

BIOLOGIA KOMÓRKI

**KOMÓRKI EUKARIOTYCZNE W MIKROSKOPIE
ŚWIETLNYM JASNEGO POLA I KONTRASTOWO-
FAZOWYM;
BARWIENIA CYTOCHEMICZNE KOMÓREK**

KOMÓRKI EUKARIOTYCZNE W MIKROSKOPIE ŚWIETLNYM JASNEGO POLA I KONTRASTOWO-FAZOWYM; BARWIENIA CYTOCHEMICZNE KOMÓREK

Wstęp

Mikroskopy świetlne, które wykorzystują światło widzialne do oświetlania preparatów, są wciąż podstawowym narzędziem w badaniach biologii komórki. Mikroskop z optyką światła przechodzącego jasnego pola, który teoretycznie umożliwia rozróżnianie szczegółów preparatu większych niż 200 nm niejednokrotnie nie daje możliwości praktycznej obserwacji w preparatach biologicznych struktur tej wielkości (a nawet większych) ze względu na zbyt małą kontrastowość preparatów biologicznych, szczególnie komórek zwierzęcych. Komórki (i większość ich organelli) są obiektami fazowymi, które nie wykazują różnic w pochłanianiu światła, zatem za pomocą mikroskopu jasnego pola mogą być obserwowane tylko po wcześniejszym wybarwieniu. Opracowano szereg różnych metod cytochemicznego barwienia komórek, ale żadna z nich nie jest dla komórek obojętna, a większość wymaga wcześniejszego utrwalania, które prowadzi do śmierci komórek. Obserwacje żywych komórek zwierzęcych w mikroskopie w świetle przechodzącym stało się możliwe z chwilą opracowania metody kontrastu-faz lub, później, kontrastu różnicowo-interferencyjnego Nomarskiego.

Ćwiczenie ma na celu:

- 1) obserwacje obiektów biologicznych (komórek zwierzęcych i roślinnych) za pomocą mikroskopu świetlnego jasnego-pola oraz mikroskopu kontrastowo- fazowego, przy zastosowaniu różnych powiększeń mikroskopu;
- 2) zapoznanie się z wybranymi metodami utrwalania i barwienia komórek zwierzęcych
- 3) określanie rzeczywistych wymiarów obiektów biologicznych (komórek i organelli)

Część 1.

Obserwacje obiektów biologicznych (komórek zwierzęcych i roślinnych) za pomocą mikroskopu świetlnego jasnego-pola oraz mikroskopu kontrastowo-fazowego

Materiał potrzebny do ćwiczeń:

Komórki zwierzęce z hodowli in vitro:

komórki wysiane na szkiełka nakrywkowe umieszczone w szalkach hodowlanych:

komórki prawidłowe: mysie fibroblasty 3T3

komórki nowotworowe: czerniaka mysiego B16 (melanoma B16)

Pożywka do hodowli fibroblastów 3T3;

Modified Eagle Medium (MEM) z dodatkiem:

- 10% cielęcej surowicy płodowej (FCS),
antybiotyków (100 i.u./ml penicyliny, 10 µg/ml streptomycyny)

Pożywka do hodowli komórek melanoma B16

Modified Eagle Medium (MEM) z dodatkiem:

- 5% cielęcej surowicy płodowej (FCS)
- antybiotyków (100 i.u./ml penicyliny, 10 µg/ml streptomycyny)

Cebula

0,9% roztwór NaCl w wodzie

Wykonanie ćwiczenia:

