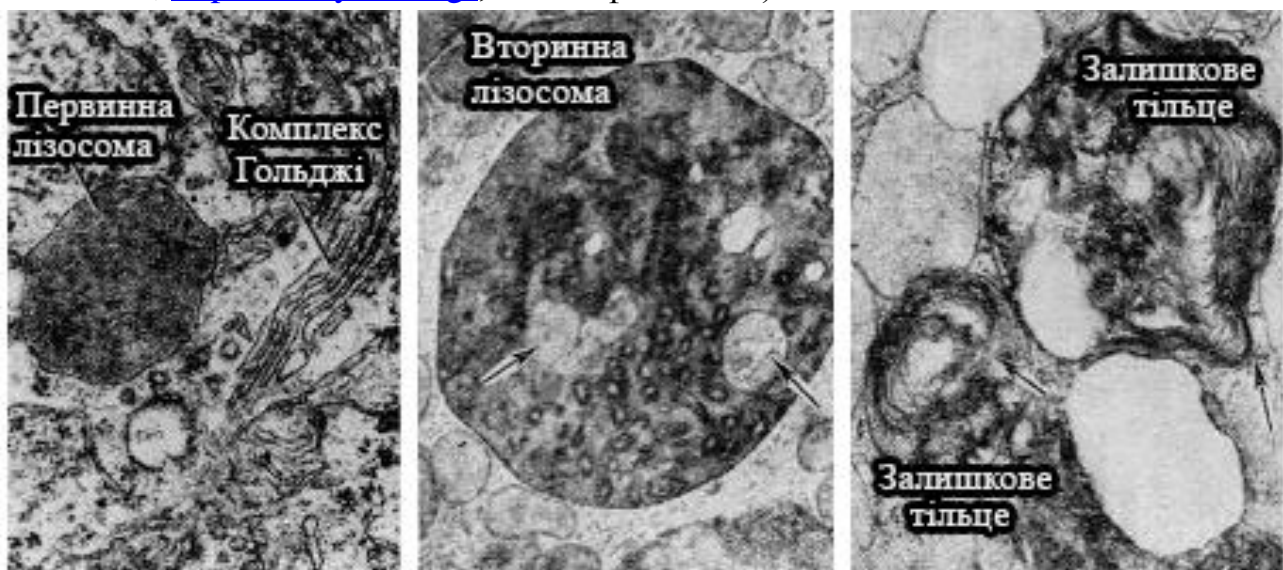


Рис. 18. Лізосоми: 1 – первинна лізосома у клітині кори головного мозку кроля, 2 – вторинна лізосома аутофагічного типу в обкладочній клітині шлунка людини (стрілками позначені мітохондрії, що потерпають перетравлення), 3 – постлізосоми (залишкові тільця), вказані стрілками (наведено за ВМЕ, стаття «Лізосоми», Т. 13, с. 103, 1980, з модифікаціями)

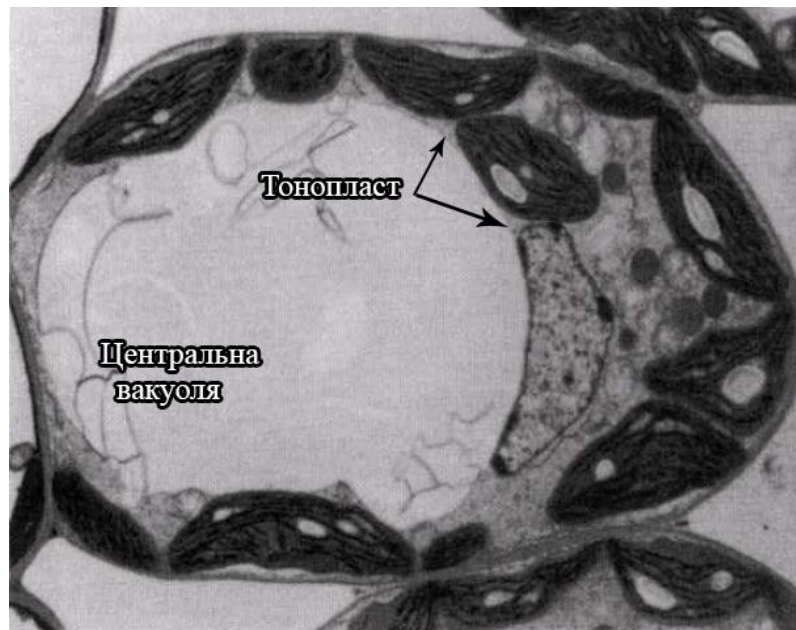


Рис. 19. Центральна вакуоля у рослинних клітинах (цит. за: Taylor D., Green N., Stout W., Biological Science, 1997, з модифікаціями)

Везикули

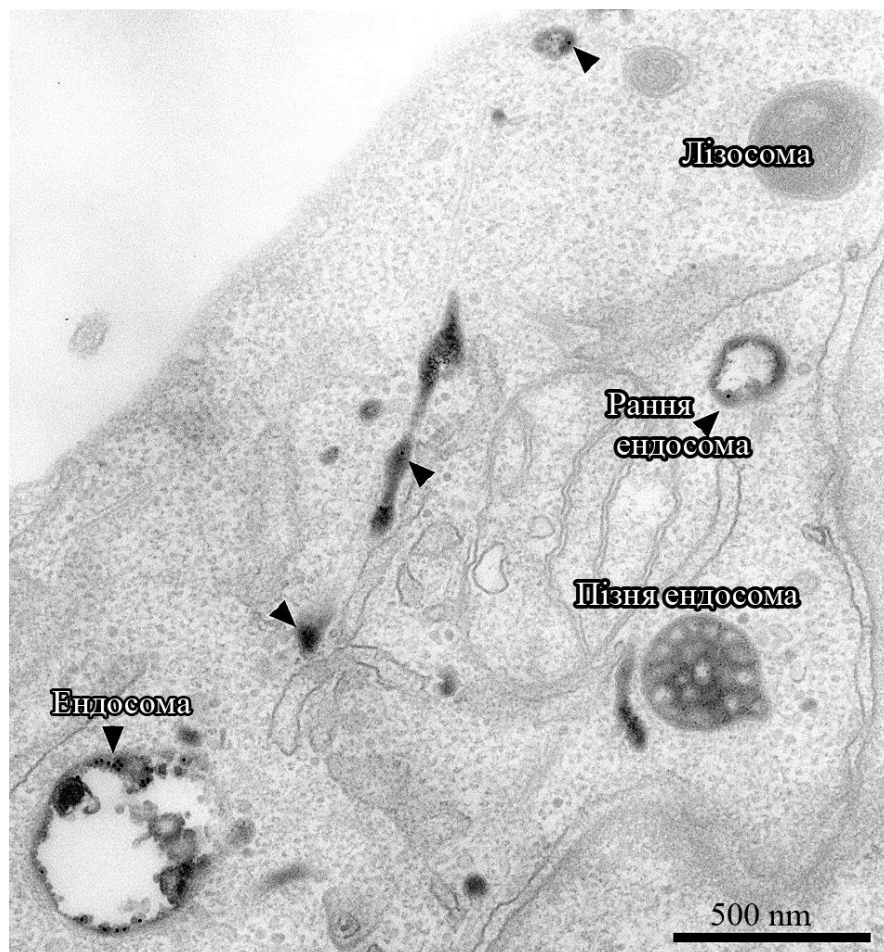


Рис. 20. Компартменти ендочитарного шляху в клітинах HeLa (джерело: HeLa cell endocytic pathway labeled for EGFR and transferrin, власна робота Matthew R. G. Russell, CC BY 3.0; <https://bit.ly/3vfpa1z>, з модифікаціями)

Енергетична система клітини

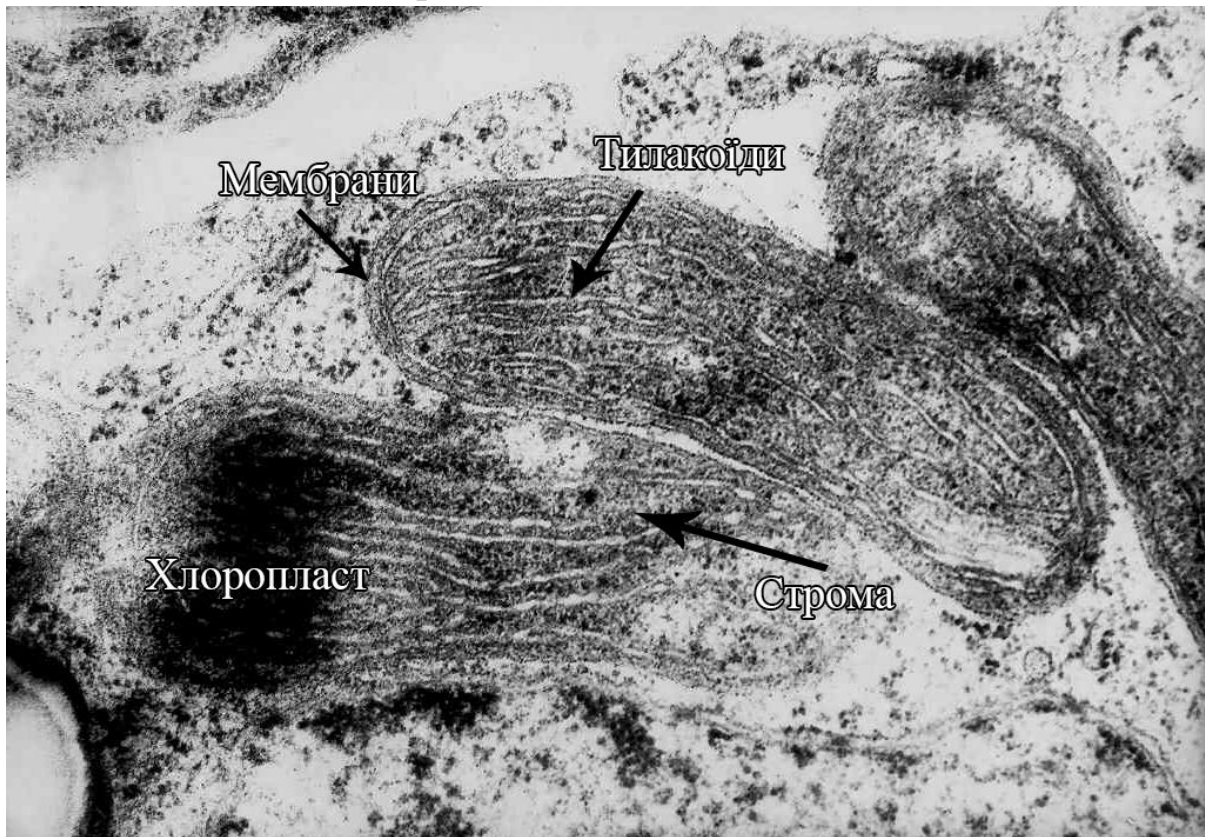


Рис. 21. Хлоропласти у клітинах тапетуму кукурудзи (власне фото д. біол. наук В. К. Симоненко (СГП), люб'язно надане для кафедри генетики і молекулярної біології ОНУ імені І. І. Мечникова).

