

Šūnu pētīšanas mikroskopiskās metodes



Dr. biol. Tuts Selga

Mikroskopisko preparātu pagatavošanas metodes

- Fiksācija.
- Grišana.
- Krāsošana.
- Novietošana uz priekšmetstikliņa.
- Pagaidu un pastāvīgie preparāti.
- Atūdeņošana.
- Preparāta ieslēgšana.

Fiksācija

- Aldehīdi (olbaltumvielas).
- Osmijs (lipīdi).
- Kālija permanganāts (augiem).
- Fiksatoru priekšrocības un trūkumi.

Kursa struktūra

- Ievadlekcija mikroskopijā.
- Lekcija luminescences pamatprincipos.
- Laboratorijas darbi – metodikas teorētiskā daļa un praktiska paraugu gatavošana un analīze.
- Kontroldarbi:

Metodes gaismas mikroskopijā, praktiskie aspekti.

Metodes elektronmikroskopijā, atomspēku mikroskopijā un luminescences mikroskopijā.

Eksāmens.

Fiksācija

- Nelielu audu gabaliņu ievieto fiksatorā.
- Tur **šūnas tiek ātri nonāvētas un to sastāvdaļu uzbūve neizmainās!!!**
- Fiksē ar glutaraldehīdu, paraformaldehīdu, etanola un etiķskābes maisījumu u.c. vielām. Fiksēt var arī sasaldējot šķidrā slāpekļa temperatūrā.

Fiksācijas ilgums

- Augstāka temperatūra paātrina fiksāciju.
- Zemāka temperatūra samazina fiksācijas artefaktus.
- Fiksatora koncentrācija nosaka fiksācijas artefaktus un fiksācijas ātrumu.

Buferi

- Fosfātu buferis.
- Nātrija kakodliāta buferis.
- Veronāla acetāta buferis.
- HEPES.
- Bufere priekšrocības un trūkumi.

Atūdeņošanas veidi

- Acetons.
- Etanols.
- Ksilols.

Krāsošana

- Krāso olbaltumvielas, nukleīnskābes (DNS vai RNS), lipīdus vai polisaharīdus(ciete vai celuloze).
- Tajās šūnu zonās, kas satur vairāk šo vielu, samazinās gaismas caurlaidība un tiek iegūts kontrastains attēls.
- Eozīns –olbaltumvielu krāsošanai (gaiši sarkanas).
- KI - cietes krāsošanai (violela vai pat melna).
- Acetoorseīns - hromosomu krāsošanai (tumši sarkans).
- Felgena krāsviela - DNS krāsošanai (spilgti sarkana).
- Sudāns III - lipīdu krāsošanai (dzeltenī).
- Osmijs un svina sāļi absorbē un noliec elektronus elektronu mikroskopā. Iezīmē lipīdus un olbaltumvielas.

Krāsošana

- Vairāku krāsvielu izmantošana histoloģijā.
- Krāsvielas elektronmikroskopijā.

Dzīvnieku audu preparātu ieslēgšana un griešana

- Parafīns.
- Rotējošais mikrotoms.

Griešana

Mikroskopiskos paraugus griež ar speciālu žileti, iesaldējot ledus piramidā, ieslēdzot parafīnā vai sveķos. Sacietējušu bloku var sagriezt ar īpašu griešanas iekārtu – mikrotomu. Iegūst no 5 μ m līdz 50 μ m biezus griezumus. Tas ļauj mikroskopā redzēt asu attēlu.



Rotējošais mikrotoms.

Ieslēgšana un griešana elektronu mikroskopijā

- Metilakriāts.
- Epons.
- Polistirēns.
- Polietilēnglikols.
- Ultramikrotomi.
- Ultramikrotomu naži.

Atbalsta plēve un sietiņi

- Formvars.
- Oglekļa plēve.
- Sietiņu izmēri un veidi.



