University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان
تهیه لام دائم از پروتوزوئر ها و
رنگ آمیزی سه گانه اندامک های درون سلولی

مقدمه

پروتوزوئرها ، جانداران یوکاریوتیک تک سلولی هستند که جزء آغازیان محسوب می شوند و از ذرات مواد غذایی و باکتری ها و جلبکها، تغذیه می کنند. هر پروتوزوئر، جاندار کاملی است که همهٔ فعالیت های حیاتی آن در درون یک سلول انجام می گیرد.به دلیل تشابه ساختاری فراوان با سلول های جانداران پرسلولی، نام تک سلولی برای آنها انتخاب شده است.

خصوصیات زیستی این گروه عبارت است از:

تک سلولی بوده و بعضی از انواع این گروه کلونی دارند، عموماً میکروسکوپی اند، همه نوع تقارن در آنها دیده می شود، دارای اشکال تغییرپذیر و برخی ثابت اند، هسته در آنها منفرد یا چندتایی است، زندگی آزاد همسفرگی یا انگلی دارند، همهٔ روش های تغذیه ای در این گروه دیده می شود، در زیستگاه های آبی و خشکی دیده می شوند و در شرایط مساعد بسرعت تکثیر میشوند.برای مثال در پارامسی تولید مثل غیر جنسی در شرایط تغذیه ای مناسب بصورت دوتاشدن Binary fission و تولید مثل جنسی در شرایط کمبود مواد غذایی و دمایی کمتر از حد اپتیموم آنها بصورت کانجوگیشن Conjugation انجام می شود.

جهت بررسی و شناسایی انواع پروتوزوئرها در آزمایشگاه می توان از آن ها لام دائم تهیه و ساختار درون سلولی آنها را به دقت بیشتر مطالعه کرد.

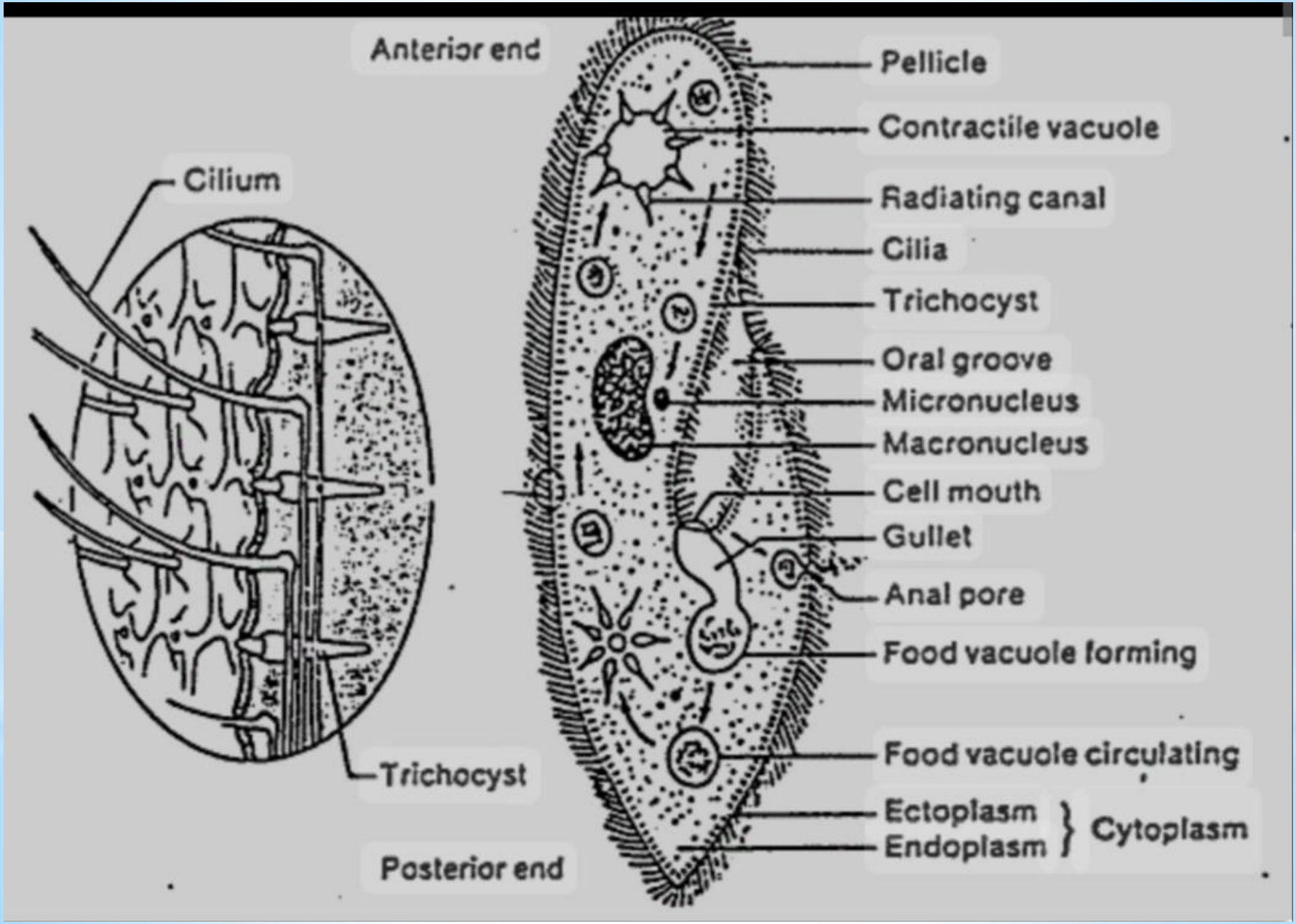
مراحل تهیه لام دائم از پروتوزوئرها تقریباً مشابه مراحل تهیه لام دائمی از سایر نمونه‌های جانوری و گیاهی است با این تفاوت که مرحله برش‌گیری وجود ندارد.بنابراین ابتدا باید لام آلبومینه شود و سپس نمونه های تک یاخته روی لام تثبیت،رنگ آمیزی،آبگیری و چسب دائم گردند.

تهیه لام‌های دائم از موجودات تک سلولی که حیات آنها وابسته به محیط‌های مایع می‌باشد بسیار دشوارتر حساس تر و دقیق‌تر از سایر نمونه‌ها می‌باشد. بدلیل اینکه با خشک شدن محیط اطراف انها و تثبیت ساختار و اندامکهای درون سلولی، عوامل نگهدارنده فشار اسمزی قادر به انجام عملکرد طبیعی خود نیستند و بالانس اسمزی سلول بهم میخورد و دچار فروپاشی و تخریب سلولی می گردند .برای روشنتر شدن اهمیت این موضوع ساختار پارامسی و تنظیم فشار اسمزی آن در حالت عادی بررسی می شود.

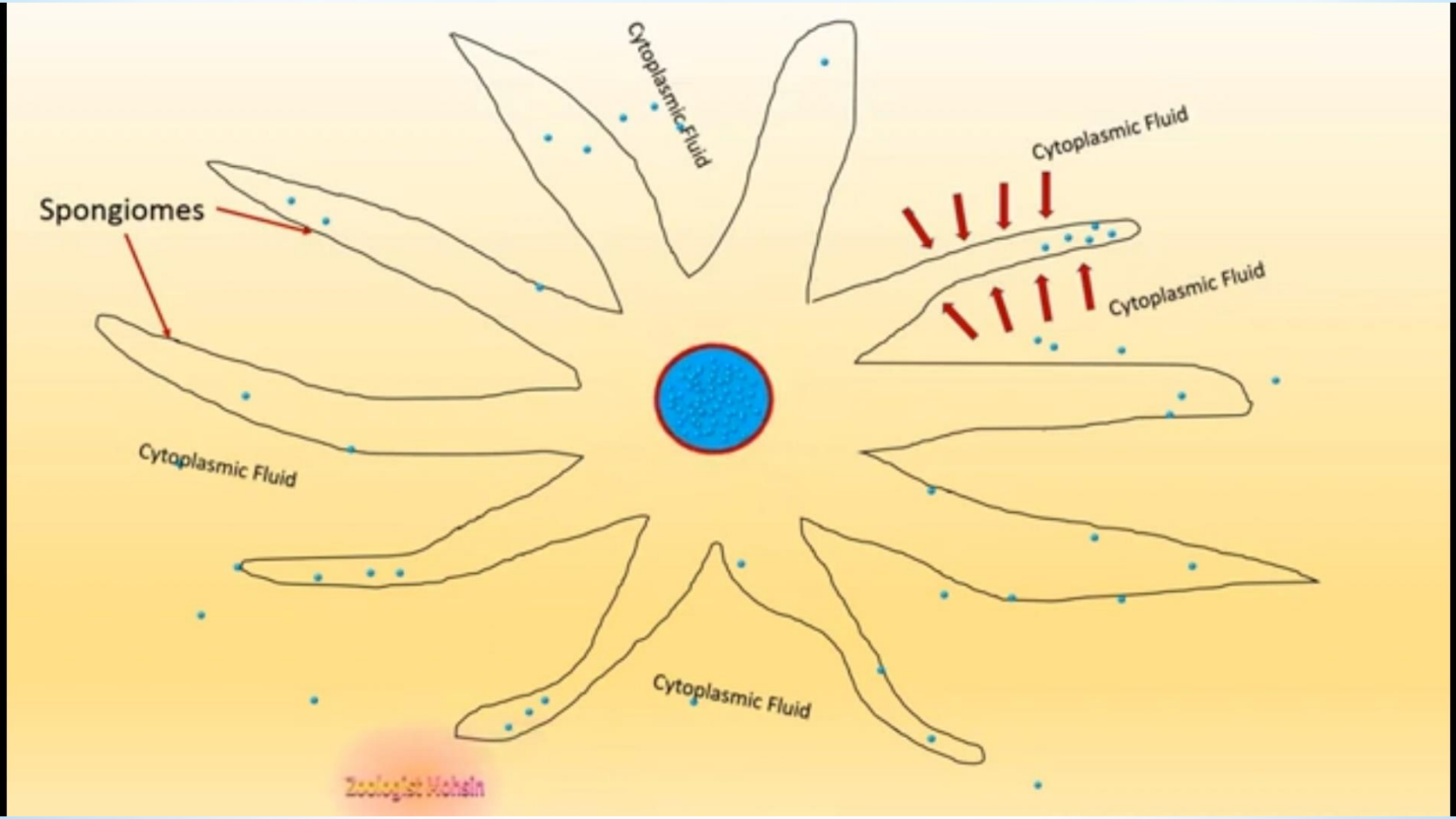
در پارامسی های آب شیرین که سیتوپلاسم آن‌ها نسبت به محیط اطراف از نظر اسمزی هایپر تونیک یا غلیظ‌تر می‌باشد در این شرایط اسمزی آب به داخل سلول جریان می‌یابد و پس‌از آن به داخل واکوئل انقباضی Contractil vacuol یا واکوئل ضربان دار که یک اندامک درون سلولی است منتقل می‌شود. این اندامک با یک مکانیسم محافظتی از جذب بیش‌ازحد آب به داخل سلول و پارگی و ترکیدن تک یاخته به‌دلیل فشار بالای آب جلوگیری می‌کند. بدین ترتیب که ابتدا کانال‌های شعاعی ظریف اطراف واکوئل انقباضی آب را از سیتوپلاسم جذب کرده و پس از پر شدن به داخل واکوئل مرکزی انقباضی پمپاژ می‌کنند.مکانیسم این عمل بدلیل وجود و عملکرد پمپ‌های پروتون و NADPH و ATPase در غشاء می باشد و درنهایت آب اضافی از طریق منافذ موجود در غشاء سلولی دفع می‌شود.