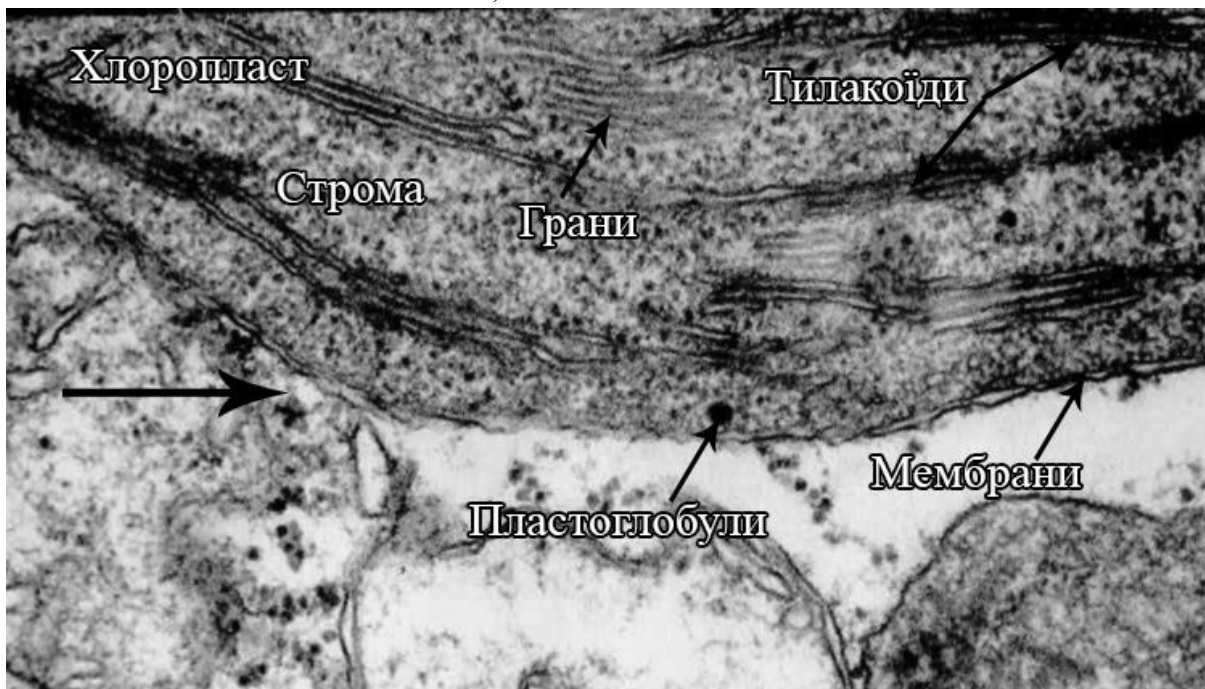


Рис. 22. Ультраструктура хлоропласта клітин кукурудзи (власне фото д. біол. наук В. К. Симоненко (СГП), люб'язно надане для кафедри генетики і молекулярної біології ОНУ імені І. І. Мечникова).

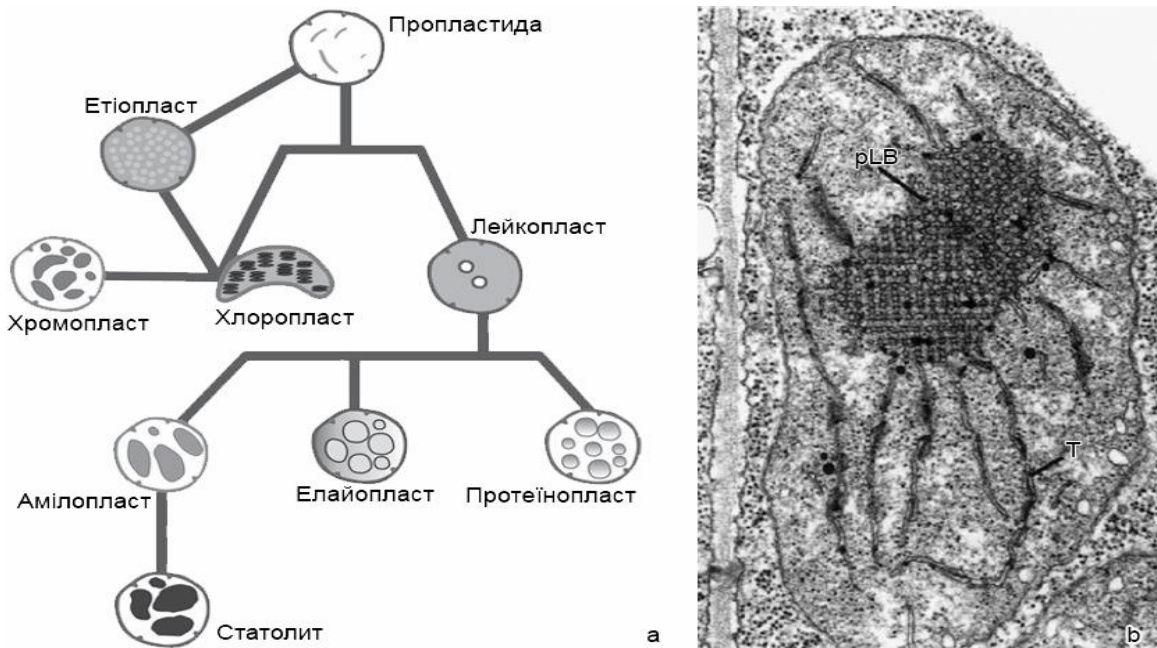


Рис. 23. Пластиди. а – деякі форми пластид та їх перетворення (цит. за Dashek W. V., Miglani G. S. «Plant cells and their organelles» (2017), рис. 10.1) та б – електронна мікрофотографія перерізу етіопласту гороху на початку стимульованого світлом перетворення у хлоропласт, де рLB – проламелярне тільце, а Т – тилакоїди (цит. за Dashek W. V., Miglani G. S. «Plant cells and their organelles» (2017), рис. 10.2), з модифікаціями.

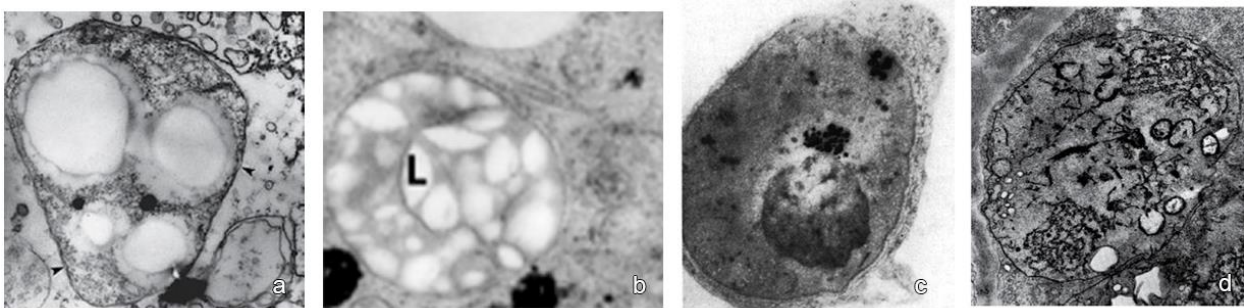


Рис. 24. Пластиди. а – амілопласт *Psilotum nudum* з великими скупченнями крахмалу та мембраною, вказаною стрілкою (цит. за Dashek W. V., Miglani G. S. «Plant cells and their organelles» (2017), рис. 10.6); б – елайопласти – спеціалізовані на зберіганні ліпідних краплин (позначено літерою L) у клітині тапетуму *Brassica napus* (цит. за Dashek W. V., Miglani G. S. «Plant cells and their organelles» (2017), рис. 10.7, з модифікаціями); с – протеїнопласт (алеїронопласт, алеїропласт), спеціалізована на зберіганні та модифікації білків пластида *Helleborus corsicus* (цит. за Dashek W. V., Miglani G. S. «Plant cells and their organelles» (2017), рис. 10.8); д – ультраструктура хромопласту: окрім двох сітчасто-тубулярних мембранних комплексів, розташованих на периферії органели, у ній присутня невелика кількість внутрішніх мембранних компонентів (цит. за Dashek W. V., Miglani G. S. «Plant cells and their organelles» (2017), рис. 10.3b)

