

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Саратовский государственный аграрный университет
имени Н.И. Вавилова»

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ
РАСТЕНИЙ

Краткий курс лекций
для аспирантов II курса

Направление подготовки
06.06.01 Биологические науки

Саратов 2015

УДК 303.4.02

ББК 28.5 (В-7)

Б 86

Б86 Методы исследований в физиологии и биохимии растений: краткий курс лекций для аспирантов II курса направления подготовки 03.01.05 Биологические науки // . - ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2015. – 61 с.

Краткий курс лекций по дисциплине «Методы исследований в физиологии и биохимии растений» составлен в соответствии с программой данной дисциплины и предназначен для аспирантов II года обучения направления 03.01.05 Биологические науки. Краткий курс лекций посвящен описанию методов научных исследований, применяемым в физиологии и биохимии растений, раскрываются принципы и возможности методов.

УДК 303.4.02

ББК 28.5 (В-7)

Б86

©. 2015

© ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2015

Введение

В современных условиях к профессионализму исследователей и преподавателей предъявляются серьезные требования. К перечню обязательных дисциплин добавлены дисциплины по выбору в вариативной части, среди них «Методы исследования в физиологии и биохимии растений», которая позволяет закрепить освоенные ранее и приобрести новые методы анализа химического состава растений, в частности, вторичных метаболитов, изучения биохимических реакций, лежащих в основе процессов обмена веществ, оценки степени воздействия факторов внешней среды на живые системы по изменению количества и качественного состава биологически активных веществ, а также по общему состоянию растительных клеток.

Курс лекций по дисциплине включает теоретический материал по темам, которые предусмотрены рабочей программой по данной дисциплине. Это – общая характеристика и разнообразных научных методов, их значение для разнообразных многонаправленных исследований растений, способы обработки полученных данных.

После каждой лекции представлен список литературы, которая использовалась для составления лекций, и которую можно использовать для освоения теоретического курса, подготовки к выходному контролю, практическим занятиям и написанию реферата.

ЛЕКЦИЯ 1

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ КАК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА

Вопросы:

- 1.1 Основные методы исследований в физиологии растений: лабораторные методы, вегетационные методы, полевые методы.
- 1.2 Понятие об эксперименте как методе познания. Эксперимент - основные принципы постановки.
- 1.3 Организация физиологического эксперимента во времени. Выбор темы, изучение истории вопроса, разработка рабочей гипотезы, составление программы

1.1 Основные методы исследований в физиологии растений: лабораторные методы, вегетационные методы, полевые методы.

Метод - это способ достижения цели, который объединяет субъективные и объективные моменты познания. Метод объективен, так как в разрабатываемой теории позволяет отражать действительность и ее взаимосвязи. Таким образом, метод является программой построения и практического применения теории. Одновременно метод субъективен, так как является орудием мышления исследователя и в качестве такового включает в себя его субъективные особенности. Другое определение метода – это совокупность приемов и операций практического и теоретического освоения действительности, которая позволяет решить поставленную задачу.

Методы подразделяют на: общенаучные (для всех наук); частные (для определенных наук); специальные или специфические (для данной науки). По мере развития познания один научный метод может переходить из одной категории в другую.

Общенаучные методы - это наблюдение, сравнение, счет, измерение, эксперимент, обобщение, абстрагирование, формализация, анализ и синтез, индукция и дедукция, аналогия, моделирование, идеализация, ранжирование, а также аксиоматический, гипотетический, исторический и системные методы.

Методы физиологических исследований – полевой, вегетативный, лабораторный. Объектом полевого, вегетативного методов является растение, поэтому их относят к биологической группе. Однако они обязательно сопровождаются лабораторными исследованиями, которые позволяют понять сущность происходящих в почве и растении процессов, в совокупности оказывающих влияние на урожай.

1.2 Понятие об эксперименте как методе познания. Эксперимент - основные принципы постановки

Эксперимент - одна из сфер человеческой практики, в которой подвергается проверке истинность выдвигаемых гипотез или выявляются закономерности объективного мира. В процессе эксперимента исследователь вмешивается в изучаемый процесс с целью познания, при этом одни условия опыта изолируются, другие исключаются, третьи усиливаются или ослабляются. Экспериментальное изучение объекта или явления имеет определенные преимущества по сравнению с наблюдением.

Классификация экспериментов:

Эксперименты различаются: 1) по способу формирования условий (естественных и искусственных); 2) по целям исследования (преобразующие, констатирующие,

контролирующие, поисковые, решающие); 3) по организации проведения (лабораторные, натурные, полевые, производственные и т.п.); 4) по структуре изучаемых объектов и явлений (простые, сложные); 5) по характеру внешних воздействий на объект исследования (вещественные, энергетические, информационные); 6) по характеру взаимодействия средства экспериментального исследования с объектом исследования (обычный и модельный); 7) по типу моделей, исследуемых в эксперименте (материальный и мысленный); 8) по контролируемым величинам (пассивный и активный); 9) по числу варьируемых факторов (однофакторный и многофакторный); 10) по характеру изучаемых объектов или явлений (технологические, социометрические) и т.п.

Кроме того различают, естественный, искусственный, преобразующий (созидательный), констатирующий, контролирующий, поисковый, решающий виды экспериментов.

Так, естественный эксперимент предполагает проведение опытов в естественных условиях существования объекта исследования (в биологической науке используется чаще всего). Искусственный эксперимент предполагает формирование искусственных условий (широко применяется в естественных и технических науках). Преобразующий (созидательный) эксперимент включает активное изменение структуры и функций объекта исследования в соответствии с выдвинутой гипотезой, формирование новых связей и отношений между компонентами объекта или между исследуемым объектом и другими объектами. Исследователь в соответствии со вскрытыми тенденциями развития объекта исследования преднамеренно создает условия, которые должны способствовать формированию новых свойств и качеств объекта.

Констатирующий эксперимент используется для проверки определенных предположений. В процессе этого эксперимента констатируется наличие определенной связи между воздействием на объект исследования и результатом, выявляется наличие определенных фактов.

Контролирующий эксперимент сводится к контролю за результатами внешних воздействий на объект исследования с учетом его состояния, характера воздействия и ожидаемого эффекта.

Поисковый эксперимент проводится в том случае, если затруднена классификация факторов, влияющих на изучаемое явление вследствие отсутствия достаточных предварительных (априорных) данных. По результатам поискового эксперимента устанавливается значимость факторов, осуществляется отсеивание незначимых.

Решающий эксперимент ставится для проверки справедливости основных положений фундаментальных теорий в том случае, когда две или несколько гипотез одинаково согласуются со многими явлениями. Это согласие приводит к затруднению, какую именно из гипотез считать правильной.

Лабораторный эксперимент проводится в лабораторных условиях с применением типовых приборов, специальных моделирующих установок, стендов, оборудования и т.д. Чаще всего в лабораторном эксперименте изучается не сам объект, а его образец. Этот эксперимент позволяет доброкачественно, с требуемой повторностью изучить влияние одних характеристик при варьировании других, получить хорошую научную информацию с минимальными затратами времени и ресурсов. Однако такой эксперимент не всегда полностью моделирует реальный ход изучаемого процесса, поэтому возникает потребность в проведении натурального эксперимента.

Полевой опыт может быть отнесен к группе натуральных экспериментов, так как проводится в естественных условиях и на реальных объектах.

Различие между орудиями эксперимента при моделировании позволяет выделить мысленный и материальный эксперимент.

1.3 Организация физиологического эксперимента во времени. Выбор темы, изучение истории вопроса, разработка рабочей гипотезы, составление программы

Важнейшая составная часть научных исследований – это эксперимент. Его основа научно поставленный опыт с точно учитываемыми и управляемыми условиями. Эксперимент включает научную постановку опыта, наблюдение исследуемого явления в условиях, которые позволяют следить за ходом явлений и воссоздавать его каждый раз при повторении этих условий. Цель эксперимента состоит в выявлении свойств исследуемых объектов, проверка справедливости гипотез и на этой основе более глубокое его изучение.

Методика - это совокупное и. мыслительных и физических операций, размещенных в определенной последовательности, в соответствии с которой достигается цель исследования. При разработке методик проведения эксперимента необходимо предусматривать: проведение предварительного целенаправленного наблюдения над изучаемым объектом или явлением с целью определения исходных данных (гипотез, выбора варьирующих факторов); создание условий, в которых возможно экспериментирование (подбор объектов для экспериментального воздействия, устранение влияния случайных факторов); определение пределов измерений; систематическое наблюдение за ходом развития изучаемого явления и точные описания фактов; проведение систематической регистрации измерений и оценок фактов различными средствами и способами; создание повторяющихся ситуаций, изменение характера условий и перекрестные воздействия, создание усложненных ситуаций с целью подтверждения или опровержения ранее полученных данных; переход от эмпирического изучения к логическим обобщениям, к анализу и теоретической обработке полученного фактического материала.

Перед каждым экспериментом составляется его план (программа), который включает: цель и задачи эксперимента, обоснованных состоянием изучаемого вопроса; выдвижение гипотезы или нескольких гипотез, выбор варьирующих факторов; обоснование объема эксперимент и выбор методик, числа опытов; порядок реализации опытов, определение последовательности изменения факторов; выбор шага изменения факторов, задание интервалов между будущими экспериментальными точками; обоснование средств измерений; описание проведения эксперимента; обоснование способов обработки и анализа результатов эксперимента. Планирование при постановке полевого опыта - это определение задач и объектов исследования, разработка схемы эксперимента, выбор земельного участка и оптимальной структуры полевого опыта.

При разработке плана-программы эксперимента важно соблюдать принцип наглядности без потери точности и достоверности, тщательно его проработки. Цель исследования должна быть четко сформулирована, построена логическая модель изучаемого явления, выбрана стратегия, которая определяет методы и приемы исследования.

Важный этап планирования - это изучение литературы по выбранному вопросу и выдвижение гипотезы. Она позволяет составить схему или схемы опытов. Обязательно указываются методики и техника эксперимента. На этапе планирования важно правильно выбрать полевой или лабораторный опыт. Полевые опыты сопровождаются однократными или многократными наблюдениями за количественными или качественными показателями состояния растений и за условиями среды. Какие наблюдения, анализы, учеты включить в программу, в какие сроки проводить наблюдения, оптимальный набор выборок необходимо определить заранее.

Первичная обработка данных включает агрономический анализ полученных данных, первичную цифровую обработку материалов, статистическую оценку результатов исследования.

Вопросы для самоконтроля:

1. Понятие о методах физиологических исследований.
2. Последовательность организации физиологического эксперимента.

Список литературы:

а) основная литература (библиотека СГАУ):

1. **Пискунов, А. С.** Методы агрохимических исследований/ А. С. Пискунов. – М.: КолосС, 2004. - 312 с. - ISBN 5-9532-0145-1.
2. **Кирюшин, Б. Д.** Основы научных исследований в агрономии/ Б. Д. Кирюшин, Б. Д. Усманов, И. П. Васильев. - М.: КолосС, 2009. - 398 с. - ISBN 9785-9532-0497-2.
3. **Ягодин, Б. А.** Агрохимия/ Б. А. Ягодин, Ю. П. Жуков, В. И. Кобзаренко – М.: Мир, 2004. -584 с. - ISBN 5-03-003615-6.

б) дополнительная литература:

1. **Березкин, В. Г.** Газовая хроматография в химии полимеров/ В. Г. Березкин, В. Р. Алишоев, И. Б. Немировская - М.: Наука, 1972. - 287 с.
2. **Березкин, В. Г.** Количественная тонкослойная хроматография/ В. Г. Березкин, А. С. Бочков. - М.: Наука, 1980. - 183 с.
3. **Бутенко, Р. Г.** Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений/ Р. Г. Бутенко. - М.: Наука, 1964. – 272 с.
4. **Васильев, В. П.** Аналитическая химия: в 2-х т. Т.2. / В. П. Васильев. - М.: Высшая школа, 1989. - 384 с.
5. **Диксон, М.** Ферменты. Т.1 /М. Диксон, Э. Уэбб; пер. англ. - М.: Мир, 1982. - 392 с.
6. **Доспехов, Б. А.** Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. — 5-е изд., доп. и перераб. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.: ил.
7. **Доспехов, Б. А.** Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных: учебное пособие для высш. с.-х. учеб. заведений/ Б. А. Доспехов. - М.: Колос, 1972. - 207 с.
8. **Ермаков, А. И.** Методы биохимического исследования растений /А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.
9. Жидкостная колоночная хроматография. В 3 т. / Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака. - М.: Мир, 1972.
10. Ионметрия в неорганическом анализе/ Л. А. Демина, Н. Б. Краснова, Б. С. Юрищева и [др.]. - М.: Химия, 1991. -192 с.
11. **Корыта, И.** Ионоселективные электроды/ И. Корыта, К. Штулик. - М.: Мир, 1989. - 266 с.
12. **Кочетов, Г. А.** Практическое руководство по энзимологии/ Г. А. Кочетов. - М.: Высшая школа, 1989. – 262 с.

ЛЕКЦИЯ 2

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вопросы:

2.1 Понятие о хроматографии.

2.2 Основные виды хроматографии: Адсорбционная хроматография. Ионообменная хроматография. Жидкостная хроматография. Бумажная хроматография. Тонкослойная хроматография Гель-фильтрационная, или молекулярно-ситовая, хроматография. Афинная хроматография. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), Газовая хроматография.

2.1 Понятие о хроматографии

Хроматография – процесс, основанный на многократном повторении актов сорбции и десорбции вещества при перемещении его в потоке подвижной фазы вдоль неподвижного сорбента. Разделение сложных смесей хроматографическим способом основано на различной сорбируемости компонентов смеси. В процессе хроматографирования так называемая подвижная фаза (элюент), содержащая анализируемую пробу, перемещается через неподвижную фазу. Обычно неподвижная фаза представляет собой вещество с развитой поверхностью, а подвижная – поток газа или жидкости, фильтрующейся через слой сорбента. При этом происходит многократное повторение актов сорбции – десорбции, что является характерной особенностью хроматографического процесса и обуславливает эффективность хроматографического разделения.

Качественный хроматографический анализ, т.е. индентификация вещества по его хроматограмме, может быть выполнен сравнением хроматографических характеристик, чаще всего удерживаемого объема (т.е. объема подвижной фазы, пропущенной через колонку от начала ввода смеси до появления данного компонента на выходе из колонки), найденных при определенных условиях для компонентов анализируемой смеси и для эталона.

Количественный хроматографический анализ проводят обычно на хроматографе. Метод основан на измерении различных параметров хроматографического пика, зависящих от концентрации хроматографируемых веществ – высоты, ширины, площади и удерживаемого объема или произведения удерживаемого объема на высоту пика.

В количественной газовой хроматографии применяют методы абсолютной градуировки и внутренней нормализации, или нормировки. Используется также метод внутреннего стандарта. При абсолютной градуировке экспериментально определяют зависимость высоты или площади пика от концентрации вещества и строят градуировочные графики или рассчитывают соответствующие коэффициенты. Далее определяют те же характеристики пиков в анализируемой смеси, и по градуировочному графику находят концентрацию анализируемого вещества. Этот простой и точный метод является основным при определении микропримесей.

При использовании метода внутренней нормализации принимают сумму каких-либо параметров пиков, например, сумму высот всех пиков или сумму их площадей, за 100%. Тогда отношение высоты отдельного пика к сумме высот или отношение площади одного пика к сумме площадей при умножении на 100 будет характеризовать массовую долю (%) компонента в смеси. При таком подходе необходимо, чтобы зависимость величины измеряемого параметра от концентрации была одинаковой для всех компонентов смеси.

Хроматография впервые была введена в аналитическую практику русским ботаником М.С. Цветом. В первых же работах с помощью этого метода М.С. Цвет установил, что считавшийся однородным зеленый пигмент растений хлорофилл на самом

деле состоит из нескольких веществ. При пропускании экстракта зеленого листа через колонку, заполненную порошком мела, и промывании петролейным эфиром он получил несколько окрашенных зон, что несомненно говорило о наличии в экстракте нескольких веществ. Впоследствии это было подтверждено другими исследователями. Этот метод он назвал хроматографией, хотя сам же указал на возможность разделения и бесцветных веществ.

Вещество подвижной фазы непрерывно вступает в контакт с новыми участками адсорбента и частью адсорбируется, а адсорбированное вещество контактирует со свежими порциями подвижной фазы и частично десорбируется.

Таким образом, создателю хроматографического метода был известен один механизм взаимодействия разделяемых веществ с материалом колонки – молекулярная адсорбция.

М.С. Цвет сформулировал закон, который назвал законом адсорбционного замещения:

Вещества, растворенные в определенной жидкости, образуют определенный адсорбционный ряд А, В, С, и т.д., выражающий относительное адсорбционное сродство его членов к адсорбенту. Каждый из членов адсорбционного ряда, обладая большим адсорбционным сродством, чем последующий, вытесняет его из соединения и в свою очередь вытесняется предыдущим.

Таким образом, основным условием для осуществления хроматографического процесса – процесса разделения веществ на колонке – М.С. Цвет считал различие в адсорбируемости. В современной хроматографии для разделения веществ кроме молекулярной адсорбции используют и другие физико-химические явления.

2.2 Основные виды хроматографии

В настоящее время используются виды хроматографии классифицируют:

По агрегатному состоянию применяемых фаз. Согласно этой классификации хроматографию подразделяют на газовую и жидкостную. Газовая включает газожидкостную и газо-адсорбционную хроматографию. Жидкостная хроматография подразделяется на жидкостно – жидкостную, жидкостно – адсорбционную и жидкостно – гелевую. Первое слово в этой классификации характеризует агрегатное состояние подвижной фазы.

По механизмам разделения, т.е. по характеру взаимодействия между сорбентом и сорбатом. По этой классификации хроматографию подразделяют на следующие виды:

1. адсорбционная хроматография – разделение основано на различии в адсорбируемости разделяемых веществ твердым адсорбентом;

2. распределительная хроматография – разделение основано на различии в растворимости разделяемых веществ в неподвижной фазе (газовая хроматография) и на различии в растворимости разделяемых веществ в подвижной и неподвижной жидких фазах;

3. ионообменная хроматография – разделение основано на различии в способности разделяемых веществ к ионному обмену;

4. проникающая хроматография – разделение основано на различии в размерах или формах молекул разделяемых веществ, например, при применении молекулярных сит (цеолитов);

5. осадочная хроматография – разделение основано на образовании различных по растворимости осадков разделяемых веществ с сорбентом;

6. адсорбционно-комплексобразовательная хроматография – разделение основано на образовании координационных соединений различной прочности в фазе или на поверхности адсорбента.

Следует иметь в виду, что очень часто процесс разделения протекает по нескольким механизмам.

По применяемой технике:

1. колоночная хроматография – разделение веществ проводится в специальных колонках;

2. плоскостная хроматография: а – бумажная – разделение веществ проводится на специальной бумаге; б – тонкослойная – разделение веществ проводится в тонком слое сорбента.

В колоночной и тонкослойной хроматографии можно использовать любой из приведенных выше механизмов разделения, в бумажной хроматографии чаще всего применяют распределительный и ионообменный механизмы.

По способу относительного перемещения фаз различают фронтальную, или элюэнтную, и вытеснительную хроматографию.

Фронтальный метод.

Это простейший по методике вариант хроматографии. Он состоит в том, что через колонку с адсорбентом непрерывно пропускают анализируемую смесь, например, компонентов А и В в растворителе Solv. В растворе, вытекающем из колонки, определяют концентрацию каждого компонента и строят график в координатах концентрация вещества – объем раствора, прошедшего через колонку. Эту зависимость обычно и называют хроматограммой или выходной кривой. Вследствие сорбции веществ А и В сначала из колонки будет вытекать растворитель Solv, а затем растворитель и менее сорбирующийся компонент А, затем и компонент В и, таким образом, через некоторое время состав раствора при прохождении через колонку меняться не будет. Метод применяется, например, для очистки раствора от примесей, если они сорбируются существенно лучше, чем основной компонент, или для выделения из смеси наиболее слабо сорбирующегося вещества.

Проявительный (элюэнтный) метод.

При работе по этому методу в колонку вводят порцию анализируемой смеси, содержащей компоненты А и В в растворителе Solv, и колонку непрерывно промывают газом-носителем или растворителем Solv. При этом компоненты анализируемой смеси разделяются на зоны: хорошо сорбирующееся вещество В занимает верхнюю часть колонки, а менее сорбирующийся компонент А будет занимать нижнюю часть. В газе или растворе, вытекающем из колонки, сначала появляется компонент А, далее – чистый растворитель, а затем компонент В. Чем больше концентрация компонента, тем выше пик и больше его площадь, что составляет основу количественного хроматографического анализа. Проявительный метод дает возможность разделять сложные смеси, он наиболее часто применяется в практике. Недостатком метода является уменьшение концентрации выходящих растворов за счет разбавления растворителем или газом-носителем.

Вытеснительный метод. В этом методе анализируемую смесь компонентов А и В в растворителе Solv вводят в колонку и промывают раствором вещества D (вытеснитель), которое сорбируется лучше, чем любой из компонентов анализируемой смеси.

Концентрация раствора при хроматографировании не уменьшается, в отличие от проявительного метода. Существенным недостатком вытеснительного метода является возможное наложение зоны одного вещества на зону другого, поскольку зоны компонентов в этом методе не разделены зоной растворителя.

В хроматографии чаще всего используют методику проявительного (элюэнтного) анализа, в этом случае наблюдаемый пик в координатах концентрация - объем называют хроматографическим пиком и характеризуют высотой, шириной и площадью.

