

ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ – ΧΡΩΣΕΙΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΑΘΗΜΑ I: Εισαγωγή στο Εργαστήριο

Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής

Δρ Χρ. Τσικρικώνη

Γιατί χρησιμοποιούμε χρωστικές?

- Για να γίνουν ορατά τα κύτταρα ή τα κυτταρικά συστατικά
 - μέγεθος
 - σχήμα
 - δομή
- Για την παρατήρηση μεταβολικών διεργασιών
- Για τη διαφοροποίηση μεταξύ νεκρών & ζωντανών κυττάρων

Οι ζωντανοί ιστοί, τα περισσότερα κύτταρα και οι κυτταρικές δομές είναι **άχρωμα**

Εξαιρέσεις: ερυθροκύτταρα, μελανοκύτταρα ή φυτικά κύτταρα

Λύση στο πρόβλημα: ο ανοσοφθορισμός ή άλλες μορφές μικροσκοπίας, καθώς και οι διάφορες τεχνικές χρώσης

Χρώσεις

- Σήμανση του στόχου με έγχρωμες ουσίες (χρωστικές)

Μεταβολή του δείκτη διάθλασης των δειγμάτων από τον δείκτη διάθλασης του μέσου

Αποτέλεσμα: οι ακτίνες του φωτός που περνούν από το χρωματισμένο δείγμα ακολουθούν διαφορετική πορεία από αυτές που περνούν από το μέσο τους

Οι **χρωστικές** είναι συνήθως ιονισμένες αρωματικές οργανικές ενώσεις. Έχουν χρώμα γιατί περιέχουν στο μόριό τους δύο βασικές χαρακτηριστικές ομάδες:

- **Χρωμοφόρα:**

>Ένα ή περισσότερα σε κάθε χρωστική
>προκαλούν βαθυχρωμία, καθώς απορροφούν φώς και επομένως μετατοπίζουν το μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη

- **- C = C -**
- **- C = N -**
- **- C = O -**
- **- N = N -**
- **- NO₂**

- **Αυξόχρωμες ομάδες:**

>συνδέουν τη χρωστική με διάφορα στοιχεία του κυττάρου και λειτουργούν ως παράγοντες διαλυτοποίησης της χρωστικής.

>**Ενισχύουν** το χρώμα, ενισχύοντας την πολικότητα της χρωστικής με το θετικό ή αρνητικό τους φορτίο. Αυξόχρωμες ομάδες είναι οι:

- **- NH₂, - COOH - HSO₃ - OH**

Κατηγορίες χρωστικών

- **Βασικές ή κατιονικές:** το χρώμα βρίσκεται στο θετικό ιόν
- **Όξινες ή ανιονικές:** το χρώμα βρίσκεται στο αρνητικό ιόν
- **Ουδέτερες:** από ανάμειξη βασικής και όξινης χρωστικής

Κατηγορίες χρωστικών

- **Μεταχρωματικές:** βάφουν με διαφορετικό χρώμα τα διάφορα υποκυτταρικά συστατικά
- **Ορθοχρωματικές:** τα υποκυτταρικά συστατικά βάφονται με το ίδιο χρώμα

Κατηγορίες χρώσεων

☐ ΑΠΛΕΣ

☐ ΔΙΑΦΟΡΙΚΕΣ

☐ ΕΙΔΙΚΕΣ

Απλές χρώσεις

- Υδατικά ή αλκοολικά διαλύματα **μίας βασικής χρωστικής** (μπλε του μεθυλενίου, κρυσταλικό ιώδες)
- Μορφολογία (σχήμα, διάταξη) ενός οργανισμού (π.χ. βακτήρια)

Διαφορικές χρώσεις

- Αντιδρούν διαφορετικά στα διάφορα είδη μικροβίων
- Χρησιμοποιούνται για το **διαχωρισμό** διαφορετικών ειδών μικροβίων
- Gram χρώση

Ειδικές χρώσεις

- Χρησιμοποιούνται για την ανάδειξη συγκεκριμένων τμημάτων των μικροοργανισμών ή οργανιδίων (π.χ. ενδοσπόρια, μαστίγια)

Προϋποθέσεις για να επιλεγεί μία διαδικασία χρώσης είναι οι ακόλουθες:

- Εξειδίκευση στόχου
 - Ευαισθησία
 - Διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του ιστού και των κυττάρων.
- Πείραμα ελέγχου (control) με τη χρήση θετικών ή/και αρνητικών μαρτύρων.

