

**Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek**

## **PRAKTIKUM IZ BIOLOGIJE STANICE**

**Skripta za studente biologije smjera molekularna biologija**

**Priredile:**

**prof. dr. sc. Marijana Krsnik-Rasol**

**prof. dr. sc. Višnja Besendorfer**

**prof. dr. sc. Biljana Balen**

**doc. dr. sc. Dubravko Pavoković**

**doc. dr. sc. Petra Peharec**

**Zagreb, školska godina 2014/2015.**

## Sadržaj

	stranica
<b>Vježba 1. Mikroskopiranje</b>	<b>2</b>
<b>Vježba 2. Plan stanične građe i osnovni organizacijski tipovi stanica</b>	<b>11</b>
<b>Vježba 3. Biomembrane – indirektna opažanja</b>	<b>16</b>
<b>Vježba 4. Plastidi</b>	<b>19</b>
<b>Vježba 5. Izolacija kloroplasta. Stanično frakcioniranje i centrifugiranje</b>	<b>22</b>
<b>Vježba 6. Rezanje tkiva, bojanje i mikroskopiranje</b>	<b>24</b>
<b>Vježba 7. Stanična jezgra – Mitoza</b>	<b>28</b>
<b>Vježba 8. Endomitoza. Politeni kromosomi i C-mitoza</b>	<b>33</b>
<b>Vježba 9. Mejoza</b>	<b>40</b>
<b>Vježba 10. Izolacija jezgara i izdužene niti DNA</b>	<b>44</b>

## Vježba 1. Mikroskopiranje

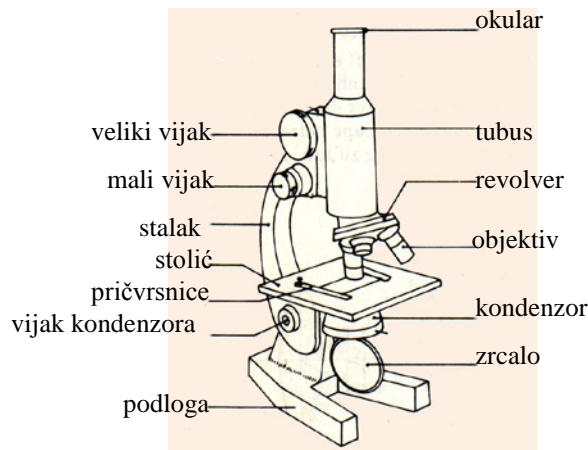
### MIKROSKOP

Mikroskopi kojima ćete se služiti u praktikumu su marke Zeiss. To su moderni školski mikroskopi s dva okulara. Danas postoje i mnogo složeniji uređaji za mikroskopiranje (ultramikroskop, mikroskop s faznim kontrastom, polarizacijski, interferencijski /Nomarski/, fluorescencijski, akustički, konfokalni) koji se koriste u istraživačke svrhe ili za citološke analize, međutim u osnovi, svi svjetlosni mikroskopi rade na istom principu.

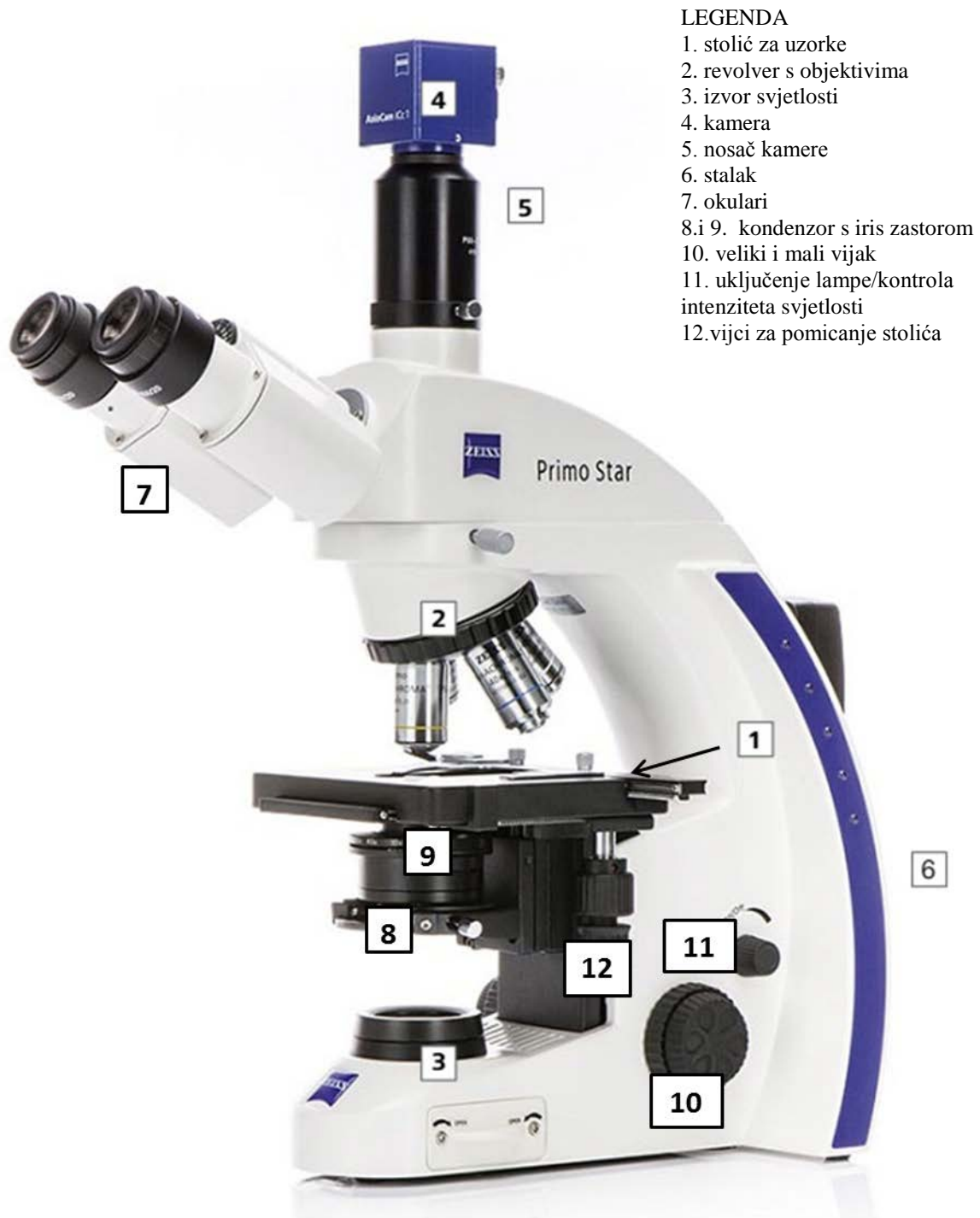
Razlikujemo mehanički i optički dio mikroskopa (slika 1.1)

**Mehanički dio:** podloga, stalak, tubus, stolić, veliki vijak, mali ili mikrometarski vijak.

**Optički dio:** okulari, objektiv, sprava za osvjetljavanje predmeta (kondenzor, predleća, iris-zastor, zrcalo )



**Slika 1.1.** Shema svjetlosnog mikroskopa (stariji tip školskog mikroskopa).



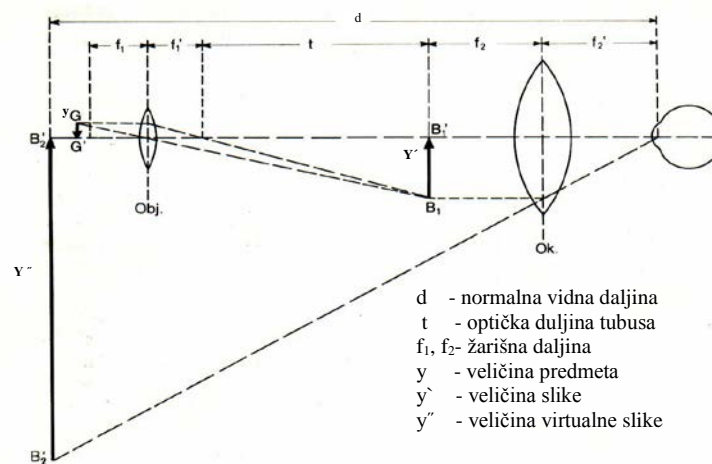
Slika 1.1a. Svjetlosni mikroskop marke Zeiss koji se koristiti u radu na praktikumu



Slika 1.1b. Svjetlosni mikroskop marke Zeiss koji se koristi u radu na praktikumu

## KAKO NASTAJE SLIKA U MIKROSKOPU ?

Preduvjet da postanete dobar mikroskopičar je da razumijete, bar u grubo, kako vaša sprava radi. Budite svjesni toga da svjetlost prolazi kroz preparat, da tamo dolazi do međudjelovanja između struktura u preparatu i svjetlosti te da svjetlost koju leće mikroskopa usmjeravaju do vašeg oka, nosi informaciju koju mozak obrađuje i interpretira. Svakako ponovite osnovne pojmove iz optike: lom zraka svjetlosti, prolaz svjetlosti kroz planparalelnu ploču, optičku prizmu i leću, indeks loma svjetlosti, rasap ili disperziju svjetlosti, difrakciju ili ogib svjetlosti na uskoj pukotini, interferenciju. Proučite u udžbeniku fizike kako nastaje slika u mikroskopu.



**Slika 1.2.** Stvaranje slike u mikroskopu (pojednostavljen shematski crtež).

Optički sustav mikroskopa sastoji se od dva bitna sustava leća: objektivna i okulara. Objektiv daje povećanu, obrnutu i realnu sliku predmeta, a okular tu realnu sliku još povećava. Prema tome, upravo je kvaliteta objektivna presudna, jer ako u realnoj slici koju on daje, sitne pojedinosti nisu vidljive tj. razlučene, okular će samo povećati sliku na kojoj se pojedinosti ne vide. To je prazno povećanje.

Ukupno povećanje mikroskopa jednako je umnošku povećanja objektivna i okulara.

$$P_u = P_{ok} \times P_{ob}$$

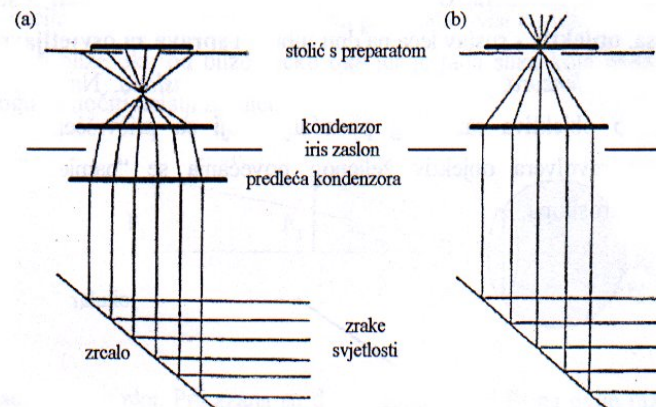
## MIKROSKOPIRANJE

**1. Uskladite visinu stolca** prema svome tijelu, tako da bez naprezanja možete primaknuti oko okularu. Mikroskop neka bude točno ispred vas. (Važno je pravilno držanje, jer će vas inače zaboljeti oko, vrat i kralježnica.)

Mikroskopirajte **bez naočala**, osim ako niste jako kratkovidni. (ovaj mikroskop ima mogućnost mikroskopiranja i sa naočalama)

Primijetiti ćete da vidno polje nije jednoliko osvijetljeno pri najslabijem objektivu. Središnji dio je jače osvijetljen, nego rubni. Ako radite s mikroskopom čiji se kondenzor može pomicati vijkom, onda ćete kod mikroskopiranja slabim objektivom spustiti kondenzor, a podići ćete ga kad rabite jače objektivne. Na mikroskopima u ovom praktikumu **kondenzori se ne mogu i ne smiju pomicati!** Iz slike 1.3. razumjet ćete da spuštanjem kondenzora ili upotrebom predleće, spuštamo žarište ovog sustava leća te tako preparat osvijetlimo širim stošcem divergentnih zraka svjetlosti.

**Slika 1.3.** Uloga kondenzora i njegove predleće. Kad je kondenzor u gornjem položaju



njegovo žarište je u ravnini preparata, ako ga spustimo ili postavimo predleću žarište se spušta, time postižemo jednoliku rasvjetu vidnog polja pri radu sa slabim objektivima.

**Uvjerite se da je slika koju daje objektiv uvećana, realna i obrnuta!**

Na predmetnom staklu nacrtajte tankim flomasterom sitnu strelicu!

