

ZAJĘCIA nr 2

ZAGADNIENIA TEORETYCZNE DO PRZYGOTOWANIA NA ĆWICZENIE: „Budowa komórki eukariotycznej część I”

Błony biologiczne: *lipidy i białka błony; glikokaliks; receptory błonowe i ich rola w przekazywaniu sygnałów; transport aktywny i bierny; zjawiska osmotyczne w komórce zwierzęcej i roślinnej.*
Cytoszkielecik: *mikrotubule, filamenty pośrednie, struktury kurczliwe (filamenty aktynowe i miozynowe).*
Mitochondrium: *budowa i funkcje.*

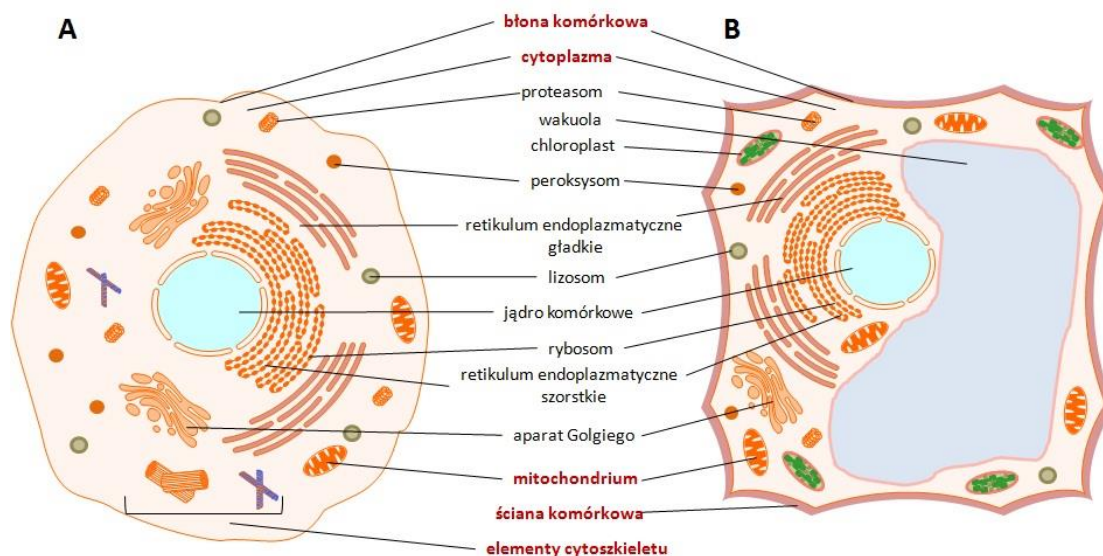
Obserwacja preparatów pod mikroskopem świetlnym: klasycznym i fluorescencyjnym.

LITERATURA

1. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: *Podstawy biologii komórki.* PWN, Warszawa 2009.
2. Ostrowski K., Kawiak J.: *Podstawy cytofizjologii.* PZWL, Warszawa 1997 (i nowsze).
3. Fletcher H.L., Hickey G.I., Winter P.C.: *Genetyka.* PWN, Warszawa 2010.
4. Solomon E.P., Berg L.G., Martin D.W., Vilee A.C. 2000. *Biologia.* MULTICO, Warszawa. (i nowsze)