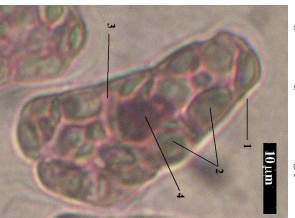
Ultramikrotoms. Griezumna biezums 100 nm.

Novietošana uz priekšmetstikliņa.

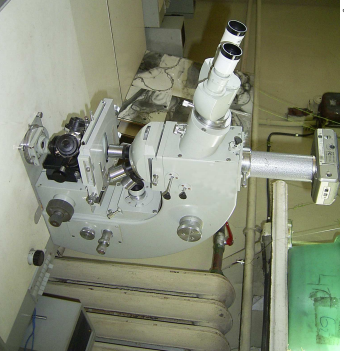
Pagaidu un pastāvīgie preparāti

- Ar oļiņas vai preparējamas adatas palīdzību griezumus pārnes uz priekšmetstikliņa.
- Pagaidu preparāta gadījumā uz priekšmetstikliņa uzpūlina tīdens pilienu un lēnām pārsedz ar segstikliņu. Paraugš izžūst 15 min. laikā.
- Pastāvīgo preparātu gadījumā griezumus atitdeņo, t.i., aizvieto tīdeni ar acetonu, tad aizvieto ar izšķīdināšanas šķīdumiem un pārsedz ar segstikliņu. Tādu paraugu var uzglabāt vairākus gadus.

Tars Selge, LU Augu šūnu bioloģijas laboratorija.

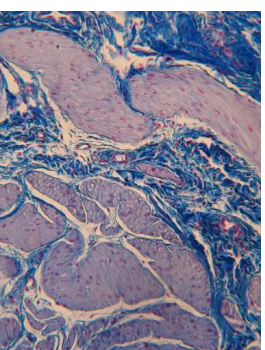


Tabakas lapu ziedepu parenhīmas šūna. 1. - šūnas sienīņa, 2. - hloroplasti, 3. - citoplazma, 4. - kodols. Tēdaiļas garums - 10 μm.



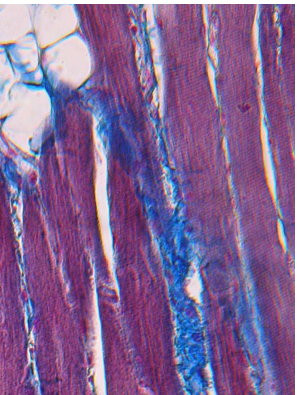
Universālais gaismas mikroskops ZEISS NU2.
Mikroskopa maksimālais palielinājums: 1500 reizes.

Sagatājamais dzīvnieku audu pagatavošanas rezultāts



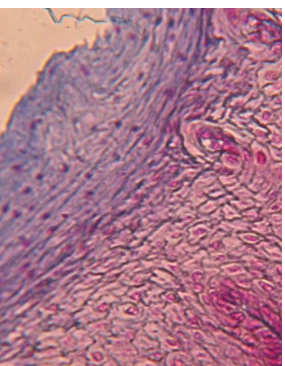
Gludo muskuļu šūnas.

Sagidamais dzīvnieku audu pagatavošanas rezultāts



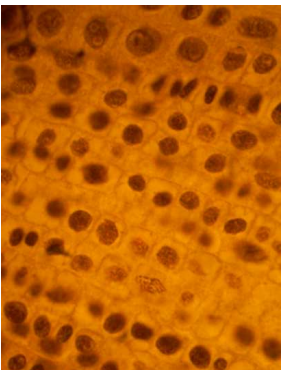
Sirds muskuļu šūnas.

Sagidamais dzīvnieku audu pagatavošanas rezultāts



Plakanais epitēlijs.

Sagidamais augu audu pagatavošanas rezultāts



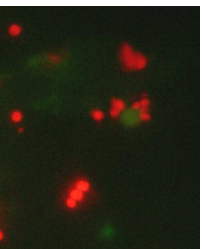
Mitoze augu šūnās.