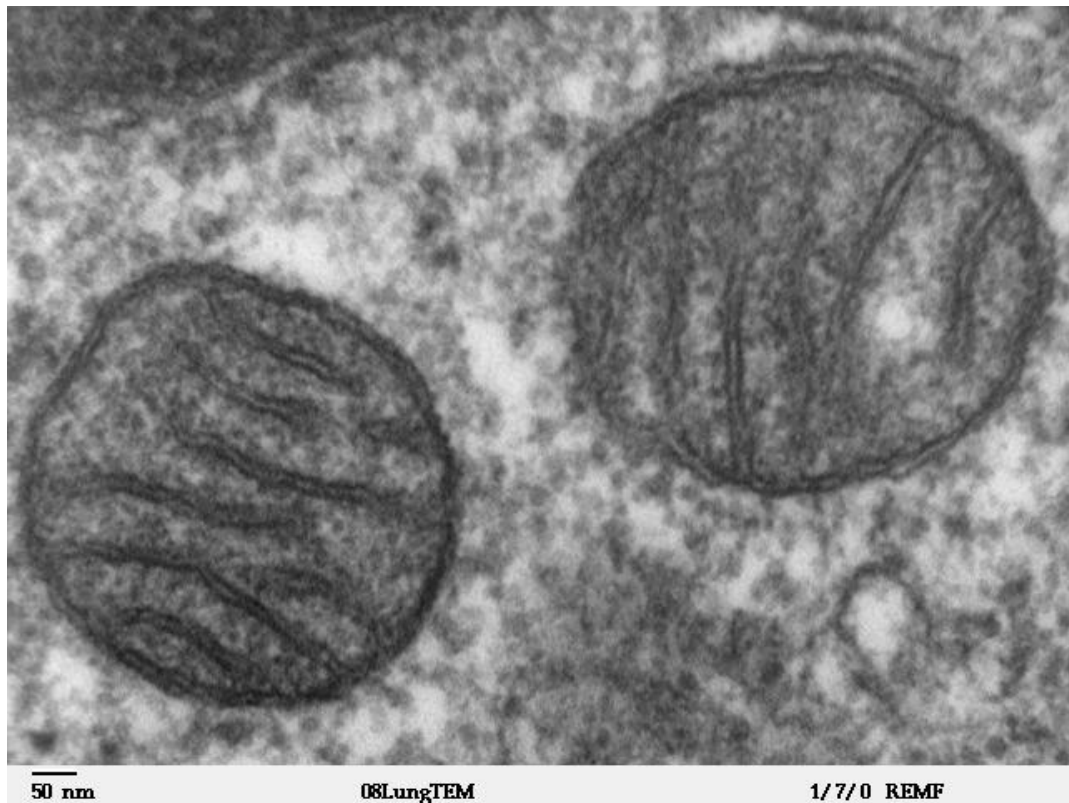


Рис. 25. Мітохондрії у клітинах легень ссавців: (автор – Louisa Howard; Wikimedia Commons, <https://bit.ly/38AO5Ty>).

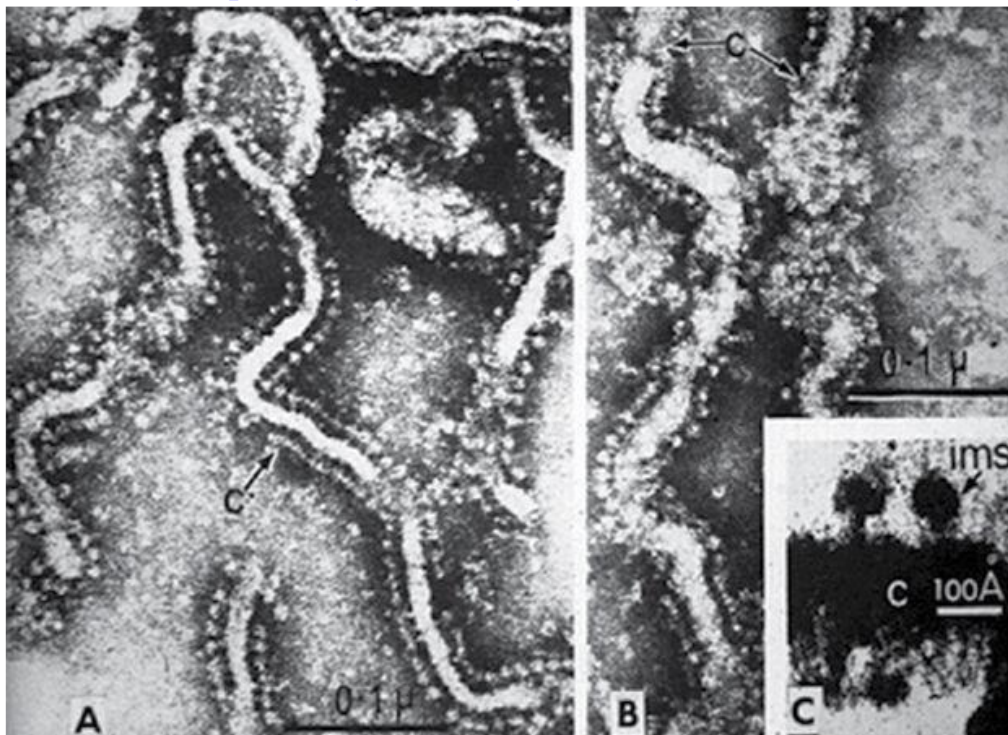


Рис. 26. Ультраструктура мембран крист мітохондрій. а, b – негативно забарвлені кристи мітохондрій з комплексами АТФ-синтази, вказаними стрілками; с – збільшені комплекси АТФ-синтази, ims – внутрішній мітохондріальний простір (матрикс) (цит. за Dashek W. V., Miglani G. S. «Plant cells and their organelles» (2017), fig. 7.3).

Інформаційна система клітини

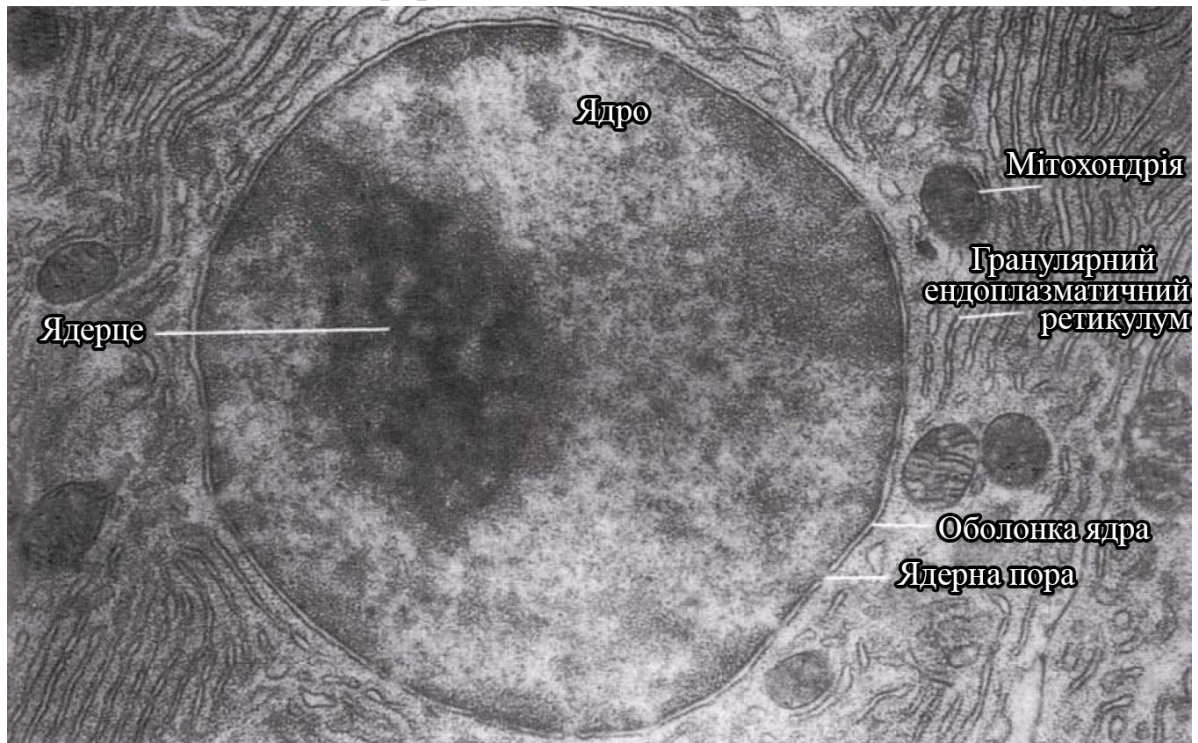


Рис. 27. Електронна мікрофотографія клітинного ядра, отримана за допомогою TEM (цит. за: Taylor D., Green N., Stout W., Biological Science, 1997, з модифікаціями).

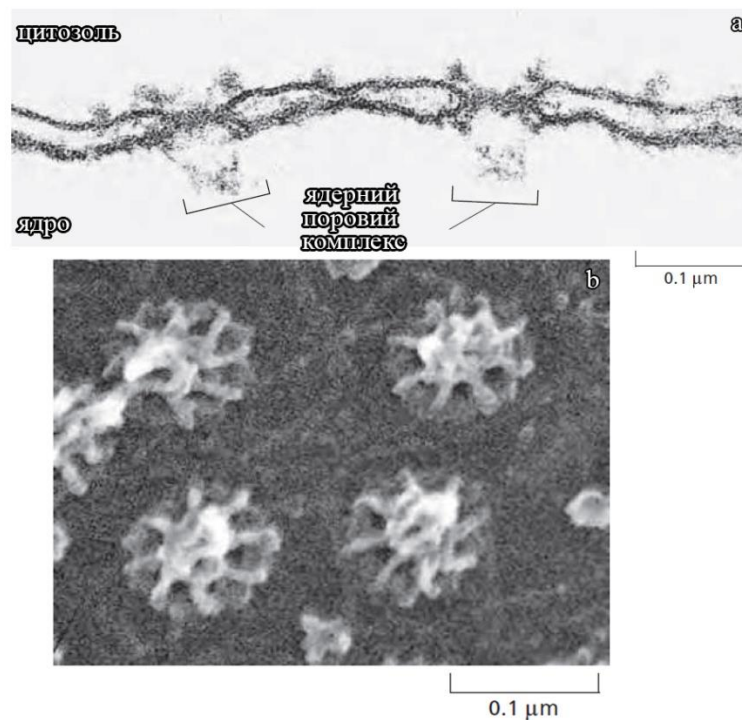


Рис. 28. Ядерні порові комплекси. а – переріз ядерної мембрани з двома ядерними порами (цит. за: Molecular biology of the cell / B. Alberts et al. (2014), fig 12-8(c), з модифікаціями); б – електронна мікрофотографія ядерних порових комплексів ооцита з боку ядра (цит. за: Molecular biology of the cell / B. Alberts et al. (2014), fig 12-8(b), з модифікаціями)

