

BIOLOGIA KOMÓRKI

LABORATORIUM NR 1

1. ZASADY BHP W LABORATORIUM

- I. W pomieszczeniu pracowni należy zachować ostrożność, porządek i czystość.
- II. Okrycia wierzchnie należy zostawiać w szatni przy wejściu do budynku Wydziału.
- III. W pomieszczeniu pracowni należy nosić bezpieczne obuwie, niedopuszczalne są buty na obcasach. Student posiadający długie włosy zobowiązany jest do spięcia ich w taki sposób, aby nie przeszkadzały w wykonywaniu powierzonych mu zadań.
- IV. Każdy student jest zobowiązany posiadać na każdych zajęciach fartuch laboratoryjny oraz rękawiczki ochronne.
- V. W pomieszczeniu pracowni nie wolno spożywać posiłków i napojów.
- VI. Należy ściśle przestrzegać procedur i pracować jedynie w wyznaczonych miejscach.
- VII. Naczynia zawierające materiał biologiczny powinny być zawsze zamknięte. Otwieramy je tylko na czas pobrania materiału i natychmiast zamykamy.
- VIII. Szkło laboratoryjne myjemy dostępnymi płynami do mycia, po czym płuczemy dwukrotnie w wodzie dejonizowanej.
- IX. Ze szczególną ostrożnością należy obchodzić się z pipetami automatycznymi. Używać ich tylko z jednorazowymi końcówkami i nastawiać tylko na wartości z przedziału podanego na tłoku pipety.
- X. Każde uszkodzenie lub rozbicie sprzętu laboratoryjnego należy zgłaszać prowadzącemu zajęcia.
- XI. W razie zaistnienia nawet najmniejszego wypadku należy niezwłocznie powiadomić prowadzącego zajęcia.
- XII. Opuszczając stanowisko pracy student jest zobowiązany sprawdzić czy wszystkie niepotrzebne urządzenia elektryczne oraz woda zostały wyłączone, drobny sprzęt odłożony na miejsce, a użyte naczynia laboratoryjne umyte i odłożone do suszenia. Stanowisko pracy należy uporządkować.
- XIII. Z pracowni Studenci nie mogą wynosić odczynników, szkła laboratoryjnego. W razie takiej konieczności może to być wykonane przez prowadzącego zajęcia.
- XIV. W trakcie doświadczeń z użyciem prądu zachować szczególną ostrożność. Przed opuszczeniem zajęć należy zawsze upewnić się czy używany aparat (urządzenie) odłączony jest od zasilacza (prądu).
- XV. Koniecznie po zakończeniu pracy w pracowni należy umyć i osuszyć ręce.

2. TECHNIKA PRACY Z PIPETĄ AUTOMATYCZNĄ

Pipeta automatyczna – to specjalny rodzaj pipety miarowej (Rys. 1). Posiada ona mechanizm składający się z precyzyjnego tłoczka ze sprężynką, rączki, regulatora oraz wymiennej końcówki. Kończówki są zazwyczaj produkowane z teflonu lub polietylenu. Odmierzana ciecz jest pobierana tylko do końcówki, przy pomocy tłoczka, który po zwolnieniu jest wypychany przez sprężynkę i zasysa ściśle określoną ilość cieczy. Regulator jest precyzyjnym ogranicznikiem skoku tłoczka. Przyjmuje on postać zwykłego pokrętkła ze skalą objętości lub w bardziej zaawansowanych technologicznie pipetach, urządzenia elektronicznego z wyświetlaczem ciekłokrystalicznym.

Pipety automatyczne służą przede wszystkim do szybkiego odmierzania niewielkich objętości cieczy – zwykle nie większych niż 1-5 ml.

Podział pipet:

1. Pipety stało-objętościowe – można pobrać jedną określoną objętość roztworu (np. 20 μ l, 1000 μ l),
2. Pipety zmienne-objętościowe – pobiera się określony zakres objętości: np. 0,5-20 μ l, 20-200 μ l, 200-1000 μ l, 1-5 ml.

