

BIOLOGIA KOMÓRKI

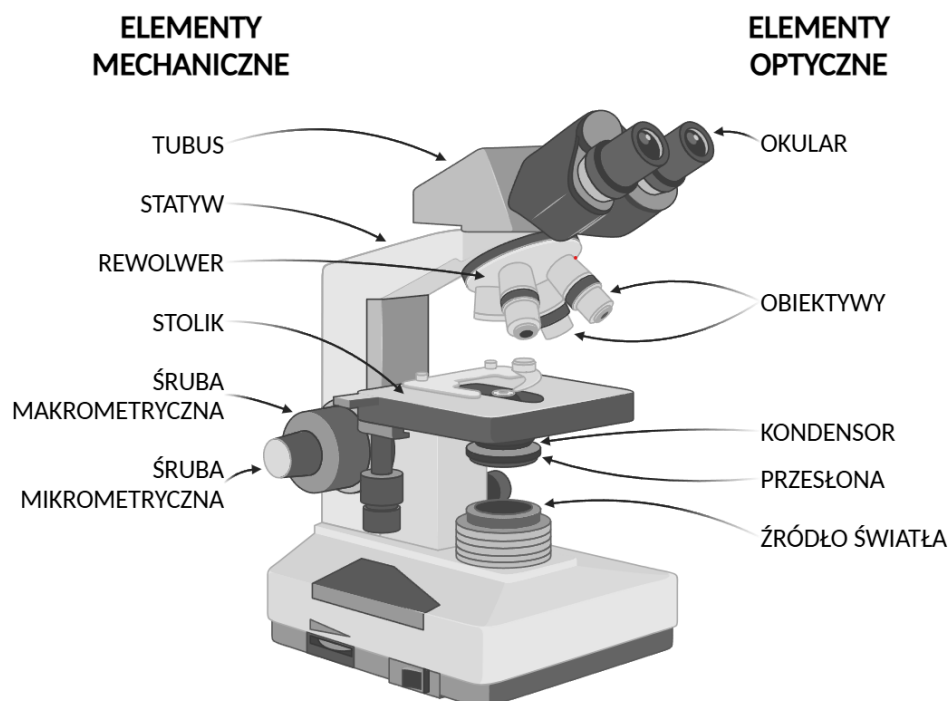
LABORATORIUM NR 2

**OBSERWACJE W MIKROSKOPIE ŚWIETLNYM WYBRANYCH KOMÓREK
I ORGANELLI KOMÓRKOWYCH**

Wynalezienie w XVII wieku mikroskopu świetlnego umożliwiło obserwację tkanek i komórek, zarówno zwierzęcych jak i roślinnych. Dzięki niemu można zauważyć, że tkanka jest podzielona na tysiące komórek, których przeciętna średnica wynosi 5-20 μm . Znacznie trudniej ujrzeć wewnętrzną strukturę komórki, nie tylko, dlatego, że jej części są bardzo małe, ale też dlatego, że są one w większości przezroczyste i z zasady bezbarwne. Obserwację struktur komórkowych umożliwiają techniki barwienia, dzięki którym różnym składnikom komórki nadaje się odmienne kolory. Do barwników struktur komórkowych wykorzystywanych w biologii komórki należą: błękit metylenowy, eozyna, Sudan III, zieleń Janusowa, czy też hemotaksylina.

Podstawowe elementy mikroskopu świetlnego (Rys. 1.):

- A. elementy mechaniczne:
 - a. **tubus**, znajdujący się na podstawie mikroskopu pomiędzy obiektywem a okulem, stanowiący oparcie dla innych elementów mechanicznych oraz optycznych,
 - b. **stolik przedmiotowy**, na którym umieszcza się obserwowany preparat, i dzięki któremu preparat ten można przesuwac,
 - c. **rewolwer** pozwalający na zmianę obiektywów, a tym samym powiększenia obserwowanego obrazu,
 - d. **śruby makro- i mikrometryczne**, pozwalające na regulację ostrości obserwowanego obrazu (ustawienie zgrubne oraz precyzyjne).
- B. elementy optyczne:
 - a. **źródło światła**,
 - b. **kondensor** skupiający rozproszone światło na preparacie; charakteryzuje go apertura kondensora, czyli rozwartość światła, które z niego wychodzi, a jest ona regulowana przysłoną zwaną przysłoną apertury (kondensora)
 - c. **przysłona** znajdująca się zwykle pod kondensorem, umożliwiająca przede wszystkim zmianę ilości światła padającego na preparat. Zmianę apertury uzyskuje się przez zmianę wielkości otworu przysłony obrotem dźwigni,
 - d. **obiektyw** wytwarza obraz rzeczywisty, powiększony i odwrócony przedmiotu umieszczonego w pobliżu ogniska (punkt przecięcia promieni świetlnych po przejściu przez układ optyczny),
 - e. **okular**, działający jak lupa, powiększa obraz utworzony przez obiektyw raz jeszcze, ostatecznie obraz jest odwrócony i pozorny.