I. Omówienie budowy i funkcji błon biologicznych, cytszkielecik i mitochondrium

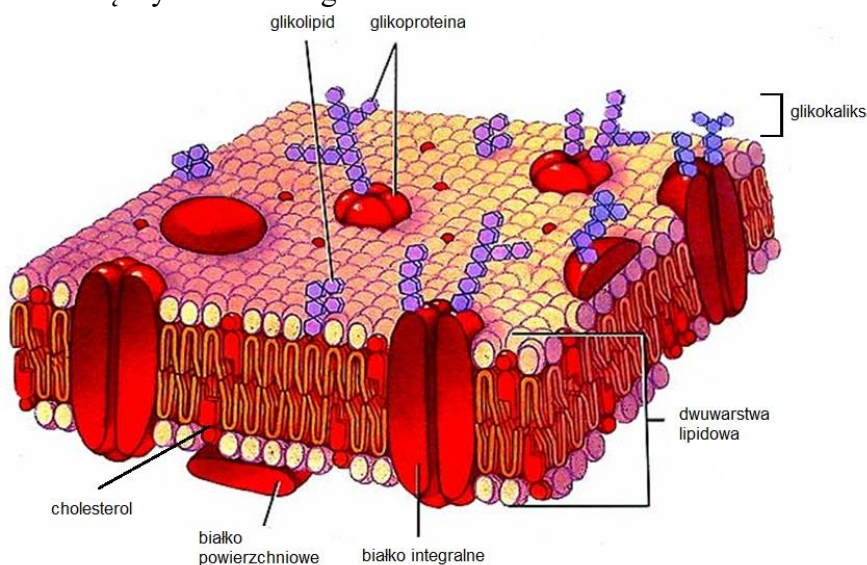
Komórka (*łac. cellula*) – to najmniejsza strukturalna i funkcjonalna jednostka organizmów żywych, zdolna do przeprowadzania wszystkich podstawowych procesów życiowych. Budowę komórki eukariotycznej (zwierzęcej i roślinnej) przedstawia rysunek 1.



Rys. 1. Budowa komórki eukariotycznej: (A) zwierzęcej (B) roślinnej.

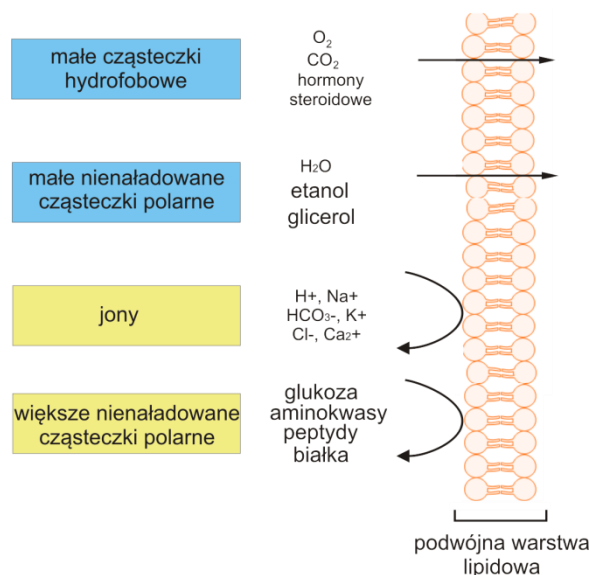
1. Błony biologiczne

Błony biologiczne (błona komórkowa i błony otaczające organelle komórkowe) zbudowane są z podwójnej warstwy lipidowej (fosfolipidy, glikolipidy i sterole) oraz białek integralnych i białek powierzchniowych (Rys. 2). Oligosacharydy związane z białkami błonowymi (glikoproteiny) lub z lipidami błony (glikolipidy) tworzą na powierzchni błony komórkowej komórki zwierzęcej **glikokaliks** (rola w procesach rozpoznawania międzykomórkowego).



Rys. 2. Budowa błony komórkowej wg Molecular Biology of the cell, 4th Edition.