Postavite staklo na stolić mikroskopa i zapamtite smjer strelice. Spustite najslabiji objektiv tako da bude udaljen od preparata (strelica na staklu) oko 5 mm. Izvadite okular i na otvor tubusa stavite ploču od mutnog stakla. Držite lijevom rukom ploču, a desnom podižite polagano tubus (velikim vijkom) dok na ploči ne ugledate sliku strelice. (Ako je prostorija jako osvijetljena teže ćete opaziti strelicu.) Usporedite veličinu i smjer strelice na preparatu s veličinom i smjerom slike te strelice koju vidite na staklenoj ploči. Biste li i virtualnu ili prividnu sliku mogli vidjeti na staklenoj ploči?

Sada opet stavite okular u tubus, pa približavajte i odmičite mutno staklo od očne leće okulara. Uхватite na staklu oštar svijetli krug – to je **okularni krug** u kojem se sijeku sve zrake koje izlaze iz mikroskopa i tu se nalazi vaše oko kad gledate u mikroskop. Provjerite smjer strelice kad staklo odmičete i približavate okularu!

## **FOKUSIRANJE – IZOŠTRAVANJE SLIKE MIKROSKOPA**

Fokusirati znači pomicati optičke sustave mikroskopa dok se ne pojavi jasna i oštra slika predmeta.

**Započnite mikroskopirati s najslabijim objektivom** na sljedeći način:

1. Stavite predmetno stakalce na stolić za mikroskopiranje i pričvrstite ga sa hvataljkama.
2. Podignite pažljivo stolić (velikim vijkom) tako da leća objektivna bude oko 0,5 cm udaljena od preparata (Pri podizanju stolića ne smijete gledati u objektiv da ne biste udarili u preparat te ga razbili i oštetili objektiv.).
3. Gledajući u okular spuštajte stolić (velikim vijkom) dok se u vidnom polju ne pojavi slika preparata. **FOKUSIRAMO UVIJEK TAKO DA POVEĆAVAMO UDALJENOST!** Razmak između frontalne leće objektivna i preparata, kad je njegova slika oštra, je **radna daljina objektivna**. Radna daljina objektivna to je manja što je jači objektiv.
4. Izoštrite sliku predmeta, prema potrebi, malim vijkom. Pomičite preparat i dobro ga promotrite, pa odaberite mjesto koje želite pobliže istražiti pomoću jačih objektivna.
5. Kad je slika fokusirana za slabiji objektiv, ona će biti u fokusu i za jače objektivna. Okrenite revolver i namjestite jači objektiv (40x, ali ne najjači tj. imerzijski objektiv!), a zatim samo malim vijkom izoštrite sliku.

## **APSORPCIJSKA I DIFRAKCIJSKO-REFRAKCIJSKA PRIRODA SLIKE**

Ovisno o prirodi preparata potrebno je mijenjati širinu stošca svjetlosti koji obasjava preparat. To se postiže **iris-zastorom**. On se nalazi u blizini donje žarišne ravnine kondenzora. U pravilu, obojene preparate obasjavamo širim snopom zraka svjetlosti, a neobojene užim.

Pojedinosti u preparatu opažamo zato što su obojene (apsorpcija svjetlosti određenih valnih duljina, priroda boje) ili zato što se od okoline razlikuju indeksom loma (difrakcijsko-refrakcijska slika). Apsorpcijska slika dolazi najbolje do izražaja kad je preparat osvijetljen širokim stošcem zraka svjetlosti, a difrakcijska dolazi bolje do izražaja kad je stožac svjetlosti uži. Slika u mikroskopu obično je istodobno apsorpcijska i difrakcijsko-refrakcijska.

**Preparat najprije pregledamo s potpuno otvorenim iris-zastorom, a zatim zatvaramo iris-zastor dok ne postignemo optimalan kontrast.**

Ako previše suzimo otvor iris-zastora, pojavit će se difrakcijski kolobari oko sitnih struktura, koji nastaju zbog optičkih pojava, a nisu zaista prisutni u preparatu.

Kod slabijih objektivna (suhi objektivna) iris-zastor treba suziti, a kod jačih (imerzijski objektivna) treba ga otvoriti.

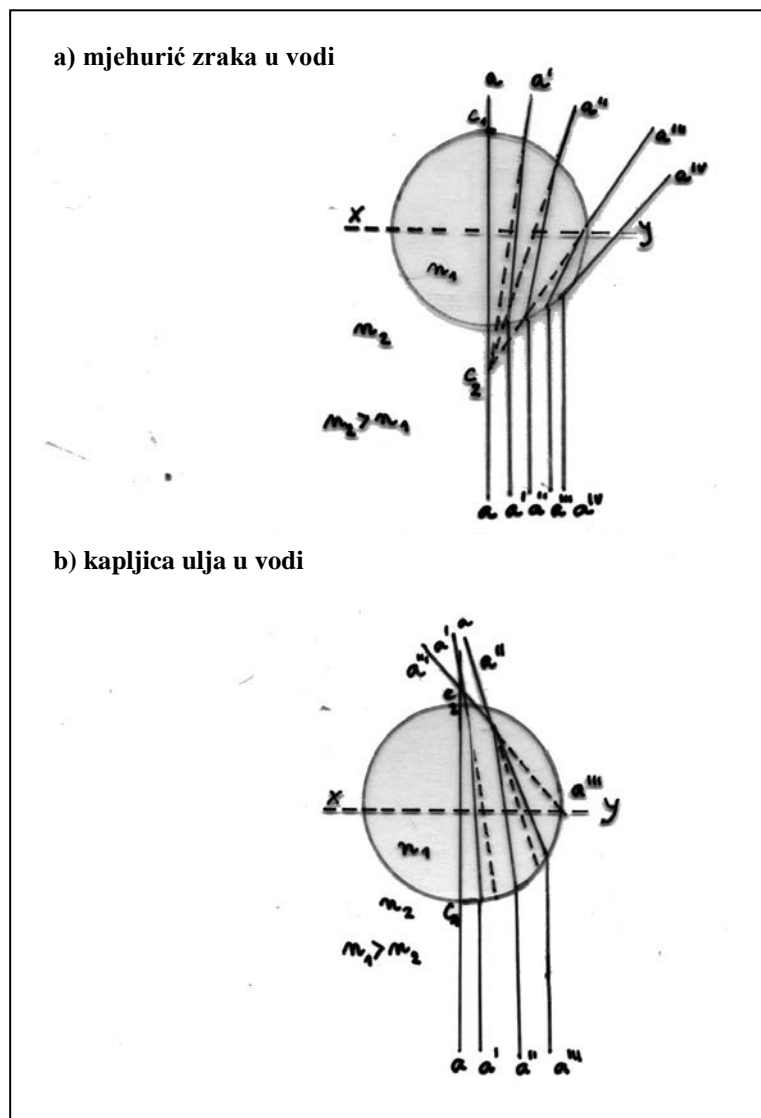


**ODREĐIVANJE RELATIVNOG INDEKSA LOMA MIKROSKOPOM**

Indeks loma ( $n$ ) je omjer brzine širenja svjetlosti kroz vakuum i neko sredstvo (zrak, voda, staklo). Zrake svjetlosti se šire sporije kroz vodu ( $n = 1,33$ ) nego kroz zrak ( $n = 1,0$ ). U stanici se brže šire kroz citoplazmu nego kroz jezgru, a još sporije se šire kroz jezgricu. Brzina širenja zraka svjetlosti kroz neko sredstvo ovisi o njegovoj optičkoj gustoći. Na osnovi relativnog indeksa loma možemo prepoznati neke strukture u preparatu. Npr. u živoj stanici pokožice luka mitohondrije ćemo razlikovati od sferosoma (masne kapljice), upravo po razlici u indeksu loma.

Obično student u preparatu najprije opazi mjehurić zraka, iako on nije dio objekta koji istražuje, već je nehotice uklopljen u preparat.

Pomoću preparata u kojem su mjehurići zraka uklopljeni u vodu ili ulje, naučit ćete prepoznati sferične uklopine manjeg indeksa loma, a promatrajući kapljice ulja u vodi, one većeg indeksa loma.



**Slika 1.4.** Lom svjetlosti kod: a) Mjehurić zraka u vodi , b) Kapljica ulja u vodi.

Proučite sliku 1.4. i odgovorite na sljedeća pitanja:

1. Što se događa sa zrakama svjetlosti kad prelaze iz sredstva većeg indeksa loma u ono manjeg i obrnuto pri prijelazu iz sredstva manjeg indeksa loma u ono većeg?
2. Što je karakteristično za prolaz zrake  $a$  na sl. 1.4. kroz sferične uklopine?
3. Što se događa sa zrakama  $a'$  i  $a''$  na graničnoj plohi voda – zrak, a što na graničnoj plohi voda – ulje? (Lom zraka svjetlosti na granici sredstava različite optičke gustoće pri izlazu iz mjehurića zbog preglednosti crteža nismo uzeli u obzir.)
4. Hoće li zrake  $a'''$  i  $a''''$  ući u objektiv mikroskopa nakon prolaza kroz mjehurić zraka (sl. 1.4.a) odnosno kap ulja (sl. 1.4.b)?
5. Ako usporedite sferične uklopine s optičkom lećom koja uklopina djeluje poput rastresače, a koja poput sabirače?

Uvjerite se na preparatu da ovo osnovno znanje iz optike može pomoći biologu da prepozna stanične organele ili uklopine i da zaključi nešto o njihovoj prirodi. Primjerice stanična jezgra ima veći indeks loma od okolne citoplazme (djeluje poput leće sabirače) te kod podizanja tubusa granična linija jezgre putuje prema unutra, a kod spuštanja tubusa prema van.

## **MIKROSKOP KAO MJERNI INSTRUMENT**

### **Mjerenje u vodoravnoj ravnini – određivanje duljine i širine predmeta**

Mikroskopom možemo mjeriti dužine uz pomoć **okulara za mjerenje** (okularni mikrometar). U takav okular umetnuta je prozirna pločica sa skalom na kojoj je 1 cm podijeljen na 100 dijelova. Preparat valja namjestiti tako da se struktura koju želimo mjeriti, preklapa sa crticama skale. Da biste to postigli pomiknite preparat i vrtite okular dok skala nije u željenom položaju. Zabilježite koliko crtica prekriva duljinu, a koliko širinu objekta istraživanja. Time još ne znate stvarnu dimenzije mjerene strukture, jer se veličina razmaka između dviju crtica na skali mjernog okulara, mijenja ovisno o povećanju objektiva. Zato za svaki objektiv treba baždariti (umjeriti) skalu u okularu, kako bi se odredila njezina mikrometerska vrijednost (razmak između dviju crtica u  $\mu\text{m}$ ).

Za baždarenje je potreban **mikrometerski preparat** (objektni mikrometar). To je predmetno staklo na kojem je skala od 1mm podijeljena na 100 dijelova (ponekad 2 mm podijeljena na 200 dijelova). Prema tome razmak između dviju crtica iznosi 10  $\mu\text{m}$ .

### **Aproksimativne metode mjerenja**

Kod početnih promatranja slika predmeta u mikroskopu, nehotice se uspoređuju veličine različitih dijelova preparata. Uspoređuju se veličine stanica, odnos veličine jezgre i stanice ili jezgre i kloroplasta te mitohondrija. Nastoji se otprilike odrediti veličina neke stanice usporedbom s nekom strukturom čiju veličinu poznajemo. U histološkim preparatima životinjskih tkiva, za usporedbu služe eritrociti.

Približno mjerenje možemo izvršiti i na sljedeći način:

Procijenimo veličinu neke strukture u vidnom polju (npr. stanice, jezgre, škrobnog zrna) u milimetrima i podijelimo tu vrijednost s umnoškom povećanja objektiva i okulara tj. ukupnim povećanjem mikroskopa.

### **Vježbe u praktikumu**

**Zadatak 1.** Na čisto predmetno staklo kapnite kap vodovodne vode i u nju polegnite listić mahovine, listić vodene kuge (*Elodea canadensis* L.), tanki prerez lista ili neki drugi objekt koji će poslužiti u vježbi mikroskopiranja. Postupite prema gornjim uputama i promotrite preparat kod slabog povećanja (objektiv 8x) i zatim kod jačeg povećanja (obj. 40x).

#### **Pitanja:**

1. Vidite li isti dio preparata slabim i jakim objektivom?
2. Stane li cijeli preparat u vidno polje kod rada a) sa slabim (8x), b) s jačim objektivom (40)?

**Zadatak 2.** Na predmetno staklo kapnite kap destilirane vode i vrhom igle prenesite u nju zrnca škroba. (Škrobna zrnca možete dobiti i tako da ostružete žiletom prerezani gomolj krumpira ili sjemenku graha). Proučite preparat (obj. 40x) i nacrtajte nekoliko zrnaca škroba onako kako ih vidite kod posve otvorenog, previše zatvorenog i optimalno namještenog iris-zastora. Nakon toga dodajte kap Lugolove otopine uz rub pokrovnice i filtrar-papirom, kojeg ste prislonili uz pokrovnicu na suprotnoj strani, upijte nešto vode, da bi otopina brže prodrla u preparat.