Sagidamais augu audu pagatavošanas rezultāts

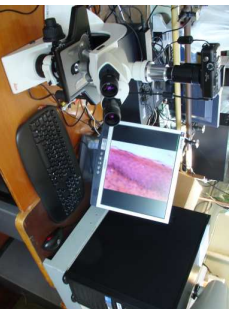


Lapas griezumns.

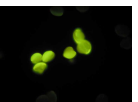
Luminiscences mikroskopija



GFP un hlorofīla luminescence lapu šūnā.

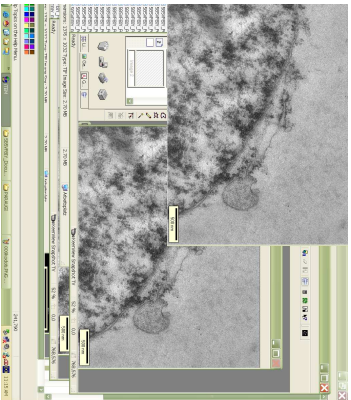


Putekšņu analīze.



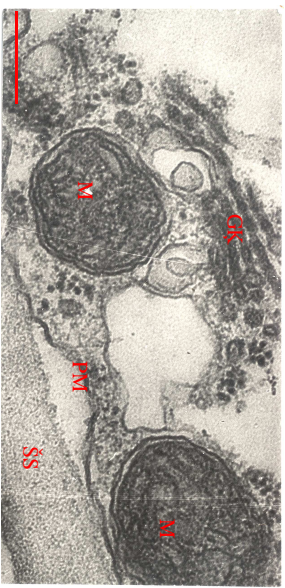
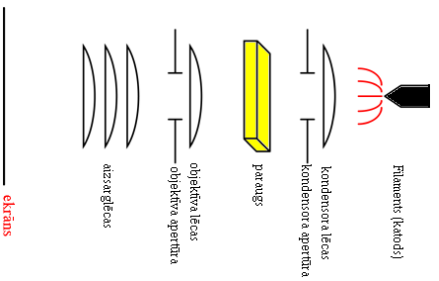
Transmisijas elektronu mikroskops Philips 301.
Palielinājums 200 000 reizi. Mikroskopa izšķirtspēja 1×10^{-10} m.
Rāda šūnu sastāvdaļas šķērsgriezumā.





Transmisijas elektronu mikroskops Philips 301.
 Datu iegūšanas un apstrādes datorprogramma Keen View.

Filaments atdala elektronus. Tie veido kūli, kas pārvietojas uz leju cauri paraugam. Elektronu kūli regulē ar gredzenveida magnētiem. Objekts tiek krāsots ar smagajiem metāliem. Tās šūnas daļas, kas pievienos metālu uz luminišcējošā, ekrāna būs tumšas, jo metāli nolieks vai absorbēs elektronus. Pārējās daļas ir gaišas.



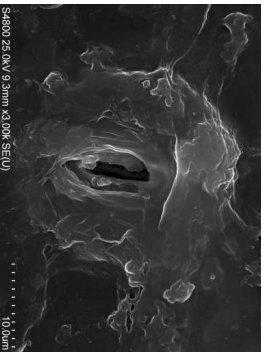
Angu šūna šķērsgriezumā. Redzami mitohondriji un Goldži ķermeņi. M-mitohondrijs, GK-Goldži ķermeņi, SS-šūnas sienīņa. PM-plazmatiskā membrāna. Vienības garums 0,5 μm.



Skenējošais elektronu mikroskops.

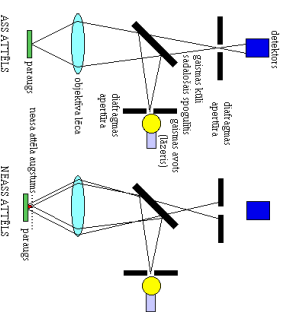


Kodols un mitohondriji.



Atvēršanās uzbūve.