Ze względu na pojemność pipety do pobierania używamy końcówek (tzw. tipsów) o różnych wielkościach. Często końcówki można rozróżnić na podstawie koloru, i tak: dla pipet o pojemności do 200 μ l używa się żółtych końcówek (lub białych), o pojemności do 1000 μ l niebieskich (lub białych), natomiast dla pipet o pojemności powyżej 1 ml głównie białych. Pojemność pipet wyraża się w μ l dla pipet o pojemności do 1000 μ l, natomiast dla pipet o większej pojemności w ml.

Techniki eksperymentalne stosowane w biotechnologii przeważnie wymagają sterylnych warunków pracy. Standardową procedurą jest używanie sterylnych końcówek. Zużyte końcówki powinny być bezzwłocznie wyrzucane do specjalnego pojemnika, gdyż ich ponowne użycie może spowodować brak powtarzalności w doświadczeniu np. przez zanieczyszczenie końcówki. Szczególną ostrożność trzeba zachować przy pracy z materiałem biologicznym (kultury bakteryjne, linie komórkowe), gdyż można zakazić siebie lub hodowlę, oraz przy wykonywaniu procedur bardzo czułych na zanieczyszczenia, kiedy to nawet najmniejsza kontaminacja może spowodować niepożądany rezultat.

Praca z pipetą nastawną:

Trzymaj pipetę w jednej ręce, natomiast drugą ręką za pomocą pokrętki nastaw żadaną pojemność pipety. Pipeta nastawna posiada jedno okienko, w którym znajdują się wartości cyfrowe w zależności od zakresu pojemności pipety. Należy je prawidłowo ustawić, pamiętając o tym, aby nie przekręcić pokrętki powyżej lub poniżej pojemności pipety. Np.: dla pipet o pojemności w zakresie: 2-20 μ l, 20-200 μ l oraz 100-1000 μ l cyfry w okienku 025 oznaczają:

Rodzaj pipety	2-20 μ l	20-200 μ l	200-1000 μ l
	0	0	0
	2	2	2
	5	5	5
Pobierana objętość cieczy	2,5 μ l	25 μ l	250 μ l

Tabela. 1. Jednostki objętości.

Zawsze odczytujemy kolumnę pionową względem kolumny poziomej

Jednostka	Skrót	Litr	Mililitr	Mikrolitr	Nanolitr	Picolitr
Litr	l (L)	1 L	10 ⁻³ L	10 ⁻⁶ L	10 ⁻⁹ L	10 ⁻¹² L
Mililitr	ml (mL)	10 ³ mL	1 mL	10 ⁻³ mL	10 ⁻⁶ mL	10 ⁻⁹ mL
Mikrolitr	μ l (μ L)	10 ⁶ μ L	10 ³ μ L	1 μ L	10 ⁻³ μ L	10 ⁻⁶ μ L
Nanolitr	nl (nL)	10 ⁹ nL	10 ⁶ nL	10 ³ nL	1 nL	10 ⁻³ nL
Picolitr	pl (pL)	10 ¹² pL	10 ⁹ pL	10 ⁶ pL	10 ³ pL	1 pL

Pobieranie roztworów z użyciem pipety automatycznej:

1. wybierz odpowiednią pipetę i nastaw na żadaną objętość,
2. nałóż odpowiednią końcówkę na pipetę,
3. naciskaj tłok pipety do momentu wyczucia pierwszego oporu,
4. następnie zanurz końcówkę w roztworze, który chcesz pobrać i powoli zwolnij nacisk kciuka na tłok i powróć do pozycji wyjściowej tłoka, poczekaj chwilę, aż roztwór zostanie zassany do końcówki,
5. roztwór powinien zostać pobrany i znajdować się w końcówce,
6. aby wypuścić roztwór z pipety należy nacisnąć tłok do momentu wyczucia drugiego oporu w pipecie; roztwór należy wypuszczać delikatnie dotykając ścianki naczynia docelowego,
7. po zakończeniu czynności należy zdjąć końcówkę z pipety, gdyż nie wolno zostawiać pipety z nałożoną końcówką.