هر پارامسی دو عدد واکوئل انقباضی در دو قطب مخالف سلول خود دارد که متناوباً فعالیت می‌کنند.مرحله‌ای که آب به داخل واکوئل مرکزی جریان می‌یابد دیاستول و بیرون راندن آب اضافی و انقباض آن را سیستول می‌گویند. این دو مرحله در واکوئل‌های انقباضی ریتمیک و دوره‌ای است و زمان آن بستگی به تفاوت اسمولاریته بین محیط و سلول دارد.معمولاً زمان پر و شدن و پمپاژ آن حدود چند ثانیه طول می‌کشد و بدین ترتیب فشار اسمزی سلول پارامسی تنظیم و مانع از ترکیدن آن می شود به این عمل osmoregulation می گویند.

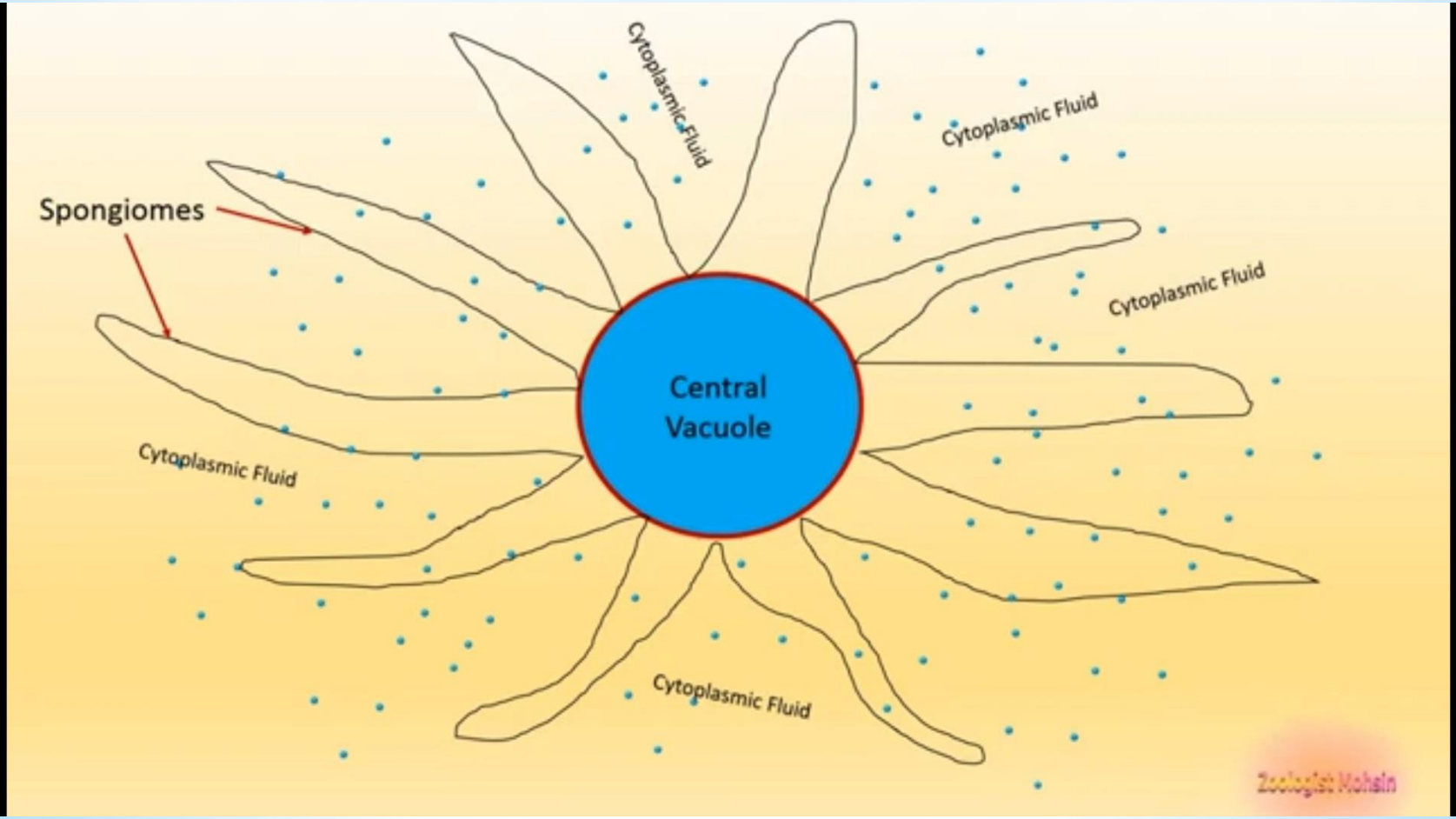
در مراحل اولیه تهیه لام با خشک شدن محیط اطراف تک‌یاخته و از کار افتادن واکوئل‌های انقباضی و عدم تعادل فشار اسمزی سلول متلاشی می‌شود. همین دلیل است که تهیه لام دائم از پروتوزوئر ها به‌مراتب مشکل‌تر و حساس‌تر از تهیه لام دائم از نمونه‌های مختلف بیولوژیک دیگر می‌باشد. برای این منظور بایستی در اولین مرحله بر روی لام پوششی غلیظ از ترکیب مناسبی تهیه شود تا با قرار گرفتن تک یاخته در این محیط ضمن خشک شدن ساختار طبیعی آن حفظ شود.



ازمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر



ازمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر



ازمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر

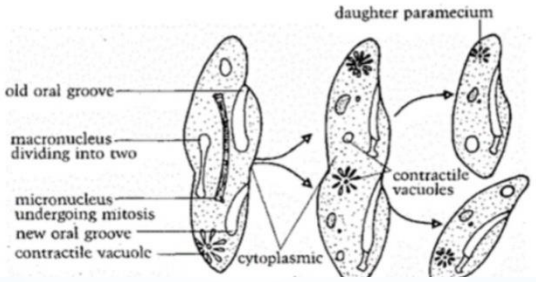
ازمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر

ازمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر

1.3.4 Paramecium in binary fission

Comments:

1. It is found in fresh water, pond, rivers, lakes, streams and pools.
2. Microscopic, slipper, shaped, cigar shaped or spindle shaped.
3. The entire body surface is covered by numerous, tiny hair –like fine protoplasmic processes called cilia.
4. Endoplasm is semi-fluid and less granular.
5. Ciliary locomotion and body contortions are present.
6. Reproduction asexually by transverse binary fission under good conditions of food.
7. Micronucleus and macronucleus are present.
8. Nutrition heterotrophic and holophytic



ازمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر

1.3.5 Conjugation in Paramecium

Comments:

1. It is the slides of paramecium showing conjugation.
2. Conjugation constitutes the sexual part of the reproduction.
3. In conjugation two individuals come in contact for mating and unite by their own grooves.
4. In each conjugant macronucleus disappears and micronucleus divides twice forming 4 haploid daughter micro nuclei.
5. The conjugation occurs only when nutrition is deficient and when temperature of water is below the optimum.

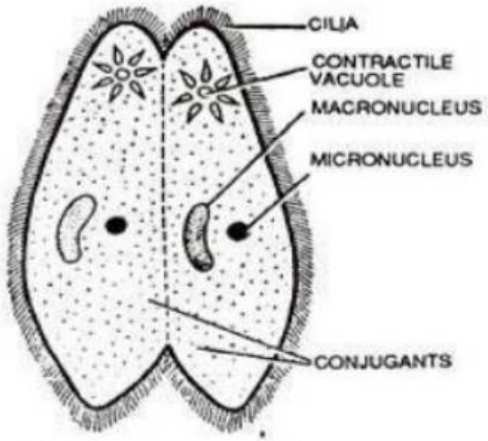


Fig.1.3.5Conjugation in Paramecium

ازمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر

مراحل آماده سازی نمونه جهت تهیه لام دائم به شرح زیر می باشد:

۱- مرحله تثبیت Fixation

در این مرحله ی قبل از قرارگیری تک یاخته بر روی لام بایستی لام توسط ترکیبی به‌نام آلبومین مایر پوشش‌دهی شود تا در این محیط تک‌سلولی در زمان خشک شدن ساختار آن تخریب نگردد و بر روی لام تثبیت شود.

سپس با استفاده از الکل با درجه خلوص بالا ساختار سیتوپلاسم تثبیت و نمونه آماده انجام مراحل مختلف رنگ‌آمیزی جهت مشخص شدن اندامک‌های درون سلولی گردد.

۲-مرحله رنگ آمیزی Staining

پس‌از مرحله تثبیت بایستی به‌ترتیب سیتوپلاسم و اندامک‌های درون سلولی توسط معرف‌های مناسب بدون تداخل با یکدیگر به‌صورت جداگانه رنگ‌آمیزی شوند. از مهم‌ترین اندامک های قابل‌مشاهده در میکروسکوپ نوری پس‌از رنگ‌آمیزی میتوکندری و هسته می‌باشند.