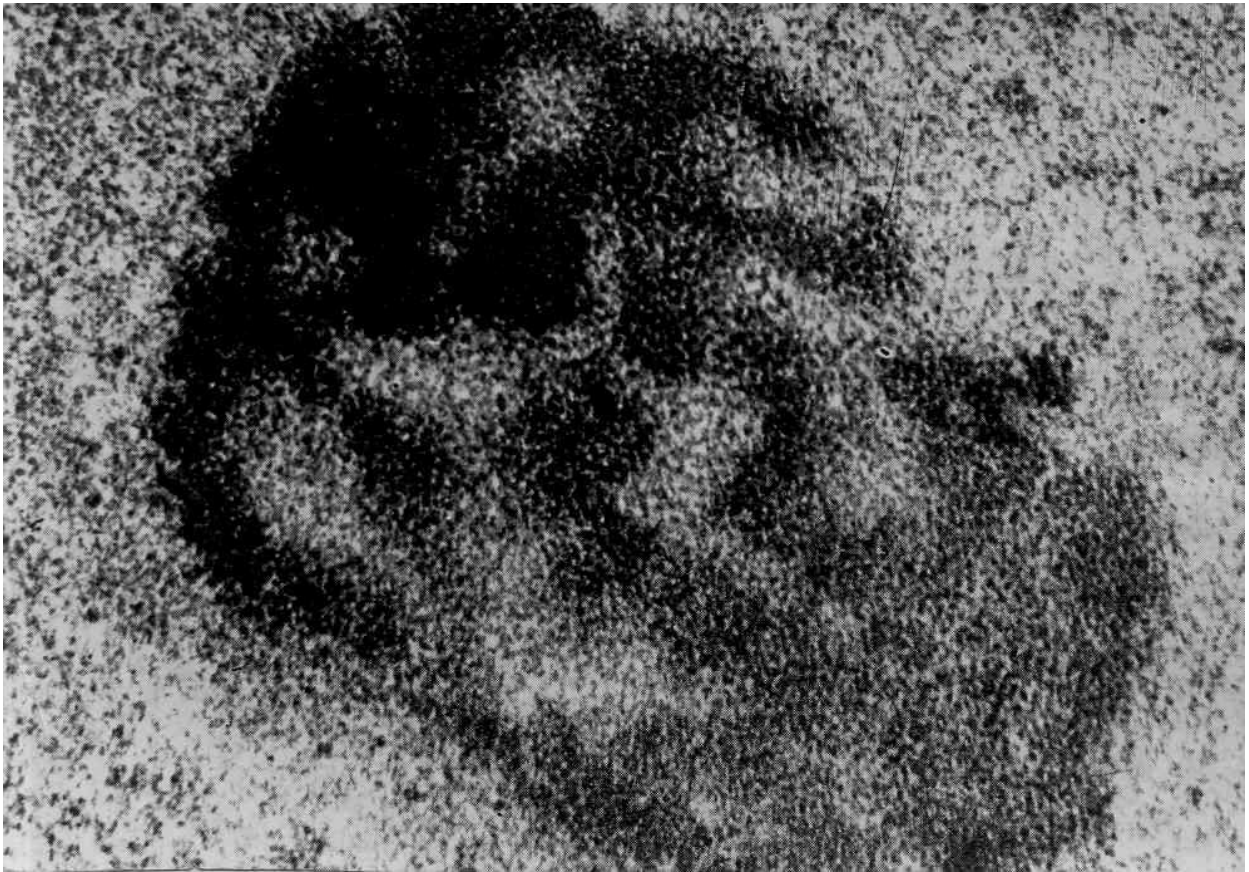


Рис. 29. Ядерце клітини підшлункової залози ссавця (фото із архівів кафедри генетики і молекулярної біології ОНУ імені І. І. Мечникова)

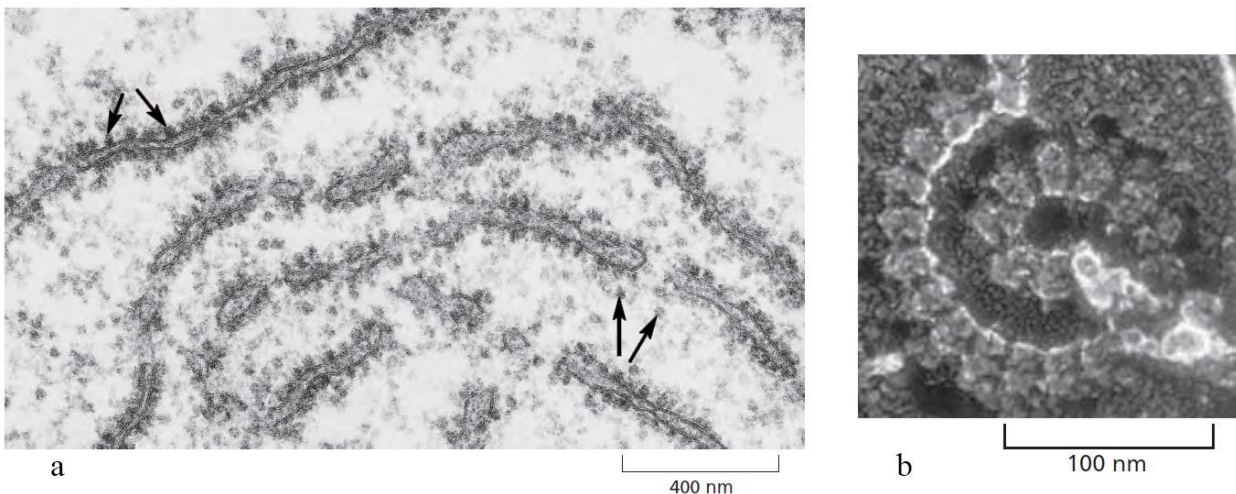


Рис. 30. Еукаріотичні рибосоми а – електронна мікрофотографія ділянки цитоплазми з цистернами ендоплазматичного ретикулуму. Позначені стрілками рибосоми знаходяться на мембранах ЕР та вільно у цитозолі (цит. за: *Molecular biology of the cell* / В. Alberts et al. (2014), fig 6-60, з модифікаціями); б – електронна мікрофотографія полірибосоми еукаріотичної клітини (цит. за: *Molecular biology of the cell* / В. Alberts et al. (2014), fig 6-73(b)).

Цитоскелет

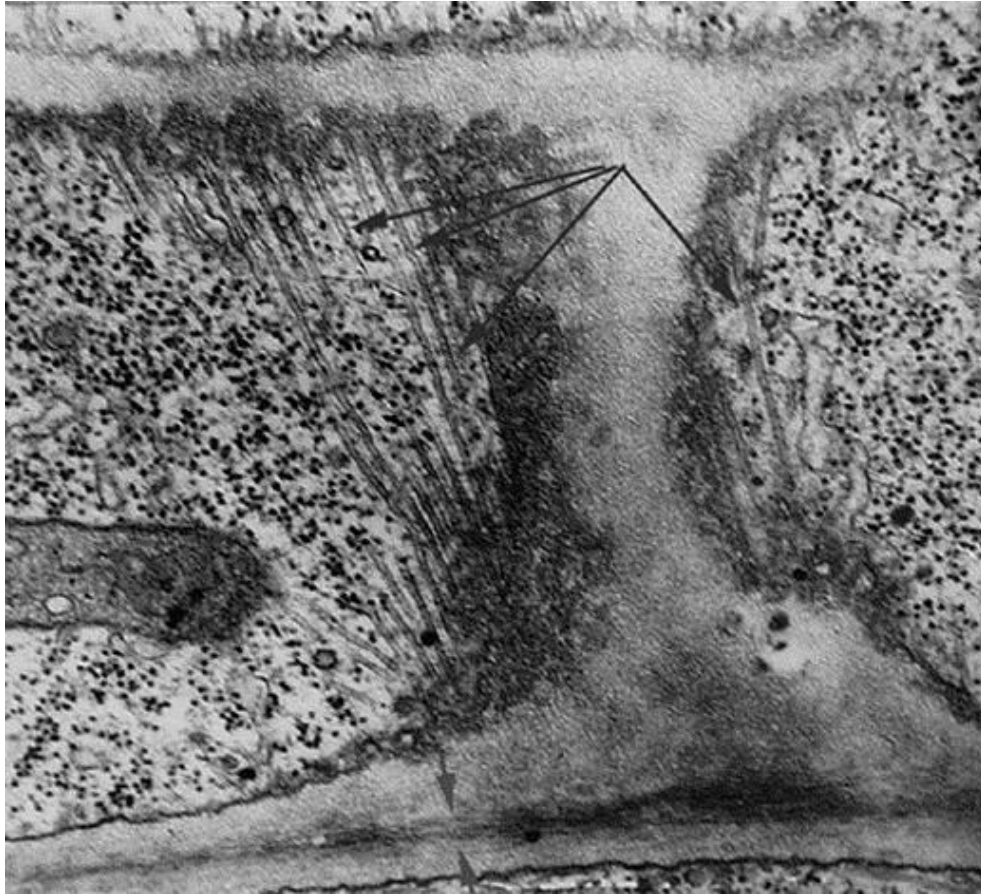


Рис. 31. Поперечні та повздовжні перерізи мікротрубочок (вказані стрілками) серединної пластинки клітини рясткі *Ornithogalum umbellatum* (цит. за Dashek W. V., Miglani G. S. «Plant cells and their organelles» (2017), fig. 6.1)