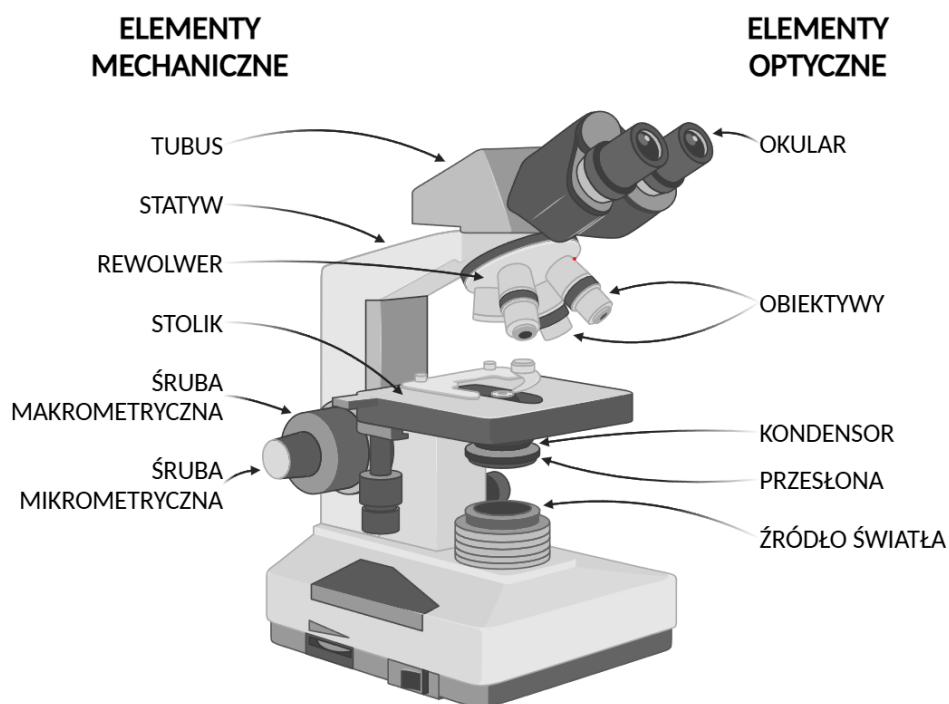
Aby zmniejszyć skalę błędu, należy wybierać pipety o najbardziej zbliżonej do żądanej przez nas objętości.

3. MIKROSKOPIA ŚWIETLNA

Mikroskop jest urządzeniem optycznym służącym do obserwacji obiektów mikroświata w dużym powiększeniu (Rys. 1).

Podstawowe elementy mikroskopu świetlnego:

- 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 przesuwając,
 - 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:

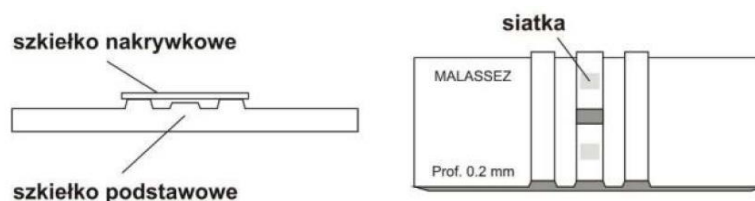
1. Umyj szkiełko podstawowe i nakrywkowe, a następnie je wysusz.
2. Przy użyciu kawałka szarego mydła, a następnie bibuły, odtłuść szkiełko podstawowe.
3. Przygotuj materiał przeznaczony do obserwacji.
4. Pipetą na środek czystego szkiełka podstawowego nanieś dany roztwór, np. kroplę wody lub barwnik.
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).

Barwienie jest to proces fizyko-chemiczny polegający na wniknięciu 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.