۳-مرحله آبگیری Dehydration

در این مرحله ساختار سلولی اعم از غشا سیتوپلاسمی سیتوپلاسم و قسمت های مختلف اندامک‌های درون سلولی به‌تدریج و مرحله به مرحله توسط درجات مختلف الکل اتانول آب‌گیری می‌شوند تا بتدریج مولکول‌های آب توسط مولکول های OH الکل بصورت پایدار جایگزین شده و از به‌هم ریختن ساختار سلولی و فروپاشی آن در حین انجام بقیه مراحل و نگهداری درازمدت لام جلو گیری شود.

۴- مرحله شفافیت دهی Clearing

در این مرحله حذف آلبومین و شفافیت دهی درون سلولی توسط حلال زایلول انجام می‌شود.

۵ - مرحله چسب دائم Mounting

در پایان مراحل فوق جهت چسباندن لامل بر روی لام و نگهداری درازمدت نمونه ها از ترکیب چسب مناسب مانند کانادا بالزام یا انتلان استفاده می‌شود و بدین ترتیب لام دائم و ماندگار تهیه می‌گردد. سپس لام در اون ۶۰ درجه سانتی‌گراد حداقل به مدت ۲ ساعت می‌ماند تا حباب‌های اضافی هوا خارج شده و لامل به‌صورت کامل بر روی لام چسبیده و محکم شود و قابل تمیز شدن باشد.

ازمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر

مواد و وسایل مورد نیاز

- محیط کشت هی شامل پارامسی
- آب مقطر
- آلبومین مایر شامل:گلیسرین و سفیده تخم مرغ به نسبت حجمی مساوی
- اسید استیک
- سبز ژانوس
- اسیدو فوشن
- سبز متیل
- الکل اتلیک با درجات ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۶ درصد
- گزیلول
- کانادا بالزام یا انتلان
- پاستور پی پت پلاستیکی یا قطره چکان
- لام و لامل
- سینی مخصوص رنگ آمیزی
- میکروسکوپ نوری

7. **What is Mayer's** Albumen? ■ Mayer's albumen is a chemical solution used to fix the small organisms and cut the extremely thin and small sections of materials (or microtome). ■ It is prepared by mixing White part of egg (albumen), Glycerine and Sodium salicylate. 50 ml of egg albumen, 50 ml of Glycerine and 1 gram of Sodium salicylate are mixed and the solution is filtered to make Mayer's albumen.

مواد و وسایل مورد نیاز

دستور ساخت محلول ها و رنگ‌های مورداستفاده با غلظت معین و استاندارد:

۱- آلبومین مایر: جهت تهیه محلول آلبومین مایر به میزان مساوی گلیسیرین با غلظت بالا و سفیده تخم‌مرغ یا آلبومین حیوانی و ۱ گرم سدیم سالیسیلات را به‌خوبی مخلوط کرده و سپس ترکیب حاصل را از صافی با سوراخ‌های ریز عبور دهید و در ظرف شیشه‌ای نگه داری کنید.

۲-فوشین اسیدی یک درصد: جهت ساخت ۱۰۰ سی‌سی فوشین اسیدی ۱ گرم از پودر آن را در ۱۰۰ سی‌سی الکل ۵۰٪ بطور کامل حل کنید.

۳- سبز ژانوس یک صدم درصد: یک صدم گرم پودر سبز ژانوس را در ۱۰۰ سی سی الکل ۹۶٪ مقطر حل کنید.

۴- سبز متیل یک درصد: ۱ گرم پودر سبز متیل را در ۸۰ سی‌سی آب مقطر و ۲۰ سی سی الکل ۹۶٪ حل کنید.

۵- اسید استیک یک درصد: ۱ سی‌سی اسیداستیک گلاسیال را با آب مقطر به حجم ۱۰۰ سی‌سی برسانید.

۶- اتانول: با درجات مختلف ۳۰ و ۵۰ و ۷۰ و ۹۶ درصد.

روش کار

مراحل آماده‌سازی لام دائم پروتوزوئر ها و رنگ‌آمیزی سه‌گانه اندامک‌های درون سلولی :

۱- ابتدا جهت حفظ فشار اسمزی تک‌یاخته ها و ثابت شدن و فیکس شدن آنها، لام را به‌طور کامل آلبومینه کنید.

۲- یک قطره محیط کشت هی را در مرکز لام قرار داده و سپس لام را بر روی شعله به دقت و به‌آرامی خشک کنید. در این مرحله دقت شود تا حرارت شدید و مستقیم نباشد.

۳- لام را به مدت ۵ دقیقه در محلول الکل اتانول ۹۶ درصد به‌منظور تثبیت ساختار سیتوپلاسم قرار دهید و در دمای محیط کاملا خشک کنید.

۴-جهت رنگ‌آمیزی سیتوپلاسم لام را در محلول رنگی اسید و فوشین ۱ درصد به مدت ۴۰ ثانیه قرار دهید.

۵- جهت رنگ‌آمیزی ساختار میتوکندری لام را به مدت ۲ دقیقه در محلول سبز ژانوس ۱ درصد قرار دهید.

۶- جهت تثبیت پروتئین‌های هسته و رنگ‌پذیری ساختار آن لام را به مدت ۱ دقیقه در اسیداستیک ۱ درصد قرار دهید.

۷- جهت رنگ‌آمیزی هسته لام را به مدت ۲ دقیقه در محلول سبز متیل ۱ درصد قرار دهید.

۸- جهت آب‌گیری از قسمت‌های مختلف نمونه لام را به‌ترتیب در درجات مختلف الکل اتانول ۳۰، ۵۰، ۷۰، و ۹۶ درصد در هر کدام از محلول‌ها به مدت ۳۰ ثانیه قرار دهید.

۹- جهت زدودن آلبومین لام را در حلال گزایلول به مدت ۱ دقیقه قرار دهید.

۱۰- لام را در دمای محیط خشک کنید.

۱۱- جهت نگهداری درازمدت لام اطراف آن را چسب لام کانادابالزام ریخته، لامل را با زاویه ۴۵ درجه به آرامی بر روی لام بگذارید و در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت حداقل ۱ تا ۲ ساعت قرار دهید تا حباب هوای اضافی خارج و لامل کاملا فیکس گردد. سپس با بزرگنمایی های مختلف میکروسکوپ نمونه ها را بررسی نمایید.

6. **Permanent Mounting of** Paramecium ■ Take a slide and place a drop of Mayer's albumen at the center to make a thin film ■ Place few drops of Paramecium cultured fluid (with abundant Paramecium) ■ Place a drop of absolute alcohol to fix paramecium specimen and dry it ■ Wash the slide with distilled water ■ Stain the specimen with hematoxylin and again wash it with water ■ Dehydrate the slide with 30% alcohol (5 minutes), 50% alcohol (5 minutes), 70% alcohol (5 minutes) and stain the sample with eosin solution; again dehydrate with 90% alcohol (5 minutes), absolute alcohol (7 minutes) ■ Clear the slide in xylol and mount in Canada balsam ■ Gentle heating or use of small droplets of xylol can help to remove air droplet formed during mounting

بررسی نتایج

دلیل رنگ شدن سیتوپلاسم توسط فوشین اسیدی این است که سیتوپلاسم به‌دلیل انجام واکنش‌های شیمیایی و آنزیمی و وجود نمک ها، پروتئین‌های بازی، گلیکوژن ها و انجام فعالیت‌های متابولیکی درون سلولی دارای PH بازی است و با رنگ فوشین اسیدی ترکیب شده رنگ صورتی ایجاد می‌کند.

علت رنگ‌پذیری میتوکندری توسط سبز ژانوس این است که در غشاء داخلی میتوکندری آنزیم‌های اکسید کننده قوی از جمله آنزیم سیتوکروم اکسیداز وجود دارد که با این رو رنگ ترکیب شده و آن را اکسید کرده و میتوکندری را به سبز آبی بسیار کم رنگ در می‌آورد.

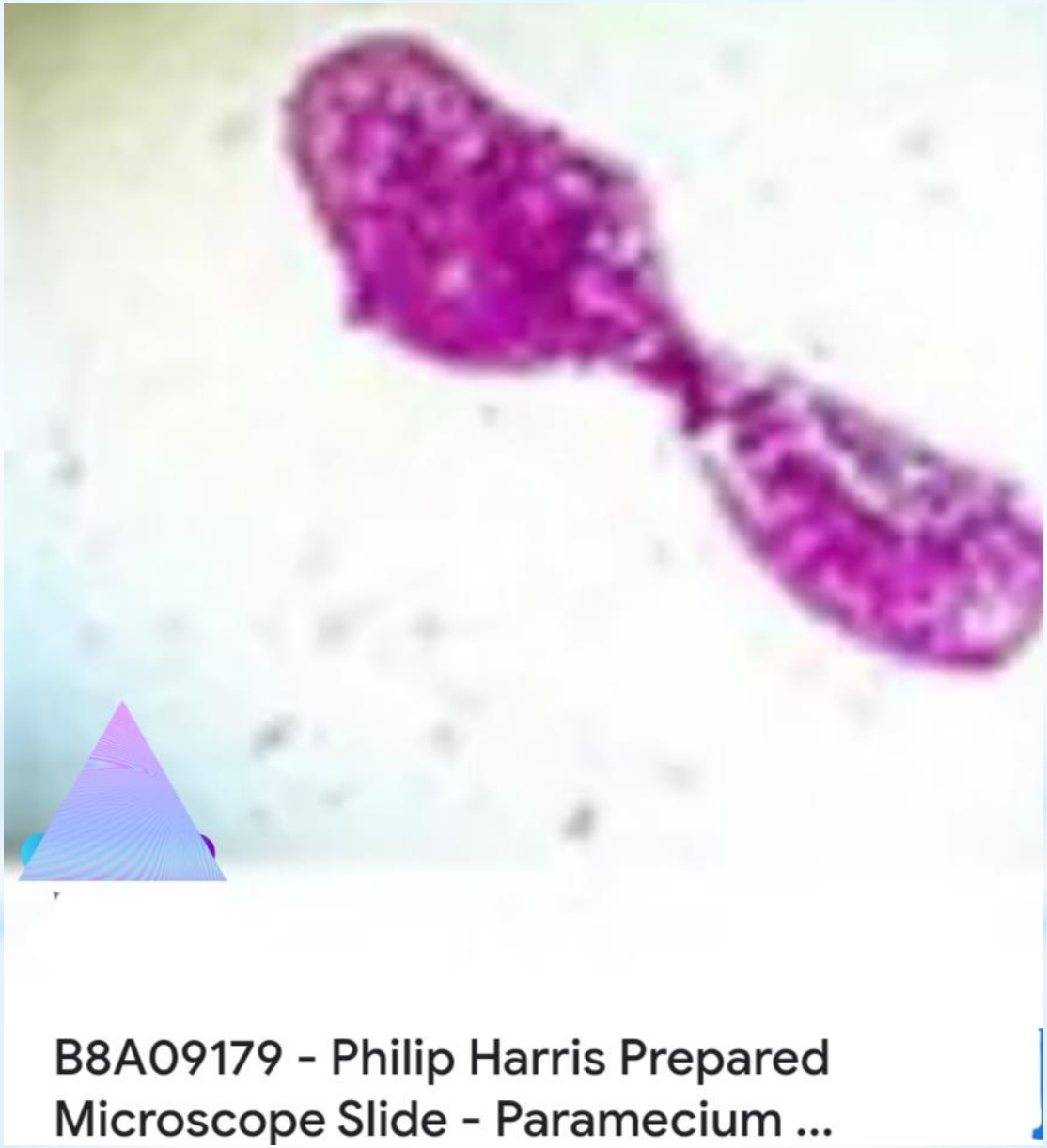
دلیل رنگ‌آمیزی هسته توسط سبز متیل و وجود اسیدهای نوکلئیک در هسته است که به هسته خاصیت اسیدی می دهند و همچنین توسط اسیداستیک اسیدی ترشده و با ترکیب شدن با سبز متیل سبز بنظر می رسند.