В аналитической практике широко используют метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Это связано с чрезвычайным разнообразием жидких неподвижных фаз, что облегчает выбор селективной для данного анализа фазы. Для обеспечения селективности колонки важно правильно выбрать неподвижную жидкую фазу. Эта фаза должна быть

хорошим растворителем для компонентов смеси (если растворимость мала, компоненты выходят из колонки очень быстро), нелетучей (чтобы не испарялась при рабочей температуре колонки), химически инертной, должна обладать небольшой вязкостью (иначе замедляется процесс диффузии) и при нанесении на носитель образовывать равномерную пленку, прочно с ним связанную. Разделительная способность неподвижной фазы для компонентов данной пробы должна быть максимальной.

Носители неподвижных жидких фаз.

Твердые носители для диспергирования неподвижной жидкой фазы в виде однородной тонкой пленки должны быть механически прочными с умеренной удельной поверхностью (порядка 20 м²/г), небольшим и одинаковым размером частиц, а также быть достаточно инертными, чтобы адсорбция на поверхности раздела твердой и газообразной фаз была минимальной. Самая слабая адсорбция наблюдается на носителях из силанизированного хромосорбата, стеклянных гранул и флуоропака (фторуглеродный полимер). Кроме того, твердые носители не должны реагировать на повышение температуры и должны легко смачиваться жидкой фазой. В газовой хроматографии хелатов в качестве твердого носителя чаще используют силанизированные диатомитовые носители – диамитовый кремнезем, или кизельгур.

Газожидкостная хроматография (ГЖХ) – один из самых современных методов многокомпонентного анализа. Его отличительные черты – экспрессность, высокая точность, чувствительность, возможность автоматизации. Метод позволяет решить многие аналитические проблемы. Количественный ГЖХ анализ можно рассматривать как самостоятельный аналитический метод, более эффективный при разделении веществ, относящихся к одному и тому же классу.

Жидкостно-жидкостная хроматография по сути близка к газо-жидкостной. На твердый носитель также наносится пленка жидкой фазы, и через колонку, наполненную таким сорбентом, пропускают жидкий раствор. Этот вид хроматографии называют жидкостно-жидкостной распределительной хроматографией. Жидкость, нанесенную на носитель, называют неподвижной жидкой фазой, а растворитель, передвигающийся через носитель, - подвижной жидкой фазой. Жидкостно-жидкостная хроматография проводится в колонке (колоночный вариант) или на бумаге (бумажная хроматография, хроматография на бумаге).

Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ), разработанный Н.А. Измайловым и М. С. Шрайбер в 1938 г., получил в настоящее время широкое распространение.

В методе ТСХ неподвижная твердая фаза тонким слоем наносится на стеклянную, металлическую или пластмассовую пластинку. В 2–3 см от края пластинки на стартовую линию вносят пробу анализируемой жидкости и край пластинки погружают в растворитель, который действует как подвижная фаза жидкостной адсорбционной хроматографии. Под действием капиллярных сил растворитель движется вдоль слоя сорбента и с разной скоростью переносит компоненты смеси, что приводит к их разделению. Диффузия в тонком слое происходит в продольном и поперечном направлениях, поэтому процесс следует рассматривать как двумерный.

Вопросы для самоконтроля:

1. Что такое хроматография?
2. Какие принципы положены в основу данного метода?
3. Какие виды хроматографического исследования существуют в настоящее время?
4. Как применяется хроматографический метод при исследовании растений?

Список литературы:

а) основная литература (библиотека СГАУ):

1. **Пискунов, А. С.** Методы агрохимических исследований/ А. С. Пискунов. – М.: КолосС, 2004. - 312 с. - ISBN 5-9532-0145-1.
2. **Кирюшин, Б. Д.** Основы научных исследований в агрономии/ Б. Д. Кирюшин, Б. Д. Усманов, И. П. Васильев. - М.: КолосС, 2009. - 398 с. - ISBN 9785-9532-0497-2.
3. **Ягодин, Б. А.** Агрохимия/ Б. А. Ягодин, Ю. П. Жуков, В. И. Кобзаренко – М.: Мир, 2004. -584 с. - ISBN 5-03-003615-6.

б) дополнительная литература:

1. **Березкин, В. Г.** Газовая хроматография в химии полимеров/ В. Г. Березкин, В. Р. Алишоев, И. Б. Немировская - М.: Наука, 1972. - 287 с.
2. **Березкин, В. Г.** Количественная тонкослойная хроматография/ В. Г. Березкин, А. С. Бочков. - М.: Наука, 1980. - 183 с.
3. **Бутенко, Р. Г.** Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений/ Р. Г. Бутенко. - М.: Наука, 1964. – 272 с.
4. **Васильев, В. П.** Аналитическая химия: в 2-х т. Т.2. / В. П. Васильев. - М.: Высшая школа, 1989. - 384 с.
5. **Диксон, М.** Ферменты. Т.1 /М. Диксон, Э. Уэбб; пер. англ. - М.: Мир, 1982. - 392 с.
6. **Доспехов, Б. А.** Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. — 5-е изд., доп. и перераб. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.: ил.
7. **Доспехов, Б. А.** Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных: учебное пособие для высш. с.-х. учеб. заведений/ Б. А. Доспехов. - М.: Колос, 1972. - 207 с.
8. **Ермаков, А. И.** Методы биохимического исследования растений /А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.
9. Жидкостная колоночная хроматография. В 3 т. / Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака. - М.: Мир, 1972.

ЛЕКЦИЯ 3

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Вопросы:

3.1 Понятие об электронной микроскопии. Физические основы метода. Разрешающая способность. Виды электронных микроскопов. Применение электронных микроскопов в физиологии растений

3.2 Подготовка биологического препарата.

3.3 Конфокальная микроскопия. Отличие от классической оптической микроскопии. Разрешение. Применение.

3.1 Понятие об электронной микроскопии.

Физические основы метода. Разрешающая способность. Виды электронных микроскопов. Применение электронных микроскопов в физиологии растений

Электронная микроскопия — это метод исследования структур, находящихся вне пределов видимости светового микроскопа и имеющих размеры менее одного микрона (от 1 мк до 1—5 Å). Действие электронного микроскопа основано на использовании направленного потока электронов, который выполняет роль светового луча в световом микроскопе, а роль линз играют магниты (магнитные линзы). Вследствие того, что различные участки исследуемого объекта по-разному задерживают электроны, на экране электронного микроскопа получается черно-белое изображение изучаемого объекта, увеличенное в десятки и сотни тысяч раз.

В биологии и медицине в основном используются **электронные микроскопы просвечивающего типа**.

Электронную микроскопию называют также совокупностью методов исследования с помощью электронных микроскопов микроструктур тел - до атомно-молекулярного уровня, их состава и локализованных на поверхностях или в микрообъемах тел электрических и магнитных полей.

Электронная микроскопия возникла в 30-х годах, когда были получены первые изображения некоторых вирусов (вируса табачной мозаики и бактериофагов). В настоящее время электронная микроскопия нашла наиболее широкое применение в цитологии, микробиологии и вирусологии, при этом возникли новых отраслей науки.

Электронная микроскопия в сочетании с биохимическими, цитохимическими методами исследования, иммунофлюоресценцией, а также рентгеноструктурным анализом позволяют судить о составе и функции структурных элементов клеток и вирусов.

Как самостоятельное научное направление электронная микроскопия решает следующие задачи:

- усовершенствование и разработку новых электронных и других корпускулярных микроскопов (напр., протонного микроскопа) и приставок к ним;
- разработка методик препарирования образцов, исследуемых в электронных микроскопах;
- изучение механизмов формирования электронно-оптических изображений;
- разработка способов анализа разнообразной информации, получаемой с помощью электронных микроскопов.

Основная часть электронного микроскопа представляет собой полый цилиндр (колонка микроскопа), из которого откачан воздух для того, чтобы не было взаимодействия электронов с молекулами газов и окисления вольфрамовой нити накаливания в катодной электронной пушки. Между катодом и анодом подается высокое напряжение (от 50 до 200-5000 кВ), что служит причиной ускорения электронов. В центре анода есть отверстие, проходя через которое электроны формируют пучок, идущий вниз по колонке микроскопа.

Линзы электронного микроскопа представляют собой электромагниты, поле которых может изменять путь электронов (как стеклянные линзы изменяют путь фотонов). В конденсорной линзе пучок электронов фиксируется и попадает на объект, с которым электроны взаимодействуют, отклоняются, рассеиваются, поглощаются или проходят без изменения. Электроны, прошедшие через объект, фокусируются объективной линзой, которая формирует увеличенное первичное изображение объекта. Так же как в световом микроскопе, объективная линза определяет его основные показатели. Первичное изображение увеличивается проекционной линзой и проецируется на экран, покрытый люминесцентным слоем, светящимся при попадании на него электронов. Вместо светящегося экрана изображение можно поместить на фотопластинку и получить снимок. Напряжение, которое используется для ускорения электронов в большинстве просвечивающих (трансмиссионных) электронных микроскопов, достигает 50-150 кВ. При напряжении в 50 кВ электрон обладает длиной волны в 0,05 А, и в этом случае теоретически можно было бы получить разрешение в 0,025 А ($d \sim 0,5 \lambda$).

Однако в современных конструкциях электронных микроскопов достигается разрешение около 1 А (0,1 нм) из-за недостаточной стабильности напряжения, стабильности тока линз, неоднородности металла магнитных линз и других несовершенств прибора (теоретически возможно еще повысить разрешение электронного микроскопа в 100 раз). Но и достигнутое разрешение огромно (величина О-Н связи в молекуле воды равна 0,99 А): оно сейчас уже в 10^6 раз выше разрешающей способности глаза!

По принципу конструкции электронный микроскоп очень сходен с оптическим: в нем есть источник освещения (катод электронной пушки), конденсорная система (конденсорная магнитная линза), объектив (объективная магнитная линза), окуляр (проекционные магнитные линзы), только вместо сетчатки глаза электроны попадают на люминесцирующий экран или на фотопластинку.

В настоящее время максимальное разрешение электронного микроскопа (ЭМ) реализуется только при исследовании металлов или кристаллических решеток. На биологических объектах такого разрешения получить пока не удастся из-за низкой контрастности объекта.

В настоящее время электронно-микроскопическое изображение с флуоресцирующего экрана с помощью цифровой телекамеры может передаваться прямо в компьютер, где на экране монитора его обрабатывают различным образом (изменяют увеличение, контрастность изображения, проводят морфометрию отдельных компонентов и т.д.).

3.2 Подготовка биологического препарата

При электронной микроскопии биологических объектов применяют специальные методы приготовления препаратов. Это необходимо для выявления отдельных компонентов изучаемых объектов (клетки, бактерии, вируса и т. д.), а также для сохранения их структуры в условиях высокого вакуума под пучком электронов. При помощи электронной микроскопии изучается внешняя форма объекта, молекулярная организация его поверхности, с помощью метода ультратонких срезов исследуется внутреннее строение объекта. Объекты исследования в электронной микроскопии - обычно твердые тела.

В просвечивающих электронных микроскопах (ПЭМ), в которых электроны с энергиями от 1 кэВ до 5 МэВ проходят сквозь объект, изучаются образцы в виде тонких плёнок, фольги, срезов толщиной от 1 нм до 10 мкм.

Порошки, микрокристаллы, аэрозоли и т. п. можно изучать, нанеся их предварительно на подложку- тонкую плёнку для исследования в ПЭМ или массивную подложку для исследования в растровых электронных микроскопах (РЭМ).

Поверхностную и приповерхностную структуру массивных тел толщиной существенно больше 1 мкм исследуют с помощью РЭМ, отражательных и зеркальных, а также ионных проекторов и электронных проекторов. Поверхностная геом. структура массивных тел изучается также и методом реплик: с поверхности такого тела снимается реплика-

отпечаток в виде тонкой плёнки углерода, коллодия, формвара и т. п., повторяющая рельеф поверхности, и рассматривается в ПЭМ. Обычно предварительно на реплику в вакууме напыляется под скользящим углом слой сильно рассеивающего электроны тяжёлого металла (напр., Pt), оттеняющего выступы и впадины геом. рельефа.

Метод декорирования позволяет исследовать не только геометрическую структуру поверхностей, но и электрическую, т. е. микрополя, обусловленные наличием дислокаций, скоплений точечных дефектов, ступенями роста кристаллических граней, доменной структурой. При таком методе исследования на поверхность образца вначале напыляется очень тонкий слой декорирующих частиц (атомы тяжёлого металла с большим коэффициентом поверхностной диффузии, молекулы полупроводников или диэлектриков), осаждающихся преимущественно на участках сосредоточения микрополей, а затем снимается реплика с включениями декорирующих микрополя части о принципе конструкции электронный микроскоп очень сходен с оптическим: в нем есть источник освещения (катод электронной пушки), конденсорная система (конденсорная магнитная линза), объектив (объективная магнитная линза), окуляр (проекционные магнитные линзы), только вместо сетчатки глаза электроны попадают на люминесцирующий экран или на фотопластинку.

Биологические объекты для исследования в ЭМ помещаются на медные сеточки, покрытые тонкими пленками – подложками (формвар, коллодий, углерод), состоящими в основном из углерода. Минимальная толщина биологического объекта с плотностью около 1 г/см^3 , выявляемого при ускоряющем напряжении в электронном микроскопе 50 кВ, равна 50 А. Вирусы, расположенные на поддерживающей пленке, видны в этом случае в виде бесструктурных пятен, а молекулы нуклеиновых кислот (толщина ДНК равна 20 А) вообще не видны из-за низкого контраста. Контраст биологических объектов повышают, используя тяжелые металлы или их соли.

Ультрамикротомия.

При прохождении пучка электронов через биологический объект часть электронов поглощается, что приводит к нагреванию объекта и к его деформации. В этой связи требуется готовить очень тонкие объекты (не выше 0,1 мкм). Процедура их изготовления сходна с той, что используется в световой микроскопии. Клетки и ткани для этого сначала фиксируют. В качестве фиксаторов используются буферные растворы глутарового альдегида или четырехоксида осмия. Применяется двойная фиксация: сначала глутаровым альдегидом, а затем осмием, который как тяжелый металл контрастирует клеточные структуры. Затем, после обезвоживания, ткани пропитываются эпоксидными смолами или другими пластиками в жидкой, мономерной форме. При полимеризации таких пластмасс пропитанный ими объект оказывается заключенным в твердые блоки, которые уже можно резать на тонкие срезы. Тонкие срезы готовятся с помощью использования специальных приборов – ультрамикротомов. Площадь получаемых ультратонких срезов обычно очень мала (0,1-1 мм^2), поэтому все операции при ультрамикротомировании идут под микроскопическим контролем. Срезы, смонтированные на сетках с подложкой, дополнительно контрастируют – «окрашивают» с помощью солей тяжелых металлов. Для этого используют соли свинца и урана, которые связываясь с внутриклеточными структурами на срезе, позитивно их контрастируют.

В электронно-микроскопических исследованиях возможно применение радиоавтографии. В этом случае используются сверхтонкозернистые эмульсии (величина гранул около 0,02-0,06 мкм).

Криоультрамикротомия

Все большее применение получают методы получения срезов с замороженных тканей, моментально охлажденных до температуры жидкого азота (-196°C). При этом происходит практически одномоментное торможение всех метаболических процессов, а вода из жидкой фазы переходит в твердую, но не кристаллическую, ее молекулярная структура

беспорядочна (стекловидное состояние). Такие твердые блоки при температуре жидкого азота можно резать на ультратонкие срезы.

Во время проведения иммунохимических исследований используют антитела, связанные с частицами коллоидного золота, локализованного на препаратах и указывающего места расположения искомого антигена.

Метод замораживания–скальвания

Метод замораживания и скальвания используется для изучения структуры различных мембранных компонентов клетки. Метод основан на том, что объект сначала быстро замораживают жидким азотом, а затем при той же температуре переносят в специальную вакуумную установку. Там замороженный объект механическим способом скальвается охлажденным ножом. При этом обнажаются внутренние зоны замороженных клеток. В вакууме часть воды, перешедшей в стекловидную форму, возгоняется («травление»), а поверхность скола последовательно покрывается тонким слоем испаренного углерода, а затем металла. С замороженного и сохраняющего прижизненную структуру материала получают реплику скола. Затем уже в условиях комнатной температуры ткань или клетки растворяют в кислотах, но пленка-реплика при этом остается целая, ее изучают в электронном микроскопе. Данный метод позволил увидеть, что как на поверхности, так и в толщине клеточных мембран располагаются глобулы интегральных белков, что мембраны не однородны по своей структуре.

Метод контрастирования корпускулярных объектов. Корпускулярными объектами называют частички вирусов, фагов, выделенные клеточные компоненты (рибосомы, мембраны, вакуоли и т.д.), макромолекулы.

Оттенивание металлами

Широко распространенным методом контрастирования биологических объектов является оттенивание металлами. Проводят его следующим образом. В специальных вакуумных установках производится термическое испарение металла при котором атомы металла разлетаются от места испарения по прямым траекториям. Встречаясь с биологическим объектом, они осаждаются на нем в виде слоя; его толщина больше в местах, перпендикулярных направлению полета частиц металла. В участках, где объект экранирует пучок частиц, возникнут «тени». Следовательно, напыленная часть объекта имеет большую плотность, чем напыленная подложка (фон), и поэтому объект виден. Метод широко применяется не только для контрастирования вирусов, рибосом, но и для достаточно тонких молекул нуклеиновых кислот. Для контрастирования используются платина, палладий, их сплавы, уран.

Негативное контрастирование

При негативном контрастировании объектов растворами солей тяжелых металлов применяют молибденовокислый аммоний, уранилацетат, фосфорно-вольфрамовую кислоту (ФВК). Водные растворы таких веществ смешивают с биологическими объектами, а затем их наносят на пленки-подложки и высушивают. После этого объекты (например, вирусы) оказываются как бы погруженными в тонкий слой аморфного вещества высокой плотности. В электронном микроскопе они выглядят как светлые объекты на темном фоне (как фотонегатив). Преимущества метода заключаются в том, что растворенные соли могут проникать вглубь объекта и выявлять дополнительные его детали. Негативное контрастирование широко применяется при изучении вирусов, ферментных комплексов мембран. Соли тяжелых металлов используют при позитивном контрастировании. В этом случае контрастирующее вещество связывается со структурой, повышает ее электронную плотность. Часто для позитивного контрастирования нуклеиновых кислот используют растворы уранилацетата в спирте или в ацетоне.

Метод высоковольтной микроскопии

В настоящее время изготовлены приборы с ускоряющим напряжением 1-3 млн. вольт. Преимущество высоковольтных электронных микроскопов заключается в том, что на них можно получить не только более высокое разрешение, но и просматривать образцы большой толщины (1-10 мкм). Одновременно с высоковольтной микроскопией использование стереоскопической съемки позволяет получать информацию о трехмерной организации внутриклеточных структур с высоким их разрешением (около 0,5 нм).

Метод сканирующей (растровой) электронной микроскопии

Данный метод даёт трехмерную картину поверхности клетки. При сканирующей электронной микроскопии пучок электронов (зонд) пробегает по поверхности объекта, и полученная информация передается на электронно-лучевую трубку.

Растровая микроскопия

С помощью растровой электронной микроскопии можно получить информацию о химическом составе в тех или иных участках клеток. Например, метод рентгеноспектрального микроанализа основан на идентификации и количественной оценке содержания химических элементов по спектрам характеристического рентгеновского излучения, возникающего при взаимодействии первичных электронов с атомами объекта.

3.3 Конфокальная микроскопия. Отличие от классической оптической микроскопии. Разрешение. Применение.

Конфокальная микроскопия— это один из методов световой микроскопии, а конфокальный микроскоп— оптический прибор, поэтому на него распространяется ряд ограничений, присущий таким приборам, например, дифракционные эффекты, зависящие от длины волны излучения. Один из недостатков обычного светового микроскопа—внефокусные лучи, которые снижают контраст изображения. Если в оптическую схему микроскопа ввести специальную диафрагму, расположенную в плоскости промежуточного изображения, то она пропустит только те световые лучи, которые исходят из очень небольшой области объекта. Диафрагма будет играть роль пространственного фильтра. Чем меньше диаметр диафрагмы, тем меньше размеры этой области. Однако в этом случае получается изображение только одного элементарного объема(voxel), причем необязательно освещать весь объект, достаточно освещение именно этого объема. Полное изображение объекта в конфокальном микроскопе формируется при последовательном просмотре этих элементарных объемов с применением различных сканирующих систем. Накопление информации происходит либо благодаря свойству инерционности зрения при быстром сканировании, либо посредством использования фотоприемников и электронных запоминающих устройств.

Таким образом, конфокальная микроскопия обеспечивает увеличение контраста изображения за счет фильтрации внефокусных лучей.

Первый патент на конфокальный микроскоп был получен Марвином Мински в 1957 году.

Конфокальный— значит «софокусный». Благодаря такому устройству микроскопа можно получить изображение с очень тонкого слоя объекта; получается т.н. «оптический срез» (slice). Изображение более контрастное и четкое (т.е. имеющее более высокое разрешение) по сравнению с обычной световой микроскопией. Записав в памяти компьютера серию оптических срезов, можно провести объемную реконструкцию объекта и получить его трехмерное изображение, не используя трудоемкую методику изготовления и фотографирования серийных гистологических срезов. Современные конфокальные микроскопы обычно имеют несколько фотоприемных каналов, благодаря которым можно

получить изображения одновременно в нескольких спектральных областях, т.е.использовать несколько флуорохромов.

