

Лабораторная работа № 2

Изучение защитного действия криопротекторов на устойчивость растительных клеток к действию низких температур

Теоретическая часть

При воздействии отрицательных температур в межклеточном пространстве растительных тканей образуются кристаллы льда, что приводит к повреждению клеточных мембран и обезвоживанию цитоплазмы. Увеличение количества криопротекторов в зимующих органах растений повышает водоудерживающую способность тканей и тем самым приводит к повышению их морозостойкости. **Криопротекторы** - это вещества, способные снизить повреждающее действие физико-химических факторов при воздействии на организм низких температур. Эти вещества используют при криоконсервации биообъектов. Криопротекторы разделяют на **проникающие** (низкомолекулярные вещества с молекулярной массой менее 300 Да: метилформамид, пропандиол, глицерин, этиленгликоль, метанол, диметилсульфоксид, 2-метил-2,4-пентандиол) и **непроникающие** (олигосахариды: сахароза, трегалоза и т.д., высокомолекулярные вещества: некоторые белки, фикоил, поливинилпирролидон, полиэтиленоксид, гидроксипропилкрахмал, поливинилалкоголь, полиэтиленгликоль желток куриного яйца, многие олигосахариды и др.).

Проникающие криопротекторы способны попасть внутрь клетки и препятствовать формированию кристаллов льда за счет формирования водородных связей с молекулами воды. Они сами замещают воду, что препятствует криодеструкции биологически важных макромолекул, и связывают некоторое количество свободной воды, что уменьшает общую дегидратацию клеток. Кроме того, проникающие криопротекторы образуют водородные связи с макромолекулами клетки, что стабилизирует их структуру. Проникновение низкомолекулярных криопротекторов внутрь клетки осуществляется либо путем диффузии, либо, в случае глицерина, через специальные белковые каналы — аквапорины. **Непроникающие криопротекторы** не могут пройти через цитоплазматическую мембрану и препятствуют осмотическим перепадам при замораживании и росту кристаллов внеклеточного льда. Также непроникающие криопротекторы позволяют снизить концентрацию проникающих, часто оказывающих токсическое влияние на клетку. Отмечено защитное действие непроникающих криопротекторов на фосфолипидный компонент плазматической мембраны, однако полностью защитное действие непроникающих криопротекторов не объяснено. Организмы, переносящие в природе сильные холода, часто вырабатывают внутри себя глицерин или сахара (глюкозу, трегалозу). При искусственной же криоконсервации наиболее часто используются глицерин и ДМСО.

Криопротекторы получили широкое применение в медицине и

животноводстве для длительного хранения при низких температурах крови, тканей, клеток, органов, а также эмбрионов и спермы домашних животных, используемой для искусственного осеменения.

Экспериментальная часть

Цель работы: изучить влияние различных криопротекторов на устойчивость растительных клеток к низким температурам.

Материалы и оборудование: 1 М раствор сахарозы, 1 М раствор глицерина, 8 % раствор NaCl, дистиллированная вода, пробирки, штативы для пробирок, микроскопы, термометры, стерильные препаровальные иглы, скальпели, пипетки, стеклянные палочки, предметные и покровные стекла, лед, охлаждающая смесь (3 части льда 1 часть соли температура около -20 °С), корнеплоды свеклы.

Ход работы

Из корнеплода свеклы скальпелем вырезать несколько пластинок толщиной 5 мм. Пластинки свеклы ополоснуть дистиллированной водой для полного удаления остатков клеточного сока и поместить в пробирки с различными растворами:

1. 5 мл дистиллированной воды;
2. 2,5 мл 1 М раствора сахарозы и 2,5 мл воды;
3. 5 мл 1 М раствора сахарозы;
4. 2,5 мл 1 М раствора глицерина и 2,5 мл воды;
5. 5 мл 1 М раствора глицерина;
6. 2,5 мл 1 М раствора сахарозы и 2,5 мл 1 М раствора глицерина.

Пробирки на 25 мин поместить в охлаждающую смесь. В это время приготовить микропрепарат среза корнеплода свеклы и рассмотреть его под микроскопом при увеличении 10х. Зарисовать клеточное строение корнеплода (наблюдаемое равномерное окрашивание клеток).

Вынуть пробирки из охлаждающей смеси. Перед размораживанием пронаблюдать окрашивание раствора в пробирках.

Разморозить растворы в стакане воды комнатной температуры.

Микроскопировать пластинки корнеплодов свеклы из растворов криопротекторов (увеличение 10х). В каждом препарате посчитать % окрашенных клеток. Результаты занести в таблицу.

Таблица 3 - Количество окрашенных клеток в пробирках

№	Раствор	Количество окрашенных клеток %
1	5 мл дистиллированной воды	
2	2,5 мл 1 М раствора сахарозы и 2,5 мл воды	
3	5 мл 1 М раствора сахарозы	
4	2,5 мл 1 М раствора глицерина и 2,5 мл воды	
5	5 мл 1 М раствора глицерина	
6	2,5 мл 1 М раствора сахарозы и 2,5 мл 1 М раствора глицерина	

Для проверки жизнеспособности клеток провести плазмолиз.

Плазмолиз – явление отставания протопласта от клеточной стенки при помещении клетки в гипертонический раствор вследствие выхода воды из клетки. Для этого тонкие срезы анализируемого материала поместить на 10 минут в 8% раствор NaCl. Затем препарат рассмотреть под микроскопом (увеличение 40х). Зарисовать плазмолизованные клетки из каждого варианта опыта.

На основании полученных результатов сделать вывод о том, какое из изученных веществ является наиболее эффективным криопротектором.

Контрольные вопросы:

1. Что такое криопротекторы?
2. Как проявляется повреждающее действие низких температур на живую клетку?
3. Каков механизм действия криопротекторов?
4. В чем разница между проникающими и непоникающими криопротекторами?
5. Что такое плазмолиз и как с помощью этого явления можно судить о жизнеспособности клетки?
6. Где применяют криопротекторы?