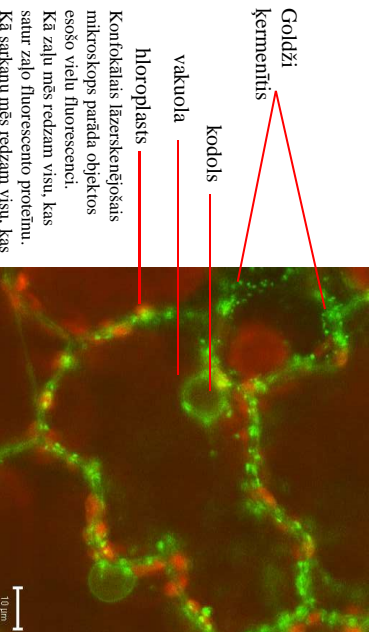
Konfokālais laserskenējošais mikroskops LEICA TCS-SL



Konfokālā laserskenējošā mikroskopa optiskā shēma.

Mikroskopa priekšrocība ir spēja biežā paraugā izvēlēties plānu slānīti, uz kuru fokusēt lāzera staru un tērādzt asi attēlu.

Dzīva (in vivo) tabakas lapu epidermas šūna



Tivs Sēdga, LU Augu šūnu bioloģijas laboratorija.

Kontofālālais lāzerskenējošais mikroskops parāda objekta esošo vielu fluorescenci.

Kā zāļu mēs redzam visu, kas satur zāļu fluorescēnto proteīnu.

Kā sarkānu mēs redzam visu, kas satur hlorofīlu.

Tāpēc var pētīt dzīvas, nektrāsotas šūnas.

Kontofālālais lāzerskenējošais mikroskops ļauj sērijveidā skenēt attēlu.

Tādējādi var izveidot animāciju ar augstu attēla izšķirtspēju.

Videokameras dod stipri mazāku attēla izšķirtspēju.

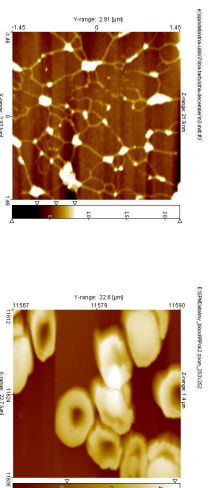
Redzama 5 attēlu sērija, kas attēlo

Goldži ķermenīšu pārvietošanos šūnā.

Animācija redzama, ja attēlu aktivē ar datora peli.



Atomspēku mikroskops.



DNS struktūru veidošanās.

Eritrocīti.

Laboratorijas darbi

- Pastāvīgais preparāts "Augu audi".
- Pastāvīgais preparāts "Dzīvnieku audi".
- Preparāts caurstarjojāai elektronu mikroskopijai.
- Preparāts skenējošai elektronu mikroskopijai.
- Mikroskopisko preparātu analīzes veidi gaismas un elektronmikroskopijā.
- Preparātu pagatavošana un analīze ar fluorescences mikroskopu!

Laboratorijas darbu saraksts

- 1.-Augu un dzīvnieku audu fiksācija.
- 2.-Augu un dzīvnieku audu atdēnošana.
- 3.-Audu ieslēgšana Epiona sveķos vai parafinā.
- 4.-Augu un dzīvnieku audu griešana, Saldegamais mikrotons, rōrgēšais mikrotons, ultramikrotons.
- 5.-Augu un dzīvnieku audu krāsošana.
- 6.-Ar a sietņu sagatavošana elektronu mikroskopijai.
- 7.-Praktiģoģ preparātu kvalitātes novērtēģms gaismas mikroskopā.
- 8.-Praktiģoģ preparātu analīzes pamati skenēģošģģ elektronu mikroskopā.
- 9.-Preparātu kvalitātes novērtēģms caurstarjojģģ elektronu mikroskopē un digitālģ attēlu analīzģ.
- 10.- Preparātu sagatavoģma darbam ar atomspēku mikroskopu un digitālģ attēlu analīzģ.
- 11.- Preparātu sagatavoģma fluorescences mikroskopijai un digitālģ attēlu analīzģ.
- 12.- Fluorescences un preparātu analīzes problēmas.