

LỜI NÓI ĐẦU

Từ khi học thuyết tế bào ra đời (1838 - 1839), sinh học đã chuyển sang một giai đoạn mới. Tế bào học đã trở thành môn khoa học cơ sở cho các ngành sinh học khác. Những thành tựu về tế bào học đã góp phần đẩy mạnh sự phát triển các ngành sinh học.

Là môn khoa học cơ sở, Tế bào học trở thành môn học bắt buộc trong chương trình đào tạo ở khoa Sinh các trường Đại học Sư phạm, Đại học Khoa học tự nhiên cũng như một số trường trong khối Nông - Lâm - Ngư - Y.

*Để phục vụ cho việc học tập, nghiên cứu về tế bào học của cán bộ, sinh viên, chúng tôi đã tiến hành biên soạn giáo trình **Tế bào học** này.*

Để hoàn thành giáo trình này, chúng tôi đã nhận được sự góp ý quý báu của nhiều đồng nghiệp, đặc biệt là PGS. TS. Nguyễn Như Hiền - Đại học Quốc gia Hà Nội. Chúng tôi chân thành cảm ơn những ý kiến đóng góp quý báu đó.

Vì còn hạn chế về nguồn tư liệu cũng như trình độ nên giáo trình không tránh khỏi những sai sót. Chúng tôi rất mong nhận được ý kiến đóng góp để lần tái bản sau giáo trình được hoàn thiện hơn.

CÁC TÁC GIẢ

Mở đầu

1. Đối tượng và nhiệm vụ của môn Tế bào học

Tế bào học là một môn khoa học nghiên cứu tế bào. Tế bào là đơn vị tổ chức cơ sở của vật chất sống về hình thái, sinh lí sinh hóa và di truyền.

Tế bào tồn tại ở tất cả các mức độ của tổ chức sống ở cơ thể vi sinh vật, thực vật và động vật. Vì vậy, vi sinh vật, động vật và thực vật đều là đối tượng nghiên cứu của tế bào học.

Cấu trúc của siêu vi khuẩn (virus) không có những đặc điểm chung với cấu trúc tế bào, chúng thiếu hệ thống enzyme nên thiếu sự trao đổi chất riêng của mình, do đó siêu vi khuẩn không thuộc phạm vi và đối tượng nghiên cứu của tế bào học.

Các cơ thể vi sinh vật có thể xem là các cơ thể có tổ chức ở mức độ tế bào mà nhân của chúng ở hệ phân tán. Chúng là đối tượng nghiên cứu của tế bào học.

Các cơ thể đơn bào như nguyên sinh động vật là những cơ thể có cấu trúc chỉ gồm một tế bào. Mặc dầu cơ thể đơn bào có tính đa dạng, nhưng chúng vẫn giữ cấu trúc chung của tế bào. Như vậy, cơ thể đơn bào vừa là tế bào vừa là cơ thể toàn vẹn.

Trong cơ thể đa bào có nhiều loại tế bào phân hoá khác nhau trên cơ sở phân hóa chức năng. Ví dụ: tế bào bạch cầu vẫn giữ nguyên tính chất nguyên thủy, trái lại với những tế bào phân hoá cao như tế bào thần kinh. Tuy được phân hóa cao, nhưng tế bào trong cơ thể đa bào vẫn giữ được những nét đặc trưng của một tế bào riêng rẽ. Như vậy, tế bào của cơ thể đa bào không chỉ là một thành phần của cơ thể toàn vẹn mà còn là một đơn vị sống toàn vẹn.

Nghiên cứu tất cả các đặc tính cấu trúc, di truyền các quá trình sinh lý, sinh hoá, nguồn gốc và tiến hóa của tế bào ở tất cả các dạng tồn tại là đối tượng của môn tế bào học đại cương.