4. MIKROSKOPOWE OKREŚLANIE GĘSTOŚCI HODOWLI KOMÓRKOWEJ ZA POMOCĄ KOMORY ZLICZENIOWEJ

Komory zliczeniowe (Rys. 2) służą do określania liczby cząstek (np. leukocyty, erytrocyty, trombocyty, bakterie, zarodniki grzybów, pyłki roślin) na jednostkę objętości cieczy.

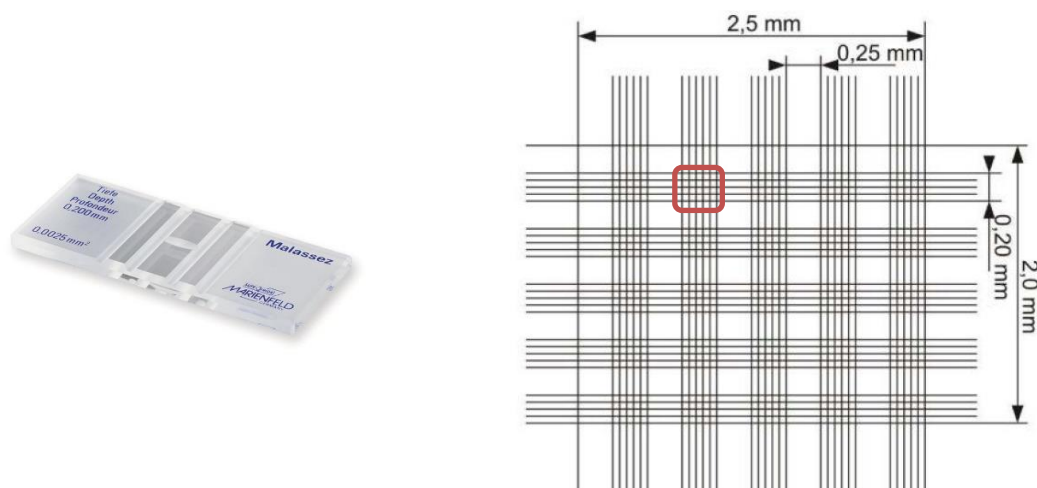
Zbudowane są z płytki podstawowej z naniesionymi siatkami oraz szkiełka nakrywkowego. Płytki podstawowe wykonane są ze specjalnego szkła optycznego o wielkości szkiełka podstawowego. Wydrążone rowki dzielą powierzchnię płytki podstawowej na 2 pola szerokie (zewnętrzne) i 3 wąskie paski (wewnętrzne). W pasku środkowym, który stanowi dno komory wygrawerowane są dwie siatki zliczeniowe, oddzielone rowkiem. Dno komory leży zazwyczaj 0,1-0,5 mm (w zależności od rodzaju komory zliczeniowej) niżej od pasków zewnętrznych. Po nałożeniu szkiełka nakrywkowego tworzy się pomiędzy nim, a paskiem środkowym szczelina o szerokości 0,1-0,5 mm.



Rys. 2. Komora zliczeniowa: widok z boku (po lewej) i widok z góry płytki podstawowej (po prawej).