- 1) Przygotować mikroskop biologiczny do pracy w jasnym polu i technice kontrastu- faz (wkręcić obiektywy o powiększeniu 10, 20 i 40x do kontrastu fazowego).
- 2) **Przygotować preparat żywych komórek zwierzęcych (prawidłowych lub nowotworowych) z hodowli *in vitro***
 - a) oglądnać, w mikroskopie odwróconym komórki wysiane na szkiełkach nakrywkowych umieszczonych w szalkach hodowlanych:
komórki prawidłowe: mysie fibroblasty 3T3
oraz komórki nowotworowe: czerniaka mysiego B16 (melanoma B16)
 - b) do przygotowania preparatu wybrać tylko 1 szalkę z komórkami (zapisać jakiego typu komórki będą oglądane)
 - c) do komory do barwień przyżyciowych nakropić 300 mikrolitrów ciepłej pożywki
 - d) za pomocą szpatułki wyjąć szkiełko z komórkami z szalki hodowlanej, przełożyć je do komory (komórkami do dołu!)
- 3) Oglądnać przygotowany preparat, używając obiektywu 20x, w jasnym polu i kontraście- faz i porównać wygląd komórek w obu technikach
 - a) zwrócić uwagę na kształt komórek, obecność organelli, ruch cytoplazmy
 - b) porównać wygląd i wielkość poszczególnych komórek w całej populacji
 - c) oglądnać preparaty z innymi komórkami (preparaty przygotowane przez kolegów z innych zespołów) i porównać morfologię różnych typów komórek ssaka
- 4) **Przygotować preparat ze skórki łuski okrywowej cebuli**
 - a) wyczyścić starannie szkiełko podstawowe i nakrywkowe
 - b) z cebuli wyjąć jedną łuskę i skalpelem wyciąć z niej kwadracik o boku około 0,5cm
 - c) za pomocą pęsety zdjąć skórkę z łuski cebuli i przenieść na szkiełko podstawowe do kropli soli fizjologicznej.
 - d) preparat przykryć szkiełkiem nakrywkowym (uważać, aby w preparacie nie było pęcherzyków powietrza)

- 5) Oglądnąć przygotowany preparat w jasnym polu, a następnie oglądnąć ten sam preparat w kontraście-faz , używając kolejno obiektywów 20x i 40x, i porównać wygląd komórek skórki łuski okrywowej cebuli w obu technikach
- a) zwrócić uwagę na kształt komórek, obecność organelli, ruch cytoplazmy
 - b) zmierzyć wielkość (długość i szerokość) wybranej komórki wykorzystując okular pomiarowy, którego wartość mikrometryczna została wcześniej zmierzona (**patrz część 3**). Wykonać pomiary wielkości tej samej komórki stosując różne powiększenia obrazu mikroskopowego, używając kolejno obiektywów o powiększeniu 10x, 20x oraz 40x.
 - c) porównać otrzymane wartości wielkości wybranej komórki i przeprowadzić analizę błędów pomiarowych.

część 2.

Utrwalanie i barwienie komórek zwierzęcych wg metody Pena.

Material potrzebny do ćwiczeń:

Komórki zwierzęce z hodowli in vitro (jak w części 1)

Roztwory do utrwalania i barwienia:

PBS – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej nie zawierający soli wapnia i magnezu

Roztwór utrwalający:

- 3,7% roztwór formaldehydu w PBS

Roztwór ekstrahujący:

- Triton X-100 : H₂O dest : glicerol (w stosunku 1:2:36)

Roztwór barwiący (wg Pena):

- 200 mg Coomassie Brilliant Blue R250 (błękit Coomassie)
- 45 ml metanolu
- 45 ml wody destylowanej
- 7 ml kwasu octowego

Wykonanie ćwiczenia:

- 1) Wybrać do barwienia ten sam typ komórek co uprzednio do przygotowania preparatów mikroskopowych do oglądania przyżyciowego komórek (komórki rosną w odpowiedniej pożywce na szkiełkach nakrywkowych umieszczonych w szalkach hodowlanych).
- 2) Zlać pożywkę znad komórek i przepłukać szkiełko 3 razy roztworem PBS o temp. 37°C.
- 3) Zalać komórki 3.7% roztworem formaldehydu w PBS o temp. 37°C i utrzymywać komórki przez 15 min w cieplarni.
Zlać utrwalacz znad komórek i przepłukać szkiełko 2 razy roztworem PBS.
- 4) Komórki na szkiełku wybarwić wg metody Pena:
 - Zalać komórki roztworem ekstrahującym i pozostawić na 15 min w temperaturze pokojowej. Zlać roztwór ekstrahujący znad komórek i przepłukać szkiełko 3 razy H₂O destylowaną.
 - Zalać komórki roztworem barwiącym Pena na 90 sekund (w temperaturze pokojowej).
 - Zlać roztwór barwnika znad komórek i przepłukać szkiełko 5 razy H₂O destylowaną.