Основные преимущества конфокальной микроскопии по сравнению с обычной световой микроскопией являются:

- Высокая контрастность изображения.
- Улучшенная разрешающая способность (латеральная в 1.4 раза, аксиальная – в зависимости от размера конфокальной диафрагмы).
- Получение «оптических срезов», трехмерная реконструкция.
- Мультиспектральные исследования с высокой степенью разделения сигналов от разных флуорохромов.
- Возможности применения методов цифровой обработки изображений.

Недостатки конфокальной микроскопии:

- Сложность настройки прибора.
- Отсутствие в ЛСКМ «оптического» изображения. Оно существует только в цифровой форме и отображается на экране монитора.
- Высокая стоимость оборудования и его эксплуатации.

Вопросы для самоконтроля:

1. Что такое электронная микроскопия?
2. Какие задачи решают с помощью электронной микроскопии в физиологии растений?
3. Как подготавливают растительный образец к проведению исследования с помощью электронного микроскопа?
4. Какие особенности характеризуют конфокальную микроскопию?

Список литературы:

а) основная литература (библиотека СГАУ):

1. **Пискунов, А. С.** Методы агрохимических исследований/ А. С. Пискунов. – М.: КолосС, 2004. - 312 с. - ISBN 5-9532-0145-1.
2. **Кирюшин, Б. Д.** Основы научных исследований в агрономии/ Б. Д. Кирюшин, Б. Д. Усманов, И. П. Васильев. - М.: КолосС, 2009. - 398 с. - ISBN 9785-9532-0497-2.
3. **Штейн, Г.И.** Руководство по конфокальной микроскопии/ Г. И. Штейн. - СПб: ИНЦ РАН, 2007. – 77 с.

б) дополнительная литература:

1. **Березкин, В. Г.** Газовая хроматография в химии полимеров/ В. Г. Березкин, В. Р. Алишоев, И. Б. Немировская - М.: Наука, 1972. - 287 с.
2. **Березкин, В. Г.** Количественная тонкослойная хроматография/ В. Г. Березкин, А. С. Бочков. - М.: Наука, 1980. - 183 с.
3. **Бутенко, Р. Г.** Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений/ Р. Г. Бутенко. - М.: Наука, 1964. – 272 с.
4. **Диксон, М.** Ферменты. Т.1 /М. Диксон, Э. Уэбб; пер. англ. - М.: Мир, 1982. - 392 с.
5. **Доспехов, Б. А.** Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. — 5-е изд., доп. и перераб. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.: ил.
6. **Доспехов, Б. А.** Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных: учебное пособие для высш. с.-х. учеб. заведений/ Б. А. Доспехов. - М.: Колос, 1972. - 207 с.
7. **Ермаков, А. И.** Методы биохимического исследования растений /А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.
8. **Ионометрия в неорганическом анализе/ Л. А. Демина, Н. Б. Краснова, Б. С. Юрищева и [др.]. - М.: Химия, 1991. -192 с.**

ЛЕКЦИЯ 4

ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Вопросы:

4.1 Понятие об оптических методах исследования. Рефрактометрия, поляриметрия, абсорбционные оптические методы.

4.2 Рефрактометрический анализ. Поляриметрический метод.

4.1 Понятие об оптических методах исследования. Рефрактометрия, поляриметрия, абсорбционные оптические методы.

Оптические абсорбционные методы — это методы анализа, основанные на поглощении электромагнитного излучения анализируемыми веществами. Именно оптические абсорбционные методы получили широкое распространение в научно-исследовательских и сертификационных лабораториях. При поглощении света атомы и молекулы поглощающих веществ переходят в новое возбужденное состояние. В зависимости от вида поглощающих веществ и способа трансформирования поглощенной энергии различают атомно-абсорбционный, молекулярно-абсорбционный анализ, нефелометрию и люминесцентный анализ.

Атомно-абсорбционный анализ основан на поглощении световой энергии атомами анализируемых веществ.

Молекулярный абсорбционный анализ основан на поглощении света молекулами анализируемого вещества и сложными ионами в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной областях спектра (спектрофотометрия, фотокolorиметрия, ИК-спектроскопия).

Фотокolorиметрия и спектрофотометрия основаны на взаимодействии излучения с однородными системами, их обычно объединяют в одну группу фотометрических методов анализа.

Нефелометрия основана на поглощении и рассеянии световой энергии взвешенными частицами анализируемого вещества.

Люминесцентный (флуориметрический) анализ основан на измерении излучения, возникающего в результате выделения энергии возбужденными молекулами анализируемого вещества.

Люминесценцией называют свечение атомов, ионов, молекул и других более сложных частиц вещества, которое возникает в результате перехода в них электронов при возвращении из возбужденного в нормальное состояния.

Чтобы вещество стало люминесцировать, к нему необходимо извне подвести определенное количество энергии. Частицы вещества поглощают энергию, переходят в возбужденное состояние, пребывая в нем некоторое время. Затем они возвращаются в состояние покоя, отдавая при этом часть энергии возбуждения в виде квантов люминесценции.

В зависимости от вида возбужденного уровня и времени пребывания в нем различают флуоресценцию и фосфоресценцию.

Флуоресценция — это вид собственного свечения вещества, которое продолжается только при облучении. Если источник возбуждения устранить, то свечение прекращается мгновенно или спустя не более 0,001 с.

Фосфоресценция — это вид собственного свечения вещества, которое продолжается после отключения возбуждающего света.

Для исследования продтоваров используют явление флуоресценции.

С помощью люминесцентного анализа можно обнаружить в исследуемом образце присутствие вещества в концентрации 10^{-11} г/г. Этот метод используется для определения некоторых витаминов, лекарственных препаратов, канцерогенных веществ, пестицидов.

Все оптические абсорбционные методы иногда объединяют в одну группу спектрохимических или спектроскопических методов анализа, хотя они имеют существенные различия по аппаратному оформлению, по виду поглощающих частиц и другим признакам. Методы разные, но в их основе лежат одинаковые законы светопоглощения.

Рефрактометрия (от лат. *refractus*- преломленный и греч. *metreo*- измеряю) - метод исследования в-в, основанный на определении показателя преломления (коэффициента рефракции) и некоторых его функций, применяется для идентификации химических соединений, количественного и структурного анализа, определения физико-химических параметров веществ. Обычно показатель преломления жидких и твердых тел определяют с точностью до 0,0001 на рефрактометрах, в которых измеряют предельные углы полного внутреннего отражения.

4.2 Рефрактометрический анализ. Поляриметрический метод

Рефрактометрический анализ основан на измерении показателя преломления (рефракции) веществ, по которому можно судить о природе вещества, чистоте и содержании в растворах.

Преломление луча света возникает на границе двух сред, если среды имеют различную плотность. Отношение синуса угла падения (α) к синусу угла преломления (β) называют относительным показателем преломления (n) второго вещества по отношению к первому и является величиной постоянной:

$$n = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta}$$

Показатель преломления вещества зависит от его природы, а также от длины волны света и от температуры.

При падении угла света под углом 90° угол преломления называется предельным углом преломления, а его величина зависит только от показателей преломления этих сред, через которые проходит свет. Поэтому, если известен показатель преломления одной среды, то, измерив предельный угол преломления, можно определить показатель преломления исследуемой среды.

Поляриметрический метод основан на свойстве некоторых веществ изменять направление световых колебаний.

Вещества, обладающие свойством изменять направление колебаний при прохождении через них поляризованного света, называются оптически активными. Особенности строения молекул объясняют проявление оптической активности в растворах.

У поляризованного луча, пропущенного через слой раствора оптически активного вещества, меняется направление колебаний, а плоскость поляризации оказывается повернутой на некоторый угол, называемый углом поворота плоскости поляризации, который зависит от поворота плоскости поляризации, концентрации и толщины слоя раствора, длины волны поляризованного луча и температуры.

Оптическая активность вещества характеризуется удельным вращением (s), под которым понимают угол, на который повернется плоскость поляризации при прохождении поляризованного луча через раствор, в 1 мл которого содержится 1 г растворенного вещества при толщине слоя раствора (длине поляризационной трубки), равной 1 дм.

Угол вращения плоскости поляризации определяют по формуле

$$\alpha = [\sigma] \times \frac{l \times C}{100},$$

где l - длина трубки, дм;

C — концентрация вещества, г/100 мл.

Из этой формулы легко вычислить концентрацию C , если известен угол вращения:

$$C = \frac{\alpha \times 100}{l \times [\sigma]},$$

Вопросы для самоконтроля:

1. Какие принципы положены в основу оптических методов исследования веществ?
2. Какие возможности оптических методов используются при проведении в области физиологии растений?
3. Что такое поляриметрия?
4. Что такое рефрактометрия?
5. Какие возможности у этих методов при проведении биохимических исследований?

Список литературы

а) основная литература (библиотека СГАУ):

1. **Пискунов, А. С.** Методы агрохимических исследований/ А. С. Пискунов. – М.: КолосС, 2004. - 312 с. - ISBN 5-9532-0145-1.
2. **Кирюшин, Б. Д.** Основы научных исследований в агрономии/ Б. Д. Кирюшин, Б. Д. Усманов, И. П. Васильев. - М.: КолосС, 2009. - 398 с. - ISBN 9785-9532-0497-2.
3. **Штейн, Г.И.** Руководство по конфокальной микроскопии/ Г. И. Штейн. - СПб: ИНЦ РАН, 2007. – 77 с.

б) дополнительная литература:

9. **Березкин, В. Г.** Газовая хроматография в химии полимеров/ В. Г. Березкин, В. Р. Алишоев, И. Б. Немировская - М.: Наука, 1972. - 287 с.
10. **Березкин, В. Г.** Количественная тонкослойная хроматография/ В. Г. Березкин, А. С. Бочков. - М.: Наука, 1980. - 183 с.
11. **Бутенко, Р. Г.** Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений/ Р. Г. Бутенко. - М.: Наука, 1964. – 272 с.
12. **Диксон, М.** Ферменты. Т.1 /М. Диксон, Э. Уэбб; пер. англ. - М.: Мир, 1982. - 392 с.
13. **Доспехов, Б. А.** Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. — 5-е изд., доп. и перераб. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.: ил.
14. **Доспехов, Б. А.** Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных: учебное пособие для высш. с.-х. учеб. заведений/ Б. А. Доспехов. - М.: Колос, 1972. - 207 с.
15. **Ермаков, А. И.** Методы биохимического исследования растений /А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош. – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.

ЛЕКЦИЯ 5

ОПТИЧЕСКИЕ АБСОРБЦИОННЫЕ МЕТОДЫ

Вопросы:

5.1 Атомно-абсорбционный и молекулярно-абсорбционный анализ.

5.2 Нефелометрия.

5.3 Люминесцентный анализ.

5.1 Атомно-абсорбционный и молекулярно-абсорбционный анализ.

Молекулярный абсорбционный анализ основан на поглощении электромагнитных излучений молекулами или сложными ионами в ультрафиолетовой, видимой или инфракрасной областях спектра. Для *молекулярного абсорбционного анализа*, использующего сложные колебательно-вращательные спектры, обычно требуются приборы с высоким разрешением. Из методов *молекулярного абсорбционного анализа* наибольшее распространение получили фотометрические. Турбидиметрические и нефелометрические методы используют гораздо реже, обычно лишь в тех случаях, когда для определяемого вещества не удастся подобрать хороших фотометрических реагентов. Флуориметрический (люминесцентный) анализ, обладающий очень высокой чувствительностью [предел обнаружения около $1 \times 10^{-8} \%$], также имеет ограниченное применение вследствие того, что лишь небольшая часть соединений флуоресцирует с достаточной интенсивностью. Основным типом спектральной аппаратуры, применяемой в *молекулярном абсорбционном анализе*, является спектрофотометр. В рассмотренных выше случаях в основу атомно-абсорбционных спектрофотометров положены спектрофотометры, выпускаемые промышленностью для *молекулярного абсорбционного анализа*. Переделка их для целей атомно-абсорбционного анализа исключает возможность применения прибора для получения молекулярных спектров поглощения растворов, что явно нецелесообразно с точки зрения экономного использования аппаратуры. Модифицированный спектрофотометр снабжен также поворотным блоком с несколькими источниками резонансного излучения, что дает возможность легко переходить от определения одного элемента к определению другого. Воспроизводимость прибора оценивается величиной 0,5 % при определении натрия на уровне 1 мкг / мл. Поскольку молекулярные и атомно-абсорбционные методы спектрофотометрии имеют общую аппаратуру и методологию, целесообразной является разработка новых конструкций спектрофотометров, на которых можно было бы проводить анализ как по молекулярным, так и по атомным спектрам поглощения. Монохроматоры спектрофотометров для *молекулярного абсорбционного анализа* (СФ-4, VSU-1 и другие) не могут быть в полной мере использованы для работы по атомным спектрам поглощения с источниками непрерывного спектра (вследствие их низкой разрешающей силы), поэтому желательна разработка новых конструкций на базе монохроматоров высокой разрешающей силы.

5.2 Нефелометрия

Нефелометрия (от греческого *nephelos*—туман)- совокупность методов измерения интенсивности рассеянного в данной среде видимого или ультрафиолетового света с целью определения концентрации, размера и формы диспергированных частиц в дисперсных системах, или, другими словами, метод анализа, измеряющий по степени мутности раствора (коллоидальной взвеси) концентрацию вещества, обуславливающего мутность. Рассеяние света — отражение его освещенными частицами взвесей (часто называемое эффектом Тиндаля) — имеет различный характер в зависимости от соотношения размеров диспергированных частиц и длины волны падающего света. Если наибольший размер взвешенных частиц меньше 0,1 длины волны, то рассеяние света в пространстве

симметрично и называется рэлеевским рассеянием. Рассеяние света частицами больших размеров сильнее, но неравномерно: оно больше в направлении движения луча падающего света. Теория рассеяния света приложима при измерении интенсивности как рассеянного света (нефелометрия), так и ослабленного, вследствие рассеяния, проходящего света (турбидиметрия).

После калибровки по суспензиям с известными концентрациями можно определять концентрацию дисперсной фазы. Измеряя интенсивность светорассеяния в растворах при разных концентрациях, можно определять массу полимерных соединений.

Угловая зависимость светорассеяния для больших частиц, а также степень поляризации рассеянного света даёт информацию о форме частиц или макромолекул). Нефелометрия используется при исследовании имульсий и коллоидных систем.

5.3 Люминесцентный анализ

Люминесцентный анализ - метод исследования различных объектов, основанный на наблюдении их **люминесценции**.

При люминесцентном анализе наблюдают либо собственное свечение исследуемых объектов (например, паров исследуемого газа), либо свечение специальных **люминофоров**, которыми обрабатывают исследуемый объект. Аппаратура, применяемая для Л. а., содержит источник возбуждения люминесценции и регистрирующее устройство. Чаще всего возбуждают фотолюминесценцию объекта, однако в некоторых случаях наблюдают катодолюминесценцию, радиолюминесценцию и хемилюминесценцию. Фотовозбуждение обычно производится кварцевыми ртутными лампами, причём с помощью светофильтров из их спектра обычно вырезается ультрафиолетовая часть. Кроме ртутных ламп, в качестве источника света в Л. а. применяют ксеноновые лампы, искры в воздухе, лазеры. Регистрация люминесценции обычно осуществляется визуально или с помощью фотоэлектронных приборов, которые повышают точность Л. а. При количественном и качественном химическом Л. а. регистрируется чаще всего самостоятельное свечение веществ. С помощью количественного химического Л. а. по интенсивности света люминесценции определяют концентрацию люминесцирующего вещества (при малых оптических толщинах его и концентрациях, меньших 10^{-4} - 10^{-5} г/см³). Чувствительность количественного Л. а. очень велика и достигает нескольких единиц на 10^{-10} г/см³ при обнаружении ряда органических веществ. Это позволяет использовать Л. а. для контроля чистоты веществ. Лучом газового лазера удаётся возбуждать люминесценцию отдельных изотопов и проводить, таким образом, изотопный Л. а.

Качественный химический Л. а. позволяет обнаруживать и идентифицировать некоторые вещества в смесях. В этом случае с помощью спектрофотометров изучают распределение энергии в спектре люминесценции веществ при низких температурах (см., например, **Шпольского эффект**) и в вязких растворах (маслах). Некоторые нелюминесцирующие вещества обнаруживают по люминесценции продуктов их взаимодействия со специально добавляемыми веществами.

Сортовой Л. а. позволяет по характеру люминесценции обнаруживать различие между предметами, кажущимися одинаковыми. Он применяется для диагностики заболеваний (например, ткань, пораженную микроспорумом, обнаруживают по яркой зелёной люминесценции её под действием ультрафиолетового света), для определения поражённости семян и растений болезнями, определения содержания органических веществ в почве и т.п. С помощью сортового Л. а. производят анализ горных пород для обнаружения нефти и газов изучают состав нефти, минералов, горных пород, сортируют алмазы и т.д. Используя свойство алмазов люминесцировать под действием мягких рентгеновских лучей, строят автоматические системы их отбора. В сортовой Л. а. часто рассматривают несобственное свечение объектов. При поиске некоторых химических элементов (например, редкоземельных) образцы породы обрабатывают специальными соединениями, которые создают с искомыми веществами люминесцирующие комплексы. В

биологии живые ткани окрашивают спец. красителями, в результате взаимодействия которых с биологическим веществом также образуются люминесцирующие комплексы. Например, ядра клеток соединительной ткани, окрашенные акридином оранжевым, дают яркую люминесценцию, причём, если клетка раковая, цвет излучения меняется. Иногда исследуемый объект, не обладающий собственной люминесценцией, подвергают предварительной обработке, заключающейся в добавлении спец. люминофора. При этом люминофор либо растворяется в исследуемой жидкости, либо адсорбируется на поверхности исследуемого объекта. При исследовании движения подземных вод в них растворяют люминофор (например, флуоресцеин) и производят Л. а. воды источников. Аналогично поступают при изучении движения прибрежных песков; в этом случае люминофор адсорбируется на поверхности песчинок. Л. а. находит применение также в криминалистике (для определения подлинности документов, обнаружения следов токсических веществ и т.п.), реставрационных работах, **дефектоскопии**. Л. а. находит применение в гигиене (определение качества некоторых продуктов, питьевой воды) и промышленно-санитарной химии (определение содержания вредных веществ в воздухе) и т.п. Способность некоторых веществ (**сцинтилляторов**) люминесцировать под действием элементарных частиц высоких энергий обеспечило широкое применение методов Л. а. в ядерной физике (сцинтилляционный счётчик, люминесцентная камера).

Вопросы для самоконтроля

1. Какие физические принципы положены в основу нефелометрии?
2. При каких биохимических исследованиях используются методы люминесценции?
3. В чем заключаются особенности проведения атомно-абсорбционного и молекулярно-абсорбционного анализа?

Список литературы

а) основная литература (библиотека СГАУ):

1. **Пискунов, А. С.** Методы агрохимических исследований/ А. С. Пискунов. – М.: КолосС, 2004. - 312 с. - ISBN 5-9532-0145-1.
2. **Кирюшин, Б. Д.** Основы научных исследований в агрономии/ Б. Д. Кирюшин, Б. Д. Усманов, И. П. Васильев. - М.: КолосС, 2009. - 398 с. - ISBN 9785-9532-0497-2.
3. **Штейн, Г.И.** Руководство по конфокальной микроскопии/ Г. И. Штейн. - СПб: ИНЦ РАН, 2007. – 77 с.

б) дополнительная литература:

1. **Березкин, В. Г.** Газовая хроматография в химии полимеров/ В. Г. Березкин, В. Р. Алишоев, И. Б. Немировская - М.: Наука, 1972. - 287 с.
2. **Березкин, В. Г.** Количественная тонкослойная хроматография/ В. Г. Березкин, А. С. Бочков. - М.: Наука, 1980. - 183 с.
3. **Бутенко, Р. Г.** Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений/ Р. Г. Бутенко. - М.: Наука, 1964. – 272 с.
4. **Диксон, М.** Ферменты. Т.1 /М. Диксон, Э. Уэбб; пер. англ. - М.: Мир, 1982. - 392 с.
5. **Доспехов, Б. А.** Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. — 5-е изд., доп. и перераб. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.: ил.
6. **Доспехов, Б. А.** Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных: учебное пособие для высш. с.-х. учеб. заведений/ Б. А. Доспехов. - М.: Колос, 1972. - 207 с.
7. **Ермаков, А. И.** Методы биохимического исследования растений /А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош. – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.

ЛЕКЦИЯ 6

ИОНОМЕТРИЯ

Вопросы:

6.1 Основные понятия о ионометрии. Прямая ионометрия и потенциометрическое титрование. Жидкостные диффузионные потенциалы.

6.2 Определение активности ионов методом стандартных добавок и с использованием калибровочного графика

6.1 Основные понятия о ионометрии. Прямая ионометрия и потенциометрическое титрование. Жидкостные диффузионные потенциалы.

Ионометрия - способ определения концентрации ионов по измерениям потенциала ионоселективного мембранного электрода.

Ионометры – приборы для прямой потенциометрии, которая проводится в лабораторных и полевых условиях. Они используются для определения концентрации соответствующих индикаторных электродов.

Наибольшее применение нашла ионометрия с помощью стеклянного электрода. Перед работой электроды выдерживают в 0,1 М растворе соляной кислоты, сам прибор градуируют по растворам с известными значениями рН. После работы электроды тщательно промывают. Данный метод можно использовать для определения концентрации ионов в растворах, для этого сначала по растворам с известными концентрациями строят калибровочный график.

С помощью иономера можно проводить потенциометрическое титрование.

Зависимость потенциала индикаторного электрода от состава раствора используют для нахождения объема в конечной точке титрования.

Для этого в анализируемый раствор порциями добавляют титрант и измеряют потенциал после добавления каждой порции.

Потенциометрическое титрование возможно также в мутных и окрашенных растворах.