Ιστοχημεία - Κυτταροχημεία

Η χημική **ανίχνευση** υποκυτταρικών στοιχείων και βιολογικών μακρομορίων μέσα σε ιστούς και κύτταρα

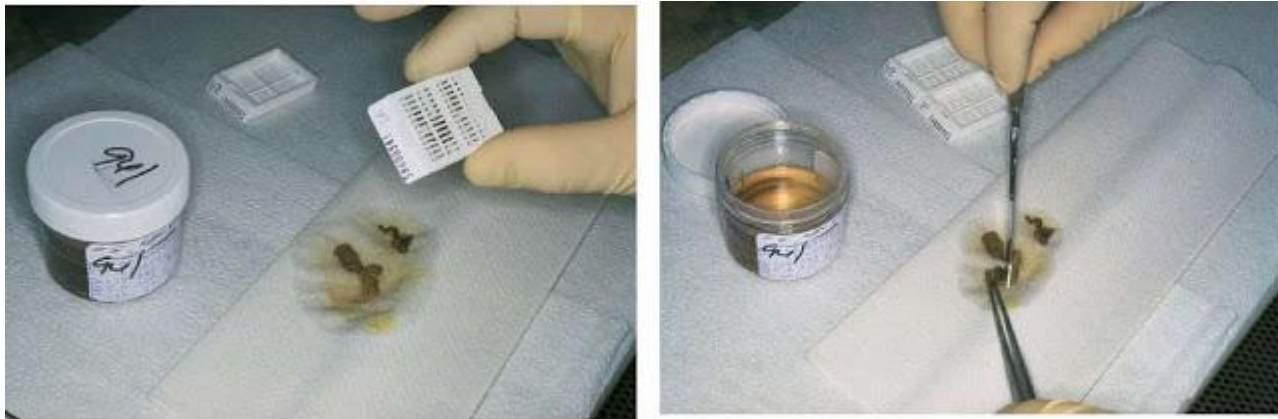
- σχέση **δομής** και λειτουργίας σε ιστούς και κύτταρα
- ακριβέστερος **εντοπισμός** βιολογικών μακρομορίων

Οι αντιδράσεις μεταξύ χρωστικών και κυτταρικών συστατικών – στόχων είναι ηλεκτροστατικής φύσεως και **δεν είναι ειδικές**

Η χρώση εξαρτάται από:

1. τον τρόπο μονιμοποίησης και έγκλεισης
2. το pH του διαλύματος (ένταση χρώσης)
3. το βαθμό διάστασης της χρωστικής(ποσότητα χρωστικής)
4. Το ισοηλεκτρικό σημείο των υποκυτταρικών στοιχείων (pI)

Διαδικασία παρασκευής μόνιμων δειγμάτων:



1) Μονιμοποίηση του ιστού (άμεσα μετά τη λήψη του):

- a. σταθεροποίηση πρωτεϊνών,
- b. διατήρηση κυτταρικής δομής,
- c. προετοιμασία δείγματος για να δεχτεί τη χρώση.



2) Έγκλειση του ιστού: αύξηση σκληρότητας του ιστού ώστε να μπορούν να γίνουν στη συνέχεια τομές

- a. έκπλυση με **αιθανόλη** (για αφαίρεση περίσσειας νερού)
- b. Εμποτισμός με **διαλυτικό** (για τη διάλυση του λίπους)
- c. Διήθηση με **παραφίνη** ή ζελατίνη (οπτικό μικροσκόπιο) και εποξειδικές ρητίνες (ηλ. μικροσκόπιο)
- d. Στερεοποίηση με ψύξη ή πολυμερισμό ή ταχεία κατάψυξη.