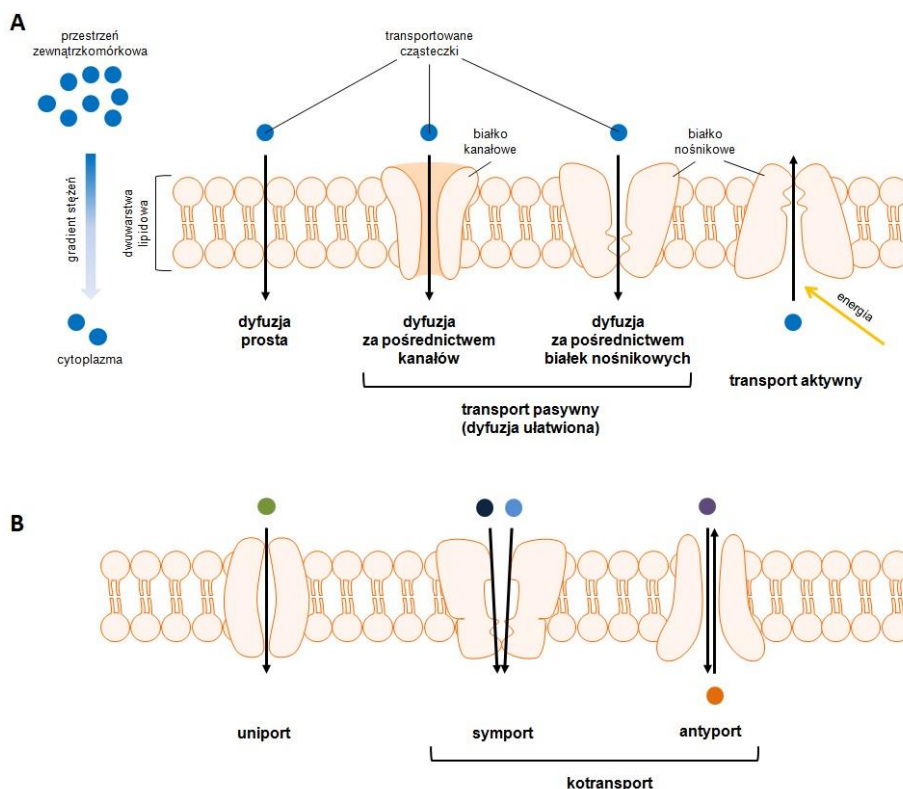
Błony biologiczne są przepuszczalne dla małych cząsteczek hydrofobowych (np. O_2 , CO_2 , N_2 , hormony steroidowe) oraz małych nienaładowanych cząsteczek polarnych (np. woda, glicerol, etanol), natomiast są nieprzepuszczalne dla jonów (np. H^+ , Na^+ , HCO_3^- , Cl^-) oraz organicznych substancji polarnych takich jak glukoza, aminokwasy, peptydy i białka (Rys. 3).



Rys. 3. Selektywność podwójnej warstwy lipidowej dla różnych cząsteczek.

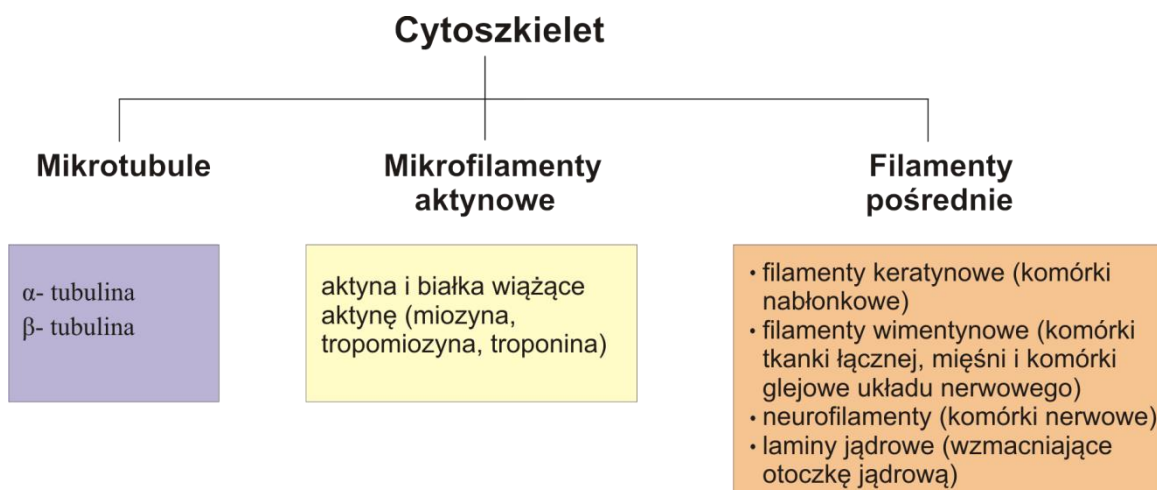
Transport substancji przez błony biologiczne:

Transport bierny odbywa się zgodnie z gradientem stężeń, bez nakładu energii na drodze dyfuzji prostej lub dyfuzji ułatwionej z udziałem kanałów białkowych oraz białkowych przenośników. **Transport aktywny** zachodzi wbrew gradientowi stężeń z wykorzystaniem energii (Rys. 4A). Uniport to transport tylko jednego rodzaju cząsteczek; **kotransport** to równoczesny transport dwóch różnych substancji w tym samym kierunku (symport) lub w kierunku przeciwnym (antyport) (Rys. 4B).



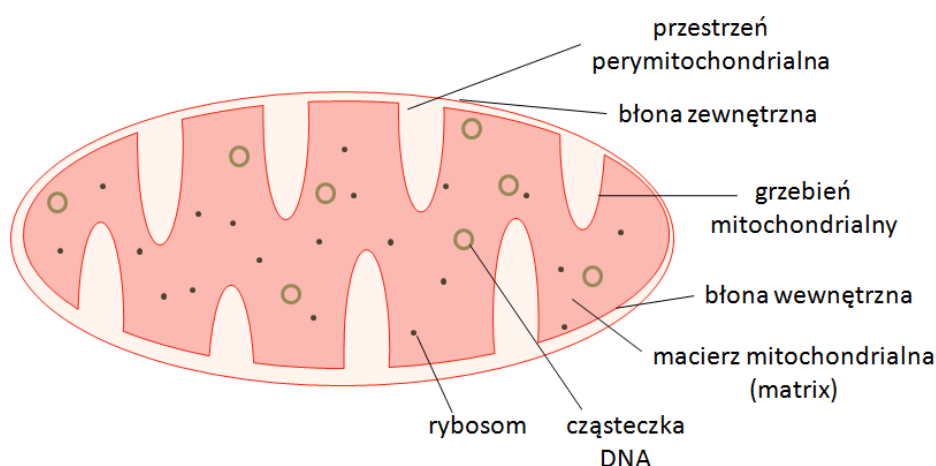
Rys. 4. Typy transportu przez błonę biologiczną.

2. Cytoszkieleł – to rusztowanie komórki. Elementy cytoszkieletu komórki zwierzęcej przedstawione są na rysunku 5.



Rys. 5. Elementy cytoszkieletu komórki zwierzęcej.

3. Mitochondrium – zawiera dwie błony: zewnętrzną i wewnętrzną (posiada liczne wgłębienia- grzebienie) oraz macierz mitochondrialną w której występuje DNA (genom mitochondrialny), RNA i rybosomy (Rys. 5). W mitochondriach odbywa się proces oddychania komórkowego, a uwolniona energia jest gromadzona w wysokoenergetycznych wiązaniach ATP.