Slide Paramecium (Pk. Of 6 pcs.) – Scientific Kart

فروهرفر

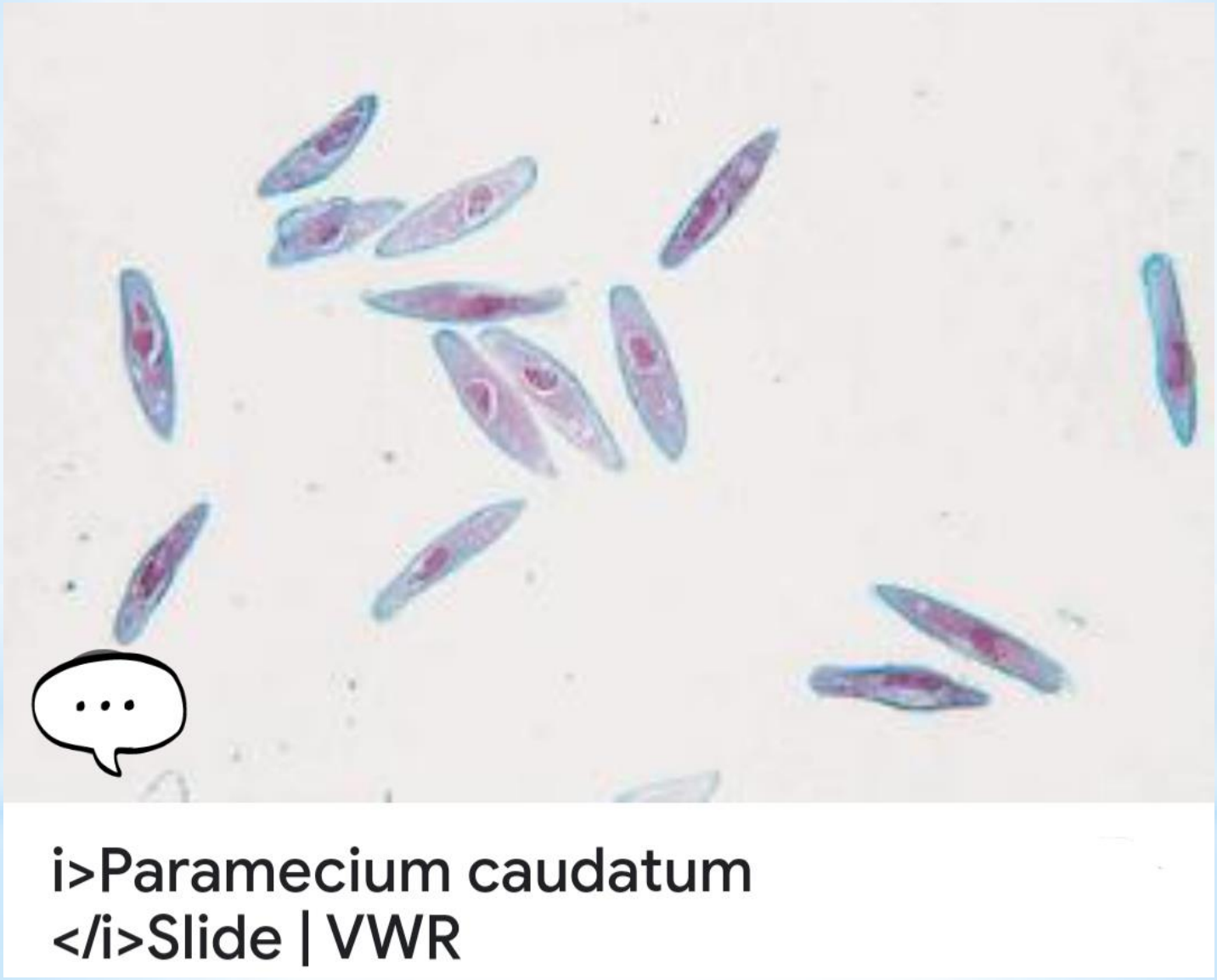
Paramecium aurelia, Living | Carolina Biological Supply

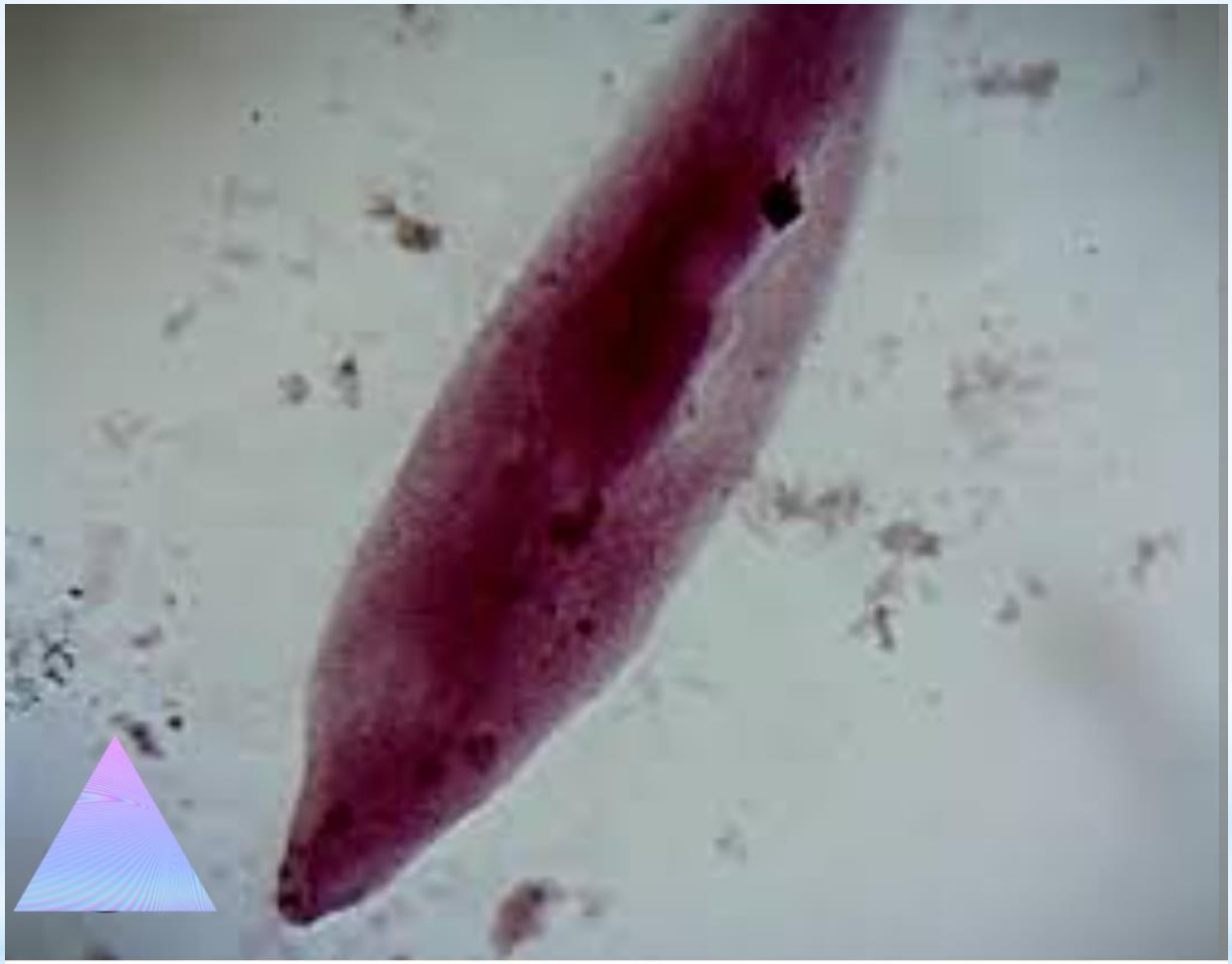
ازمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر


B8A09179 - Philip Harris Prepared
Microscope Slide - Paramecium ...