Nhưng, trước kia, tế bào học chỉ nghiên cứu bó hẹp trong lĩnh vực hình thái học, một số quá trình sinh lí, còn quá trình sinh hoá, lí sinh, di truyền tế bào chưa được nghiên cứu. Mãi đến những năm 30 của thế kỉ XX, do sự xâm nhập của các môn khoa học khác như toán, lí, hóa vào sinh học và do ứng dụng các phương tiện nghiên cứu mới trong sinh học như kĩ thuật hiển vi điện tử, hóa tế bào, lí tâm siêu tốc, nguyên tử, đánh dấu, phân tích cấu trúc bằng tia Rơnghen... thì trong tế bào học có một cuộc cách mạng lớn, đã đi sâu vào nghiên cứu các hiện tượng lý sinh, các quá trình sinh hoá - nghiên cứu ở mức độ siêu hiển vi và cả mức độ phân tử, và đã đạt được những thành tựu to lớn, đặt môn tế bào học vào vị trí mũi nhọn của nền khoa học sinh học hiện đại.

Nhiệm vụ của môn tế bào học hiện nay là nghiên cứu và giải quyết 3 vấn đề lớn: vấn đề tiến hóa; vấn đề tự điều khiển; vấn đề tự sinh sản của tế bào.

** Vấn đề tiến hoá của tế bào gồm:*

- Làm sáng tỏ con đường xuất hiện phức hệ tổ chức tế bào trong quá trình hình thành sự sống.

- Nghiên cứu các định luật tiến hóa của tế bào ở các dạng tồn tại (là vấn đề chủng loại phát sinh của tế bào).

- Nghiên cứu các vấn đề có liên quan đến quá trình cá thể phát sinh của tế bào ở cơ thể đơn bào và cơ thể đa bào.

** Vấn đề tự điều khiển bao gồm:*

- Nghiên cứu các quá trình bảo đảm cho sự sống của tế bào.
- Nghiên cứu cơ chế, quá trình đưa đến trạng thái bất bình thường của tế bào.
- Định tính, thích nghi của tế bào với môi trường sống.
- Nghiên cứu các cơ chế điều hòa các quá trình nội bào theo không gian và thời gian.
- Nghiên cứu phương thức tồn tại của chức phận và quan hệ tương hỗ giữa các tế bào trong cơ thể đa bào dưới hệ thống điều khiển chung của cơ thể.

** Vấn đề sinh sản bao gồm:*

- Nghiên cứu các quá trình sinh sản và sinh trưởng của tế bào và các cấu trúc của tế bào.
- Làm sáng tỏ cơ chế tổng hợp protein trong tế bào, cơ chế, chức năng di truyền của tế bào: tích thông tin di truyền, chuyển thông tin di truyền cho thế hệ các tế bào con.
- Tế bào được xem là đơn vị sống cơ bản cả về cấu trúc, chức phận cũng như di truyền của tất cả các dạng tồn tại của các tổ chức sống, do đó tế bào học được xem là trung tâm của hệ thống khoa học sinh học. Chính ở đây cũng là nơi gặp gỡ của các kiến thức toán, lí, hóa. Thành tựu của tế bào học là cơ sở để giải quyết các vấn đề cơ bản như: nguồn gốc sự sống, vấn đề sinh tổng hợp protein, vấn đề di truyền học... các vấn đề trong y học và nông nghiệp... Đồng thời cũng là cơ sở vững chắc cho khoa học triết học duy vật macxit.

2. Sơ lược lịch sử môn Tế bào học

Danh từ tế bào bắt nguồn từ chữ Latinh "*Cela*" có nghĩa là xoang rỗng, được Robert Hooke dùng lần đầu tiên vào năm 1665 khi ông miêu tả cấu trúc của nút bần dưới kính hiển vi phóng đại 30 lần do ông chế tạo.

Khoảng 10 năm sau (1674), Leewenhooke với kính hiển vi phóng đại 270 lần, lần đầu tiên đã quan sát thấy các tế bào tự do, các cấu trúc chứa bên trong tế bào và đã phát hiện ra nhân của tế bào hồng cầu. Tuy nhiên, thời bấy giờ người ta chưa có khái niệm rõ ràng về cấu trúc chứa bên trong tế bào. Những hiểu biết đầu tiên như vậy kéo dài 100 năm. Mãi đến thế kỉ XIX, nhờ sự hoàn thiện dần của kính hiển vi mà đã có nhiều công trình nghiên cứu tế bào ra đời. Từ đó, người ta đã khám phá ra hàng loạt các cấu trúc quan trọng trong tế bào.

