

Biologia komórki

Zajęcia wstępne:

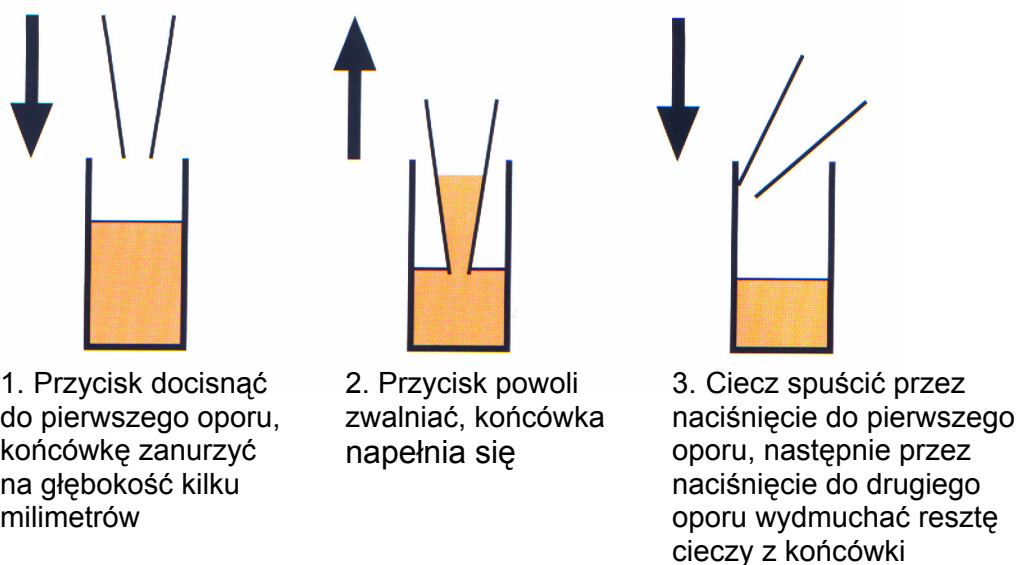
Przypomnienie podstawowych zasad pracy i technik stosowanych w laboratorium biologiczno/biochemicznym

Technika pipetowania z użyciem pipet automatycznych

Pipetowanie wprost przedstawia Rys. 1. Należy pamiętać, że przy objętościach $>10 \mu\text{l}$ końcówkę pipety należy zwilżyć. Ten typ pipetowania zaleca się dla wzorcowych rozpuszczalników, takich jak woda, bufony, rozcieńczone sole, rozcieńczone kwasy i zasady.

Pipetowanie odwrotne używa się dla cieczy lepkich, roztworów o wysokim ciśnieniu par, rozpuszczalników silnie zwilżających. Czynności przedstawione są na Rys 2.

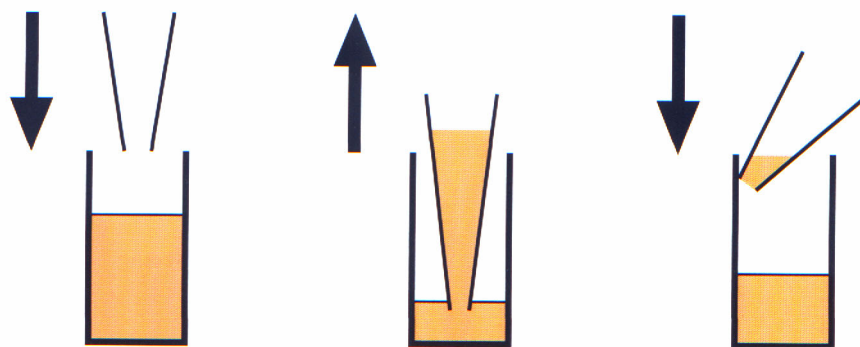
Pipetowanie wprost



Rys. 1. Zasady tzw. pipetowania wprost z użyciem pipety automatycznej.

Błędy w pracy, uszkodzone lub zanieczyszczone pipety i czynniki zewnętrzne mogą powodować znaczne błędy w odmierzaniu objętości za pomocą pipet automatycznych. Poniżej w Tabeli 1 przedstawiono niektóre ważne przyczyny błędów i sposoby ich unikania/usuwania.