#### **Pitanja:**

1. Što zaključujete o prirodi slike u slučaju nebojenih i obojenih škrobnih zrnaca?

**Zadatak 3.** Razrežite uzduž lukovicu luka (*Allium cepa* L) na ploške debljine oko 1 cm. Razdvojite mesnate ljuske i na udubljenoj strani izrežite pokožicu (ne odvajajući je od ljuske) u pravokutnike veličine oko 0,3 x 0,5 cm. Komadiće ljuski zajedno sa zarezanom pokožicom stavite u tikvicu s vodom pa pomoću vakuum sisaljke isušite zrak. (Ako nemate vakuum sisaljku dobro će poslužiti i injekcijska štrcaljka, stavite u nju vodu do polovine njena volumena, stavite tkivo, istisnite klipom sav zrak, i zatim začepite otvor štrcaljke prstom te izvlačite klip i pustite da se ponovno sam vrati. Ponovite to više puta.) Pincetom odvojite komadić pokožice i položite ga (ranjenom plohom prema gore) u kap vode na predmetnici. Pazite da se pokožice na savije ili smota! Položite pokrovnicu tako da izbjegnute uklapanje mjehurića zraka.

#### **Pitanja:**

1. Kako ćete razlikovati kapljicu ulja u vodi, od mjehurića zraka u vodi?

2. Što se događa sa zrakama svjetlosti kad pod nekim kutem padnu na granicu između vode (ulja) i zraka, a što onda kada dođu na granicu između vode i ulja?
3. Ako djelovanje sferičnih uklopina usporedite s djelovanjem leće, koja uklopina djeluje poput leće rastresače, a koja poput sabirače?
4. Zašto je potrebno isisati zrak iz tkiva lukovice?
5. Što uočavate gledajući jezgru i stanične stijenke uz fino pomicanje tubusa malim vijkom?

**ZA SLIJEDEĆU VJEŽBU:**

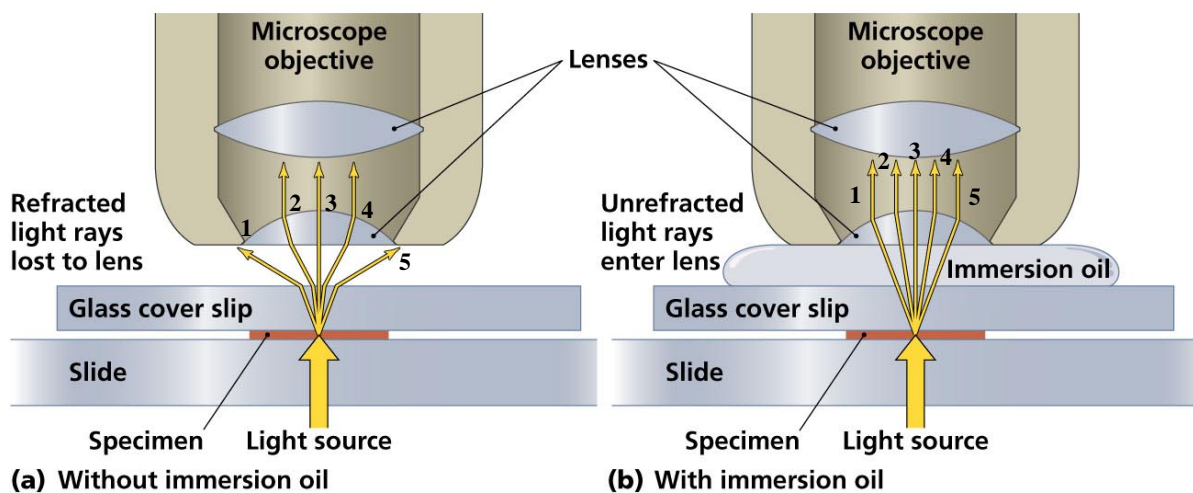
- Shematski prikaz bakterijske stanice
- shematski prikaz alge *Chlorella* sp.(vrčasti kloroplast)

## Vježba 2. Plan stanične građe i osnovni organizacijski tipovi stanica

### IMERZIJSKI OBJEKTIV

Objektiv daje realnu, sliku predmeta, koju okular još jače poveća. Kvaliteta slike ovisi u prvom redu o kvaliteti objektiva.

Kod objektiva slabog i srednjeg povećanja, između preparata i frontalne leće objektiva je zrak (suhi sustavi). Imerzija ili imerzijski objektiv uranja se u kap imerzijskog ulja koje stavljamo na pokrovno staklo. Imerzijsko ulje ima indeks loma jednak indeksu loma stakla ( $n = 1,515$ ), a time se prostor između frontalne leće objektiva i preparata u optičkom smislu homogenizira, pa nestaje granica između sredstva većeg indeksa loma (pokrovno staklo) i manjeg indeksa loma (zrak,  $n = 1$ ). Na slici 2.1. desno prikazano je pravocrtno širenje zraka svjetlosti kroz optički homogen prostor, a lijevo vidimo lom zraka svjetlosti na graničnoj plohi staklo – zrak. U suhim sustavima dio zraka svjetlosti (zrake 1 i 5) promašit će objektiv zbog loma na granici staklo-zrak. U optički homogenom sredstvu nema loma svjetlosti, pa više zraka svjetlosti ulazi u objektiv.



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

**Slika 2.1.** U optički homogenom sredstvu nema loma svjetlosti (desno), pa zrake 1, 2, 3, 4 i 5 ulaze u objektiv. Zbog loma svjetlosti pri prijelazu iz preparata u zrak, zrake 1 i 5 neće ući u objektiv.

## Rad s imerzijskim objektivom

Imerzijski objektiv moramo približiti preparatu, jer je njegova radna daljina (udaljenost frontalne leće objektiva od preparata) vrlo mala (0,13 - 1,15 mm). Zbog toga treba s njime **pri fokusiranju postupati vrlo pažljivo**. To se radi ovako:

1. Namjestite se za rad na mikroskopu
2. Pomoću slabog objektiva pregledajte preparat. Stavite u sredinu vidnog polja strukture koje želite istraživati.
3. Provjerite kod jačeg povećanja kvalitetu vašeg preparata i namjestite preciznije odabrani dio preparata.
4. Pomaknite revolver s objektivima tako da je iznad preparata prazan prostor.
5. Udaljite leću objektiva od preparata pomoću velikog vijaka oko 2 cm te pomaknite revolver s objektivima tako da je iznad preparata prazan prostor
6. Stavite kap imerzijskog ulja na pokrovno staklo, točno tamo gdje vidite krug svjetlosti koja dolazi iz kondenzora.
7. Okrenite revolver tako da imerzijski objektiv dođe na mjesto suhoga.
8. Nagnite glavu da vidite frontalnu leću objektiva pa velikim vijkom podižite stolić za preparat dok leća objektiva ne dotakne kap imerzijskog ulja. U trenutku dodira imerzijsko ulje naglo prione uz objektiv, pa primjećujete lagani bljesak.
9. Sada gledajte u okular i lagano podignite stolić malim vijkom, ako se slika ne pojavi polako spuštajte stolić dok ne dobijete oštru sliku. (Pazite da naglim i neopreznim dizanjem stolića ne zgnječite ili razbijete preparat i da ne oštetite objektiv!!)

### Napomena!

Ako slika nije jasna i preparat je loše priređen (predebeo) imerzijski objektiv neće popraviti te nedostatke preparata! Pazite da pokrovno staklo dobro leži na preparatu, te da nije koso zbog prevelikih komadića tkiva ili predebelih prereza.

Radimo li s jakim objektivom moramo neprestano fokusirati, tj. izoštravati sliku predmeta malim vijkom. To činimo zato da bismo izbjegli nejasnoće, koje su uvjetovane zakrivljenošću ravnine slike, ali i zato da istražimo različite ravnine preparata. Budite svjesni toga da je mikroskopska slika stanice dvodimenzionalna, dok je sama stanica trodimenzionalna struktura.

## USPOREDBA PROKARIOTSKE I EUKARIOTSKE STANICE

Stanica je osnovna strukturna, funkcionalna i reproduksijska jedinica života. Bez obzira na njihovu raznolikost, stanice možemo razvrstati u jednu od dvije osnovne organizacijske skupine, a to su: **prokariotske** i **eukariotske** stanice (slika 2.2).

Prokariotske stanice su ujedno i organizmi i to jednostanični. Bakterije su prokariotski organizmi, a među njima razlikujemo arheje (archea ili archebacteria) i bakterije (eubacteria). Svi ostali organizmi (protisti, gljive, životinje i biljke) su eukariotski, a mogu biti jednostanični ili mnogostanični.

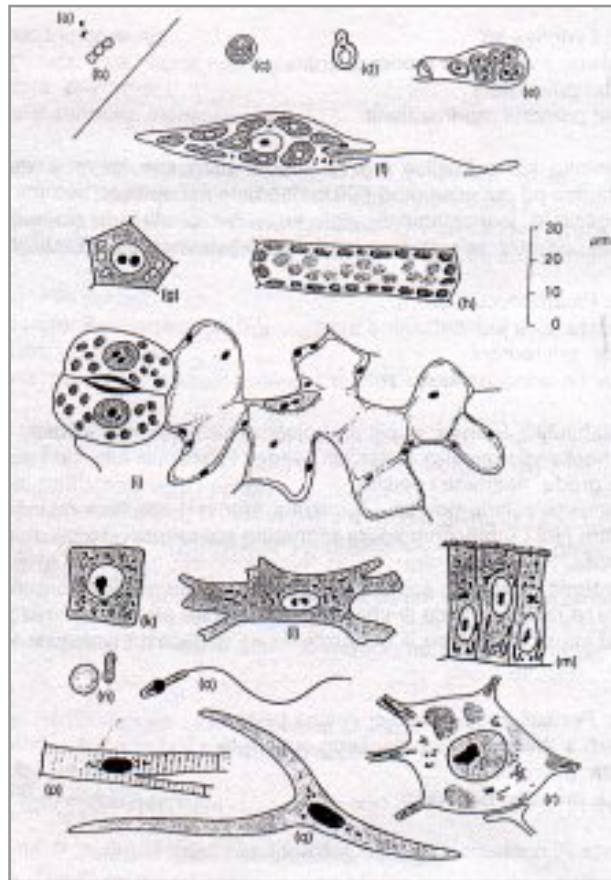
Naziv prokariotski i eukariotski odražava razliku u staničnoj organizaciji, pri čemu prokariotska stanica ne sadrži jezgru (grč. karyon = jezgra) u obliku staničnog organela, već je nasljedna tvar (genetički materijal), tj. kružna molekula DNA u citoplazmi. Taj dio citoplazme u kojem je DNA funkcionalno odgovara jezgri, to je ekvivalent jezgre ili nukleoid (lat. nukleus = jezgra). Među prokariotskim organizmima najsitniji i najjednostavniji organizmi su mikoplazme (veličina stanice oko 0,5  $\mu\text{m}$ ). Mikoplazme su paraziti te nemaju ni staničnu stijenku poput ostalih bakterija. Njihova DNA sadrži svega 500-700 gena. Mikoplazme se još nazivaju minimalnim stanicama, jer imaju onaj minimum veličine i organizacije potreban za život. S biokemijskog gledišta mikoplazme nisu tako jednostavne i njihova je molekularna organizacija vrlo složena. Najsloženiji prokarioti su cijanobakterije, koje u svojoj citoplazmi sadrže membranske lamele (tilakoide) koje su vrlo slične fotosintetskim membranama u kloroplastima biljnih stanica. Na tim se membranama odvija fotosinteza i to na način koji odgovara onome u biljaka, a ne fotosintezi u ostalih bakterija.

U bakterijskim se stanicama zbivaju svi važni metabolički procesi uključujući i tri osnovna puta za dobivanje energije: glikoliza, respiracija i fotosinteza. Jednostavnija organizacija prokariotskih stanica dolazi do izražaja u njihovim malim dimenzijama, nedostatku unutarstaničnih membrana, manjem sadržaju DNA i kraćem generacijskom vremenu.

Eukariotske stanice veće su i kompleksnije od prokariotskih. Njihova DNA smještena je u jezgri, koja je morfološki jasno izdiferencirana i odvojena od citoplazme jezgrinom ovojnicom (čine je dvije membrane). U citoplazmi eukariotskih stanica nalaze se organeli obavijeni ovojnicom (plastidi, mitohondriji) ili samo jednom membranom (ER, Golgijev kompleks, lizosomi). Eukariotske stanice membranama su raščlanjene (kompartimentizirane) u različite reakcijske prostore.