Đáng chú ý hơn cả là công trình nghiên cứu và tổng kết của nhà thực vật học Schleiden (1838) và nhà động vật học Schwann (1839). Trên cơ sở công trình nghiên cứu của mình và dựa vào kết quả của nhiều công trình trước đó, hai ông đã tổng kết nâng lên thành lý luận. Và học thuyết tế bào ra đời. Học thuyết tế bào đã xác nhận rằng: "Tất cả sinh vật từ động vật, thực vật và cả cơ thể đơn bào đều có cấu tạo gồm các tế bào và các

sản phẩm của tế bào”. Học thuyết tế bào là một trong những tổng kết vĩ đại về sinh học. Học thuyết tế bào ra đời đã có ảnh hưởng lớn đến tất cả các hướng nghiên cứu sinh học. Sinh học và tế bào học bắt đầu phát triển mạnh mẽ từ đây. Tuy nhiên, trong suốt thế kỉ XIX, tế bào học chỉ tập trung nghiên cứu về cấu trúc và hiện tượng sinh sản của tế bào và hình thái... Đó là thời kì nghiên cứu tế bào có tính chất cổ điển.

Trong những năm của thế kỉ XX, tế bào học phát triển rất mạnh, nhanh chóng đạt được nhiều thành tựu lớn. Thành công đó nhờ vào hai nguyên nhân sau:

- Sự tiến bộ của kĩ thuật, của phương pháp nghiên cứu, trước hết là kĩ thuật hiển vi điện tử và phân tích cấu trúc bằng tia Ronghen.

- Sự phối hợp chặt chẽ với các môn khoa học khác như di truyền, sinh lý, sinh hoá và lí sinh.

Nhờ vậy mà các nhà tế bào học đi sâu nghiên cứu cấu trúc siêu hiển vi, cấu trúc phân tử của tế bào và các quá trình sinh lí, sinh hoá, lý sinh trong tế bào học.

Sau đây đề cập đến một số thành tựu đã đạt được

Những thành tựu khoa học của ngành sinh lí tế bào:

Từ chỗ nghiên cứu tế bào trên mẫu vật đã được xử lí và nhuộm màu ở thế kỉ XIX, bước sang thế kỉ XX, các nhà sinh lí học tập trung nghiên cứu các tế bào sống. Từ chỗ chỉ nghiên cứu các dạng vận động của tế bào như cử động amip, tự cử động của tiêm mao..., người ta đã sáng tạo và áp dụng các phương pháp nghiên cứu mới như phương pháp nuôi cấy tế bào của Harison (1909) và của Caren (1912). Nhờ phương pháp này mà các nhà nghiên cứu đã có thể tách được các dòng tế bào thuần và nghiên cứu được cấu trúc và chức năng của tế bào sống một cách tốt nhất.

Năm 1911, Caren đã áp dụng phương pháp phẫu thuật vào tế bào. Nhờ đó, người ta đã nghiên cứu thành công hàng loạt vấn đề như: xác định độ nhớt, ý nghĩa của pH, quá trình oxy hóa khử, quan hệ giữa nhân và tế bào chất...

Để nghiên cứu quá trình sinh lí và tính chất lí hóa, các nhà tế bào học đã tập trung nghiên cứu bản chất của màng tế bào làm mô hình màng; nghiên cứu sự vận chuyển và cơ chế vận chuyển các chất qua màng; nghiên cứu sự cảm ứng và co rút của tế bào, cùng các hoạt động khác của tế bào. Người ta đã thành công trong nghiên cứu điện sinh học của tế bào và đã có những kết quả đem ra áp dụng phục vụ sức khoẻ con người. Gần đây, người ta đã chú ý đến quá trình tự điều khiển và tự điều hòa trong tế bào và đã thu được những kết quả đáng kể.