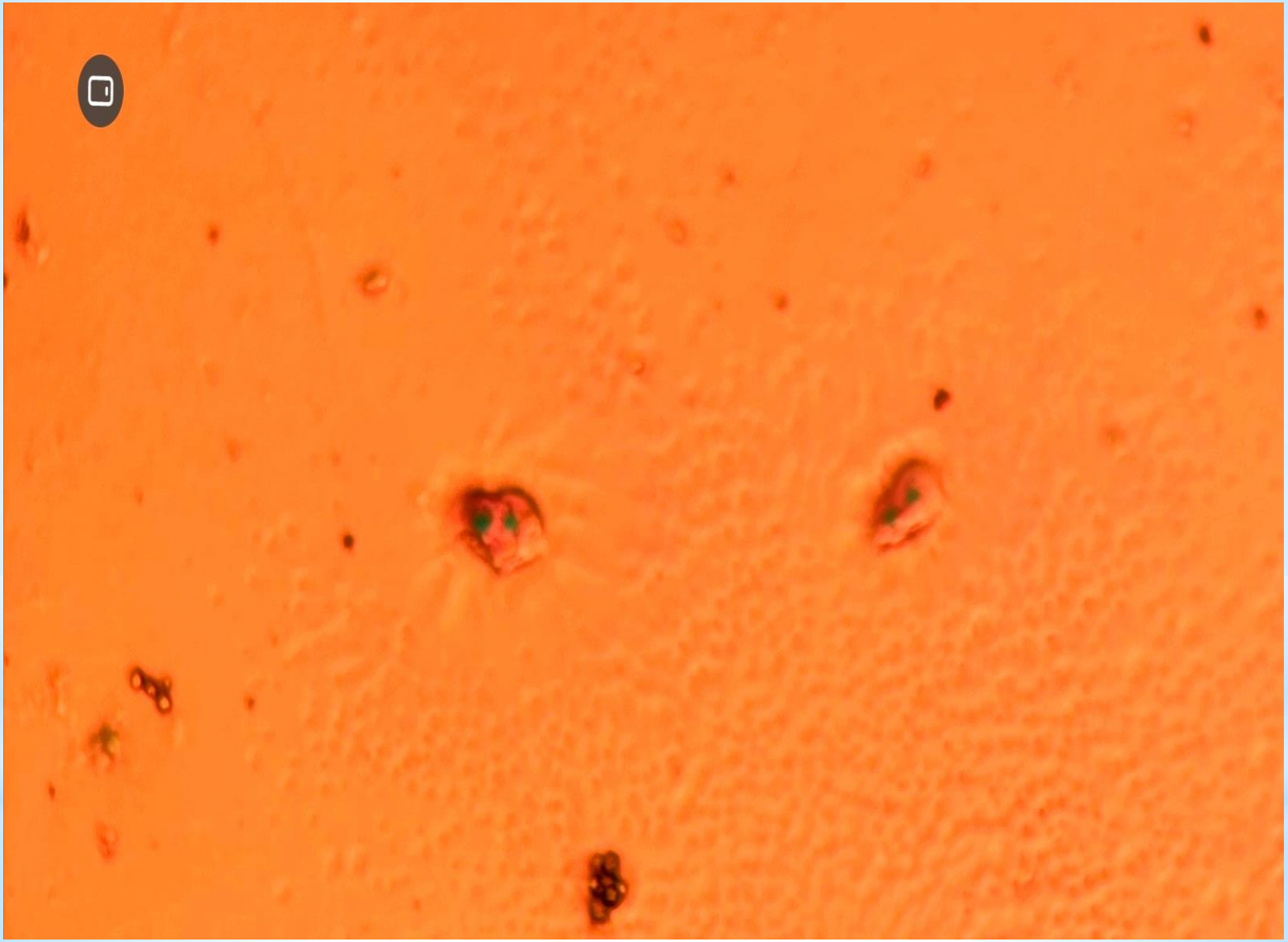
Paramecium Conjugation,
Whole Mount - Prepared...

Paramecium Conjugation
under the microscope,...

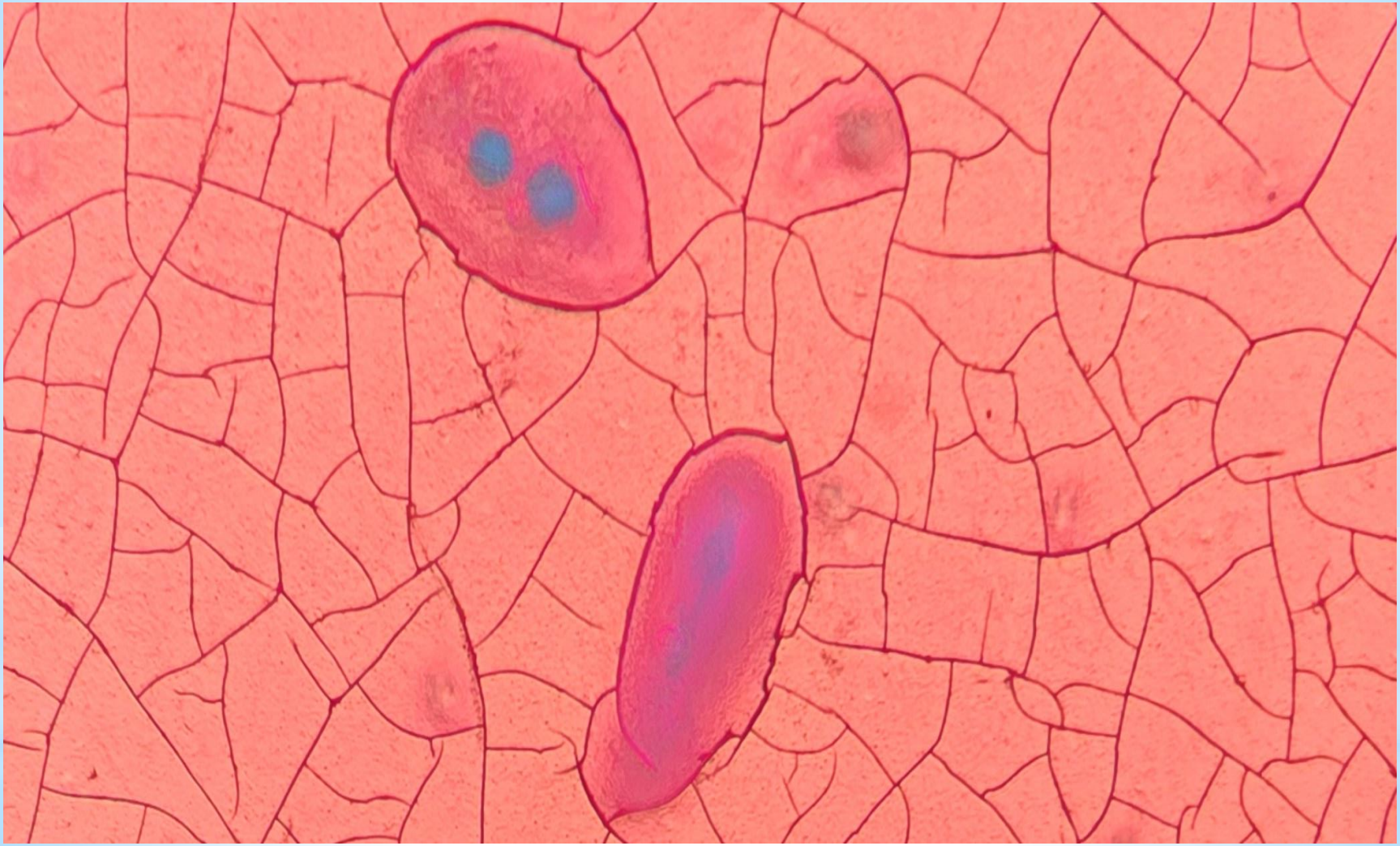

i>Paramecium caudatum
</i>Slide | VWR



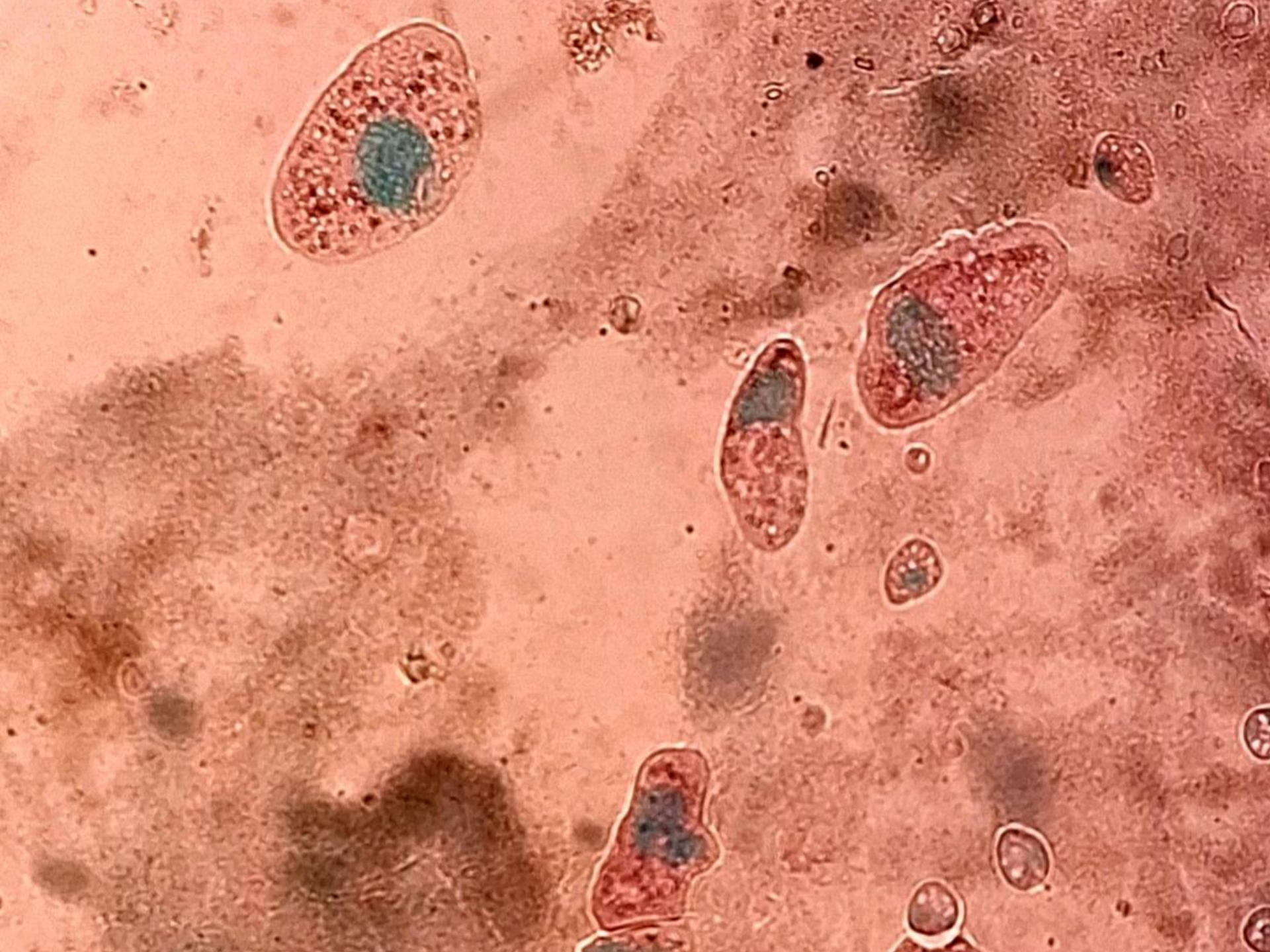
Paramecium Caudatum (z.1-30) | Pro Source