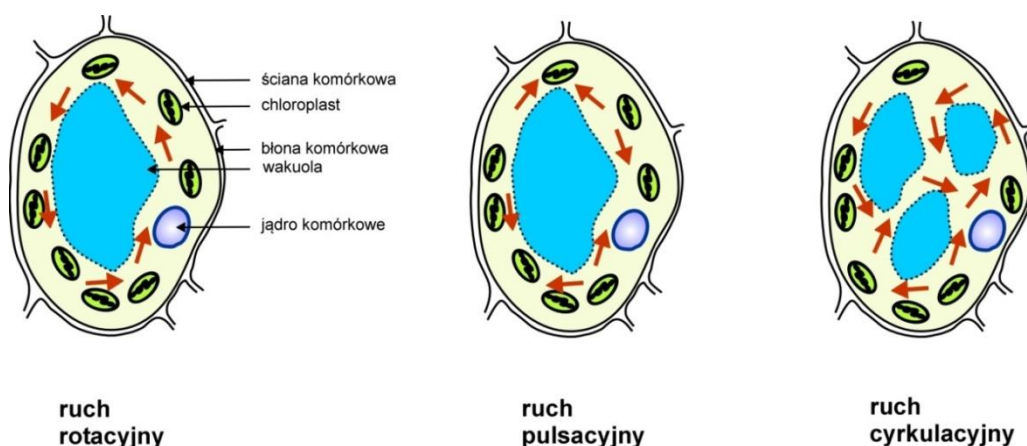
Rys. 5. Budowa mitochondrium.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

II. Mikroskopowanie - przygotowanie preparatów z materiału biologicznego

1. Obserwacja ruchów cytoplazmy w komórce roślinnej (Rys. 6.):

- **ruch rotacyjny (kołowanie)** – cytoplazma płynie w jednym kierunku w warstwie przyściennej wokół centralnie umieszczonej wakuoli. Ruch taki inaczej nazywamy cyklozą; odbywa się on najczęściej u roślin wodnych.
- **ruch pulsacyjny** – cytoplazma płynie raz w jednym, raz w drugim kierunku, co daje wrażenie pulsacji; występuje np. w komórkach glonów i grzybów.
- **ruch cyrkulacyjny (krążenie)** – cytoplazma płynie w różnych kierunkach w obrębie mostków cytoplazmatycznych utworzonych na powierzchni wakuoli; odbywa się u większości roślin lądowych.



Rys. 6. Ruchy cytoplazmy w komórce roślinnej.

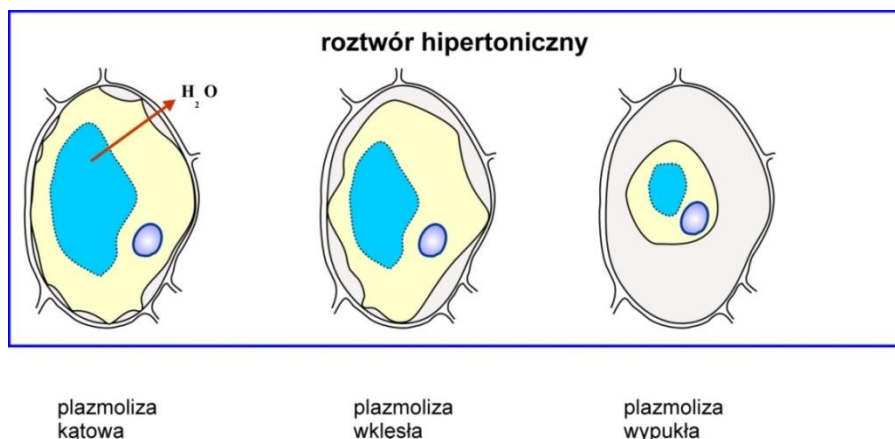
Instrukcja przygotowania preparatu z epidermy liścia Rogatka *Ceratophyllum* sp.

- ✓ z liścia walisnerii wytnij żyłką lub skalpelem niewielki skrawek
- ✓ skrawek umieść na szkiełku podstawowym w kropli wody, przykryj szkiełkiem nakrywkowym
- ✓ preparat ułóż na żarówce mikroskopu
- ✓ po kilku minutach zacznij obserwację obrazu pod powiększeniem obiektywu 10x i 40x.

Obserwacja: ruch rotacyjny cytoplazmy na podstawie przemieszczających się chloroplastów wokół wakuoli. Wykonaj rysunek.