Những nghiên cứu của hóa tế bào:

Công trình nghiên cứu có ý nghĩa đầu tiên của hóa tế bào là phát hiện và tách được acid nucleic từ tế bào bạch cầu, từ tinh trùng, từ hồng cầu chim của Mise (1869) và của Cotsen (1891). Và sau công trình của Watson và Crick thì vai trò quan trọng của acid đó đối với sinh tổng hợp protein, di truyền tế bào mới được làm sáng tỏ. Người ta đã khám phá ra những phân tử đặc hiệu (enzyme) trong tế bào và vai trò xúc tác cho quá trình biến đổi năng lượng cần thiết cho hoạt động sống của tế bào (Vilan 1903, Vacbua 1908-1913). Đặc biệt, sau khi Bensli (1934) dùng phương pháp li tâm tách được một lượng ty thể đủ để thực hành phân tích hoá học và vật lí học thì vai trò của ty thể và enzyme hô hấp cư trú trong ty thể mới xác định được rõ ràng, và cơ chế quá trình oxy hoá khử trong tế bào

mới được khám phá một cách tường tận. Từ đó, các nhà tế bào học lần lượt tách được các cấu thành khác của tế bào để nghiên cứu vai trò của chúng.

Phương pháp nghiên cứu đánh dấu ra đời cho các nhà tế bào học một khả năng nghiên cứu mới: khả năng nghiên cứu tế bào động của quá trình trao đổi chất trong tế bào.

Sự phát triển của hoá tế bào hiện nay đã cho phép ta sử dụng các phương pháp phân tích vi hoá và siêu vi để nghiên cứu các lượng vô cùng nhỏ của các chất, của từng tế bào và cả cấu thành của tế bào. Ngày nay, áp dụng phương pháp sắc ký, phương pháp quang phổ, phương pháp huỳnh quang hấp thụ tia ronghen đã cho phép ta nghiên cứu thành phần hóa học của màng, các chất quan trọng của tế bào như phân tử acid nucleic, protein... trong từng phần khác nhau của tế bào.

Những thành tựu khoa học của ngành di truyền học tế bào:

Khoảng giữa thế kỉ XIX, tính chất phổ biến của tế bào là phân bào được xem là quá trình trung tâm và cơ sở cho sinh sản tế bào. Nhà tế bào học và di truyền học nổi tiếng Wilson (1925) đã phát biểu: “Đặc tính di truyền chính là sự liên tục di truyền bảo đảm bởi sự phân chia tế bào”. Các định luật cơ bản của di truyền được Enzimedel phát minh từ năm 1865. Nhưng thời kỳ ấy, các thành tựu và hiểu biết về tế bào còn quá nghèo nàn chưa đủ cơ sở vật chất và lí luận để giải thích được và vì vậy công trình vĩ đại này bị lãng quên.

Vào đầu thế kỉ XX, sự phát triển của tế bào học đạt được ở mức cao, do đó, cơ chế phân ly tính trạng di truyền do Enzimedel tìm ra có thể hiểu và giải thích được. Người ta đã biết rằng các tế bào sinh dục nguyên thủy (noãn nguyên bào, tinh nguyên bào) là lưỡng bội khác với các tế bào sinh dục đã chín là đơn bội và chu trình biến đổi của nhiễm sắc thể trong phân bào giảm nhiễm liên quan chặt chẽ với hiện tượng di truyền. Và chỉ sau khi Morgan và các cộng tác của ông đã xác định được đơn vị di truyền gọi là gen và xác định được các locus bên trong nhiễm sắc thể thì các nghiên cứu thực nghiệm, các định luật di truyền tiến hoá mới có cơ sở và mới có thể trở thành một lĩnh vực sinh học gọi là di truyền học. Những năm gần đây đã phát triển hướng nghiên cứu mới: di truyền phân tử và di truyền sinh hoá. Người ta đã đi sâu nghiên cứu hiện tượng di truyền không chỉ ở mức độ tế bào mà còn ở mức độ phân tử. Người ta đã xác định được mã di truyền, nghiên cứu sự đóng mở gen, thay đổi gen hay ghép gen. Đã có nhiều thành công lớn trong lí luận và thực tiễn.

Những thành tựu khoa học về các cấu trúc siêu vi của tế bào và sinh học phân tử:

Nhằm sự phối hợp chặt chẽ giữa tế bào học và các môn: sinh hoá, hóa lí, hóa cao phân tử, đồng thời áp dụng các phương pháp nghiên cứu hóa lí vào sinh học mà những năm gần đây đã xuất hiện những nghiên cứu mới trong sinh học như: hình thái siêu vi và sinh học phân tử.