Pipetowanie odwrotne



1. Przycisk docisnąć do drugiego oporu, końcówkę zanurzyć na głębokość kilku milimetrów

2. Przycisk powoli zwalniać, końcówka napełnia się

3. Ciecz oddać przez naciśnięcie przycisku aż do pierwszego oporu, reszta cieczy pozostaje w końcówce!

Rys. 2. Zasady tzw. pipetowania odwrotnego z użyciem pipety automatycznej.

Tabela 1.

błąd	przyczyna	pomoc
pipeta kapie, jest nieszczelna	luźna końcówka, niewłaściwa końcówka uszkodzona pipeta np. uszczelka, tłok itp. tłok zanieczyszczony resztkami odczynnika	zastosować oryginalną końcówkę mocno nasadzić przesmarować pipetę, wstawić nową uszczelkę lub tłok oczyścić tłok
przycisk suwu tłoka ciężko chodzi	tłok jest zanieczyszczony uszczelka spęczniała od par odczynnika tłok jest uszkodzony	oczyścić tłok i nasmarować
objętość odmierzana przez pipetę nie odpowiada wartości nastawionej	odbiegające warunki nieszczelna pipeta pipeta rozkalibrowana	patrz Tabela 2 sprawdzić szczelność wykalibrować pipetę

Dla zapewnienia poprawnej pracy pipety oraz precyzyjnego odmierzania objętości należy pamiętać o przyczynach błędu pipetowania, niektóre z nich przedstawiono w Tabeli 2.

przyczyna błędu	maksymalny błąd	pomoc
pipeta trzymana ukosem (~30°)	+0.5%	pipetę trzymać pionowo
niewłaściwa końcówka pipety	>0.4%	stosować końcówki odpowiadające używanej pipecie (firmie)
gęstość odmierzanego odczynnika znacznie odbiega od gęstości cieczy używanej do kalibracji pipety	-0.4%	pipetę skalibrować używając odmierzaną ciecz
temperatura pomiaru znacznie odbiega od temperatury kalibracji	-5.5%	skalibrować pipetę na nowe warunki temperaturowe
położenie geograficzne np. wysokość nad poziom morza 1000 m	-0.4%	skalibrować pipetę

Pracę pipety automatycznej można łatwo sprawdzić ważąc odmierzoną objętość wody destylowanej na wadze analitycznej i porównując masę wody z jej nominalną objętością. Dla objętości <1 μ l sprawdzenie za pomocą wagi analitycznej nie jest praktycznie możliwe i do tego celu używany jest specjalny test fotometryczny.

W laboratoriach, w których wykonuje się analizy medyczne dokładne wyniki analiz może gwarantować tylko precyzyjne działanie w toku całego postępowania, poczynając od pipetowania, poprzez wykonywanie oznaczeń i kończąc na ocenie analizy. Im mniejsza tolerancja błędu w każdym używanym do przeprowadzania analiz przyrządów, tym dokładniejsze i precyzyjniejsze są otrzymywane wyniki. Zwykle wymagany jest atest i zgodność posiadanych przyrządów, w tym pipet, z normami danego kraju lub międzynarodowymi np. ISO9001 i/lub gwarancję spełnienia wymagań prawnych dotyczących przyrządów używanych w analizach medycznych/diagnostycznych.

Budowa i posługiwanie się mikroskopem świetlnym

Mikroskop optyczny zbudowany jest z dwóch zasadniczych układów: mechanicznego i optycznego.

Częściami mechanicznymi mikroskopu są: statyw, tubus z urządzeniem rewolwerowym i stolik. W statywie mikroskopu mieści się makrośruba i mikrośruba, które służą do nastawiania ostrości w mikroskopie. Stolik mikroskopu jest zwykle ruchomy, można nim poruszać wzdłuż i w poprzek za pomocą śrub, co ułatwia przesuwanie preparatu. W jego środku znajduje się otwór, przez który przechodzą promienie światła oświetlające preparat. Na stoliku znajdują się sprężynowe zaciski do przytrzymywania szkiełka podstawowego.

Układ optyczny mikroskopu składa się z układu powiększającego (obiektywy, okular) i układu oświetlającego (lampa elektryczna i kondensator).