**Tablica 2.1. Razlike između prokariotskih i eukariotskih stanica**

<b>Prokariotske stanice</b>	<b>Eukariotske stanice</b>
Izgrađuju jednostanične organizme	Izgrađuju jednostanične i mnogostanične organizme
Nukleoid (ekvivalent jezgre)	Jezgra omeđena ovojnicom
DNA-kružna molekula	DNA-organizirana s proteinima u kromatin i kromosome
Veličina 0,1-10 $\mu\text{m}$	10-100 $\mu\text{m}$ i više
Nema kompartimentata (organela)	Membranom obavijeni kompartimenti - stanični organeli
Nema citoskeleta	Citoskelet
Binarno cijepanje	Mitoza, mejoza



**Slika 2.2.** Raznolikost stanica. Neki oblici stanica (prikaz kod istog povećanja) **a)** *E. coli*, **b)** *Nostoc* (cijanobakterija), **c)** *Chlorella* (zelena alga), **d)** *Saccharomyces* sp. (kvasac), **e)** *Pyronema* - askus s askosporama, **f)** *Euglena*, **g)** stanica vrška korijena biljke (meristemska stanica), **h)** stanica palisadnog parenhima s kloroplastima, roda *Forsythia*, **i)** stanice donje epiderme i puč sa stanicama zapornicama roda *Caltha*, **k)** parenhimska stanica jetre štakora, **l)** fibroblast (stanica iz kulture tkiva), **m)** epitelna stanica tubula bubrega, **n)** ljudski eritrocit, **o)** spermij čovjeka, **p)** mišićna stanica srca, **q)** tripolarna stanica glatkog mišića.

## RAD U PRAKTIKUMU

Čemu služi crtanje i to na početku 21. stoljeća? Je li to gubljenje vremena, način da se ispuni praktikum i zaposle studenti ili možda ipak ima nekog smisla?

Crtanje ima važnu ulogu u mikroskopiji i još se uvijek ne može u potpunosti nadomjestiti fotografijom ili digitalnim prikazom slike na ekranu. Da biste mogli točno nacrtati strukture u preparatu morate ih pažljivo promatrati. Morate uočiti proporcije pojedinih struktura te njihov međusobni odnos i položaj. Stanicu vidite uvijek samo u optičkom presjeku tj. uvijek kao dvodimenzionalnu strukturu. Primijetit ćete da se njena slika mijenja pri fokusiranju, jer tada postaju jasno vidljive različite ravnine preparata. Suradnjom vaše ruke (kojom podižete i



spuštate tubus) i mozga (koji integrira slike različitih ravnina) možete dobiti predodžbu o trodimenzionalnoj strukturi preparata.

### Prednosti crtanja:

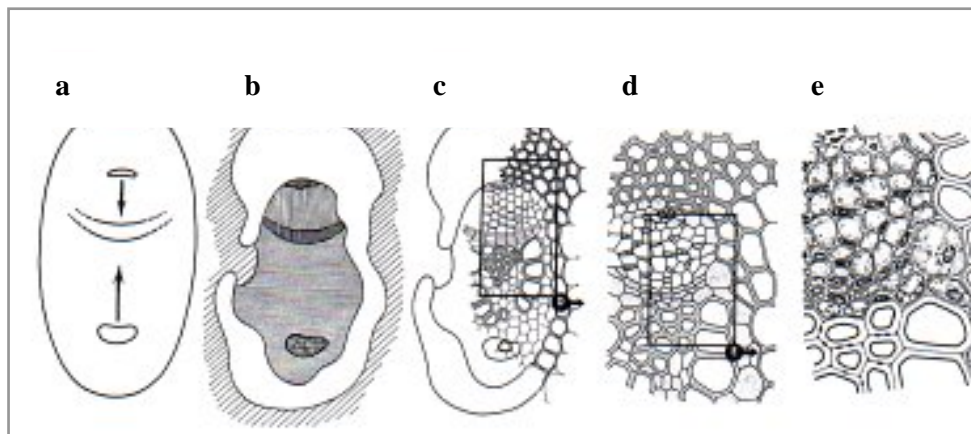
- Vježba zapažanja
- Optičke ravnine preparata mogu biti prostorno prikazane.
- Na crtežu se može istaknuti bitno, nebitno samo naznačiti, a izostaviti suvišno (npr. talog boje ili mjehur zraka).
- Crtežom se mogu prikazati preparati koji nisu prikladni za fotografiju (npr. prejako obojeni, predebeli).
- Opis crteža prisiljava vas da aktivirate svoje znanje.

### Nedostaci crtanja:

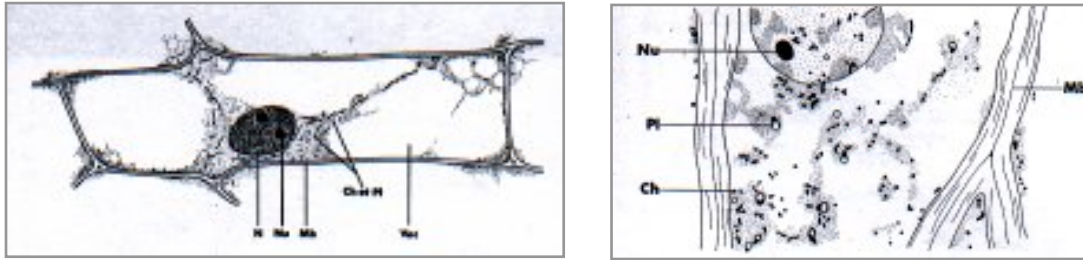
- Mikroskopsko crtanje traži mnogo vremena.
- Postoji opasnost subjektivnog prikazivanja preparata.
- Postoji mogućnost krivog prikazivanja dimenzija u preparatu.

Svatko može naučiti kako crtati. Potreban vam je jednostavan pribor: kvalitetan papir, nekoliko olovaka različite tvrdoće, dobra gumica. Papir na kojem crtate stavite tik uz mikroskop s desne strane (ili lijeve ako crtate lijevom rukom). U mikroskop gledajte lijevim okom, a istodobno neka desno oko gleda na papir i prati konture koje crtate. Uz malo vježbe to može svatko naučiti.

Crtež može biti jednostavna skica. Ona ne sadrži detalje, ali na njoj možete točno označiti mjesto koje je zanimljivo i koje želite još nekome pokazati. Pojednostavljeni crtež je detaljniji, ali su ipak neke strukture pojednostavljene (npr. biljne stanice se crtaju omeđene jednom linijom). Detaljan crtež prikazuje što je moguće vjernije strukture preparata. Tako detaljno može se nacrtati samo jedna stanica ili dio stanice. Na slici 2.3. i 2.4. prikazani su primjeri crtanja mikroskopskih preparata.



**Slika 2.3.** Mogućnosti prikazivanja mikroskopskog objekta crtanjem. **a** - skica, **b** – schema (različita tkiva su grafički različito označena), **c** – vjeran prikaz stanica s jednostrukim konturama, **d** – izrez iz C prikazan detaljnije, **e** – izrez iz d, stanice vjerno nacrtane s dvostrukim konturama (stanične stijenke) i staničnim sadržajem (Preparat – *Ranunculus* sp., provodna žila u poprečnom presjeku). Preuzeto iz: Braune W, Leman A, Taubert H, Pflanzenanatomisches Praktikum. Gustav Fischer Verlag, 1987)



**Slika 2.4.** Crtež cijele stanice (lijevo) detaljniji prikaz dijela stanice (desno).

### Vježbe u praktikumu

**Zadatak 1. Bakterijske stanice.** Na predmetno staklo stavite kap vode te vrhom iglice zahvatite bakterije koje rastu na hranidbenoj podlozi i prenesite ih u vodu. Na mjestu nanošenja bakterije će biti preguste, ali to mjesto može početniku olakšati nalaženje slike kod slabog povećanja. Kad ste izoštrili sliku kod slabog povećanja, pregledajte preparat pri jačem povećanju (obj. 40:1) te zatim nađite sliku rabeći imerzijski objektiv (90:1). Nacrtajte sliku bakterija koju daje imerzijski objektiv.

### **Zadatak 2. Eukariotske stanice**

**a) Stanice kvasca.** Na čisto predmetno staklo kapnite suspenziju kvašćevih gljivica. Neke su stanice žive, a neke mrtve. Razlikuju se po tome što su mrtve stanice obojene bojom metilensko modrilo, a žive su neobojene. Pregledajte preparat na uobičajeni način i nacrtajte sliku koju daje imerzijski objektiv.

**b) Stanica alge *Chlorella sp.*** U kap vode na predmetnom staklu stavite iglicom zelenu algu *Chlorella sp.* koju ste dobili uzgojenu u kulturi na hranidbenoj podlozi. Promatrajte algu kod najvećeg povećanja.

**c) Stanice lista vrste *Zebrina pendula* ili *Rhoeo discolor*.** Na čisto predmetno staklo kapnite kap vodovodne vode i u nju polegnite tanki prerez lista. Prerez najprije pogledajte pri slabom i srednjem povećanju, a zatim nacrtajte sliku koju daje imerzijski objektiv.

**d) Stanice epitela usne šupljine čovjeka.** Dobro operite ruke. Na čisto predmetno staklo stavite kap vode. Povucite jagodicom kažiprsta po sluznici s unutarnje strane obraza i prenesite oljuštene stanice u kap vode. Pokrijete pokrovnicom i pregledajte preparat. Nacrtajte sliku epitelne stanice koju daje imerzijski objektiv. Obojite stanice aceto-bojom (orceinom ili karminom; kapnite boju uz rub pokrovnice i filter-papirom sa suprotne strane izvlačite vodu, da biste ju zamijenili bojom.).

**Pitanja:**

1. Je li *Chlorella* prokariotska ili eukariotska stanica?
2. Je li *Chlorella* jednostaničan ili višestaničan organizam?
3. Na osnovu koje lako uočljive karakteristike možete odmah klasificirati stanicu *Chlorella* u jedan od dva osnovna tipa?
4. Koje su lako uočljive karakteristike biljne stanice?
5. Što ste opazili u neobojenim epitelnim stanicama?
6. Koji se dio epitelne stanice obojio intenzivnije?
7. Što zaključujete o veličini prokariotskih i eukariotskih stanica? Procijenite veličinu prokariotske i eukariotskih stanica koje ste gledali.

**ZA SLIJEDEĆU VJEŽBU:**

- Definicija izotoničnosti i izoosmotičnosti, objasnite primjerom

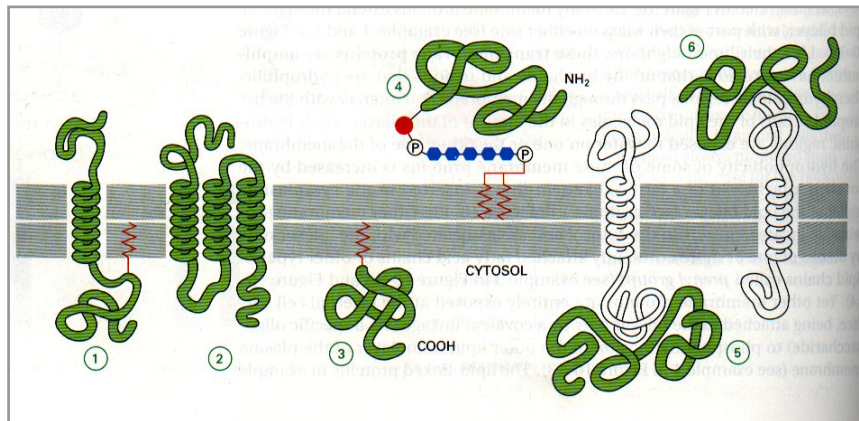
### Vježba 3. Biomembrane – indirektna opažanja

Plazmatska membrana (naziva se još plazmalema ili stanična membrana) obavlja stanicu i određuje njezin prostor te kao selektivno propusna barijera održava bitne razlike između stanice i njene okoline. Sve biološke membrane građene su po istom principu, a izgrađuju ih lipidi i proteini te glikolipidi i glikoproteini.

**Dvosloj lipida** tvori strukturni matriks membrane. Membranski lipidi su amfipatske molekule (na jednom kraju hidrofilne, a na drugom hidrofobne) koje se spontano međusobno orijentiraju, ovisno o tome nalaze li se u vodenoj sredini ili u nekom nepolarnom otapalu ili na granici dviju faza. U vodenoj sredini mogu se spontano složiti u dvosloj. Takav dvosloj djeluje poput dvodimenzionalne tekućine u kojoj molekule mogu lateralno difundirati (model tekućeg mozaika, Singer i Nicolson 1972., slika 3.1.).

**Membranski proteini** su pretežno odgovorni za funkciju membrana. Oni djeluju kao specifični receptori, enzimi, prenositelji ili čine vodene kanale za prolaz hidrofilnih tvari kroz membranu. Proteini mogu biti uronjeni u lipidni dvosloj – integralni proteini, usidreni u njemu ili vezni površinski kao periferni proteini.