Nghiên cứu tổ chức hay còn gọi là siêu cấu trúc của tế bào có ý nghĩa quan trọng bậc nhất, bởi vì tất cả các quá trình sinh lí và sinh hoá đặc trưng cho vật chất sống đều được thể hiện trong cấu trúc phân tử của tế bào và ở mức độ phân tử.

Những thành tựu của sinh học phân tử có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của sinh học hiện đại.

Sự xác lập lên mối tương quan rất chặt chẽ giữa trình tự sắp xếp các acid amin trong mạch polypeptid với hình thù của phân tử protein và với các đặc tính sinh học xác định của chúng.

Làm sáng tỏ cơ chế hoạt động của các enzyme khác nhau

Sáng tạo ra mô hình phân tử ADN và làm sáng tỏ vai trò của chúng trong hiện tượng di truyền và cuối cùng hình thành quan niệm hiện đại về hoá học lập thể về các đại phân tử.

Như vậy, thành tựu của sinh học phân tử đã cho phép ta đi sâu vào bản chất của sự sống. Tất cả các đặc tính lý hóa của các phân tử tham gia vào hoạt động sống, cũng như mối tương quan giữa các phân tử đều có liên hệ đến tổ chức tế bào. Hay nói cách khác, sinh học phân tử có cơ sở tế bào học của nó. Vì vậy mà ngày nay đã hình thành nên chuyên ngành: sinh học phân tử tế bào.

Cần phải chú ý rằng, dù cho vai trò của các đại phân tử (acid nucleic, protein...) có quan trọng đến bao nhiêu đi nữa đối với sự sống thì ở mức độ phân tử riêng rẽ chưa thể hiện được sự sống mà tổ chức tế bào vẫn là tổ chức cơ sở nhất, nhỏ nhất thể hiện tính chất sống của vật chất sống.

3. Các phương pháp nghiên cứu Tế bào học

3.1. Phương pháp hiển vi

3.1.1. Kính hiển vi thường (kính hiển vi quang học)

Độ phóng đại kính hiển vi quang học phụ thuộc vào hệ thống ống kính: vật kính và thị kính.

Khoảng cách của tiêu bản có thể quan sát được đối với kính hiển vi thường phụ thuộc vào bước sóng ánh sáng.

Độ phóng đại mạnh nhất của vật kính hiện nay là 120 lần và độ phóng đại tối đa của thị kính là 30 lần. Như vậy, độ phóng đại tối đa của kính hiển vi quang học là $120 \times 30 = 3600$ lần.

Vật nhỏ bao nhiêu thì kính hiển vi quang học có thể quan sát được?

Ta biết khoảng cách (d_o) cho phép tối thiểu đối với ánh sáng thường được biểu diễn bằng công thức:

$$d_o = 1/3 \lambda \quad (\lambda \text{ là độ dài bước sóng ánh sáng})$$

Độ dài trung bình của bước sóng ánh sáng thường là $0,6 \mu$ (1 micron: $\mu = 0,001 \text{ mm}$).

$$\text{Như vậy, } d_o = 1/3 \times 0,6 = 0,2 \mu$$

Nghĩa là đối với kính hiển vi thường chỉ có thể quan sát thấy những chi tiết của tiêu bản có khoảng cách lớn hơn $0,2 \mu$.

Vậy, muốn tăng khả năng phóng đại của kính hiển vi thường cần sử dụng các tia sáng khác có độ dài bước sóng ngắn hơn.

3.1.2. Kính hiển vi tử ngoại

Kính hiển vi tử ngoại dùng tia tử ngoại có độ dài bước sóng ngắn để tăng khả năng cho phép của kính hiển vi thường.

Người ta thường dùng các tia với độ dài bước sóng từ 275 - 210 nm ($1\text{nm} = 0,001\mu\text{m}$).

Khả năng cho phép tốt nhất có thể đạt tới $0,1\mu$. Ánh sáng tử ngoại không nhìn thấy được bằng mắt thường nên muốn thu ảnh người ta phải mắc vào kính một bộ phận chụp hình hoặc dùng màn ảnh huỳnh quang để ảnh hiện lên màn ảnh.