Obiektywy są najistotniejszą częścią mikroskopu. Zbudowane są z metalowego korpusu, w którym umieszczone są soczewki i na których widnieje numer wskazujący krotność powiększenia. Obiektywy tworzą obraz rzeczywisty, odwrócony i powiększony. Okular mikroskopu służy do powiększania obrazu wytworzonego przez obiektyw. Składa się z dwóch płasko-wypukłych soczewek, z których górna powiększa obraz wytworzony przez obiektyw, zaś dolna zwiększa pole widzenia. Okular daje obraz powiększony, urojony, prosty. Układ okular-obiektyw daje więc obraz odwrócony jaki powstał w wyniku działania obiektywu.

Układ oświetlający ma za zadanie dostarczenie takiej ilości światła aby możliwa była obserwacja preparatu. Pod stolikiem mikroskopu znajduje się kondensator, którego zadaniem jest prawidłowe oświetlenie preparatu.

Przy posługiwaniu się mikroskopem należy przestrzegać kilku podstawowych zasad:

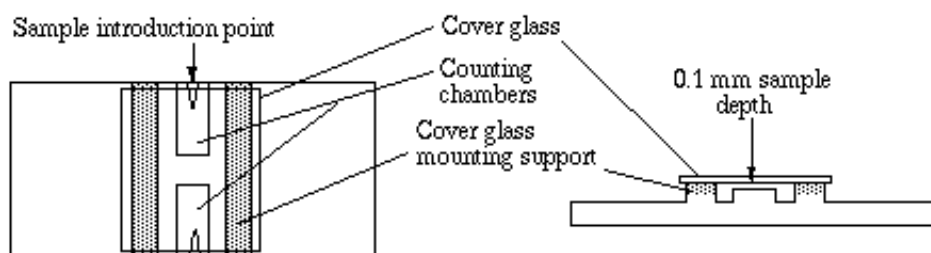
- dobierać powiększenie obiektywu do wielkości obiektu i rodzaju informacji jaką się chce uzyskać podczas obserwacji mikroskopowych.
- ostrość obrazu ustawiać używając obiektywu o jak najmniejszym powiększeniu np. 10x ponieważ głębia ostrości będzie większa i ustawienie ostrości łatwiejsze.
- zwracać uwagę na obiekt obserwacji podczas ustawiania ostrości. Ruch obiektywu powinien zawsze być od obiektu a nie do obiektu. Pozwala to uniknąć uszkodzenia (zgniecenia) szkiełka nakrywkowego i podstawowego oraz zniszczenia preparatu.
- nie używać pokręteł w mikroskopie, których przeznaczenia nie znamy. Dla bezpieczeństwa mikroskopu i badanego preparatu w przypadku jakichkolwiek wątpliwości co do sposobu używania mikroskopu należy zwrócić się o pomoc do prowadzącego ćwiczenie.
- zwracać uwagę na szczególne wymagania używanego obiektywu np. obiektyw 100x wymaga zwykle użycia olejku immersyjnego nakładanego na szkiełko nakrywkowe.

Liczenie komórek w komorze hemocytometru

W hemocytometrze gęstość komórek określa się przez policzenie pod mikroskopem komórek znajdujących się na siatce w komorze cytometru. Komora ta ma zdefiniowane wymiary (powierzchnię i wysokość) a zliczane są komórki znajdujące się w polu o określonych wymiarach. Policzenie zdarzeń znajdujących się w obrębie kilku do kilkunastu takich pól, przy założeniu homogenności zawiesiny, pozwala na wyliczenie ilości komórek przypadającej na jednostkę objętości.

Komorę hemocytometru (Rys. 3) stanowi grube oszlifowane szkiełko podstawowe, z centralnie umieszczonymi siatkami do liczenia. Siatki rozdziela system rowków układem przypominający literę H. Za rowkami znajdują się ograniczniki, na których umieszcza się szkiełko nakrywkowe. W ten sposób uzyskuje się zamkniętą komorę, której wysokość liczona od powierzchni siatek do powierzchni szkiełka nakrywkowego wynosi dokładnie 0.1 mm. Szkiełko nakrywkowe jest nieco węższe od szkiełka podstawowego toteż po zamknięciu komory nie zasłania zagłębień, do