2. Obserwacja plazmolizy i deplazmolizy w komórkach korzenia buraka czerwonego *Beta vulgaris*

Plazmoliza zachodzi gdy umieścimy komórkę roślinną w roztworze hipertonicznym. Woda na skutek dyfuzji przenika przez błonę na zewnątrz komórki. Skutkiem tego jest kurczenie się wakuoli i odstawanie protoplastu od ściany komórkowej. Wyróżnia się trzy rodzaje plazmolizy: kątową, wklęsłą i wypukłą (Ryc.7). **Deplazmoliza** to proces odwrotny do plazmolizy. Po umieszczeniu tej samej komórki w roztworze hipotonicznym, woda napłynie z powrotem do wnętrza komórki, która odzyska stan prawidłowego uwodnienia.



Rys. 7. Rodzaje plazmolizy.

Instrukcja przygotowania preparatu z korzenia buraka czerwonego *Beta vulgaris* - zjawisko plazmolizy

- ✓ korzeń buraka przekrój w poprzek, wytnij żyłką lub skalpelem cienki skrawek
- ✓ umieść go w kropli nasyconego roztworu sacharozy (jest to roztwór o wyższym stężeniu tj. hipertoniczny w stosunku do soku wakuolarnego komórek buraka), przykryj szkiełkiem nakrywkowym
- ✓ preparat mikroskopowy ułóż na stoliku przedmiotowym. Ustaw ostrość obrazu przy powiększeniu obiektywu 10x, a następnie 40x.

Obserwacja: po kilku minutach zachodzi zjawisko plazmolizy, czyli odwodnienia komórki. W swoim preparacie zaobserwuj różne typy plazmolizy: kątową, wklęsłą i wypukłą. Wykonaj rysunki.

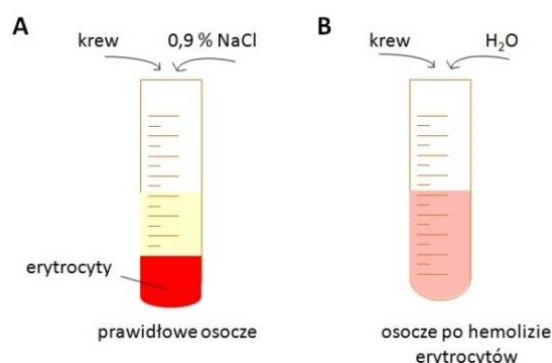
Obserwacja zjawiska deplazmolizy w komórkach korzenia buraka czerwonego *Beta vulgaris*.

- ✓ preparat mikroskopowy z komórkami korzenia buraka, które uległy plazmolizie wyjmij ze stolika mikroskopu
- ✓ usuń szkiełko nakrywkowe
- ✓ skrawek buraka przenieś igłą preparacyjną na nowe szkiełko podstawowe, umieść go w niewielkiej ilości wody destylowanej (jest to roztwór o mniejszym stężeniu – hipotoniczny). Nakryj szkiełkiem nakrywkowym.
- ✓ prowadź obserwację przy powiększeniu obiektywu 10x, a następnie 40x.

Obserwacja: woda przez błonę półprzepuszczalną wnika do wakuoli, co powoduje ponowne przyleganie protoplastu komórki do ściany komórkowej. Wykonaj rysunek.

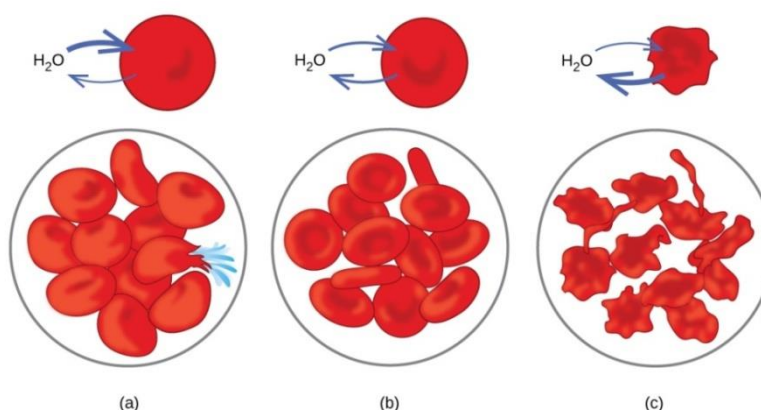
3. Obserwacja hemolizy erytrocytów krwi człowieka

