



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 های حرکتی مژه (cilia) و تاژه (flagella)
- ✓ مشاهده و بررسی هسته (nucleus)
- ✓ بررسی توانایی زیستی یا تراوایی غشاء پلاسمایی سلول زنده (viability)
- ✓ مشاهده سیکلوسیس (cyclosis) یا جریان سیتوپلاسمی

مقدمه

رنگ آمیزی زیستی

در این نوع رنگ آمیزی ضمن حفظ حیات نمونه یا سلول مورد نظر، اجزاء مورد مطالعه به صورت اختصاصی رنگ می شوند. بدیهی است که در این تکنیک رنگ آمیزی، رنگ های حیاتی بایستی با غلظت بسیار پایین و رعایت شرایط خاصی از نظر نوع محلول سازنده، اسیدیته و مولاریته ان تهیه شوند و مراحل انجام رنگ آمیزی با دقت و رعایت موارد مختلف از قبیل میزان رنگ مورد استفاده مدت زمان رنگ آمیزی و رعایت شرایط مناسب با حفظ حیات نمونه انجام پذیرد در غیر این صورت رنگ آمیزی غیر حیاتی می گردد.

رنگ آمیزی غیرزیستی

در رنگ آمیزی غیرزیستی حیات نمونه از دست می رود. اما اجزاء مورد مطالعه اختصاصاً رنگ می گیرند و محلول سازنده یا نوع رنگ مورد استفاده برای سلول سمی و کشنده می باشد.

عوامل موثر بر رنگ آمیزی حیاتی

- ✓ غلظت، pH و مولاریته رنگ دقیق باشد.
- ✓ میزان رنگ مورد استفاده در طول رنگ آمیزی بقدر کافی باشد و بیش از حد ظرفیت سلول استفاده نشود.
- ✓ نوع محلول مورد استفاده جهت ساخت رنگ (اسیدی، الکلی، آبی، سرم فیزیولوژیکی و...) بدقت تهیه شود.
- ✓ مدت زمان رنگ آمیزی زیاد طول نکشد.
- ✓ در رابطه با تک یاخته ها نور بیش از حد میکروسکوپ باعث ایجاد حرارت و مرگ سلول می شود و همچنین از الکل استفاده نگردد.
- ✓ 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 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

پارامسی ها، پروتوزوئر های تک سلولی و در شاخه مژکداران و سلسله پروتیستا طبقه بندی می شوند. در آب های آرام و آبگیر های راكد زندگی میکنند و بخش اصلی زنجیره غذایی را تشکیل می دهند. آنها از پسمانده ی جلبک ها و سایر موجودات ریز تغذیه کرده و خودشان توسط موجودات دیگر بلعیده می شوند.

تمام اعضای شاخه مژکداران به وسیله برآمدگی های ریز مو مانندی که مژک نامیده می شود حرکت می کنند.

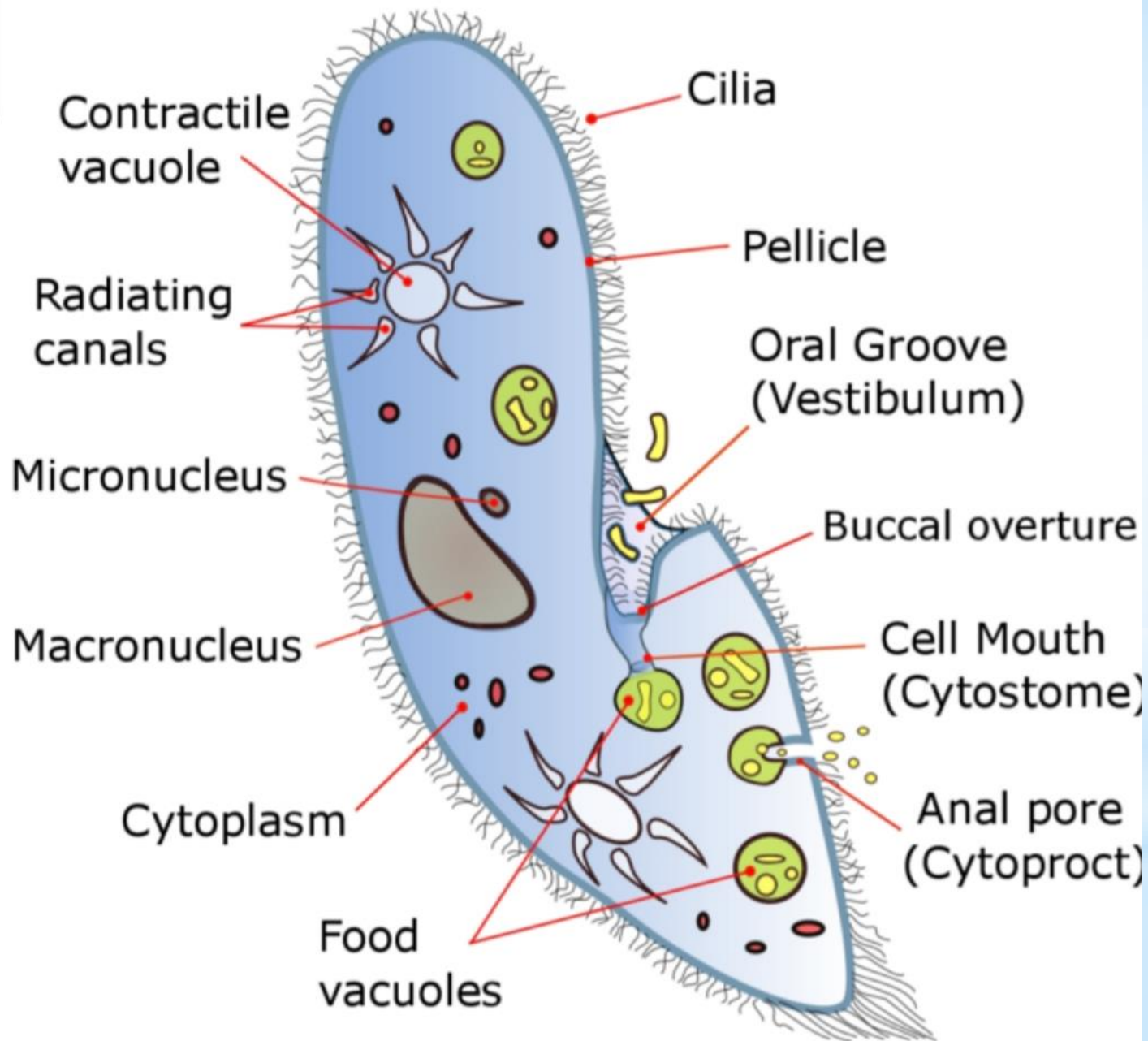
حرکت پارامسی اینگونه است که اگر ضربان اندام حرکتی به سمت عقب باشد، حرکت به سمت جلو است و بالعکس. اگر ضربان به صورت مایل باشد ، جانور به دور خود می چرخد و در حال چرخش میتواند به جلو و عقب حرکت کند.

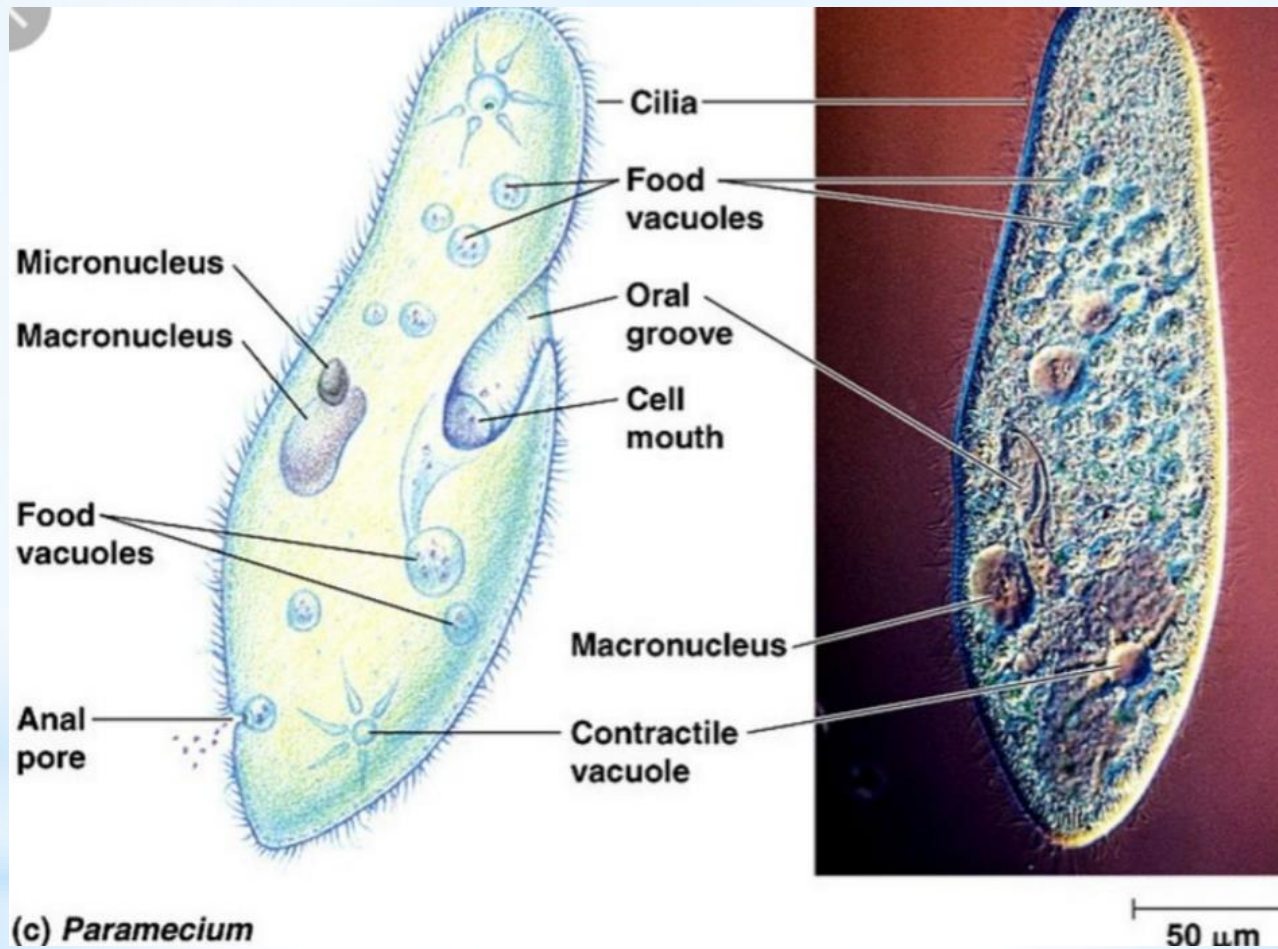
پارامسی قادر نیست شکل بدنش را مثل آمیب ها تغییر دهد. زیرا که پوسته ضخیم و سختی به نام پلیکل دارند. پلیکل کل سطح غشای سلول را در برمیگیرد.

پارامسی دو نوع هسته دارد. هسته بزرگ (ماکرونوکلئوس) میباشد که فعالیت هایی مثل تنفس، سنتز پروتئین و هضم غذا را کنترل میکند. هسته کوچک (میکرونوکلئوس) تنها در زمان تولیدمثل فعالیت دارد.

تولیدمثل جنسی در پارامسی با تبادل DNA بین هسته های کوچک همراه است. در این زمان دو پارامسی از طول بهم می چسبند و از طریق دهان سلولی به هم ملحق می شوند.

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





واکوئل vacuole

واکوئل‌ها یا انقباضی‌اند 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 و مدور 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 ذرات غذایی را به عهده دارند. جهت مشاهده این اندامک‌ها از رنگ حیاتی با غلظت پایین قرمز خنثی neutral red استفاده می‌شود.



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.

طرز ساخت رنگ حیاتی قرمز خنثی

✓ ۰.۱-۰.۰۰۱ گرم رنگ قرمز خنثی در ۱۰۰ سی سی آب یا الکل مطلق حل شود. در رابطه با تک یاخته هایی مثل پارامسی از اب جهت تهیه رنگ استفاده می شود.

✓ به این ترتیب غلظت بسیار پایین ۰.۱-۰.۰۰۱ درصد در آب یا الکل مطلق (Alcoholic or Aquatic) ساخته می شود.

✓ رنگ پس از تهیه دارای ذرات کلوئیدی و غیر قابل حل می باشد و تک یاخته بعنوان غذا ذرات رنگ را بلعیده و واکوئل‌های گوارشی ان به رنگ قرمز کم رنگ مشاهده می شوند.

واکوئل غذایی Food vacuole



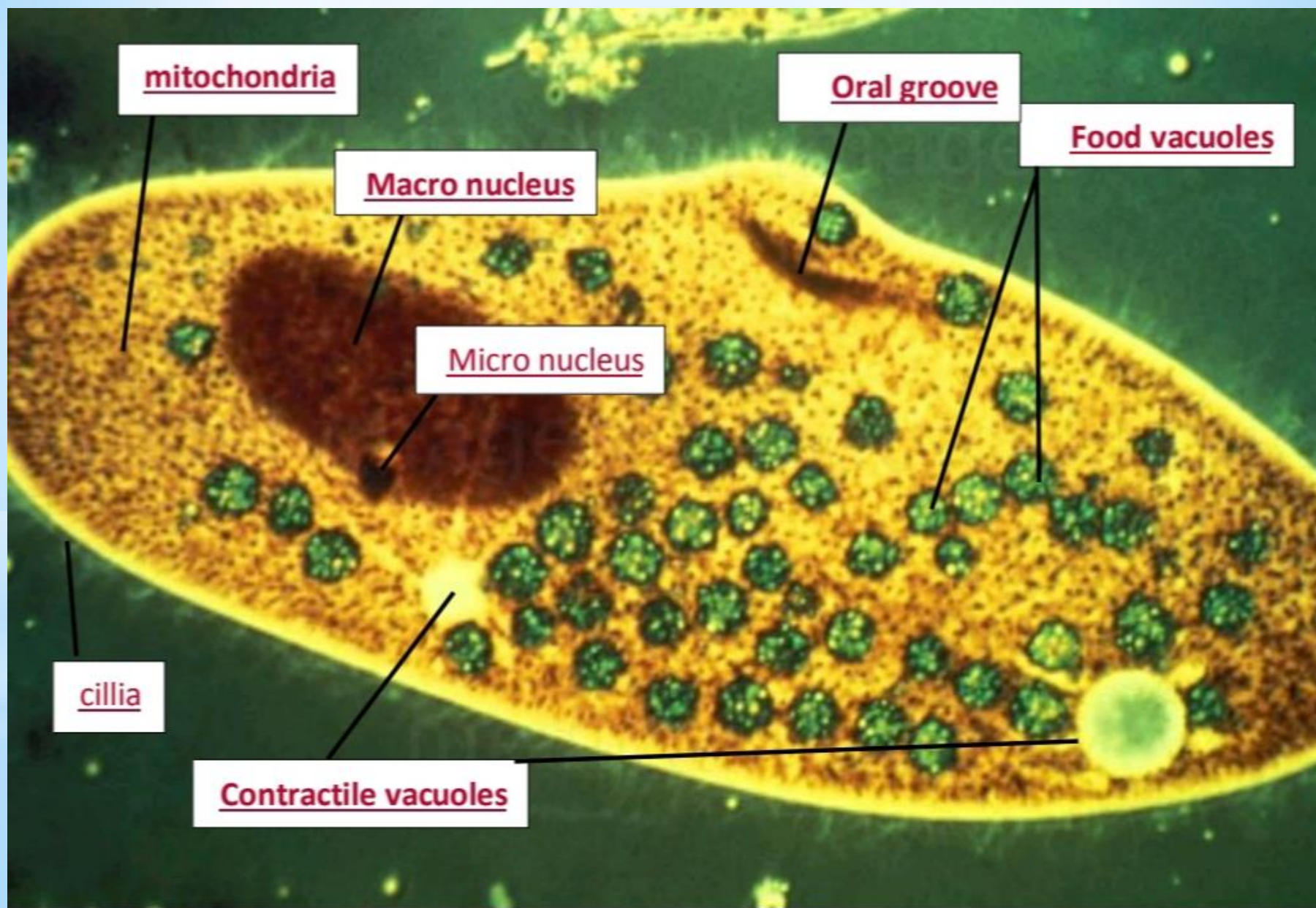


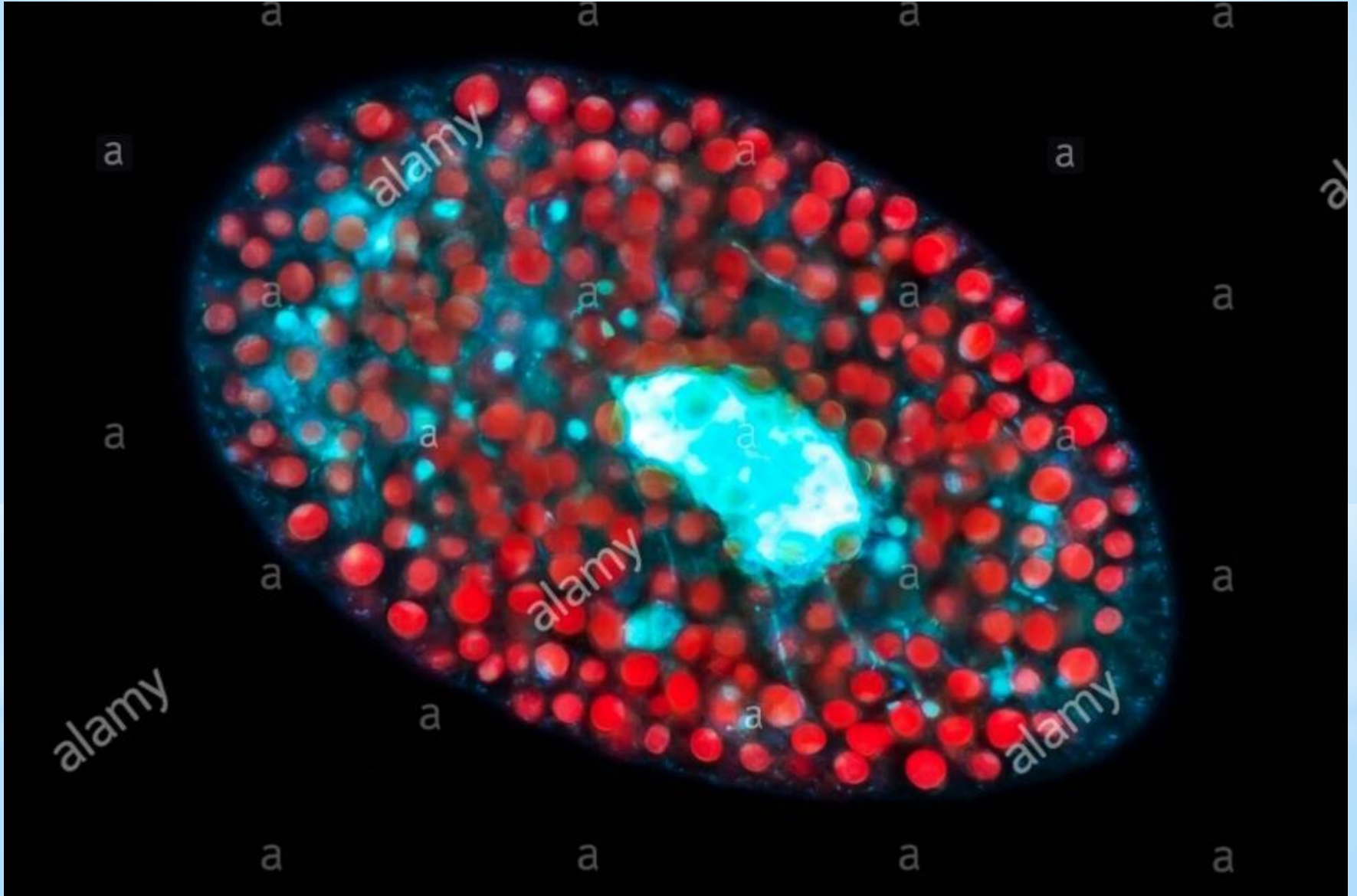












میتو کندری mitochondria

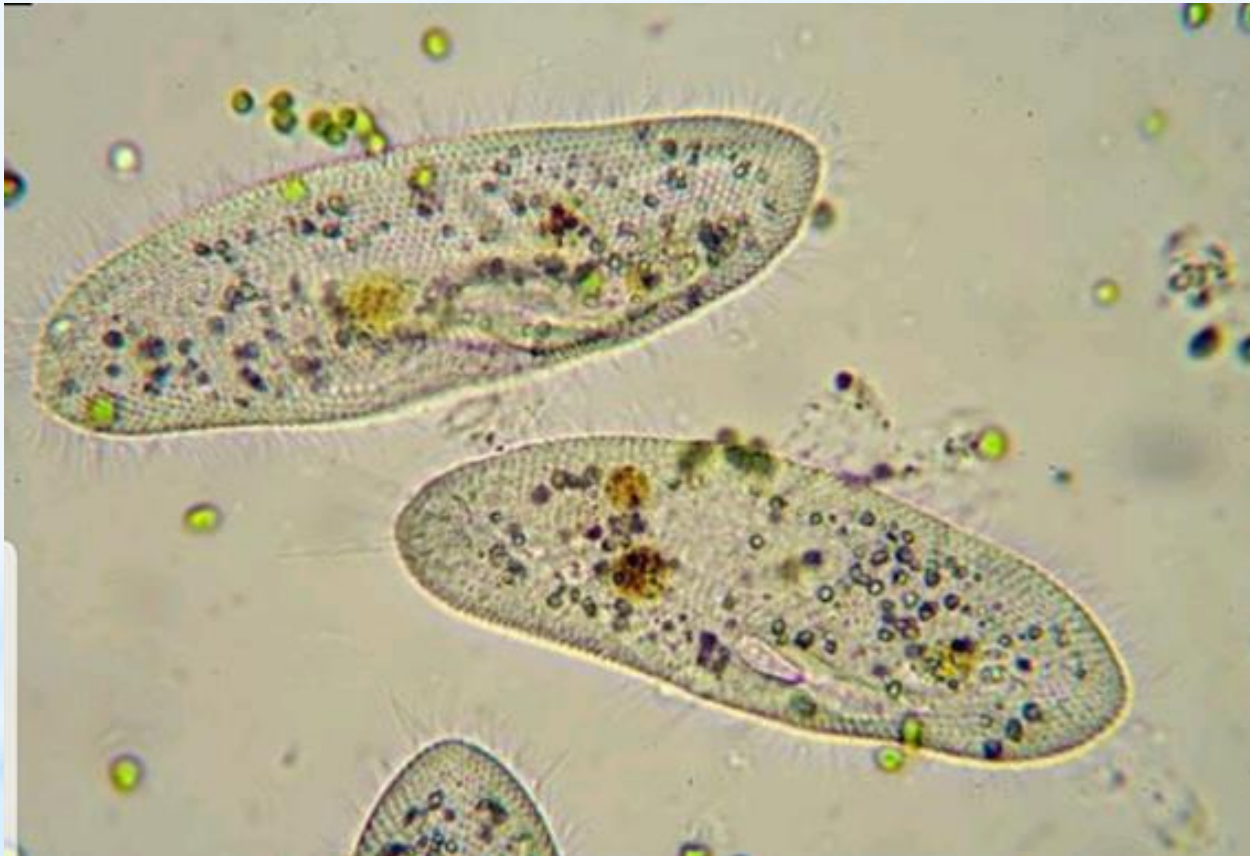
میتو کندری ها ۲۵ درصد حجم سلول های یوکاریوت را اشغال کرده و جایگاه تنفس سلولی هستند. این اندامکها با میکروسکوپ نوری با استفاده از تکنیک های رنگ آمیزی حیاتی قابل مشاهده اند، اما جزئیات ساختاری و فراساختاری آنها فقط با میکروسکوپ الکترونی گذاره قابل مشاهده می باشد. ساختار آنها شبیه به باکتری های میله ای شکل بوده و قطری بین ۰/۵-۱ میکرون دارند و طول آنها حدود ۲-۱ میکرون می باشد. پس از هسته، واکوئل و کلروپلاست، بزرگترین اندامک های درون سلولی هستند. تقسیم آنها به صورت دوتایی (Binary fission) بوده که در طول چرخه ی سلولی اندازه آنها دو برابر و سپس تقسیم می شوند. مطالعه میتو کندری به دلیل شفافیت زیاد و ضریب شکست کمی که دارد، توسط میکروسکوپ نوری معمولی در سلول های زنده قدری مشکل است و با میکروسکوپ زمینه متضاد phase contrast و افتراقی فاز متضاد DIC دقیقتر مشاهده می شود.

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 سیتوکروم اکسیداز موجود در چرخه تنفسی سلولی با این رنگ واکنش می‌دهد، رنگ سبز ژانوس اکسید شده و به رنگ سبز-آبی کم رنگ بدلیل غلظت بسیار پایین مشاهده می‌شود. در حالیکه این رنگ در سیتوپلاسم سلول به حالت احیا و بی رنگ می‌باشد.

طرز ساخت رنگ حیاتی سبز ژانوس

✓ این رنگ باغلظت بسیار پایین 0.004 گرم در 100 سی سی آب یا الکل مطلق به صورت 0.004 درصد، ساخته می شود.

میتو کندی میتوcondria





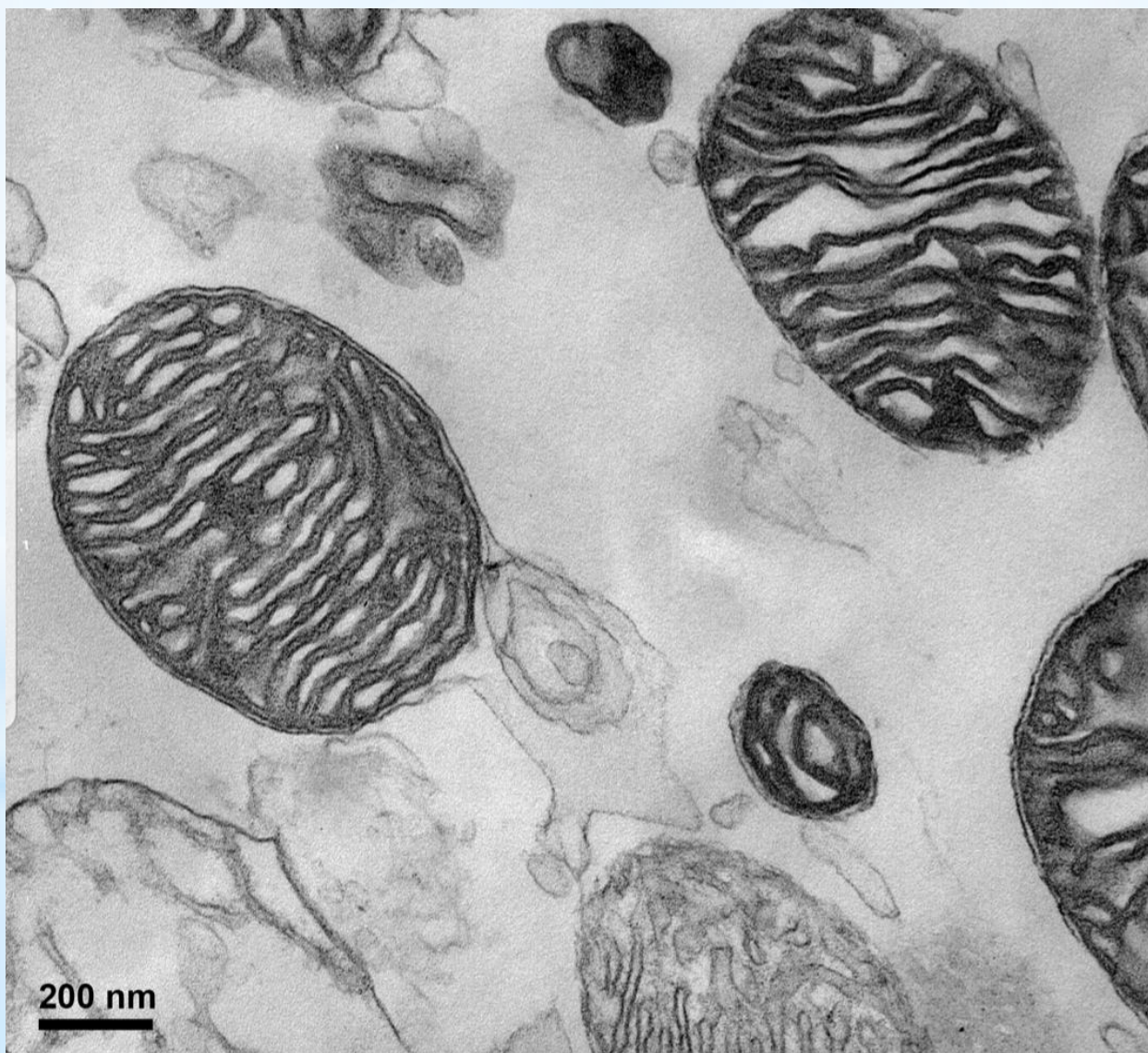


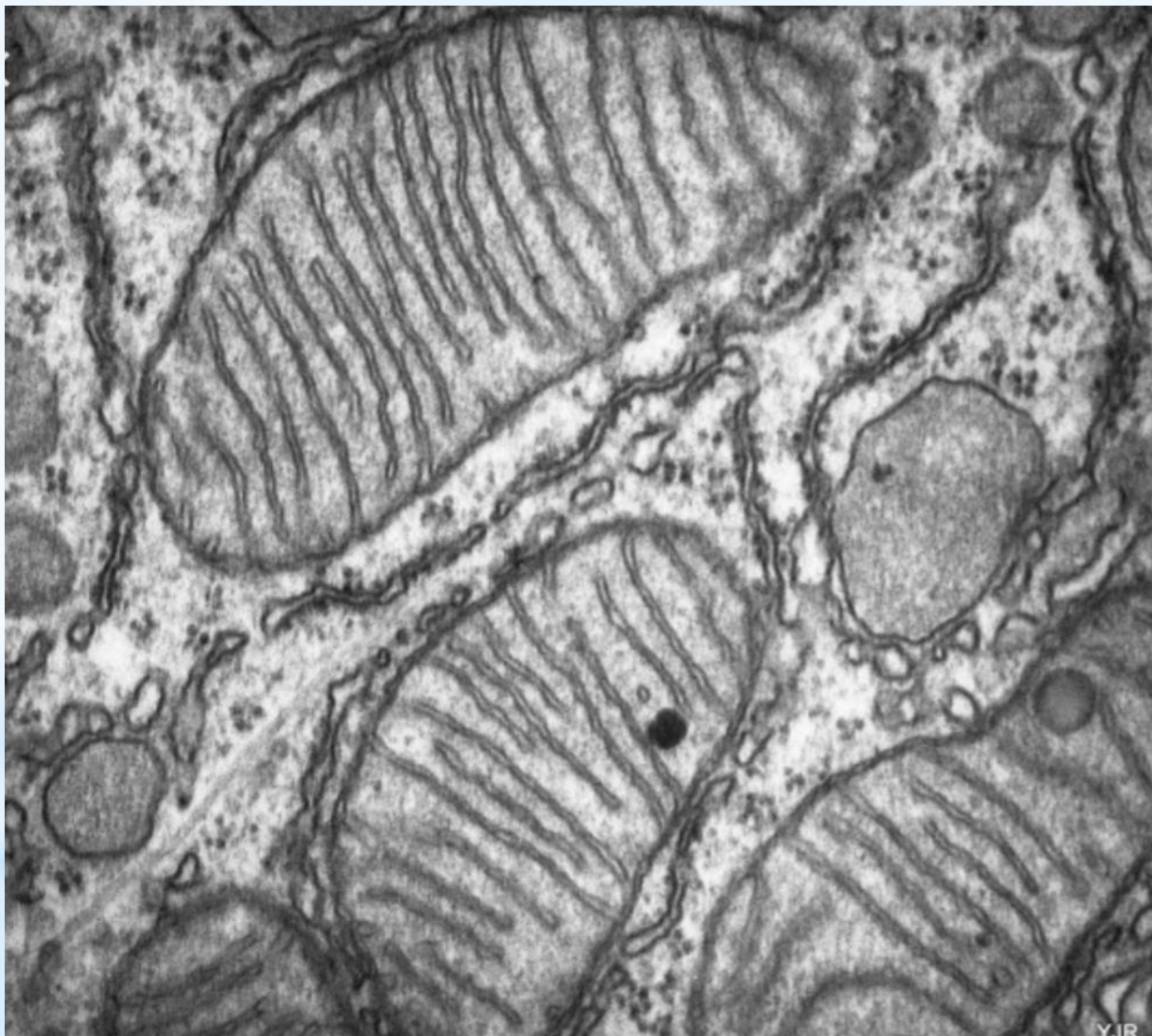


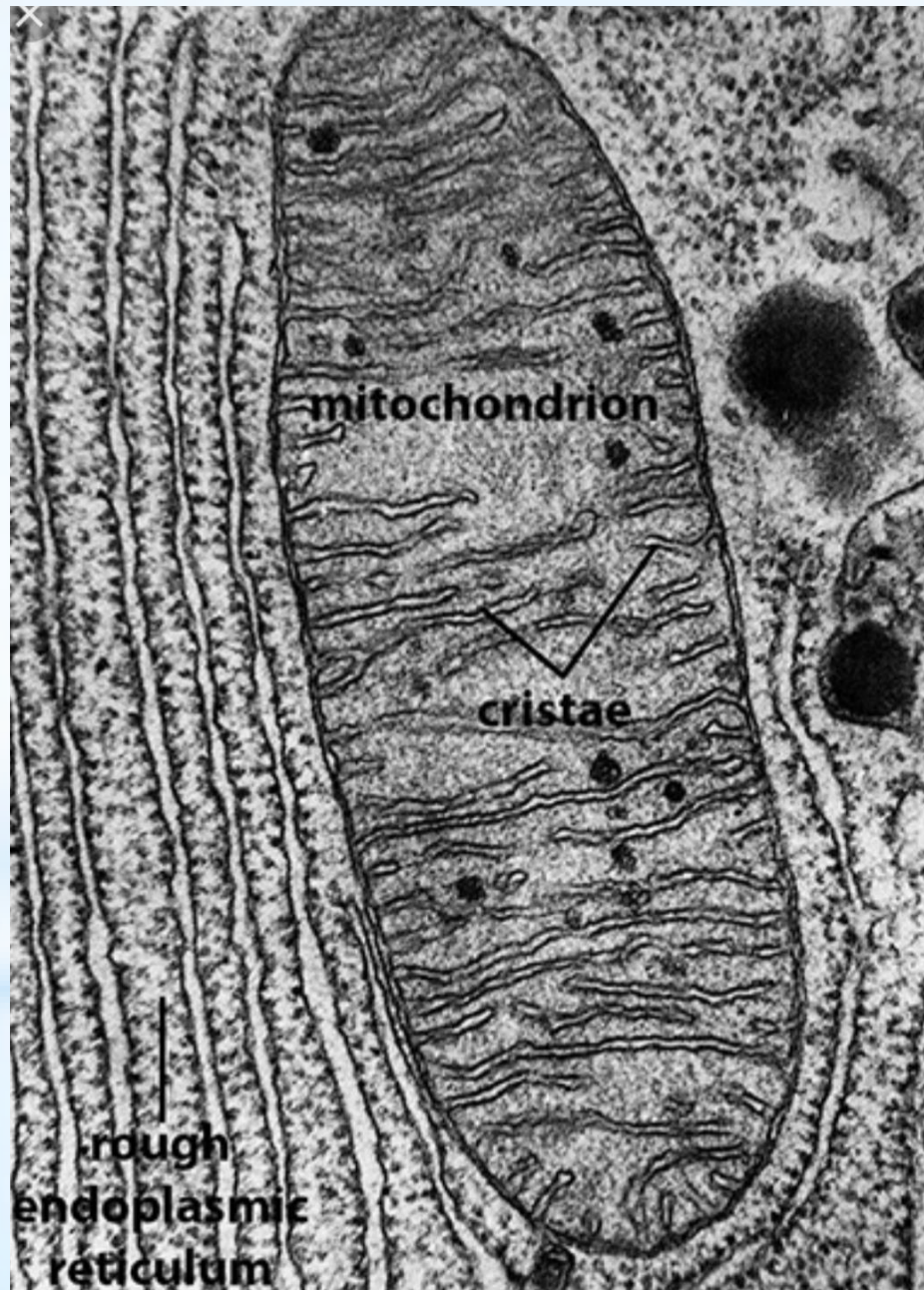
آزمایشگاه سلولی و مولکولی - فرزانه فروهرفر

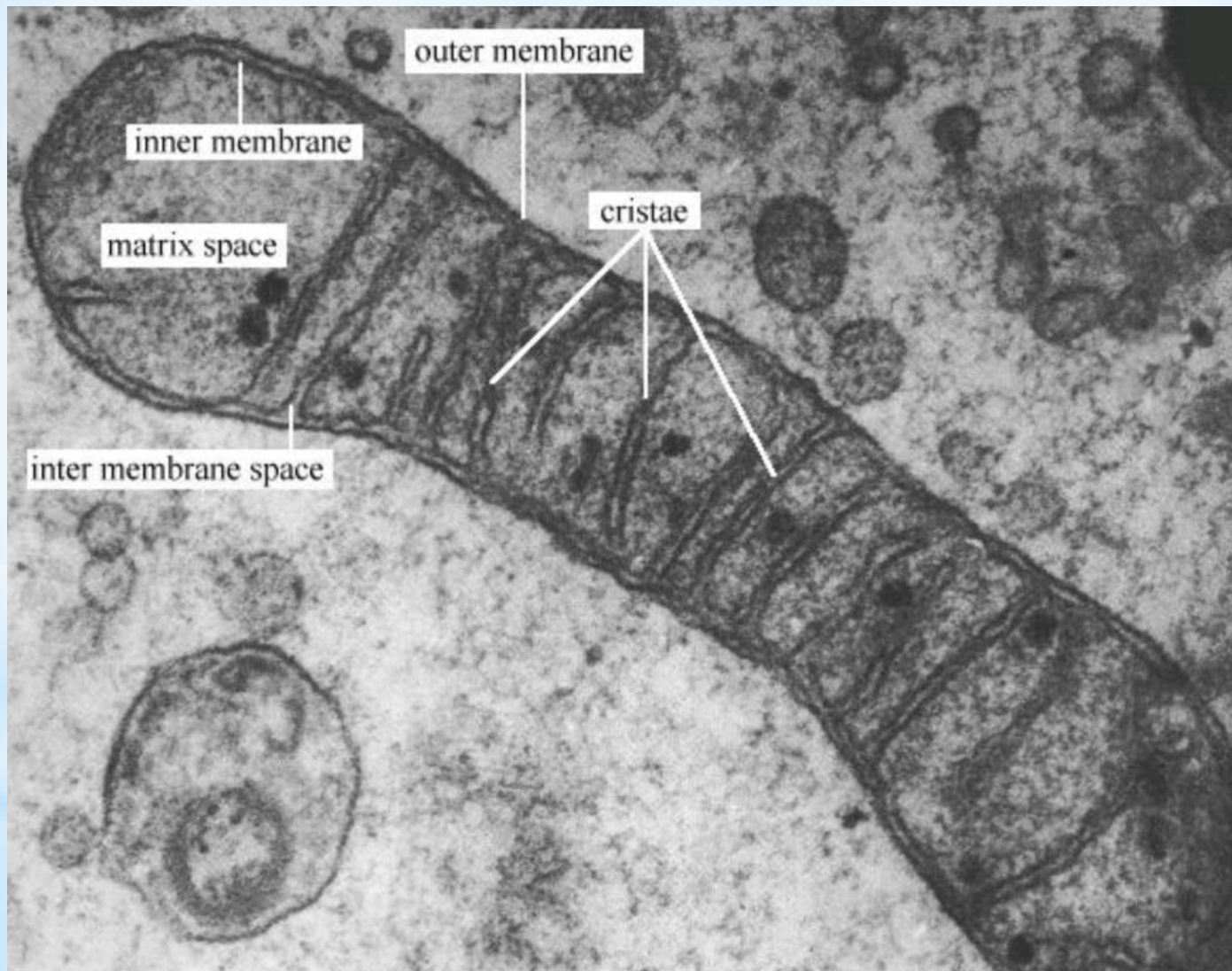
مراحل بلوغ و تکامل میتوکندری در سلول تحت میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن











اندامک حرکتی cilia

در تک یاخته ها زوائد دائمی حرکتی مژک ها (Cilia) و تاژک ها (flagella) می باشند که ساختاری کاملاً مشابه دارند و از تعدادی میکروتوبول با نظم خاصی 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 و یا 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.

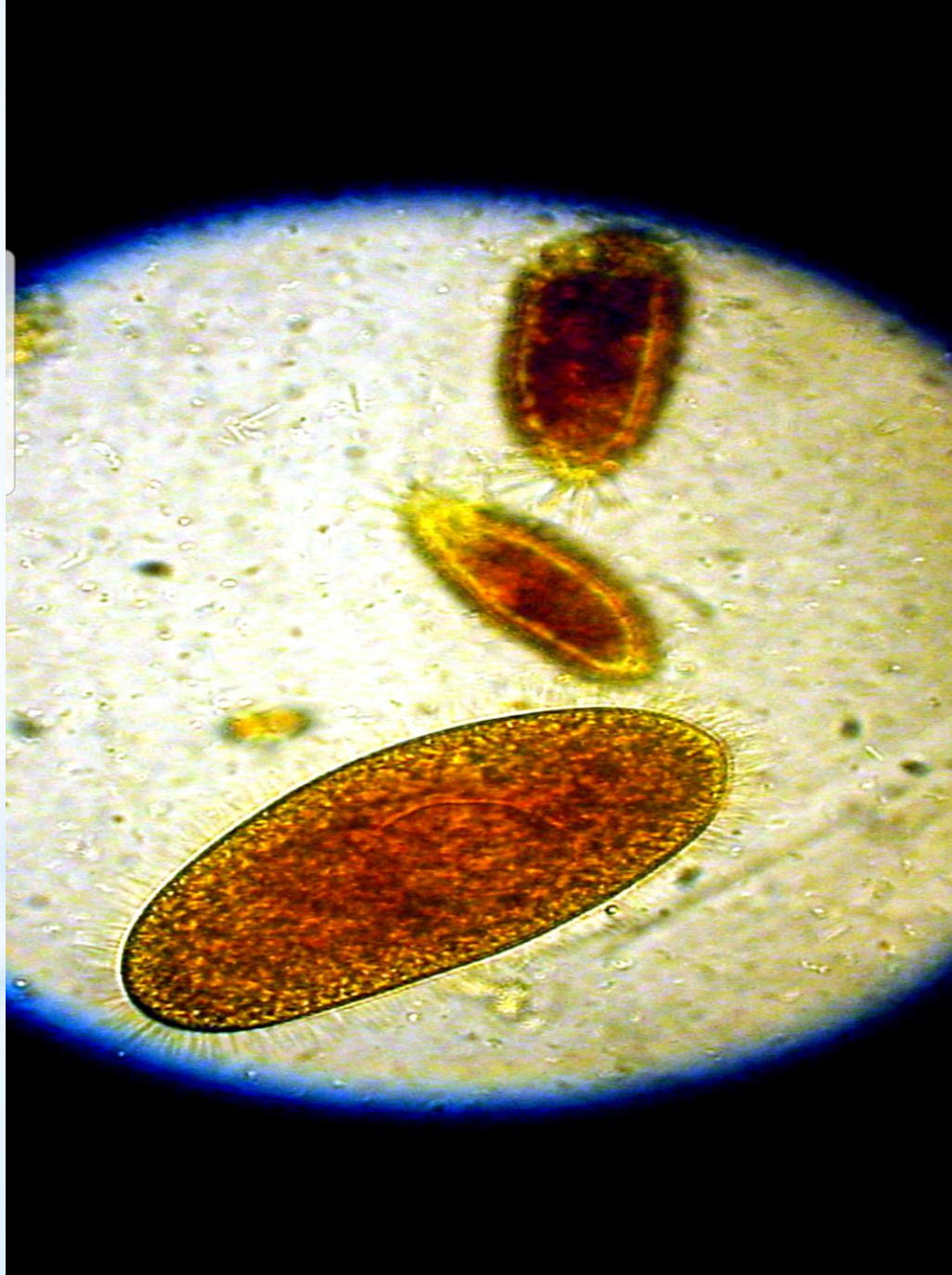
جهت مشاهده ساختار حرکتی مژه یا تاژک از رنگ غیر حیاتی لوگل lugol یا یدیدوره یا یدیدور پتاسیم (IKI) استفاده می‌شود. این رنگ در آب مقطر و با افزودن بلورید و یدور پتاسیم تهیه می‌شود. بلورید به دلیل سمی بودن برای سلول‌های زنده در غلظت استفاده شده، این رنگ آمیزی را غیر حیاتی می‌سازد.

طرز ساخت رنگ غیر حیاتی لوگل

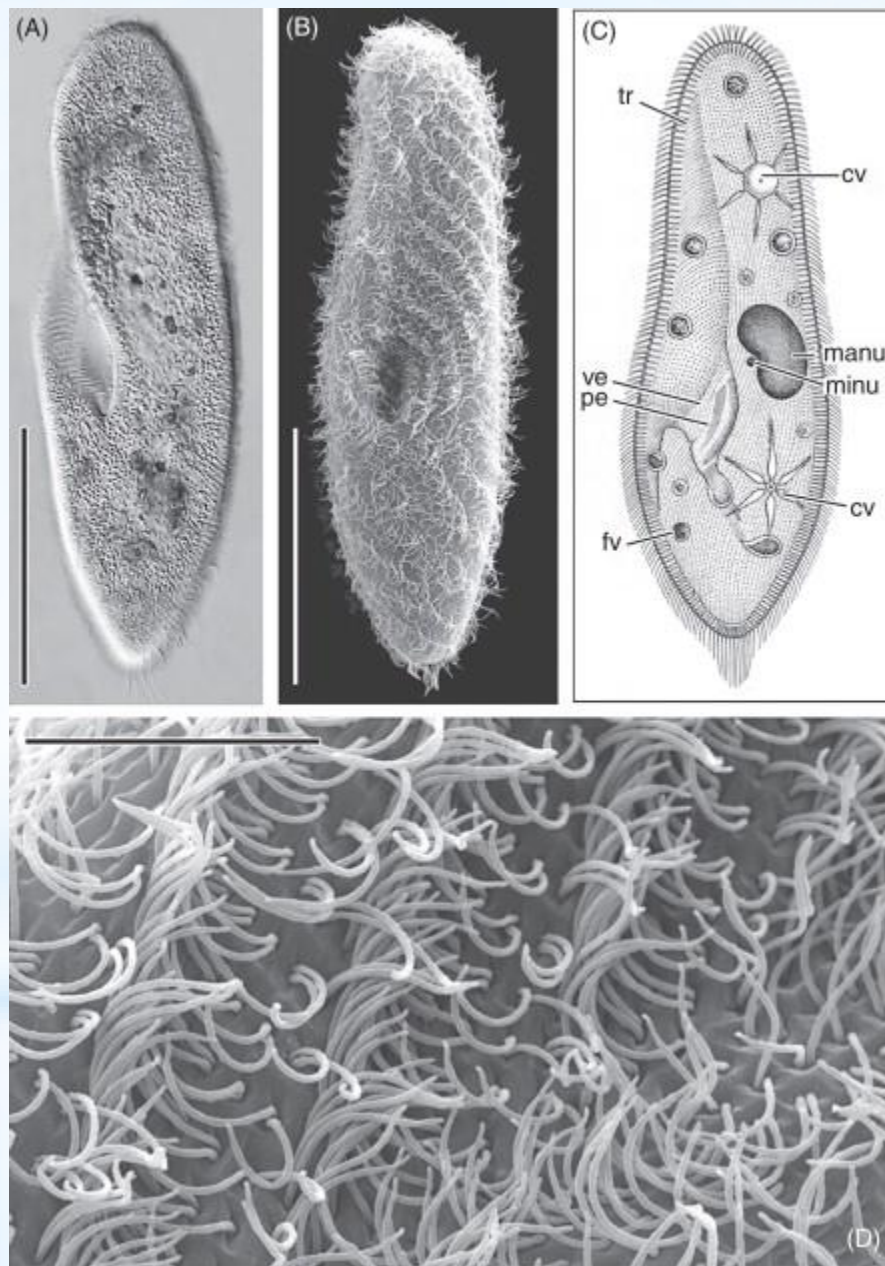
✓ این رنگ در ۱۰۰ سی سی آب مقطر با افزودن بلورید به میزان ۱ گرم به یدور پتاسیم به میزان ۲ گرم تهیه می شود و aquatic میباشد و اندامک های حرکتی را به رنگ زرد طلایی در می آورد.

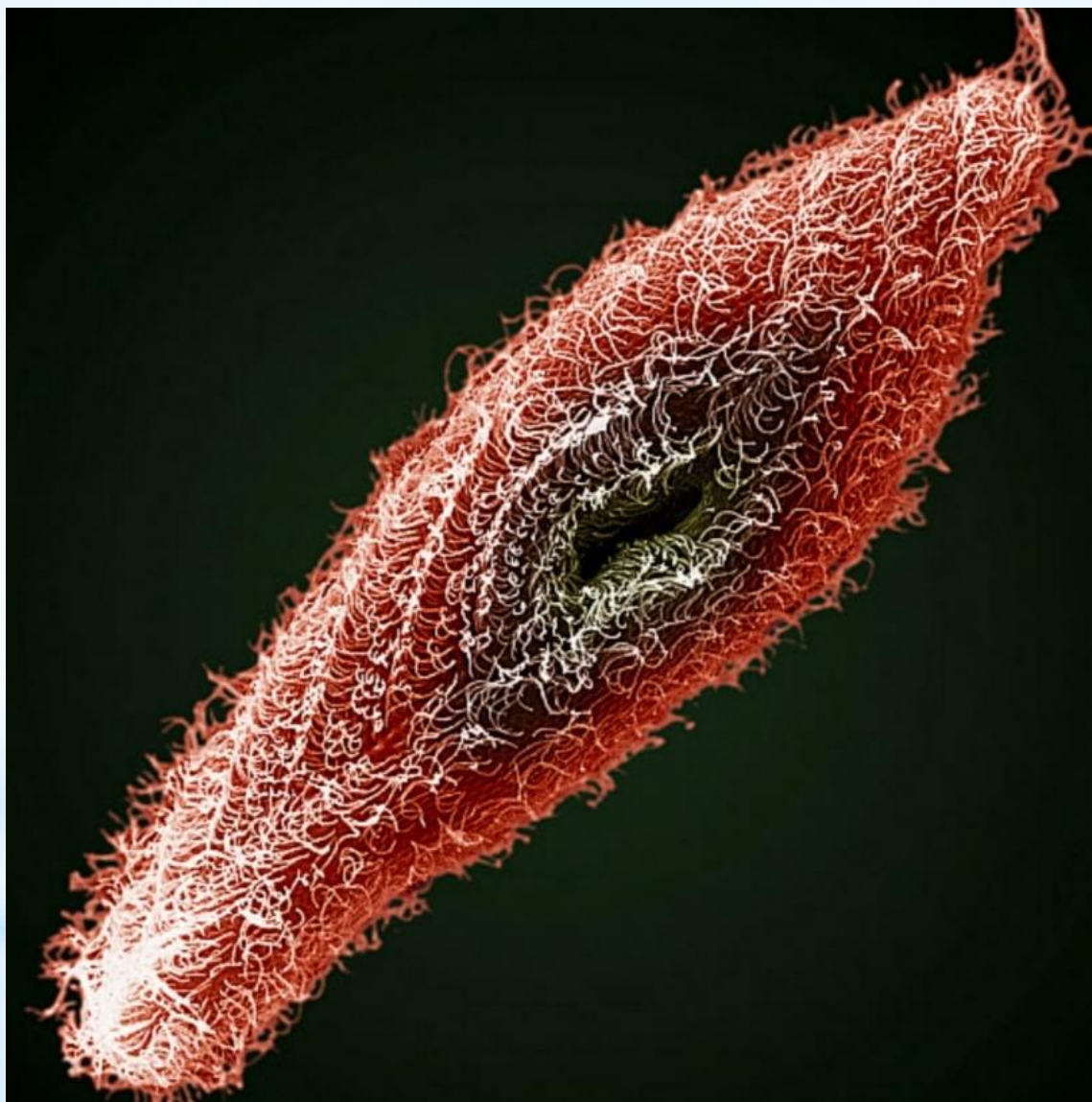
مژک Cilia

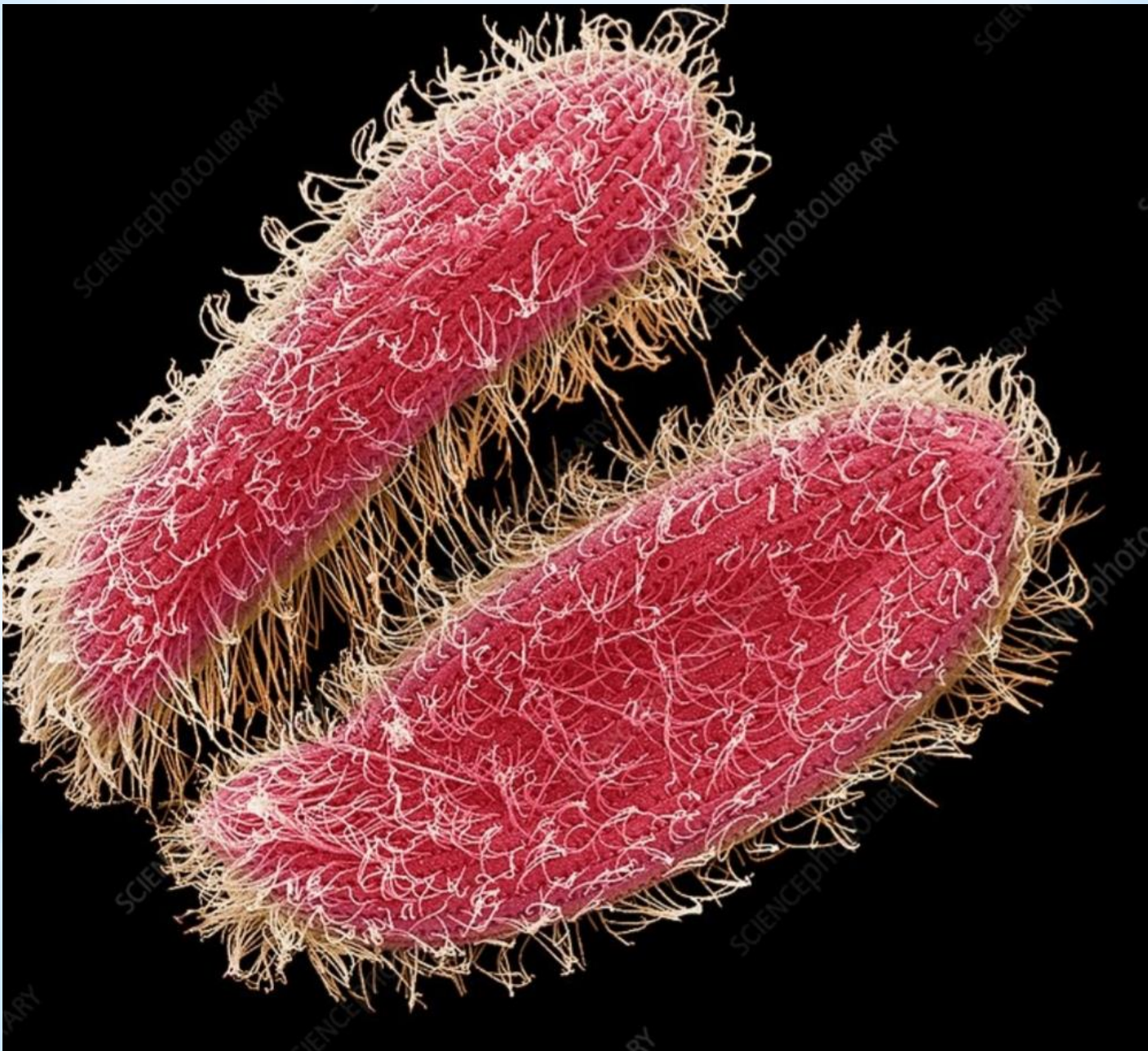




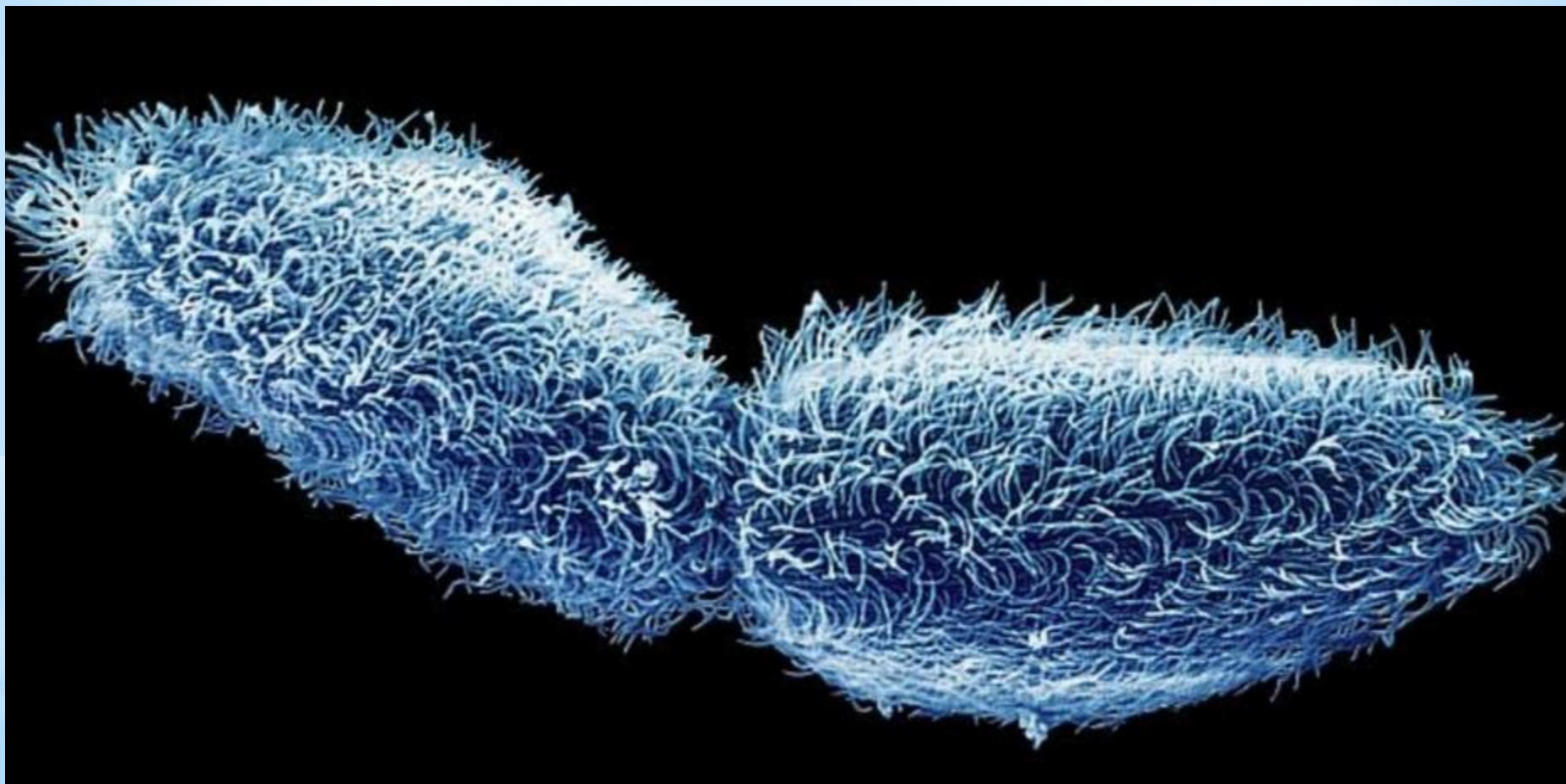












هسته nucleus

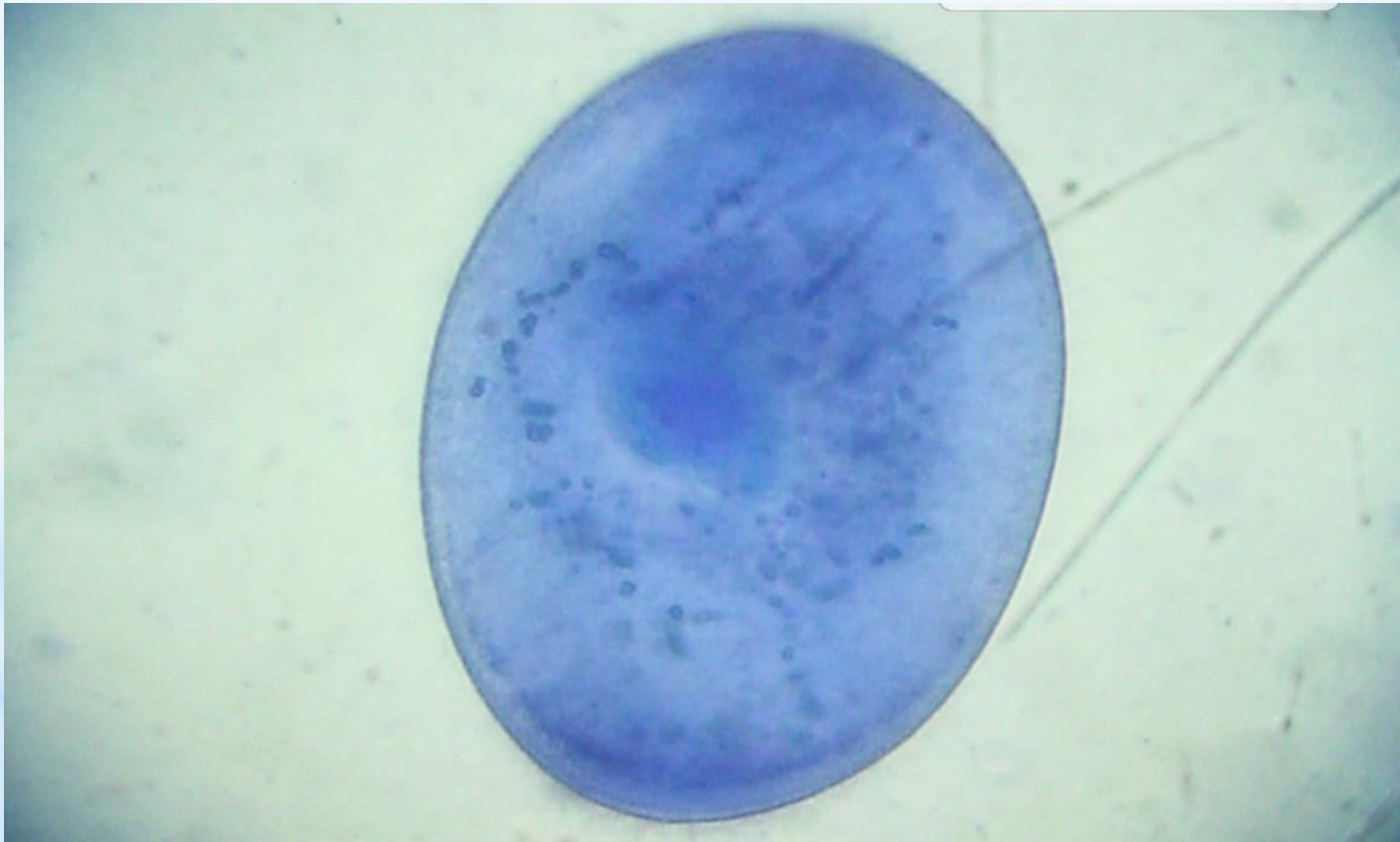
شکل و اندازه و تعداد هسته در تک یا ختگان بسیار متنوع است و به ابعاد مختلف دیده می شود. اکثر تک یا ختگان یک هسته دارند اما برخی از آن ها در تمام یا دوره ای از زندگی خود ممکن است بیش از یک هسته داشته باشند.

به منظور مشاهده هسته از رنگ حیاتی آبی متیل یا methylene blue استفاده می شود. این رنگ هسته را 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 تا مولکول های رنگ از غشا دو لایه هسته عبور کند و با پروتئین های ساختاری هسته ترکیب گردد. در این مدت زمان میتوان viability غشا سلول زنده را نیز بررسی نمود.

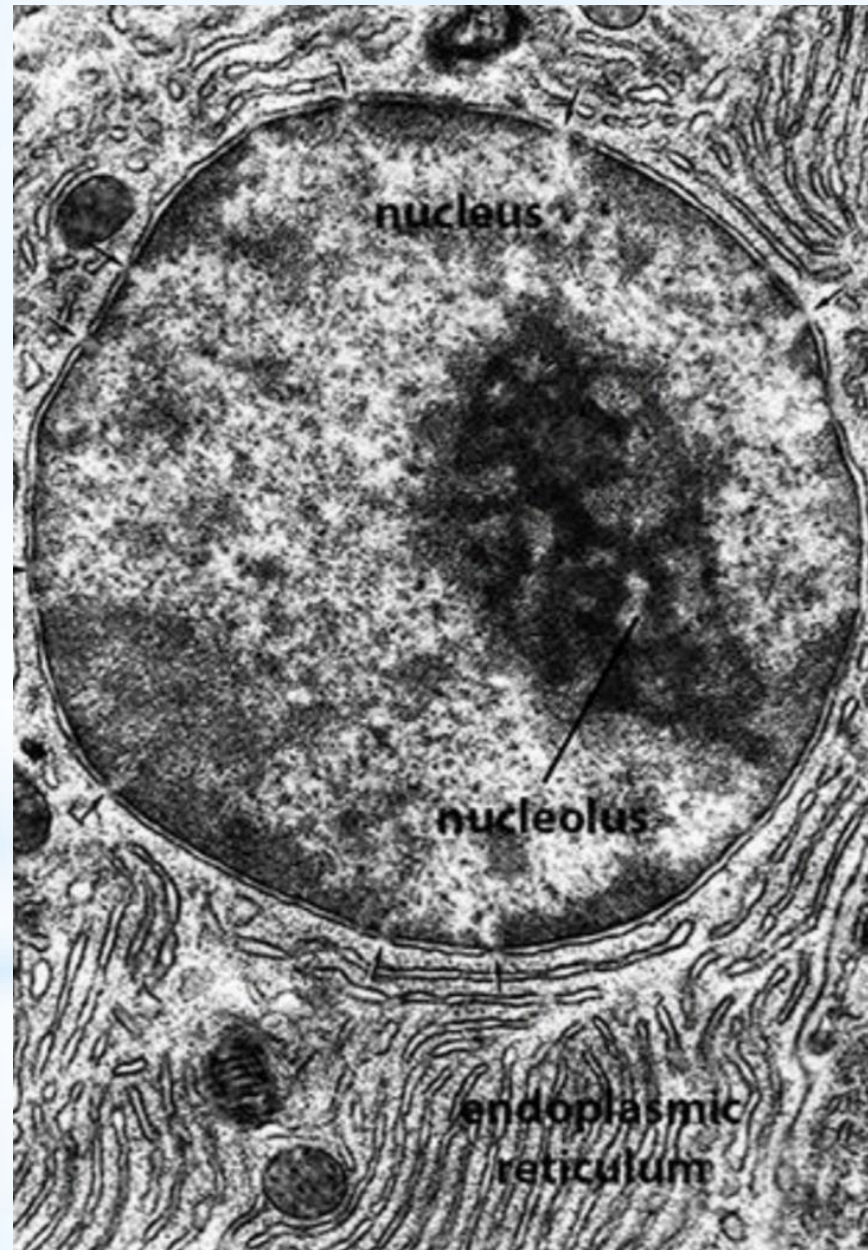
طرز ساخت رنگ حیاتی آبی متیل

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

هسته nucleus







غشاء پلاسمایی Plasmalemma

غشاء پلاسمایی مرز بین سلول و محیط خارج سلول است و جایگاه اصلی مبادله مواد بین سلول و محیط اطراف یا سلول مجاور می باشد. به علاوه در حفظ ترکیبات سلول، شناسایی ترکیبات خارجی، برقراری اتصالات سلولی، ایمنی و سازگاری سلول با محیط اطراف و سلول های 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 سيتوپلاسمی cytoplasmic streaming

✓ واژه سیکلوز به معنی چرخندگی می باشد و به مفهوم: جریان چرخشی یا منظم درون سيتوپلاسمی 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 سيتوپلاسم 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 متوالی و دنبال کردن مسیر حرکت آنها در سيتوپلاسم با چشم میتوان جریان سيتوپلاسمی در سلول را مشاهده کرد.



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 و لامل
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 درون سلولی 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 آزمایش 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 پاستورپیت روی لام قرار داده و یک قطره رنگ قرمز خنثی بر روی آن ریخته، پس از لامل گذاری در بزرگنمایی $40\times$ 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 پررنگ‌تر 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 میتوکنندری از سبز ژانوس استفاده کرده، لامل گذاری کنید و ابتدا در بزرگنمایی $40\times$ و پس از ثابت شدن تک یاخته در بزرگنمایی $100\times$ این اندامک ها را مشاهده کنید. به فرم عمومی آن ها توجه کنید که شبیه باکتریها هستند. بدیهی است که به دلیل کوچکی و شفافیت آن ها بایستی کلیه امکانات تنظیم نور و کنتراست در میکروسکوپ به کار گرفته شود و با تنظیم پیچ میکروفوکوس این اندامک دقیقاً بررسی شود. به زنده بودن تک یاخته ها توجه کنید.

همچنین در تک‌یاخته‌های زنده حرکت میتوکنندری 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.

تک‌یاخته‌هایی 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 تک یا ختگان 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 نمونه های زنده هسته را مشاهده کنید. دقت کنید پس از چند دقیقه هسته متمایز می شود. 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 یا خته ها حیات خود را از دست می دهند بدین ترتیب نفوذپذیری انتخابی غشا را در این قسمت با طرف دیگر لام مقایسه کنید.