αλλοίωση
κυτταρικών δομών

Διάρρηξη κυττάρων
λόγω δημιουργίας
κρυστάλλων πάγου



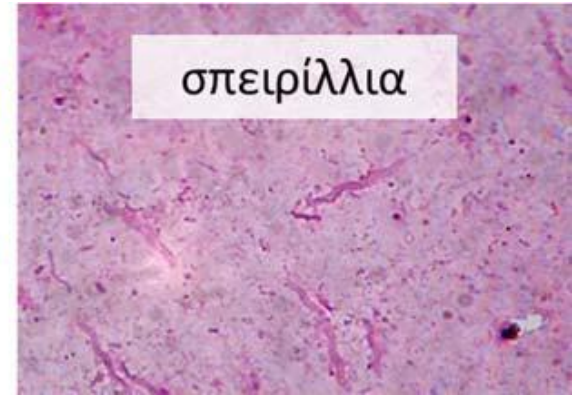
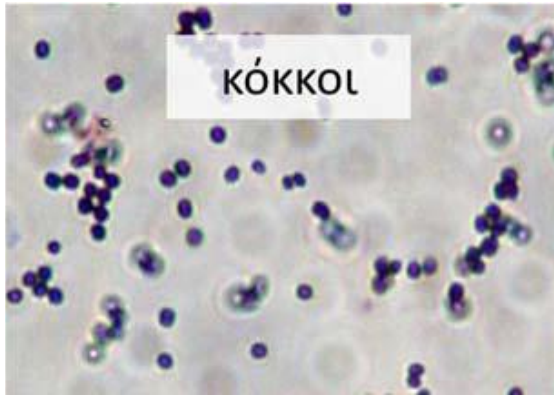
3) Λήψη λεπτών τομών: μικροτόμοι - οπτικό μικροσκόπιο
υπερμικροτόμοι - ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

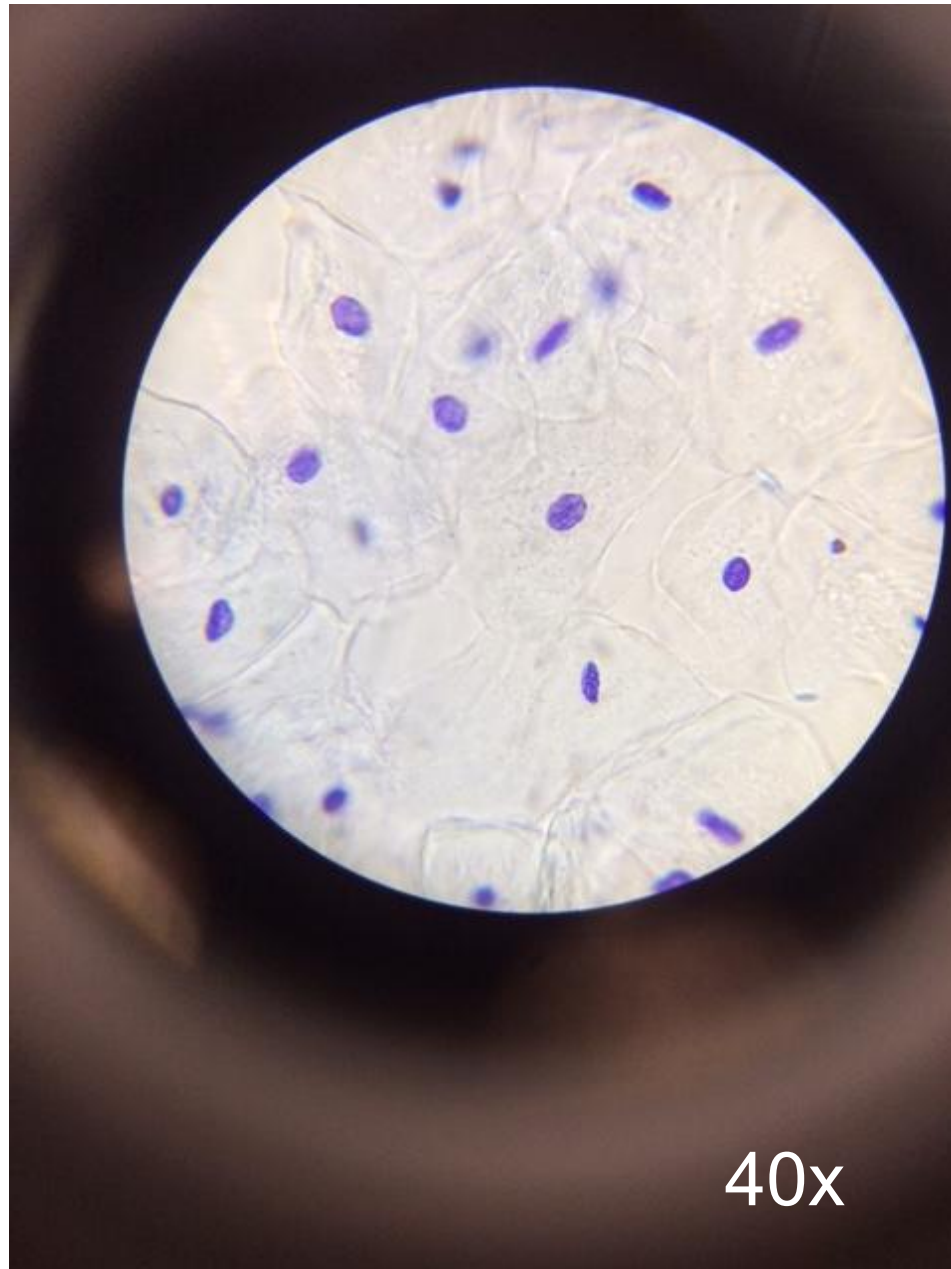
4) Καθήλωση των τομών: τοποθέτηση τομών σε αντικειμενοφόρο πλάκα και σταθεροποίησή τους με κολλώδεις ουσίες (π.χ. βάλσαμο του Καναδά)

Χρήση στη βιοδιαγνωστική

Ιστολογικές και κυτταροχημικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται εκτεταμένα για **διαγνωστικούς σκοπούς** εκμεταλλευόμενες τις διαφορές στην κατανομή των διαφόρων βιολογικών μακρομορίων σε κύτταρα και ιστούς ανάμεσα στα φυσιολογικά και παθολογικά παρασκευάσματα.

Προκαρυωτικοί οργανισμοί στοματικής μικροχλωρίδας – χρήση της χρωστικής Giemsa 10%

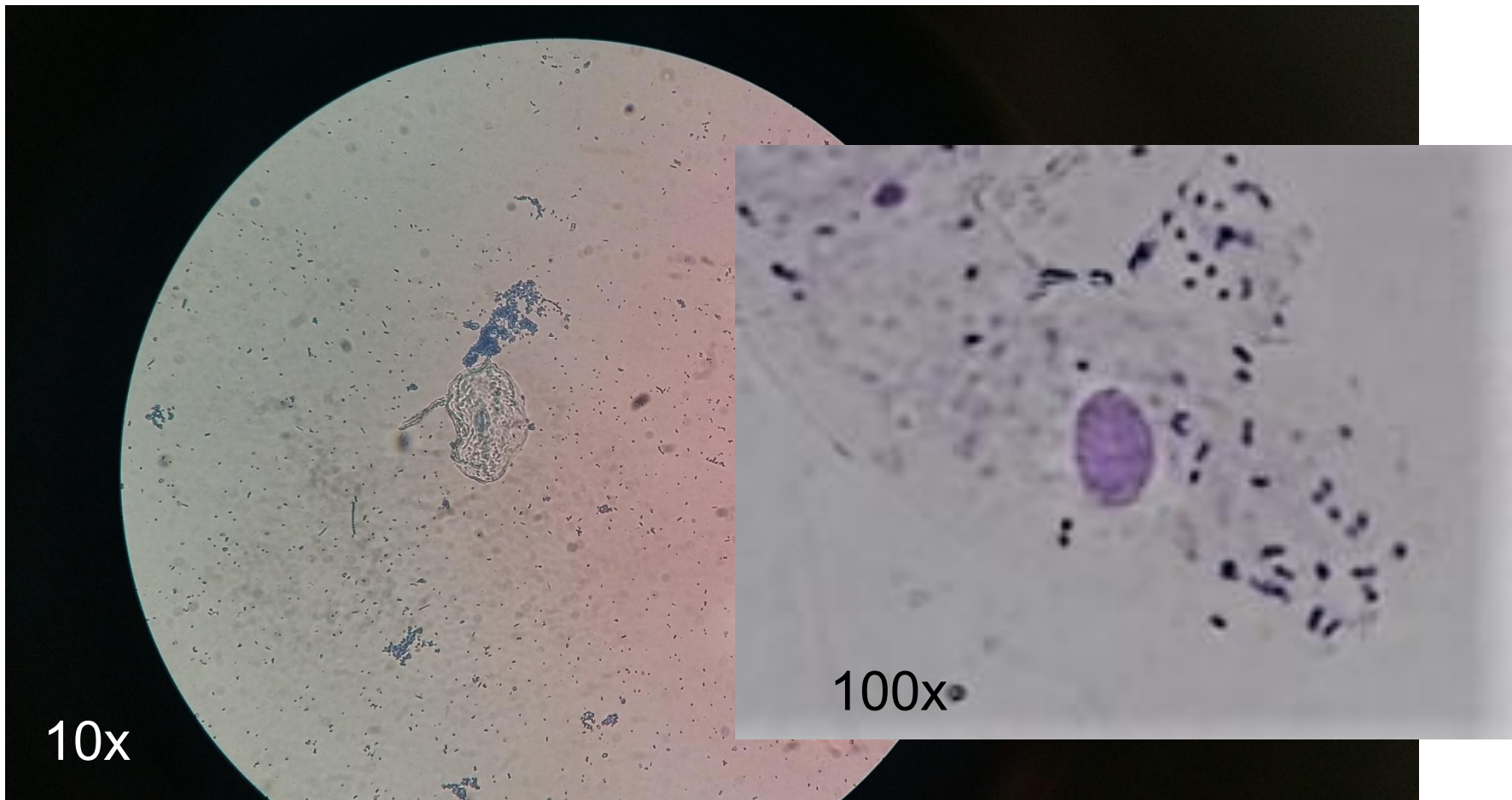




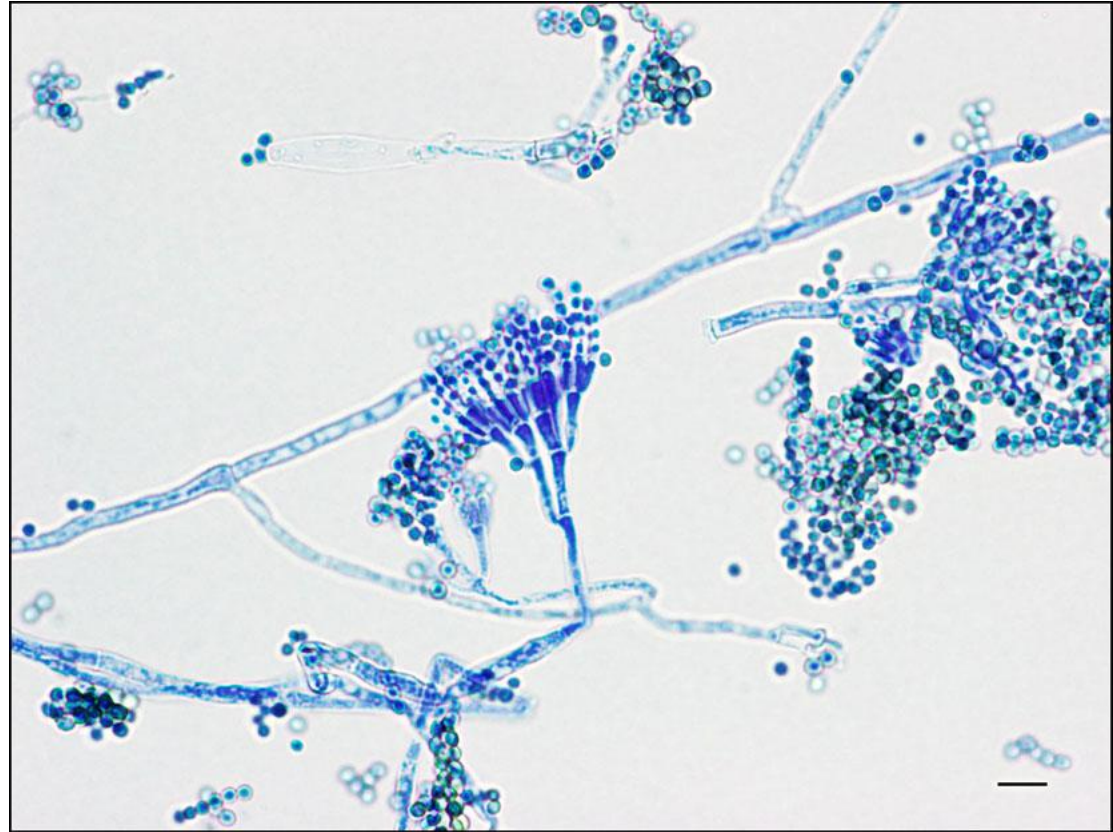
40x

10x