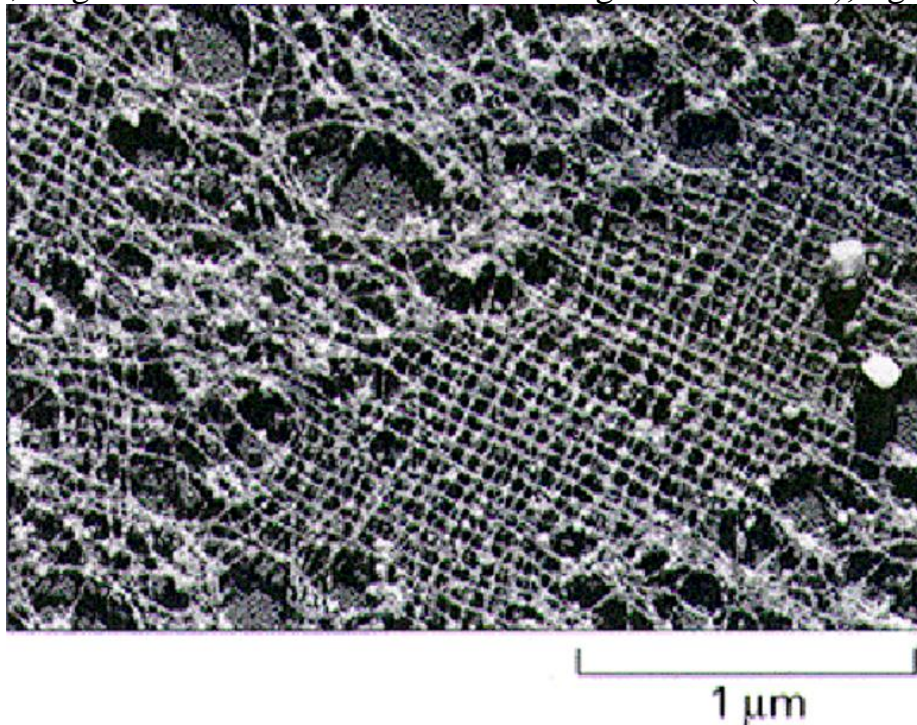


Рис. 32. Проміжні мікрофіламенти (у складі ядерної ламіни) (Джерело - <https://bit.ly/3tDTvWI>)

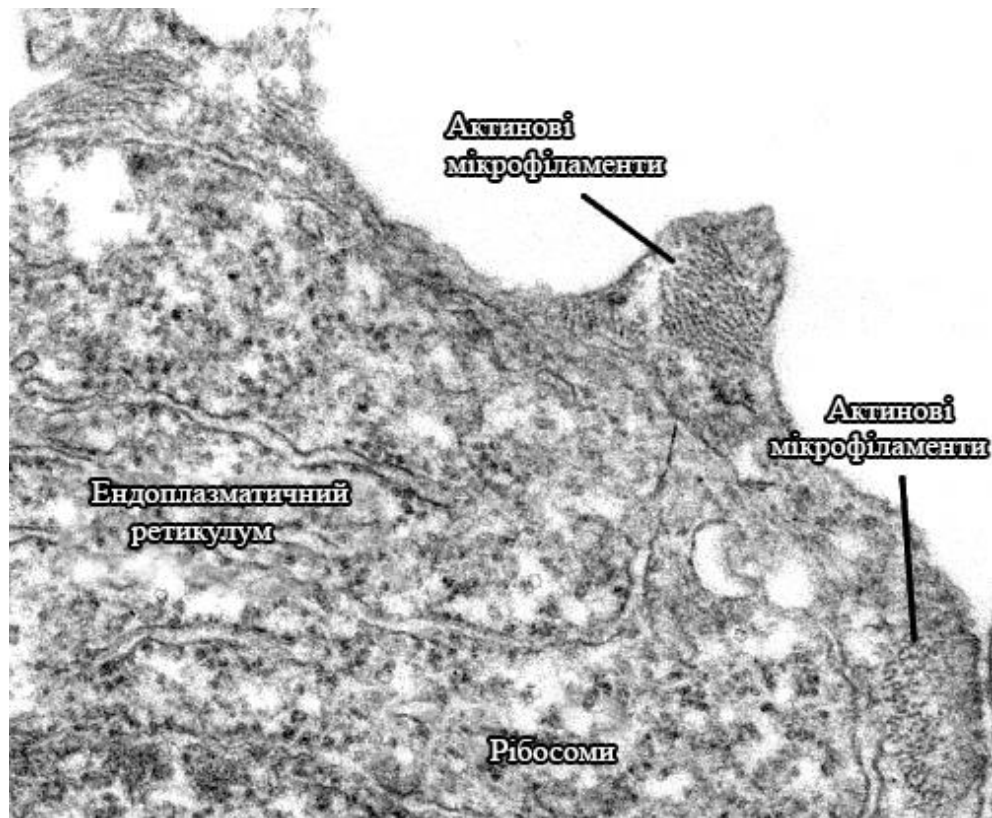


Рис. 33. Мікрофіламенти (актинові філаменти) (Джерело - <https://bit.ly/3cTgoQ8>, з модифікаціями)



Рис. 34. Електронна мікрофотографія целюлозних волокон клітинної стінки зеленої морської водорості *Chaetomorpha melagonium* (цит. за: Taylor D., Green N., Stout W., Biological Science, 1997)

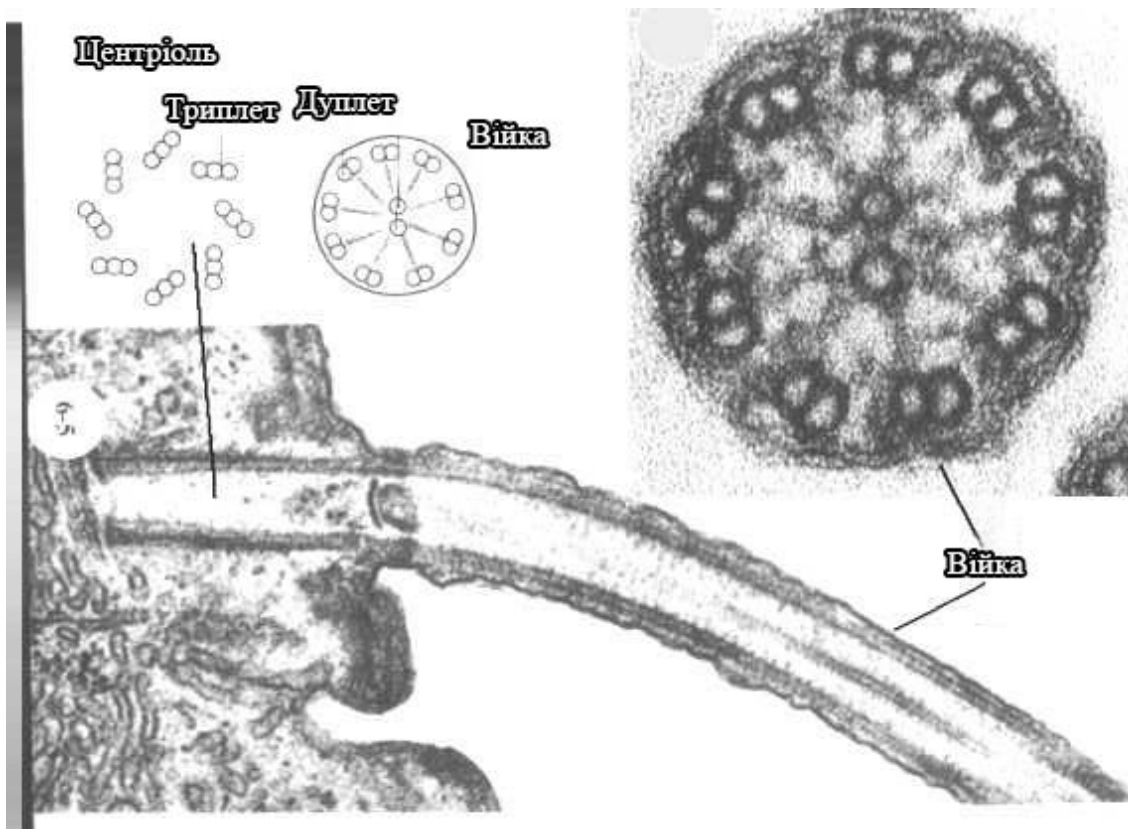


Рис. 35. Ультраструктура війки еукаріотичної клітини (Джерело - <https://bit.ly/36SbGy2>)



Рис. 36. Дуплікована пара центросом у S-періоді клітини ссавця. Кожна центросома складається з пари центріолей під прямим кутом одна до одної (Джерело - <https://med.se-todo.com/biolog/16920/index.html>).

Питання для контролю

1. Біологічні мембрани: хімічний склад й будова.
2. Біологічні мембрани: походження, оновлення, ріст мембран.
3. Поняття про матрикс (гіалоплазма, основна речовина цитоплазми, цитозоль).

4. Поняття про клітинні системи.
5. Вакуолярна система клітини: складові та принципи роботи.
6. Цитоплазматична мембрана (плазмалема) – структура і функції.
7. Клітинна стінка.
8. Мембранний транспорт: молекулярний і везикулярний.
9. Гранулярний ендоплазматичний ретикулум.
10. Агранулярний ендоплазматичний ретикулум.
11. Апарат Гольджі. Структура і функції.
12. Лізосоми: структура і функції.
13. Поняття про везикули.
14. Пероксисоми, гліоксисоми.
15. Вакуолі рослинних клітин: будова, функції.
16. Енергетична система клітини: загальна характеристика.
17. Будова та функції мітохондрій.
18. Будова та функції пластид.
19. Ряд перетворень пластид вищих рослин.
20. «Опорно-рухова система» клітини – цитоскелет, його загальна характеристика.
21. Мікротрубочки: будова і функції.
22. Мікрофіламенти: будова і функції.
23. Проміжні філаменти: будова і функції.
24. Внутрішньоклітинний транспорт.
25. Органели руху: джгутики і війки (кінетоцилі).
26. Будова базального тільця.
27. Загальна схема будови центріолі.
28. Схема будови центросфери.
29. Інформаційна система клітини: складові і принципу функціонування.
30. Ядро, його структура і функції.
31. Ядерна мембрана і будова ядерно-порового комплексу.
32. Ядерце, його структура та функції.
33. Хроматин інтерфазної клітини.
34. Білок-синтезуючий апарат еукаріотичної клітини.
35. Центросомний цикл.
36. Клітинний цикл.