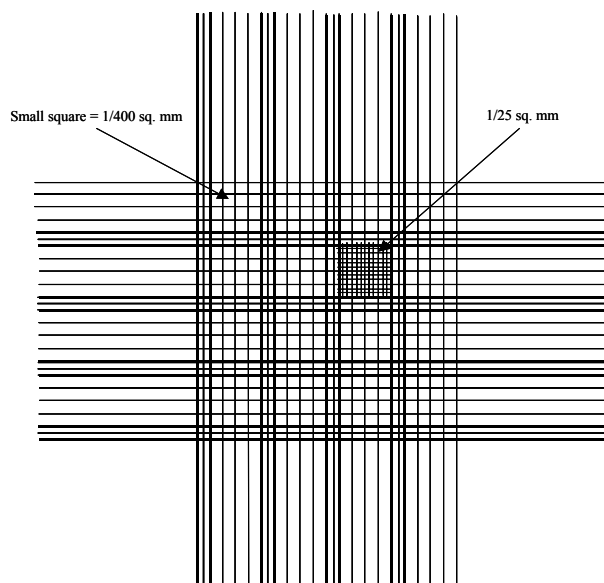
których wprowadza się zawiesinę komórek. Z zagłębień tych komórki są kapilarnie wciągane do komory i rozprowadzane na powierzchni siatki.



Rys. 3. Widok komory hemocytometru szklanego.

Istnieje kilka rodzajów siatek hemocytometru. Jedną z częściej używanych komór jest komora Thoma z siatką przedstawioną na Rys. 4.

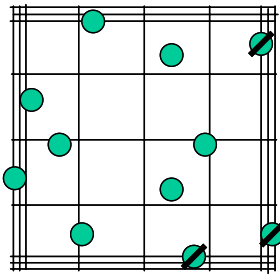
Całkowita powierzchnia siatki to 1 mm^2 . Składa się ona z 16 dużych kwadratów o boku $1/5 \text{ mm}$, które rozdzielają linie potrójne. Każdy taki kwadrat podzielony jest dalej na 16 małych kwadratów o boku $1/20 \text{ mm}$. Przecinające się linie potrójne tworzą również kwadraty o boku $1/20 \text{ mm}$.



Rys. 4. Siatka Thoma.

Metodyka liczenia:

- obiektyw x10;
- komorę ustawić tak, aby widoczne było największe pole ograniczone liniami potrójnymi (pole o pow. 1 mm^2); (patrz rysunek poniżej)



- liczyć komórki leżące wewnątrz kwadratu (o boku 1/20mm) a także na górnych i lewych liniach ograniczających (●); nie liczyć komórek znajdujących się na dolnych i prawych liniach ograniczających (/); pozwoli to uniknąć liczenia tych samych komórek po dwa razy;

Obliczenie gęstości komórek:

- obliczyć średnią ze zliczeń (ilość policzonych pól zależy od rodzaju siatki i celu dla jakiego oznaczenie jest wykonywane);
- gęstość zawiesiny komórek [szt./ml] wyliczyć ze wzoru:

$$c = n / v$$

gdzie: c – gęstość komórek
 n – ilość zliczonych komórek
 v - objętość komory;

Obecnie najczęściej w praktyce laboratoryjnej używa się hemocytometrów jednorazowych (plastikowych), składających się z zespolonych ze sobą elementów (połączonej ze sobą komory i szkiełka nakrywkowego). Pozwala to na uniknięcie dodatkowych czynności związanych z przygotowaniem hemocytometru do liczenia (składania komory), jej mycia i eliminuje niebezpieczeństwo uszkodzenia komory w czasie analizy.

Zasady posługiwania się hemocytometrem szklanym:

Hemocytometr jest prostym ale stosunkowo kosztownym przyrządem (cena ok. 100 euro) z tego względu należy dołożyć wszelkich starań aby nie uszkodzić/stłuc komory.

Należy ograniczyć pracę z komorą trzymaną w ręku i wszelkie operacje jak np. czyszczenie, składanie, napełnianie komory, wykonywać z komorą leżącą na stole lub w niewielkiej odległości od jego powierzchni. Proszę unikać przenoszenia komory pomiędzy stołami laboratoryjnymi i przekazywania jej innym osobom ponieważ może to doprowadzić do jej upuszczenia i stłuczenia.

Komorę trudno uszkodzić ręcznie a więc należy ją trzymać pewnie w ręku tak aby nie wypadła przypadkowo podczas manipulacji.

Po zakończeniu ćwiczenia proszę **samodzielnie nie myć** komór ale pozostawić je na stole do umycia przez personel pomocniczy lub prowadzącego ćwiczenie.