Dùng kính hiển vi tử ngoại, ngoài khả năng làm tăng độ phóng đại còn cho phép ta nghiên cứu thành phần hoá học của các cấu trúc sinh học mà không cần thiết phải qua quá trình định hình và nhuộm màu. Vì vậy, dùng kính hiển vi tử ngoại có thể nghiên cứu các đối tượng sinh học ở trạng thái sống.

3.1.3. Kính hiển vi huỳnh quang

Hiện tượng huỳnh quang là hiện tượng phát sáng của các chất khi bị kích thích bởi năng lượng và hấp thụ năng lượng đó. Nguồn năng lượng cung cấp cho vật có thể khác nhau.

Huỳnh quang quang học: sự phát sáng do ánh sáng thường.

Huỳnh quang Ronghen: sự phát sáng dưới tác dụng của tia Ronghen.

Huỳnh quang phóng xạ: do các chất phóng xạ.

Huỳnh quang sinh vật: quan sát thấy ở các cơ thể sinh vật.

Trong kĩ thuật tế bào và mô học, người ta sử dụng ánh sáng thường để làm phát quang các đối tượng nghiên cứu, vì khi các chất đã hấp thụ được tia sáng thì phát sáng.

Đối tượng nghiên cứu dưới kính hiển vi huỳnh quang thường có hai loại:

- Các đối tượng tự bản thân phát ra huỳnh quang không cần nhuộm màu. Loại này gọi là huỳnh quang nguyên sinh. Ví dụ: vitamin A, B₂...

- Huỳnh quang thứ sinh: được xuất hiện khi các đối tượng nhuộm màu bằng các chất huỳnh quang đặc biệt. Ví dụ: acridin, orange,...

Phương pháp thu huỳnh quang cho phép ta nghiên cứu các hoạt động sinh vật sống, quan sát sự xâm nhập và phân tán số phận của các chất huỳnh quang diễn ra trong cơ thể sống trong quá trình trao đổi chất bình thường và bệnh lí cũng như các chất tiêm vào tế bào và mô. Dùng huỳnh quang có thể nghiên cứu cấu trúc và thành phần hóa học của các chất như ADN, ARN trong tế bào.

3.1.4. Kính hiển vi đối pha

Phương pháp này cho phép ta thu được các ảnh rõ nét của cấu trúc tế bào sống mà kính hiển vi thường không thấy được. Phương pháp đối pha dựa vào nguyên tắc các cấu thành riêng biệt các cấu trúc của các tiêu bản trong suốt khác với môi trường xung quanh bởi chỉ số chiết quang.

Phương pháp hiển vi đối pha cho phép không những nghiên cứu được đối tượng sống hiển vi không qua tiêu bản nhuộm màu mà còn phân biệt được các cấu trúc trong tế bào sống, nghiên cứu được các quá trình sống diễn ra trong tế bào sống như quá trình

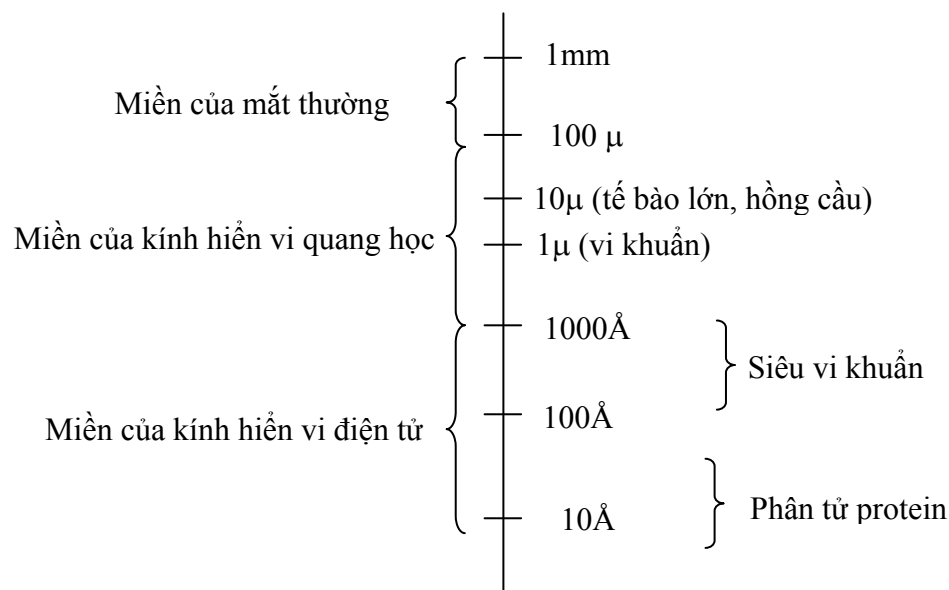
thực bào, các thay đổi của nhân và tế bào chất trong thời kì phân chia; sự chuyển động của ty thể.