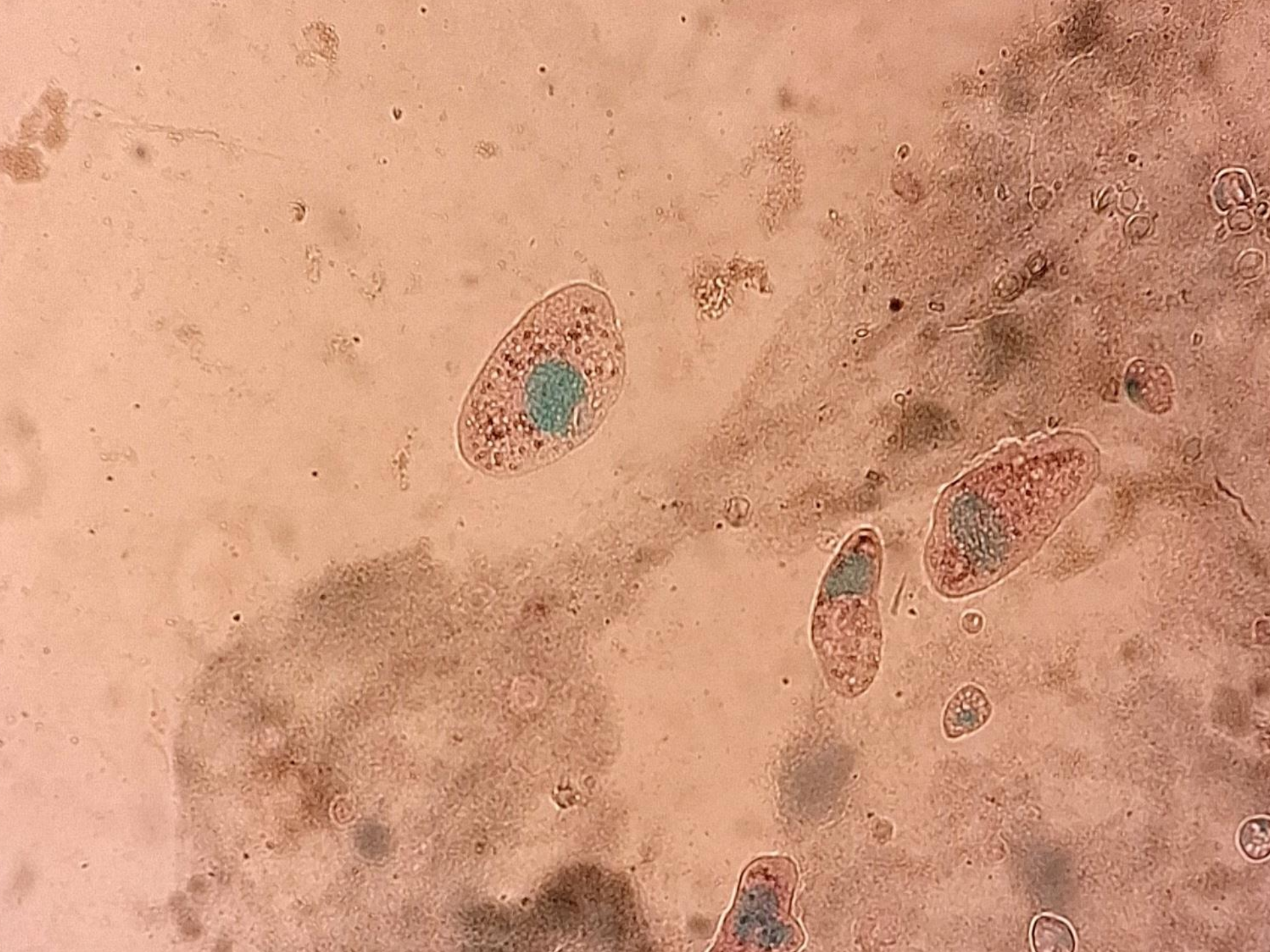


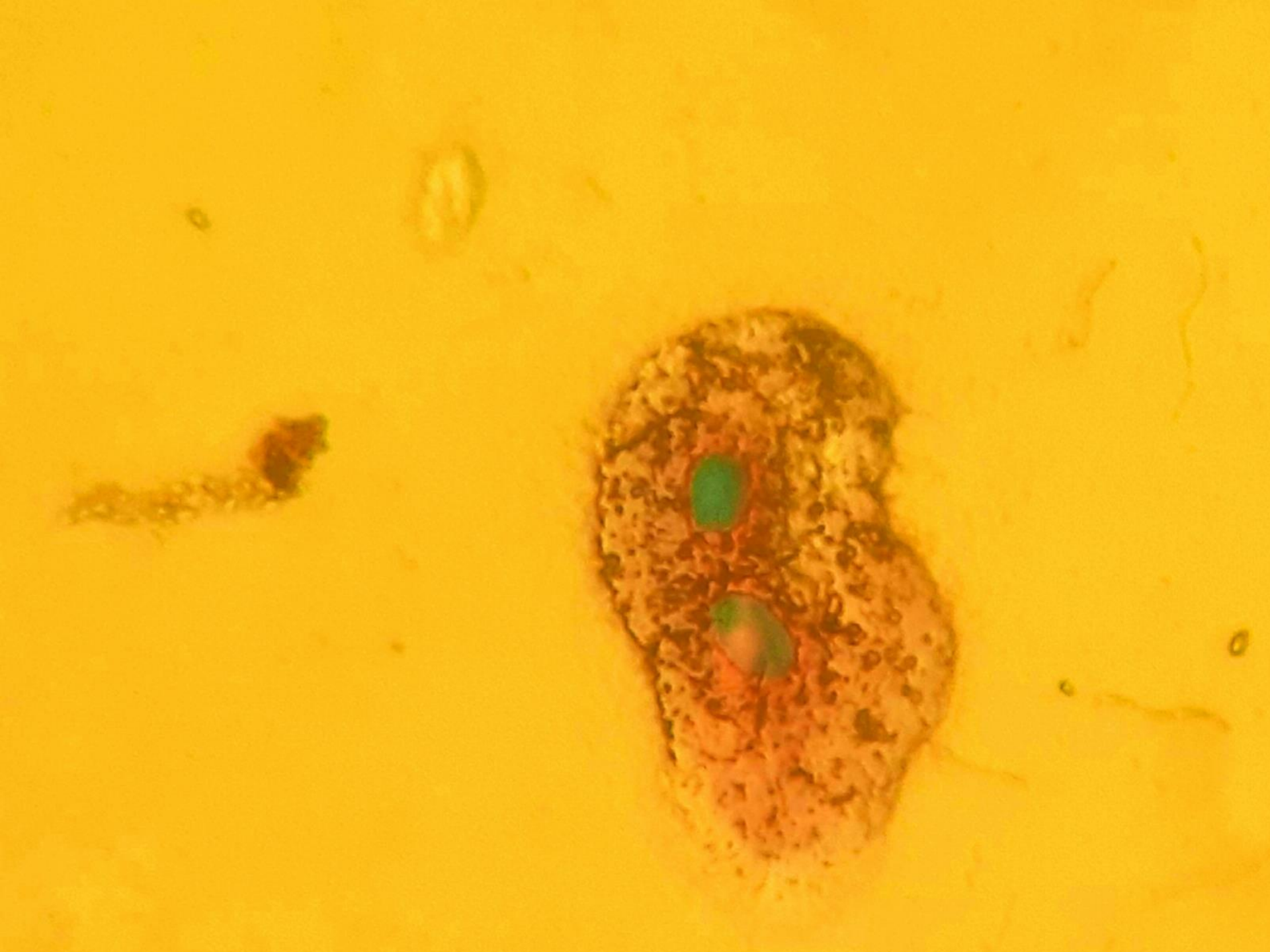
ازمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر



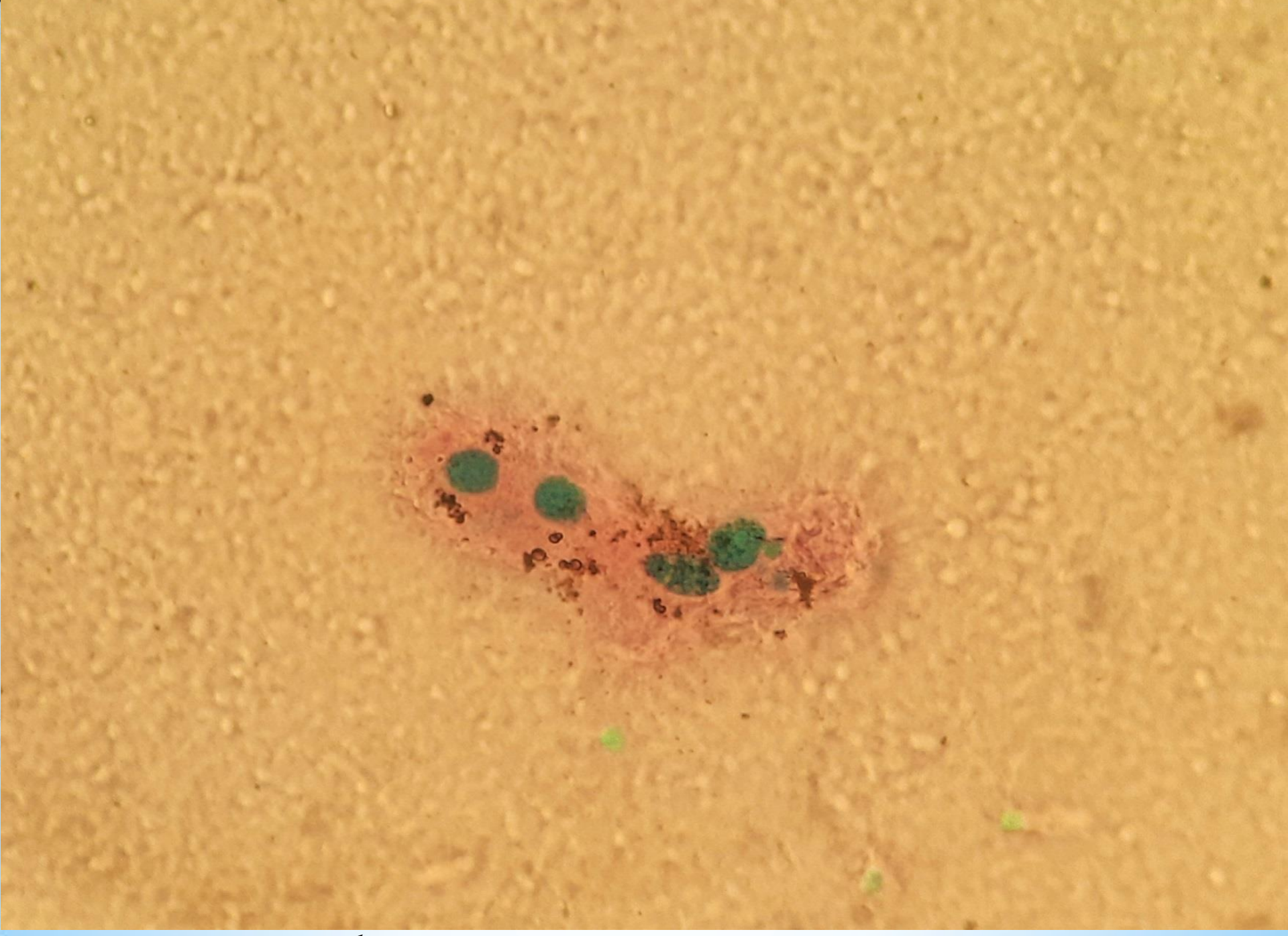
ازمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر

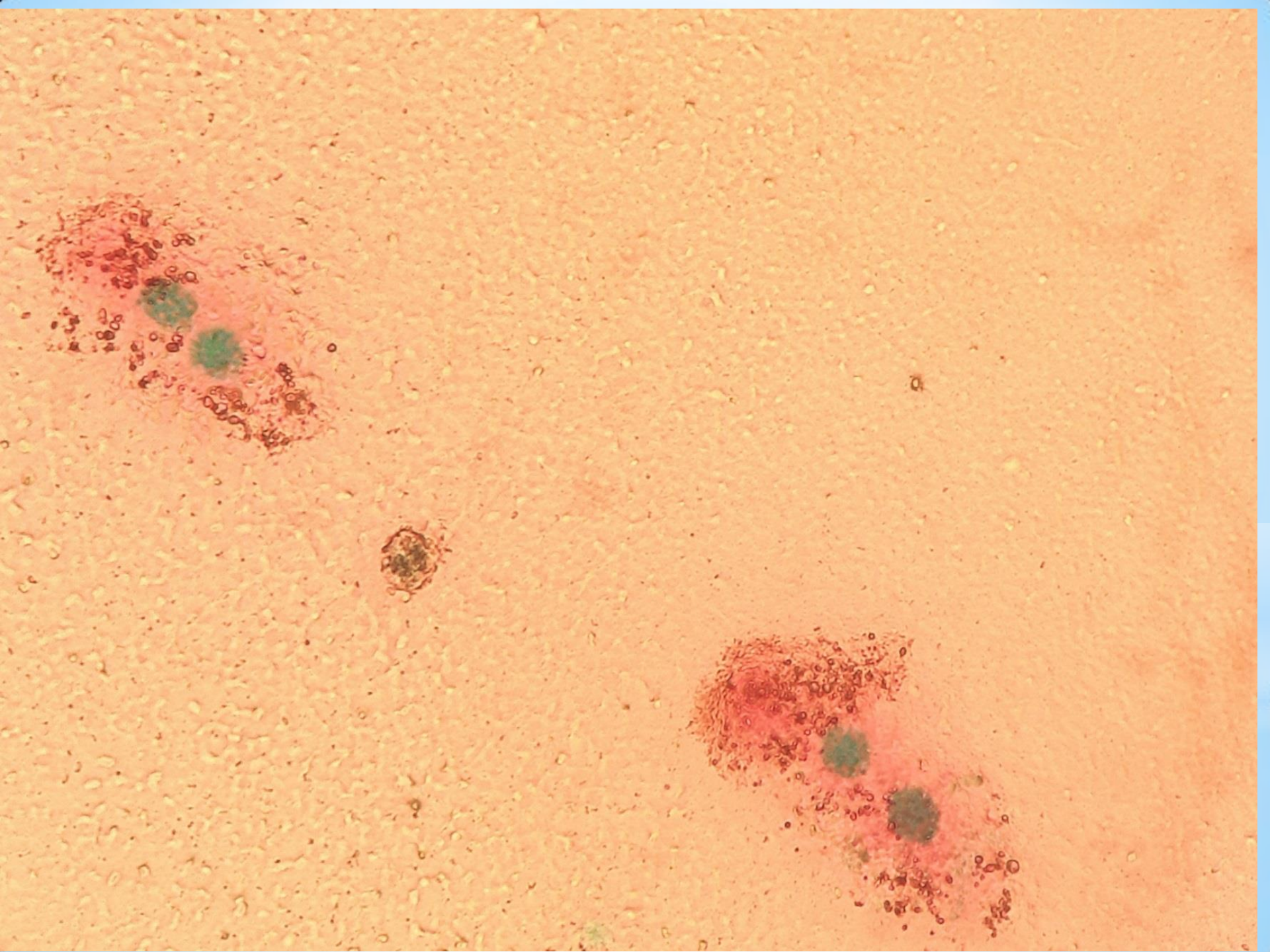


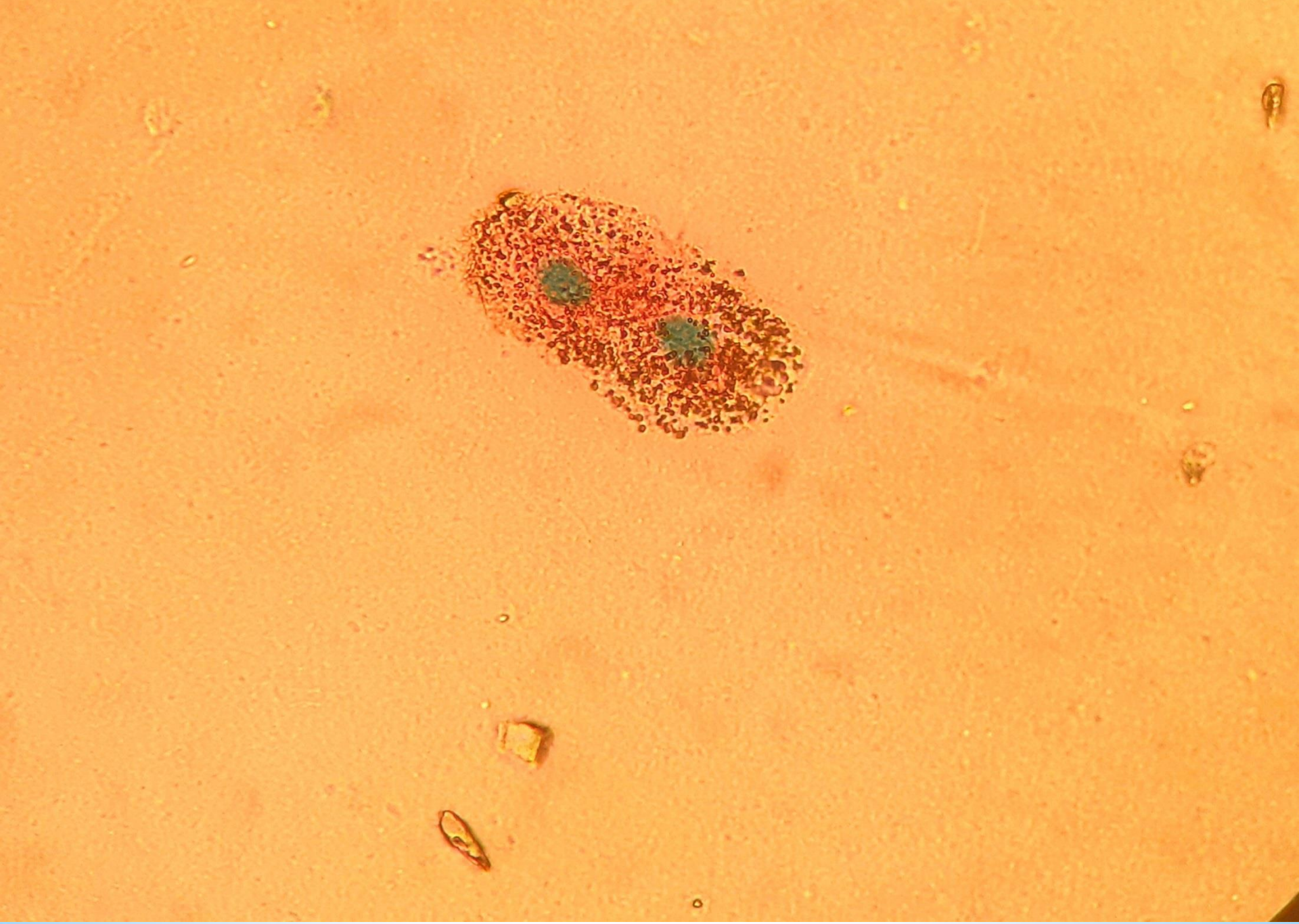




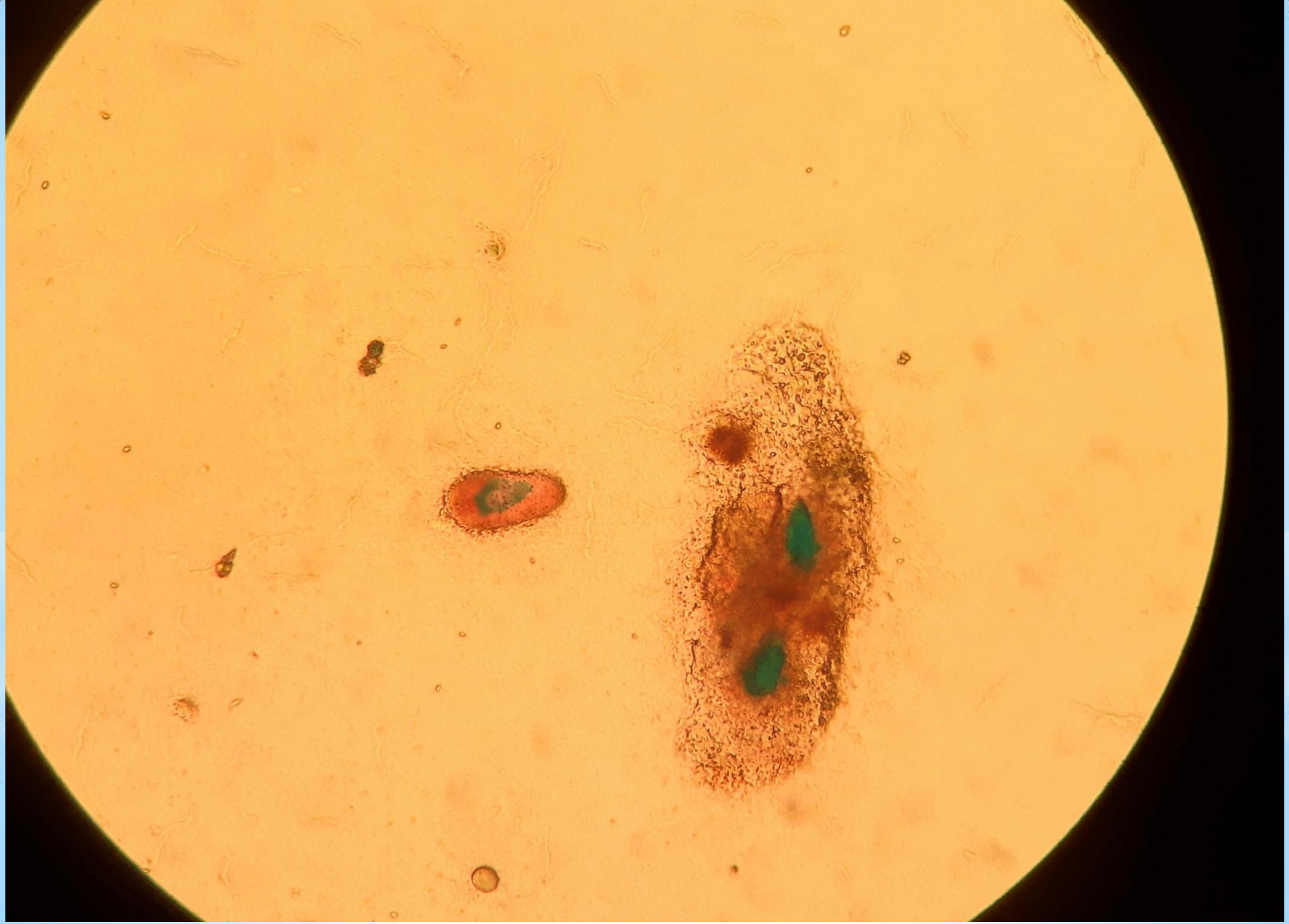
ازمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر



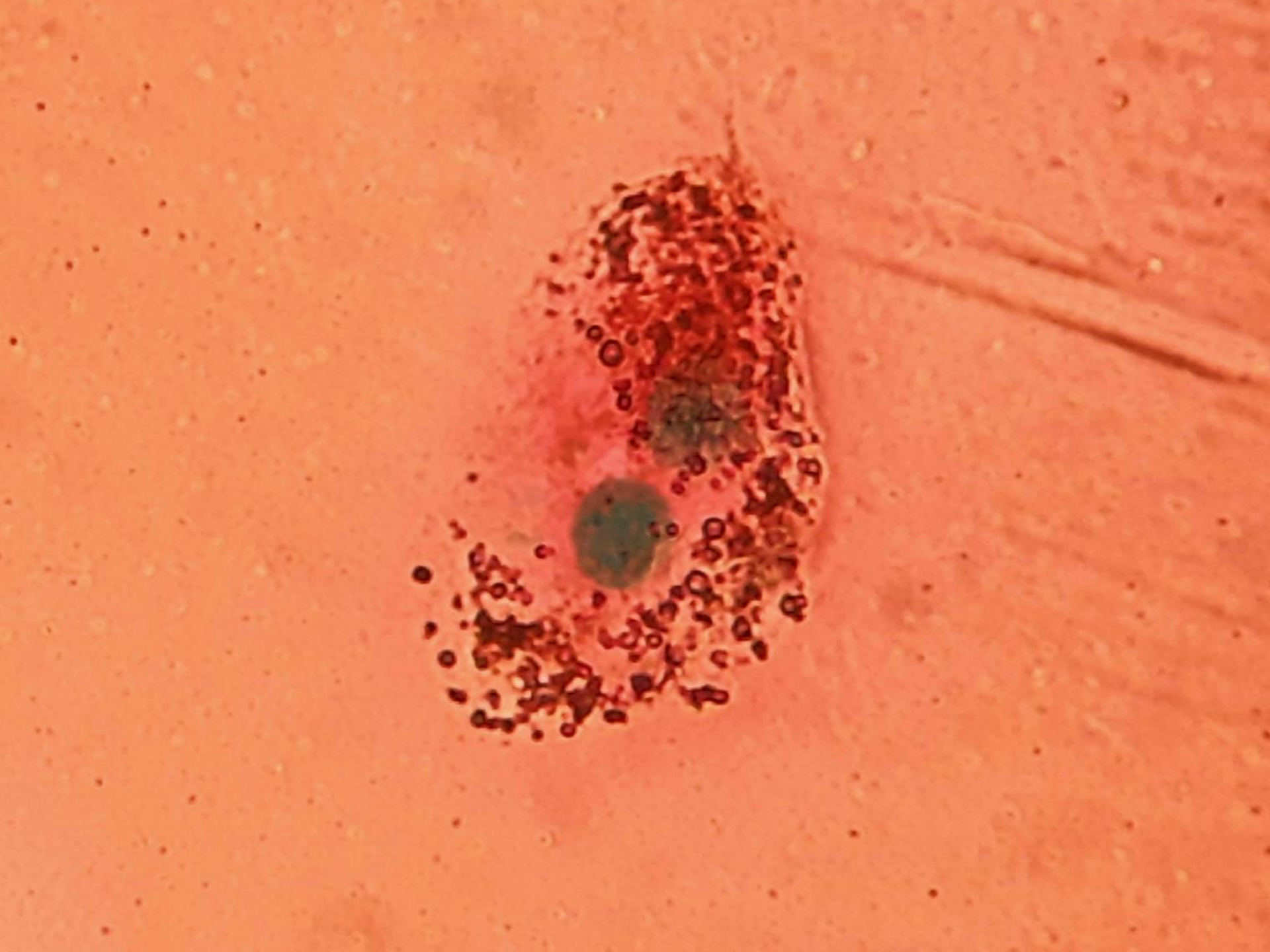


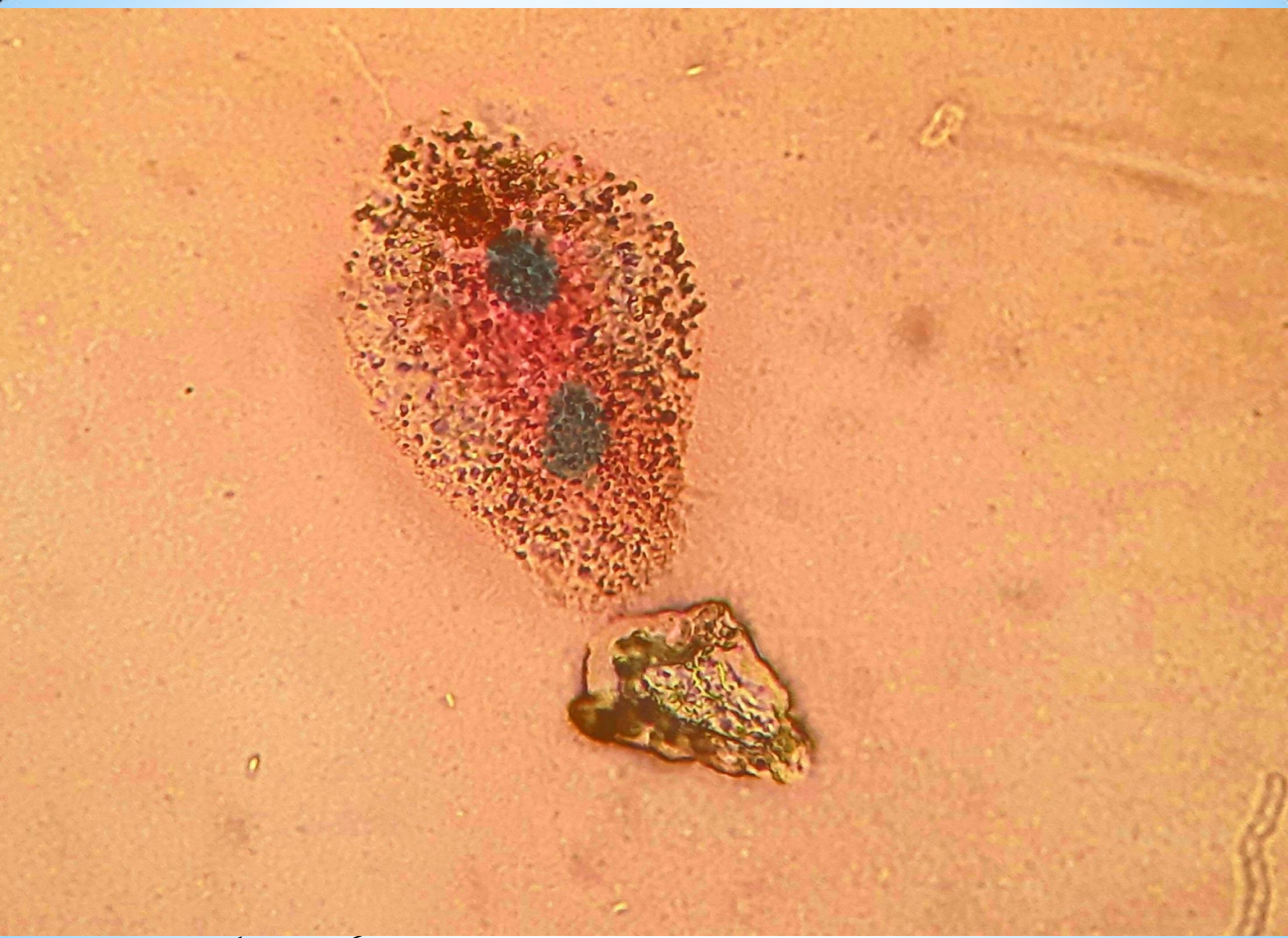


ازمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر



ازمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر





ازمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر

ازمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر