University of Isfahan
Biology Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
and Microbiology
Farzaneh Forouharfar

عنوان:

- ✓شناخت مفهوم رنگ آمیزی زیستی(vital staining) و غیر زیستی(Non vital staining)

اهداف

- ✓ مشاهده و بررسی واکوئل غذایی(Food vacuole)
- ✓ مشاهده و بررسی میتوکندری(mitochondria)
- ✓ مشاهده و بررسی اندامک ها ی حرکتی مژه (cillia)و تاژه(flagella)
- ✓ مشاهده و بررسی هسته(nucleus)
- ✓ بررسی توانایی زیستی غشاء پلاسمایی سلول زنده(viability)
- ✓ مشاهده سیکلوسیس (cyclosis)یا جریان سیتوپلاسمی

مقدمه

رنگ‌آمیزی زیستی

در این نوع رنگ‌آمیزی ضمن حفظ حیات نمونه مورد نظر، اجزاء مورد مطالعه به صورت اختصاصی رنگ می‌شوند. بدیهی است که در این تکنیک رنگ امیزی،رنگ‌های حیاتی بایستی با غلظت بسیار پایین و شرایط خاصی از نظر محلول سازنده، اسیدیته و مولاریته تهیه شوند.

رنگ‌آمیزی غیرزیستی

در رنگ‌آمیزی غیرزیستی حیات نمونه از دست می‌رود. اما اجزاء مورد مطالعه اختصاصاً رنگ می‌گیرند و محلول سازنده یا نوع رنگ برای سلول سمی و کشنده می‌باشد.

عوامل موثر بر رنگ آمیزی

دقیق بودن غلظت ،pHرنگ،مولاریته

نوع محلول مورد استفاده جهت ساخت رنگ(اسیدی،الکلی،آبی،سرم فیزیولوژیکی و..)

- ✓ مدت زمان رنگ آمیزی.
- ✓ میزان رنگ مورد استفاده در طول رنگ آمیزی.
- ✓ در رنگ آمیزی زیستی با توجه به رعایت شرایط رنگ آمیزی،نمونه میکروسکوپی زنده می ماند و جزء یا قسمت مورد نظر به صورت اختصاصی(specificly)رنگ می شود.

در این آزمایش برخی از اندامک های درون سلولی در تک یاخته ها با استفاده از رنگ های حیاتی و غیر حیاتی به صورت اختصاصی رنگ می شوند.

پارامسی ها،پروتوزویر های تک سلولی اند و در شاخه مژکداران وسلسله پروتییستاطبقه بندی می شوند.آنها در آب های آرام و آبگیر های زاید زندگی میکنند و بخش اصلی زنجیرۀ غذایی را تشکیل می دهند.آنها از پسماندۀ ی جلبک ها و سایر موجودات ریزتغذیه می کنند وخودشان توسط موجودات کوچکدیگر خورده می شوند.

تمام اعضای شاخه مژکداران به وسیله برآمدگی های ریز مو مانندی که مژک (پنیکول) نامیده می شودحرکت می کنند.

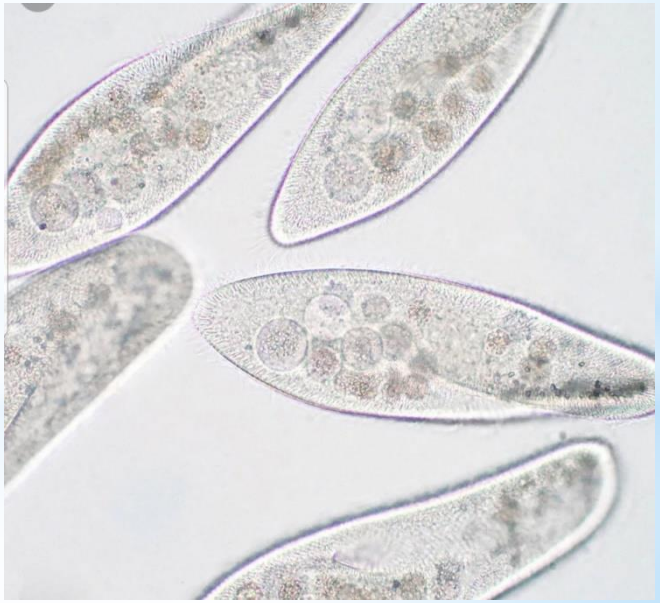
حرکت پارامسی اینگونه است که اگر ضربان به سمت عقب باشد، حرکت جانور به سمت جلو استو باالعکس. اگر ضربان به صورت مایل باشد ، جانور به دور خود می چرخد.در جالی که می چرخد به جلو و عقب حرکت می کند.

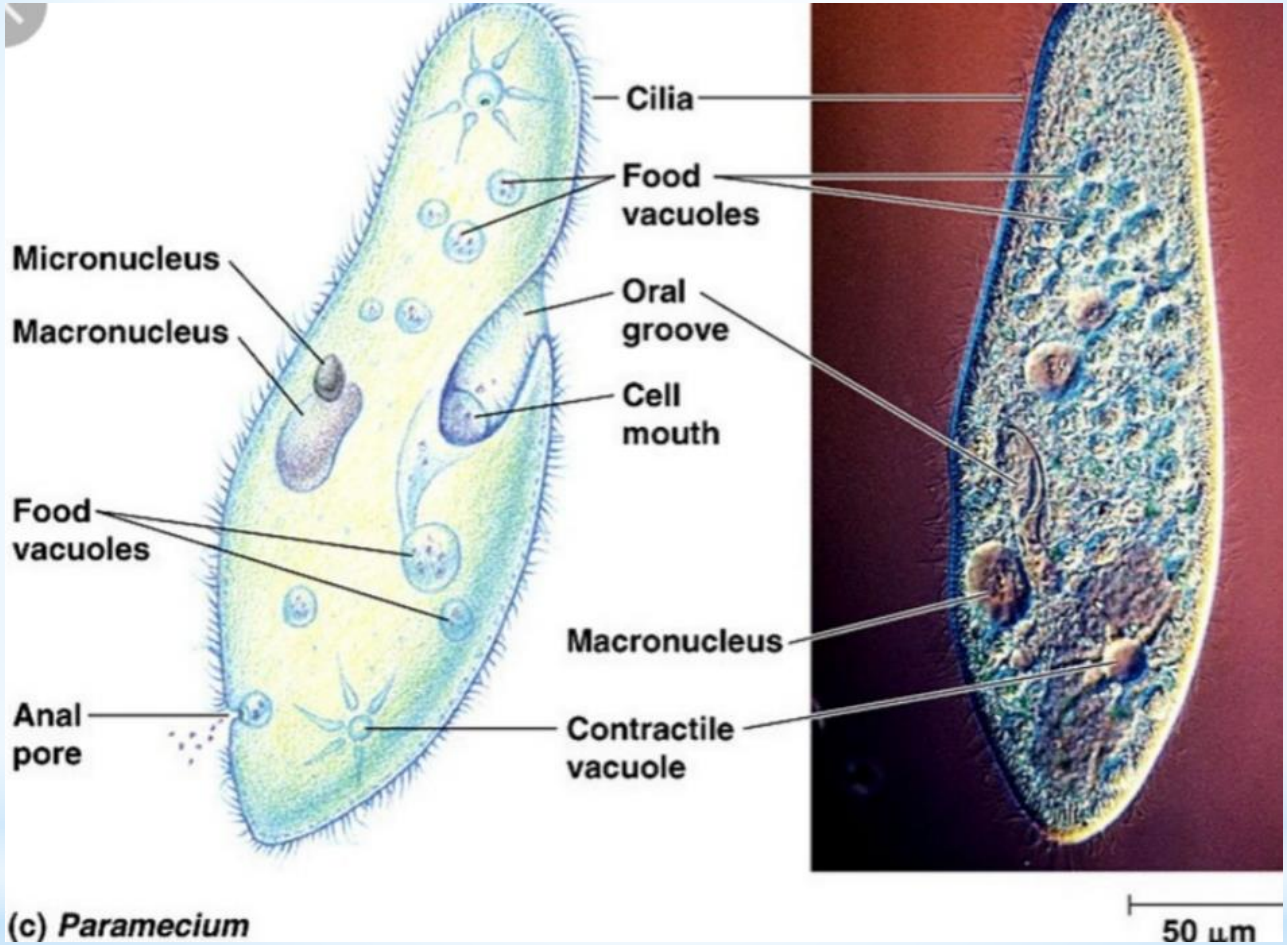
گارامسی قادر نیست شکل بدنش را مثل آمییب ها تغییر دهد.زیرا که غشای پیوسته ضخیم و سختی به نام پلیکل دارند.پلیکل غشای سلولی را فرا میگیرد.

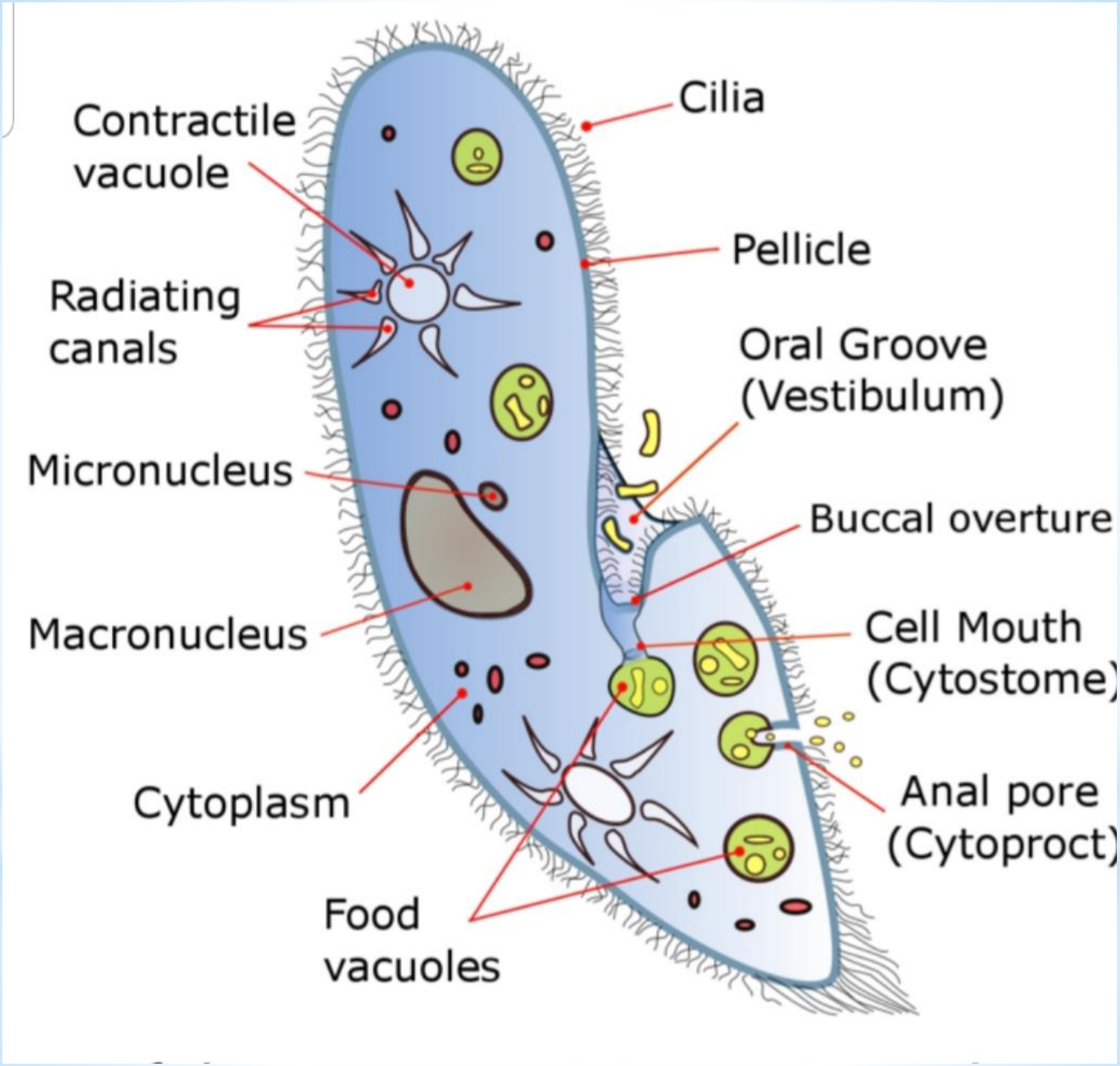
پارامسی دو نوع هسته دارد. هسته بزرگ(ماکرونوکلیوس) میباشد که فعالیت هایی مثل تنفس،سنتز پروتیین و هضم غذا را کنترل میکند.هسته کوچک (میکرو نوکلیوس)تنها در تولیدمثل بکار می رود.

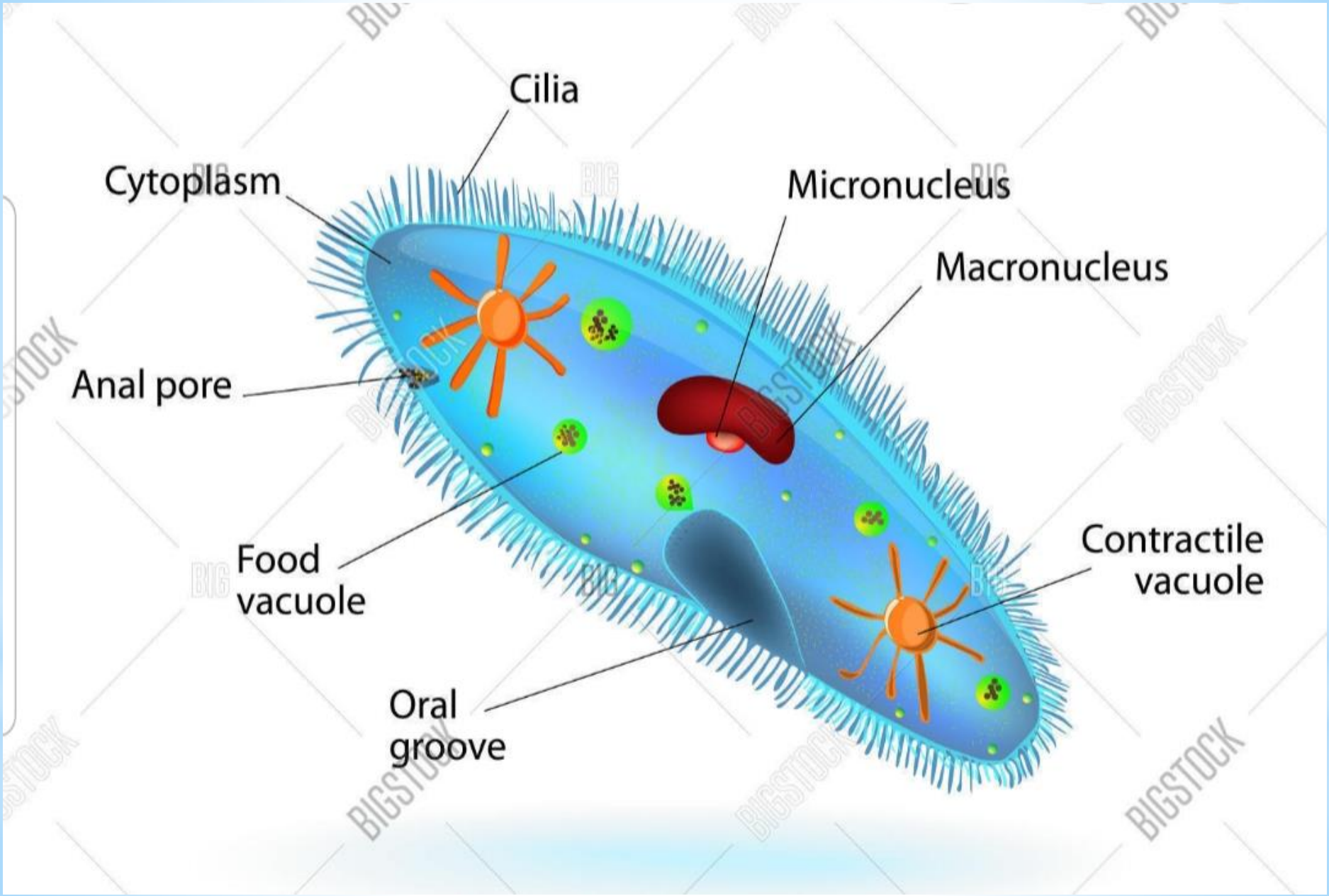
تولیدمثل در پارامسی با تبادل DNA بین هسته های کوچک همراه است.این عمل به اینگونه است که دو پارامسی بصورت طولی بهم می چسبندو از طریق دهان سلولی به هم ملحق می شوند.

به این تولیدمثل گشنگیری می گویند که نوعی تولیدمثل جنسی در میکروارگانیسم هاست.




Cilia
Food vacuoles
Micronucleus
Macronucleus
Oral groove
Cell mouth
Food vacuoles
Macronucleus
Anal pore
Contractile vacuole
(c) Paramecium
50 µm


Contractile vacuole
Cilia
Pellicle
Radiating canals
Oral Groove (Vestibulum)
Micronucleus
Buccal overture
Macronucleus
Cell Mouth (Cytostome)
Anal pore (Cytoproct)
Cytoplasm
Food vacuoles


Cilia
Cytoplasm
Micronucleus
Macronucleus
Anal pore
Food vacuole
Contractile vacuole
Oral groove

واکوئل

واکوئل‌ها اندامک‌هایی هستند که یا انقباضی اند و مسئول تنظیم فشار اسمزی داخل سلول هستند و یا غذایی‌اند که محل تجمع ذرات غذایی می‌باشند. واکوئل‌های انقباضی رنگ نمی‌پذیرند و به حالت گرد در دو طرف پیکر تک یاخته‌ای مثل پارامسی واقع شده‌اند. واکوئل‌های غذایی متعدد بوده و به تدریج ذرات غذایی محیط را در خود انباشته می‌کنند و دریافت و جذب ذارت غذایی را به عهده دارند. جهت مشاهده این اندامک‌ها از رنگ حیاتی با غلظت پایین قرمز خنثی یا neutral red استفاده می‌شود.

طرز ساخت رنگ حیاتی قرمز خنثی

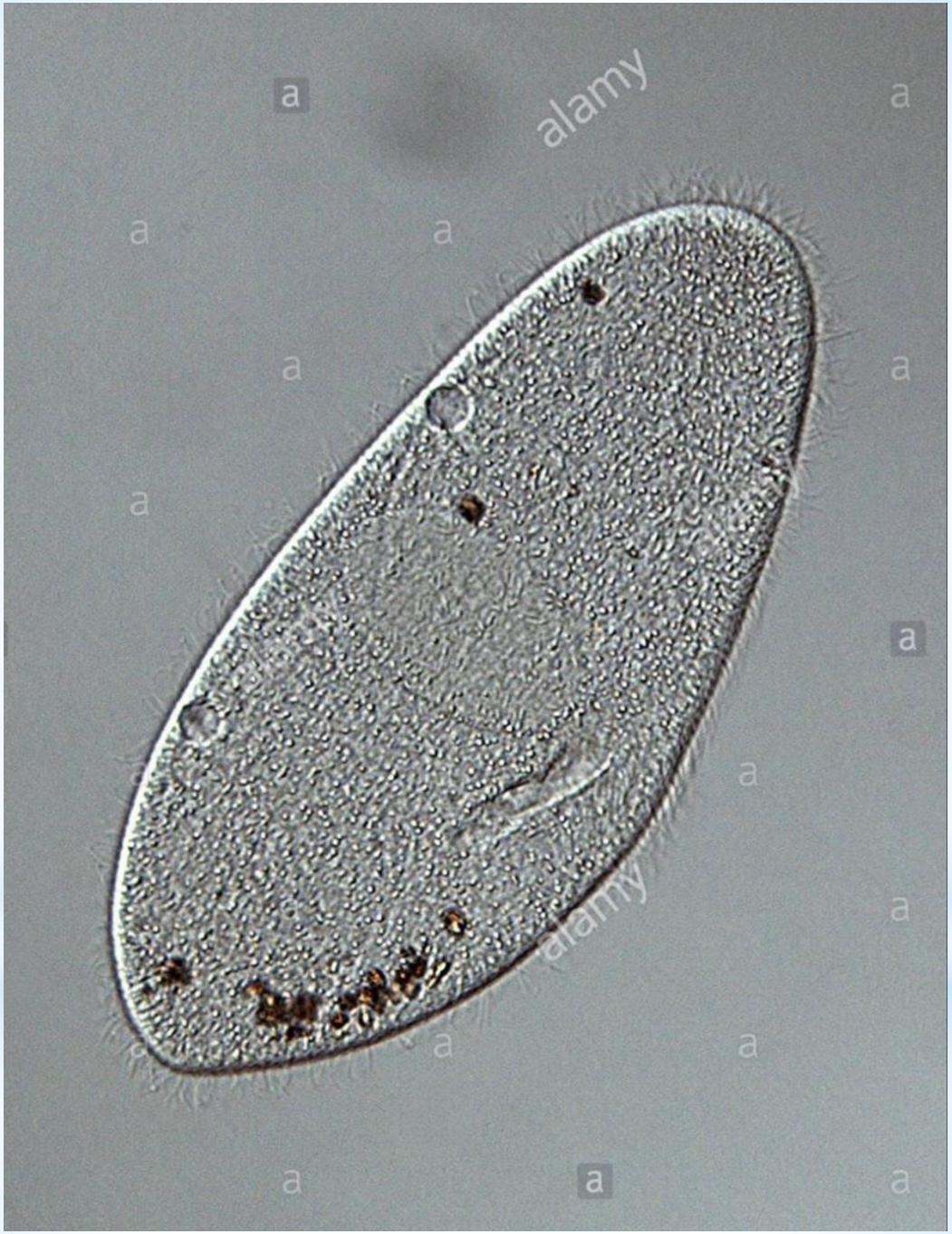
- ✓ ۰.۱-۰.۰۰۱گرم رنگ قرمز خنثی در۱۰۰ سی سی آب یا الکل مطلق حل شود .
- ✓ به این ترتیب غلظت بسیار پایین ۰.۱-۰.۰۰۱درصد در آب یا الکل مطلق(Alcoholic or Aquatic) ساخته می شود.
- ✓ رنگ پس از تهیه دارای ذرات کلوئیدی و غیر قابل حل است.

میتوکندری

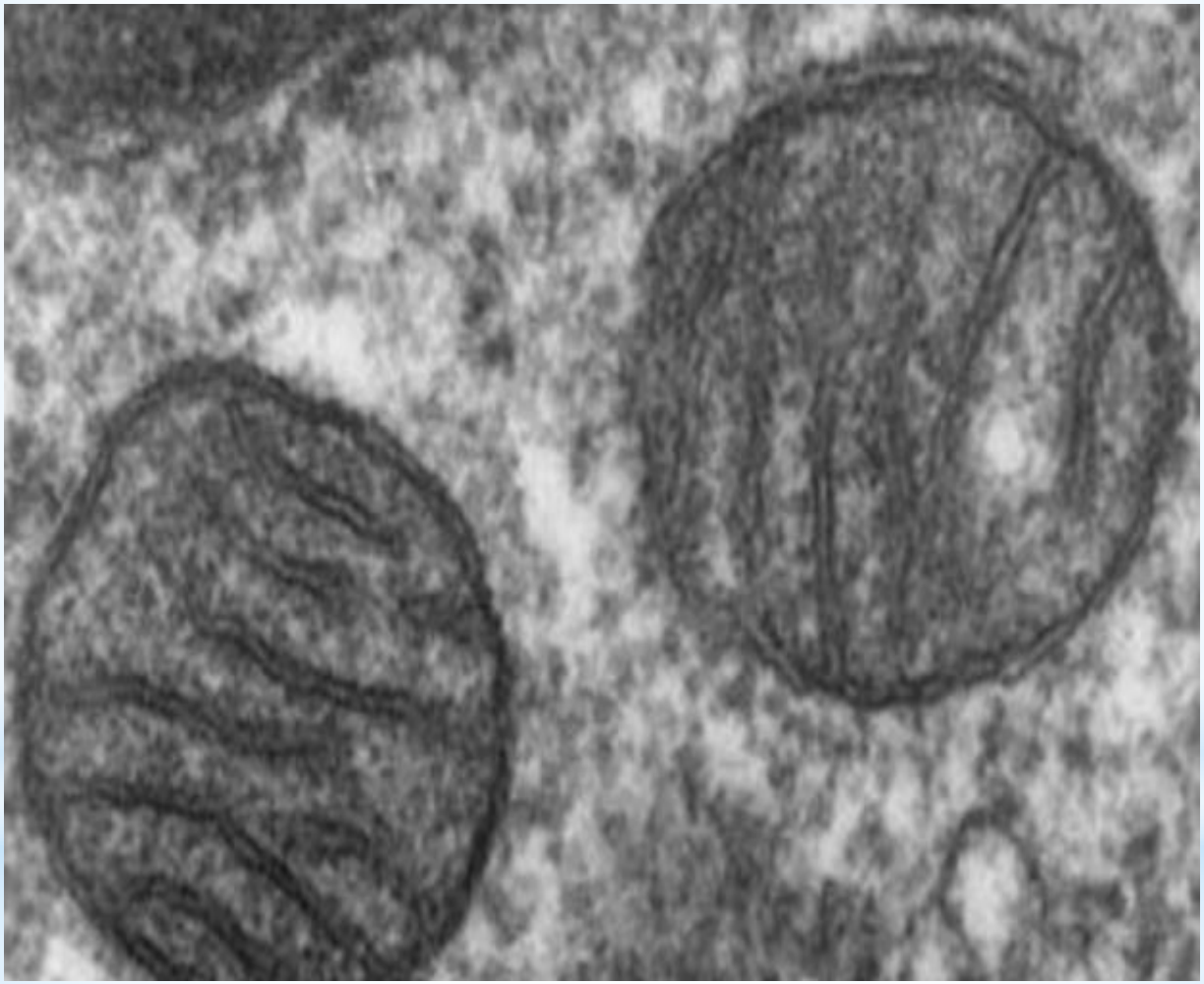
میتوکندری ها ۲۵ درصد حجم سلول‌های یوکاریوت‌را اشغال کرده و جایگاه تنفس سلول‌اند. این اندامکها با میکروسکوپ نوری با استفاده از تکنیک‌های رنگ‌آمیزی حیاتی قابل مشاهده‌اند،اما جزئیات ساختاری و فراساختاری آن‌ها فقط با میکروسکوپ الکترونی گذاره قابل مشاهده می‌باشد.ساختار آن‌ها شبیه به باکتری‌های میله‌ای شکل بوده و قطری بین ۱-۰/۵ میکرون دارند و طول آن‌ها حدود ۲-۱ میکرون می‌باشد. پس از هسته، واکوئل و کلروپلاست، بزرگترین اندامک‌های درون‌سلولی هستند. تقسیم آن‌ها به صورت دوتایی(Binary fission) بوده که در طول چرخه‌ی سلولی اندازه‌ی آن‌ها دو برابر و سپس تقسیم می‌شوند. مطالعه میتوکندری به دلیل شفافیت زیاد و ضریب شکست کمی که دارد، توسط میکروسکوپ نوری معمولی در سلول‌های زنده قدری مشکل است و با میکروسکوپ زمینه تاریک(Dark field) و زمینه متضاد (phase contrast بهتر مشاهده می‌شود.

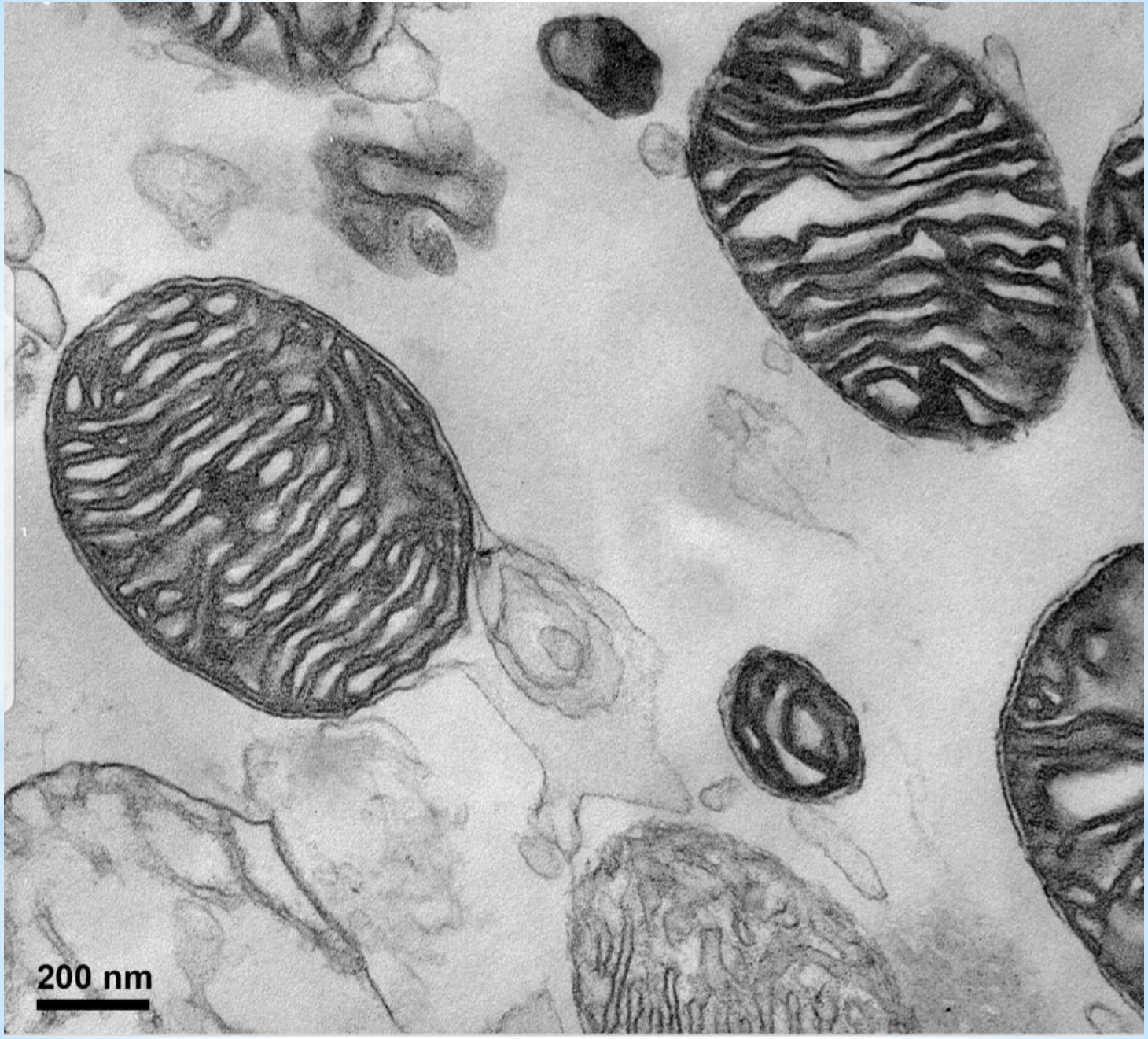
در میکروسکوپ‌های نوری جهت بررسی آن‌ها به حالت زنده از محلول رنگی سبز ژانوس یا Janus green B استفاده می‌کنیم که این رنگ ساختار میتوکندری را به رنگ سبز-آبی کم رنگ در می‌آورد.از آنجایی که در ساختار غشای داخلی میتوکندری آنزیم سیتوکروم‌اکسیداز موجود در چرخه تنفسی سلولی با این رنگ واکنش می‌دهد، رنگ سبز ژانوس اکسید شده و رنگ سبز-آبی کم‌رنگ مشاهده می‌شود. در حالیکه این رنگ در سیتوپلاسم سلول به حالت احیا و بی‌رنگ می‌باشد.

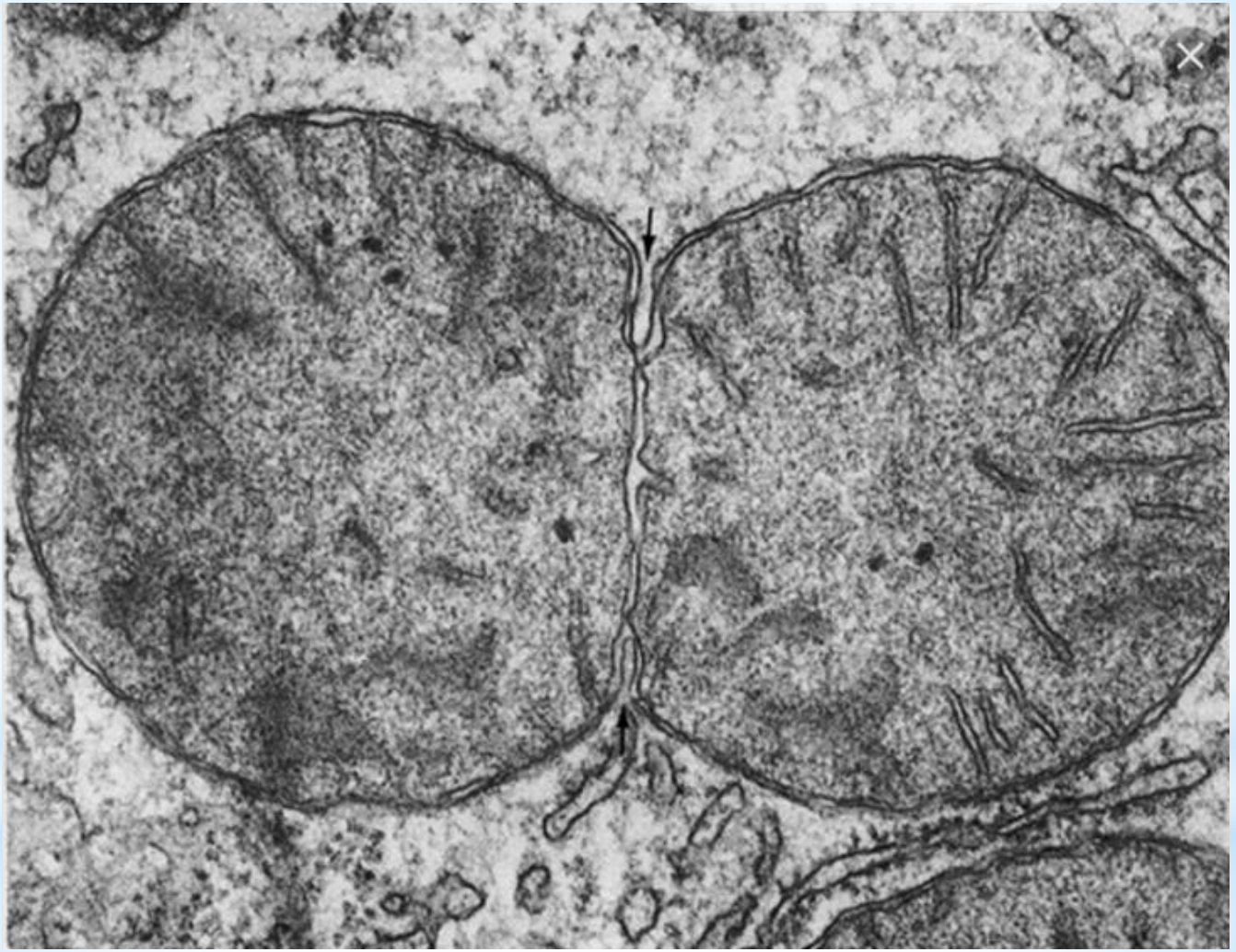
میتوکندری

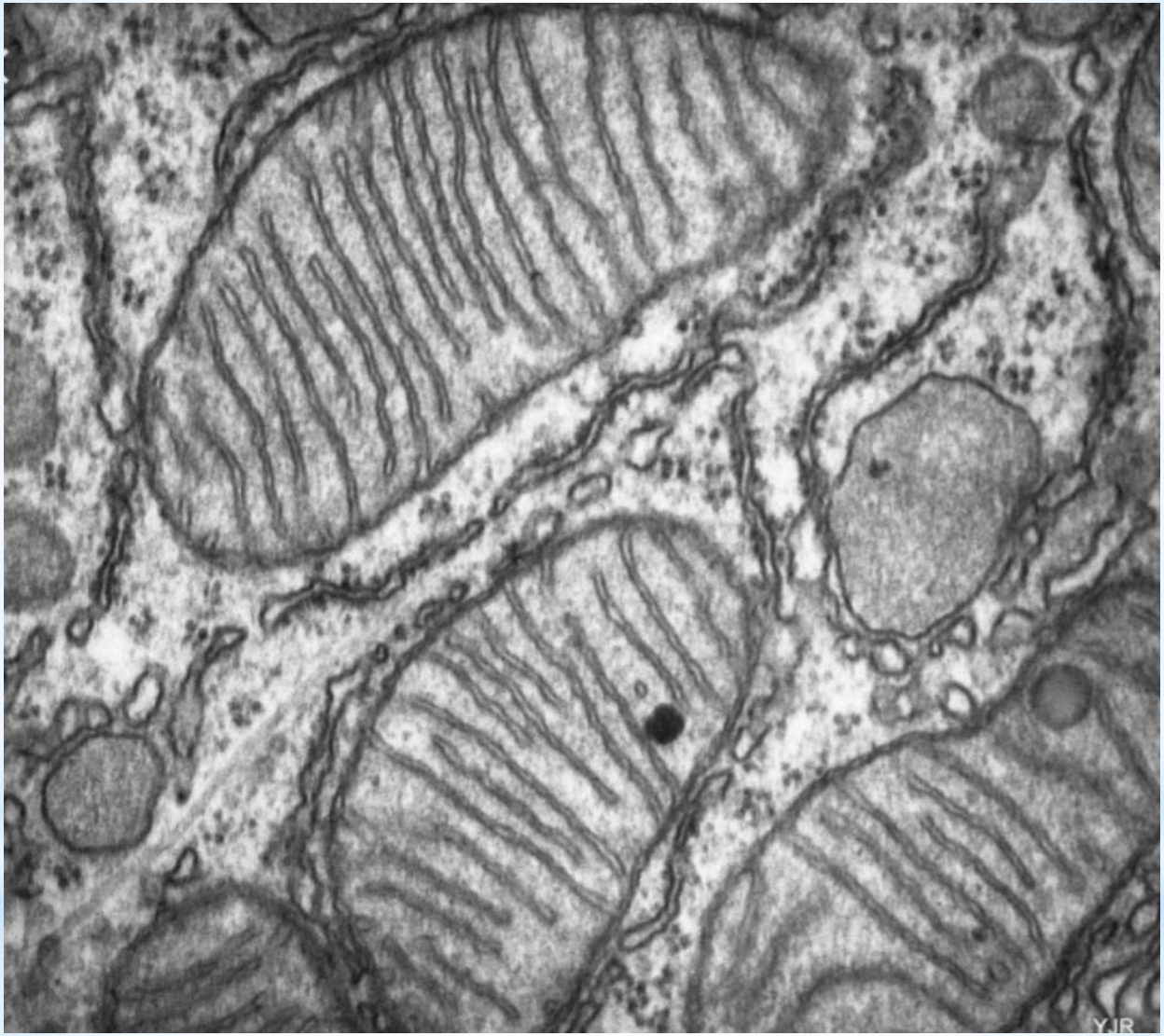


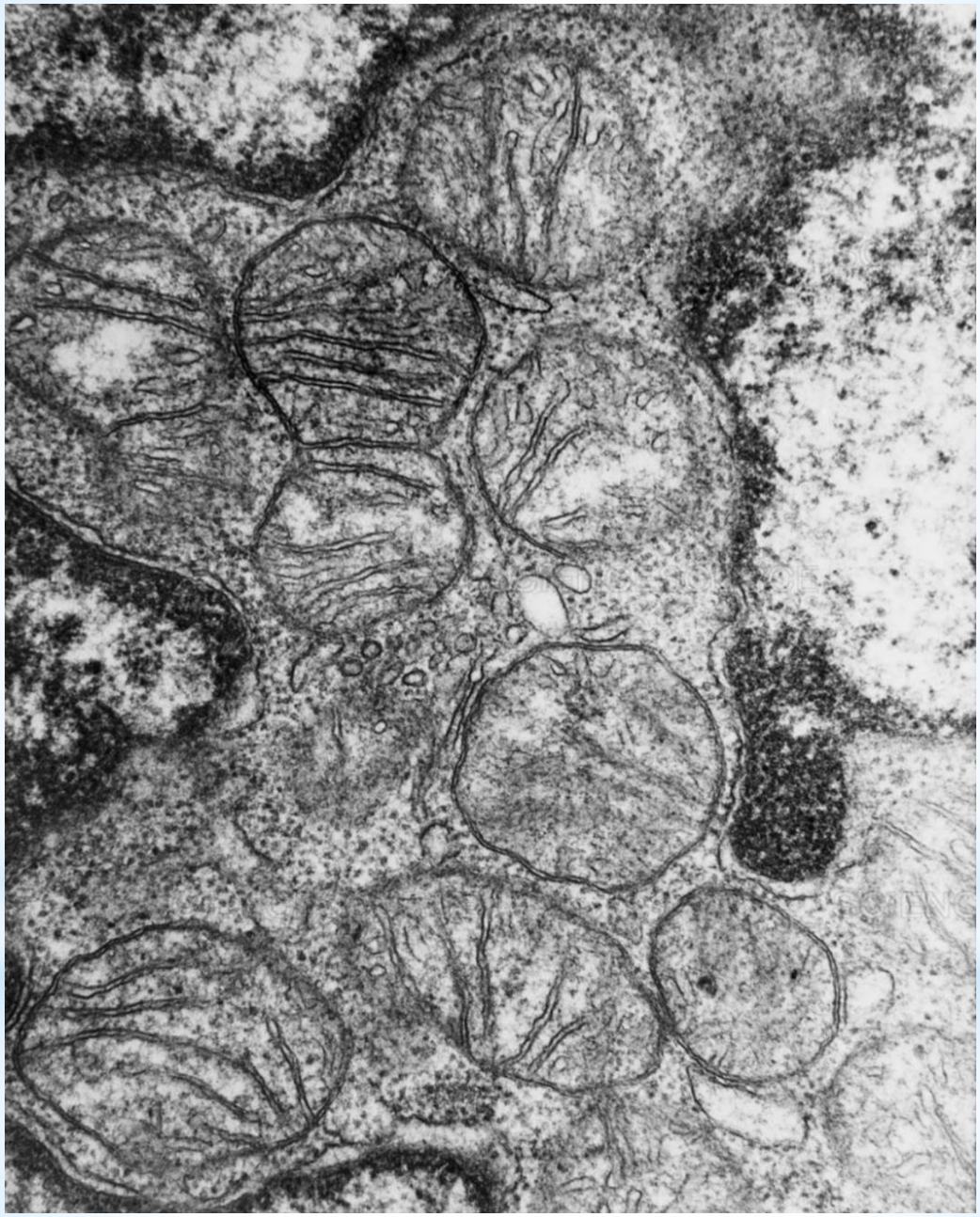
میتوکندری



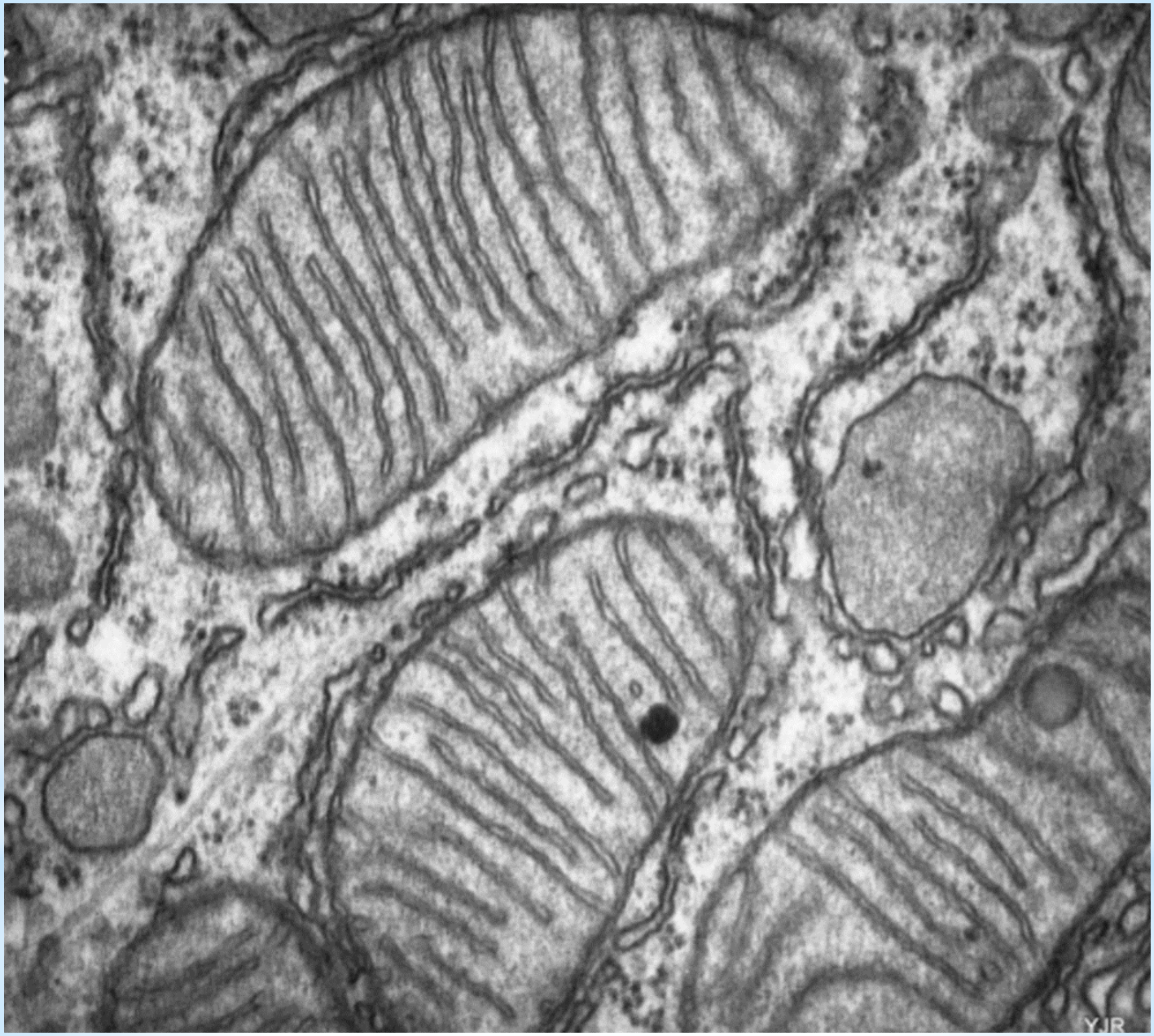

200 nm

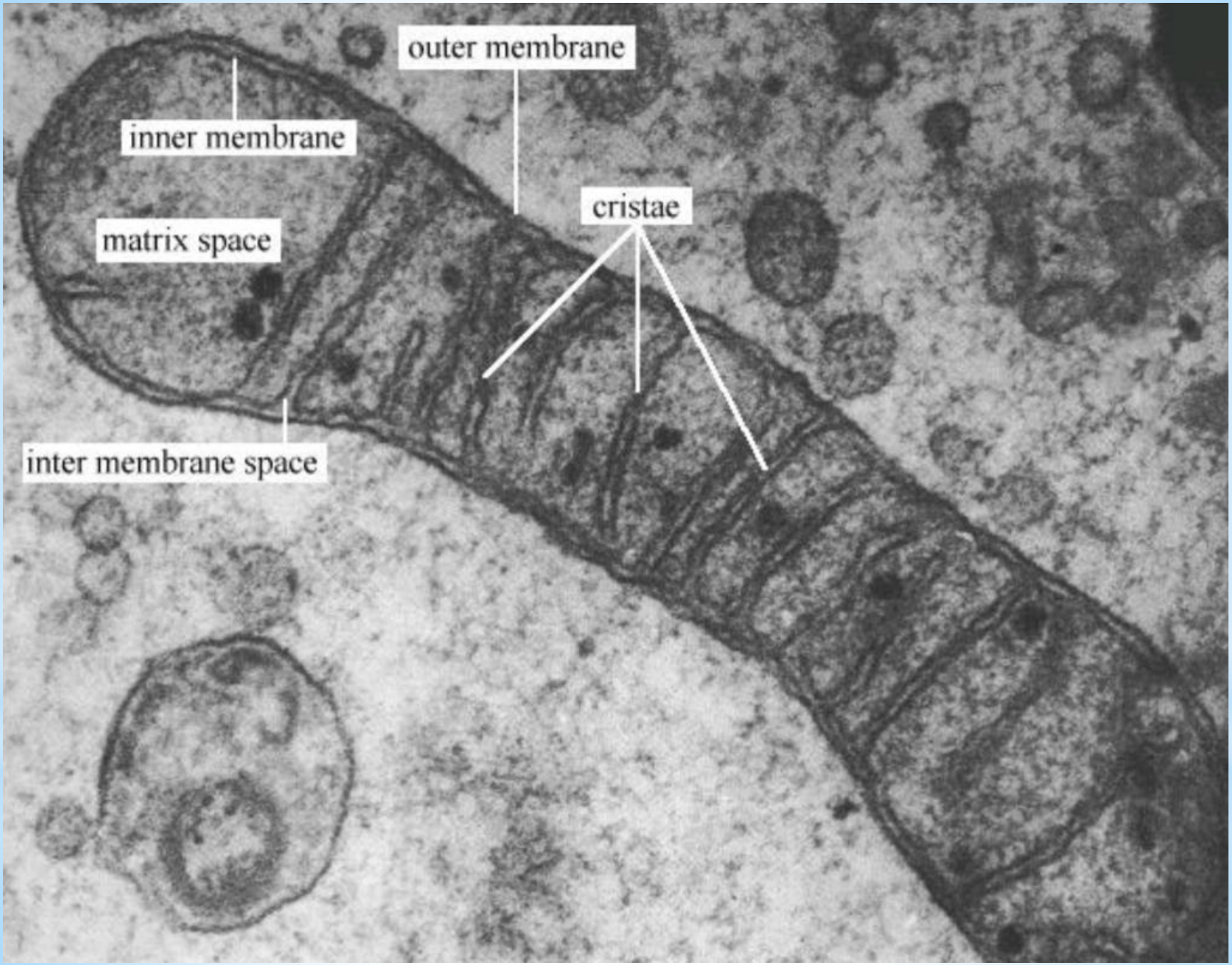


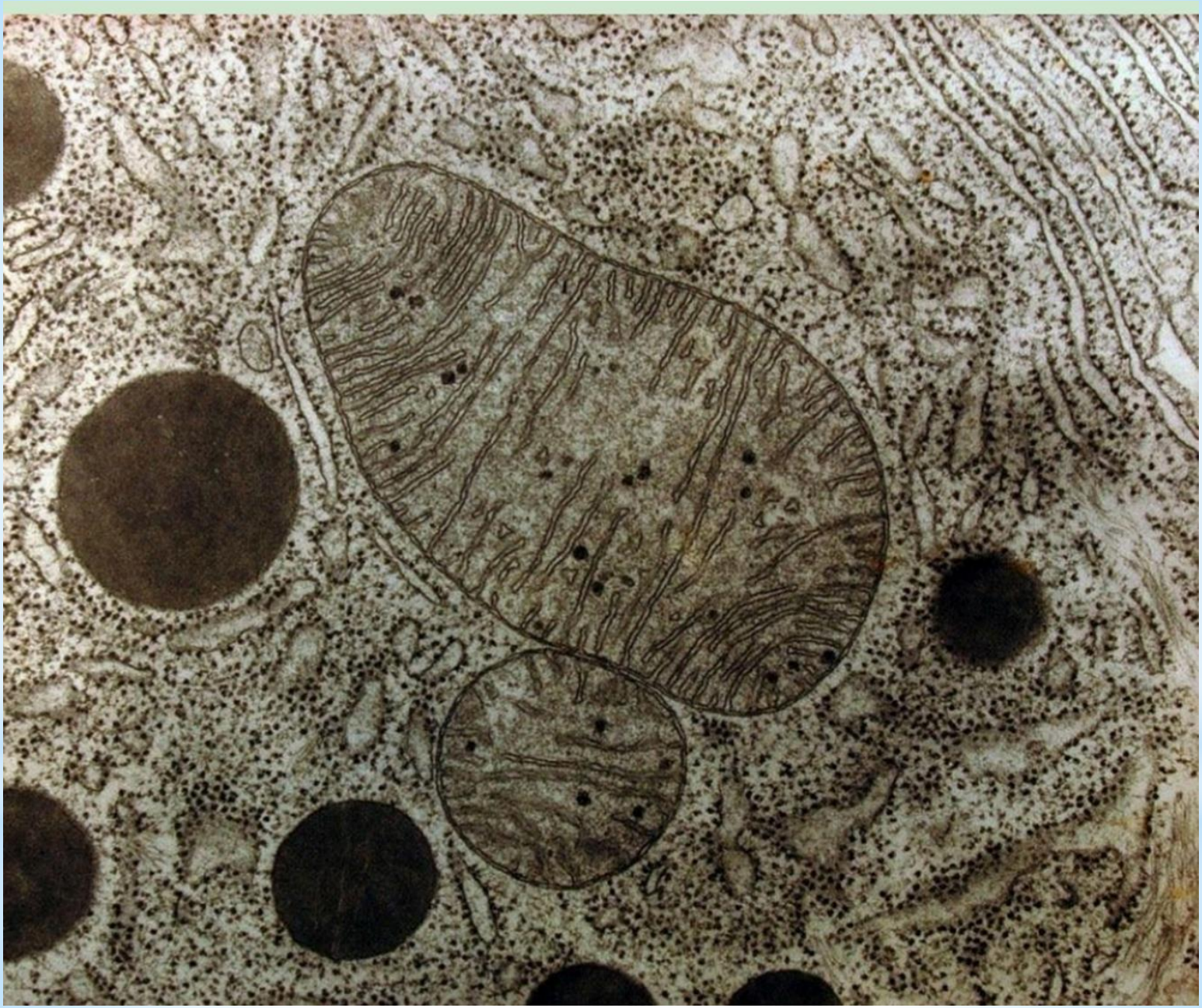


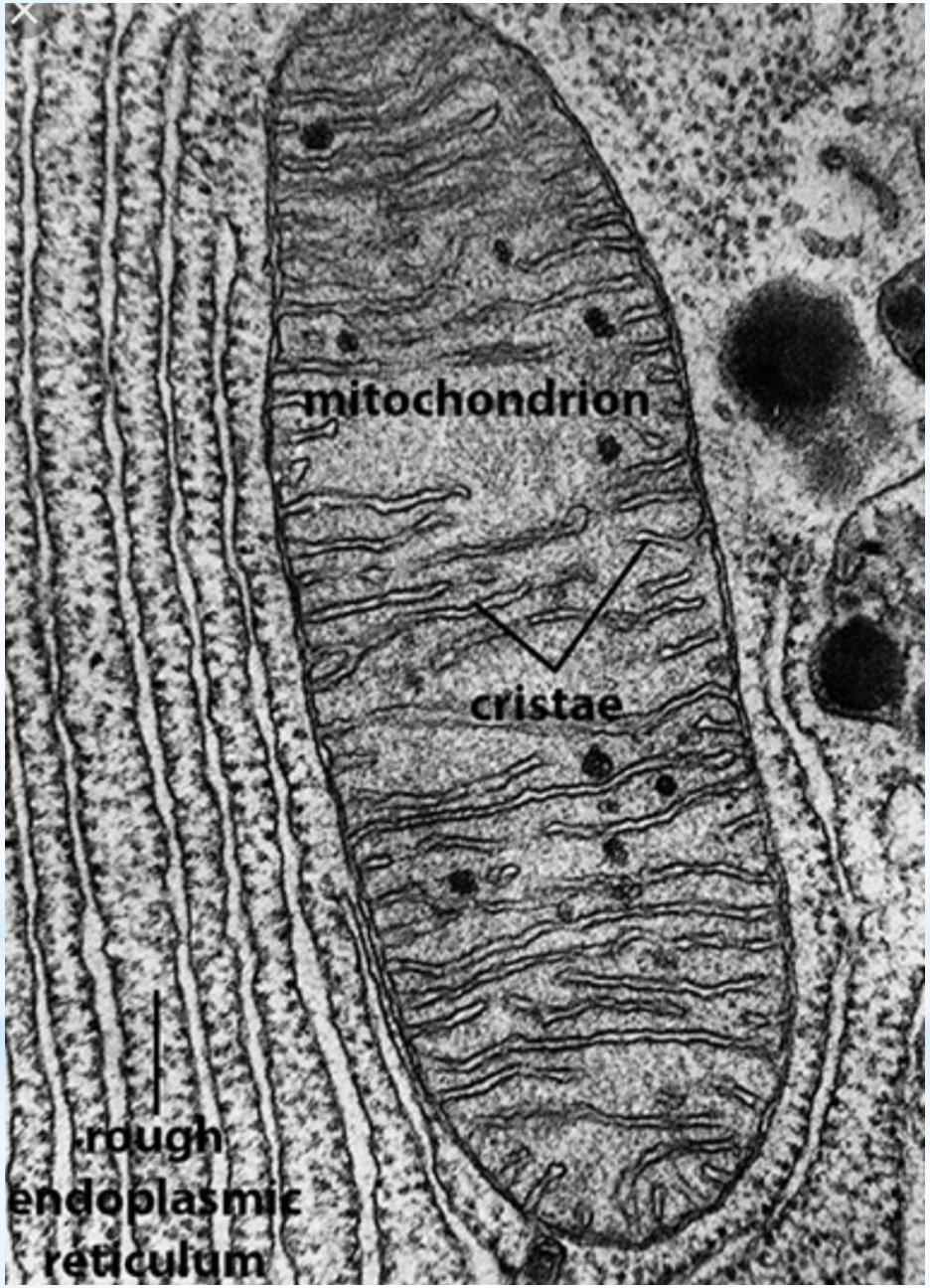


آزمایشگاه سلولی و مولکولی- فرزانه فروهرفر




outer membrane
inner membrane
cristae
matrix space
inter membrane space




mitochondrion
cristae
rough
endoplasmic
reticulum

طرز ساخت رنگ حیاتی سبز ژانوس

- ✓ این رنگ باغلظت بسیار پایین۰.۰۰۴گرم در ۱۰۰ سی سی آب یا الکل مطلق به صورت ۰.۰۰۴درصد، ساخته می شود.

اندامک حرکتی

در تک یاخته ها زوائد دائمی حرکتی مژک ها(Cillia) و تاژک ها(flagella) می باشند که ساختاری کاملا مشابه دارند و از تعدادی میکروتوبول با نظمی خاص تشکیل یافته اند.تفاوت مژک ها و تاژک ها در طول و تعداد آن هاست.اگر طول کم و تعداد زیاد باشد مژک بوده و چنانچه طول زیاد و محدود باشند تاژک گفته می شوند.حرکت تاژک ها به صورت موجی و از رأس به طرف قاعده تاژک ویا برعکس می باشد.در حالی که حرکت مژک ها به صورت پارویی انجام می شود.

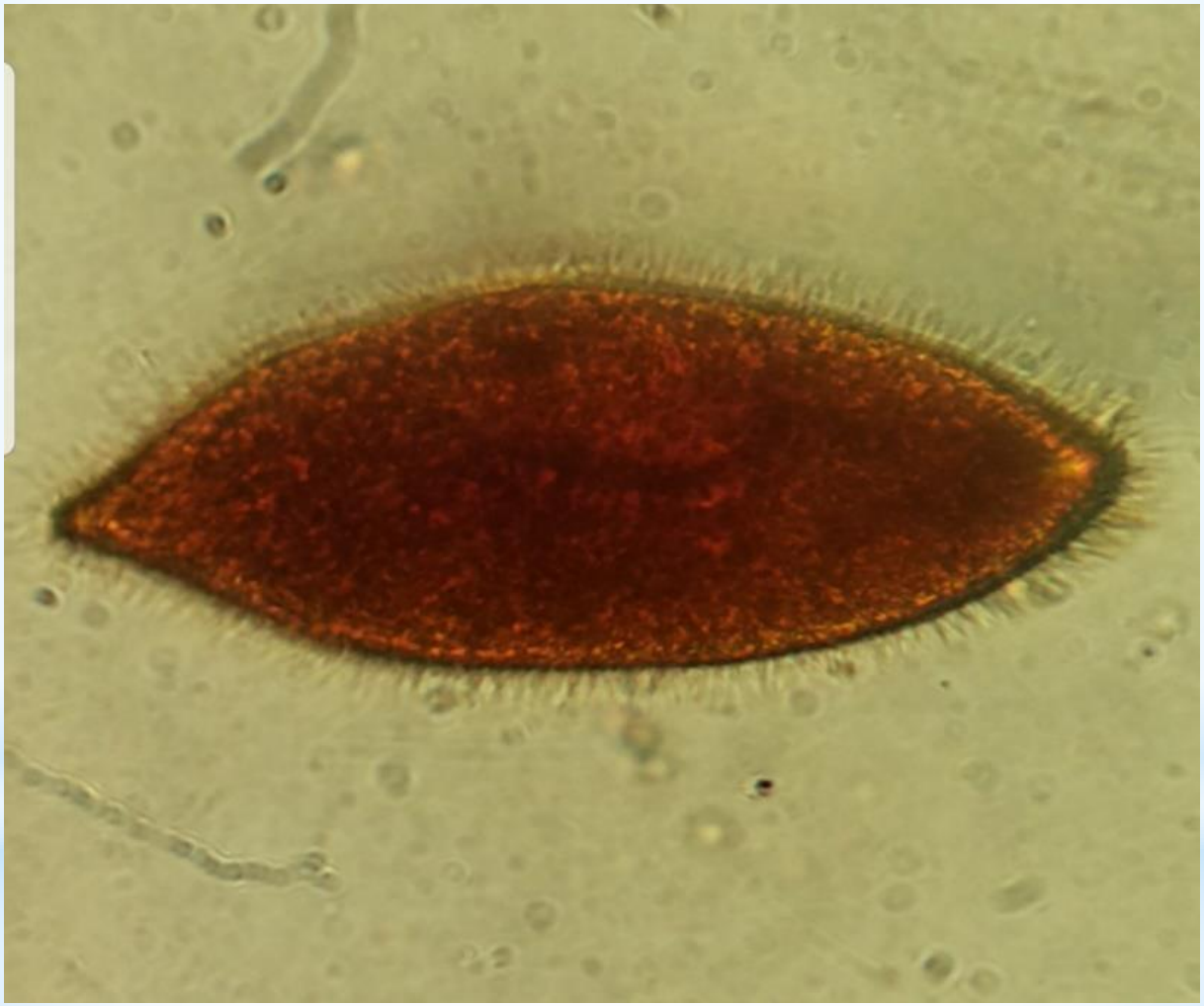
مشاهده اندامک حرکتی مژه به دلیل تراکم و تعداد بیشتر در سطح میکروسکوپ نوری بهتر امکان پذیر می باشد.

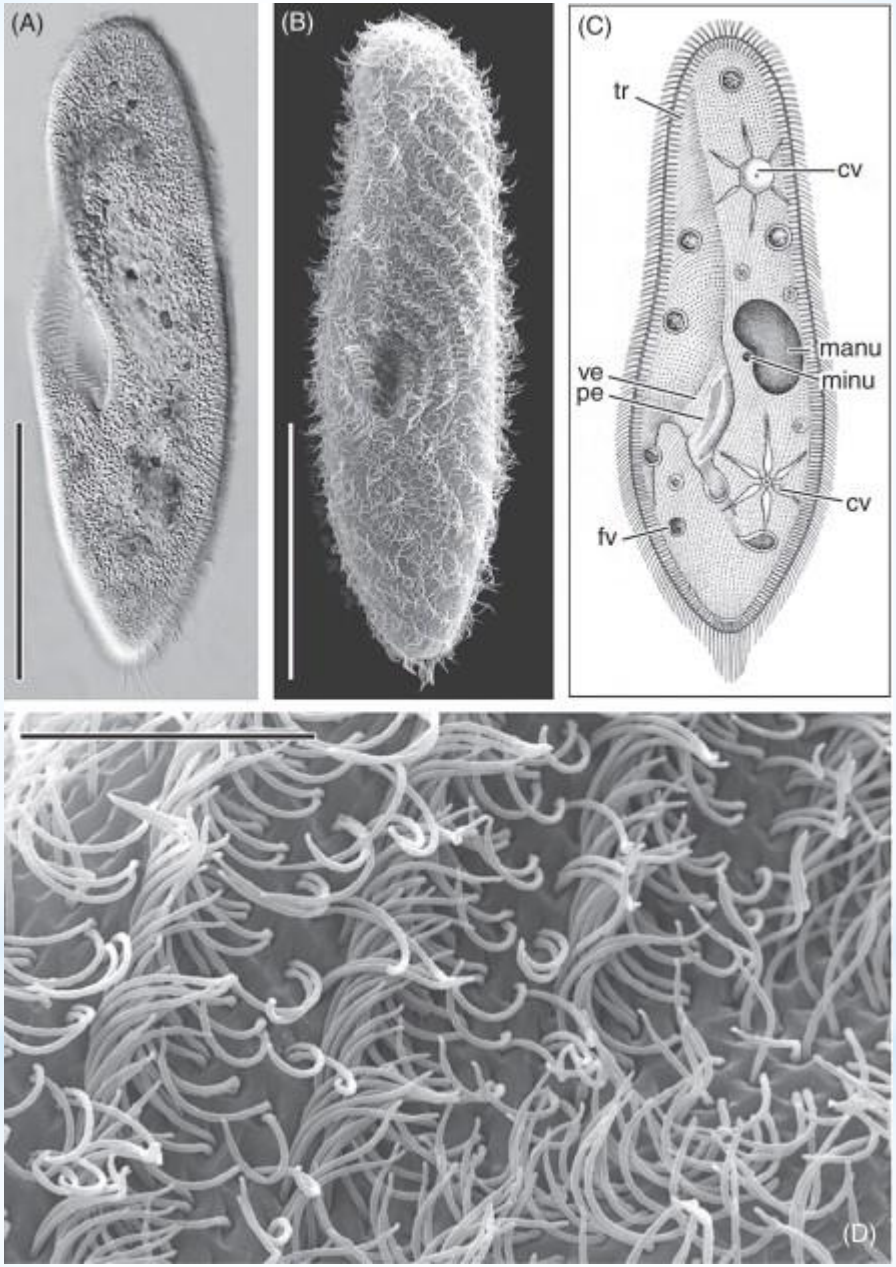
جهت مشاهده ساختار حرکتی مژه یا تاژک از رنگ غیر حیاتی لوگل lugol یا یدیدوره یا ید یدور پتاسیم (IKI)استفاده می‌شود. این رنگ در آب مقطر و با افزودن بلور ید و یدور پتاسیم تهیه می‌شود. .بلور ید به دلیل سمی بودن برای سلول های زنده در غلظت استفاده شده ،این رنگ آمیزی را غیر حیاتی می سازد.

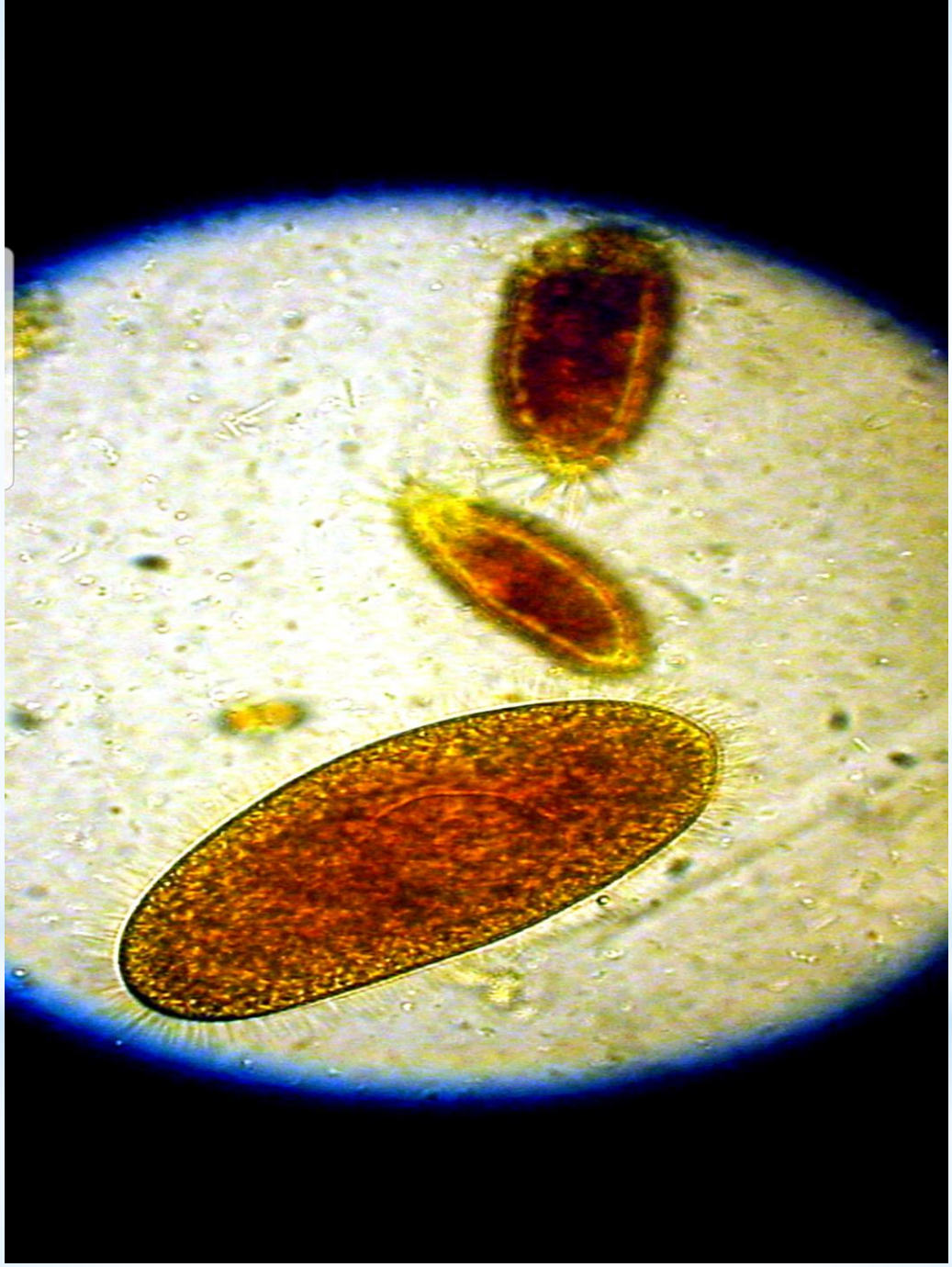
طرز ساخت رنگ غیر حیاتی لوگل

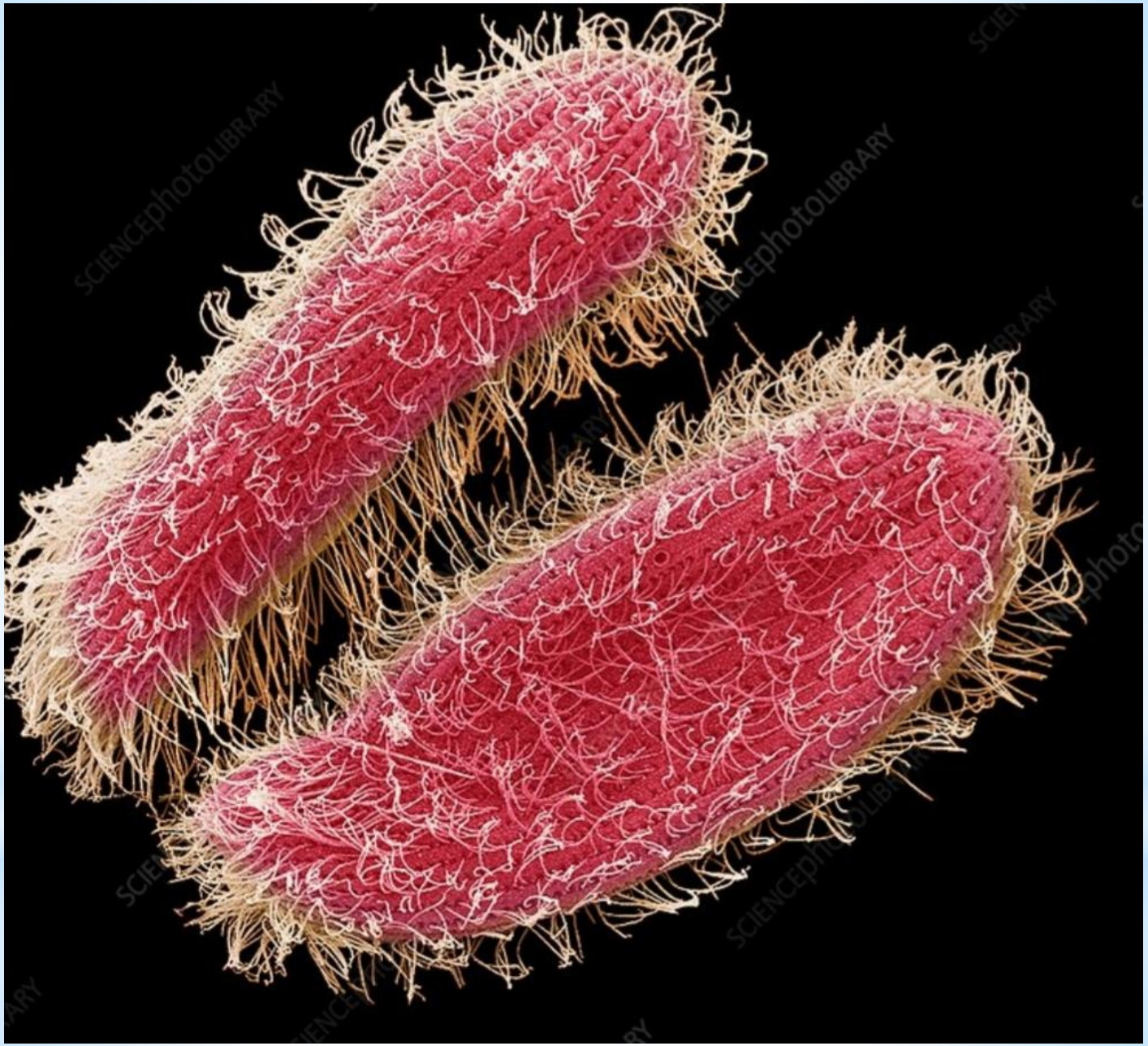
- ✓ این رنگ در۱۰۰ سی سی آب مقطر با افزودن بلور ید به میزان ۱ گرم به یدور پتاسیم به میزان ۲ گرم تهیه می شود و aquatic میباشد و اندامک های حرکتی را به رنگ زرد طلایی در می آورد.