Ngoài ra, để nghiên cứu tế bào sống, người ta còn dùng hiển vi giao thoa, hiển vi nền đen và kĩ thuật hiển vi phân cực.

3.1.5. Kính hiển vi điện tử

Điểm khác nhau cơ bản giữa kính hiển vi thường và kính hiển vi điện tử là các tia sáng được thay thế bằng các chùm tia điện tử có bước sóng ngắn hơn nhiều lần, do đó tăng khả năng phóng đại lên nhiều lần.

Sơ đồ biểu diễn kích thước của đối tượng nghiên cứu của các phương pháp nghiên cứu:



Về khả năng lí thuyết, khoảng cách cho phép tối thiểu của kính hiển vi điện tử khoảng 100.000 lần bé hơn kính hiển vi thường. Điều đó cho chúng ta khả năng rộng lớn để tăng độ phóng đại đến hàng triệu lần.

Hệ thống kính hiển vi điện tử, về nguyên tắc chung, giống như hệ thống kính hiển vi thường, chỉ khác nguồn sáng tới (chùm tia điện tử) .

Kĩ thuật hiển vi điện tử mở ra chân trời mới trong nghiên cứu thế giới siêu vi của tế bào. Kĩ thuật hiển vi điện tử cho phép ta khám phá ra rất nhiều điều mới lạ trong cấu trúc siêu vi của tế bào. Ví dụ: mạng lưới nội bào, thể ribo, lizo... phát hiện ra cấu trúc của màng tế bào, màng nhân, cấu trúc nhân...

3.2. Phương pháp Ronghen

Phương pháp phân tích cấu trúc bằng tia Ronghen cho phép chúng ta phân biệt được các cấu trúc từ 10 Å trở xuống. Phương pháp này dựa trên cơ sở hiện tượng nhiễu xạ của tia Ronghen, xuất hiện khi các tia phóng xạ Ronghen đập vào nguyên tử và phân tử tạo mạng không gian trong vật chất. Khi các chùm song song của tia Ronghen xuyên

qua đối tượng nghiên cứu thì ảnh nhiễu xạ sẽ được ghi lên phim ảnh đặt sau đối tượng nghiên cứu.

Nhờ phương pháp này người ta đã phân biệt được cấu trúc không gian phức tạp của hàng loạt protein và nhờ nó mà Watson và Crick đã xây dựng được mô hình cấu trúc không gian của ADN.

Đây là một trong những phương pháp hiện đại tốt nhất của các nhà sinh học phân tử, đã mở ra con đường vô cùng rộng lớn cho sự phát triển của sinh học phân tử.

3.3. Phương pháp tế bào

Nhiệm vụ của tế bào học không chỉ xác định bằng sinh hoá của tế bào mà chủ yếu là xác định cấu trúc sinh hóa phức tạp định khu trong tế bào cả về số lượng cũng như chất lượng.

3.3.1. Phương pháp tách các cấu thành của tế bào

Người ta thường nghiền tế bào trong môi trường nước, sau đó li tâm để tách các phần khác nhau của tế bào dựa trên sự khác nhau về hằng số lắng của các cấu thành.

Ngày nay, với các máy li tâm siêu tốc chiết phân và li tâm siêu tốc phân tích có tốc độ khoảng 60.000 - 70.000 vòng/phút và dùng các dung môi khác nhau thích hợp, người ta không chỉ phân tích được các cấu thành của tế bào như: nhân, hạch nhân, ti thể, lạp thể, nhiễm sắc thể.... mà còn phân tích được cấu thành đại phân tử trong tế bào và xác định được trọng lượng phân tử của chúng. Ví dụ: các đại phân tử protein, acid nucleic hoặc virus, tách mạch xoắn ADN...