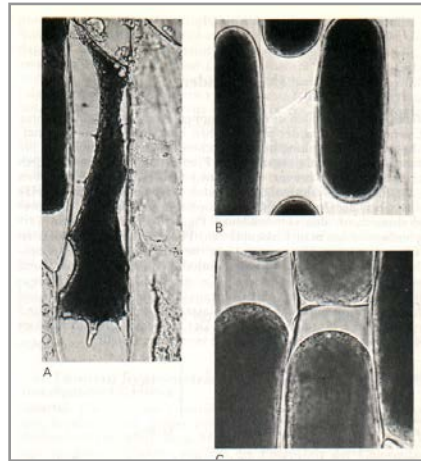
**Šećeri** ne dolaze samostalno već su kovalentno vezani za membranske proteine ili lipide. Nalaze se s vanjske strane plazmatske membrane, a ako su u unutrašnjosti eukariotske stanice, onda su okrenuti od citoplazme (prema unutrašnjosti membranskih vrećica npr. lizosoma). Uloga im je višestruka te su odgovorni i za međusobno prepoznavanje stanica.



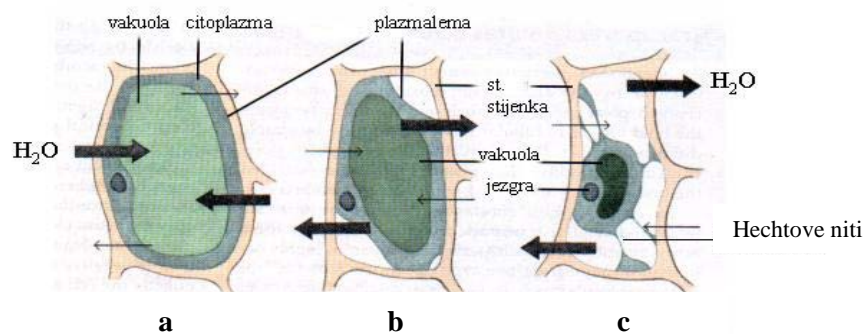
**Slika 3.1.** Membranski proteini mogu prolaziti kroz lipidni dvosloj (1, 2), biti usidreni u njemu (3, 4) ili su pričvršćeni samo periferno (5, 6). (Preuzeto iz Alberts i sur. Garland Pub. Inc. 1994)

### INDIREKTNI DOKAZI POSTOJANJA BIOMEMBRANA – PLAZMOLIZA

Pod pojmom plazmolize podrazumijevamo odvajanje plazmaleme i staničnog protoplasta od stanične stijenke kad se biljna stanica nađe u hipertoničnoj otopini (slika 3.2.). Pojava je izazvana osmozom. Eksperimentalno je možemo izazvati tako da žive biljne stanice stavimo u otopinu šećera ili soli koja ima veću koncentraciju nego stanični sok (sadržaj vakuole). Stanični sok je sada hipotoničan u odnosu na otopinu šećera, pa voda izlazi iz vakuole te kroz protoplazmatski sloj i plazmalemu izlazi iz stanice. Vakuola se smanjuje sve dok se ne izjednači koncentracija sadržaja vakuole s koncentracijom plazmolitika (otopine kojom je izazvana plazmoliza) (slika 3.3).



**Slika 3.2.** Plazmoliza u stanicama luka *Allium cepa*. (Preuzeto iz Nultsch, Grahle, Mikroskopisch botanisches Praktikum, Thieme 1968)



**Slika 3.3.** Plazmoliza u epidermalnim stanicama lista. **a)** Normalni uvjeti – turgescentna stanica **b)** Hipertonična otopina – početak plazmolize **c)** Hipertonična otopina veće koncentracije - plazmolizirana stanica. (Preuzeto iz: Raven i sur. Biology of Plants, Freeman & Comp. 1999.)

## **STANICA KAO OSMOMETAR**

### **Vježba**

1. Napravite 100 ml matične otopine saharoze koncentracije  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  (1,0 M). (Relativna molekularna masa saharoze: 342,3).
2. Razrjeđivanjem matične otopine priredite niz otopina koncentracija od 0,2 M do 1,0 M (prije rada nadopunite Tablicu 3.1).
3. Oštrim žiletom izrežite s donje strane lista biljke *Rhoeo discolor* tanke tangencijalne prereze (dobro će poslužiti i list puzavca *Tradescantia* sp. , pokožica luka, korijen cikle i dr.) te ih uronite u posudice u kojima ste priredili niz razrjeđenja saharoze. Nakon desetak minuta priredite preparate za mikroskopiranje.
4. Na predmetno staklo stavite kap vode (iz prve posude u nizu) i u nju nekoliko tankih prereza (iz iste posude). Pregledajte preparat kod slabog i srednjeg povećanja. Odaberite stanice koje su ljubičasto obojene zbog antocijana u vakuoli i nacrtajte takvu turgescentnu stanicu.
5. Redom pregledajte sve prereze u otopinama različitih koncentracija saharoze. Nacrtajte još dvije stanice: jednu u kojoj je plazmoliza tek započela i drugu u kojoj je ona uznapredovala (obj. 40:1).
6. Kod slabog povećanja pregledajte orijentacijski svaki preparat i procijenite za većinu stanica stupanj plazmolize. Kod koje koncentracije plazmoliza tek započinje?

**Zadatak 1.** Nacrtajte po jednu turgescentnu stanicu, stanicu u kojoj je plazmoliza tek započela te stanicu s krajnjim stupnjem plazmolize.

**Zadatak 2.** Koristeći se stanicom kao malim osmometrom, na osnovi iskustva iz prethodne vježbe odredite približnu koncentraciju zadanih otopina saharoze.

### **Pitanja:**

1. Što se događa s vakuolom tijekom plazmolize?
2. O čemu ovisi osmolarnost neke stanice?
3. Moraju li dvije otopine koje su izoosmotične s citoplazmom ujedno biti i izotonične? Obrazložite odgovor.

### **ZA SLIJEDEĆU VJEŽBU:**

- slika vegetacijskog vrška
- slika kloroplasta sa detaljima građe
- slika kromoplasta

## Vježba 4. Plastidi

Plastidi su organeli karakteristični isključivo za biljne stanice. Kod gljiva i nekih visoko specijaliziranih biljnih stanica nema plastida. U jednoj biljnoj stanici javlja se uvijek samo jedan tip plastida, dok u čitavoj biljci nalazimo različite tipove. Plastidi su semautonomni organeli i sadrže vlastitu nasljednu uputu u plastidnoj DNA (ptDNA), koja međutim, nije dovoljna za samostalan život plastida izvan stanice. Plastidi su obavijeni dvjema membranama koje zajedno čine ovojnica. Vanjska i unutarnja membrana plastida razlikuju se pri čemu unutarnja membrana predstavlja pravu barijeru prema citoplazmi. Prostor između membrana je necitoplazmatski prostor (omeđen od citoplazme vanjskom membranom), a unutarnja membrana obavlja plastoplazmu tj. stromu u kojoj se nalaze ribosomi, kružna molekula DNA (prisutna u više kopija), škrobna zrnca, plastoglobuli te sustav membrana nazvan tilakoidne membrane ili tilakoidi.

Poznato je više tipova plastida koji mogu povratno prelaziti iz jednog oblika u drugi. Koji će tip plastida biti zastupljen u stanici ovisi o razvojnom stadiju stanice, njenom smještaju unutar biljke i o fiziološkim uvjetima, pri čemu je svjetlost odlučujući faktor.

**Proplastidi** su slabo diferencirani, bezbojni plastidi meristemskih stanica (sl. 4.1.a). Sadrže malo internih struktura, dijele se, a iz njih će se razviti određeni tip plastida ovisno o smjeru diferencijacije stanica u kojima se nalaze.

**Kloroplasti** su fotosintetski aktivni plastidi (sl. 4.1.b). U tilakoidnim membranama kloroplasta prisutan je klorofil (vezan za membranske proteine), karotenoidi i ostale, za membranu vezane komponente fotosintetskog sklopa. Enzimi za fiksaciju ugljičnog dioksida i sintetske putove s time u vezi nalaze se u stromi kloroplasta. Pojedinačne tilakoide nazivamo stroma-tilakoidi, dok višeslojne naslage tilakoida zovemo grana tilakoidi. Iako je najznačajnija funkcija kloroplasta fotosinteza, u kloroplastima se odvija i sinteza lipida, masnih kiselina i škroba.

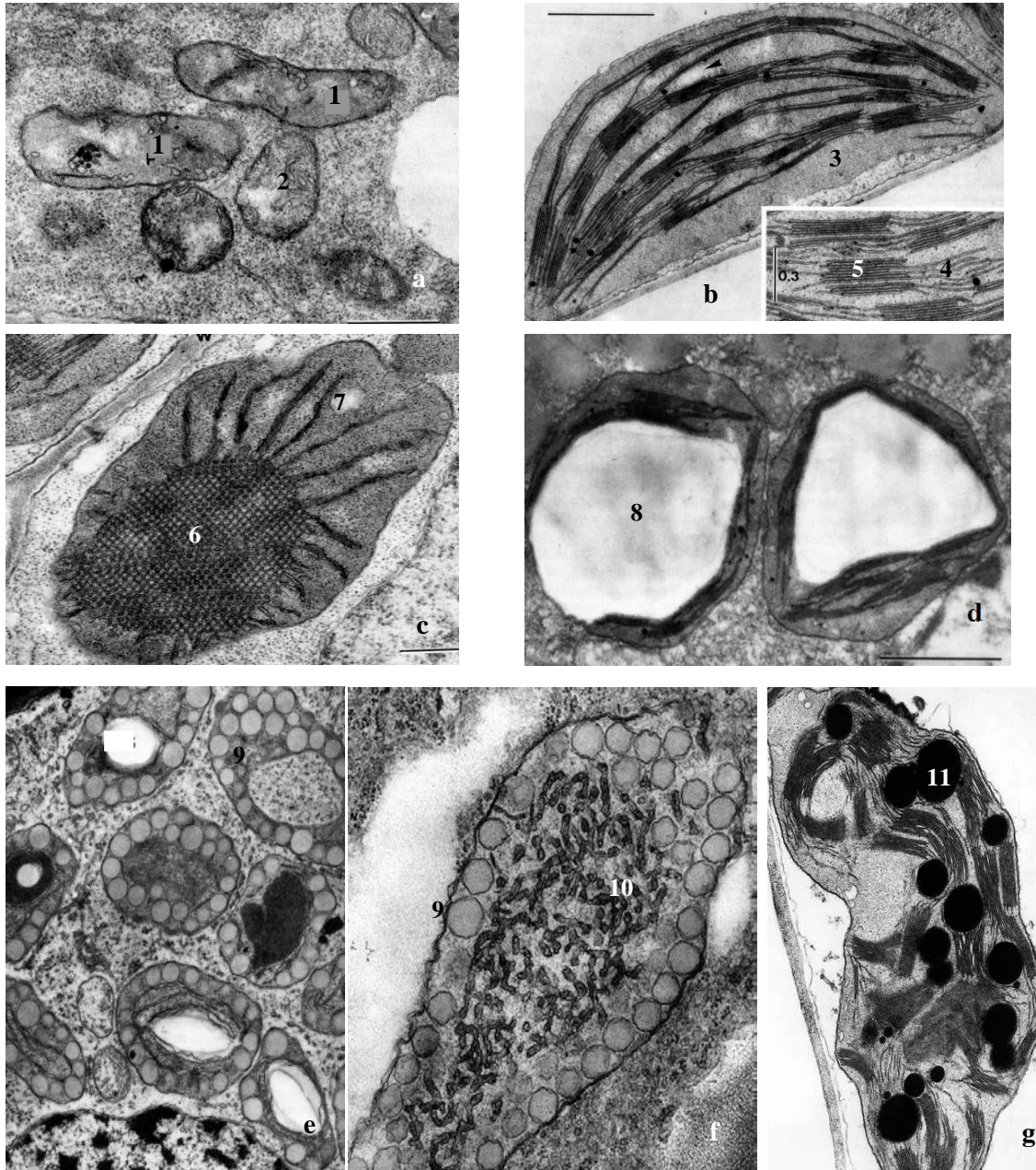
**Etioplasti** su plastidi koje nalazimo u stanicama biljaka koje rastu u mraku (sl. 4.1.c). Neke reakcije u izgradnji fotosintetskog aparata i tilakoida ovisne su o svjetlosti. Protoklorofil reduktaza primjer je enzima ovisnog o svjetlosti. Etioplasti sadrže parakristaličnu strukturu tzv. prolamelarno tijelo i malo membrana – protilakoida. Prilikom osvjetljavanja razgrađuje se prolamelarno tijelo i formiraju se funkcionalni tilakoidi.

**Kromoplasti** su žuto ili narančasto do crveno obojeni plastidi cvjetova i plodova, sadrže karotenoide i vrlo mnogo lipida u obliku lipidnih globula (sl. 4.1.e i f). Osim globularnog tipa kromoplasta poznati su kromoplasti s membranama u obliku tubula kao i oni s karotenskim kristalima.

**Leukoplasti** su bezbojni plastidi u stanicama koje nisu fotosintetski aktivne. Često imaju pričuvnu funkciju i sadrže škrobna zrnca (amiloplasti, sl. 4.1.d), rezervne proteine (proteinoplasti) ili lipide (elaioplasti). Škrobna zrnca mogu biti prisutna u svim tipovima plastida.

U požutjelim listovima nalaze se **gerontoplasti** u kojima je razgrađen klorofil i tilakoidne membrane, a u brojnim plastoglobulima su otopljeni karotenoidi.





**Slika 4.1.** Plastidi – organeli specifični za biljne stanice; **a** – proplastidi, **b** – kloroplast, **c** – etioplast, **d** – amiloplasti (leukoplasti koji sadrže škrob), **e** i **f** – kromoplasti, **g** – gerontoplast. (EM-snimke iz: Kleinig H, Sitte P. Zellbiologie. Gustav Fischer Verlag, 1984).

**1** – protilakoidi (začeci tilakoidnih membrana), **2** – mitohondrij, **3** – stroma, **4** – stroma tilakoidi, **5** – grana tilakoidi (granum), **6** – prolamelarno tijelo, **7** – protilakoidi, **8** – škrobno zrnice u leukoplastu, **9** – globuli kromoplasta, **10** – tubuli kromoplasta, **11** – plastoglobuli.



## Vježbe

**Zadatak 1.** Izolirajte vegetacijski vršak vodene kuge (*Helodea canadensis* Rich.).

Vršak mora ostati neoštećen, a stanice u njemu žive. Postupajte na sljedeći način: Pincetom odstranite listiće, pa kad vidite bijelu kvržicu, tj. vršak prekriven samo s nekoliko listića položite ga u kap vode na predmetnom staklu i britvicom (žiletom) odrežite vrh (iznad mjesta insercije listova). Iglicom odstranite listiće, no možete ih ostaviti u kapi jer će pridržavati pokrovnicu da ne zgnječi vršak.

Kod slabog povećanja proučite anatomiju vrška, a zatim pod imerzijom, u vršnim stanicama uočite jezgre i proplastide u citoplazmi.

**Zadatak 2.** Načinite tanke tangencijalne prereze lista. Stavite ih odmah u vodu i pomoću vodene sisaljke ili injekcijske šprice odstranite zrak iz intercelulara. Načinite mikroskopski preparat i utvrdite koji tip plastida se nalazi u: a) epidermskim stanicama, b) stanicama zapornicama puči, c) stanicama susjedicama, d) stanicama parenhima lista (mezofil). Za praktične vježbe prikladni su listovi koji su turgescetni i nešto deblji te se daju lako rezati. Npr. vrste: *Kalanchoe daigremontiana*, *Tradescantia sp.*, *Zebrina pendula*, *Pulmonaria officinalis* (plućnjak), *Helodea canadensis* i dr.

Nacrtajte detalj stanice koji vidite pod imerzijskim objektivom. Usporedite svjetlosno-mikroskopsku (SM) sliku plastida s onom koju daje elektronski mikroskop (EM). Nacrtajte detalj ultrastruktura koje vidite na elektronsko-mikroskopskoj snimci (ovojnica, tilakoidi, plastoglobuli i dr.).

**Zadatak 3.** Utvrdite odakle potječe žuta ili narančasta boja nekih cvjetova. Napravite tanke prereze latice maćuhice, žute i ljubičaste perunike, i dr.

**Zadatak 4.** Utvrdite odakle potječe žuta ili narančasta boja nekih plodova. Napravite tanke prereze ploda žute ili crvene paprike i korijena mrkve i dr.

### Pitanja:

1. Koji plastidi su prisutni u stanicama vegetacijskog vrška ?
2. Koji tip plastida se nalazi u a) epidermalnim stanicama, b) stanicama zapornicama puči, c) stanicama susjedicama puči d) stanicama parenhima lista (mezofil)?
3. Odakle potječe žuta, crvena ili narančasta boja nekih cvjetova i plodova?
4. Koji tip kromoplasta nalazite u korijenu mrkve?

## Vježba 5. Izolacija kloroplasta. Stanično frakcioniranje i centrifugiranje

Stanično frakcioniranje je izdvajanje staničnih organela ili sitnijih struktura u zasebne frakcije, radi boljeg upoznavanja njihova biokemijskog sastava i fiziologije. Stanice je potrebno rastrgati (homogeniranje), ali tako da organeli ostanu neoštećeni i fiziološki aktivni. Puffer u kojem se homogenira tkivo ili suspenzija stanica oponaša uvjete u stanici. On mora imati pH jednak staničnomu, a koncentracija soli i/ili šećera u njemu je takva da je on izotoničan u odnosu na citoplazmu. To znači da voda neće osmozom ulaziti u organele, koji bi se zbog toga rasprsnuli (hipotonični šok). Važni su također sastav i koncentracija iona te organskih dodataka i zaštitnih tvari. Često se dodaje merkaptoetanol, ditiotreitol, askorbinska kiselina ili serumski albumin. Polivinilpirolidon veže na sebe fenole i alkaloide kojima su bogata neka biljna tkiva.

Homogeniranje ili kidanje stanica:

1. Liza u hipotoničnoj otopini (samo životinjske stanice)
2. Stakleni homogenizator
3. Tarionik
4. Ultrazvuk
5. Homogenizator s noževima (mikser)
6. Stanična preša

Svi postupci se obavljaju pri temperaturi 0-4°C. Ako stanice imaju staničnu stijenku, ona se može razgraditi enzimima. Celulaza i pektinaza za biljne stanice, a lizozimom za bakterije.

Organeli, koji su svi izmješani u staničnoj kaši (homogenatu) razdvajaju se centrifugiranjem. Razlikujemo nekoliko načina:

1. **Diferencijalno centrifugiranje** pri kojem se iz staničnog homogenata u postupnim koracima centrifugiranja sve većom brzinom u određenom vremenu talože različiti stanični dijelovi.
2. **Centrifugiranje u koncentracijskom gradijentu**, koje može biti **ravnotežno (izopikničko)** ili **zonalno**

### Ravnotežno centrifugiranje

U cjevčici za centrifugiranje uspostavi se koncentracijski gradijent saharoze ili nekog drugog spoja. Na površinu se nanese uzorak čije sastojke treba razdvojiti. Za vrijeme centrifugiranja organeli ili još sitnije čestice putuju do onog mjesta u gradijentu gustoće koje odgovara njihovoj vlastitoj gustoći i tamo se zaustavljaju (ravnotežno stanje). Tako razdvojene slojeve čestica moguće je sakupiti u zasebne frakcije. Gradijent gustoće može biti linearan ili stupnjevit.

### Zonalno centrifugiranje

Gradijent gustoće je znatno blaži tako da je gustoća čestica u svakoj točki veća nego što je gustoća okolne otopine. Tijekom centrifugiranja čestice putuju kroz gradijent različitim brzinama, odnosno u zonama. Ako se centrifugiranje pravodobno zaustavi one su međusobno razdvojene, ali ako traje predugo sve će se čestice naći na dnu cjevčice.

**Vježba u praktikumu****IZOLACIJA KLOROPLASTA IZ LISTOVA ŠPINATA**

**VAŽNO! Cijeli postupak provesti pri temperaturi od 0-4 °C.**

1. Izvagati 2,5g listova i izrezati ih na petrijevoj zdjelici u što sitnije komadiće.
2. Izrezano tkivo prebaciti u hladni tarionik i pažljivo ga homogenirati uz dodatak 4 ml pufera sljedećeg sastava:  
  
50mM Tris-HCl   pH = 7.8  
400mM sorbitol  
1mM MgCl<sub>2</sub>  
1mM EDTA
3. Homogenat filtrirati kroz četiri sloja gaze i jedan sloj tkanine „miracloth”.
4. Filtrat centrifugirati 1 min na 500 g (3000 rpm) da se istalože grubi ostaci stanica, jezgre i škrob.
5. Supernatant dobiven centrifugiranjem filtrata, centrifugirati 10 min na 4000g (8000 rpm).
6. Talog resuspendirati u malom volumenu (0.5 ml) pufera.

**Zadatak 1.** Shematski prikažite postupak izolacije kloroplasta.

**Zadatak 2.** Izolirane kloroplaste promatrajte pomoću:

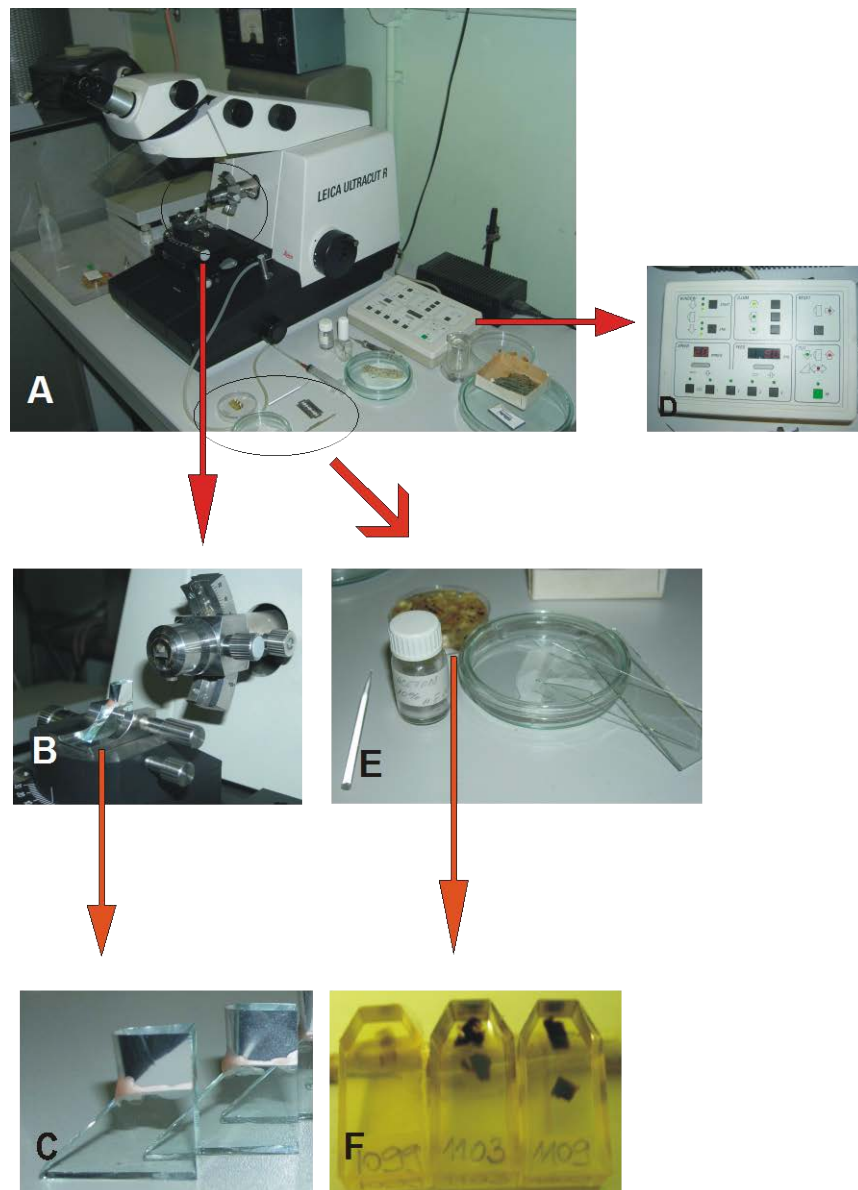
- a) školskog svjetlosnog mikroskopa i nacrtajte sliku koju daje imerzijski objektiv.
- b) fluorescencijskog mikroskopa. UV-zrake pobuđuju fluorescenciju klorofila, pa kloroplasti izgledaju poput crvenih kuglica.