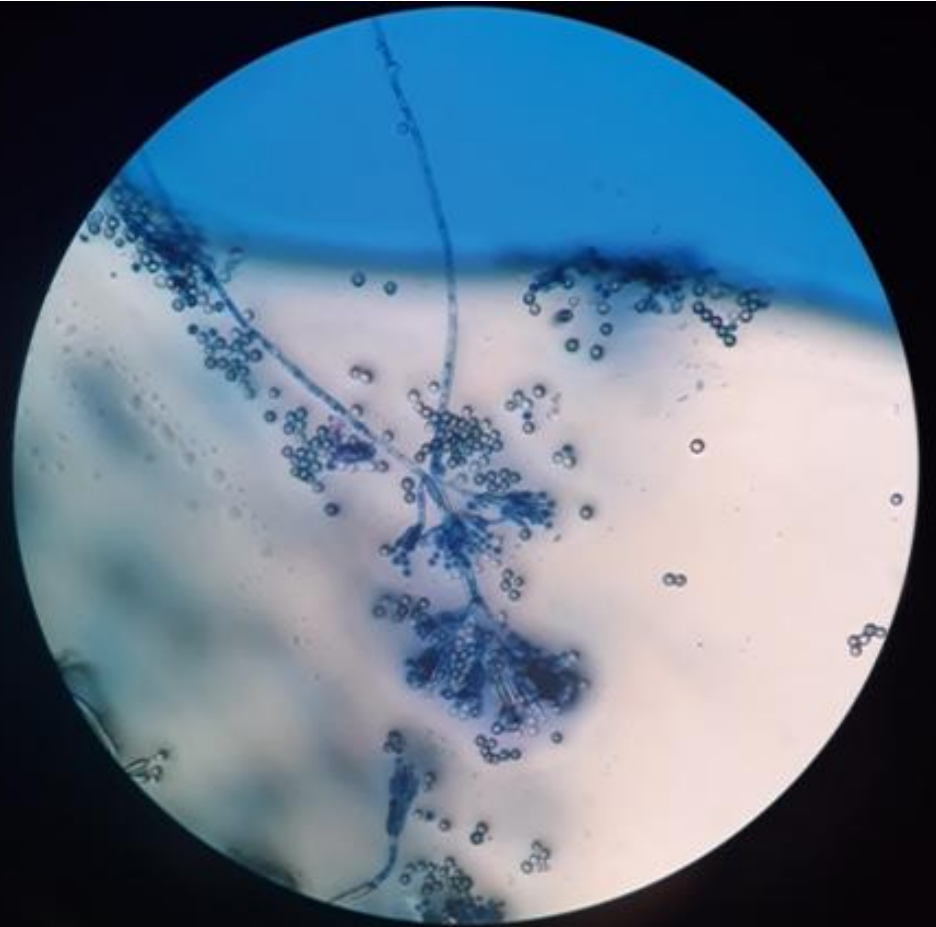
100x



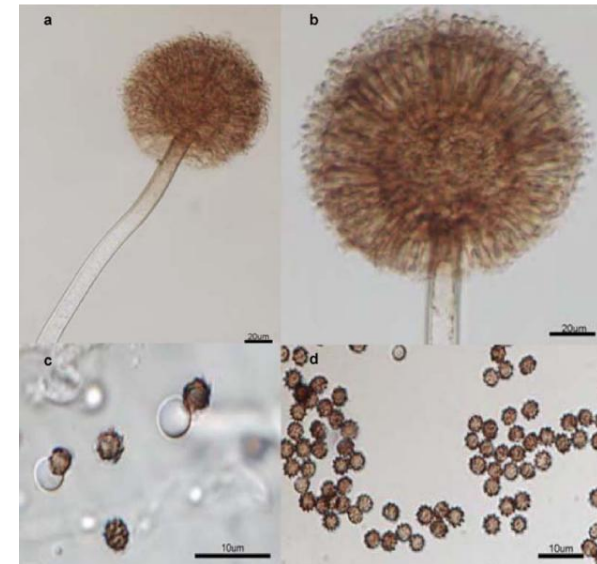
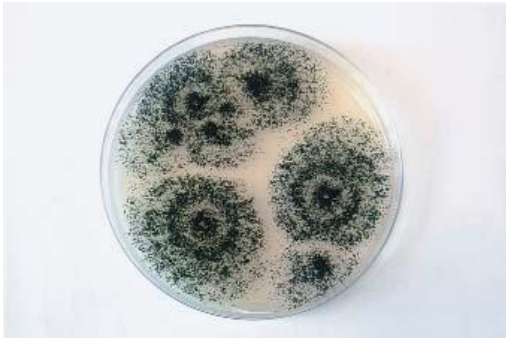
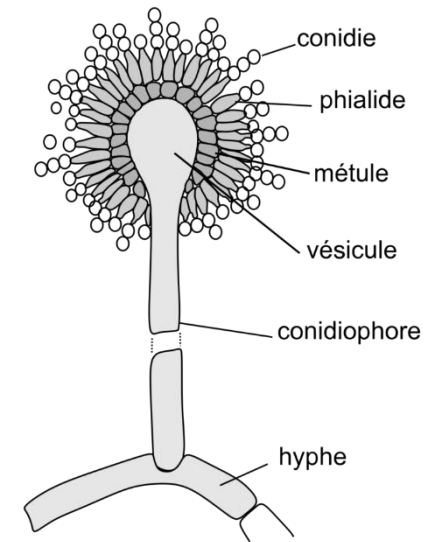
Μούχλα του πορτοκαλιού (*Penicillium* sp.)



Penicillium sp.

