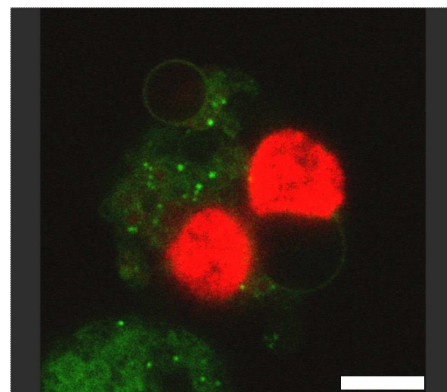


9. darbs. PCD-sīpola šūnās

Viens no dzīvnieku šūnu programmētas bojāejas veidiem ir apoptoze. Šūnās kodola DNS fragmentējas. Kodoli fragmentējas. Šūnās izveidojas lielas autofāgiskās vakuolas. Šūna veido burbuļveida izaugumus, kuri dažkārt satur kodola fragmentus.

1. attēls. Apoptoze cilvēka cilmšūnu kultūrā. Zaļš – endomembrānu lipīdi (plazmatiskā membrāna, ET, Goldži), sarkans – kodola DNS. Iedaļas garums – 50 mikrometri.



Viendīgļlapjiem raksturīga šūnu polaritāte. Lapas augšanas gaitā pirmās diferenciācijas lapas apikālās daļas šūnas. Vēlāk izveidojas mediālā daļa un visbeidzot diferenciācijas bazālās daļas šūnas. Augu augšanas gaitā lapa pakāpeniski noveco. Šūnu bojāeja ir programmēta. Tas nozīmē, ka endonukleāzes kodolu DNS fragmentē apmēram 200 kb garos fragmentos.

Programmēta bojāeja vispirms iestājas apakšējā stāva lapas apikālās daļas šūnās. Visvēlāk PCD iestājas augšējā stāva lapas bazālās daļas šūnās.

Mūsu gadījumā nepieciešams atrast kodolus, kas satur fragmentētu DNS. Kodoli tiks krāsoti ar metilēnzilo un DNS ar propīdija jodīdu resursu taupības nolūkos. (mikroskopiski DNS fragmentu klātbūtni pierādīt var ar TUNEL metodi)

Pētījumu mērķis ir noskaidrot vai: **a)** sīpola glabāšanas procesā šūnas ir dzīvas un cik lielā mērā tajā ir sācies programmētas šūnu bojāejas process; **b)** kuras sīpola zonas būtu vērts pētīt, izmantojot TUNEL metodi.

Eksperimenta struktūra

Pozitīvā kontrole – rāda, ka šūnas satur pētāmo objektu vai arī izmantojamā krāsviela ir krāsotspējīga.

Negatīvā kontrole - rāda, ka izmantojamā krāsviela vai metode ir specifiska (*nav novērojami artefakti, trokšņi, krāsojamā viela nav izklūvusi no atbilstošajiem organoīdiem, netiek nokrāsoti citi objekti*)

Eksperimenta varianti - rāda, kā mainās šūnu/organoīdu uzbūve un ķīmiskais sastāvs vai arī pētāmās vielas koncentrācija un novietojums atkarībā no genotipa, diferenciācijas virziena un etapa vai audzēšanas apstākļiem.

Jautājumi, kas mūsu eksperimentā liek izmantot dažādus kontroles veidus:

Vai sīpola epidermas plēsumā šūnas ir dzīvas un nebojātas?

Vai šūnas satur kodolus?

Vai fiksācija ar acetometanolu nebojā kodola morfoloģiju?

Vai krāsošana ar propīdija jodīdu nebojā kodola morfoloģiju?

Vai propīdija jodīds krāso tikai kodola DNS?

Pozitīva kontrole - nefiksētas un fiksētas sīpola epidermas šūnas krāsotas ar metilēnzilo. (Šūnas krāsotas ar metilēnzilo pierāda, ka šūnās ir kodoli.

Krāsošana ar propīdija jodīdu pierāda, ka šūnas pirms fiksēšanas ir dzīvas un propīdija jodīds šūnās neiekļūst.)

Negatīvā kontrole – nefiksētas šūnas krāsotas ar propīdija jodīdu

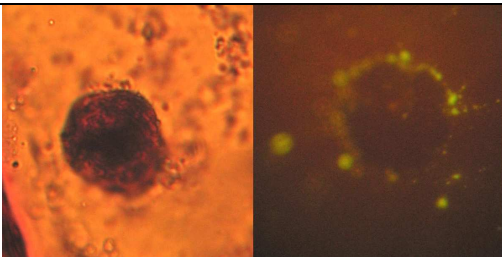
Viena un tā paša šūnas fragmenta apskatīšana caurejošā gaismā un UV gaismā ļauj pierādīt, ka tikai kodoli ir nokrāsoti ar propīdija jodīdu.