## Vježba 6. Rezanje tkiva, bojanje i mikroskopiranje

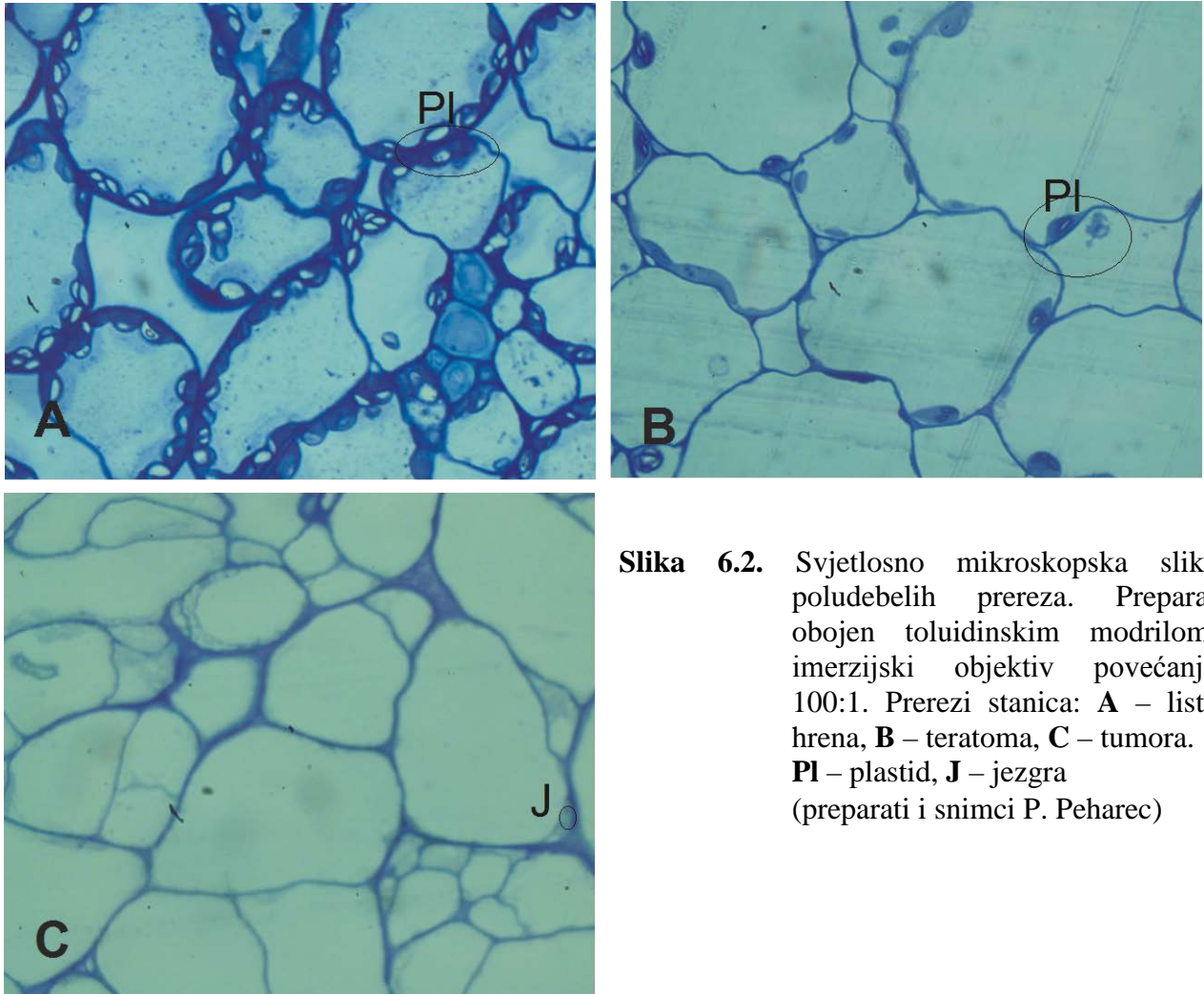
Slika stanice koju daje svjetlosni mikroskop znatno se razlikuje od one elektronskog mikroskopa. Svjetlosnim mikroskopom možemo opažati samo stanične organele: jezgru, plastide i mitohondrije, ali membrane i ovojnice kojima su ti organeli omeđeni, ne možemo vidjeti, jer su dimenzije membrane (oko 8 nm) ispod granice moći razlučivanja svjetlosnog mikroskopa.

Strukture u biljnome ili životinjskome materijalu, koje želimo proučavati, moramo pripremiti na određeni način. Uzorak je potrebno izrezati na sitne komadiće, fiksirati, dehidrirati a potom uklopiti u sredstvo koje je najprije tekuće (npr. Spurovo sredstvo), a zatim će se polimerizirati i skrutnuti pri povišenoj temperaturi. Na taj način uzorak ostaje uklopljen unutar krutog bloka, a to će omogućiti lakše rezanje biološkog materijala (slika 6.1. F). Takvi blokovi režu se na vrlo tanke prereze, debljine oko 90 nm. Za rezanje služi ultramikrotom sa specijalnim dijamantnim ili staklenim noževima. Prerezi plivaju na površini vode u malom „bazenčiću“ tik iza oštrice noža te ih je potrebno „uloviti“ kako bi se našli na malim (oko 5 mm promjera) okruglim mrežicama koje su prethodno naparene ugljikom (slika 6.1. A, B, C i D). Tanki sloj ugljika ne smeta prolazu elektrona, a sprječava da sitni prerezi propadnu kroz šupljine na mrežici. Prerezi na mrežici kontrastiraju se uranil-acetatom i olovnim citratom te se stavljaju na poseban nosač i unose u elektronski mikroskop. Na elektronsko-mikroskopskoj slici postaju vidljivi organeli kao što su endoplazmatski retikulum (ER), Golgijevo kompleks (GK), lizosomi (Ly), perksisomi (Per) i trepetljike (cilije) te ultrastrukture plastida, mitohondrija i jezgri kao i sitne strukture poput ribosoma.

Prije rezanja ultratankih prereza često se priređuju poludebeli prerezi (oko 1  $\mu\text{m}$ ). Takvi prerezi omogućuju mikroskopičaru uvid u to je li već počeo rezati uklopljeni materijal (ili reže samo sredstvo za uklapanje), je li zahvatio dio uzorka koji želi istraživati, tj. takvi prerezi omogućuju bolje snalaženje pri daljnjem rezanju. Poludebeli prerezi „ulove“ se staklenim štapićem i polože na predmetno stakalce u kapljicu 10% acetona (slika 1. E). Stakalce se zagrije na plameniku da aceton ispari te se prerezi oboje mješavinom 2 %-tne otopine boraksa i 2 %-tne otopine toluidinskog modrila (1:1 volumni dio). Postupa se tako da se tik uz prerez na predmetnom staklu s jedne strane stavi kap otopine boraksa, a s druge kap otopine toluidinskog modrila, a zatim se histološkm iglicom te dvije kapi prevuku preko prereza, pri čemu se otopine izmiješaju. Tako obojani prerezi prevuku se nekoliko puta kroz plamen (da boja prodre u dublje dijelove tkiva) te se dobro isperu vodom, pažljivo prebrišu i pregledaju svjetlosnim mikroskopom (slika 6.2. A, B i C).



**Slika 6.1.** Ultramikrotom i njegovi sastavni dijelovi. **A** – ultramikrotom-Ultracut R marke Leica, **B** – nosač bloka i stakleni nož, **C** – stakleni nož s ljepljivom trakom koja čini mali spremnik s vodom za hvatanje prereza, **D** – upravljačka ploča, **E** - potreban pribor za pripremu poludebelih prereza, **F** - uklopljeni materijal za rezanje. (preparati i snimci P. Peharec)



**Slika 6.2.** Svjetlosno mikroskopska slika poludebelih prereza. Preparat obojen toluidinskim modrilom, imerzijski objektiv povećanja 100:1. Prezezi stanica: **A** – lista hrena, **B** – teratoma, **C** – tumora. **Pl** – plastid, **J** – jezgra (preparati i snimci P. Peharec)

### **Vježba u praktikumu**

Na predmetnom staklu nalaze se poludebeli prerezi pripremljeni iz sitnih komadića lista hrena (*Armoracia lapathifolia* Gilib.) te tumorskih linija hrena (TM i TN). Tumorska tkiva dobivena su iz primarnih tumora čiji je rast bio izazvan bakterijom *Agrobacterium tumefaciens*. Obojite prereze mješavinom 2 %-tnog boraksa i 2 %-tnog toluidinskog modrila koristeći se histološkom iglicom. Predmetno stakalce lagano zagrijte provlačeći ga nekoliko puta kroz plamen. Boja će pri zagrijavanju ući u strukture tkivnog prereza i obojiti ih. Pazite da ne zagrijavate stakalce predugo da se preparat ne oboji preintenzivno ali ni prekratko jer strukture neće biti dobro obojene. Preparat temeljito isperite vodom i dobro ga osušite ne dodirujući gornju površinu predmetnog stakla (na njoj se nalaze prerezi). Takav preparat spreman je za mikroskopiranje.

**Zadatak 1.** Priredite preparate za proučavanje struktura u biljnom tkivu i shematski prikažite postupak bojanja poludebelih tkivnih prereza.

**Zadatak 2.** Proučite sva tri poludebela prereza linija hrena (list hrena te njegove tumorske linije-TM i TN).

#### **Pitanja:**

1. Što je karakteristično za list a što za tumorske linije ?
2. Postoje li razlike ili sličnosti između ovih linija?
3. Koje organele možete najlakše zamijetiti u stanicama lista odnosno u tumorskim linijama ?

#### **ZA SLIJEDEĆU VJEŽBU:**

- Slike pojedinih faza mitoze u vršku korjenčića luka *Allium cepa*

## Vježba 7. Stanična jezgra - Mitoza

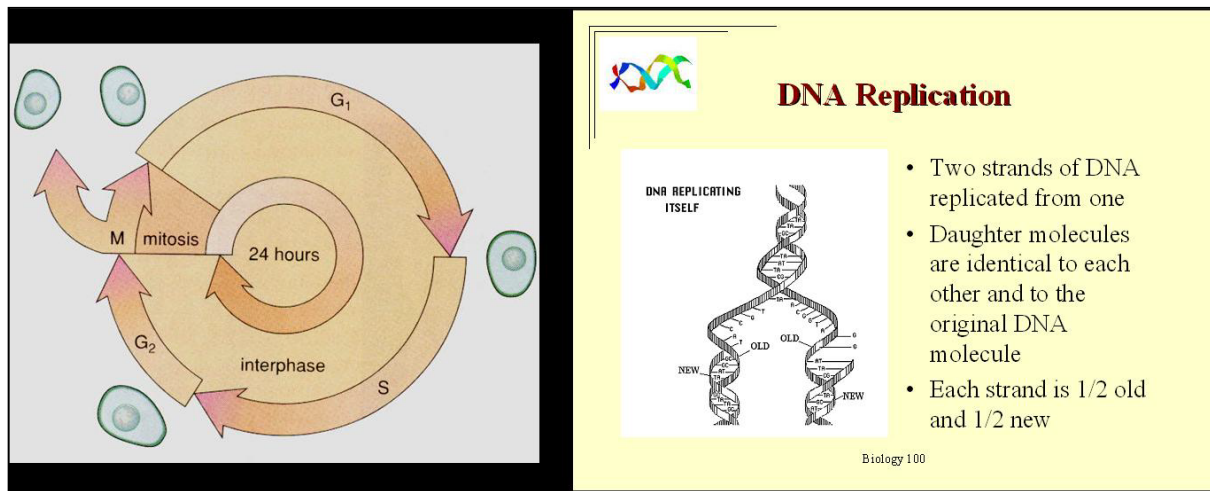
Eukariotske stanice imaju morfološki izdiferenciranu jezgru, dok u jednostavnijim prokariotskim stanicama funkciju jezgre obavlja ekvivalent jezgre - nukleoid.

Staničnu jezgru (nukleus) čine sljedeće strukture:

- jezgrina ovojnica
- jezgrina lamina
- nukleoplazma
- jezgrin matriks
- kromatin/kromosomi
- jezgrica (nukleolus)

## STANIČNI CIKLUS

Radi lakšeg razumijevanja znanstvenici dijele proces staničnog rasta i diobe u faze. Tako se stanični ciklus dijeli na **interfazu** i **mitozu**. Interfaza je podijeljena na 3 podfaze, a to su: **G<sub>1</sub>**, **S** i **G<sub>2</sub>** (G dolazi od engl. gap, a S od synthesis, sl. 7.1), a mitozu na 5 faza: **profaza**, **prometafaza**, **metafaza**, **anafaza**, **telofaza**. Nakon diobe jezgre dolazi do diobe cijele stanice tzv. **citokineze**. U stanicama koje se ne dijele, jezgra je metabolički aktivna, ali ne uočavaju se morfološke promjene poput onih tijekom diobe, pa se takva jezgra zove „jezgra u mirovanju“, no svakako je bolji naziv **radna jezgra** (razmislite zašto?). Radna je jezgra morfološki slična interfaznoj, ali razlikuju se od nje po aktivnosti.