مژک ها(Cillia)

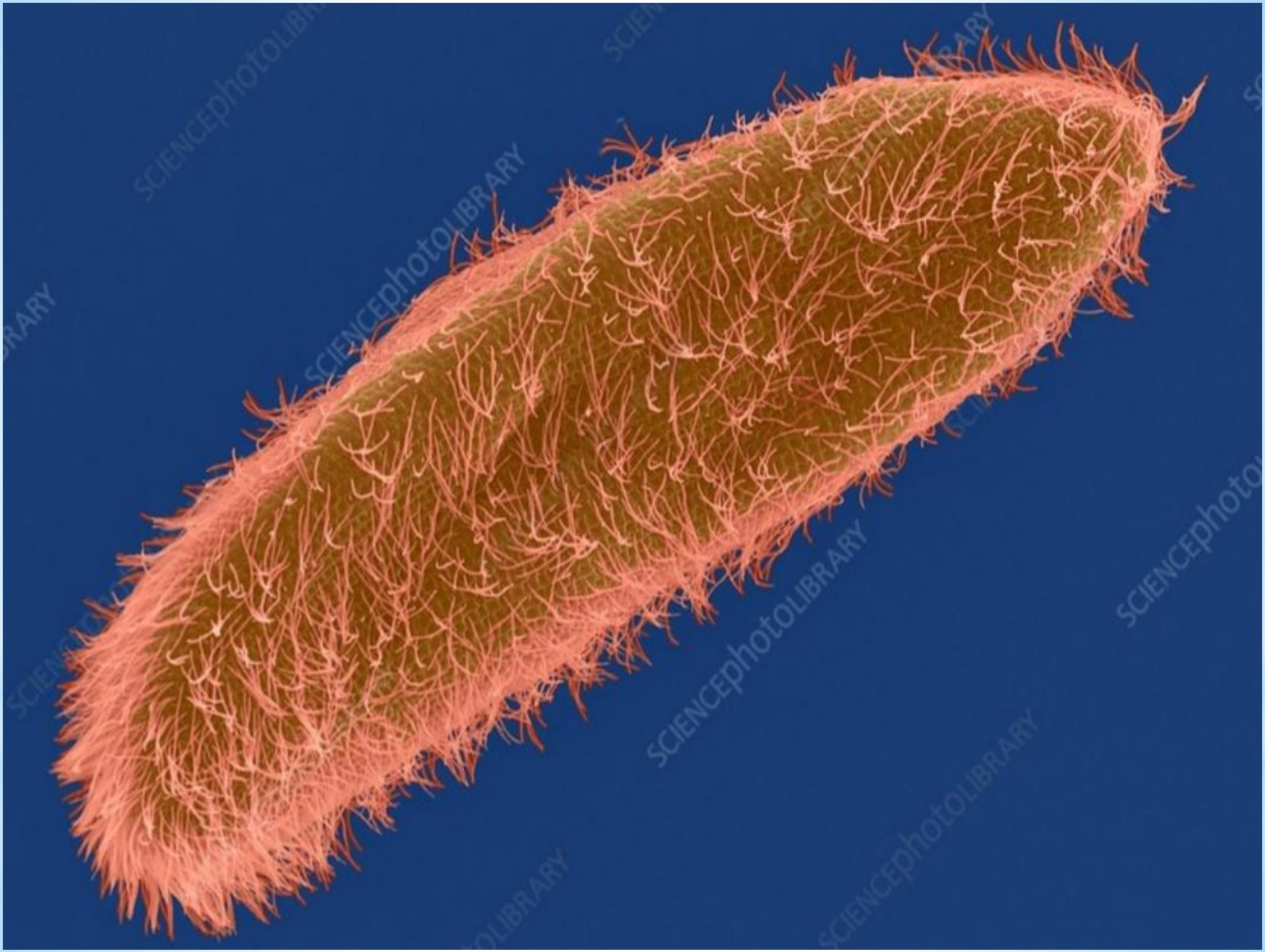



(A)
(B)
(C)
tr
cv
manu
minu
ve
pe
cv
fv
(D)

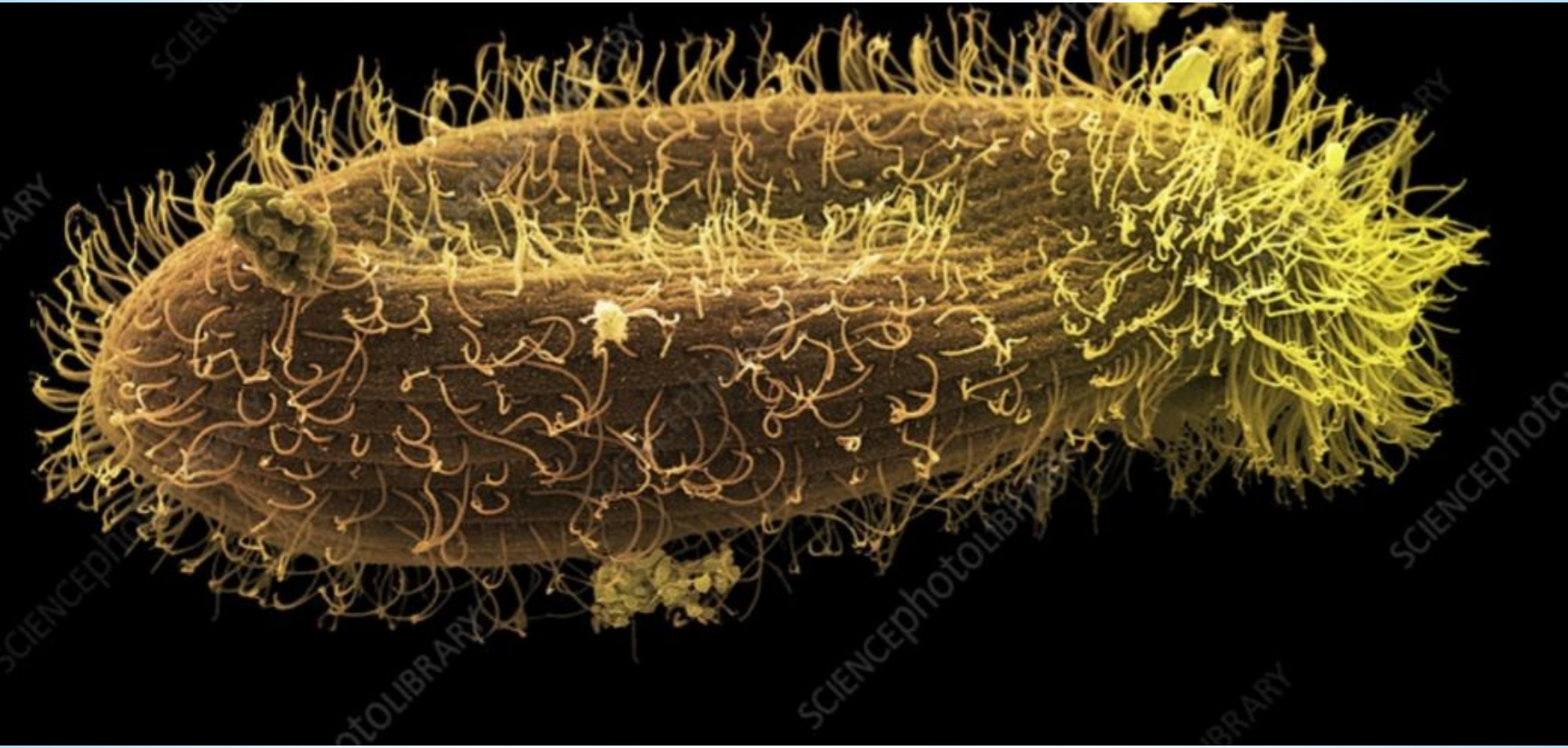


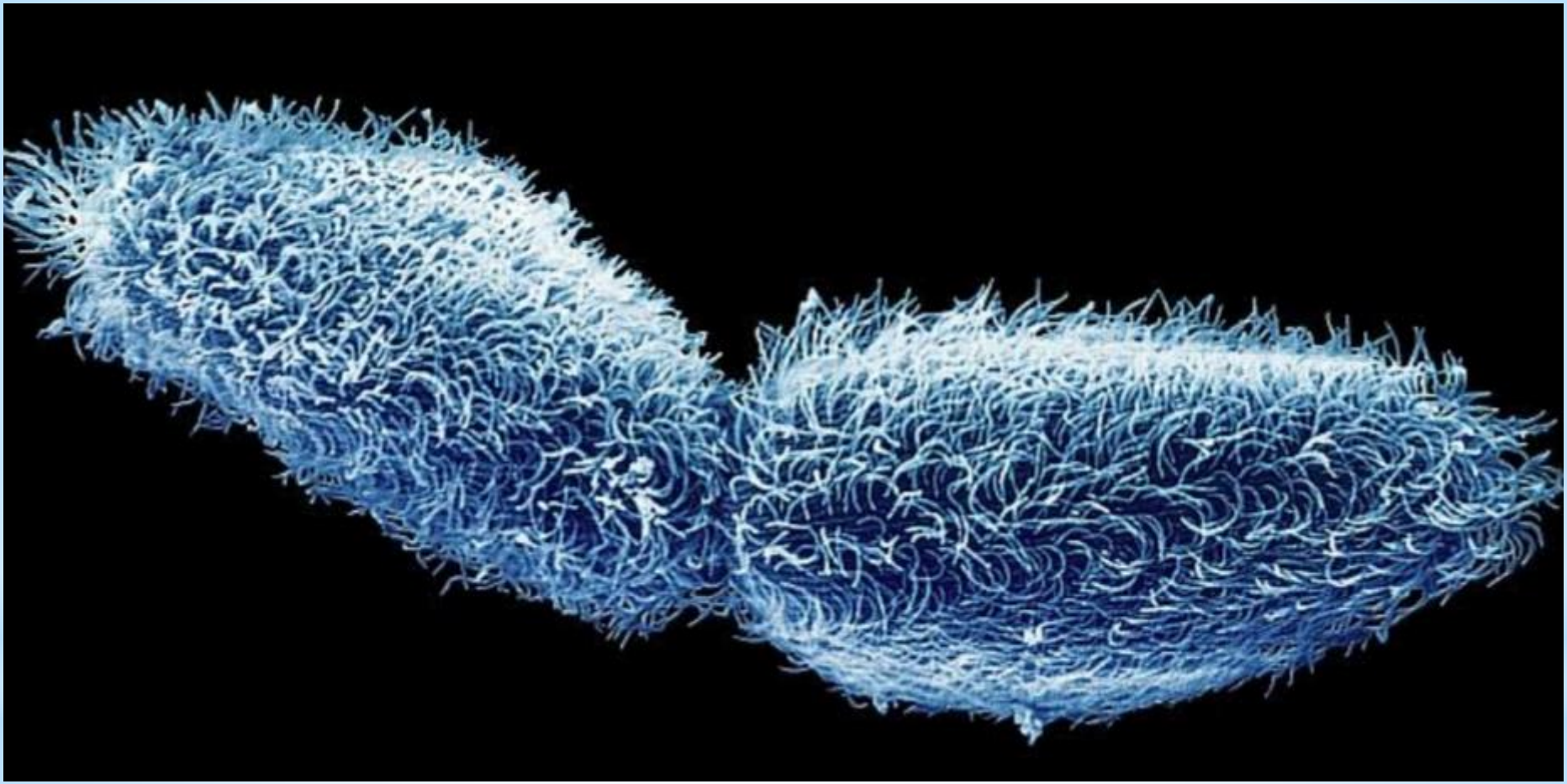


آزمایشگاه سلولی و مولکولی- فرزانه فروهرفر



آزمایشگاه سلولی و مولکولی- فرزانه فروهرفر





در این آزمایش علاوه بر آشنایی با مفاهیم رنگ آمیزی زیستی و غیر زیستی،واکوئل غذایی،میتوکندری،اندامک حرکتی و هسته به طور اختصاصی رنگ آمیزی می شوند و تراوایی غشاءسلول زنده مورد بررسی قرار می گیرد.

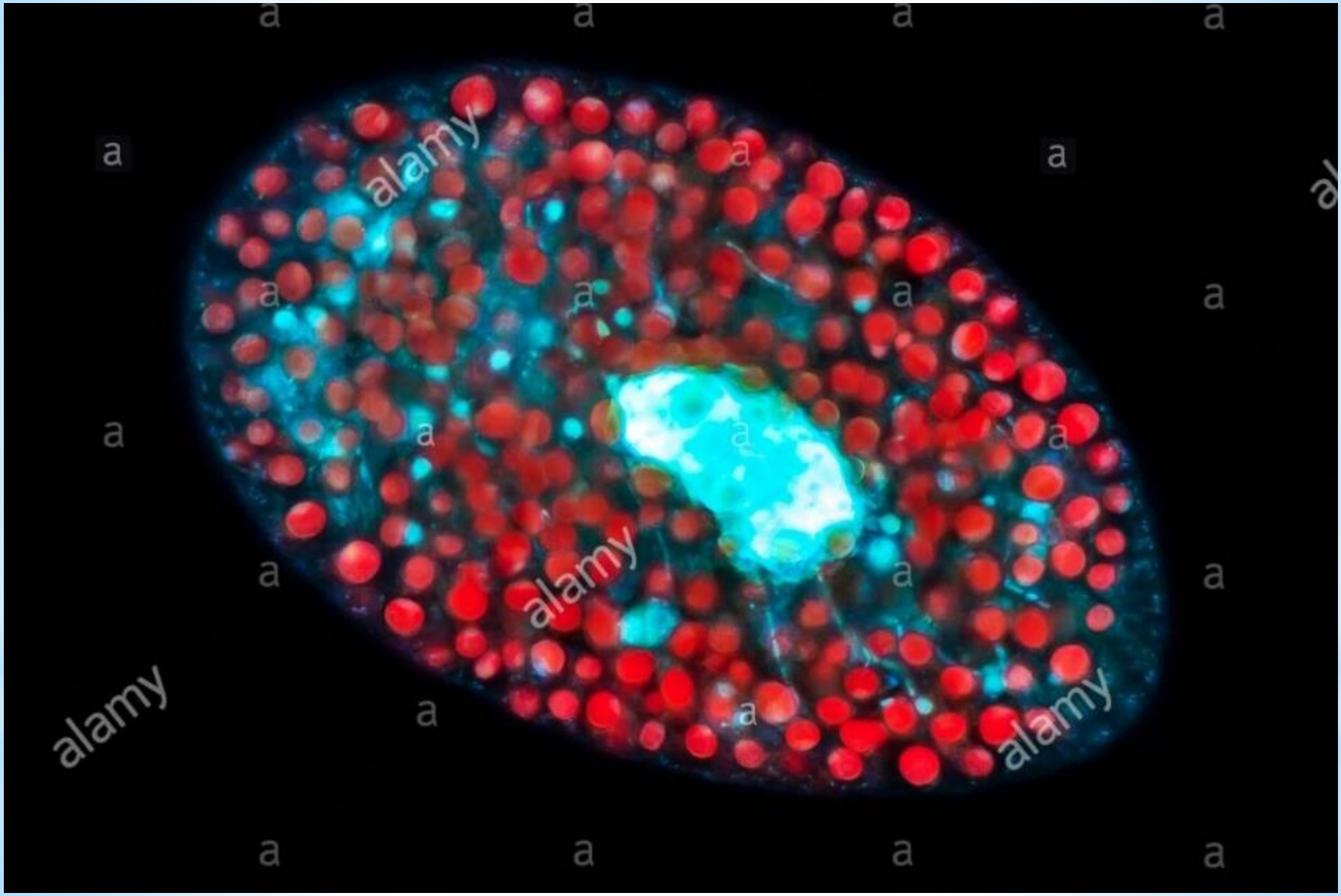
واکوئل غذایی(Food vacuole)

- ✓ در تک یاخته ای مثل پارامسی که با توجه به سن تک یاخته و شرایط تغذیه ای آن،تعداد و اندازه واکوئل های غذایی متفاوت است.
- ✓ تجمع تدریجی ذرات غذایی در واکوئل های غذایی.
- ✓ تجمع تدریجی رنگ قرمز خنثی(Neutral red)در واکوئل های غذایی و تغییر رنگ آن ها به قرمز کم رنگ تا پر رنگ بر حسب تجمع رنگ.