Rys. 1. Budowa mikroskopu świetlnego (grafika wykonana przy użyciu BioRender.com).

Powiększenie i zdolność rozdzielcza

Całkowite powiększenie mikroskopu jest iloczynem powiększenia obiektywu i okularu. **Zdolność rozdzielcza** mikroskopu jest to najmniejsza odległość dzieląca dwa punkty, które w obrazie mikroskopowym są dostrzegalne oddzielnie. Im mniejsza jest ta odległość, tym lepsza jest zdolność rozdzielcza układu optycznego i tym więcej informacji zawartych jest w obrazie mikroskopowym. Zdolność rozdzielcza mikroskopu jest wprost proporcjonalna do długości fali światła oświetlającego preparat i odwrotnie proporcjonalna do numerycznej apertury obiektywu (NA):

$$d = \frac{0,61\lambda}{NA}$$

gdzie: λ – długość fali świetlnej, NA- apertura numeryczna obiektywu

Apertura numeryczna (NA) mikroskopu to miara zdolności mikroskopu do zbierania światła i rozróżniania szczegółów w badanym obiekcie. Opisana jest wzorem:

$$NA = n \cdot \sin\alpha$$

gdzie: n – współczynnik załamania światła, α – kąt aperturowy obiektywu.

Wartość numerycznej apertury obiektywu jest umieszczona na obudowie obiektywu i wynosi, w zależności od powiększenia obiektywu, od 0,25 do 1,25. Im większa apertura numeryczna, tym mikroskop jest w stanie uzyskać wyraźniejszy obraz i dostrzec mniejsze szczegóły.

Zasady dobrego mikroskopowania:

1. Przetrzyj szmatką elementy optyczne mikroskopu.
2. Ustaw mikroskop na najmniejszym powiększeniu.
3. Ustaw źródło światła.
4. Umieść preparat na stoliku tak, aby przedmiot znalazł się na środku otworu stolika.
5. Obniż tubus maksymalnie, uważając by nie rozgnieść preparatu.
6. Obserwacje zacznij od najmniejszego powiększenia.
7. Patrz w okular i kręć powoli śrubą makrometryczną w celu uzyskania obrazu, a następnie śrubą mikrometryczną, w celu dostosowania ostrości obrazu.
8. Aby zobaczyć więcej szczegółów, nastaw większe powiększenie przekręcając rewolwerem obiektywy.
9. Po zakończonej obserwacji przestaw obiektyw na najmniejsze powiększenie i obniż maksymalnie stolik przedmiotowy za pomocą śruby makrometrycznej.

Kolejność czynności przy przygotowaniu preparatów mikroskopowych:

1. Umyj szkiełko podstawowe i nakrywkowe, a następnie je wysusz.
2. Przy użyciu kawałka szarego mydła, a następnie bibuły, odtłuść szkiełko podstawowe.
3. Przygotuj materiał przeznaczony do obserwacji.
4. Pipetą na środek czystego szkiełka podstawowego nanieś dany roztwór, np. kroplę wody lub barwnik.
5. Umieść w kropli roztworu materiał przeznaczony do obserwacji.
6. Przykryj preparat szkiełkiem nakrywkowym (najlepiej opuszczać szkiełko powoli pod skosem, uważając, aby pod szkiełko nie dostało się powietrze).

OBSERWACJE W MIKROSKOPIE ŚWIETLNYM WYBRANYCH KOMÓREK I ORGANELLI KOMÓRKOWYCH

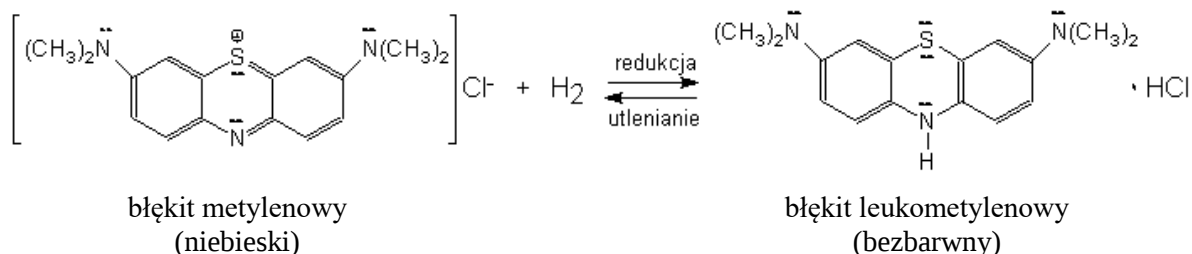
Barwienie jest to proces fizyko-chemiczny polegający na wnikięciu barwnika do wnętrza komórki mikroorganizmu i utworzeniu barwnego kompleksu z cytoplazmą lub wewnątrzkomórkowymi strukturami komórki. Barwienie ma na celu ułatwienie obserwacji cech morfologicznych komórek mikroorganizmów, a stosowane może być również do liczenia komórek żywych i martwych, czyli do badania przeżywalności mikroorganizmów. Ze względu na sposób wstępnego przygotowania preparatu wyróżniamy barwienie przyżyciowe oraz barwienie preparatów utrwalonych.

I. BARWIENIE KOMÓREK ZA POMOCĄ BŁĘKITU METYLENOWEGO

Do barwienia komórek często stosuje się barwniki zasadowe wykorzystując ich powinowactwo do składników komórek, które posiadają odczyn kwaśny. Przykładem jest błękit metylenowy - kationowy barwnik, który nadaje niebieski kolor ujemnie naładowanym częściom komórek np. chromatynie. Dodatkowo barwnik ten posiada specyficzne właściwości oksydoredukcyjne, opisane poniżej.

a. WŁAŚCIWOŚCI REDUKCYJNO-OKSYDACYJNE BŁĘKITU METYLENOWEGO

Glukoza redukuje błękit metylenowy (kolor niebieski) do leukobarwnika – błękitu leukometylenowego, który jest związkiem bezbarwnym (Ryc.1). W tej reakcji glukoza utlenia się do kwasu glukonowego, który w roztworze zasadowym przechodzi w glukonian sodu. Wstrząsanie kolby powoduje rozpuszczanie w roztworze tlenu obecnego w powietrzu, a ten utlenia leukobarwnik z powrotem do błękitu metylenowego. Niebieskie zabarwienie utrzymuje się dłużej, im wstrząsanie jest częstsze.



Ryc. 1. Właściwości oksydoredukcyjne barwnika – błękitu metylenowego.

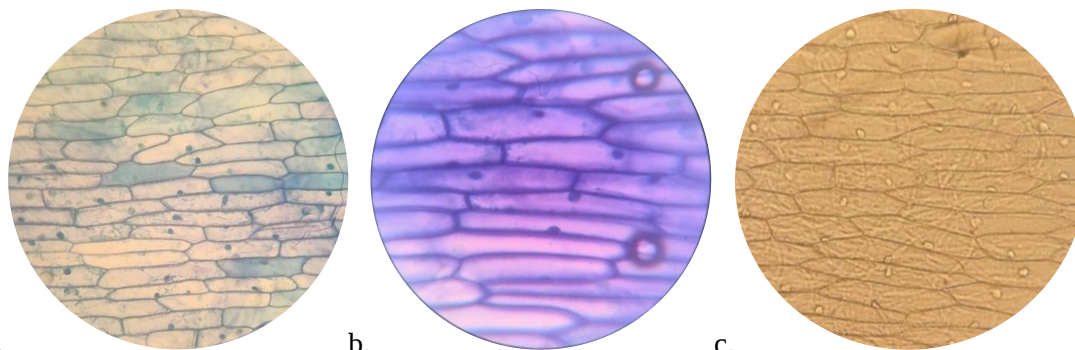
WYKONANIE:

1. Do probówki typu Falcon odmierzyć 0,25 g NaOH i 1 g glukozy.
2. Uzupełnić wodą destylowaną do poziomu 12 ml.
3. Do mieszaniny dodać 0,25 ml 0,2% roztworu błękitu metylenowego, zamknąć kolbę korkiem i mocno wstrząsać – obserwując zabarwienie roztworu.
4. Odstawić kolbę na pewien czas, obserwować zmiany.
5. Podnieść korek i ponownie wstrząsnąć kolbę. Czynności powtórzyć.

b. BARWIENIE KOMÓREK EPIDERMY CEBULI (*LAC. ALLIUM CEPA*)

Tkanka epidermalna (spotykana z reguły w postaci pojedynczej warstwy komórek), okrywa łodygę, liście i korzenie. Właściwe komórki epidermalne są żywe, mało wyspecjalizowane i ściśle przylegają do siebie tworząc zwarty układ pozbawiony przestworów komórkowych. Komórki te posiadają grubą pierwotną ścianę komórkową i są silnie zwakuolizowane.

Tkanka epidermalna pochodząca z dorosłych łusek cebuli (Ryc. 2) jest niezwykle korzystnym materiałem do badań mikroskopowych i może być pobrana bez poważniejszego uszkodzenia komórek żywych łuski cebuli.



Ryc. 2. Preparat z wewnętrznej łuski cebuli: barwiony błękitem metylenowym (a, b) oraz niebarwiony.

WYKONANIE:

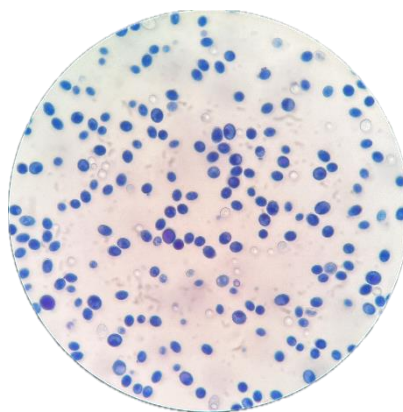
1. Pokroić cebulę skalpelem na ćwiartki. Wyjąć z jednej ćwiartki łuskę i naciąć żyłką jej powierzchnię (od wklęsłej strony łuski) formując kwadraty o boku około 3 mm.
2. Na dwóch szkiełkach podstawowych umieścić po kropli wody destylowanej. Za pomocą pęsety zdjąć dwa uformowane kwadraty skórki i ostrożnie przenieść na szkiełka podstawowe.
3. Jeden preparat przykryć szkiełkiem nakrywkowym – obserwować wakuole, jądro i jąderko.
4. Do drugiego preparatu dodać kroplę 0,2% roztworu błękitu metylenowego.
5. Począć, aż materiał dokładnie wyschnie na powietrzu.
6. Ponownie zalać szkiełko barwnikiem i barwić przez 3 min.
7. Spłukać szkiełko używając wody destylowanej, osuszyć bibułą i nałożyć szkiełko nakrywkowe.
8. Obserwować uzyskany preparat pod mikroskopem.

c. BARWIENIE KOMÓREK DROŻDŻY

Błękit metylenowy jest powszechnie stosowany do oceny żywotności komórek, w tym drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Barwnik ten przenika do komórek martwych lub o uszkodzonej błonie komórkowej, barwiąc je na niebiesko, podczas gdy żywe, aktywne metabolicznie komórki pozostają bezbarwne (Ryc. 3).

WYKONANIE:

1. Przygotować zawiesinę drożdży w 5% roztworze glukozy (dodać szczyptę drożdży do 2–3 ml roztworu i wymieszać).
2. Na szkiełko podstawowe nanieść kroplę zawiesiny drożdży.
3. Dodać kroplę błękitu metylenowego i delikatnie wymieszać igłą preparacyjną.
4. Przykryć szkiełkiem nakrywkowym i odczekać 2–3 minuty.
5. Obserwować pod mikroskopem przy powiększeniu 40x.



Ryc. 3. Komórki drożdży barwione błękitem metylenowym.

II. BARWIENIE MITOCHONDRIUM ZA POMOCĄ ZIELENI JANUSA

Mitochondria to organelle obecne zasadniczo we wszystkich komórkach eukariotycznych (wyjątek stanowią niektóre ameby patogenne oraz erytrocyty). Poza ich dominującą funkcją wytwarzania dwóch form energii: protonowej siły motorycznej oraz ATP, pełnią wiele innych funkcji metabolicznych.

Po zastosowaniu specjalnych barwien (np. hematoksyliną żelazistą lub przyżyciowo zielenią Janusową) mitochondria można dostrzec pod mikroskopem optycznym w postaci cytoplazmatycznych ziarenek lub niteczek o średnicy 0,5 μm i długości 2–5 μm .

Mitochondria w wyniku barwienia uzyskują kolor niebieski - barwna reakcja wywołana jest obecnością w mitochondriach oksydazy cytochromowej, która utrzymuje barwnik w obrębie mitochondrium w postaci utlenionej (barwnej), podczas gdy w cytoplazmie zieleń Janusowa zostaje zredukowana do formy bezbarwnej. Reakcja barwna jest więc zależna od tlenu, mitochondria zostają odbarwione w momencie, gdy zostanie usunięty ze środowiska tlen.

WYKONANIE:

1. Przygotować niewielki fragment wewnętrznej skórki łuski cebuli – patrz ćw. I.
2. Na czyste szkiełko podstawowe nanieść dwie krople 0.1% roztworu zieleni Janusowej.
3. Umieścić w roztworze przygotowany fragment skórki cebuli.
4. Barwić około 30 minut, przewietrzając roztwór kilka razy za pomocą pipety.
5. Nanieść na preparat świeżą kroplę 0.1% roztworu zieleni Janusowej i przykryć szkiełkiem nakrywkowym.
6. Natychmiast oglądać preparat przy powiększeniu 40x – zabarwienie mitochondriów znika po krótkim czasie.

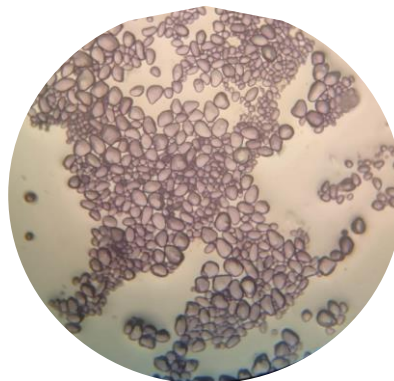
III. BARWIENIE SKROBII ZAPASOWEJ

Skrobia jest składnikiem zapasowym komórki roślinnej. Pod względem chemicznym należy do węglowodanów. W komórce występują w postaci ziaren różniących się budową, kształtem i wielkością. Cechy anatomiczne ziaren skrobiowych mają duże znaczenie diagnostyczne i są przydatne w analizie mikroskopowej surowców roślinnych.

Roztwór jodu w jodku potasu (I_2 w KI), nazywany płynem Lugola, służy do wykrywania skrobi, barwiąc ją na kolor od niebieskofioletowego do fioletowo-czarnego (Ryc. 4), w zależności od stężenia skrobi.

WYKONANIE:

1. Na szkiełku podstawowym umieścić dwie krople płynu Lugola.
2. Odciąć duży kawałek bulwy *Solanum tuberosum* (ziemniaka) – skraplać powinien się sok.
3. Dotknąć krojoną powierzchnią bulwy (z sokiem) płynu Lugola na szkiełku podstawowym.
4. Przykryć preparat szkiełkiem nakrywkowym.
5. Obserwować preparat pod małym powiększeniem.



Ryc. 4. Ziarna skrobi w komórkach ziemniaka wybarwione płynem Lugola.

