



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

عنوان

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

اهداف

مشاهده و بررسی واکوئل غذایی (Food vacuole) و انقباضی (Contractile 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 خاص از نظر نوع محلول سازنده، اسیدیته و مولاریته آن 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 حیاتی تبدیل به 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

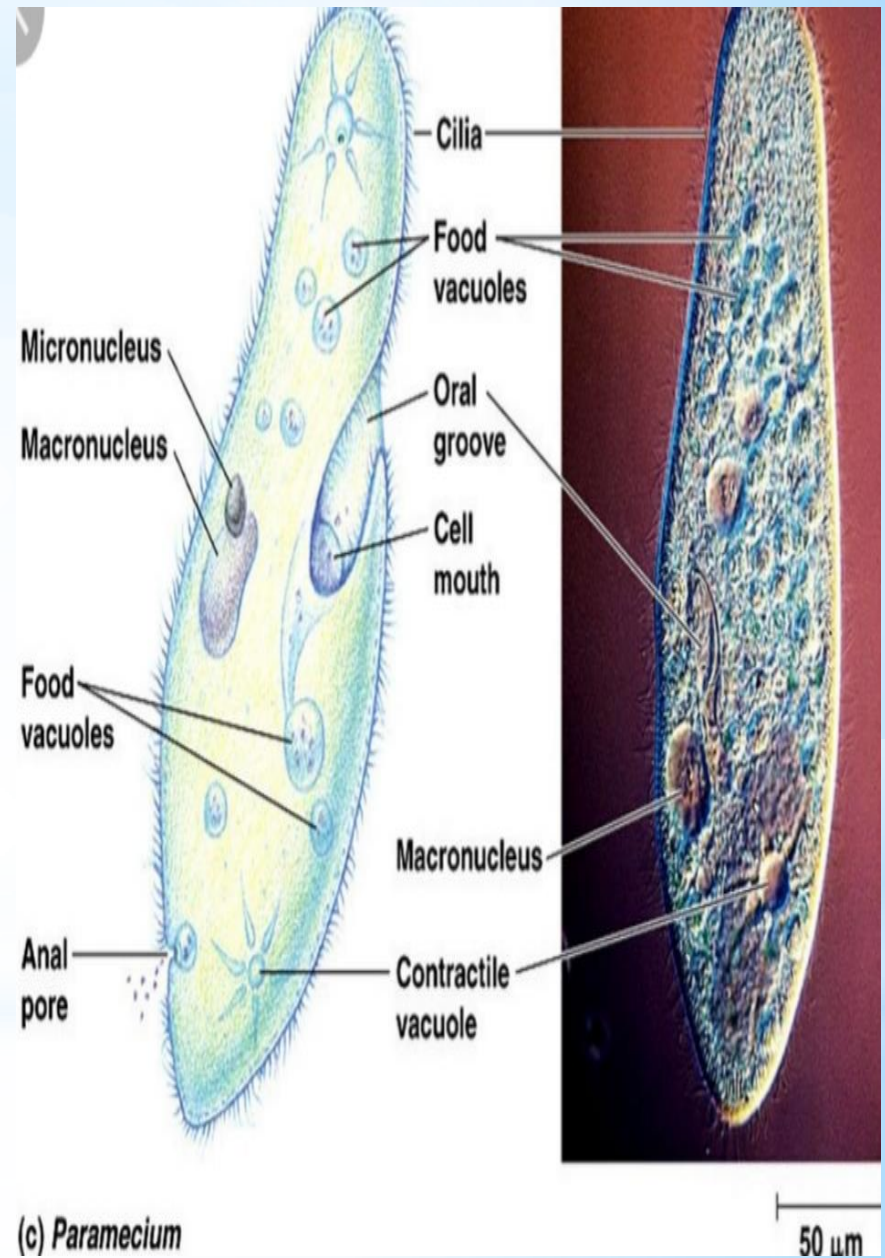
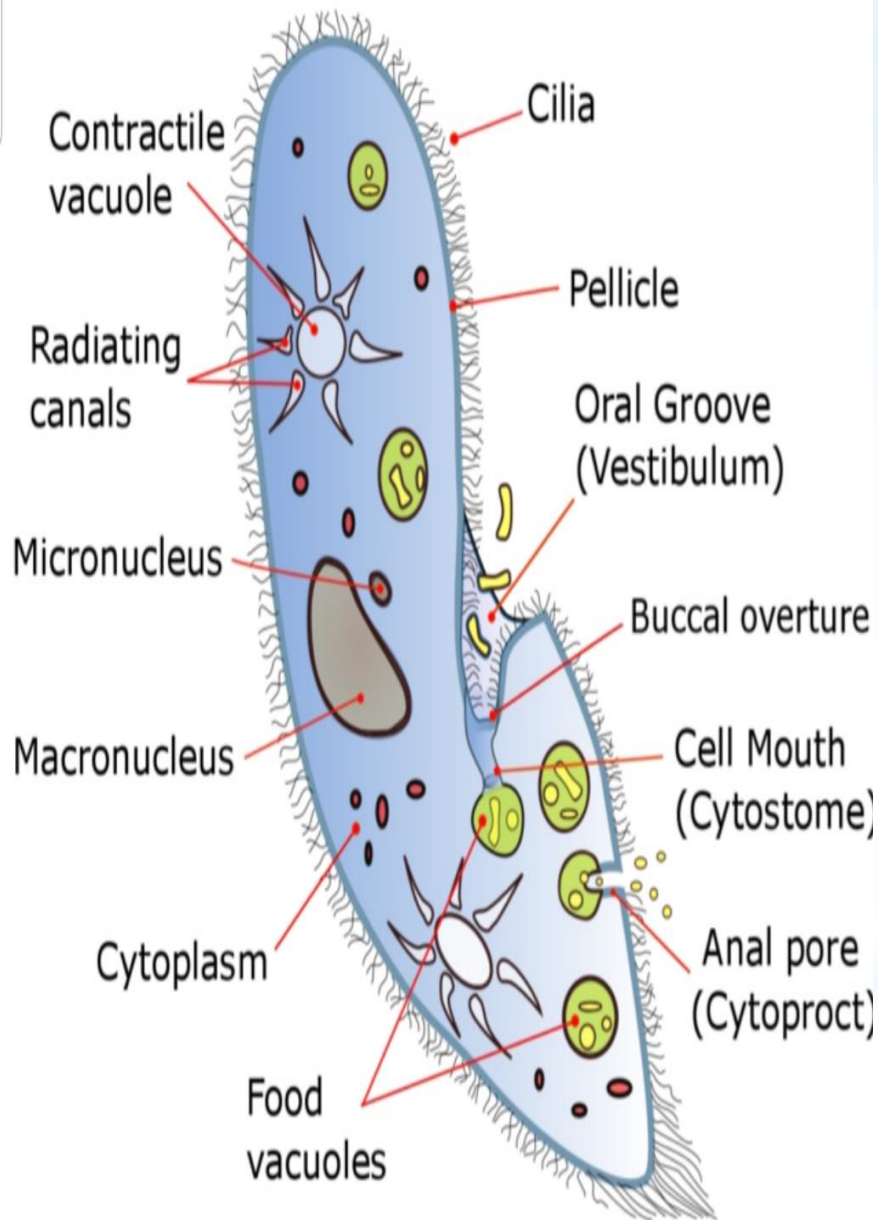
- ✓ غلظت، pH و مولاریته محلول رنگی بایستی دقیق و متناسب با شرایط نمونه باشد.
- ✓ میزان رنگ مورد استفاده در طول رنگ آمیزی بقدر کافی باشد و بیش از حد ظرفیت سلول استفاده نشود.
- ✓ نوع محلول مورد استفاده جهت ساخت رنگ (اسیدی، الکلی، آبی، سرم فیزیولوژیکی و...) بدقت تهیه شود.
- ✓ مدت زمان رنگ آمیزی زیاد طول 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 هایی مثل پارامسی با استفاده از رنگ های حیاتی و غیر حیاتی به صورت اختصاصی رنگ می شوند.

پارامسی Paramecium

پارامسی ها، پروتوزوئر های تک سلولی از شاخه مژکداران هستند که در آب های آرام و آبگیر های راکد زندگی میکنند و بخش اصلی زنجیره غذایی را تشکیل می دهند. آنها از پسماندهای جلبک ها و سایر موجودات ریز تغذیه کرده و خودشان توسط موجودات دیگر بلعیده می شوند. تمام اعضای شاخه مژکداران به وسیله اندام 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) که فعالیت هایی مثل تنفس، سنتز پروتئین و هضم غذا را کنترل میکند.

هسته کوچک (میکرونوکلئوس) تنها در زمان تولید مثل فعالیت دارد. تولید مثل جنسی در پارامسی با تبادل DNA بین هسته های کوچک همراه است. در این زمان دو پارامسی از طول بهم می چسبند و هسته ها از طریق دهان سلولی به هم ملحق می شوند. به این تولید مثل کانبوگیشن یا گشنگیری می گویند که نوعی تولید مثل جنسی در میکروارگانسیم هاست.



شناسایی اندامک های درون سلولی با استفاده ازنگ آمیزی حیاتی و غیرحیاتی واکوئل vacuole

واکوئل ها در سلول دو نوع هستند یا انقباضی و مسئول تنظیم فشار اسمزی درون سلولی **Contractil vacuole** و یا غذایی و محل تجمع ذرات غذایی می باشند **Food vacuole** واکوئل های انقباضی رنگ نمی پذیرند و دو عدد به حالت گرد و مدور در دو طرف پیکر تک یاخته ای مثل پارامسی واقع شده اند. واکوئل های غذایی متعدد بوده و به تدریج ذرات غذایی محیط را در خود انباشته می کنند و دریافت و جذب ذرات غذایی را به عهده دارند. جهت مشاهده این اندامک ها از رنگ حیاتی با غلظت پایین قرمز خنثی **neutral red** استفاده می شود.

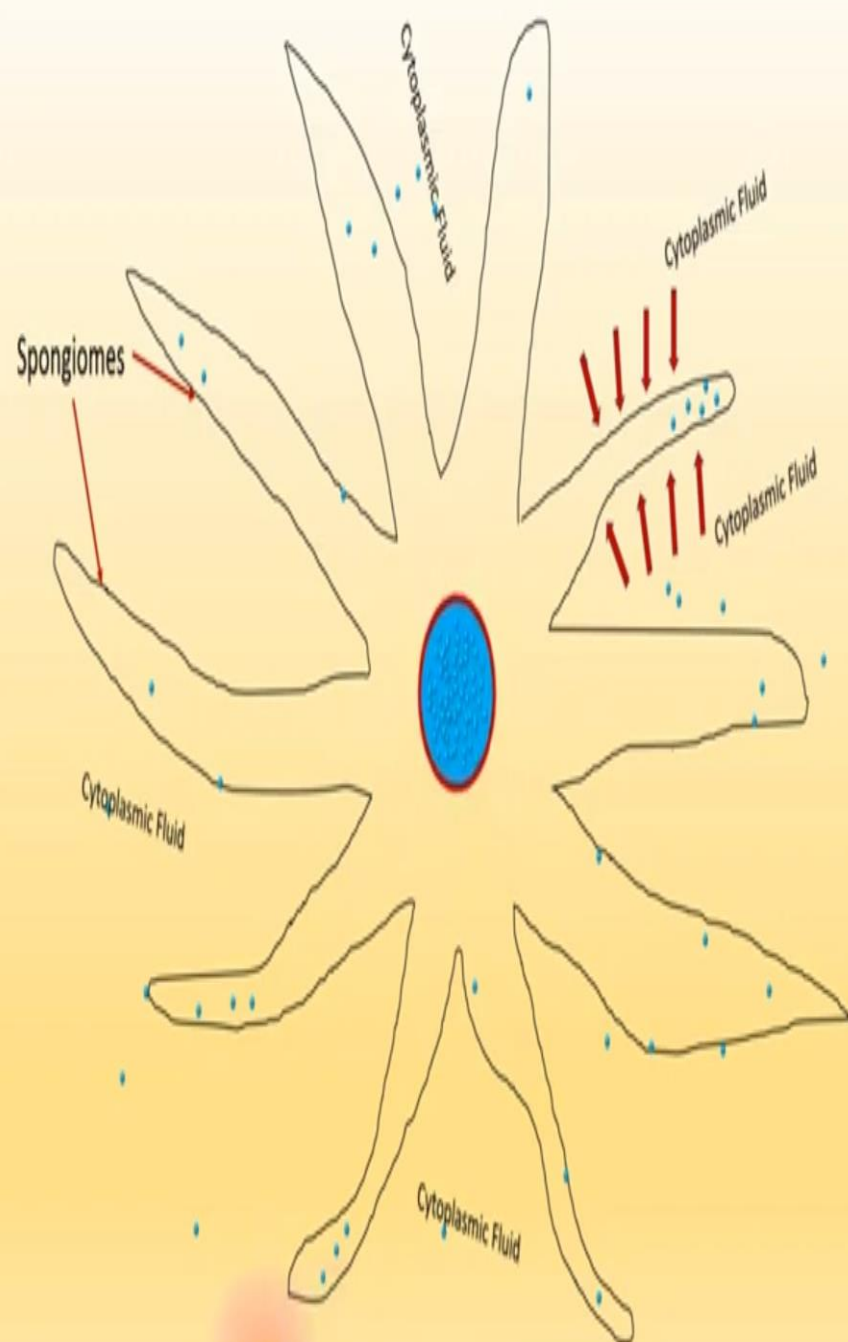
طرز ساخت رنگ حیاتی قرمز خنثی

0.001-0.01 گرم رنگ قرمز خنثی در 100 سی سی آب یا الکل مطلق حل شود (Alcoholic or Aquatic). در رابطه با تک یاخته هایی مثل پارامسی از آب جهت تهیه رنگ استفاده می شود چون الکل باعث مرگ آنها می شود. این رنگ پس از تهیه دارای ذرات کلوئیدی و غیر قابل حل می باشد و تک یاخته بعنوان غذا ذرات رنگ را بلعیده و واکوئل های گوارشی آن به رنگ قرمز کم رنگ مشاهده می شوند.

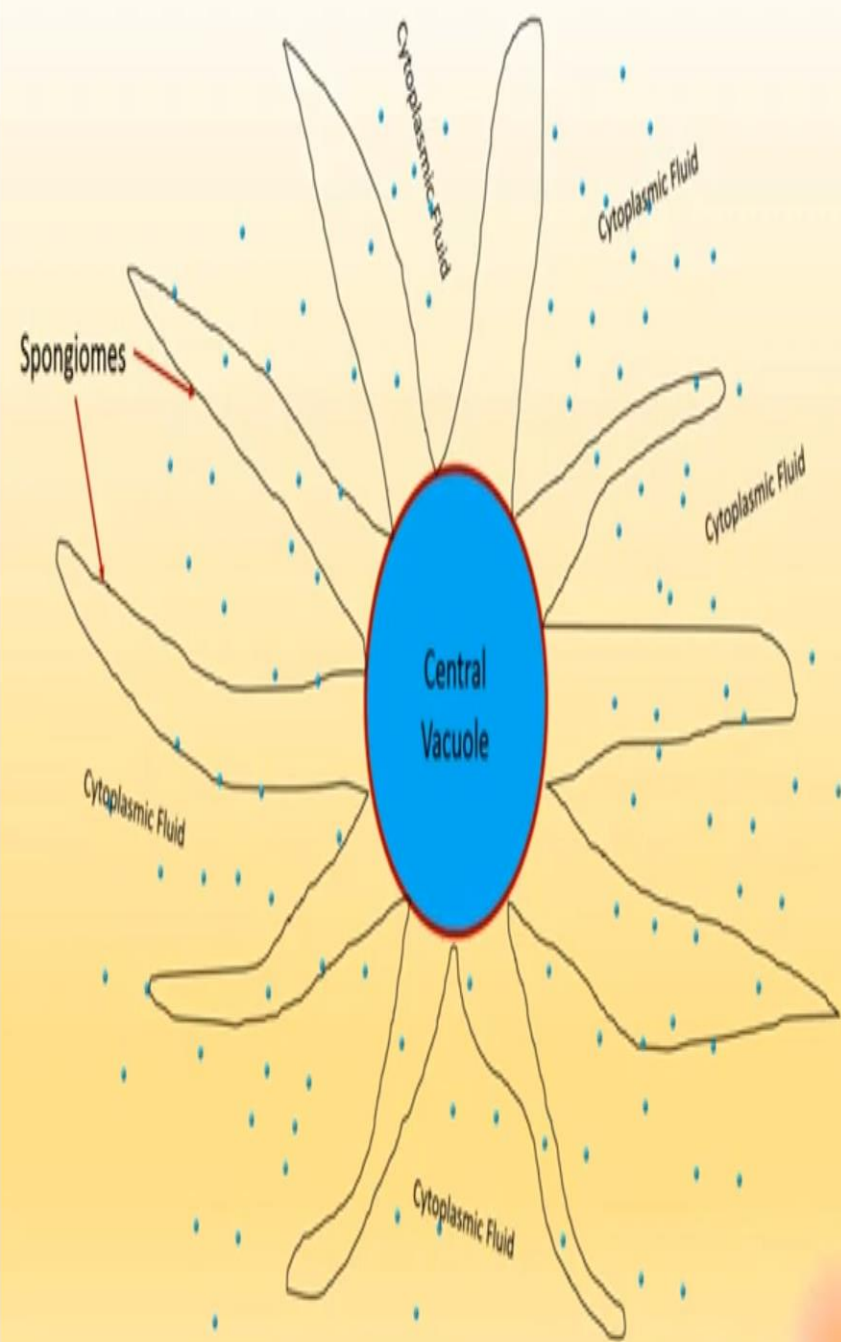
در پارامسی های آب شیرین که سیتوپلاسم آنها نسبت به محیط اطراف از نظر اسمزی هایپر تونیک یا غلیظ تر می باشد در این شرایط اسمزی آب به داخل سلول جریان می یابد و پس از آن به داخل واکوئل انقباضی Contractil vacuol یا واکوئل ضربان دار که یک اندامک درون سلولی است منتقل می شود.

هر پارامسی دو عدد واکوئل انقباضی در دو قطب مخالف سلول خود دارد که متناوباً فعالیت می کنند. مرحله ای که آب به داخل واکوئل مرکزی جریان می یابد دیاستول و بیرون راندن آب اضافی و انقباض آن را سیستول می گویند. این دو مرحله در واکوئل های انقباضی ریتمیک و دوره ای 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 می کشد و بدین ترتیب فشار اسمزی سلول پارامسی تنظیم و مانع از ترکیدن آن می شود به این عمل osmoregulation می گویند.

این اندامک با یک مکانیسم محافظتی از جذب بیش از حد آب به داخل سلول و پارگی و ترکیدن تک یاخته به دلیل فشار بالای آب جلوگیری می کند. بدین ترتیب که ابتدا کانال های شعاعی ظریف اطراف واکوئل انقباضی آب را از سیتوپلاسم جذب کرده و پس از پر شدن به داخل واکوئل مرکزی انقباضی پمپاژ می کنند. مکانیسم این عمل بدلیل وجود و عملکرد پمپ های پروتون و NADPH و ATPase در غشاء می باشد و در نهایت آب اضافی از طریق منافذ موجود در غشاء سلولی دفع می شود.



مشاهده واکوئل انقباضی در حالت دیاستول



مشاهده واکوئل انقباضی در حالت سیستول

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 و تجمع ذرات غذایی در واکوئل های غذایی تدریجی است.

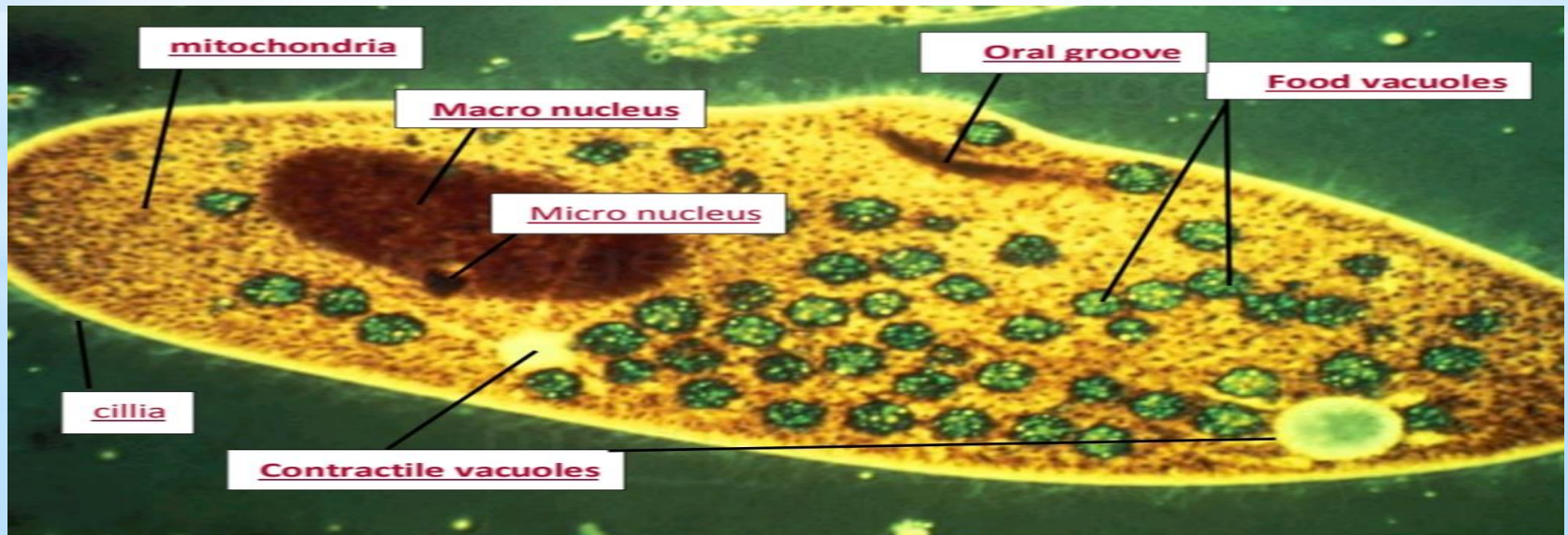
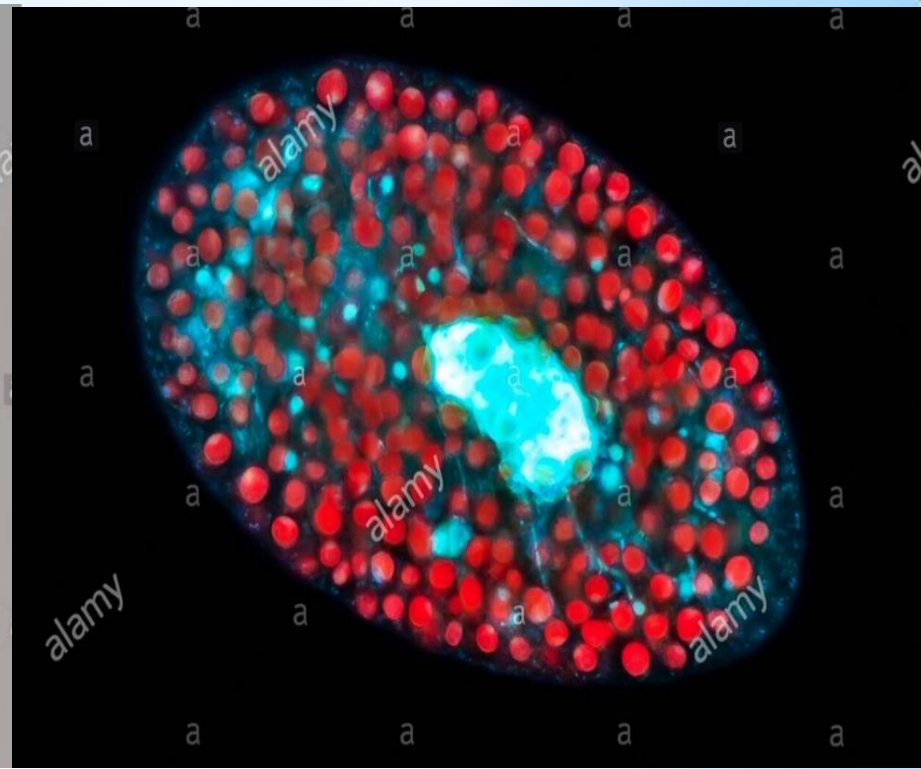
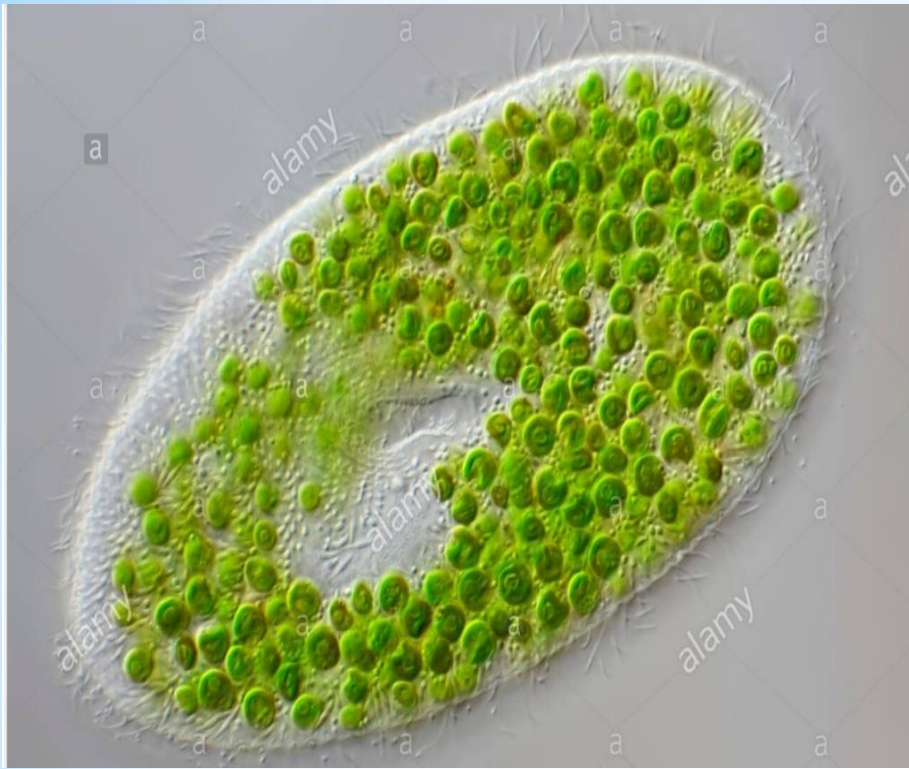
بنابراین تجمع تدریجی رنگ قرمز خنثی Neutral red در واکوئل های غذایی و تغییر رنگ آن ها به قرمز کم رنگ تا پر رنگ بر حسب تجمع رنگ کمی پس از رنگ آمیزی در زیر میکروسکوپ قابل مشاهده می باشد.



واکوئل غذایی و طرز تشکیل آن Food vacuole







میتوکندري mitochondria

میتوکندري ها 25 درصد حجم سلول هاي یوکاریوت را اشغال کرده و جایگاه تنفس سلولي هستند. این اندامکها در میکروسکوپ نوري با استفاده از تکنیک هاي رنگ آميزي حیاتي قابل مشاهده اند، اما جزئیات ساختاري و فراساختاري آنها فقط با میکروسکوپ الکترونی گذاره قابل مشاهده می باشد.

ساختار آنها شبیه به باکتری هاي گرد تا میله اي شکل بوده و قطري بين 1-0/5 میکرون دارند و طول آنها حدود 1-2 میکرون می باشد. پس از هسته، واکوئل و کلروپلاست، بزرگترین اندامک های درون سلولي هستند. تقسیم آنها به صورت دوتایی (Binary fission) بوده که در طول چرخه سلولي اندازه آنها دو برابر و سپس تقسیم می شوند. مطالعه میتوکندري به دلیل شفافیت زیاد و ضریب شکست کمی که دارد، توسط میکروسکوپ نوري معمولي در سلول هاي زنده قدری مشکل است و با میکروسکوپ زمینه متضاد phase contrast و افتراقي فاز متضاد تداخلي DIC دقیقتر و با کنتراست بالاتر مشاهده می شود.

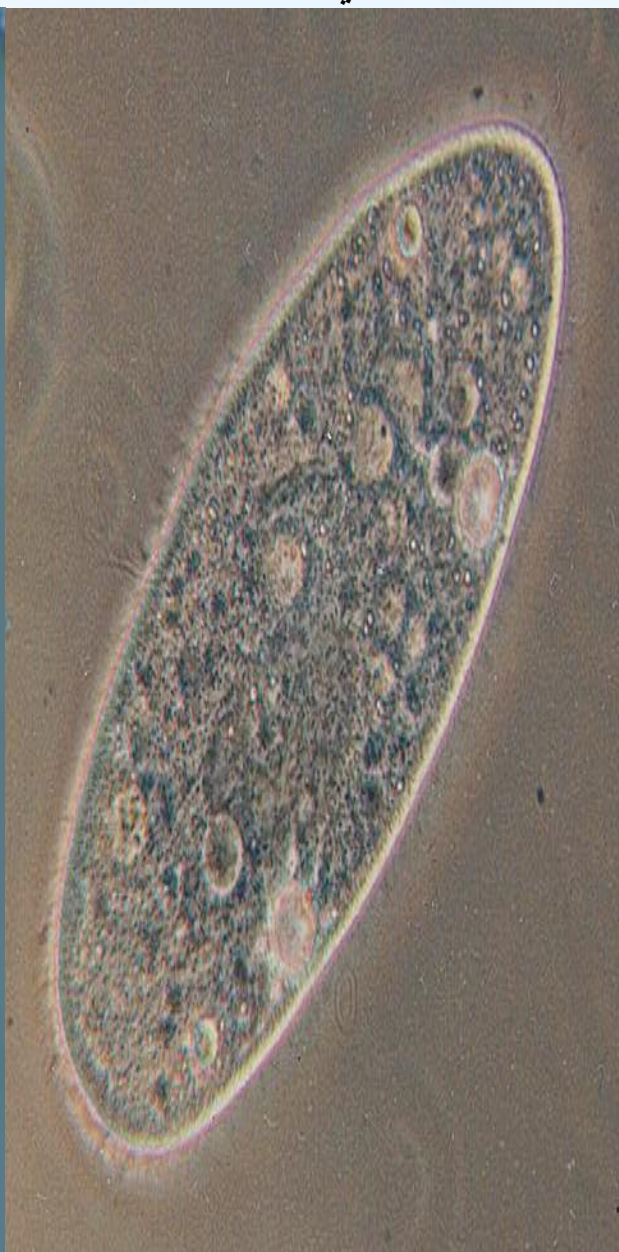
در میکروسکوپ‌های نوری جهت بررسی آن‌ها به حالت زنده از محلول رنگی سبز ژانوس یا Janus green B استفاده می‌کنیم که این رنگ ساختار میتوکندری را به رنگ سبز-آبی کم رنگ در می‌آورد. از آنجایی که در ساختار غشای داخلی میتوکندری آنزیم سیتوکروم اکسیداز موجود در چرخه تنفسی سلولی با این رنگ واکنش می‌دهد، رنگ سبز ژانوس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

طرز ساخت رنگ حیاتی سبز ژانوس

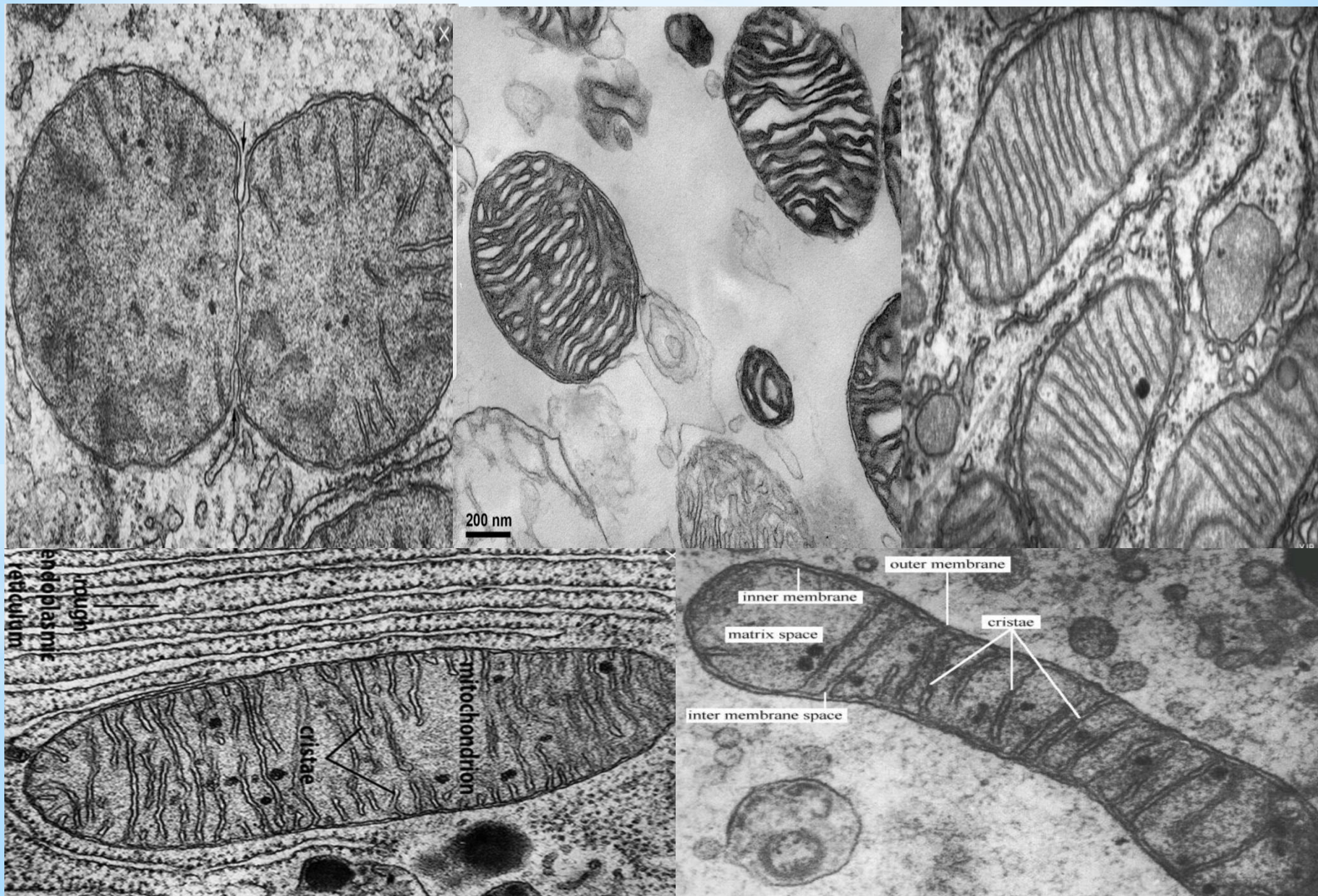
این رنگ با غلظت بسیار پایین 0.004 گرم در 100 سی سی آب یا الکل مطلق به صورت 0.004 درصد، ساخته می‌شود.



میتوکندري mitochondria



مراحل بلوغ و تکامل میتوکندری در سلول تحت میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن



اندامک حرکتی cilia

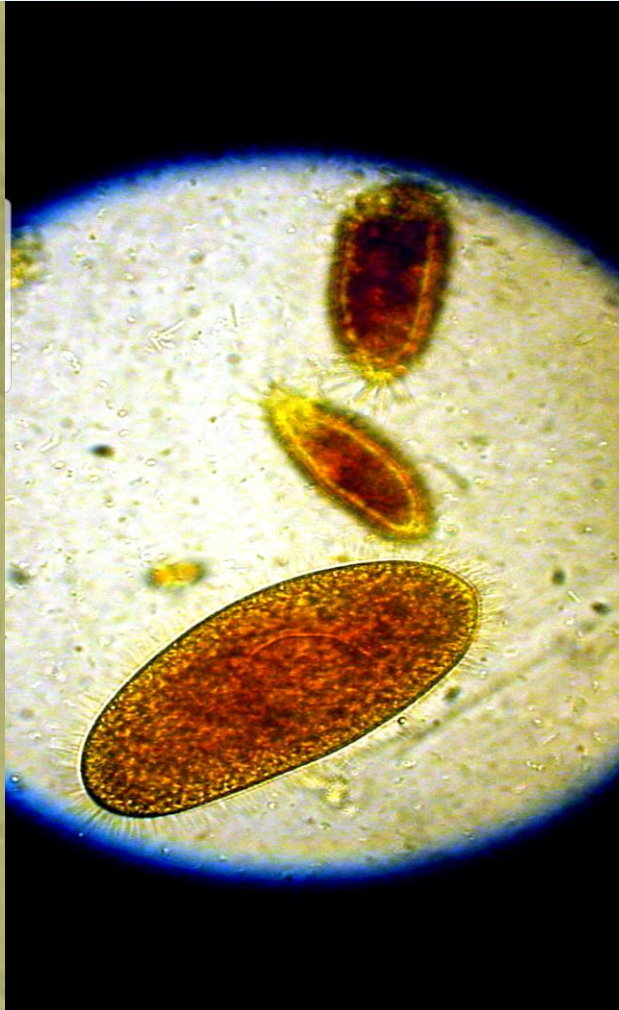
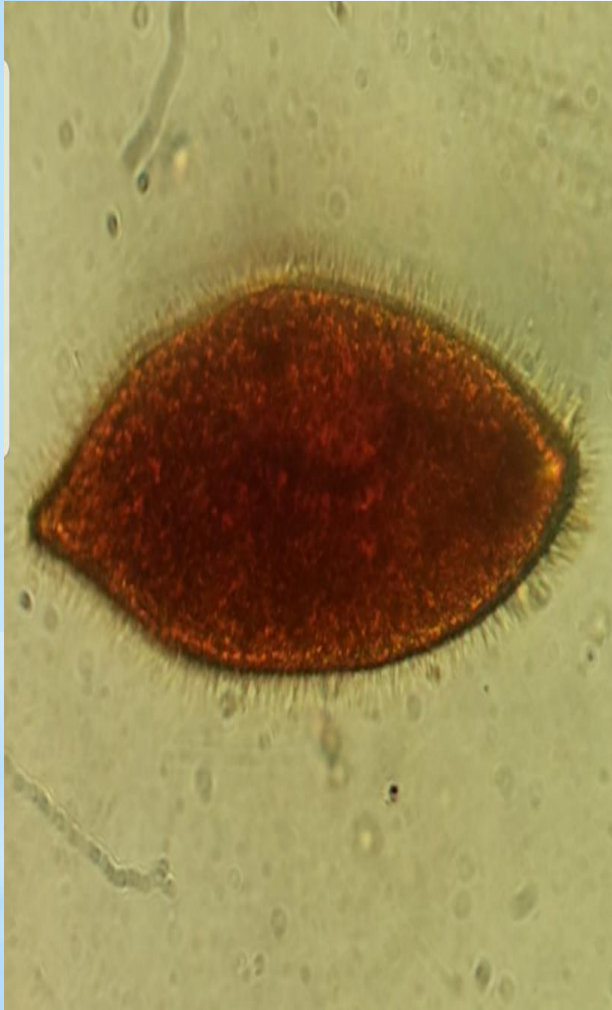
در تک یاخته ها زوائد دائمی حرکتی مژک ها (Cilia) و تاژک ها (flagella) می باشند که ساختاری کاملاً مشابه دارند و از تعدادی میکروتوبول با نظم خاصی تشکیل یافته اند. تفاوت مژک ها و تاژک ها عمدتاً در طول و تعداد آن هاست. اگر طول کم و تعداد زیاد باشد مژک گفته می شوند. حرکت تاژک ها به صورت موجی و از رأس به طرف 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.

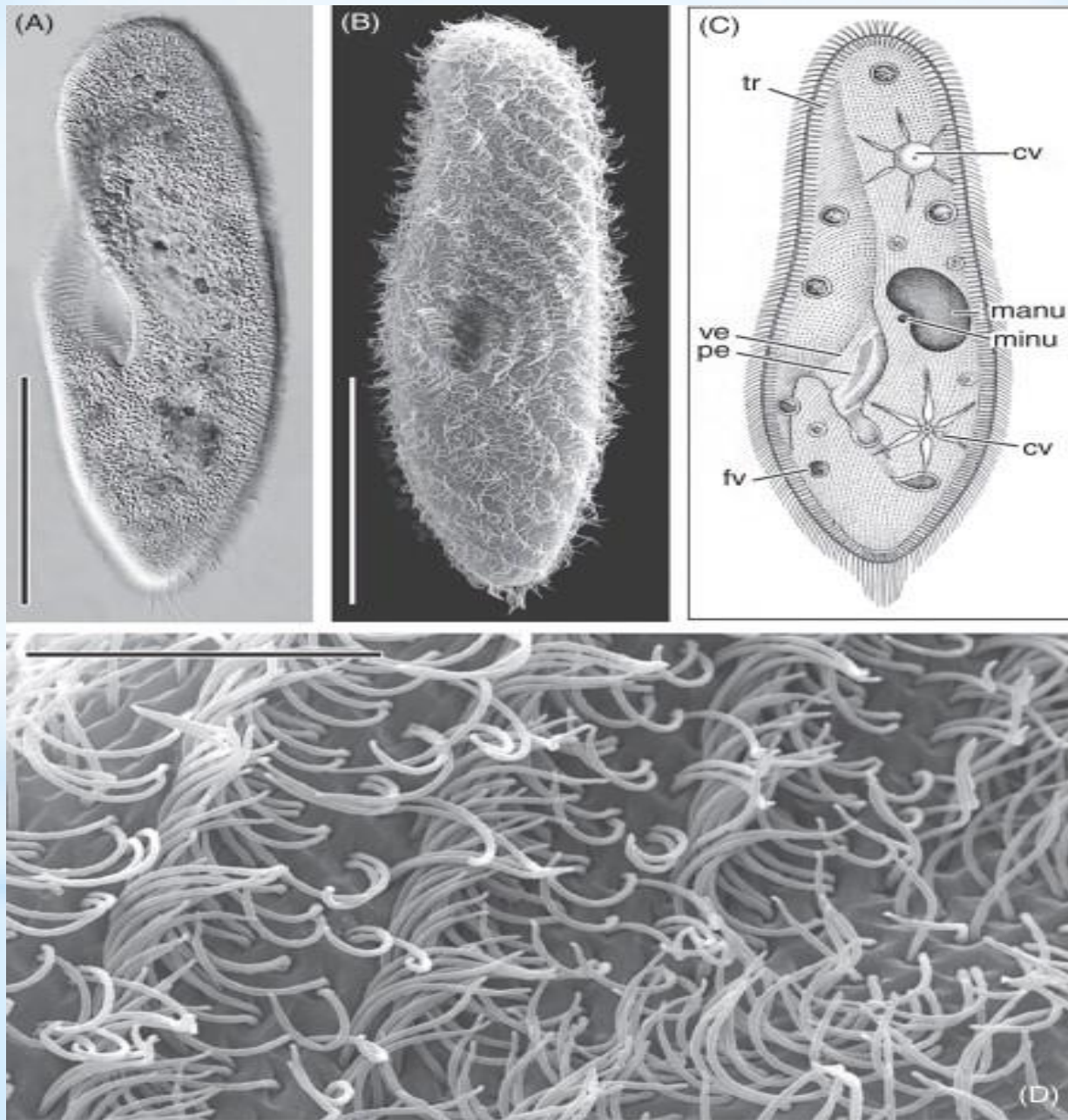
جهت مشاهده ساختار حرکتی مژه یا تاژک از رنگ غیر حیاتی لوگل lugol یا یدیدوره یا ید دور پتاسیم (IKI) استفاده می شود. این رنگ در آب مقطر و با افزودن بلور ید و یدور پتاسیم تهیه می شود. بلور ید به دلیل سمی بودن برای سلول های زنده در غلظت استفاده شده، این رنگ آمیزی را غیر حیاتی می سازد.

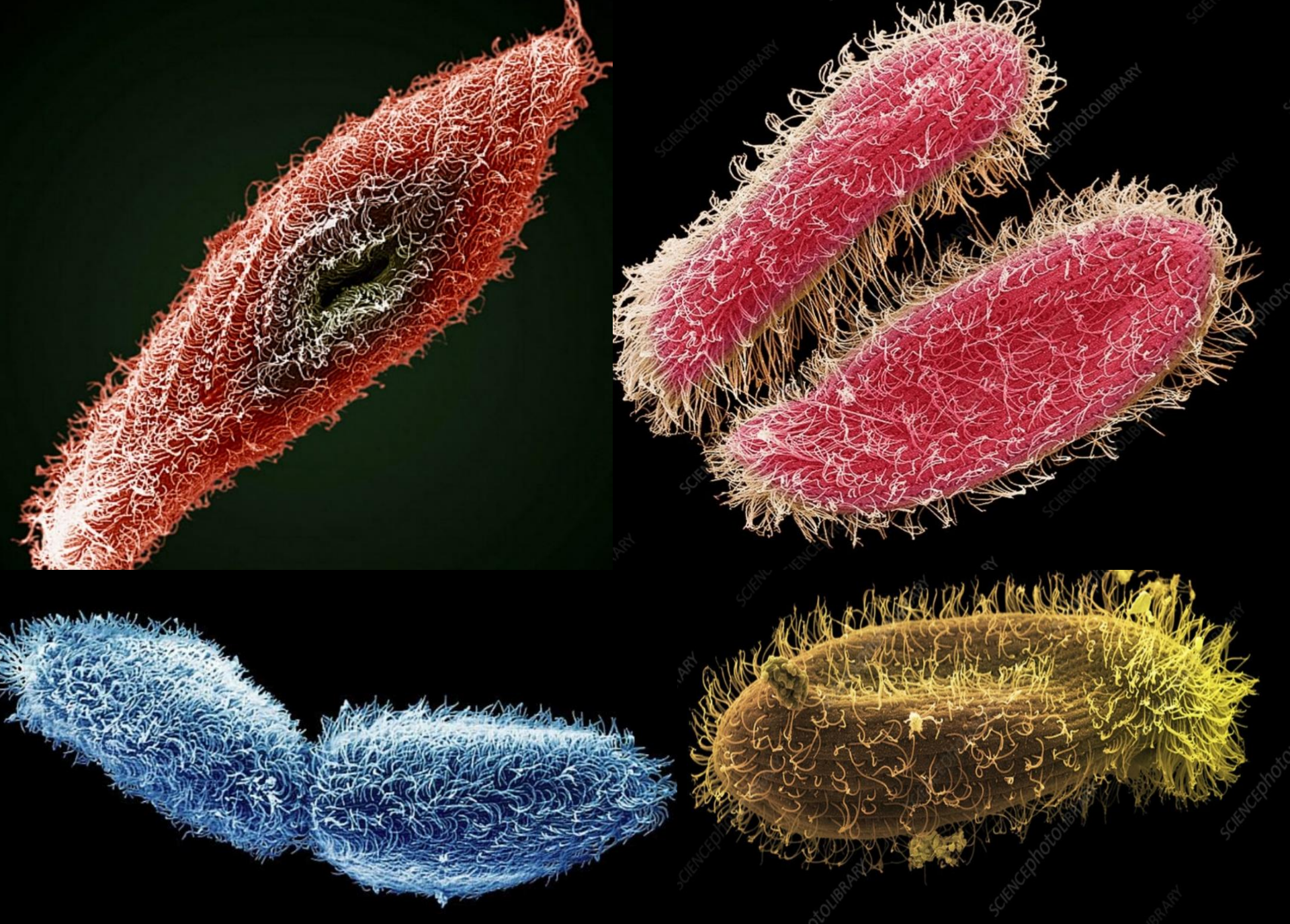
طرز ساخت رنگ غیر حیاتی لوگل

این رنگ در 100 سی سی آب مقطر با افزودن بلور ید به میزان 1 گرم به یدور پتاسیم به میزان 2 گرم تهیه می شود و aquatic می باشد و اندامک های حرکتی را به رنگ زرد طلایی در می آورد.

مژک Cilia







هسته nucleus

شکل و اندازه و تعداد هسته در تک یاختگان بسیار متنوع است و به 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.

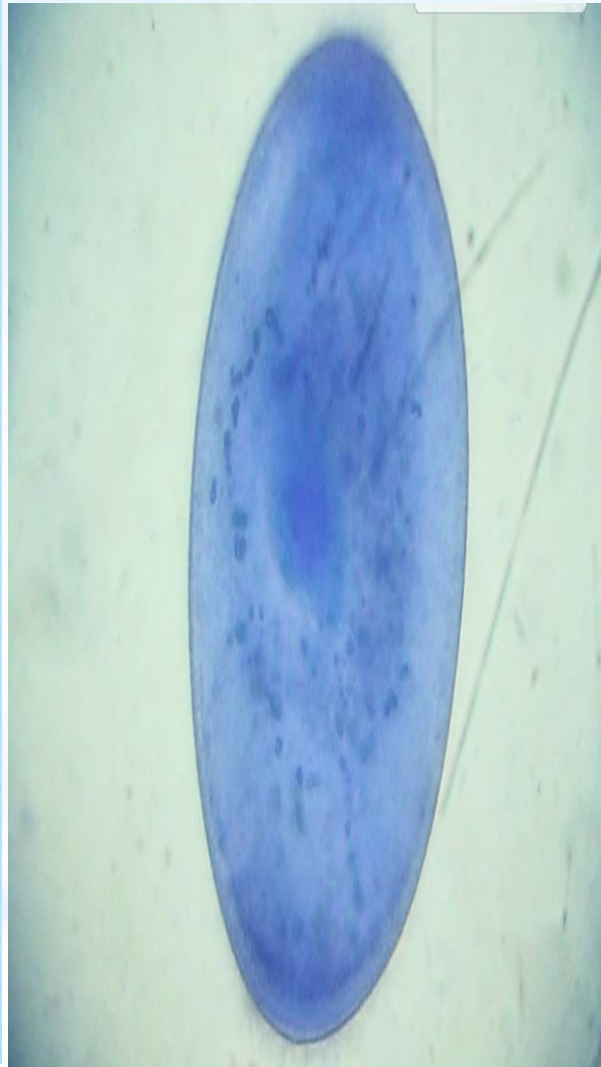
به منظور مشاهده هسته از رنگ حیاتی آبی متیل یا methylene blue استفاده می شود. این رنگ هسته را به رنگ آبی آسمانی کم رنگ درمی آید. رنگ آمیزی هسته توسط آبی متیل تدریجا انجام می شود و حدود 5 الی 10 دقیقه طول می کشد تا مولکول های رنگ از غشا دو لایه هسته عبور کند و با پروتئین های ساختاری هسته ترکیب گردند. در این مدت زمان میتوان viability غشا سلول زنده را نیز بررسی نمود.

طرز ساخت رنگ حیاتی آبی متیل
0.01 گرم رنگ آبی متیل در 100 سی سی آب مقطر حل شود بدین ترتیب رنگ با غلظت پایین 0.01 درصد آب مقطر aquatic تهیه می شود.

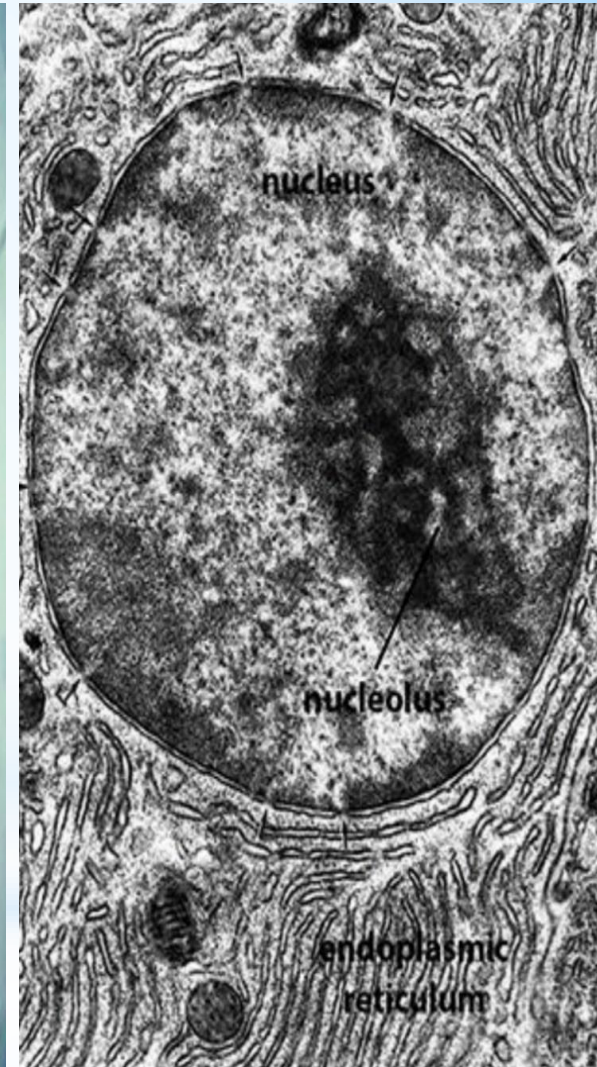
هسته nucleus



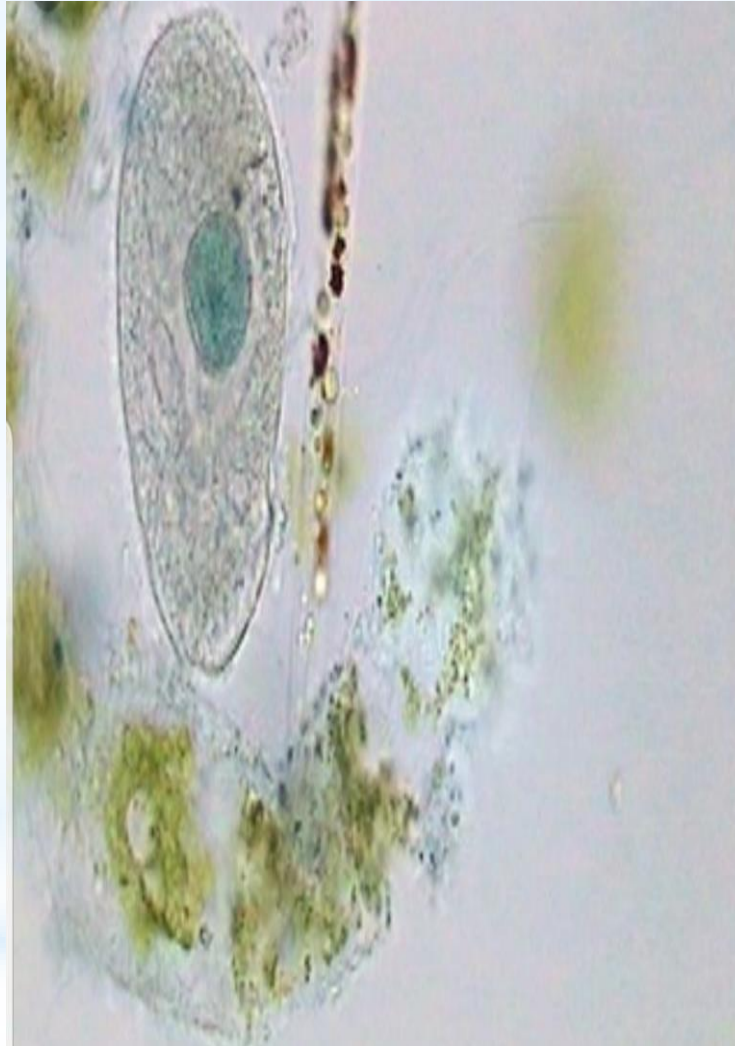
مشاهده هسته رنگآمیزی توسط آبی متیل
بیانگر **viability** غشا سلول زنده



مشاهده هسته رنگآمیزی توسط آبی متیل
بیانگر عدم وجود **viability** غشا سلول زنده



مشاهده هسته در میکروسکوپ
الکترونی



مشاهده هسته رنگآمیزی توسط سبز متیل
بیانگر viability غشا سلول زنده

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 Viability یا زنده بودن و نفوذ پذیری انتخابی غشاء یک سلول زنده نیز، می توان از رنگ های حیاتی استفاده کرد که شرح آن در روش کار آمده است.

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 متوالی و دنبال کردن مسیر حرکت آنها در سیتوپلاسم با چشم میتوان جریان سیتوپلاسمی در سلول را مشاهده کرد.



مواد و وسایل مورد نیاز

مواد و وسایل مورد نیاز

1. محیط کشت هی HEY

2. قرمز خنثی

3. سبز ژانوس

4. لوگل (ید یدوره)

5. آبی متیل یا سبز متیل

6. فرمالین

7. لام و لامل

8. پاستور پیپت

9. 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، ذرت 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 يك قطره از محیط هی را توسط پاستورپیپت روی لام قرار داده و يك قطره رنگ قرمز خنثی بر روی آن ریخته، پس از لامل گذاری در بزرگنمایی 40x بعد از چند دقیقه مشاهده کنید. به حالت زنده و متحرك تکیافته‌ها 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 داشته ،کاملاً کروی و بی‌رنگ هستند و نفوذ پذیری نسبت به رنگ ندارند.

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 40x و پس از ثابت شدن تک‌یاخته در بزرگنمایی 40 یا 100x 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 دقت شود در تک‌یاخته‌های زنده حرکت میتوکندری در داخل سیتوپلاسم که بیانگر برقراری جریان سیتوپلاسمی می‌باشد، قابل توجه می‌باشد.

جهت مشاهده ساختار حرکتی، مجدداً يك قطره از محیط هی را روی لام قرار داده و پس از افزودن لوگل لامل گذاری کنید و نمونه را در بزرگنمایی 40 مشاهده کنید. دقت شود که با افزودن این رنگ غیر حیاتی، نمونه ثابت شده و تحرك و حیات خود را از دست می‌دهد.

تک‌یاخته‌هایی با مژه یا تارک‌های درشت‌تر را انتخاب و با فوکوس روی اندامک‌های حرکتی آن‌ها را بررسی کنید.

به منظور مشاهده هسته و بررسی **viability** یا توانایی نفوذپذیری انتخابی غشاء سلول زنده در تکیاختگان بر روی دو گوشه يك لام هر طرف يك قطره محیط هی بگذارید، به هر کدام يك قطره رنگ آبی متیل افزوده يك 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 يك قطره فرمالین لامل گذاری کنید. نمونه را در بزرگنمایی x40 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 و تفسیر کنید.

رنگ آمیزی سه گانه در تک یاختگان

رنگ آمیزی سیتوپلاسم توسط فوشین اسیدی، هسته توسط سبز متیل یا ابی متیل، رنگ آمیزی میتوکندری توسط سبز ژانوس

دلیل رنگ شدن سیتوپلاسم توسط فوشین اسیدی این است که سیتوپلاسم به دلیل انجام واکنش های شیمیایی و آنزیمی و وجود نمک ها، پروتئین های بازی، گلیکوژن ها و انجام فعالیت های متابولیکی درون سلولی دارای PH بازی است و با رنگ فوشین اسیدی ترکیب شده رنگ صورتی ایجاد می کند.

دلیل رنگ آمیزی 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.

علت رنگ پذیری میتوکندری توسط سبز ژانوس این است که در غشاء داخلی میتوکندری آنزیم های 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 می آورد