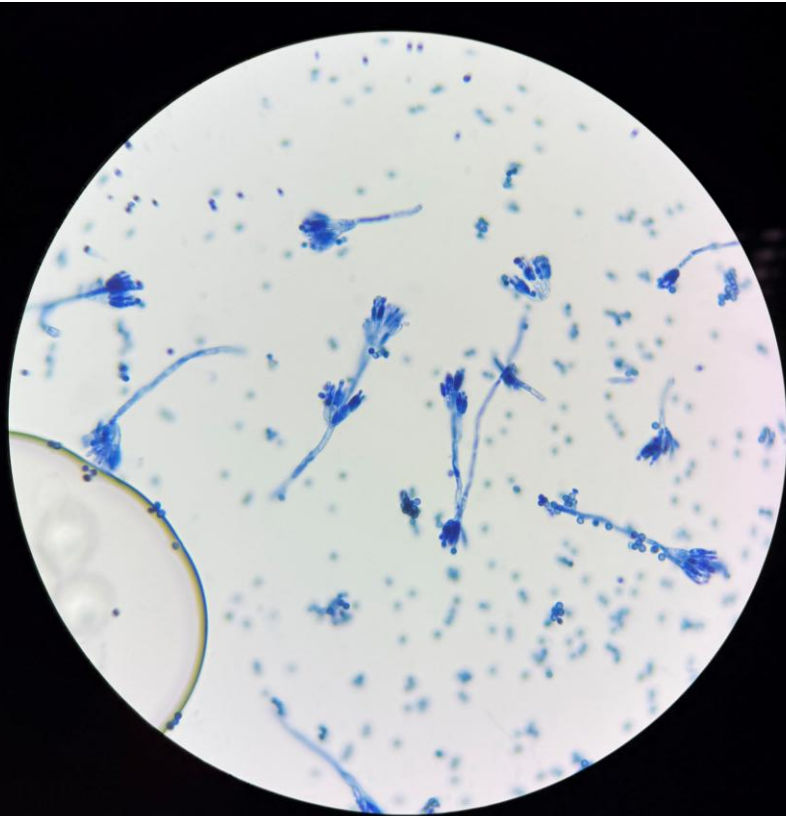


Aspergillus niger

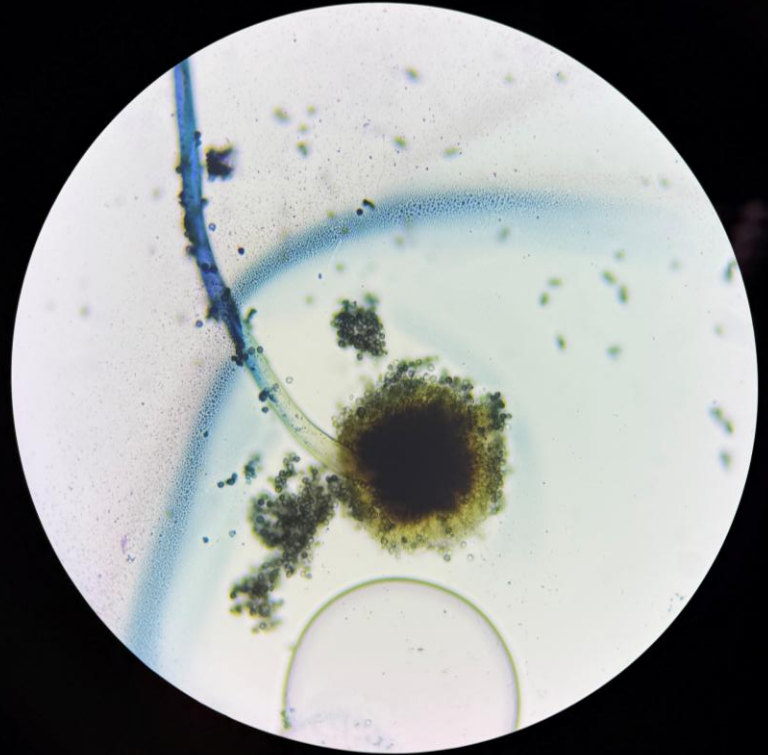


<https://www.cabi.org/isc/datasheet/7444#tosymptomsOrSigns>

https://www.researchgate.net/figure/Aspergillus-niger-is-one-of-the-common-species-of-Aspergillus-a-genus-characterized-by_fig1_8883164



Penicillium sp.



Aspergillus niger