Для потенциометрического титрования используются разные химические реакции – кислотнo-основные, осаждения, комплексообразования и окисления и восстановления. В этом случае используются разные электроды:

При кислотнo-основных реакциях – стеклянный электрод; при окислительно-восстановительных – платиновый.

Объем титранта в конечной точке титрования находят по кривой титрования в координатах «потенциал – объем титранта»

Диффузионный потенциал – это разность потенциалов на границе двух соприкасающихся растворов электролитов, Диффузионный потенциал возникает в следствии разной скорости переноса катионов и анионов через границу, вызванного различием их электрохимических потенциалов. Наличие диффузионного потенциала вызывает погрешность при измерении электродного потенциала.

6.2 Определение активности ионов методом стандартных добавок и с использованием калибровочного графика

Метод добавок в ионометрии широко используют при проведении аналитических исследований. Он имеет следующие преимущества. В случаях когда, если колебания ионной силы в анализируемых пробах непредсказуемых, или в случае дрейфа потенциала на электродах. При этом используются методы стандартной добавки и метод Грана.

Метод добавки основан на том, что к анализируемой пробе добавляется стандартный раствор известной концентрации.

После каждой добавки записывается показания электродов. В зависимости от особенностей обработки результатов метод называется методом стандартной добавки или методом Грана.

Вопросы для самоконтроля:

1. Что такое ионометрия?
2. Какие принципы положены в её основу?
3. Зачем используются методы добавок?

Список литературы:

а) основная литература (библиотека СГАУ):

1. **Пискунов, А. С.** Методы агрохимических исследований/ А. С. Пискунов. – М.: КолосС, 2004. - 312 с. - ISBN 5-9532-0145-1.
2. **Кирюшин, Б. Д.** Основы научных исследований в агрономии/ Б. Д. Кирюшин, Б. Д. Усманов, И. П. Васильев. - М.: КолосС, 2009. - 398 с. - ISBN 9785-9532-0497-2.
3. **Штейн, Г.И.** Руководство по конфокальной микроскопии/ Г. И. Штейн. - СПб: ИИЦ РАН, 2007. – 77 с.

б) дополнительная литература:

1. **Березкин, В. Г.** Газовая хроматография в химии полимеров/ В. Г. Березкин, В. Р. Алишоев, И. Б. Немировская - М.: Наука, 1972. - 287 с.
2. **Березкин, В. Г.** Количественная тонкослойная хроматография/ В. Г. Березкин, А. С. Бочков. - М.: Наука, 1980. - 183 с.
3. **Бутенко, Р. Г.** Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений/ Р. Г. Бутенко. - М.: Наука, 1964. – 272 с.
4. **Диксон, М.** Ферменты. Т.1 /М. Диксон, Э. Уэбб; пер. англ. - М.: Мир, 1982. - 392 с.
5. **Доспехов, Б. А.** Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. — 5-е изд., доп. и перераб. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.: ил.
6. **Доспехов, Б. А.** Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных: учебное пособие для высш. с.-х. учеб. заведений/ Б. А. Доспехов. - М.: Колос, 1972. - 207 с.
7. **Ермаков, А. И.** Методы биохимического исследования растений /А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош. – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.

ЛЕКЦИЯ 7

ВЕГЕТАЦИОННЫЙ МЕТОД

Вопросы:

7.1 Назначение. Основные методические требования. Схемы опытов.

7.2 Водные, песчаные и почвенные культуры. Питательные смеси. Особенности опытов с различными растениями

7.1 Краткая характеристика и значение полевого опыта

Полевой опыт это метод изучения жизни растений на специально выделенном участке, на определенной почвенной разности, выравненной по плодородию в целях установления эффективности удобрений, химических мелиорантов и т.д., сопровождающийся исследованиями почв и растений. По большому счету, полевой опыт служит для выявления действия факторов внешней среды на растение в конкретных почвенно-климатических условиях. При организации и проведении полевого опыта обязательно используются такие методы познания, как анализ и синтез. **Анализ** - метод познания при помощи расчленения или разложения предметов исследования (объектов, свойств и т.д.) на составные части. В связи с этим анализ составляет основу аналитического метода исследований. **Синтез** - соединение отдельных сторон предмета в единое целое. Анализ и синтез взаимосвязаны, они представляют собой единство противоположностей.

Основные понятия, которые применяются для постановки полевого опыта – это

- Схема полевого опыта,
- Вариант опыта,
- Опытная делянка,
- Повторность опыта в пространстве,
- Схематический план.

Важное условие проведение полевого опыта - это соблюдение типичности, которая бывает природной и организационно-хозяйственной.

Полевой опыт характеризуется точностью и достоверностью. Точность полевого опыта проявляется в точности количественных результатов, и определяется математически с использованием вариационной статистики.

Достоверность подтверждает значимость и качество опыта при его оценке без математической обработки.

Классификация полевых опытов разработана в 30-е годы XX века и используется до настоящего времени практически без изменений. Так, различают стационарные, производственные, основные, однофакторные, многофакторные, многолетние, единичные, массовые, коллективные, географические, мелкоделяночные опыты.

Стационарные опыты закладываются на постоянном участке землепользования научно-исследовательского учреждения. Цель стационарного опыта заключается в выявлении действия удобрений на урожай и качество сельскохозяйственных растений. Стационарный опыт позволяет глубоко вскрыть процессы, происходящие в почве и приводящие к изменению урожайности.

Производственные опыты – закладываются в условиях фермерских хозяйств специалистами научно-исследовательских учреждений для уточнения результатов, полученных в стационарных опытах. Цель производственного опыта – получение ответа на вопрос со стороны производства.

Основные опыты проводятся научно-исследовательскими учреждениями по детально разработанным программам на длительное время. К ним предъявляются строгие требования, поэтому предусматривается всестороннее изучение участка, его однородность по плодородию, соблюдение повторностей, соблюдение севооборота, получение высокой точности.

Предварительные опыты имеют ориентировочный характер. Они закладываются на небольшой срок и служат основой для разработки схем и программ основных опытов.

Основные, предварительные опыты подразделяются на однофакторные, многофакторные, однолетние и многолетние, единичные и массовые. Данные группы выделяются по количеству изучаемых факторов, длительности изучения, охвата объектов, места проведения.

7.2 Краткая характеристика и значение вегетационного метода

Вегетационный метод исследования был разработан как агрохимический метод с целью изучения питания растений, оценки усвояемости питательных элементов почвы и удобрений. Он необходим для решения вопросов теории и практики сельского хозяйства.

Сущность вегетационного метода заключается в поддержании в благоприятных соотношениях внешние условия – обеспеченность растений водой, светом, теплом.

Вегетационный метод применяют для решения вопросов в агрохимии, физиологии растений, экологии, растениеводстве, почвоведении. Вегетационный опыт позволяет получать убедительные данные о том, как отзываются растения на разные факторы внешней среды. Схемы вегетационных опытов зависят от задач, которые ставятся перед исследователями. Особенности вегетационного опыта – почву берут с пахотного слоя. В сосудах поддерживается оптимальная влажность и мобилизация питательных веществ, при ухудшении погодных условий растений переносятся вегетационный домик.

При постановке вегетационного опыта применяются почвенные, водные, песчаные, стерильные культуры.

Вопросы для самоконтроля:

1. Понятие о вегетационном методе?
2. Что характерно для полевого опыта?
3. Особенности постановки опыта в почвенных и полевых культурах?

Список литературы:

а) основная литература (библиотека СГАУ):

1. **Пискунов, А. С.** Методы агрохимических исследований/ А. С. Пискунов. – М.: КолосС, 2004. - 312 с. - ISBN 5-9532-0145-1.
2. **Кирюшин, Б. Д.** Основы научных исследований в агрономии/ Б. Д. Кирюшин, Б. Д. Усманов, И. П. Васильев. - М.: КолосС, 2009. - 398 с. - ISBN 9785-9532-0497-2.
3. **Штейн, Г.И.** Руководство по конфокальной микроскопии/ Г. И. Штейн. - СПб: ИНЦ РАН, 2007. – 77 с.

б) дополнительная литература:

1. **Березкин, В. Г.** Газовая хроматография в химии полимеров/ В. Г. Березкин, В. Р. Алишоев, И. Б. Немировская - М.: Наука, 1972. - 287 с.
2. **Березкин, В. Г.** Количественная тонкослойная хроматография/ В. Г. Березкин, А. С. Бочков. - М.: Наука, 1980. - 183 с.
3. **Бутенко, Р. Г.** Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений/ Р. Г. Бутенко. - М.: Наука, 1964. – 272 с.
4. **Диксон, М.** Ферменты. Т.1 /М. Диксон, Э. Уэбб; пер. англ. - М.: Мир, 1982. - 392 с.
5. **Доспехов, Б. А.** Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. — 5-е изд., доп. и перераб. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.: ил.
6. **Доспехов, Б. А.** Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных: учебное пособие для высш. с.-х. учеб. заведений/ Б. А. Доспехов. - М.: Колос, 1972. - 207 с.
7. **Ермаков, А. И.** Методы биохимического исследования растений /А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош. – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.

ЛЕКЦИЯ 8

ПОЛЕВЫЕ МЕТОДЫ

Вопросы:

8.1 Сравнительная характеристика экспериментов, преимущества, недостатки.

Полевой метод – основные требования. Типичность и принцип единственного различия. Основные элементы проведения полевого опыта. Назначение. Географическая сеть. Основные методические требования.

8.2 Выбор и подготовка участка. Схемы опытов. Учёт продуктивности.

8.1 Сравнительная характеристика экспериментов, преимущества, недостатки.

Полевой метод – основные требования. Типичность и принцип единственного различия. Основные элементы проведения полевого опыта. Назначение.

Географическая сеть. Основные методические требования.

Основные методические требования к полемому опыту, схема опыта, вариант, опытная делянка, повторность и повторение в опыте

Полевой опыт решает целый ряд важнейших задач – позволяет выявить эффективность приемов возделывания сельскохозяйственных культур в конкретных почвенно-климатических условиях, проверяется использование новых удобрений, разрабатываются рациональные приемы их использования, изучает растения в природной обстановке.

Опытная делянка - это элементарная часть опытного участка определенного размера и формы, на которой осуществляется агротехнический прием, поставленный на изучение согласно принятой схеме, причем на всех делянках одинаково проводят все агротехнические приемы, кроме того, который необходимо изучить. Опытные делянки имеют определенный размер и форму, которые должны обеспечить достаточную точность опыта. Размер опытной делянки для различных видов полевых опытов зависит от назначения, задач опыта, культуры, степени, характера, пестроты почвенного покрова, агротехники, от того, какой техникой предполагается пользоваться при обработке делянок. Площадь делянки зависит также от размеров самого растения и агротехники: ширины междурядий, густоты стояния.

Например, для льна оптимальная площадь опытной делянки – 20-25 м², для зерновых – 40-60 м², для пропашных культур -50-100 м², при ограниченном количестве семян в селекционной работе площадь делянок составляет 0,5-2,0 м².

У опытных делянок есть защитные полосы. Они бывают боковыми и концевыми. Боковые защитные полосы располагаются вдоль длинных сторон делянок для того, чтобы исключить влияние растений соседних вариантов. Для разграничения изучаемых сортов между делянками располагаются узкие незасаженные полосы шириной 20-40 см. концевые защитные полосы выделяют для защиты учетной части делянки от случайных повреждений. Ширина концевых защитных полос не менее 2 м.

Направление делянки влияет на достоверность результатов опыта. При выборе направления делянок учитывают, что длинная сторона должна располагаться в направлении, в котором сильнее изменяется плодородие почв.

Форма делянки – это соотношение длины и ширины. По данному показателю делянки бывают квадратными (соотношение сторон – 10x10 м, 5x5 м), прямоугольными (соотношение 5x20 м, 4x20 м), удлиненными (соотношение 2,5x40 м, 4x60 м). Известно, что длинные участки более полно охватывают пестроту земельного участка.

Повторность опыта в пространстве – число одноименных делянок каждого варианта. Площадь опытного участка с полным набором вариантов, размещенных на делянках, называется повторением.

Размещение вариантов может быть: стандартное, систематическое, рендомизированное.

При стандартном размещении часто, через 1-2 опытных варианта, располагается контроль. Систематическое размещение – это неизменный порядок размещения вариантов в каждом повторении, этот порядок подчиняется определенной системе. При рендомизированном размещении порядок вариантов определяется по жребию, при этом каждый вариант имеет равную вероятность попасть на любую делянку.

Схематический план – размещение всех вариантов опыта на чертеже с указанием площади делянок, их формы, защитных полос и повторений. Схематический план – это документ, согласно которому происходит разбивка и восстановление полевого опыта на опытном участке. Схематический план обязательно должен быть внесен в полевой журнал.

Повторность опыта на территории – это число одноименных делянок каждого варианта. Территориальная повторность необходима для детальной и полной характеристики пестроты земельного участка.

Повторность опыта во времени – количество лет испытаний новых агротехнических приемов или сортов, она позволяет установить действие, взаимодействие или последствие факторов в разных условиях внешней среды. Увеличение повторности позволяет заметно снизить ошибки опытов.

Организованное повторение – часть площади опытного участка, включающая полный набор вариантов схемы опыта. Метод организованных повторений используется при постановке полевых опытов, так как сложно выделить под опыт земельный участок без ярко выраженных различий между отдельными частями опытного участка. Организованные повторения могут размещаться по-разному - сплошное размещение (опытные участки территориально объединены) и разбросанное размещение (опытные участки размещены на разных опытных полях, в разных частях одного поля).

Возможно случайное размещение опытов на земельном участке без территориального объединения вариантов в компактные группы (повторения). Это метод неорганизованных повторений или полной рендомизации. Он используется в том случае, когда опыт небольшой по объему и закладывается на хорошо выровненных участках.

4.2 Наличие сравнимости и соблюдение принципа единственного различия. Возможные отступления от формального соблюдения принципа единственного различия (использование принципа целесообразности и оптимальности)

В основе полевого опыта лежит принцип единственного различия, который заключается в изменении одного фактора, в то время как остальные должны быть тождественными. Соблюдать этот принцип очень сложно, так как все факторы в природе тесно взаимосвязаны. Однако при проведении опыта исследователи соблюдают одинаковые агротехнические приемы во всех вариантах. Это относится к обработке почвы, предшествующим культурам, засоренности, норме высева семян, вида или сортам, взятым для исследования.

Типичность, которая относится к одному из основных требований к полемому опыту, бывает природной и организационно-хозяйственной. Природная типичность подразумевает соответствие опыта природным условиям. Это значит, что полученные результаты могут использоваться на практике только в данном регионе. Организационно-хозяйственная типичность предусматривает соответствие опыта организационно-хозяйственным условиям, поэтому полученные результаты будут применимы к хозяйствам с теми же показателями плодородия почв и экономическим условиям, что и в опыте.

Качество полевого опыта также является важным требованием и определяется точностью количественных результатов, которая в свою очередь определяется целями, назначением и местом проведения опыта. Характеристика точности – это случайная ошибка средней опыта, это обобщенный статистический показатель, который характеризует количественную изменчивость результатов опыта, выражается в процентах и условно обозначается $S_x \%$.

Достоверность еще одно требование, которому должны соответствовать результаты полевого опыта. Это понятие есть математическая доказанность разницы в урожаях в разных вариантах опыта. Достоверность обозначают НСР_{0,95}. Это значит, что наименьшая существенная разница при 95% уровне вероятности, является достоверной и служит доказательством эффективности того или иного варианта.

8.2 Выбор и подготовка участка. Схемы опытов. Учёт продуктивности.

Анализ почвы:

Подготовка участка под опыт и проведение почвенного обследования – это первый этап предварительной работы. Цель - определение почвенной разновидности участка, границ естественного и искусственного плодородия почвы. Масштаб 1:1000, причем соблюдается высокая точность, наносятся на карту границы почвенных разностей, отбираются почвенные пробы с пахотного слоя, на площади 1 га закладывается разрез для детального морфологического описания почвенных горизонтов, далее почвенные образцы отбираются как по горизонтам, так и послойно через каждые 10 см по всему профилю. В почвенных образцах определяют гумус, содержание азота, фосфора, калия, кальция, магния, тяжелых металлов, подвижные формы питательных элементов, физико-химические показатели и т.д. Полученные и проанализированные по указанным показателям почвенные образцы оставляют на хранение, чтобы в дальнейшем была возможность провести наблюдение за динамикой рассмотренных показателей.

Анализ рельефа:

При выборе участка для опыта необходимо рассматривать и рельеф, так как варианты опыта должны находиться в одинаковых условиях по освещенности, обеспеченности влагой, плодородию. Земельный участок, предназначенный для полевого опыта, подвергают нивелировке с горизонталями через 0,1-0,2 м, данные наносятся на почвенную карту.

Рекогносцировочный посев:

Дает возможность получить точное представление о пестроте почвенного плодородия. Это сплошной посев какой-либо культуры, обычно овса, яровой пшеницы, ячменя, проса, картофеля, свеклы, чувствительной к почвенному плодородию и метеоусловиям на участке, предназначенном для полевого опыта. В случае рекогносцировочного посева данные об урожае обрабатываются методами математической статистики.

Уход за растениями и наблюдения в течение вегетационного периода при проведении полевого опыта

Уход за растениями проводят при необходимости. В первую очередь это борьба с сорными растениями, насекомыми-вредителями. Причем все мероприятия проводятся в одни сроки по всем опытным делянкам. Возможно применение гербицидов, фунгицидов.

Фенологические наблюдения проводятся во всех агрономических и агрохимических опытах. Значение фенологических наблюдений состоит в установлении различий в росте и развитии растений в период вегетации по вариантам, времени наступления фаз развития растений. В ряде случаев фенологические наблюдения могут помочь в объяснении причин определенного влияния на урожайность сельскохозяйственных культур. Начало фенофазы – это первый день, когда она зарегистрирована у 10% растений, массовое наступление фенофазы – день, когда она наблюдается 70% растений. Все наблюдения записываются в полевой журнал.

Фенофазы яровых зерновых растений – всходы, кущение, выход в трубку, колошение, цветение, молочная, восковая и полная спелость; у озимых зерновых – всходы, появление третьего листа, кущение, конец осенней и начало весенней вегетации, выход в трубку, колошение, цветение, молочная, восковая и полная спелость; фенофазы кукурузы – всходы, появление третьего листа, кущение, выметывание метелок, цветение початков, молочная,

восковая и полная спелость; у гречихи – всходы, начало роста стебля, образование соцветий, цветение, конец цветения, зеленая и полная спелость семян.

Учет урожайности

Урожайность – это продукция, которая получена в результате определенных мероприятий с единицы площади посева или посадки, выражается в граммах, килограммах, центнерах, тоннах с единицы площади. К урожайности используется термин структура, которая подразумевает определенный состав частей урожая после созревания. Структура урожайности зависит от биологических особенностей культуры.

Учет урожайности - важная операция при проведении полевых опытов. Она требует аккуратности, точности. Используются прямой и косвенный методы учета. Прямой метод учета урожайности заключается в уборке и взвешивании урожая со всей учетной площади делянок. Косвенный метод состоит в том, что используют не всю массу урожая, а только среднюю пробу.

Отчет по полевому опыту

По результатам опыта ежегодно оформляются отчеты, в которых должна быть гипотеза, фактическая достоверность полученных данных, логическая последовательности, ясность, краткость и убедительные изложения.

Вопросы для самоконтроля:

1. Особенности проведения полевого опыта.
2. Подготовка участков для проведения полевого опыта.
3. Отчет по полевому опыту.

Список литературы

а) основная литература (библиотека СГАУ):

1. **Пискунов, А. С.** Методы агрохимических исследований/ А. С. Пискунов. – М.: КолосС, 2004. - 312 с. - ISBN 5-9532-0145-1.
2. **Кирюшин, Б. Д.** Основы научных исследований в агрономии/ Б. Д. Кирюшин, Б. Д. Усманов, И. П. Васильев. - М.: КолосС, 2009. - 398 с. - ISBN 9785-9532-0497-2.
3. **Штейн, Г.И.** Руководство по конфокальной микроскопии/ Г. И. Штейн. - СПб: ИНЦ РАН, 2007. – 77 с.

б) дополнительная литература:

1. **Березкин, В. Г.** Газовая хроматография в химии полимеров/ В. Г. Березкин, В. Р. Алишоев, И. Б. Немировская - М.: Наука, 1972. - 287 с.
2. **Березкин, В. Г.** Количественная тонкослойная хроматография/ В. Г. Березкин, А. С. Бочков. - М.: Наука, 1980. - 183 с.
3. **Бутенко, Р. Г.** Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений/ Р. Г. Бутенко. - М.: Наука, 1964. – 272 с.
4. **Диксон, М.** Ферменты. Т.1 /М. Диксон, Э. Уэбб; пер. англ. - М.: Мир, 1982. - 392 с.
5. **Доспехов, Б. А.** Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. — 5-е изд., доп. и перераб. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.: ил.
6. **Доспехов, Б. А.** Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных: учебное пособие для высш. с.-х. учеб. заведений/ Б. А. Доспехов. - М.: Колос, 1972. - 207 с.
7. **Ермаков, А. И.** Методы биохимического исследования растений /А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош. – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.

ЛЕКЦИЯ 9

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ОПЫТНЫХ ДАННЫХ

Вопросы:

9.1 Ошибки и основные методы математической статистики (сравнения величин, дисперсионный анализ, корреляционный и регрессионный анализ), предпосылки их применения.