Перелік рекомендованої літератури

1. Алексеева Т. Г. Загальна цитологія : навч.-метод. посіб. / Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2022. 123 с.
<http://dspace.onu.edu.ua:8080/handle/123456789/33326>
2. Альбертс Б., Джонсон А., Левіс Д., Реф М., Робертс К., Уолтер П. Молекулярна біологія клітини. Переклад з англійської. Львів: Видавничий дім «Наутилус», 2018. 1536 с.
3. Kohen E., Santus R., Hirschberg J. G., Ozkutuk N. Atlas of cell organelles fluorescence. CRC Press, 2004. 214 p.
4. Dashek W. V., Miglani G. S. Plant cells and their organelles. Hoboken, N.J. : Wiley, 2017. 413 p.
5. Earnshaw W. C., Johnson G. T., Lippincott-Schwartz J., Pollard P. T. D. Cell biology. 3rd Edition. — Elsevier, 2017. — 900 p.
6. Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. Molecular cell biology. 6th edition. L.: Freeman, W. H. & Company, 2007. 1150 p.
7. Plopper G., Sharp D., Sikorski E., Lewin B. Lewin's cells. 3rd ed. USA. : Courier Companies, 2015. 1056 p.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

Каріотипування рослинних об'єктів

Хромосоми містяться у каріоплазмі і характеризуються постійністю кількісного і якісного складу у клітинах даного виду. Кількісний та якісний склад хромосом властивий особинам даного виду, називається **каріотипом**. У диплоїдному наборі хромосом соматичної клітини слід розрізняти парні гомологічні хромосоми, тобто такі, що мають однакову морфологію, проте походження із різних геномів: одна від материнської гаметети, друга від батьківської. Каріотип клітин зазвичай досліджують на давлених препаратах або в мазках; для цього придатні клітини на стадії метафази. Так звані **метафазні пластинки** фотографують і проводять каріотипування.

Усі хромосоми, що входять до каріотипу, можна розташувати у вигляді **каріограми** (візуальне представлення повного хромосомного набору). Для цього з фотографії метафазної пластинки акуратно вирізають хромосоми, розбивають їх на пари гомологів, ранжують і наклеюють на лист паперу, враховуючи будову. Каріотип певної особини або даного виду може бути представлений у вигляді схеми (**ідіограми**), на якій пари гомологів розташовуються рядами у порядку зменшення розмірів. Складання ідіограми базовано на вимірюванні кожної хромосоми, обліку довжин плечей, положення первинних перетяжок-центромер, вторинних перетяжок і супутників, що дозволяє досить точно ідентифікувати хромосоми.

У багатьох рослин, а іноді і тварин, окрім постійних компонентів каріотипу – так званих А-хромосом – в ядрах деяких особин даного виду виявляються додаткові або В-хромосоми. Їх кількість варіює у досить широких межах. Ці додаткові хромосоми утворюються внаслідок фрагментації або перебудови хромосом основного набору (А-хромосом). Їх присутність збільшує генетичну варіабельність популяцій.

Мета роботи: Провести каріотипування і скласти ідіограму морфометричним методом, використовуючи фотографії метафазних пластинок сільськогосподарчих рослин.

Матеріали та обладнання

Фотографії метафазних пластинок.

Ножиці.

Клей.

Папір.

Міліметрова лінійка.

Завдання 1. Провести каріотипування малохромосомного виду рослин родини Fabaceae, використовуючи надану мікрофотографію метафазної пластинки.

Хід роботи:

1. Фотографію метафазної пластинки обраної рослини уважно розглядають, вирізають хромосоми і попарно розкладають їх на папері, ранжуючи від самих великих до найменших хромосом (рис. 37a).
2. Хромосоми наклеюють на папір так, щоб центромерні ділянки приходилися на проведену на папері лінію, а більш довгі плечі знаходилися знизу від лінії – побудувати каріограму (рис. 37b).
3. Побудувати ідіограму – схематичне зображення каріотипу (рис. 37c).
4. Класифікувати хромосоми, позначити метацентричні, акроцентричні, телоцентричні та супутничні хромосоми.
5. Ідентифікувати кожну хромосому за допомогою морфометричного методу, використовуючи наступні показники:

5.1. Абсолютна довжина хромосоми, L^a , мкм

5.2. Відносна довжина хромосоми, L^r , мкм

$$L^r = \frac{\text{довжина хромосом}}{\text{довжина усіх хромосом ядра}}, \%$$

5.3. Плечовий індекс (I^B)

$$I^B = \frac{\text{довжина довгого плеча хромосоми}}{\text{довжина короткого плеча хромосоми}}, \%$$

5.4. Центромерний індекс (I^C)

$$I^C = \frac{\text{довжина короткого плеча хромосоми}}{\text{довжина усієї хромосоми}}, \%$$

5.5. Індекс спіралізації

$$I^s = \frac{\text{сумарна довжина двох коротких хромосом}}{\text{сумарна довжина двох довгих хромосом}}, \%$$

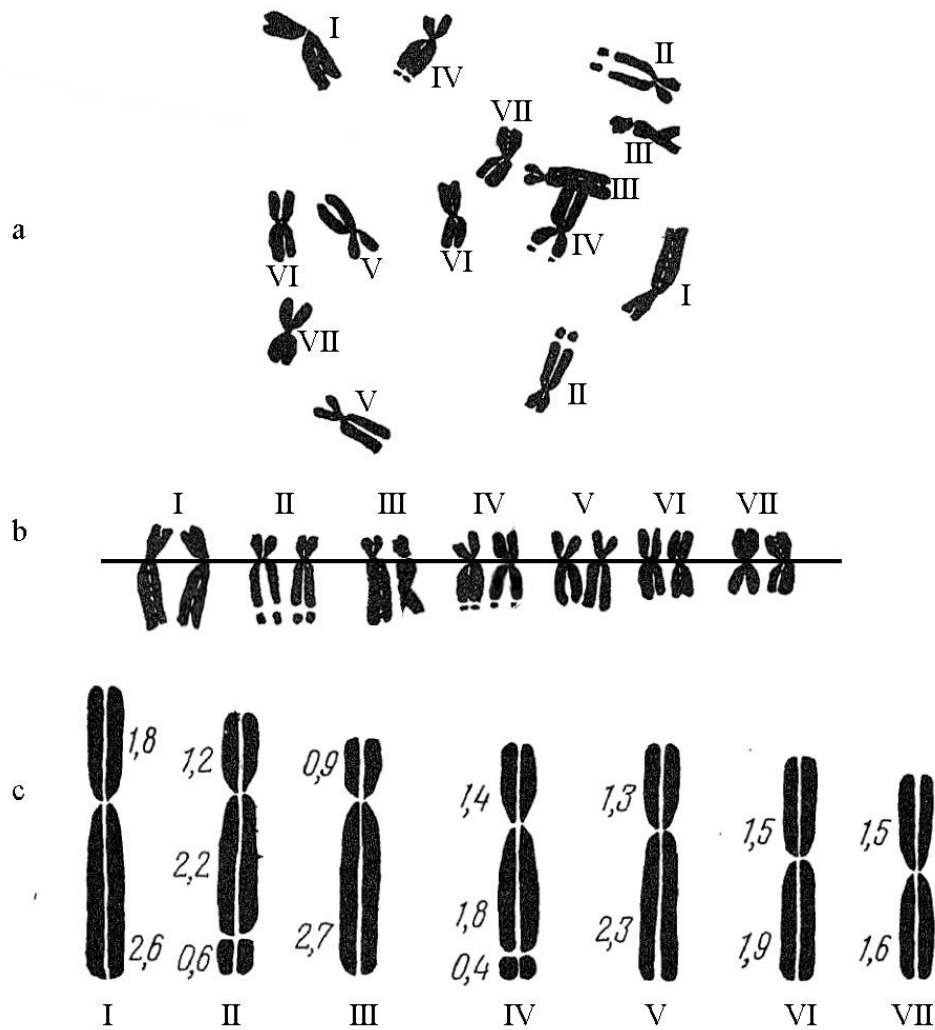


Рис. 37. а – метафазна пластинка, б – каріограма і с – ідіограма гороху (*Pisum sativum* L), (адаптовано за Паушевою З.П., 1984).

Завдання 2. Зробити висновок про значення цитогенетичних досліджень.

Питання для контролю:

1. Хроматин інтерфазного ядра і ядерна архітектура.
2. Рівні укладки (конденсації хромосом).
3. Що входить до складу нуклеосоми?
4. Морфологія метафазних хромосом.
5. Що таке каріотип і ідеограма?
6. Що таке А-хромосоми та В-хромосоми?
7. Біологічний сенс появи гігантських хромосом.
8. Які типи гігантських хромосом вам відомі?
9. Морфометричний метод ідентифікації хромосом каріотипу.

Перелік рекомендованої літератури

1. Сиволоб А. В., Афанасьєва К. С. Молекулярна організація хромосом : навч. посіб. – Київ : Київський університет, 2014. 286 с.
2. Варенюк І. М., Дзержинський М. Е. Методи цито-гістологічної діагностики: навчальний посібник. Київ: Інтерсервіс, 2019. 256 с.
3. Сатарова Т. М. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни „Генетика”. Кам'янське, ДДГУ, 2020. 53 с.
4. Тоцький В. М. Генетика. 3-тє видання, виправлене і доповнене. Одеса: Астропринт, 2008. 712 с.
5. Chromosomes and Cytogenetics: Genetics.Topic Room. Scitable by nature education: Library. URL: <https://go.nature.com/3q017k0> (дата звернення 22.08.2023).
6. Mitosis: Gallery Images. MicroscopyU. URL: <https://bit.ly/33YLWxY> : (дата звернення 22.08.2023).

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

Визначення мітотичного індексу

Мета роботи: оцінити активність поділу клітин у меристематичних тканинах *Allium cepa* L.

Матеріали та обладнання

Мікроскопи.