Roztworem izotonicznym dla erytrocytów krwi człowieka jest 0,9% NaCl. Jeśli komórki te umieścimy w roztworze hipotonicznym (o mniejszym stężeniu np. w wodzie) dojdzie do hemolizy czyli rozpadu erytrocytów i uwolnienia hemoglobiny do osocza krwi, które zabarwi się na różowo (Ryc. 5).



Rys. 8 Obserwacja krwinek czerwonych w różnych roztworach. (A) W roztworze izotonicznym (0,9% NaCl) krwinki nie ulegają zmianom, osocze jest prawidłowe. (B) W roztworze hipotonicznym (woda) błona komórkowa erytrocytów pęka i krwinki ulegają zupełnej hemolizie, osocze jest zabarwione na różowo.

Hemolizę krwinek można zaobserwować także wykonując preparat mikroskopowy. Kroplę krwi nanieś na brzeg szkiełka podstawowego i drugim szkiełkiem rozciągnij ją za szkiełkiem. Przykryj szkiełkiem nakrywkowym. Oglądaj preparat pod mikroskopem używając obiektywu 100x (pamiętaj aby użyć olejku immersyjnego). W zależności od roztworu w jakim krwinki będą umieszczone przybiorą różny kształt (Rys. 9).



Rys. 9. Zachowanie się erytrocytów umieszczonych w roztworach o różnym stężeniu. W roztworze hipotonicznym (a) woda wpływa do komórki, erytrocyty pęcznieją, zwiększają objętość, pękają. W roztworze hipertonicznym (c) komórki tracą wodę, zmieniają kształt, kurczą się. W roztworze izotonicznym (b) obserwuje się równowagę osmotyczną.
<https://opentextbc.ca/chemistry/chapter/11-4-colligative-properties/>

III Zapoznanie z zasadami mikroskopii fluorescencyjnej

Odmianą mikroskopii świetlnej jest mikroskopia fluorescencyjna. Działanie mikroskopu fluorescencyjnego opiera się na systemie optycznym, umożliwiającym detekcję i wizualizację sygnału pochodzącego od fluorochromu.

Fluorochrom jest substancją, zdolną do emisji światła fluorescencyjnego po wzbudzeniu światłem o określonej długości fali. Światło wzbudzające fluorescencję badanej próbki kierowane jest, poprzez system filtrów i luster, do obiektywu, a następnie skupiane na preparacie. Wzbudzone światło fluorescencyjne z próbki wraca do obiektywu, a następnie kierowane jest do detektora obrazu (oko ludzkie, kamera).

Fluorochromy zawarte w próbkach mogą być naturalne (np. chlorofil) lub sztucznie wprowadzane do preparatów w celu specyficznej wizualizacji określonych struktur komórkowych.

A. Metodyka przygotowania preparatów do mikroskopii fluorescencyjnej

Krótkie omówienie w pracowni laboratoryjnej metody przygotowania preparatów z zastosowaniem przeciwciał I-rzędowych i przeciwciał II- rzędowych znakowanych znacznikiem fluorescencyjnym.

B. Obserwacja preparatów pod mikroskopem fluorescencyjnym

1. Tkanka prawidłowa i nowotworowa pacjentów z rakiem nerki
2. Tkanka prawidłowa i nowotworowa pacjentów z rakiem jelita grubego
3. Prawidłowa i atroficzna nerka szczura z nadciśnieniem - przekrój przez korę i rdzeń