Математическая статистика используется для планирования опытов, в котором должно быть определенное количество повторностей и вариантов, причем все они в начале опыта должны находиться в одинаковых условиях. Важно также отобрать объекты, которые будут объективно отражать влияние изучаемых факторов. Изменчивость признаков исследуемых растений может быть количественной и качественной. Количественная изменчивость проявляется для таких признаков как масса урожая, процент сахаров или белка, размеры растений, масса плодов и т.д. При качественной изменчивости наблюдается такое варьирование, при котором различия между вариантами выражаются качественными показателями, причем у одних вариантов они есть, у других – нет. Вариационный ряд – это такой ряд данных, в которых указаны возможные значения варьирующего признака в порядке возрастания или убывания и соответствующие им частоты. Ход анализа вариационных рядов зависит от объема выборки: малые выборки состоят из малого количества единиц (меньше 30, например, количество повторностей равно 3-6, большие выборки – состоят из большого количества единиц (больше 30). В обоих случаях вычисляют основные статистические показатели: среднюю арифметическую, дисперсию. Стандартное отклонение, ошибку средней арифметической, коэффициент вариации, относительную ошибку средней арифметической.

Дисперсионный анализ в биологических исследованиях впервые применил английский ученый Р. А. Фишер. Он открыл закон распределения отношения средних квадратов (дисперсий).

Значение дисперсионного анализа заключается в раскрытии смысла результатов эксперимента, в определении точности и достоверности его результатов. Знание основ дисперсионного анализа необходимо для планирования и постановки эксперимента. При дисперсионном анализе одновременно обрабатывают результаты нескольких вариантов. Они объединены в статистический комплекс, структура которого определяется схемой и методикой эксперимента. Дисперсионный анализ имеет следующие особенности: так, используется обобщенная ошибка средних, которая высчитывается на основании большого количества наблюдений; используется для обработки данных простых, сложных, однолетних, многолетних, однофакторных и многофакторных опытов; нет громоздких вычислений, даже при большом количестве вариантов в опыте; в основе эксперимента лежит принцип рандомизации.

В настоящее время используются различные модификации дисперсионного анализа. Например, модификации В. Н. Перегудова или Б. А. Доспехова.

В основе дисперсионного анализа лежит предположение, что опыт достоверен тогда, когда рассеяние между вариантами больше, чем между повторностями одного варианта. Дисперсионный анализ позволяет определить степень влияния факторов – каждого в отдельности и суммарного действия на изменчивость изучаемого признака. При этом общую сумму квадратов отклонений и общее число степеней свободы разделяют на компоненты, соответствующие структуре эксперимента, а также осуществляют значимость действия и взаимодействия изучаемых факторов по F-критерию. Дисперсионный анализ позволяет определить степень или долю влияния изучаемого фактора.

Если при проведении опыта учитывались и соблюдались все методические требования, то отсутствуют грубые ошибки, а систематические ошибки минимальны. При этом

исследуемые показатели по значениям приближаются к истинным величинам данных показателей. Если количество параллельных показателей достаточно велико, то они образуют кривую нормального распределения (кривую Гаусса), которая имеет выпуклую форму, переходящую в изогнутую. Средние арифметические также должны приближаться к истинному значению. Вероятность отклонения эмпирических значений средней от истинного значения можно определить. Точка перегиба кривой Гаусса соответствует квадратическому основному отклонению. Оно обозначается буквой σ .

- Количество показаний, отклоняющееся от среднего арифметического значения больше, чем на $\pm \sigma$, составляет 1/3 часть от общего числа показаний.
- Количество показаний, отклоняющееся от среднего арифметического значения больше, чем на $\pm 2\sigma$, составляет 1/22 часть от общего числа показаний.
- Количество показаний, отклоняющееся от среднего арифметического значения больше, чем на $\pm 3\sigma$, составляет 1/370 часть от общего числа показаний.

Таким образом, достоверность определения возрастает пропорционально корню квадратному из числа сделанных определений \sqrt{n} .

На оси абсцисс по обе стороны от средней арифметической отложены величины отклонений от неё отдельных показаний. Большее количество показаний располагается вблизи значения средней арифметической. Чем в большей степени результаты отличаются от средней величины, тем меньше таких результатов.

Квадратическое отклонение от средней величины – это средняя квадратическая ошибка, которая обозначается буквой m . Её узнают по формуле:

$$m = \sigma / \sqrt{n}$$

Таким образом, между точностью опыта и его повторностью обратно пропорциональна. Чем больше повторностей, тем выше точность опыта.

Ошибка средних вычисляется в целом по опыту, ошибка разности становится ошибкой опыта:

$$M_{\text{опыта}} = m d \pm \sqrt{2} m d = \pm m \sqrt{2} = \pm 1,41 m$$

Причины, которые обуславливают изменчивость в полевых агрономических или агрохимических опытах несколькими факторами. Рассеяние по вариантам обусловлено действием изучаемого фактора (например, удобрениями), рассеяние по повторностям обусловлено плодородием почвы в каждой повторности, остаточное рассеяние обусловлено случайными причинами, например, неточностью измерений, неравномерностью посевов, индивидуальной изменчивостью растений.

Даже при тщательном проведении опыта будет отмечаться варьирование значений разных исследуемых показателей, к которым приводят ошибки различного рода ошибки: случайные, систематические и грубые.

Случайные ошибки возникают как следствие неоднородности почвенного плодородия, индивидуальной изменчивости растений, случайных механических повреждений растений, повреждений болезнями и т.д. При проведении опыта исследователь должен свести случайные ошибки к минимуму, так как полностью их избежать их не удается.

Систематические ошибки в полевом опыте обуславливают различным плодородием почвы и влияют на урожайность. Виды систематических ошибок – сплошная, захватывают все варианты всех повторений опыта; захватывающая все варианты одного или нескольких повторений; затрагивающие некоторые варианты опыта. При сплошной систематической ошибке сравнимость результатов не нарушается. Ошибки, захватывающие все варианты одного или нескольких повторений, исключаются из общего варьирования, они исключаются из общего варьирования. Ошибки, затрагивающие некоторые варианты, нарушают их сравнимость и делают результаты опыта недостоверными. Систематические ошибки в максимальной степени исключаются при детальном почвенном и агрохимическом обследовании участка, при проведении уравнительных и рекогносцировочных посевов.

Грубые ошибки есть следствие нарушения основных требований к полевому опыту. Такие ошибки нельзя устранить. Результаты с испорченных делянок не используют при математической обработке.

Дисперсионный анализ в модификации В. Н. Перегудова

Статистическая обработка результатов полевого опыта методом дисперсионного анализа по В. Н. Перегудову, включает следующие этапы:

- 1) составить таблицу, в которую внести полученные данные;
- 2) вычислить суммы (например, урожаев) по вариантам опыта, по повторностям, общую сумму всех поделочных урожаев;
- 3) вычислить средние по вариантам делением соответствующих значений S на повторность;
- 4) выбрать произвольное начало, его определяют как среднее значение из максимального и минимального чисел;
- 5) составить таблицу, в которую вносят отклонения поделочных данных от произвольного начала, при этом ставится знак «-», если урожайность меньше произвольного начала;
- 6) Подсчитать суммы S , P и Q , где S – сумма отклонений по вариантам, P – сумма отклонений по повторностям; Q – общая сумма всех поделочных отклонений;
- 7) Вычислить квадраты отклонений от произвольного начала, занести результаты в таблицу;
- 8) Суммировать квадраты поделочных отклонений по вариантам и повторениям, полученные величины также складывают и получают общую сумму квадратов;
- 9) Полученные данные выписывают в определенной последовательности;
- 10) Составить таблицу, в которую внести результаты сумм квадратов и степени свободы; вычислить остаточное рассеяние C_z , для этого вычесть из общего рассеяния значение рассеяния повторений и вариантов; определить степень свободы остаточного рассеяния путем вычитания из степени свободы общего рассеяния двух последующих - степени свободы рассеяния повторений и степени свободы рассеяния вариантов; найти среднее значения квадрата для вариантов и для остатка;
- 11) Для установления достоверности действия факторов найти критерий существенности Фишера (F); при этом вычисляют значения F фактического, которое сравнивают с F теоретическим (табличным). F теоретический равен отношению среднего квадратичного отклонения вариантов (σ_v^2) к среднему квадратическому отклонению остатка (σ_z^2). Если F факт больше F табл, то различия между вариантами опыта существенны, следовательно нужно найти достоверность различий между отдельными вариантами. Если F факт меньше F табл, то опыт проведен с большими погрешностями, и дальнейшую статистическую обработку не следует проводить;
- 12) определить относительную ошибку или точность опыта, наименьшую существенную разницу для того, чтобы установить достоверность вариантов. При этом определяют среднее квадратичное отклонение (оно характеризует ошибку урожая с единичной делянки в среднем по всему опыту).

Далее вычисляется наименьшая существенная разница (HCP) в зависимости от принятого уровня вероятности – 0,95 или 0,99. Уровень вероятности, или уровень существенности, приводится в таблицах Стьюдента. Данный показатель зависит от числа степеней свободы остатка и вычисляется по формуле:

Дисперсионный анализ в модификации Б. А. Доспехова

В этом случае статистические показатели такие же, как в изложении В. Н. Перегудова. Так, общее варьирование значений в разных вариантах опыта выражается формулой:

S_u – сумма квадратов отклонений общего рассеяния;

S_v – сумма квадратов рассеяния вариантов;

S_p – сумма квадратов рассеяния повторения;

C_z – сумма квадратов остаточного рассеяния.

Особенность данной модификации заключается в том, что при расчетах используются другие обозначения, при определении сумм квадратов применяется корректирующий фактор (С). При этом учитываются Общее варьирование, варьирование повторений, варьирование вариантов, остаточное варьирование

Формулы для вычисления видов варьирования:

$$C_z = C_y - (C_p - C_v)$$

Относительная ошибка опыта вычисляется по формуле:

S_x - это ошибка опыта; \bar{x} - средняя урожайность в опыте.

Ошибка разности вычисляется по формуле: $S_d = 1,41 S_x$

Преобразования

При постановке агрономических, агрохимических и других опытов используется принцип рендомизации при размещении вариантов опыта, который позволяет получить однородность дисперсий по вариантам. Однако даже при случайном размещении вариантов, независимом отборе проб, возможно значительное варьирование по вариантам вследствие засоренности, действия насекомых-вредителей, при этом возможно преобразовывать исходные данные. Преобразование позволяет уменьшить пределы варьирования, устранить неоднородность дисперсии и получить более точное сравнение результатов.

Чаще всего используются логарифмические преобразования, трансформация данных подсчета численности путем извлечения квадратного корня из X (\sqrt{X} или $\sqrt{X+1}$ при небольших или нулевых значениях), трансформация X в «угол-арксинус $\sqrt{\text{процент}}$ ».

При логарифмических преобразованиях каждое значение X трансформируется в $\lg X$ или $\lg(X+1)$, в том случае если в некоторых наблюдениях есть значения, равные 0.

При трансформации X в «угол-арксинус $\sqrt{\text{процент}}$ » используется, если исследуемые величины выражены в процентах (пораженность растений болезнями и вредителями). Преобразование проводится в том случае, когда значения близки к 0 и 100 %, а вариация сильно снижается.

Далее значения обрабатывают по схеме дисперсионного анализа, после оценки существенности частных различий переходят к первоначальным единицам измерения. Средние, полученные в процессе преобразования, несколько отличаются от средних значений, которые получены по исходным данным.

Корреляция, регрессия и ковариация

Особенность исследований живых объектов, при проведении агрономических и агрохимических исследований в том числе, состоит в том, что значению изучаемого признака X соответствует множество значений признака Y . Это пример проявления стохастических (вероятностных) или корреляционных связей, для анализа которых важно выявить, насколько тесны эти связи и какая у них форма. В этом случае используются специальные статистические методы – корреляция и регрессия.

Регрессия - это изменение результативного признака (функции) при определенном изменении одного или нескольких факторов.

Основные понятия, которые используются при проведении корреляционного анализа:

- 1) Форма корреляции – линейная и криволинейная;
- 2) Направление корреляции – прямая и обратная;
- 3) Простая корреляция, простая регрессия – в том случае, когда исследуются связь между двумя признаками;
- 4) Множественная корреляция, множественная регрессия – в том случае, когда исследуются связи между тремя и более признаками;
- 5) Уравнение регрессии (корреляционное уравнение). При простой регрессии уравнение выглядит следующим образом:

$$Y=f(x)$$

Если регрессия множественная, то уравнение выглядит так:

$$Y=f(X, Z, V, \dots)$$

По уравнению регрессии можно определить значение признака при определенных уровнях действия факторов.

6) Коэффициенты корреляции, корреляционное отношение – это показатели тесноты связи между признаком и действующим фактором.

7) Ковариационный анализ – это применение в совокупности методов корреляции, регрессии, дисперсионного анализа. Сущность метода состоит в следующем – если между изучаемым в эксперимента признаком и тем, которые в эксперимент не включен, существует тесная линейная связь, то есть возможность выровнять условия проведения эксперимента в отношении последнего признака, снизить ошибку эксперимента, при этом получить больше информации об изучаемом объекте.

Линейная корреляционная зависимость между признаками носит линейный характер, математически описывают уравнением прямой линии $Y=a+bX$, которое называется также уравнением регрессии Y на X , причем b – это выборочный коэффициент регрессии.

Линейная регрессия - это такая зависимость, при которой одинаковые изменения величины X приводит к одинаковым изменениям показателя Y . Регрессия может быть криволинейной, если при одинаковых изменениях значения признака наблюдаются неодинаковые изменения функций.

Корреляция и регрессия называется прямой или положительной, если при увеличении показателя увеличивается значение функции.

Корреляция и регрессия называется обратной или отрицательной, если при увеличении показателя значение функции уменьшается.

Для определения силы и направления связи показателя и его значения используется коэффициент корреляции – r . Это безразмерная величина, значения которой меняются в пределах $-1 < r < +1$.

- Коэффициент корреляции приближается к 1 в случае, если зависимость прямая, при обратной зависимости значения r отрицательны и могут приближаться к -1.

- Если $r=0$, то между показателем и функцией (или между признаками) нет линейной связи, однако может быть выявлена криволинейная зависимость.

- При $r < 0,3$ зависимость между признаками слабая, при $r=0,3-0,7$ – средняя, при $r > 0,7$ – зависимость сильная.

- Еще более точно степень сопряженности между признаками можно определить, вычислив квадрат коэффициента корреляции.

- Для коэффициента корреляции также определяют надежность, вычисляя ошибку и критерий существенности.

- Стандартная ошибка корреляции вычисляется по формуле:

Sr – это ошибка коэффициента корреляции,

r – коэффициент корреляции,

n – количество пар значений, по которым вычислялся коэффициент корреляции.

Формула для определения критерия существенности:

- это значит, что корреляционная связь существенна;

- это значит, что корреляционная связь не существенна.

Вопросы для самоконтроля

1. Основы дисперсионного анализа.
2. Дисперсионный анализ в модификации В. Н. Перегудова.
3. Дисперсионный анализ в модификации Б. А. Доспехова.
4. Преобразования.
5. Корреляция, регрессия и ковариация.

Список литературы:

а) основная литература (библиотека СГАУ):

1. **Пискунов, А. С.** Методы агрохимических исследований/ А. С. Пискунов. – М.: КолосС, 2004. - 312 с. - ISBN 5-9532-0145-1.
2. **Кирюшин, Б. Д.** Основы научных исследований в агрономии/ Б. Д. Кирюшин, Б. Д. Усманов, И. П. Васильев. - М.: КолосС, 2009. - 398 с. - ISBN 9785-9532-0497-2.
3. **Штейн, Г.И.** Руководство по конфокальной микроскопии/ Г. И. Штейн. - СПб: ИНЦ РАН, 2007. – 77 с.

б) дополнительная литература:

1. **Березкин, В. Г.** Газовая хроматография в химии полимеров/ В. Г. Березкин, В. Р. Алишоев, И. Б. Немировская - М.: Наука, 1972. - 287 с.
2. **Березкин, В. Г.** Количественная тонкослойная хроматография/ В. Г. Березкин, А. С. Бочков. - М.: Наука, 1980. - 183 с.
3. **Бутенко, Р. Г.** Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений/ Р. Г. Бутенко. - М.: Наука, 1964. – 272 с.
4. **Диксон, М.** Ферменты. Т.1 /М. Диксон, Э. Уэбб; пер. англ. - М.: Мир, 1982. - 392 с.
5. **Доспехов, Б. А.** Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. — 5-е изд., доп. и перераб. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.: ил.
6. **Доспехов, Б. А.** Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных: учебное пособие для высш. с.-х. учеб. заведений/ Б. А. Доспехов. - М.: Колос, 1972. - 207 с.
7. **Ермаков, А. И.** Методы биохимического исследования растений /А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош. – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.

ЛЕКЦИЯ 10

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ОПЫТНЫХ ДАННЫХ

Вопросы:

10.1 Математические методы анализа опытных данных. Факторный анализ.

10.2 Понятие о математическом моделировании.

10.1 Математические методы анализа опытных данных. Факторный анализ.

Факторный анализ — многомерный метод, применяемый для изучения взаимосвязей между значениями переменных. Предполагается, что известные переменные зависят от меньшего количества неизвестных переменных и случайной ошибки.

Факторный анализ позволяет решить две важные проблемы исследователя: описать объект измерения всесторонне и в то же время компактно. С помощью факторного анализа возможно выявление скрытых переменных факторов, отвечающих за наличие линейных статистических корреляций между наблюдаемыми переменными.

Таким образом можно выделить цели факторного анализа:

- определение взаимосвязей между переменными, (классификация переменных), т.е. «объективная R-классификация»;
- сокращение числа переменных необходимых для описания данных.

Практическое выполнение факторного анализа начинается с проверки его условий. В обязательные условия факторного анализа входят:

- Все признаки должны быть количественными.
- Число наблюдений должно быть не менее чем в два раза больше числа переменных.
- Выборка должна быть однородна.
- Исходные переменные должны быть распределены симметрично.
- Факторный анализ осуществляется по коррелирующим переменным.

Сущность факторного анализа - процедура вращения факторов, то есть перераспределения дисперсии по определённому методу. Цель ортогональных вращений — определение простой структуры факторных нагрузок, целью большинства косоугольных вращений является определение простой структуры вторичных факторов, то есть косоугольное вращение следует использовать в частных случаях. Поэтому ортогональное вращение предпочтительнее.

Главной проблемой факторного анализа является выделение и интерпретация главных факторов. При отборе компонент исследователь обычно сталкивается с существенными трудностями, так как не существует однозначного критерия выделения факторов, и потому здесь неизбежен субъективизм интерпретаций результатов. Существует несколько часто употребляемых критериев определения числа факторов. Некоторые из них являются альтернативными по отношению к другим, а часть этих критериев можно использовать вместе, чтобы один дополнял другой:

- **Критерий Кайзера или критерий собственных чисел.** Этот критерий предложен Кайзером, и является, вероятно, наиболее широко используемым. Отбираются только факторы с собственными значениями равными или большими 1. Это означает, что если фактор не выделяет дисперсию, эквивалентную, по крайней мере, дисперсии одной переменной, то он опускается.

- **Критерий каменистой осыпи или критерий отсеивания.** Он является графическим методом, впервые предложенным психологом Кэттелом. Собственные значения возможно изобразить в виде простого графика. Кэттел предложил найти такое место на графике, где убывание собственных значений слева направо максимально замедляется. Предполагается, что справа от этой точки находится только «факториальная осыпь» — «осыпь» является геологическим термином, обозначающим обломки горных пород, скапливающиеся в нижней части скалистого склона^[1]. Однако этот критерий

отличается высокой субъективностью и, в отличие от предыдущего критерия, статистически необоснован. Недостатки обоих критериев заключаются в том, что первый иногда сохраняет слишком много факторов, в то время как второй, напротив, может сохранить слишком мало факторов; однако оба критерия вполне хороши при нормальных условиях, когда имеется относительно небольшое число факторов и много переменных. На практике возникает важный вопрос: когда полученное решение может быть содержательно интерпретировано. В этой связи предлагается использовать ещё несколько критериев.

- **Критерий значимости.** Он особенно эффективен, когда модель генеральной совокупности известна и отсутствуют второстепенные факторы. Но критерий непригоден для поиска изменений в модели и реализуем только в факторном анализе по методу наименьших квадратов или максимального правдоподобия.

- **Критерий доли воспроизводимой дисперсии.** Факторы ранжируются по доле детерминируемой дисперсии, когда процент дисперсии оказывается несущественным, выделение следует остановить. Желательно, чтобы выделенные факторы объясняли более 80 % разброса. Недостатки критерия: во-первых, субъективность выделения, во-вторых, специфика данных может быть такова, что все главные факторы не смогут совокупно объяснить желательного процента разброса. Поэтому главные факторы должны вместе объяснять не меньше 50,1 % дисперсии.

- **Критерий интерпретируемости и инвариантности.** Данный критерий сочетает статистическую точность с субъективными интересами. Согласно ему, главные факторы можно выделять до тех пор, пока будет возможна их ясная интерпретация. Она, в свою очередь, зависит от величины факторных нагрузок, то есть если в факторе есть хотя бы одна сильная нагрузка, он может быть интерпретирован. Возможен и обратный вариант— если сильные нагрузки имеются, однако интерпретация затруднительна, от этой компоненты предпочтительно отказаться.

10.2 Понятие о математическом моделировании.

Математическое моделирование основано на явлении изоморфизма - сходстве форм при качественном различии явлений. Благодаря изоморфизму можно моделировать одну систему с помощью другой, вместо одного явления изучать другое. При математическом моделировании вместо изучения и исследования оригинала исследуются математические зависимости, описывающие оригинал.