Постійні мікропрепарати зрізів корінців цибулі.

Завдання 1. Визначити мітотичний індекс для клітин меристем корінців цибулі

Хід роботи:

1. Встановити препарат під мікроскоп, налаштувати зображення клітин кореневої меристеми на малому збільшенні. Перевести мікроскоп на велике збільшення.
2. У п'яти полях зору підрахувати загальну кількість клітин та кількість клітин, які знаходяться у різних фазах поділу: профазі, метафазі, анафазі, телофазі (рис. 38).

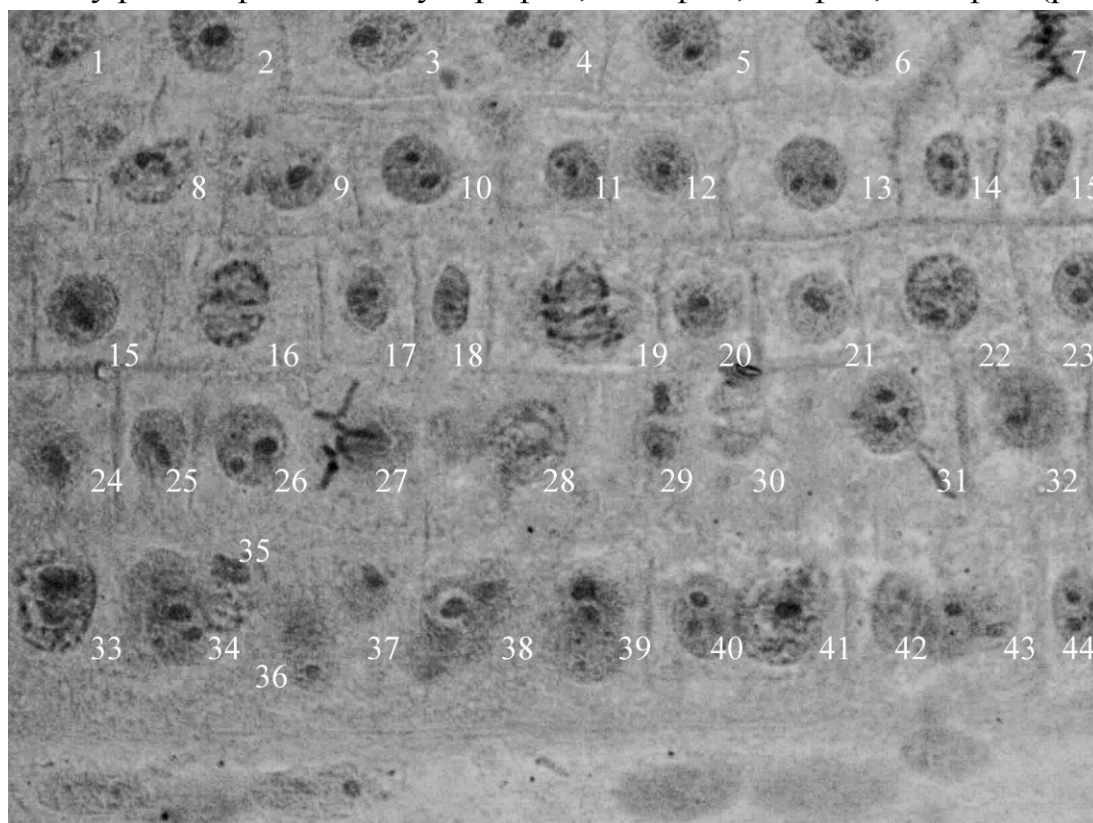


Рис. 38. Мікрофотографія клітин меристеми корінців цибулі (постійний мікропрепарат).

Профаза – № 16, 28; Метафаза – № 7, 27; Анафаза № 19; Телофаза – відсутня, усі решта клітин – інтерфазні. Загальна кількість клітин у полі зору – 44.

3. За формулою розрахувати мітотичний індекс – відсоток клітин, що поділяються, від загального числа проаналізованих клітин

$$MI = \frac{(P + M + A + T)}{N} \times 100(\%), \text{ де}$$

P – кількість клітин у профазі, M – у метафазі, A – у анафазі, T – у телофазі відповідно, N – загальна кількість клітин у полі зору.

4. Розрахувавши мітотичний індекс для кожного з п'яти досліджених полів зору окремо, визначити середнє арифметичне.

Завдання 2. Зробити висновок про активність меристематичної тканини корінців цибулі.

Завдання 3. Зробити висновок про біологічне значення мітозу.

Питання для контролю:

1. Мітоз як тип поділу соматичних клітин.
2. Фази мітозу.
3. Зміни кількості хромосом і кількості ДНК (величина C) у мітотичному циклі.
4. Біологічне значення мітозу.
5. Порівняльна характеристика мітозу у рослинних і тваринних клітинах.
6. Що таке цитокінез?
7. Назвіть та охарактеризуйте нетипові та патологічні форми мітозу.
8. Яким чином визначають показник мітотичного індексу?
9. З якою метою визначають мітотичний індекс тканини?

Перелік рекомендованої літератури

1. Загальна цитологія і гістологія : підручник / М. Е. Держинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін.; за ред. М. Е. Держинського ; упорядкування Н. В. Скрипник – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2010. – 575 с.
2. Загальна цитологія. Практикум" : навчальний посібник / М. Е. Держинський, О. К. Вороніна, Н. В. Скрипник та ін. К. : Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2011. – 126 с.
3. Ликова І. О. Лабораторний практикум з загальної цитології: навчальний посібник. Харків, 2017. 56 с.
4. Сиволоб А. В., Афанасьєва К. С. Молекулярна організація хромосом: навч. посіб. Київ : Київський університет, 2014. 286 с.
5. Трускавецький Э. С. Цитологія: підручник. К.: Вища школа, 2004. 254 с.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

Мікроспорогенез у злакових рослин

Мета роботи: ознайомитися з проходженням процесів мікроспорогенезу вищих квіткових рослин.

Завдання 1. Виготовити тимчасові давлені препарати пиляків пшениці і визначити фази мікроспорогенезу.

Матеріали та обладнання

Мікроскопи біологічні.

Предметні і покривні скельця.

Крапельниці з водою.

Ацетокармін.

Пінцети.

Препарувальні голки.

Фільтрувальний папір.

Набір фіксатів пиляків сільськогосподарчих злаків на різних етапах мікроспорогенезу.

Хід роботи:

1. Підготувати предметне скло, протерти його і нанести краплину барвника ацетокарміну посередині, покласти всередину краплини пиляк пшениці.
2. Обережно за допомогою пінцета і препарувальної голки розділити пиляк на частини, за можливості убрати оболонки пиляка.
3. Над полум'ям спиртівки прогріти краплину, не доводячи до її кипіння. Це необхідно для кращого забарвлення ядер клітин.
4. Обережно фільтрувальним папером відтягнути барвник, нанести на препарат краплину 45 % оцтової кислоти.
5. Тримаючи покривне скло під кутом до краплини, акуратно опустити його на залози.
6. Обережно тупим кінцем препарувальної голки постукати по препарату для отримання моношару клітин на препараті.
7. Зробити замальовки та фотографії, позначити на рисунку клітини, вказати стадію мейозу (рис. 39).



Рис. 39. Приклади виконання завдання 1 лабораторної роботи № 7

8. Повторити процедуру, знайти і проаналізувати інші стадії мікроспорогенезу.

Завдання 2. Скласти порівняльну таблицю проходження фаз поділу при мейозі і мітозі, зазначивши основні події, стан хроматину та плоїдність клітин (для мітозу заповнювати лише першу частину таблиці).

Таблиця 2

Порівняльна характеристика фаз мітозу і мейозу

| Фази | Мейоз | Мітоз |
|-------------|-------|---------------|
| Інтерфаза | | |
| Профаза I | | |
| Метафаза I | | |
| Анафаза I | | |
| Телофаза I | | |
| Профаза II | | Фази відсутні |
| Метафаза II | | |
| Анафаза II | | |
| Телофаза II | | |
| Цитокінез | | |

Завдання 3. Зробити висновок про біологічне значення мейозу.

Питання для контролю:

1. Мейоз як особливий вид клітинного поділу.
2. Типи мейотичного поділу.
3. Характеристика фаз мейотичного поділу.
4. Специфічні риси профазі I мейозу.
5. Зміни кількості ДНК (величина C) і кількості хромосом у мейотичному поділі.
6. Порівняльна характеристика мітозу і мейозу.
7. Гаметогенез у тварин.
8. Особливості гаметогенезу у вищих рослин.
9. Формування чоловічих і жіночих гаметофітів.
10. Біологічне значення і роль мейозу.

Перелік рекомендованої літератури

1. Загальна цитологія і гістологія : підручник / М. Е. Держинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. ; за ред. М. Е. Держинського ; упорядкування Н. В. Скрипник К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2010. 575 с.
2. Тоцький В. М. Генетика. 3-тє видання, виправлене і доповнене. Одеса: Астропринт, 2008. 712 с.
3. Трускавецький Э. С. Цитологія: підручник. К.: Вища школа, 2004. 254 с.
4. Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Balksimore D., Darnell J. Molecular cell biology. 6th edition. L.: Freeman, W. H. & Company, 2007. 1150 p.
5. Meiosis: Gallery Images. MicroscopyU. URL: <https://bit.ly/33YLWxY> (дата звернення 22.08.2023).

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ № 8

Окремі проблеми клітинної біології

Завдання. Здобувачі готують п'ятихвилинні доповіді-презентації на перераховані нижче теми і приймають участь у дискусії.

Підготовка і представлення доповіді здобувачами є надзвичайно важливою формою самостійної роботи. У рамках курсу загальної цитології здобувачам пропонують обрати одну з запропонованих тем для підготовки п'ятихвилинної доповіді, у рамках якої необхідно ознайомити аудиторію з основними важливими моментами обраної теми. Здобувачам пропонуються теми, пов'язані з історичними або методичними аспектами розвитку цитології та клітинної біології, зокрема, фундаментальні роботи у цій галузі, що були відзначені Нобелівськими преміями з фізіології і медицини, хімії або фізики.