- 5) Wyczyścić szkiełko podstawowe i nakropić na nie 20µl H₂O destylowanej. Na kroplę wody nałożyć szkiełko z wybarwionymi komórkami (komórkami do dołu) i lekko osuszyć brzegi szkiełka bibułą.
- 6) Przygotowany preparat oglądać w mikroskopie biologicznym przygotowanym do pracy w jasnym polu. Oglądać komórki pod różnymi powiększeniami.
- 7) Porównać obrazy komórek (tego samego rodzaju) utrwalonych i wybarwionych oraz wcześniej oglądanych komórek żywych. Czy można zaobserwować różnice, a jeśli tak to jakie?
- 8) Korzystając z preparatu wybarwionych, wybranych komórek mysich zmierzyć długość i szerokość lub średnicę (zależnie od kształtu komórek) 10 losowo wybranych komórek oraz średnice jąder w tych komórkach. Pomiarów dokonać wykorzystując okular pomiarowy, którego wartość mikrometryczna została wcześniej zmierzona (**patrz część 3**). Zaleca się użycie obiektywu o powiększeniu 20x. Obliczyć średnią wielkość oglądanych komórek mysich oraz średnią wielkość jąder komórkowych (wartości podać w mikrometrach).
- 9) Porównać szacunkowe wielkości badanych komórek ssaka i komórek cebuli.

Część 3.

Określanie rzeczywistych wymiarów obiektów biologicznych

Materiał potrzebny do ćwiczeń:

*mikroskopowy okular pomiarowy
szkiełko mikrometryczne*

Wykonanie ćwiczenia:

Wyznaczenie wartości mikrometrycznej okularu pomiarowego:

- 1) Umieścić na stoliku mikroskopu szkiełko mikrometryczne i znaleźć jego obraz w mikroskopie (w jasnym polu), przy użyciu obiektywu o powiększeniu 10x.
- 2) Do nasadki okularowej, w miejscu jednego z normalnych okularów mikroskopu włożyć okular pomiarowy; znaleźć ostry obraz skali okularu pomiarowego poprzez przekręcenie wewnętrznej części okularu pomiarowego przy unieruchomionej obudowie okularu.
- 3) Przekręcić okular pomiarowy tak, aby obie skale (okularu i szkiełka mikrometrycznego) były względem siebie równoległe.
- 4) Przesuwając stolik mikroskopu ustawić obraz skali szkiełka mikrometrycznego tak, aby „zerowa” działka szkiełka pokrywała się z „zerową” działką okularu pomiarowego.
- 5) Następnie znaleźć kolejne miejsce, w którym działki obu skal się pokrywają i zapisać która jest to działka okularu pomiarowego i ilu mikrometrom odpowiada.
- 6) Wyliczyć wartość mikrometryczną okularu pomiarowego dla obiektywu o powiększeniu 10x.
- 7) Wykonać analogiczne pomiary wartości mikrometrycznych okularu pomiarowego dla obiektywów o powiększeniu 20x i 40x (punkty od 3 do 6).

Zakres materiału, który należy przygotować do ćwiczeń:

- Zastosowania mikroskopu świetlnego jasnego pola oraz kontrastowo-fazowego w badaniach biologii komórki

-
- Możliwości wizualizacji struktury wewnątrzkomórkowej komórek eukariotycznych w mikroskopie jasnego-pola i kontrastowo-fazowym
 - Utrwalanie i barwienie komórek zwierzęcych: różne metody, ich zalety i ograniczenia
 - Określanie rzeczywistych wymiarów obiektów biologicznych

Zalecana literatura:

B. Alberts i in.: Podstawy biologii komórki, PWN 2005, część pierwsza, panel 1-1

M. Pluta: Mikroskopia optyczna. Mikroskopia fazowo-kontrastowa

E. Kurczyńska i D. Borowska-Wykręt: Mikroskopia świetlna w badaniach komórki roślinnej, rozdziały 2 i 3