Математической моделью объекта называют его описание математическими средствами, позволяющее выводить суждение о некоторых свойствах объекта при помощи формальных процедур. Использование математического языка предопределяет необходимость все операции и преобразования в математических моделях осуществлять над математическими объектами: числами, векторами, множествами, матрицами, функциями и т. д. В наиболее общем виде математическая модель объекта представляется уравнением

$$F(X,Y)= \text{const} (1)$$

где X, Y- векторы управляемых и неуправляемых параметров модели.

При изучении сложных объектов приходится учитывать большое число взаимосвязанных факторов, при этом реально доступная информация может иметь любую степень детерминированности, быть плохо формализуемой, поступать в произвольной форме и эволюционировать во времени. При математическом моделировании факторы отображаются в виде математических конструкций - таких, как параметры состояния объекта и среды, ограничения на область совместного и согласованного изменения этих параметров и т.д. Многие факторы при этом могут оказаться плохо формализуемыми, т.е. их отражение математическими конструкциями оказывается либо невозможным, либо просто плохим.

Формализация предполагает построение некоторой структуры с целью логического описания и понимания формализуемого объекта.

Поэтому плохо формализуемыми являются аморфные, слабо структурированные явления. Причинами плохой формализуемости может служить сложность объекта, недостаток знаний о нём, наличие интуитивно оцениваемых показателей и т.д. Часто построение модели начинают с "инвентаризации" всех имеющихся сведений об объекте моделирования, например, составления списка переменных и связывающих их ограничений, идентификации определяющих переменных, выбор вида модели и т.д. Любой объект может быть описан многими способами, исходные данные о нём известны приближённо. Поэтому модели объекта должны соответствовать уровню знаний о нём, возможностям использования и достижения целей моделирования.

Описание объекта начинают с описания его состояния в данный момент времени. Это состояние называют фазовым состоянием, а численные значения параметров модели, соответствующие этому состоянию, - фазовыми координатами. Например, фазовое состояние материальной точки определяется её координатами и величинами скоростей. Изменение состояния объекта под действием внешних сил или внутренних процессов сопровождается изменением фазовых координат. Связь между изменением состояния объекта и действием внешних сил проявляется в законах сохранения, которые служат основой любого модельного описания объекта. К числу таких законов относятся известные физические законы сохранения вещества, энергии, количества движения и т.д. и математические, связанные с геометрическими или алгебраическими отношениями и свойствами математических объектов.

Вопросы для самоконтроля

1. Сущность факторного анализа.
2. Что такое математическая модель?
3. В чем значение использование математических моделей?

Список литературы:

а) основная литература (библиотека СГАУ):

1. **Пискунов, А. С.** Методы агрохимических исследований/ А. С. Пискунов. – М.: КолосС, 2004. - 312 с. - ISBN 5-9532-0145-1.
2. **Кирюшин, Б. Д.** Основы научных исследований в агрономии/ Б. Д. Кирюшин, Б. Д. Усманов, И. П. Васильев. - М.: КолосС, 2009. - 398 с. - ISBN 9785-9532-0497-2.

б) дополнительная литература:

1. **Березкин, В. Г.** Газовая хроматография в химии полимеров/ В. Г. Березкин, В. Р. Алишоев, И. Б. Немировская - М.: Наука, 1972. - 287 с.
2. **Березкин, В. Г.** Количественная тонкослойная хроматография/ В. Г. Березкин, А. С. Бочков. - М.: Наука, 1980. - 183 с.
3. **Бутенко, Р. Г.** Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений/ Р. Г. Бутенко. - М.: Наука, 1964. – 272 с.
4. **Диксон, М.** Ферменты. Т.1 /М. Диксон, Э. Уэбб; пер. англ. - М.: Мир, 1982. - 392 с.
5. **Доспехов, Б. А.** Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. — 5-е изд., доп. и перераб. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.: ил.
6. **Доспехов, Б. А.** Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных: учебное пособие для высш. с.-х. учеб. заведений/ Б. А. Доспехов. - М.: Колос, 1972. - 207 с.
7. **Ермаков, А. И.** Методы биохимического исследования растений /А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош. – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.

ЛЕКЦИЯ 11

МЕТОД КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Вопросы:

11.1 Основные принципы культивирования. Питательные среды.

11.2 Культуры соматических клеток. Выделение и культивирование клеток. Морфологическая характеристика каллусных тканей. Суспензионные культуры. Культивирование гаплоидных клеток.

11.1 Основные принципы культивирования. Питательные среды.

Культура клеток высших растений может рассматриваться с трех точек зрения – как уникальная биологическая система, как модель в физиологии, биохимии и генетике растений и как инструмент для разнообразных исследований и биотехнологии. Популяциям растительных клеток, выращиваемым в искусственных условиях, присущи специфические особенности, благодаря которым культура клеток и тканей растений представляет новую экспериментально созданную биологическую систему. Отличия культивируемых клеток от клеток организма, часто специально усиленные путем создания биохимических мутантов, гибридных или трансформированных клеток, помогают глубже проникнуть в механизмы процессов, происходящих в растении. В качестве биологической модели клетки *in vitro* представляют интерес для многих физиологов и биохимиков растений, а также генетиков. Однако степень адекватности такой модели зависит от изучаемого процесса. Культура клеток, как правило, является адекватной моделью для тех процессов, которые протекают в любой растительной клетке, независимо от существующих систем контроля. Для тех клеточных функций, где принципиальную роль играют механизмы организменного контроля развития, модель может быть неадекватной.

Культура клеток растений широко используется в самых разнообразных фундаментальных и прикладных исследованиях. На основе культивируемых клеток и тканей высших растений в настоящее время созданы и активно развиваются перспективные, принципиально новые технологии для различных отраслей промышленности и сельского хозяйства.

Термин «культура клеток, тканей и органов растений» применяется к следующим асептически выращиваемым частям растения: изолированным зародышам, изолированным органам (кончики корней, меристемы побегов, листовые примордии, части молодых цветков и плодов), каллусной ткани, суспензионной культуре, культуре протопластов.

Набор объектов растительного происхождения, которые можно в основе метода культуры клеток и тканей растений лежит уникальное свойство растительной клетки – тотипотентность. **Тотипотентность** – это способность клетки реализовывать генетическую информацию, обеспечивающую ее дифференцировку и развитие до целого организма. Тотипотентность присуща оплодотворенной яйцеклетке растений и животных. Что же касается дифференцированных клеток, то у животных тотипотентность присуща только некоторым клеткам кишечнорастворимых.

Необходимым условием работы с культурой изолированных тканей является соблюдение строгой стерильности. Для соблюдения условий асептики при выполнении работ по культивированию растений *in vitro* стерилизации должны подвергаться операционная комната, в которой производят инокуляцию и посадку культур, одежда и руки работающего персонала, посуда, используемая для культивирования объектов, все необходимые инструменты и материалы, питательные среды, объекты культивирования. В ламинар-боксах асептика достигается подачей стерильного воздуха в рабочий объем. Ламинар-боксы, как правило, оснащены УФ лампами, обеспечивающими стерилизацию внутренней поверхности. Однако даже после этого рабочую поверхность перед

использованием желательно протереть 70 %-ным этанолом или 20 %-ным водным раствором фенола.

Чистую посуду, предварительно завернутую в бумагу или фольгу, инструменты стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу при температуре 160 С в течение 1,5–2 ч. Непосредственно перед работой в боксе инструменты стерилизуют еще раз, помещая в фарфоровый или стеклянный стакан с 96 %-ным спиртом и обжигая каждый из них в пламени спиртовки. Стерильный инструмент используют только для одноразовой манипуляции. Перед повторным использованием его снова следует обработать спиртом и обжечь.

Питательные среды, не содержащие термолабильных веществ, стерилизуют автоклавированием при давлении 0,5–1 атм. Продолжительность стерилизации зависит от объема среды в сосуде. Культуральные сосуды со средой объемом 25–50 мл стерилизуют в течение 15–20 мин, объемом 2–4 л – в течение 30–40 мин.

Растительные ткани сами по себе могут служить источником заражения, так как на их поверхности всегда находится эпифитная микрофлора. Для поверхностной стерилизации растительных тканей применяют большой набор химических веществ. Растительные экспланты стерилизуют растворами соединений, содержащих активный хлор (хлорамином, гипохлоритом кальция и натрия, сулемой), бром (бромной водой), диацидом, перекисью водорода, спиртом, антибиотиками.

Общие навыки работы в стерильных условиях, основные практические аспекты получения культуры растительных клеток и тканей и ее поддержания группируются вокруг проблемы подбора подходящей среды для культивирования. Компоненты среды для выращивания растительных объектов *in vitro* условно можно разделить на 5 групп:

- макроэлементы;
- микроэлементы;
- источники углерода;
- витамины;
- регуляторы роста.

Минеральная основа питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей должна включать все необходимые растениям макроэлементы (азот, фосфор, серу, калий, кальций, магний, железо) и микроэлементы (бор, марганец, цинк, медь, молибден и др.) В состав большинства питательных сред для культивирования клеток и тканей растений входят витамины: тиамин, рибофлавин, биотин, пантотеновая кислота, пиридоксин, аскорбиновая кислота. Содержание регуляторов роста обычно является определяющим фактором для успешного роста культур клеток растений. Из фитогормонов в составе сред наиболее часто используют ауксины и цитокинины. Поскольку различные клетки и ткани в культуре резко отличаются по способности к автономному синтезу и метаболизму отдельных групп фитогормонов, то в связи с этим их рост в различной степени зависит от снабжения регуляторами роста.

Различия в потребностях в экзогенных ауксинах и цитокининах позволяют выделить несколько групп тканей:

- ткани, растущие на средах только с ауксинами (например, экспланты корня топинамбура, корней цикория);
- ткани, требующие для роста введение в среду только цитокининов (культура корешка белого турнепса);
- ткани, для роста которых необходимы и ауксины и цитокинины (большинство культивируемых тканей);
- ткани, растущие на средах с растительными экстрактами сложного состава;
- опухолевые ткани

11.2 Культуры соматических клеток. Выделение и культивирование клеток. Морфофизиологическая характеристика каллусных тканей. Суспензионные культуры. Культивирование гаплоидных клеток.

Клональное микроразмножение – это использование техники *in vitro* для быстрого получения неполовым путем растений, идентичных исходному. По своей сути микрклональное размножение аналогично вегетативному типу размножения растений с той лишь разницей, что оно протекает в пробирке в условиях *in vitro*, где из клеток изолированных тканей в итоге можно получить достаточно большое количество растений. Асептические условия и соответствующие питательные добавки позволяют в случае необходимости уменьшить размер экспланта до нескольких миллиметров. В настоящее время число видов растений, которые можно клонировать «в пробирке» уже составляет около одной тысячи. Хотя метод микрклонального размножения растений является довольно трудоемким и затратным, в ряде случаев на его основе уже стало возможным создавать экономически рентабельные технологии. Этот метод имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения:

- высокий коэффициент размножения (105–106 – для травянистых, цветочных растений, 104–105 – для кустарниковых древесных, 104 – для хвойных);
- возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала;
- получение генетически однородного посадочного материала;
- освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры;
- ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- сокращение продолжительности селекционного процесса;
- ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- получение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
- возможность автоматизации процесса выращивания.

Области применения клонального микроразмножения разнообразны и имеют тенденцию к расширению:

- в селекции для поддержания и размножения растений с уникальными генотипами;
- для быстрого размножения новых и уже существующих сортов;
- массового получения оздоровленного посадочного материала у растений, подверженных вирусным заболеваниям;

Соматическая гибридизация.

Это метод получения гибридных растений в результате слияния протопластов, золированных из соматических клеток родительских форм. Поскольку для слияния протопластов не существует барьеров, то на уровне протопластов могут быть объединены несовместимые при половом размножении виды растений. Причем такую искусственную гибридизацию можно осуществлять между соматическими клетками, принадлежащими далеким в систематическом отношении организмам и даже между растительными и животными клетками. Принципиальное отличие соматических гибридов, полученных методом слияния протопластов, от гибридов, полученных половым путем, состоит в том, что при половом скрещивании цитоплазматические гены передаются в большинстве случаев только от материнского растения, а при соматической гибридизации – двуродительно. Т.е. слияние протопластов способствует объединению двух различных цитоплазм, и в образовавшемся гибриде оба партнера имеют более или менее равный цитоплазматический статус.

Экспериментальная гаплоидия.

Роль гаплоидных растений в генетических исследованиях очень велика. Применение их позволяет легче обнаружить рецессивные мутации, редкие рекомбинации, экспрессию введенного извне генетического материала. Гаплоидия может широко применяться при количественном генетическом анализе сельскохозяйственных растений. Такой анализ включает изучение взаимодействия генов и генетической изменчивости, определения групп сцепления, установления числа генов, действующих на количественные признаки, установление локализации полигенов. Гаплоиды также широко используются в селекционном процессе. Одно из важнейших направлений их применения заключается в возможности получения из гаплоидных клеток путем их обработки колхицином полностью гомозиготных диплоидных растений.

Существует несколько способов сохранения генофонда высших растений: заповедники, национальные парки, банки семян. Наиболее простым среди них является хранение семян. Однако данный метод неприменим к тем видам растений, чьи семена не выдерживают длительного хранения. В частности, к ним относятся древесные растения, сохранение генофонда которых осуществляется в виде искусственных посадок, что требует значительных площадей и регулярного ухода. У некоторых видов растений рекомбинации, возникающие при развитии семян, могут привести к разрушению ценных комплексов генов, накопленных в течение длительного времени. В связи с этим возникает необходимость в длительном хранении живой ткани в вегетативной форме.

В настоящее время один из наиболее перспективных способов сохранения генофонда высших растений представляет собой культивирование *in vitro* клеток, тканей и органов растений. Для сохранения генофонда могут быть использованы:

- протопласты;
- суспензионные культуры клеток;
- каллусные культуры;
- пыльца и пыльники;
- культуры меристем побегов;
- зародыши;
- асептически выращиваемые целые растения.

Вопросы для самоконтроля

1. Значение метода культуры тканей для физиологических исследований?
2. Главные принципы при организации работы с культурой ткани?
3. Какие растения введены в культуру ткани?
4. Принципы составления питательных сред?
5. Условия соблюдения асептики.

Список литературы

а) основная литература (библиотека СГАУ):

1. **Дитченко, Т. И.** Культура клеток, тканей и органов: курс лекций/ Т. И. Дитченко. – Минск: БГУ, 2007. – 102 с.
2. **Пискунов, А. С.** Методы агрохимических исследований/ А. С. Пискунов. – М.: КолосС, 2004. - 312 с. - ISBN 5-9532-0145-1.
3. **Кирюшин, Б. Д.** Основы научных исследований в агрономии/ Б. Д. Кирюшин, Б. Д. Усманов, И. П. Васильев. - М.: КолосС, 2009. - 398 с. - ISBN 9785-9532-0497-2.

б) дополнительная литература:

1. **Березкин, В. Г.** Газовая хроматография в химии полимеров/ В. Г. Березкин, В. Р. Алишоев, И. Б. Немировская - М.: Наука, 1972. - 287 с.

2. **Березкин, В. Г.** Количественная тонкослойная хроматография/ В. Г. Березкин, А. С. Бочков. - М.: Наука, 1980. - 183 с.
3. **Бутенко, Р. Г.** Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений/ Р. Г. Бутенко. - М.: Наука, 1964. - 272 с.
4. **Диксон, М.** Ферменты. Т.1 /М. Диксон, Э. Уэбб; пер. англ. - М.: Мир, 1982. - 392 с.
5. **Доспехов, Б. А.** Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. — 5-е изд., доп. и перераб. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.: ил.
6. **Доспехов, Б. А.** Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных: учебное пособие для высш. с.-х. учеб. заведений/ Б. А. Доспехов. - М.: Колос, 1972. - 207 с.
7. **Ермаков, А. И.** Методы биохимического исследования растений /А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош. - 2-е изд., перераб. и доп. - Л.: Колос, 1972. - 456 с.

ЛЕКЦИЯ 12

РАДИОИЗОТОПНЫЙ МЕТОД

12.1 Использование меченых атомов в физиологии растений для определения интенсивности ассимиляции CO₂, скорости поглощения ионов, распределение по растению и др.

Радиоизотопные методы исследований основаны на регистрации интенсивности гамма-излучения радионуклида, введенного в организм или образцы биологических сред, а также радионуклидов, содержащихся в биологических тканях организма. Выбор именно гамма-составляющей радиоактивного распада связан с проникающей способностью этого лучения в биологических тканях, подобной рентгеновскому, тогда как α - и β -компоненты радиоактивного излучения практически полностью поглощаются биосредами. Собственное гамма-излучение живых организмов определяется свойствами радионуклидов, входящих в структуру биотканей, и, как правило, имеет низкую интенсивность, соизмеримую с естественной фоновой.

Радиоактивное вещество для диагностических РФП должно удовлетворять следующим требованиям:

- одна линия γ -квантов (монохроматичность излучения);
- энергия излучения γ -квантов – 100...200 кэВ, оптимальная для аппаратной регистрации излучения и обеспечения проникающей способности в биотканях;
- тип радиоактивного распада – в виде *изомерного перехода*, при котором вещество A_mXZ с индексом массы ядра A в атомных единицах и индексом заряда ядра Z , кратным заряду электрона из возбужденного состояния, переходит в стабильное состояние AXZ с излучением γ -кванта $A_mXZ \rightarrow AXZ + \gamma$; или *электронного захвата*, при котором происходит захват ядром одного из электронов внутренней оболочки атома с последующим испусканием кванта характеристического рентгеновского (а по сути γ) излучения после перехода на вакантный энергетический уровень одного из электронов внешних оболочек атома $AXZ + -1\beta \rightarrow AYZ-1 + \gamma$;
- период полураспада радионуклида должен быть достаточным для проведения исследований;
- вывод из организма остаточных доз препарата обеспечивается выполнением следующего неравенства: $t_{\text{ВЫВОДА}} \geq T_{1/2} \geq \ln 2 t_{\text{ИССЛЕДОВАНИЯ}}$, где $T_{1/2}$ - период полураспада радионуклида.

В практике радиоизотопных исследований в качестве радиоактивных веществ РФП наибольшее распространение получили ^{99m}Тс, ¹²³И, ^{113m}Ип. ^{99m}Тс – технеций модифицированный, тип распада - изомерный переход, основная линия γ -квантов имеет энергию 140 кэВ, период полураспада $T_{1/2} = 6,04$ часа. Используют для исследования крови, почек, костных тканей, легких, селезенки, тканей всего тела. Доза одного исследования составляет 8 – 800 МБк. ¹²³И – йод, тип распада – электронный захват, основная линия γ -квантов – 159 кэВ, $T_{1/2} = 13$ часов.

Все исследования ведутся только в радиоизотопных диагностических лабораториях специально подготовленным персоналом. Лучевую безопасность обеспечивает расчет оптимальной активности вводимого радионуклида.

С помощью радиоактивных изотопов химических элементов определили скорости передвижения питательных элементов по сосудам растений, скорости поглощения их корнями из почвы, влияния окружающих условий среды на эти процессы.

Получение высоких урожаев сельскохозяйственных культур возможно при оптимизации процессов питания растений. Для изучения этих процессов часто используются радиоактивные изотопы наиболее важных питательных элементов: фосфора (³²P), углерода (¹⁴C), кальция (⁴⁵Ca), калия (⁴⁰K). Физические характеристики этих радиоизотопов

(достаточно долгий период полураспада, удобные для регистрации тип и энергия излучения) позволяют проводить наблюдения за их поступлением из почвы и удобрений в различные сельскохозяйственные культуры, выяснять наилучшие сроки и формы внесения удобрений.

Исследования скорости обновления белковых веществ в растениях, выполненные при помощи метода меченых атомов, вскрыли ряд фактов, заставляющих по-новому оценить значение подкормок во время вегетации для получения высокого урожая и направленного изменения химического состава и качества урожая сельскохозяйственных растений.

При помощи метода меченых атомов были получены существенные данные для оценки так называемого коэффициента использования удобрений, что, например, имело принципиальное значение для расчетов обеспеченности растений фосфором. С помощью изотопов фосфора, серы, цинка интенсивно изучалась роль ризосферных микроорганизмов в питании растений.

Изотопный метод был с успехом применен для изучения обменных реакций в почвах и для разработки новой методики определения обменной поглотительной способности почв, методики определения поглощенного кальция в карбонатных почвах. Качественный состав растений, величина урожая зависят от протекания физиологических процессов в клетках и тканях растений.

Применение радиоактивных изотопов помогло установить некоторые особенности биосинтеза хлорофилла, обмена фосфора нуклеиновых кислот в клетках, изучить продукты фотосинтеза в зависимости от условий его осуществления, процессы включения аминокислот в белки.

Для обеспечения нормальной жизнедеятельности биологических организмов необходимы микроэлементы, которые в основном потребляются растениями из почвы. Дефицит микроэлементов ограничивает рост и развитие растений, вызывает болезни. Роль микроэлементов (кобальта, цинка) в обмене веществ была выяснена с помощью метода радиоактивной метки (^{60}Co , ^{65}Zn).

Вопросы для самоконтроля

1. Какое применение нашел метод меченых атомов в физиологии и биохимии?
2. Какие радиоактивные вещества используются в этих исследованиях?
3. Какие требования должны соблюдаться?
4. Почему радиоизотопный метод является очень чувствительным?

Список литературы

а) основная литература (библиотека СГАУ):

1. **Пискунов, А. С.** Методы агрохимических исследований / А. С. Пискунов. – М.: КолосС, 2004. - 312 с. - ISBN 5-9532-0145-1.
2. **Кирюшин, Б. Д.** Основы научных исследований в агрономии / Б. Д. Кирюшин, Б. Д. Усманов, И. П. Васильев. - М.: КолосС, 2009. - 398 с. - ISBN 9785-9532-0497-2.