3.3.2. Phương pháp nhuộm màu hóa tế bào

Người ta dựa vào đặc tính các cấu thành khác nhau trong tế bào sẽ bị nhuộm màu khác nhau khi dùng những chất màu đặc trưng để làm xuất hiện các cấu thành khác nhau của tế bào ở đúng vị trí của chúng. Để xác định được các chất hoặc các nhóm chất khác nhau, người ta sử dụng phương pháp đặc trưng cho từng chất:

- Dùng phương pháp (phản ứng) hóa học giống các phản ứng dùng trong hóa học phân tích nhưng thích hợp để nghiên cứu các mô.

- Dùng các phản ứng đặc trưng cho một số chất.

- Dùng các phương pháp lí hoá.

Ngày nay, người ta đã dùng các phương pháp khác nhau để làm xuất hiện các hydratcarbon, các lipid, các protide, các enzyme, acid nucleic trong tế bào và các cấu thành của tế bào đúng vị trí thật của chúng. Phương pháp này chỉ cho kết quả định tính.

3.3.3. Phương pháp nghiên cứu tế bào sống

Có nhiều phương pháp nghiên cứu tế bào sống như:

- Phương pháp vi phẫu thuật.

- Phương pháp nuôi cấy tế bào - mô italic.

Ví dụ: ngày nay, nhờ vào sự hoàn thiện của phương pháp nuôi cấy mô tế bào, người ta không những nuôi cấy thành công các tế bào riêng biệt mà còn có thể nuôi cấy *in vitro* các bào quan và thậm chí cả các phần tử sống nữa. Và đã đóng góp đáng kể trong việc nghiên cứu tìm hiểu cơ chế phân hóa tế bào, cơ chế hoạt động của gen...

3.3.4. Phương pháp quang phổ

Ta biết rằng các cấu thành khác nhau trong tế bào hấp thụ chọn lọc các tia hồng ngoại, các tia tử ngoại và các tia sáng thường. Nhờ vậy, người ta có thể dùng quang phổ kế để đo lường sự hấp thụ ánh sáng của các cấu thành tế bào. Cường độ hấp thụ ánh sáng của các chất phụ thuộc vào nồng độ của chất đó. Như vậy, ta có thể dựa vào các dẫn liệu quang học để tính toán và đưa ra thành phần hóa học của tế bào và định hướng các chất đó.

Ngày nay, với phương pháp này, người ta xác định được các chất trong tế bào với lượng $10^{-12} - 10^{-14}$ g trong diện tích $1 \mu\text{m}^2$. Kết hợp với các phương pháp khác như kính hiển vi huỳnh quang đã cho phép ta nghiên cứu sự phân bố trong tế bào các chất protide các lipid, các micropolysaccharide cũng như acid nucleic.

3.3.5. Phương pháp nghiên cứu tự đánh dấu và tự chụp hình

Phương pháp này dựa trên nguyên tắc sử dụng các chất đồng vị phóng xạ phóng ra các tia α , β và các tia này tự nhũ tương giấy ảnh. Người ta đưa ra các đồng vị phóng xạ (C^{14} , P^{32} và tritium H^3 ...) vào tế bào, tiêu bản tế bào tự nhũ tương giấy ảnh (tự chụp hình), sau đó, đem rửa ảnh bằng cách thông thường. Dựa vào ảnh chụp, người ta xác định chính xác vị trí, mật độ các phần có chất phóng xạ.

Phương pháp này không những cho phép chúng ta biết được sự phân bố các chất trong tế bào mà còn cho phép chúng ta theo dõi được số phận và tính chất động học của các chất trong tế bào. Ví dụ: nhờ H^3 timidin cho phép ta theo dõi được cơ chế tự tái bản của ADN, nghiên cứu sự tổng hợp protein trên các thể ribosome.

3.3.6. Các phương pháp thông dụng trong sinh học phân tử

Phương pháp tách chiết acid nucleic.

Phương pháp phân tích định tính và định lượng acid nucleic.

Phương pháp lai phân tử.

Phương pháp PCR.

Phương pháp xác định trình tự acid nucleic.

Phương pháp điện di.

Phương pháp sắc ký.