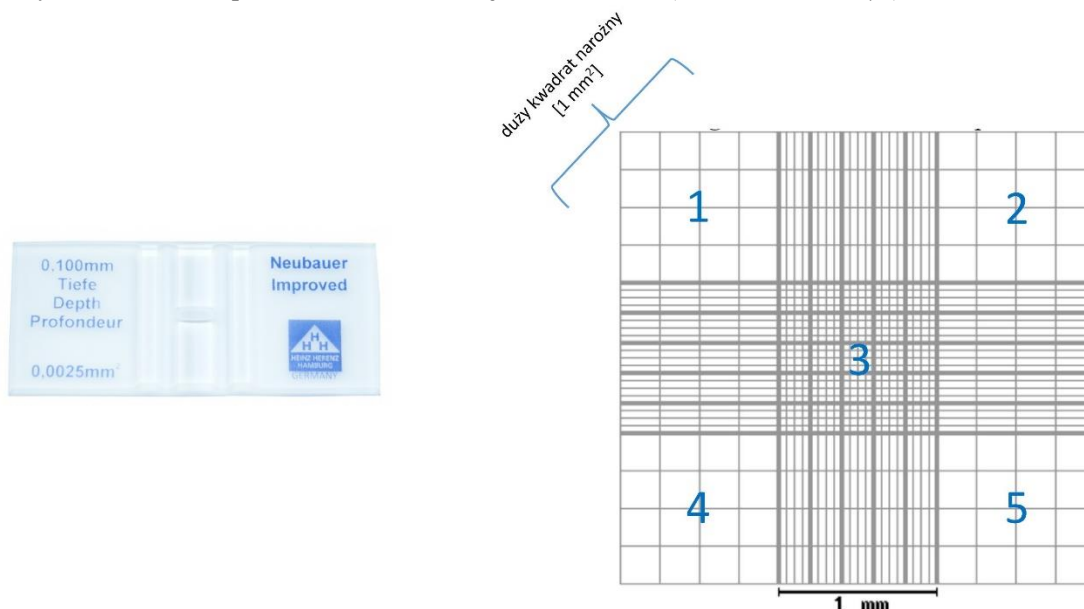
Komory Malassez (Rys. 3) służą najczęściej do zliczania ilości komórek w płynie (np. *S. cerevisiae*) oraz nicieni. Właściwą komorę stanowi siatka pokrywająca łączną powierzchnię 5 mm² (2 mm x 2,5 mm), podzieloną na 25 dużych prostokątów, gdzie powierzchnia każdego wynosi 0,25 x 0,20 mm = 0,05 mm². Duże prostokąty są z kolei podzielone na 20 mini kwadratów o powierzchni 0,05 x 0,05 mm = 0,0025 mm² każdy).

Głębokość komory wynosi 0,2 mm, zatem objętość cieczy znajdującej się na jednym prostokącie o powierzchni 0,05 mm² wynosi 0,01 mm³ (0,01 mikrolitra – µl).



Rys. 3. Komora Malassez: widok rzeczywisty (po lewej) oraz układ siatki pojedynczej komory pomiarowej (po prawej).

Komora Neubauera (Rys. 4) z podwójną siatką tworzy 9 dużych kwadratów, każdy po 1 mm^2 . Cztery duże narożne kwadraty podzielone są na 16 kwadratów o długości boku wynoszącej $0,25 \text{ mm}$. Wykorzystuje się je do zliczania leukocytów. Duży środkowy kwadrat podzielony jest na 25 kwadratów grupowych o bokach długości $0,2 \text{ mm}$. Powierzchnia zliczeniowa grup kwadratów jest oddzielona od zewnętrznych potrójną linią graniczną. Głębokość komory $0,1 \text{ mm}$, zatem objętość cieczy znajdującej się na jednym kwadracie o powierzchni 1 mm^2 wynosi $0,1 \text{ mm}^3$ ($0,1 \text{ mikrolitra} - \mu\text{l}$).



Rys. 4. Komora Neubauera: widok rzeczywisty (po lewej) oraz układ siatki pojedynczej komory pomiarowej (po prawej).

Ogólna formuła obliczania liczby cząstek (komórek) dla komór zliczeniowych:

$$\text{Liczba cząstek na } \mu\text{l objętości} = \frac{\text{zliczone cząstki}}{\text{powierzchnia zliczania [mm}^2\text{]} \times \text{głębokość komory [mm]} \times \text{rozcieńczenie}}$$

LITERATURA:

Alberts B. 1999. Podstawy biologii komórki.

Kawiak J., Mirecka J., Olszewska M., Warchola J. 1998. Podstawy cytofizjologii.

Kurczyńska E.U., Borkowska-Wykręt D. 2007. Mikroskopia świetlna w badaniach komórki roślinnej.

Kwolek-Mirek M., Zadrag-Tecza R. 2014. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. Federation of European Microbiological Societies Yeast Research. 12:1068-1079.