б) дополнительная литература:

1. **Диксон, М.** Ферменты. Т.1 /М. Диксон, Э. Уэбб; пер. англ. - М.: Мир, 1982. - 392 с.
2. **Доспехов, Б. А.** Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. — 5-е изд., доп. и перераб. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.: ил.
3. **Доспехов, Б. А.** Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных: учебное пособие для высш. с.-х. учеб. заведений / Б. А. Доспехов. - М.: Колос, 1972. - 207 с.
4. **Ермаков, А. И.** Методы биохимического исследования растений /А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош. – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.

ЛЕКЦИЯ 13

ИОНОМЕТРИЯ

Вопросы:

13.1 Ионселективные мембранные электроды, классификация. Жидкостные ионообменные электроды, принципы их работы, конструкция. Твердые мембранные электроды, устройство и принцип работы. Гетерогенные мембранные электроды. Электроды с иммобилизованными ферментами и клетками. Электроды из инертного металла.

13.2 Вольтамперометрия как полярографический метод анализа. Сущность и особенности вольтамперометрии. Электрохимические ячейки. Инверсионная вольтамперометрия.

13.1 Ионселективные мембранные электроды, классификация. Жидкостные ионообменные электроды, принципы их работы, конструкция. Твердые мембранные электроды, устройство и принцип работы. Гетерогенные мембранные электроды. Электроды с иммобилизованными ферментами и клетками. Электроды из инертного металла.

Ионоселективные электроды – это электрохимические электроды, равновесный потенциал которых в растворе электролита, содержащем определенные ионы, обратимо и избирательно зависит от концентрации этих ионов. На этом основании ионоселективные электроды используют для определения концентрации (активности) различных ионов в растворе, а также для анализа и контроля процессов, протекание которых сопровождается изменением ионного состава растворов.

Разработка и применение ионоселективные электроды для определения различных ионов - основная задача ионометрии. В большинстве случаев ионоселективный электрод представляет собой устройство, основным элементом которого является мембрана, проницаемая только для определенного иона. Между растворами электролитов, разделенных мембраной, устанавливается стабильная разность потенциалов, которая алгебраически складывается из двух межфазных скачков потенциала и диффузионного потенциала, возникающего внутри мембраны.

Измерение концентрации определяемого иона в принципе возможно по значению эдс гальванического элемента, составленного из находящихся в контакте исследуемого и стандартного растворов, в каждый из которых погружены идентичные ионоселективные электроды, избирательно чувствительные к определяемому иону; концентрация этого иона в стандартном растворе C точно известна.

Для практических измерений гальванический элемент составляют из ионоселективных электродов и электрода сравнения (например, хлоросеребряного), которые сначала погружают в стандартный, а затем в исследуемый раствор; разность соответствующих эдс равна E .

Состав стандартного раствора должен быть по возможности близок к составу измеряемого. Искомую концентрацию c вычисляют по уравнению:

$$\lg c = zE/q + \lg c_0,$$

где z - зарядовое число иона, q - изотермическая постоянная (при 25 °С она равна 58,5 мВ). Различают ионоселективные электроды с твердыми, жидкими и пленочными мембранами. Твердые мембраны создают на основе металлических систем типа Ag-AgCl, Hg-Hg₂Cl₂, ионообменных смол, стекол различного состава, моно- и поликристаллов труднорастворимых в воде солей. Селективность кристаллических ионоселективных

электродов определяется способностью ионов под действием электрического поля перемещаться в кристаллической решетке по дефектам.

Стекланные ионоселективные электроды рассматривают как твердый электролит, который может вступать в ионообменное взаимодействие с исследуемым раствором. Стекланные ионоселективные электроды обладают высокой чувствительностью к ионам H^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ и др., что позволяет проводить измерения, например, pH в диапазоне от -2 до 14 при температурах до 100-150 °С, измерения pNa - в диапазоне от -0,5 до 4 при температурах до 100 °С, измерения pNH₄ - в диапазоне от 0 до 3,5 при температурах до 80 °С (pNa и pNH₄ - отрицат. логарифмы концентраций Na^+ и NH_4^+ в моль/л). Монокристаллический LaF₃ - электрод – наиболее селективный по отношению к ионам F⁻. Ионоселективные электроды с жидкими мембранами создают на основе растворов в орг. растворителях ионообменных веществ (жидкие катиониты или аниониты) или нейтральных хелатных соединений эти растворы отделены от исследуемого водного раствора пористыми перегородками.

Селективность жидких мембран определяется, в первую очередь, избирательностью комплексообразования или ионного обмена между мембраной и раствором.

Примерами таких ионоселективных электродов могут служить Ca²⁺ - электрод на основе раствора кальциевых солей диэфиров фосфорной кислоты (дидецилфосфата) и жидкостной электрод с одинаковой селективностью к ионам Ca²⁺ и Mg²⁺, используемый для определения жесткости воды. В ионоселективные электроды с пленочными мембранами активными являются те же вещества, что и в жидких мембранах, но они нанесены на полимерную матрицу, например, поливинилхлоридную.

На практике мембрана ионоселективного электрода проницаема не только для определяемого иона, но и для посторонних или мешающих (влияющих) ионов, однако селективность мембраны к определяемому и мешающим ионам различна и зависит от их концентрации. Поэтому ионоселективные электроды характеризуют коэффициентом электродной селективности и интервалом концентраций определяемого иона.

В настоящее время созданы ионоселективные электроды для нескольких десятков катионов и анионов; среди них F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, S²⁻, CN⁻, CNS⁻, NO₃⁻, ClO₄⁻, CO₃²⁻, HCO₃⁻, H₂PO₄⁻, RCOO⁻, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Ag⁺, Fe²⁺, R₄N⁺.

Специальные типы ионоселективные электроды позволяют определять концентрацию неионных веществ: газочувствительные ионоселективные электроды, используемые для определения содержания в растворах NH₃, CO₂, SO₂, H₂S и др. Газовый электрод включает ионоселективный электрод и электрод сравнения, контактирующие с небольшим объемом вспомогат. (приэлектродного) раствора, который отделен от исследуемого раствора газовой прослойкой или гидрофобной газопроницаемой мембраной, например, поливинилиденфторидной. В основе их действия лежат реакции с участием газов (напр., CO₂ + H₂O ⇌ H⁺ + HCO₃⁻. Газ (CO₂, NH₃ или иной) распределяется между измеряемым и вспомогат. растворами, образующиеся во вспомогательном растворе ионы регистрируются ионоселективные электроды. Поскольку в большинстве используемых реакций образуются ионы H⁺, в газочувствительных электродах применяют в основных стекланных ионоселективных электродах.

Для определения концентрации большого числа органических соединений служат биоспецифичные ионоселективные электроды - ферментные, иммуноферментные, бактериальные, микробные и др. В основе их действия лежат реакции, катализируемые ферментами, которые превращают неионное вещество (субстрат) в ион, определяемый соответствующим ионоселективные электроды. Обычно фермент используют в иммобилизованном состоянии непосредственно на мембране ионоселективные электроды, иногда - на отдельном носителе. Ферментные электроды позволяют определить концентрацию не только субстратов, но и веществ, являющихся ингибиторами или активаторами каталитических реакций.

Ионоселективные электроды находят применение в химическом анализе для изучения комплексообразования, ассоциации ионов и др.; в качестве детекторов при анализе в проточных системах, что особенно важно для автоматизации контроля производств. процессов; в медико-биол. исследованиях для определения ионного состава биол. сред, активности ионов внутри и вне клетки; для контроля загрязнений воздуха и окружающей среды (дождевой воды, снега, льда и т.п.); для анализа почв и почвенных растворов, исследования ионных равновесий в морской воде и т.д.

13.2 Вольтамперометрия как полярографический метод анализа. Сущность и особенности вольтамперометрии. Электрохимические ячейки. Инверсионная вольтамперометрия.

Вольтамперометрия — метод анализа, основанный на исследовании зависимости тока поляризации от напряжения, прикладываемого к электрохимической ячейке, когда электрический потенциал рабочего электрода значительно отличается от равновесного значения. По разнообразию методов вольтамперометрия — самая многочисленная группа из всех электрохимических методов анализа, широко используемая для определения веществ в растворах и расплавах (например, полярография, амперометрия).

Все разновидности вольтамперометрических методов используют рабочий микроэлектрод с площадью поверхности 10^{-7} – 10^{-1} см². Получаемые с его помощью вольтамперные кривые позволяют идентифицировать растворенные вещества, определить их концентрацию, а нередко — термодинамические и кинетические параметры.

Первый вольтамперометрический метод — полярография — был предложен в 1922 чешским химиком Я. Гейровским. Рабочим электродом в его установке служил капаящий ртутный электрод. Ртуть имеет высокое водородное перенапряжение, поэтому ртутный электрод удобен для изучения процессов, протекающих при отрицательных потенциалах. Поверхность электрода постоянно обновляется в процессе измерения, что исключает загрязнение электрода. Вольтамперометрические исследования проводятся также с помощью твердых электродов, например, из платины и углерода, и используются процессы, протекающие при положительных потенциалах.

В вольтамперометрии с линейной разверткой потенциала (хроноамперометрии) задают линейное изменение потенциала во времени и раствор не перемешивают, так что массоперенос происходит исключительно благодаря диффузии. При циклической вольтамперометрии к электроду прикладывают повторяющиеся импульсы напряжения треугольной формы. Вещества, образующиеся на восходящем участке цикла, исследуются на нисходящем его участке. Такой метод особенно эффективен для изучения механизма электродных реакций путем анализа поляризационных кривых при разных скоростях развертки потенциала и разных концентрациях раствора.

Существуют и другие виды вольтамперометрии — дифференциальная импульсная и квадратно-волновая, — при которых на линейно растущий потенциал налагаются импульсы напряжения разной формы. Эти методы широко используются для определения малых концентраций веществ в растворе. Если в ходе вольтамперометрического измерения раствор перемешивается, а значит, массоперенос осуществляется одновременно с помощью конвекции и диффузии, то говорят о гидродинамической вольтамперометрии. В этом случае удобно использовать вращающийся дисковый электрод, поскольку экспериментальные вольт-амперные кривые можно прямо сопоставить с теоретическими.

Вопросы для самоконтроля

1. Как устроены и как работают ионселективные электроды?
2. Что такое вольтамперометрия?

Список литературы:

а) основная литература (библиотека СГАУ):

1. **Пискунов, А. С.** Методы агрохимических исследований/ А. С. Пискунов. – М.: КолосС, 2004. - 312 с. - ISBN 5-9532-0145-1.
2. **Кирюшин, Б. Д.** Основы научных исследований в агрономии/ Б. Д. Кирюшин, Б. Д. Усманов, И. П. Васильев. - М.: КолосС, 2009. - 398 с. - ISBN 9785-9532-0497-2.

б) дополнительная литература:

1. **Диксон, М.** Ферменты. Т.1 /М. Диксон, Э. Уэбб; пер. англ. - М.: Мир, 1982. - 392 с.
2. **Доспехов, Б. А.** Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. — 5-е изд., доп. и перераб. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.: ил.
3. **Доспехов, Б. А.** Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных: учебное пособие для высш. с.-х. учеб. заведений/ Б. А. Доспехов. - М.: Колос, 1972. - 207 с.
4. **Ермаков, А. И.** Методы биохимического исследования растений /А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош. – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.

ЛЕКЦИЯ 14

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Вопросы:

7.1 Понятие об электрофорезе. Физические основы метода. Вертикальный и горизонтальный электрофорез. Техника приготовления гелей и аппаратура.

14.2 Электрофорез белков и нуклеиновых кислот в полиакриламидном геле. Разделение белков по размерам и заряду. Окрашивание белков.

14.1 Понятие об электрофорезе. Физические основы метода. Вертикальный и горизонтальный электрофорез. Техника приготовления гелей и аппаратура

Электрофорез занимает сейчас центральное место среди методов исследования белков и нуклеиновых кислот. Метод позволяет разделять макромолекулы, различающиеся по таким важнейшим параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд, причем эти параметры могут выступать как порознь, так и в совокупности.

Физический принцип электрофореза

Макромолекулы, находящиеся в буферном растворе, обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависят от рН среды. Если через этот раствор, заключенный в канал из изолирующего материала, например, стеклянную трубку, начать пропускать электрический ток, то вдоль канала установится определенный градиент напряжения - сформируется электрическое поле. Его напряженность измеряется разностью потенциалов по концам рабочего канала (или его участка), отнесенной к его длине (В/см). Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода, причем их трение об окружающую среду ограничивает скорость миграции. В зависимости от величины заряда и размеров молекулы приобретают разные скорости, это и есть сущность процесса электрофореза.

Постепенно исходный препарат, состоявший из различных молекул, разделяется на зоны одинаковых молекул, мигрирующих с одной и той же скоростью. Со временем эти зоны распределяются по длине канала.

В состав системы для электрофореза входят два электрода, представленные спиральками из платиновой проволоки и электродные резервуары. Через находящиеся в них буферные растворы и рабочий канал замыкается электрическая цепь между электродами.

Рабочий канал заполняют гелем. Достаточно чистая и хорошо смачиваемая (гидрофильная) пространственная сетка геля удерживает жидкость от вытекания и препятствует конвекции. Вместе с тем используемые гели содержат очень много жидкости (80—99,5%), в которой (т. е. в рабочем буфере) и мигрируют макромолекулы. Наличие сетки геля вносит важную дополнительную деталь в картину электрофоретической миграции. Фракционируемые макромолекулы любых размеров сталкиваются с нитями полимера, образующего сетку геля, как следствие, возрастает эффективное трение о среду и снижается скорость движения молекул.

В настоящее время почти исключительно используются полиакриламидные гели (ПААГ) и гели агарозы.

Метод электрофореза очень гибок, так как концентрацию полимера можно варьировать и получать гели с очень широким диапазоном размеров пор; можно изменять электрические заряды макромолекул путем вариации рН буфера, конфигурацию макромолекул изменяют путем введения в буфер денатурирующих агентов или детергентов.

К сложностям метода относятся диффузия макромолекул, приводящая к размыванию зон, выделяется тепло, которое может способствовать повышению температуры системы и повлиять на скорость движения макромолекул.

В ходе электрофореза зоны растворенных макромолекул остаются невидимыми. Для наблюдения за процессом в исходный препарат добавляют **краситель**, молекулы которого несут электрический заряд того же знака, что и фракционируемые макромолекулы, но не взаимодействуют с ними. Краситель тоже передвигается в электрическом поле, но уже в виде окрашенной зоны. Его подбирают таким образом, чтобы скорость миграции наиболее подвижных макромолекул была несколько ниже, чем у молекул красителя. Когда окрашенная зона доходит до конца трубки, электрофорез прекращают.

Разделившиеся зоны биополимеров во избежание их диффузии немедленно фиксируют. Для этого гель извлекают из стеклянной формы и вымачивают в смеси кислоты со спиртом так, что белки или нуклеиновые кислоты выпадают в осадок в том самом месте, где закончилась их миграция в ходе электрофореза. После фиксации (или одновременно с ней) проводят окрашивание зон путем вымачивания геля в растворе красителя, прочно связывающегося с белком или нуклеиновой кислотой. Излишек красителя удаляют.

На фотографии окрашенного цилиндрического ПААГ хорошо видны четкие, узкие полосы разделившихся компонентов исходной смеси белков.

Вместо цилиндрических часто используют гели в виде тонких пластин, заподимеризованные между двумя плоскими стеклами. Такие пластины имеют важное преимущество: на них можно одновременно фракционировать несколько препаратов. Обычно их вносят с одного края геля на равных расстояниях друг от друга. Каждый препарат разделяется в электрическом поле независимо от своих соседей, образуя свой набор зон. На фотографии такой пластины хорошо видна серия параллельных «треков», исчерченных поперечными полосами окрашенных зон, в которых располагаются (в данном случае) олигонуклеотиды различной длины.

Вместо окрашивания или наряду с ним часто используют методы обнаружения разделенных зон по их радиоактивности. К ним относятся приемы регистрации полос на фотопленке посредством автордиографии или флюорографии и различные способы счета радиоактивности в геле с помощью жидкостных сцинтилляционных счетчиков. Преимущества пластин не ограничиваются экономией времени и места при обработке большого количества препаратов. Важнее другое: поскольку гель заливают в форму для полимера.

Фракционированием в ПААГ и агарозе не исчерпываются современные методы электрофореза. В качестве «носителей» жидкой фазы широко используют также пленки из ацетата целлюлозы, фильтровальную бумагу, тонкие слои силикагеля, целлюлозы, сефадекса и др. В некоторых случаях, например, при разделении низкомолекулярных веществ, эти системы имеют свои преимущества, однако для фракционирования белков, нуклеиновых кислот и их фрагментов в настоящее время используют почти исключительно гель-электрофорез, поэтому только он и будет подробно описан.

Гели для электрофореза

ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ (ПААГ). Акриламид ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CONH}_2$) представляет собой белый кристаллический порошок. Хорошо очищенный продажный препарат содержит не более 0,05% акриловой кислоты. Его 5%-ный водный раствор должен иметь рН не ниже 5, а оптическая плотность 1%-ного раствора при 290 нм (A_{290}) не должна превышать 0,15. Такой препарат можно использовать без дополнительной очистки или перекристаллизации. Акриламид следует хранить сухим, в темной посуде, предпочтительно на холоду. В этих условиях он может храниться до года. Акриламид токсичен (воздействует на кожу и нервную систему), поэтому отвешивать и растворять его следует в перчатках и под тягой.

NN'-Метиленбисакриламид («Бис») – $(\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CONH})_2 - \text{CH}_2 -$ используют в

качестве «сшивки» линейных полимеров акриламида. Продажные препараты, содержащие не более 0,02% акриловой кислоты, не нуждаются в дополнительной очистке. При подготовке определенной серии опытов удобно заранее приготовить концентрированный (30 — 40%) водный раствор акриламида и метиленбисакриламида с определенным соотношением обоих мономеров. Такой раствор можно хранить в холодильнике в течение нескольких недель. ТЕМЕД хранится хорошо, а персульфат аммония растворяют в воде непосредственно перед началом опыта.

Для приготовления геля маточные растворы мономеров и буфера смешивают в такой пропорции, чтобы получить нужную конечную концентрацию акриламида и буфера, дополняют до расчетного объема водой и вносят ТЕМЕД. После этого раствор деаэрируют в колбе Бунзена, присоединенной к водоструйному насосу, добавляют расчетный объем раствора персульфата и заливают в трубку или между стеклами для формирования пластин. При правильном выборе концентраций персульфата и ТЕМЕД полимеризация занимает 30 — 40 мин. Ее следует вести вдали от яркого источника света.

Техника приготовления гелей и приборов для электрофореза

Рассмотрим основные технические приемы приготовления и использования гелей для электрофореза. Это рассмотрение целесообразно провести отдельно для трех вариантов аналитического электрофореза: вертикального в трубках, вертикального в пластинах и горизонтального в пластинах.

Вертикально расположенные трубки

Вертикальное расположение гелей имеет то преимущество, что препарат, наносимый на гель сверху, при любом его объеме равномерно покрывает всю рабочую поверхность геля. Затруднение при вертикальном расположении могут возникать при недостаточной сцепленности геля со стеклом, он будет сползать вниз. Все приборы с вертикальным расположением гелей конструктивно сложнее, чем аппараты с горизонтальным расположением, т.к. верхний электродный резервуар должен быть поднят над гелем. Необходимо уплотнение в местах сочленения его с трубками или пластинами.

Трубки (12-18штук) с уже запolyмеризованным в них гелем вставляют снизу в резиновые прокладки так, чтобы их верхние концы выступали над дном резервуара. Если используют не все трубки, то на их место ставят заглушки. Собранный вместе с трубками верхний электродный резервуар устанавливают на нижний так, чтобы концы трубок оказались на некотором расстоянии от дна последнего и заполняют нижний резервуар электродным буфером до такого уровня, что трубки оказываются почти полностью погруженными в буфер. Это делается для улучшения теплоотвода в процессе электрофореза. С этой же целью нижний буфер перемешивают магнитной мешалкой или вводят дополнительную охлаждающую систему. Оба резервуара цилиндрической или прямоугольной формы изготавливают из плексигласа, что позволяет следить за продвижением фронта красителя. В резервуарах должны быть закреплены электроды из платиновой проволоки. Нижний электрод при этом должен располагаться так, чтобы поднимающиеся от него пузырьки газа не попадали на нижние торцы трубок, что создавало бы помехи протекания через них тока. Объемы электродных резервуаров достаточно велики, чтобы рН находящегося в них буфера не изменялся под влиянием продуктов электролиза.

Для заливки и полимеризации геля нижние торцы трубок заклеивают парафильмом и устанавливают строго вертикально в штатив. Заливают гель. Собранный прибор, заливают буфер в верхний электродный резервуар. При полимеризации геля часть трубки с верхнего ее конца оставляют свободной, и туда при заливке попадает буфер. Затем под него, на поверхность геля, пипеткой накладывают препарат, в который добавляют предварительно 5-10% сахарозы. При любом варианте электрофореза надо быть уверенным в том, что исходный препарат свободен от взвешенных частиц (пыли или осадков), которые будут

собирается на торце геля и однородность тока по его сечению, что повлечет за собой деформацию разделяющихся зон.

Горизонтально расположенные пластины

Преимущество-отсутствие проблемы уплотнения. Оба электродных буфера находятся в резервуарах, расположенных ниже уровня горизонтального столика, на который кладут гель.