IV. OBSERWACJA NIEBARWIONYCH PREPARATÓW KOMÓREK MIĘKISZOWYCH

PLASTYDY

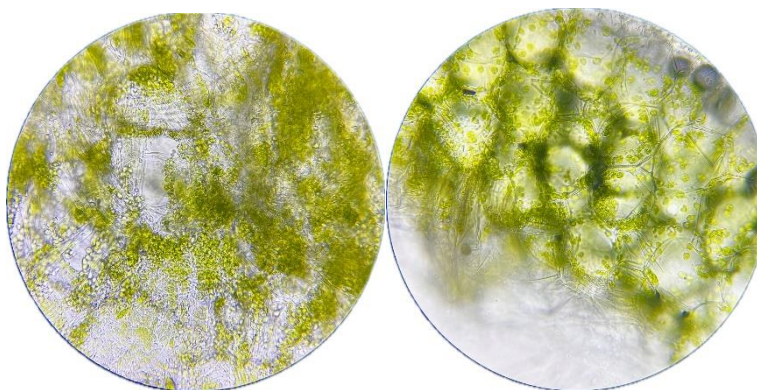
Plastydy są organellami występującymi u wszystkich żyjących komórek roślinnych. Plastydy zawierają własny DNA i są oddzielone od cytoplazmy podwójną błoną komórkową. Wszystkie plastydy rozwijają się z *proplastydów*, które są relatywnie małymi organellami obecnymi w niedojrzałych komórkach merystematycznych. Proplastydy rozwijają się zgodnie z wymaganiami każdej różnicującej się komórki, co jest w większej mierze determinowane przez DNA jądrowe. Rodzaje plastydów: etioplasty, leukoplasty, chloroplasty oraz chromoplasty.

a. CHLOROPLASTY

Chloroplasty to organelle, występujące tylko w komórkach roślinnych (Ryc. 5). Zawierają barwnik – chlorofil, umożliwia przeprowadzanie fotosyntezy. Nazwa chloroplast pochodzi od greckiego słowa *chloros* zielony oraz *plast* – kształt, forma.

WYKONANIE:

1. Przygotować skrawek z przekroju poprzecznego liścia aloesu.
2. Na szkiełku podstawowym umieścić kroplę wody destylowanej. Przygotowany preparat liścia aloesu umieścić w kropli wody.
3. Przykryć preparat szkiełkiem nakrywkowym i obserwować pod mikroskopem jako tzw. preparat bezpośredni (powiększenie 40x oraz 100x).
4. Obserwować typowe komórki miękiszowe oraz znajdujące się w nich chloroplasty.



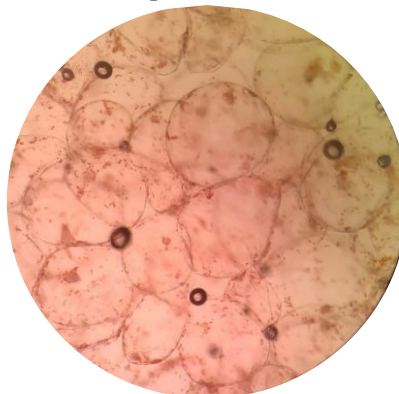
Ryc. 5. Tkanka aloesu zawierająca chloroplasty.

b. CHROMOPLASTY

Chromoplasty są plastydami odpowiedzialnymi za syntezę i magazynowanie barwników karotenoidowych. Nadają barwę kwiatom, owocom i niekiedy korzeniom (np. marchwi), ale nie biorą udziału w fotosyntezie (Ryc. 6).

WYKONANIE:

1. Na dwa szkiełka podstawowe nanieść po kropli wody destylowanej.
2. Za pomocą skalpela zeskrobać cienkie skrawki z korzenia marchwi, przenieść je do kropli wody na jedno z przygotowanych szkiełek podstawowych.
3. Wykonać rozmaz z komórek miąższowych pomidora na drugim z przygotowanych szkiełek podstawowych.
4. Przykryć preparaty szkiełkami nakrywkowymi.
5. Obserwować chromoplasty pod mikroskopem.



Ryc. 6. Tkanka pomidora zawierająca chromoplasty.

Odczynniki:

- NaOH
- glukoza $C_6H_{12}O_6$,
- barwniki: błękit metylenowy (0,2% roztwór wodny), 2% roztwór I_2 w KI (płyn Lugola), 0,1% roztwór zieleni Janusa
- liść aloesu, ziemniak, cebula, pomidor.

Literatura:

1. Kawiak J., Mirecka J., Olszewska M., Warchoła J. 1998. Podstawy cytofizjologii.
2. Kurczyńska E.U., Borkowska-Wykręt D. 2007. Mikroskopia świetlna w badaniach komórki roślinnej.
3. Kłyszejko-Stefanowicz L. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005, str. 74-82.
4. Alberts B. Podstawy biologii komórki. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007 (lub nowsze)
5. Kilarski W. Strukturalne podstawy biologii komórki. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.