Нобелівські премії з фізіології і медицини

1. Нобелівська премія 2001 – за відкриття ключових регуляторів клітинного циклу.
2. Нобелівська премія 2002 – за відкриття, що стосуються генетичної регуляції розвитку людських органів і запрограмованої загибелі клітин.
3. Нобелівська премія 2009 – за відкриття механізму захисту хромосом теломерами та ферментом теломеразою.
4. Нобелівська премія 2012 – за відкриття репрограмування зрілих клітин у плюрипотентні стовбурові.
5. Нобелівська премія 2013 – за відкриття механізмів регуляції доставки везикул – головної транспортної системи клітин.
6. Нобелівська премія 2016 – за відкриття механізмів аутофагії.

Нобелівські премії з хімії

7. Нобелівська премія 2002 – за розробку методів ідентифікації та аналізу структур біологічних молекул.
8. Нобелівська премія 2004 – за відкриття убіквілін-опосередкованого розкладання білка.
9. Нобелівська премія 2006 – за дослідження механізму копіювання клітинами генетичної інформації.
10. Нобелівська премія 2008 – за відкриття та розробку зеленого флуоресцентного білка (GFP).
11. Нобелівська премія 2009 – за дослідження структури та функції рибосоми.

12. Нобелівська премія 2017 – За розвиток флуоресцентної мікроскопії суперроздільної здатності.
13. Нобелівська премія 2017 – за розробку криоелектронної мікроскопії для визначення структури з високою роздільною здатністю біомолекул у розчині.
14. Нобелівська премія 2020 – за розвиток методу редагування геному.

Нобелівські премії з фізики

15. Нобелівська премія 1953 – за обґрунтування фазово-контрастного методу, особливо за винахід фазово-контрастного мікроскопа.
16. Нобелівська премія 1986 – за винахід і роботу над методами електронної мікроскопії.
17. Нобелівська премія 2018 – За розробку лазерних щипців та їх використання у біологічних системах.

Українські вчені, що працювали у галузі цитології

Гамалея Микола Федорович (1859–1949).

Делоне Лев Миколайович (1891–1969)

Заболотний Данило Кирилович (1866–1929)

Левитський Григорій Андрійович (1878–1942).

Леонтович Олександр Васильович (1869–1943).

Мечников Ілля Ілліч (1845–1916).

Навашин Сергій Гаврилович (1857–1930).

Перемежко Петро Іванович (1833–1894).

Фінн Володимир Васильович (1878–1957).

Зазначений перелік не є вичерпним і студенти можуть пропонувати доповіді на теми, обрані самостійно, за умови належності предмету доповіді до наук, пов'язаних з клітинним рівнем організації живої матерії.

Питання для контролю:

1. Етапи клітинного циклу.
2. Регулятори клітинного циклу: фактори росту.
3. Регулятори клітинного циклу: цикліни і циклін-залежні кінази.
4. Що таке клітини G₀-періоду?
5. Досліди Л. Гейфліка та межа Гейфліка.
6. Теломери і теломерази.
7. Назвіть типи і перелічіть властивості стовбурових клітин.
8. Програмована загибель клітини – апоптоз.
9. Стадії апоптозу.
10. Надайте порівняльну характеристику апоптозу і некрозу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алексеева Т. Г. Загальна цитологія : навч.-метод. посіб. / Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2022. 123 с.
<http://dspace.onu.edu.ua:8080/handle/123456789/33326>
2. Альбертс Б., Джонсон А., Левіс Д., Реф М., Робертс К., Уолтер П. Молекулярна біологія клітини. Переклад з англійської. Львів: Видавничий дім «Наутилус», 2018. 1536 с.
3. Білий Р. О., Ковалишин В. І., Челпанова І. В., Єлісеєва О. П., Балущ Л. В., Наконечна О. В., Ященко А. М., Луцик О. Д. Цитологія, ембріологія та загальна гістологія: навчальний посібник-атлас. Львів: Кварт, 2017. 59 с.
4. Варенюк І. М., Держинський М. Е. Методи цито-гістологічної діагностики: навчальний посібник. Київ: Інтерсервіс, 2019. 256 с.
5. Держинський М. Е., Скрипник Н. В., Гарматіна С. М., Островська Г. В., Варенюк І. М., Пустовалов А. С., Вороніна О. К., Пазюк Л. М., Бузинська Н. О. Загальна цитологія та гістологія. Частина І: Загальна цитологія: навчальний посібник. К. : Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2006. 275 с.
6. Загальна цитологія і гістологія : підручник / М. Е. Держинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. ; за ред. М. Е. Держинського ; упорядкування Н. В. Скрипник К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2010. 575 с.
7. Ликова І. О. Лабораторний практикум з загальної цитології: навчальний посібник. Харків, 2017. 56 с.
8. Сатарова Т. М. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни „Генетика”. Кам'янське, ДДТУ, 2020. 53 с.
9. Сиволоб А. В., Афанасьєва К. С. Молекулярна організація хромосом: навч. посіб. Київ : Київський університет, 2014. 286 с.
10. Тоцький В. М. Генетика. 3-тє видання, виправлене і доповнене. Одеса: Астропринт, 2008. – 712 с.
11. Трускавецький Э. С. Цитологія: підручник. К.: Вища школа, 2004. 254 с.
12. Гістологія. Цитологія. Ембріологія : підруч. для студентів / за ред. : О. Д. Луцика, Ю. Б. Чайковського . Вінниця : Нова Кн., 2020. 496 с
13. Dashek W. V., Miglani G. S. Plant cells and their organelles. Hoboken, N.J. : Wiley, 2017. 413 p.
14. Earnshaw W. C., Johnson G. T., Lippincott-Schwartz J., Pollard P. T. D. Cell biology. 3rd Edition. — Elsevier, 2017. — 900 p.
15. Kohen E., Santus R., Hirschberg J. G., Ozkutuk N. Atlas of cell organelles fluorescence. CRC Press, 2004. 214 p.
16. Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. Molecular cell biology. 6th edition. L.: Freeman, W. H. & Company, 2007. 1150 p.
17. Plopper G., Sharp D., Sikorski E., Lewin B. Lewin's cells. 3rd ed. USA. : Courier Companies, 2015. 1056 p.
18. Wong E. V. Cells: Molecules and Mechanisms. Axolotl Academic Publishing Company, Louisville, KY, 2009. 283 p.

КОРИСНІ ІНТЕРНЕТ-РЕСУРСИ

1. MicroscopyU: The source for microscopy education.
URL: <https://www.microscopyu.com>: (дата звернення 22.08.2023).
2. A Selection of Antique Microscope Slides from the Victorian Era. 1830s ~ 1900:
URL: <http://www.victorianmicroscopeslides.com/slides.htm>
(дата звернення 22.08.2023).
3. The Project Gutenberg eBook, Micrographia, by Robert Hooke.
URL: <http://www.gutenberg.org/files/15491/15491-h/15491-h.htm>
(дата звернення 22.08.2023).
4. Dr. Jastrows electron microscopic atlas.
URL: <http://www.drjastrow.de/EMAtlasE.html> (дата звернення 22.08.2023).
5. Mitosis: Gallery Images. MicroscopyU.
URL: <https://bit.ly/33YLWxY> : (дата звернення 22.08.2023).
6. Meiosis: Gallery Images. MicroscopyU.
URL: <https://bit.ly/33YLWxY> (дата звернення 22.08.2023).
7. Cell Cycle and Cell Division. Cell Biology. Topic Room. Scitable by nature education: Library.
URL: <https://go.nature.com/2Lu024W> (дата звернення 22.08.2023).
8. Chromosomes and Cytogenetics: Genetics. Topic Room. Scitable by nature education: Library.
URL: <https://go.nature.com/3q017k0> (дата звернення 22.08.2023).
9. Cell Biology. – Topic Room. Scitable by nature education: Library.
URL: <https://www.nature.com/scitable/topic/cell-biology-13906536/>
(дата звернення 22.08.2023).
10. 4DNUCLEOME program. URL: <https://commonfund.nih.gov/4dnucleome>
(дата звернення 22.08.2023).
11. Ou H. D., Phan S., Deerinck T. J., Thor A., Ellisman M. H., O’Shea C. C. ChromEMT: visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. Science.
URL: <https://science.sciencemag.org/content/357/6349/eaag0025>
(дата звернення 22.08.2023)
12. Atlas of plant and animal histology. URL: <https://bit.ly/2MDFp7e>
(дата звернення 22.08.2023)
13. Cell Biology and Cytochemistry : Cell Biology.
URL: <https://bit.ly/3aR5Yhk> (дата звернення 22.08.2023)
14. HarvardX : Cell Biology. URL: <https://bit.ly/3p2d5bu> (дата звернення 22.08.2023)
15. WEHImovies. URL: <https://bit.ly/3aJMbQF> (дата звернення 25.06.2023).
16. HarvardX : Cell Biology : How mitochondrial diseases are inherited.
URL: <https://bit.ly/3a08l23> (дата звернення 22.08.2023).
17. Astonishing molecular machines: Drew Berry at TEDxSydney.
URL: <https://bit.ly/36Tuvkl> (дата звернення 22.08.2023)
18. Digizyme : Cell Signaling Technologies : Molecular Landscapes.
URL: <https://bit.ly/3rwpA0K> (дата звернення 22.08.2023)

Навчальне видання

ЗАГАЛЬНА ЦИТОЛОГІЯ

ЕЛЕКТРОННІ МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

до лабораторних робіт з курсу
для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
спеціальності 091 «Біологія та біохімія»

Електронне практичне видання

Укладач:

Алексєєва Тетяна Григорівна

В авторській редакції

Затвердж. авт. 30.09.2024. Шрифт Times New Roman.
Системні вимоги: операційна система сумісна з програмним забезпеченням
для читання файлів формату PDF.
Обсяг 5,5 МБ. Зам. № 2811.

Видавець і виготовлювач
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р.
вул. Університетська, 12, м. Одеса, 65082, Україна
Тел.: (048) 723 28 39, e-mail: druk@onu.edu.ua