Гель, полимеризованный на тонкой стеклянной пластинке или плашке из плексигласа, помещают на столик открытой поверхностью кверху, поскольку препарат вносят не с торца, а в ряд специальных «колодцев», расположенных на некотором расстоянии от края. Электрофорез проводят в форезных камерах. Препараты вносят в «колодцы» вместе с красителем - бромфеноловым синим, содержащим также глицерин, который «прижимает» краситель и препарат, не позволяя им диффундировать в геле или в буфере.

Приборы для электрофореза

Для проведения электрофореза чаще всего используются приборы конструкции, предложенной Стадиером. Верхний и нижний резервуары прямоугольной формы соединены вертикальной стенкой, в которой имеется вырез, ведущий в полость верхнего резервуара. Такой же вырез имеет и одна из двух стеклянных пластин, между которыми полимеризуется гель. Пластины прижимаются пружинными зажимами к вертикальной стенке так, чтобы оба выреза совпадали. Буфер в верхний резервуар заливают до такого уровня, чтобы он через вырез покрывал верхний торец геля. При этом вторая, не вырезанная, стеклянная пластинка выступает в роли передней стенки резервуара. В месте совмещения двух вырезов, между стеклянной пластиной и стенкой, должно быть осуществлено уплотнение, препятствующее вытеканию верхнего буфера. В оба резервуара вмонтированы электроды из платиновой проволоки. При установке в прибор форму с гелем частично погружают в буфер нижнего резервуара, так что она опирается на разнесенные по сторонам выступы и ее нижний торец оказывается приподнятым над дном резервуара. После погружения необходимо удалить пузырьки воздуха.

По окончании электрофореза пластины разнимают, отслаивая одну из них от геля с помощью шпателя. Его всовывают между пластинами со стороны карманов и слегка поворачивают. Со второй пластины

14.2 Электрофорез белков и нуклеиновых кислот в полиакриламидном геле. Разделение белков по размерам и заряду. Окрашивание белков

Электрофорез белков в простой системе удобно использовать для их разделения, но не характеристики. Электрофоретическая подвижность каждого белка в простой системе зависит одновременно и от массы белка, и от его суммарного электрического заряда, и от конфигурации, и от жесткости упаковки белковой глобулы. Вклад каждого из этих факторов неизвестен и может существенно изменяться в зависимости от условий электрофореза. Для установления строгой корреляции между каким-либо одним из перечисленных параметров и электрофоретической подвижностью белка надо исключить влияние всех остальных.

Электрофорез в ПААГ с использованием DDC-Na позволяет разделять белки, различающиеся между собой только по молекулярной массе. Для этого смесь белков в исходном препарате обрабатывают не менее, чем трехкратным избытком DDC-Na (по весу). За счет гидрофобных взаимодействий детергент одинаково связывается с подавляющим большинством белков в соотношении 1,4 мг DDC-Na на 1 мг белка.

Огромный избыток полностью диссоциированных остатков сульфокислоты, привносимый детергентом, в большинстве случаев делает несущественной роль собственного заряда белка. Благодаря электростатическому отталкиванию тесно расположенных отрицательно заряженных остатков серной кислоты, белковая цепь распрямляется и приобретает форму жесткой палочки с поперечником $-1,6 \text{ m}$ и длиной,

зависящей только от числа звеньев этой цепи, а следовательно — от молекулярной массы белка.

Одновременно с обработкой DDC-Na необходимо обеспечить возможность полного развертывания белковой цепи, а для этого — разорвать все ковалентные S-S связи внутри молекулы белка. С этой целью белок перед электрофорезом обрабатывают еще и высокой концентрацией (1%) (3-меркаптоэтанола при повышенной температуре.

Электрофретическая подвижность, т. е. скорость миграции при напряженности поля 1 В/см, жесткого комплекса белок DDC-Na оказывается связанной с молекулярной массой белка (M) простым соотношением $A-BI_gM$, где A и B — коэффициенты, зависящие от пористости геля, температуры и других условий эксперимента. Величину i' удобнее представлять в относительных единицах, выражающих отношение путей миграции белка и «лидирующего красителя» — бромфенолового синего. Обозначим это отношение R_f . Такая замена отразится только на значении коэффициентов A и B, о которых нам известно только то, что они в данных условиях опыта одинаковы для всех белков. Измененные величины коэффициентов тоже будут постоянными величинами в данном опыте. Поэтому вместо их определения пользуются методом сравнения с известными по своей массе «маркерами». Одновременно с электрофорезом изучаемой смеси белков, отдельным треком на той же пластинке, т.е. в тождественных условиях эксперимента, разделяют смесь известных маркеров. С их помощью по точкам строят зависимость $I_gM=f(R_f)$, которая, естественно, оказывается прямолинейной. Опираясь на эту зависимость, можно графически, по измеренным величинам R_f определить значения I_gM , а следовательно, и M для исследуемого белка. Разумеется, вся предварительная обработка детергентом и Р-меркаптоэтанола должна быть проведена строго одинаково для этого белка и всех маркеров.

Выбор буфера в этом варианте не играет роли, так как заряд белка определяется его комплексом с DDC-Na. Обычно используют нейтральный буфер, добавляя в него 0,1% DDC-Na, чтобы поддержать комплекс детергента с белками»

Для белков с молекулярной массой менее 12 тысяч дальтон определение M становится ненадежным. Для различных диапазонов масс белков рекомендуется использовать ПААГ различной пористости, согласно следующей таблице:

Диапазон M (тысяч дальтон) % ПААГ 12-43 15 16-68 10 36-94 7,5 57-212 5

Сам процесс электрофореза и окраски белков после его окончания производят как обычно, но DDC-Na от белка предпочтительно отмыть до окраски, вымачивая гель в 50% -ной ТХУ в течение ночи.

DDC-Na в комплексе с белком в некоторой мере препятствует окрашиванию (большой отрицательный заряд!).

14.2 Электрофорез белков и нуклеиновых кислот в полиакриламидном геле.

Разделение белков по размерам и заряду. Окрашивание белков.

Электрофретическая подвижность биополимеров в геле (i') пропорциональна их подвижности в свободной жидкости (i_0), которая определяется отношением суммарного заряда макромолекулы к ее массе. Фактором, обуславливающим отличие i' от i_0 является сила трения о гель, которая зависит от соотношения линейных размеров макромолекул и пор геля, а следовательно, от молекулярных масс белков и концентрации ПААГ. Молекулярные массы подавляющего большинства индивидуальных белков не превышают 500 000. Поэтому использование гелей агарозы оказывается нецелесообразным, кроме тех случаев, когда разделение белков хотят вести только по величине отношения заряда к массе. Как правило, электрофорез белков проводят в ПААГ, содержащем 5 — 20% акриламида.

Белки являются, цвиттерионами. Их суммарным зарядом, а следовательно, и отношением заряда к массе, можно управлять путем изменения рН буфера, в котором полимеризуют ПААГ и ведут электрофорез и который далее будем именовать рабочим.

Очевидно, что оптимальное значение рН рабочего буфера обуславливает не максимальный заряд, а максимальное различие зарядов разных белков, составляющих исходную смесь. Поэтому в большинстве случаев нецелесообразно использовать экстремальные величины рН рабочего буфера, слишком удаленные от изоэлектрических точек всех белков смеси. Для обычных кислых белков оптимальные значения рН буфера оказываются в нейтральной или слабощелочной области; миграция белков идет в направлении от катода к аноду. Для щелочных белков (гистонов, белков рибосом и др.) целесообразно использовать слабокислые буферы (рН 4 — 5). Эти белки различаются по величине суммарного положительного заряда и мигрируют в направлении от анода к катоду.

Несмотря на малое количество фракционируемого белка, от рабочего буфера требуется существенная емкость, так как при образовании зоны локальная концентрация белка может оказаться значительной. Поэтому приходится использовать буферы с концентрацией 0,1 — 0,2 М и более. При этом следует учитывать, насколько близко к границе буферной области лежит рабочее значение рН. Если такое приближение к границе необходимо, то для обеспечения достаточной буферной емкости молярность буфера приходится еще увеличивать. Эффект трения о гель зависит не только от молекулярной массы, но и от конфигурации и жесткости. Несмотря на малое количество фракционируемого белка, от рабочего буфера требуется существенная емкость, так как при образовании зоны локальная концентрация белка может оказаться значительной. Поэтому приходится использовать буферы с концентрацией 0,1 — 0,2 М и более. При этом следует учитывать, насколько близко к границе буферной области лежит рабочее значение рН. Если такое приближение к границе необходимо, то для обеспечения достаточной буферной емкости молярность буфера приходится еще увеличивать. Вопрос об электропроводности буферов рассмотрен ниже.

Отметим далее, что эффект трения о гель зависит не только от молекулярной массы, но и от конфигурации и жесткости белковой макромолекулы. Глобулярные белки, неспособные к агрегации или диссоциации на субъединицы, ведут себя более или менее одинаково, хотя их размеры зависят от плотности упаковки глобулы. Рыхлые глобулярные и, особенно, фибриллярные белки могут деформироваться при взаимодействии с гелем и тем самым облегчать себе миграцию между его нитями. Этот эффект особенно сильно выражен у высокомолекулярных нуклеиновых кислот.

Для однозначного определения молекулярной массы белка по скорости его миграции при электрофорезе бывает целесообразно распрямить полипептидную цепочку белка и придать ей жесткость. Именно такой прием используется увеличивать. Эффект трения о гель зависит не только от молекулярной массы, но и от конфигурации и жесткости. Несмотря на малое количество фракционируемого белка, от рабочего буфера требуется существенная емкость, так как при образовании зоны локальная концентрация белка может оказаться значительной. Поэтому приходится использовать буферы с концентрацией 0,1 — 0,2 М и более. При этом следует учитывать, насколько близко к границе буферной области лежит рабочее значение рН. Если такое приближение к границе необходимо, то для обеспечения достаточной буферной емкости молярность буфера приходится еще увеличивать. Вопрос об электропроводности буферов рассмотрен ниже.

Отметим далее, что эффект трения о гель зависит не только от молекулярной массы, но и от конфигурации и жесткости белковой макромолекулы. Глобулярные белки, неспособные к агрегации или диссоциации на субъединицы, ведут себя более или менее одинаково, хотя их размеры зависят от плотности упаковки глобулы. Рыхлые глобулярные и, особенно, фибриллярные белки могут деформироваться при взаимодействии с гелем и тем самым облегчать себе миграцию между его нитями. Этот эффект особенно сильно выражен у высокомолекулярных нуклеиновых кислот.

Для однозначного определения молекулярной массы белка по скорости его миграции при электрофорезе бывает целесообразно распрямить полипептидную цепочку белка и

придать ей жесткость. Именно такой прием используется при электрофорезе белков, обработанных додецилсульфатом натрия.

Элюция белков из геля

Простейший прием-извлечение белка из фрагмента геля за счет диффузии в течение длительного времени при 37-400. Это приемлемо и для свободных белков, и для комплексов с ДСН. Для этого гель измельчают, в суспензию добавляют ДСН (даже если проводили электрофорез без него). После окончания элюции гель удаляют центрифугированием. От ДСН и красителя отмывают ацетоном. Осажденный ацетоном белок высушивают или лиофилизируют. Существует огромное разнообразие методов и реактивов для элюции, предложенных различными авторами.

Вопросы для самоконтроля

1. Понятие об электрофорезе.
2. Почему данный метод широко используется в разных областях биологической науки?
3. В чем заключается принцип электрофореза?

Список литературы:

а) основная литература (библиотека СГАУ):

1. **Пискунов, А. С.** Методы агрохимических исследований/ А. С. Пискунов. – М.: КолосС, 2004. - 312 с. - ISBN 5-9532-0145-1.
2. **Кирюшин, Б. Д.** Основы научных исследований в агрономии/ Б. Д. Кирюшин, Б. Д. Усманов, И. П. Васильев. - М.: КолосС, 2009. - 398 с. - ISBN 9785-9532-0497-2.
3. **Остерман, Л. А.** Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование: практическое пособие/ **Л. А. Остерман.** - М.: Наука, 1981. - 288 с.

б) дополнительная литература:

1. **Березкин, В. Г.** Газовая хроматография в химии полимеров/ В. Г. Березкин, В. Р. Алишоев, И. Б. Немировская - М.: Наука, 1972. - 287 с.
2. **Березкин, В. Г.** Количественная тонкослойная хроматография/ В. Г. Березкин, А. С. Бочков. - М.: Наука, 1980. - 183 с.
3. **Бутенко, Р. Г.** Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений/ Р. Г. Бутенко. - М.: Наука, 1964. – 272 с.
4. **Диксон, М.** Ферменты. Т.1 /М. Диксон, Э. Уэбб; пер. англ. - М.: Мир, 1982. - 392 с.
5. **Доспехов, Б. А.** Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. — 5-е изд., доп. и перераб. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.: ил.
6. **Доспехов, Б. А.** Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных: учебное пособие для высш. с.-х. учеб. заведений/ Б. А. Доспехов. - М.: Колос, 1972. - 207 с.
7. **Ермаков, А. И.** Методы биохимического исследования растений /А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош. – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.

ЛЕКЦИЯ 15

УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ТЕОРИИ СЕДИМЕНТАЦИИ.

Вопросы:

15.1 Ультрацентрифугирование. Ультрацентрифуга. Принцип действия и расположение важнейших узлов. Дифференциальное центрифугирование. Зонально-скоростное центрифугирование. Равновесное центрифугирование.

15.2 Основные понятия теории седиментации.

15.1 Ультрацентрифугирование. Ультрацентрифуга. Принцип действия и расположение важнейших узлов. Дифференциальное центрифугирование. Зонально-скоростное центрифугирование. Равновесное центрифугирование.

Ультрацентрифугирование - метод разделения и исследования частиц размером менее 100 нм (коллоидные системы, молекулы белков, нуклеиновых к-т, синтетических полимеров) под действием центробежных сил.

Ультрацентрифуга (от ультра..., центр и лат. fugo — бег, бегство), прибор для разделения частиц менее 100 нм (коллоидов, субклеточных частиц, макромолекул белков, нуклеиновых кислот, липидов, полисахаридов, синтетических полимеров и пр.), взвешенных или растворённых в жидкости; это достигается вращением ротора, создающего центробежное поле с ускорением, на много порядков превышающим ускорение силы тяжести.

По назначению и конструкции ультрацентрифуги подразделяются на **препаративные, аналитические и препаративно-аналитические**.

Препаративные ультрацентрифуги снабжены угловыми роторами с гнездами для цилиндрических пробирок, стаканов или бутылок, наклоненных под углом 20—40° к вертикальной оси ротора, либо так называемыми бакетными роторами со стаканами, поворачивающимися на 90° при вращении. Существуют также зональные и проточные роторы с одной большой внутренней полостью для фракционируемой жидкости. Препаративные ультрацентрифуги используются для выделения отдельных компонентов из сложных смесей.

Аналитические ультрацентрифуги снабжены роторами со сквозными цилиндрическими гнездами, в которые помещены специальные прозрачные кюветы для исследуемых растворов или суспензий. Процесс перераспределения частиц в них можно наблюдать непосредственно при вращении ротора с помощью специальных оптических систем (рефрактометрических, абсорбционных). Существуют модели аналитических ультрацентрифуг, соединённые с ЭВМ, производящими автоматическую обработку экспериментальных данных.

Первая ультрацентрифуга, предназначенная для изучения движения частиц, невидимых в световой микроскоп, создана шведским учёным Т. Сведбергом в 1923 (публикация в 1924). В этой ультрацентрифуге достигались центробежные ускорения всего до 5000 g. Она имела абсорбционную оптическую систему и использовалась для изучения движения частиц золота диаметром около 5 нм. В 1926 г. Т. Сведберг сконструировал первую высокоскоростную ультрацентрифугу (41000 об/мин, ускорения — до 10⁵ g), с помощью которой проводились аналитические исследования белков в растворах (в частности, гемоглобина). В 1939 г. Т. Сведбергом создана аналитическая ультрацентрифуга со стальным ротором (65000 об/мин). Подавляющее большинство современных лабораторных ультрацентрифуг снабжено электрическими приводами и алюминиевыми или титановыми роторами.

Метод дифференциального центрифугирования

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

Зонально-скоростное центрифугирование

Этот метод, называемый ещё s-зональным центрифугированием, заключается в насаивании исследуемого образца на поверхность раствора с непрерывным градиентом плотности. Затем образец центрифугируют до тех пор, пока частицы не распределятся вдоль градиента в виде дискретных зон или полос. Благодаря созданию градиента плотности удаётся избежать смешивания зон, возникающего в результате конвекции. Этот метод применяется для разделения гибридов РНК-ДНК, субъединиц рибосом и других клеточных компонентов.

Равновесное центрифугирование в градиенте плотности.

Для создания градиента плотности используют соли тяжёлых металлов, например, рубидия или цезия, а также растворы сахарозы. Образец, например, ДНК, смешивают с концентрированным раствором хлористого цезия. И растворённое вещество (ДНК), и растворитель сначала распределяют по всему объёму равномерно. В ходе центрифугирования устанавливается равновесное распределение концентрации, а, следовательно, и плотности $CsCl$, так как ионы цезия обладают большой массой. Под действием центробежного ускорения молекулы ДНК распределяются, собираясь в виде отдельной зоны в части пробирки с соответствующей им плотностью. Метод применяется главным образом в аналитическом центрифугировании, и был использован Нельсоном и Сталем для изучения механизма репликации ДНК *E.coli*. равновесное центрифугирование в градиенте плотности является также методом разделения и изучения липопротеидов плазмы крови человека.

15.3 Основные понятия теории седиментации.

Седиментационный анализ - один из наиболее широко применяемых не прямых методов определения размера частиц и их распределения по размерам. Седиментационный анализ основан на зависимости скорости осаждения однородных частиц от их размеров. Грубодисперсные системы изучают методом седиментации в гравитационном поле, а тонкодисперсные и коллоидно-дисперсные – методом седиментации в центрифуге и в ультрацентрифуге.

В вязкой и плотной среде при седиментации частица движется под действием силы тяжести в гравитационном поле. Сила сопротивления среды, действующая на сферическую частицу, зависит от ее размера, скорости движения, вязкости среды и характеризуется числом Рейнольдса.

Уравнение Стокса было выведено при соблюдении ряда условий, которые не всегда соблюдаются в реальных системах:

- Частицы должны быть сферическими. Это условие обычно выполняется для разбавленных эмульсий и частиц полимеров, полученных методом эмульсионной полимеризации. Частицы суспензий часто отклоняются от сферической формы, поэтому для них определяется некоторый эффективный радиус частицы той же массы, движущейся с той же скоростью. Такой радиус называют эквивалентным или эффективным.

- Отсутствие взаимодействия между частицами. Расстояние между частицами должно быть достаточно большим, чтобы падение одних частиц не сказывалось на скорости других. Поэтому анализ следует проводить при невысоких концентрациях (1-2%).
- Необходимо, чтобы сосуд, в котором происходит седиментация, был намного больше размеров частиц. Это необходимо для того, чтобы можно было пренебречь влиянием стенок, так как вблизи стенок скорость оседания не следует закону Стокса.
- Движущиеся частицы должны быть твердыми и гладкими. Это условие связано с возможностью изменения формы частиц в результате возникновения в них микропотоков. Условие не выполняется при течении эмульсий.
- Отсутствие проскальзывания между оседающей частицей и средой. Необходимо, чтобы частица хорошо смачивалась жидкостью, так как в уравнение входит h – вязкость именно жидкости.
- Скорость оседания должна быть постоянной, иначе сила тяжести не уравновесится силой трения.
- Скорость оседания должна быть небольшой, в противном случае возникает турбулентный режим течения, и тогда нельзя будет использовать вязкость h , соответствующую ламинарному режиму течения.

Вопросы для самоконтроля

1. Понятие о центрифугировании и ультрацентрифугировании.
2. Для чего используется метод дифференциального центрифугирования?
3. В чем заключается теория седиментации?

Список литературы

а) основная литература (библиотека СГАУ):

1. **Пискунов, А. С.** Методы агрохимических исследований/ А. С. Пискунов. – М.: КолосС, 2004. - 312 с. - ISBN 5-9532-0145-1.
2. **Кирюшин, Б. Д.** Основы научных исследований в агрономии/ Б. Д. Кирюшин, Б. Д. Усманов, И. П. Васильев. - М.: КолосС, 2009. - 398 с. - ISBN 9785-9532-0497-2.
3. **Штейн, Г.И.** Руководство по конфокальной микроскопии/ Г. И. Штейн. - СПб: ИНЦ РАН, 2007. – 77 с.
4. **Остерман, Л. А.** Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование: практическое пособие/ **Л. А. Остерман.** - М.: Наука, 1981. - 288 с.

б) дополнительная литература:

1. **Березкин, В. Г.** Газовая хроматография в химии полимеров/ В. Г. Березкин, В. Р. Алишоев, И. Б. Немировская - М.: Наука, 1972. - 287 с.
2. **Березкин, В. Г.** Количественная тонкослойная хроматография/ В. Г. Березкин, А. С. Бочков. - М.: Наука, 1980. - 183 с.
3. **Бутенко, Р. Г.** Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений/ Р. Г. Бутенко. - М.: Наука, 1964. – 272 с.
4. **Диксон, М.** Ферменты. Т.1 /М. Диксон, Э. Уэбб; пер. англ. - М.: Мир, 1982. - 392 с.
5. **Доспехов, Б. А.** Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. — 5-е изд., доп. и перераб. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.: ил.
6. **Доспехов, Б. А.** Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных: учебное пособие для высш. с.-х. учеб. заведений/ Б. А. Доспехов. - М.: Колос, 1972. - 207 с.
7. **Ермаков, А. И.** Методы биохимического исследования растений /А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош. – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.