واکوئل غذایی(Food vacuole)

aramecium on
Micscape

آزمایشگاه سلولی و مولکولی- فرزانه فروهرفر



هسته

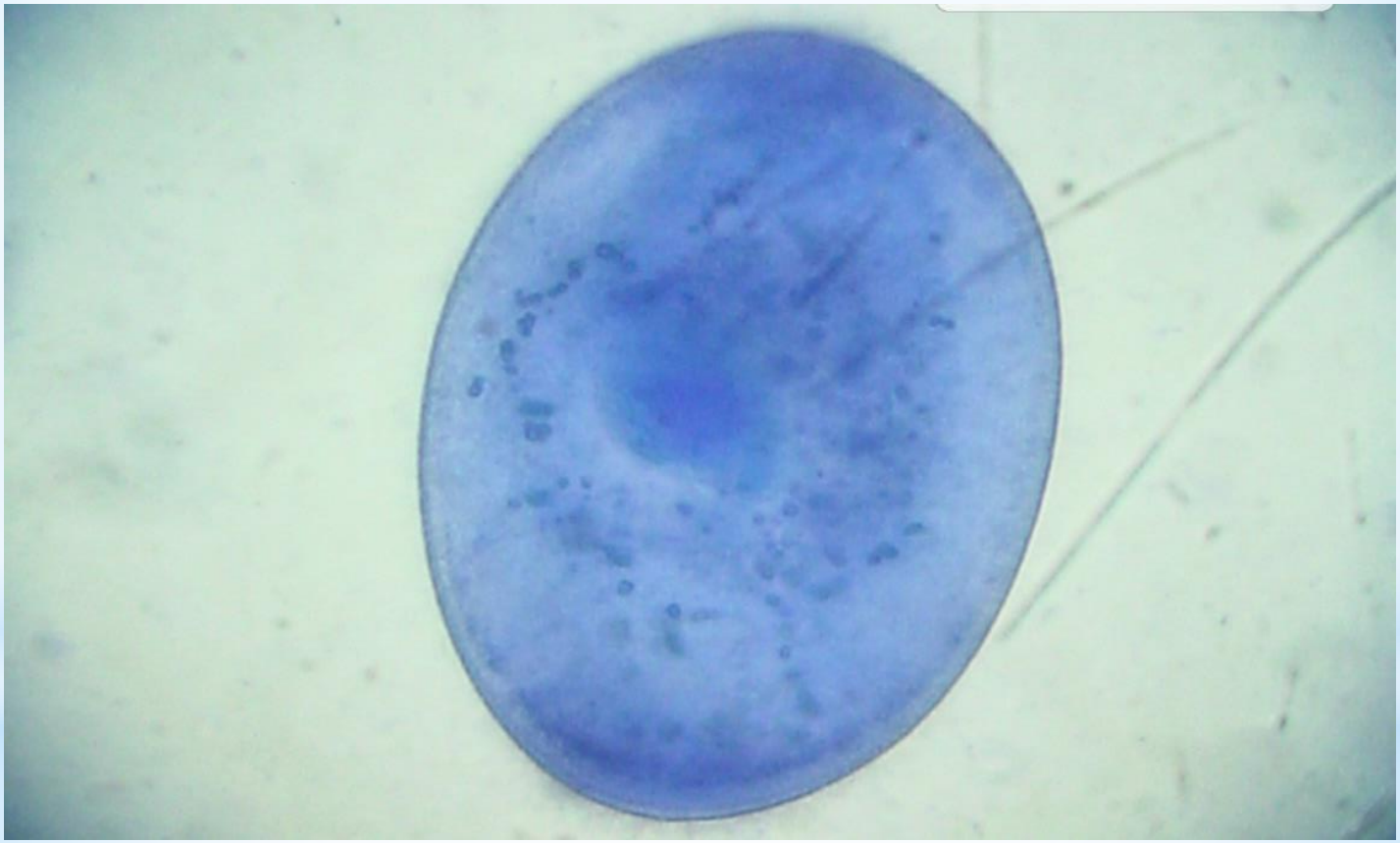
شکل و اندازه وتعدادهسته در تک یاختگان بسیار متنوع است وبه ابعاد مختلف دیده می شود.اکثر تک یاختگان یک هسته دارند اما برخی از آن ها در تمام یا دوره ای از زندگی خود ممکن است بیش از یک هسته داشته باشند.

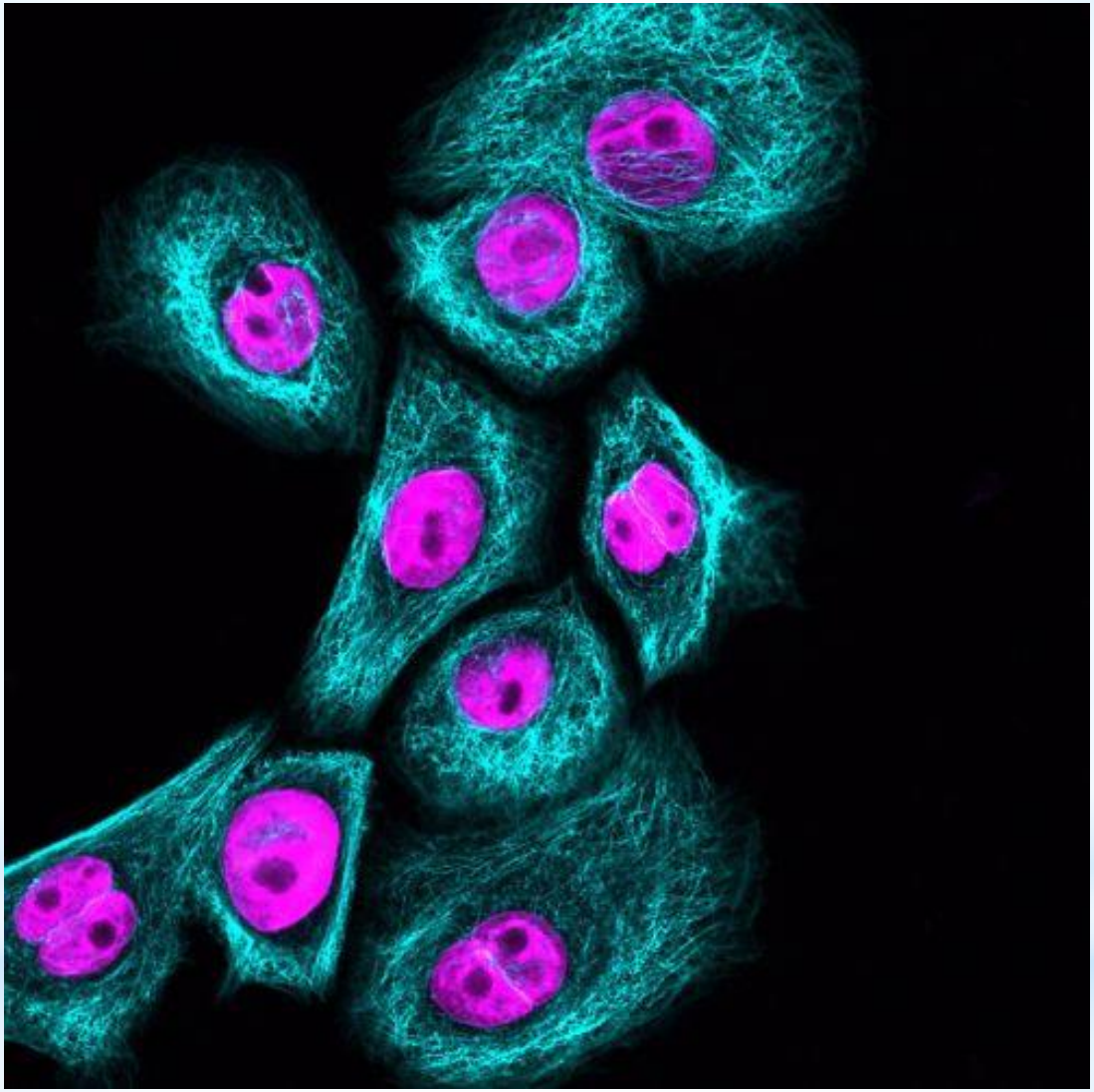
به منظور مشاهده هسته از رنگ حیاتی آبی متیل یاmethylene blue استفاده می شود. وهسته به رنگ آبی آسمانی کم رنگ درمی آید. رنگ آمیزی هسته توسط آبی متیل تدریجا انجام می شود و حدود ۵ الی ۱۰ دقیقه طول می کشد. در این مدت زمان میتوان viabilityسلول را بررسی نمود.

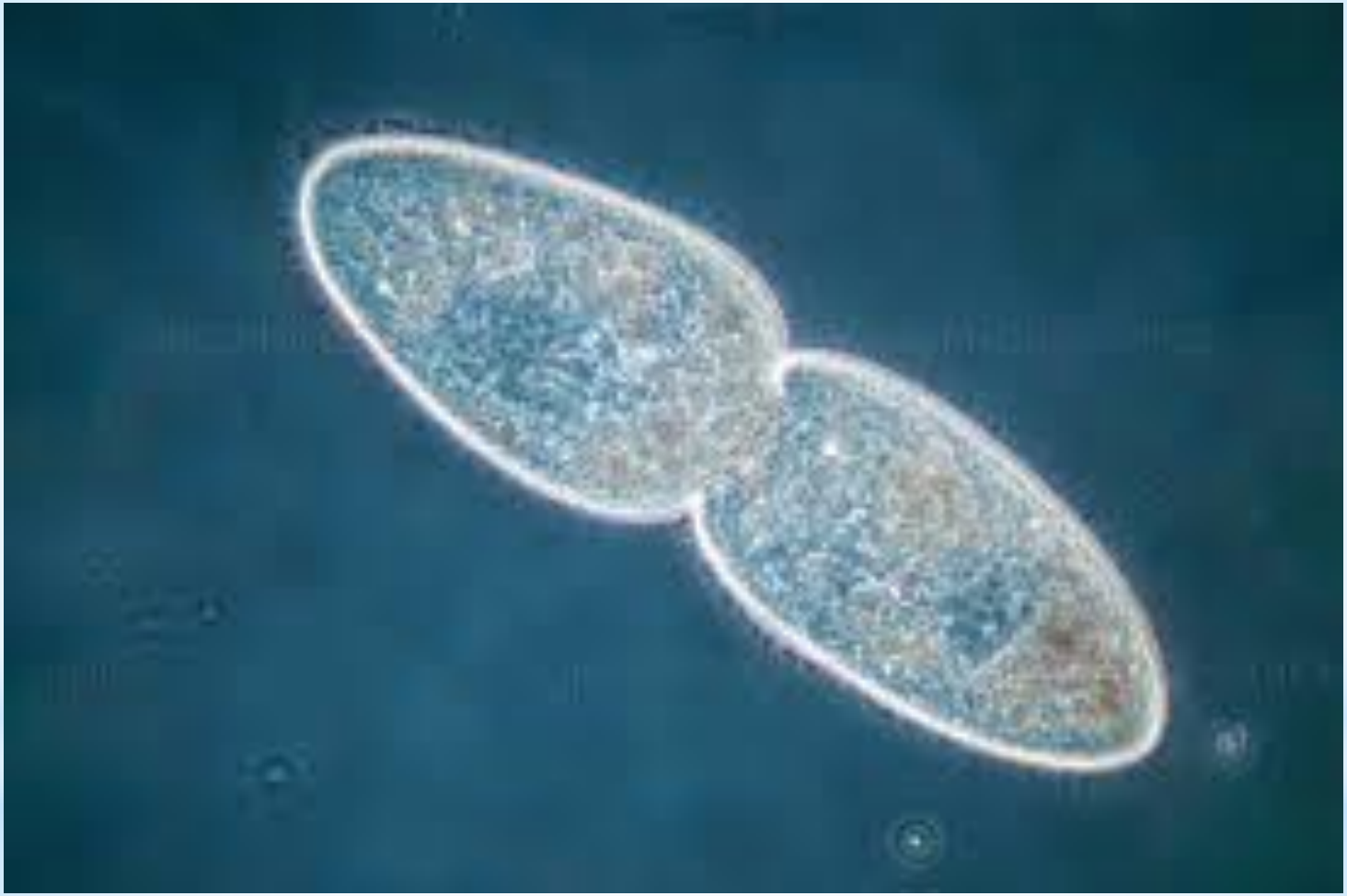
طرز ساخت رنگ حیاتی آبی متیل

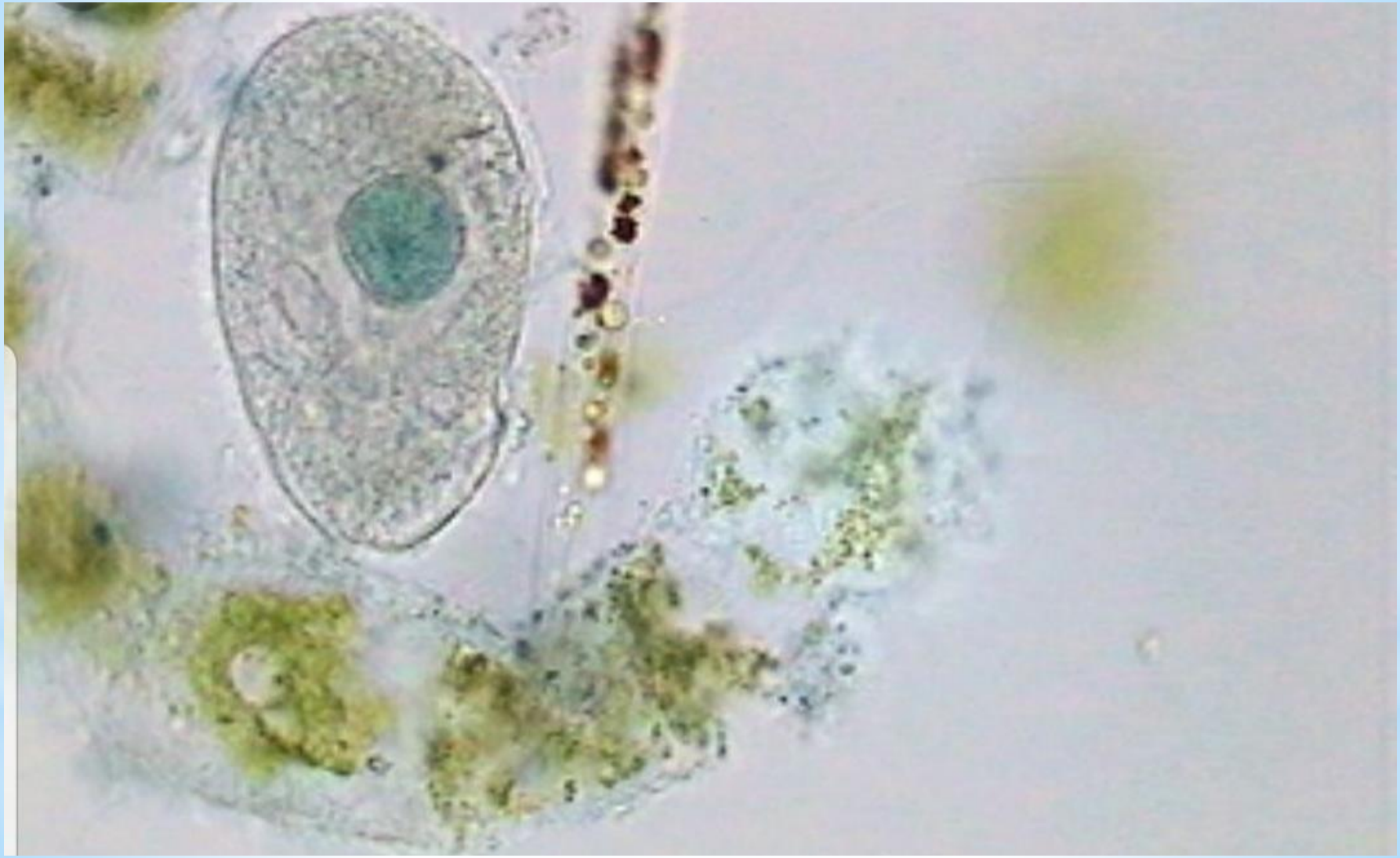
- ✓ ۰.۰۱گرم رنگ آبی متیل در ۱۰۰ سی سی آب مقطر حل شود بدین ترتیب با غلظت پایین ۰.۰۱درصد آب مقطر aquaticتهیه می شود.

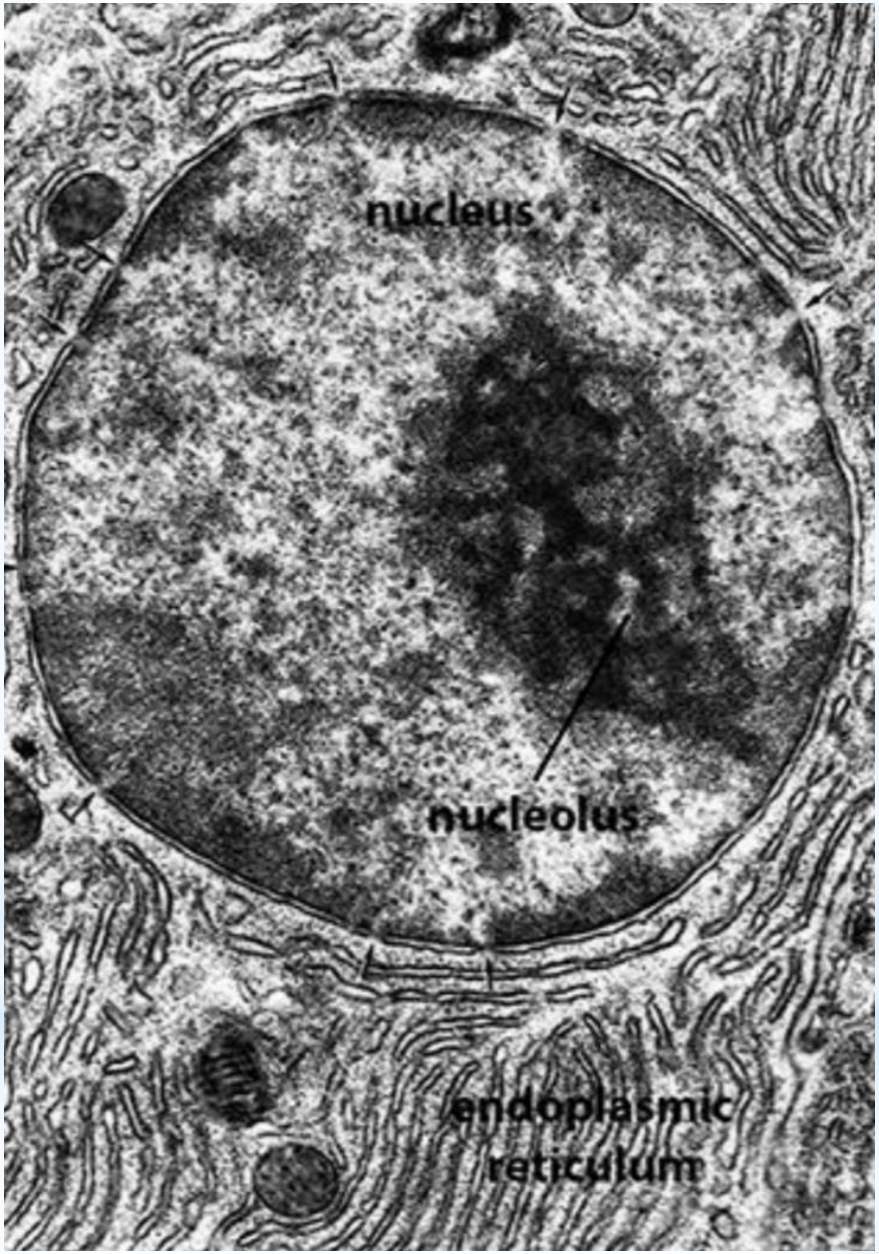
هسته










nucleus
nucleolus
endoplasmic
reticulum

غشاء پلاسمایی

غشاء پلاسمایی مرز بین سلول و محیط خارج سلول است و جایگاه اصلی مبادله مواد بین سلول و محیط اطراف یا سلول مجاور می‌باشد. به علاوه در حفظ ترکیبات سلول، شناسایی ترکیبات خارجی، برقراری اتصالات سلولی، ایمنی و سازگاری سلول با محیط اطراف و سلول‌های مجاور نقش اساسی دارد.جهت بررسی نفوذ پذیری انتخابی غشاء یک سلول زنده می توان از رنگ های حیاتی استفاده کرد که شرح آن در روش کار آمده است .

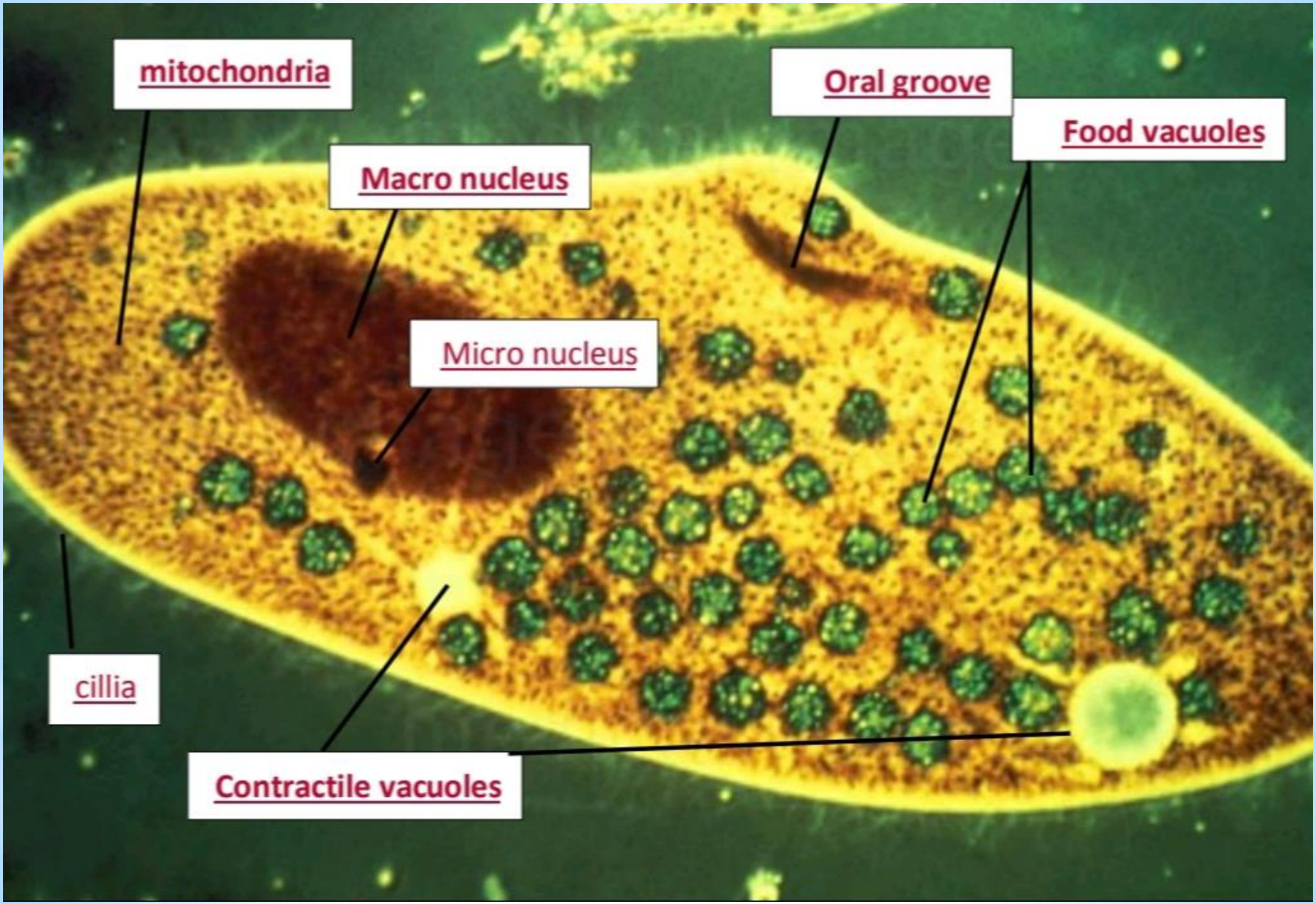
سیکلوز(cyclosis) یا جریان سیتوپلاسمی(cytoplasmic streaming)

- ✓ واژه سیکلوز به معنی چرخندگی می باشد و به مفهوم:جریان چرخشی یا منظم درون سیتوپلاسمی است که اجزاء سلول را به حرکت در می آورد.
  میکروتوبول های درون سلولی عامل اصلی ایجاد این حرکت و سازماندهی آن می باشد.
  پروتئین های اکتین و میوزین از ترکیبات مهم دخیل در ایجاد این جریان می باشد.

سیکلوز یک حرکت آرام و دائمی در سیتوپلاسم در جهات مختلف است که در اثر آن مواد درون سلولی و اندامک ها جابجا می شوند.

- ✓ **در این آزمایش در زمان شناسایی و رنگ آمیزی اندامک های درون سلولی با مشاهده دقیق این اندامک به مدت چند ثانیه می توان جابجایی آن ها را در سیتوپلاسم مشاهده و دنبال کرد که در نتیجه جریان سیتوپلاسمی در سلول می باشد.**

Macro nucleus
Food vacuoles
Oral groove(cytopharynx)
Contractile vacuoles


mitochondria
Oral groove
Food vacuoles
Macro nucleus
Micro nucleus
cillia
Contractile vacuoles

mitochondria
Food vacuoles

واکوئل انقباضی

مواد و وسایل مورد نیاز

مواد و وسایل مورد نیاز

۱. محیط کشت هی HEY
۲. قرمز خنثی
۳. سبز ژانوس
۴. لوگل(ید یدوره)
۵. آبی متیل یا سبز متیل
۶. لام ولامل
۷.پاستور پیپت
۸.میکروسکوپ

روش کار

در این آزمایش از محیط کشت هی که حاوی تک یاخته‌های مختلف می‌باشد، جهت انجام رنگ‌آمیزی حیاتی و غیر حیاتی و مشاهده اندامک‌های درون‌سلولی استفاده می‌شود. این محیط را با افزودن چند دانه گندم و برگ‌های پوسیده زیر درختان به آب برکه، حداقل چند روز قبل از آزمایش فراهم کنید. ضمن انجام ازمایش و درک مفهوم رنگ‌آمیزی زیستی و غیر زیستی برخی از اندامک‌های درون سلولی که در میکروسکوپ نوری قابل رؤیتند، رنگ‌آمیزی و مشاهده می‌شوند.

ابتدا جهت مشاهده واکوئل‌های غذایی یک قطره از محیط هی را توسط پاستورپیپت روی لام قرار داده و یک قطره رنگ قرمز خنثی بر روی آن ریخته، پس از لامل گذاری در بزرگنمایی ۴۰x بعد از چند دقیقه مشاهده کنید. به حالت زنده و متحرک تک‌یاخته‌ها دقت شود. همچنین دقت شود که واکوئل‌های غذایی به تدریج ذرات کلوییدی رنگ را بدرون خود جذب کرده و پر رنگ‌تر می‌شوند. به واکوئل‌های انقباضی نیز دقت شود که در دو قطب پیکر پارامسی قرار دارند و کروی و بی‌رنگ هستند.

قطره دیگری از محیط هی را روی لام گذاشته و جهت مشاهده میتوکندری از سبز ژانوس استفاده کرده، لامل گذاری کنید و ابتدا در بزرگنمایی ۴۰x و پس از ثابت شدن تک‌یاخته در بزرگنمایی ۱۰۰x این اندامک‌ها را مشاهده کنید. به فرم عمومی آن‌ها توجه کنید که شبیه باکتریها هستند. بدیهی است که به دلیل کوچکی و شفافیت آن‌ها بایستی کلیه امکانات تنظیم نور و کنتراست در میکروسکوپ به کارگرفته شود و با تنظیم پیچ میکروفوکوس این اندامک دقیقاً بررسی شود. به زنده بودن تک‌یاخته‌ها توجه کنید.

هم‌چنین در تک‌یاخته‌های زنده حرکت میتوکندری در داخل سیتوپلاسم که بیانگر برقراری جریان سیتوپلاسمی می‌باشد، قابل توجه می‌باشد.

جهت مشاهده ساختار حرکتی، مجدداً یک قطره از محیط هی را روی لام قرار داده و پس از افزودن لوگل لامل گذاری کنید و نمونه را در بزرگنمایی ۴۰ مشاهده کنید. دقت شود که با افزودن رنگ، نمونه ثابت شده و تحرک و حیات خود را از دست می‌دهد.

. تک یاخته‌هایی با مژه یا تاژک‌های درشت‌تر را انتخاب و با فوکوس روی اندامک‌های حرکتی آن‌ها را بررسی کنید.

به منظور مشاهده هسته و بررسی پدیده توانایی نفوذپذیری انتخابی غشاء در تک‌یاختگان بر روی دو گوشه یک لام هر طرف یک قطره محیط هی بگذارید، به هر کدام یک قطره رنگ آبی متیل افزوده یک طرف را لامل گذاری کرده تا در نمونه‌های زنده هسته را مشاهده کنید. دقت کنید پس از چند دقیقه هسته متمایز می‌شود.

به طرف دیگر پس از افزودن یک قطره فرمالین لامل گذاری کنید. نمونه را در بزرگنمایی ۴۰ مشاهده کنید. دقت کنید که پس از افزودن فرمالین تک یاخته‌ها حیات خود را از دست می‌دهند بدین ترتیب نفوذپذیری انتخابی غشا را در این قسمت با طرف دیگر لام مقایسه کنید.