Metode

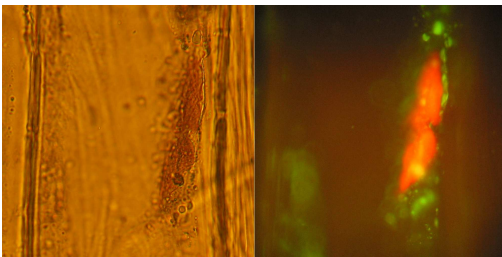
1. grupa. Ārējās zvīņlapas apikālās daļas epiderma.
2. grupa. Ārējās zvīņlapas bazālās daļas epiderma.
3. grupa. Iekšējās zvīņlapas mediālās daļas epiderma.

Katra grupa sagatavo divus paraugus: fiksētu un nefiksētu sīpola epidermas plēsumu. Laukums mazāks par 0,5 cm².

<ul style="list-style-type: none">❑ Ar skalpeli atdala vajadzīgo zvīņlapu.❑ Ar žileti vai skalpeli veic iegriezumu zvīņlapā.❑ Pinceti ievieto griezumā vietā un noplēš epidermu.❑ Plēsumu novieto uz priekšmetstikla ūdens pilienā.❑ Ar preparējamās adatas un žiletas palīdzību iegūst pareiza izmēra un gludu paraugu.❑ Nosūc ūdeni ar filtrpapīru.❑ Uzpilina 30 – 50 mikrolitrus metilēnzilā šķīduma un krāso 5 – 10 min.❑ Skalo ar krāna ūdeni.❑ Apskata mikroskopā caurejošā gaismā.❑ Uzpilina 30 mikrolitrus propīdija jodīda un krāso vismaz 5 min. Pārsedz ar segstiklu.❑ Apskata mikroskopā caurejošā gaismā.❑ Apskata mikroskopa luminiscences režīmā.	<ul style="list-style-type: none">❑ Ar skalpeli atdala vajadzīgo zvīņlapu.❑ Ar žileti vai skalpeli veic iegriezumu zvīņlapā.❑ Pinceti ievieto griezumā vietā un noplēš epidermu.❑ Plēsumu novieto uz priekšmetstikla ūdens pilienā.❑ Ar preparējamās adatas un žiletas palīdzību iegūst pareiza izmēra un gludu paraugu.❑ Nosūc ūdeni ar filtrpapīru.❑ Uzpilina 50 – 100 mikrolitrus acetoetanola un fiksē vismaz 5 min mitrajā kamerā.❑ Skalo ar krāna ūdeni.❑ Uzpilina 30 – 50 mikrolitrus metilēnzilā šķīduma un krāso 5 – 10 min.❑ Skalo ar krāna ūdeni.❑ Uzpilina 30 mikrolitrus propīdija jodīda un krāso vismaz 5 min. Pārsedz ar segstiklu.❑ Apskata mikroskopā caurejošā gaismā.❑ Apskata mikroskopa luminiscences režīmā.
--	---



2. attēls. Nefiksētu sīpola epidermas šūnu kodolu morfoloģija. Krāsots ar metilēnzilo un propīdija jodīdu. Kreisā puse - kodols ar kondensētu hromatīnu; labā puse – kodola atrašanās vieta. DNS nav nokrāsota. Zaļš – autoluminiscence.



3. attēls. Fiksētu sīpola epidermas šūnu kodolu morfoloģija. Fiksēts ar acetometanolu. Krāsots ar metilēnzilo un propīdija jodīdu. Kreisā puse - kodols ar organoīdiem; labā puse – kodols ar kondensētu un fragmentētu DNS. Sarkans-kodola DNS, zaļš – autoluminiscence.

NOVĒROJUMI

1. Vai šūnas satur kodolus? Cik %?
2. Vai krāsošana ar propīdija jodīdu nebojā kodola morfoloģiju?
3. Kāda ir kodolu forma?
4. Kāds ir heterohromatīna daudzums?
5. Vai fiksācija ar acetometanolu nebojā kodola morfoloģiju?
6. Vai sīpola epidermas plēsumā šūnas ir dzīvas un nebojātas?
7. Vai propīdija jodīds krāso tikai kodola DNS?
8. Vai vērojama kodola fragmentācija? Kas ir redzams?
9. Salīdziniet kodolu skaitu, formu un fragmentēto kodolu skaitu starp grupām.