**Slika 7.1.** Ciklus stanične diobe većine eukariotskih stanica podijeljen je u četiri faze: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> i M. (Preuzeto iz Alberts i sur. Garland Pub. Inc. 1994)



## INTERFAZA

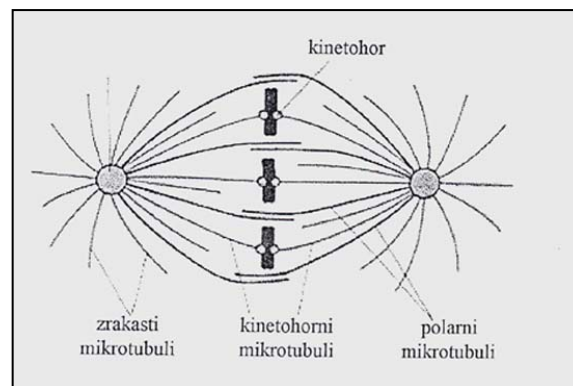
Interfaza, stadij između dviju uzastopnih dioba stanice, obuhvaća oko 90% ukupnog trajanja staničnog ciklusa. Ključan događaj interfaze je udvostručenje nasljedne tvari (reduplikacija genetičkog materijala) tj. reduplikacija molekule DNA, koja se zbiva na semikonzervativan način tj. tako da od dvije novonastale molekule svaka sadrži jedan originalni (stari) polinukleotidni lanac i drugi novosintetizirani lanac (sl. 7.1). Nakon što se nasljedna tvar udvostručila mitotičkom diobom raspodijeliti će se na jezgre kćeri tako da svaka dobije identičnu genetičku informaciju i jednak broj kromosoma kao i stanica-majka. Biološko značenje mitoze upravo je u tome što čuva konstantnost nasljedne tvari.

Na svjetlosnomikroskopskoj snimci interfazne jezgre koja je obojena karminom, orceinom ili kao rezultat Feulgenove nuklealne reakcije, uočava se gusta zrnata struktura koju nazivamo **kromatin** (kompleks proteina i DNA) (slika 7.4.2. **kr**). Na nekim mjestima zrnca su jače obojena i krupnija - to su **kromocentri**, mjesta jače kondenzacije kromatina. Kromatin je dakle obojeni sadržaj jezgre koji odgovara dekonenziranim kromosomima koji se oblikuju tijekom mitoze.

## MITOZA

Mitoza je dioba jezgre do koje dolazi nakon udvostručenja nasljedne tvari u S-fazi.

**Profaza** je početna faza mitoze. Kromosomi izgledaju poput dugih niti koje čine klupko (sl. 7.4.1). Oni se sve više skraćuju i postaju deblji te se uočava da su uzduž podijeljeni u dvije **kromatide** – **sestrinske kromatide**. Kromatide su omotane jedna oko druge tvoreći tzv. **relacijsku spiralu**. Sestrinske kromatide se drže zajedno u položaju **centromera** – specifičnog slijeda nukleotida molekule DNA na koji se veže specijalizirana struktura – **kinetohor** (sl. 7.2. i 7.3). Pri kraju profaze počinje se formirati **diobeno vreteno**, bipolarna nitasta struktura, sastavljena od mikrotubula (sl. 7.2). Jezgrica nestaje.



**Slika 7.2.** Tri vrste mikrotubula diobenog vretena. Biljne stanice nemaju zrakaste mikrotubule.

**Prometafaza** započinje raspadom jezgrine ovojnice u membranske vezikule. Na svakoj strani centromera formira se kinetohor koji se veže na posebnu skupinu mikrotubula diobenog vretena nazvanu **kinetohorni mikrotubuli**; preostali mikrotubuli vretena nazivaju se **polarni mikrotubuli**, dok se oni izvan vretena nazivaju **zrakasti mikrotubuli** (sl.7.2).U prometafazi

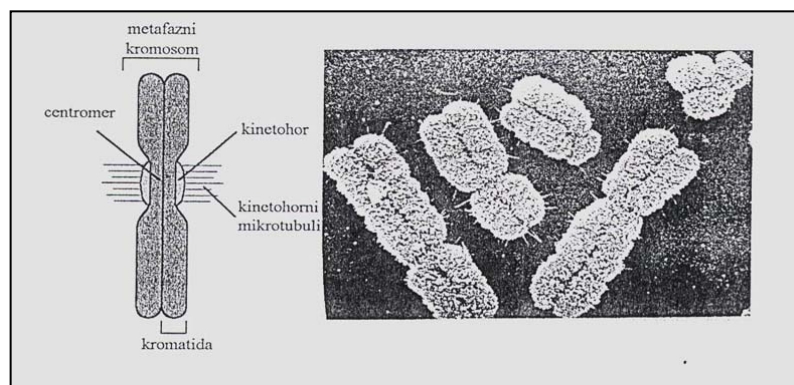
kromosomi su jako kondenzirani, znatno kraći od onih u profazi i moguće ih je pojedinačno razlučiti (ukoliko se suviše ne preklapaju) (sl. 7.4.2). Raspršeni su po stanici, a mogu se uočiti **sestrinske kromatide** kao i područje **centromera** (sl. 7.4.2).

U fazi koja slijedi, **metafazi**, kromosomi će se naći u središtu stanice. Pomoću kinetohornih vlakana diobenog vretena kromosomi se poredaju tako da su njihovi centromeri točno u ekvatorijalnoj ravnini (okomito na smjer pružanja mikrotubula diobenog vretena), a kraci kromosoma su okrenuti prema polovima i obično savijeni (sl. 7.3. i 7.4.3).

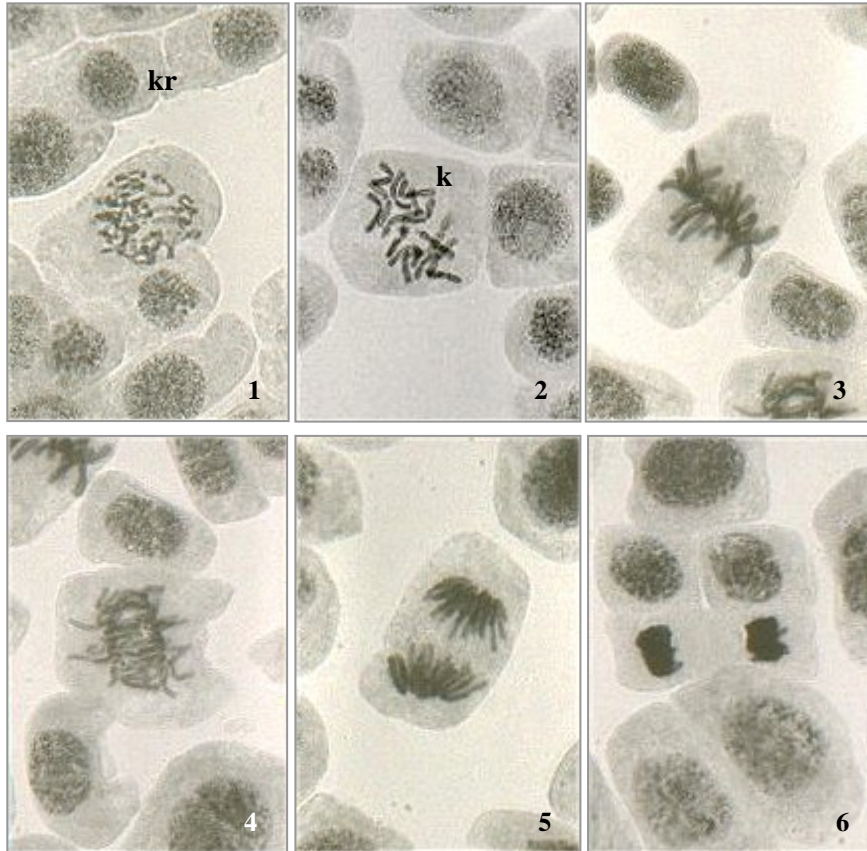
Zatim slijedi **anafaza** koja započinje razdvajanjem sestrinskih kromatida u području centromera a zatim i cijelom dužinom te se nastavlja pomicanjem sestrinskih kromatida na suprotne polove. **Diobeno vreteno** koje se sastoji od **polarnih** i **kinetohornih niti** (mikrotubula) ne vidi se u svjetlosnomikroskopskoj slici (osim primjenom tehnika imuno-fluorescencijske i fazno-kontrastne mikroskopije). Kretanje sestrinskih kromatida prema polovima vretena posljedica je dvaju vrsta nezavisnih procesa. Prvo, skraćuju se kinetohorne niti i drugo, produžuju se polarni mikrotubuli koji polove vretena još dodatne razdvajaju. Kad se sestrinske kromatide razdvoje nazivamo ih **kromosomima** (sl. 7.4.4. i 7.4.5). To su jednostruki kromosomi, koji su izgrađeni od jedne molekule DNA.

U **telofazi** kromosomi stižu na polove diobenog vretena, a kinetohorni mikrotubuli nestaju. Polarni mikrotubuli se još više izdužuju. Tijekom telofaze kromosomi se dekonenziraju i postaju duge, tanke niti, diobeno vreteno se raspada i formira se jezgrina ovojnica (sl. 7.4.6). Jezgrice koje su nestale u profazi počinju se ponovo pojavljivati.

Mitoza završava te započinje **citokineza**. Po sredini životinjske stanice, okomito na os diobenog vretena između jezgara-kćeri, nastaje **žlijeb** (diobena brazda), koji se postepeno produbljuje dok ne podijeli stanicu na dvije stanice-kćeri. Biljne stanice imaju čvrstu celuloznu stijenku pa kod njih ne nastaje žlijeb, već se u ekvatorijalnoj ravnini formira **fragmoplast** – bačvasto tijelo u kojem su brojne Golgijeve vezikule sa sastojcima za izgradnju stanične stijenke.



**Slika 7.3.** Crtež i EM snimka metafaznih kromosoma. (Preuzeto iz Alberts i sur. Garland Pub. Inc. 1994)



**Slika 7.4.** Svjetlosnomikroskopska slika mitoze u stanicama vrška korijena luka (*Allium cepa* L). Preparat obojen acetokarminom, snimljeno pod imerzijskim objektivom povećanja 100:1. **1** - Tri meristemske stanice s jezgrama u **profazi** mitoze. **2** – **Prometafaza**, vidljivi su pojedinačni kromosomi, uočava se par satelitnih kromosoma (strelica). **3** – **Metafaza**, kromosomi u ekvatorijalnoj ravnini. **4, 5** – **Anafaza**, jednostruki kromosomi putuju prema suprotnim polovima diobenog vretena. **6** – **Telofaza**, kromosomi se despiraliziraju i oblikuju nove jezgre. **kr** – kromatin, **k** – kromosom. (preparati i snimci M. Krsnik-Rasol)

## Vježbe

Izrada preparata za studij mitoze u meristemskim stanicama vrška korijena luka (ili neke druge biljne vrste)

1. Izabrati zdrave lukovice i oštrom nožem odrezati bazu lukovice tako da se ukloni suhe korjenčiče.
2. Staviti lukovicu na otvor prikladne posude (staklenka ili sl.) tako da ranjena ploha bude uronjena u vodu.
3. Korjenčiči počinju izbijati nakon otprilike 24 sata. Ostaviti lukovicu nekoliko dana da korjenčiči izrastu 3 – 10 cm. Povremeno mijenjati vodu.
4. Pripremiti kušalicu (epruvetu) s bojom (1-2% otopina karmina ili orceina u 45% octenjoj kiselini) i u boju staviti vršne dijelove korijena duljine oko 1 cm.
5. Lagano grijati, provlačeći epruvetu kroz plamen, dok se ne pojave mjehurići. Ne smije jako kipjeti. (OPREZ!!! Pazite da zbog pre naglog grijanja sadržaj epruvete ne izleti van, jer vas može opeći.)
6. Prebaciti boju s korjenčičima u malu petrijevku posudu (ili neku drugu prikladnu posudu) te je poklopiti da se izbjegne udisanje para kiseline.
7. Na čisto predmetno staklo staviti kap boje i sa strane polegnuti obojeni komadić korijena. Otkinuti samo vršni dio (oko 1 mm) i staviti ga u boju.
8. Zaobljenim krajem olovke ili glatkim drškom iglice za pripremu tuckati po vršku korijena da se raspadne u nekoliko manjih fragmenata.
9. Pokriti pokrovnim stakalcem pazeći da se ne uklopi veće mjehure zraka.
10. Preko pokrovnog stakalca položiti 2-3 sloja papira za upijanje i snažno pritisnuti jagodicom palca, tako da se upije suvišak boje, a stanice rasporede u jednom sloju.

**Zadatak 1.** Priredite 2 preparata za studij mitoze i shematski prikažite pojedine korake u pripremi preparata.

**Zadatak 2.** Proučite pojedine faze mitoze te interfazu i izbrojite koliko ste pojedinih faza pronašli u sto stanica na vašem preparatu. Popunite tablicu. Isti postupak primijenite i na drugom preparatu.

**Zadatak 3.** Izračunajte mitotski indeks za oba preparata. (Mitotski indeks je kvocijent broja stanica u diobi i ukupnog broja stanica).

**Zadatak 4.** Nacrtajte detaljno sliku metafaze i anafaze mitoze koju ste vidjeli primjenom imerzijskog objektiva. Obilježite sve nacrtane strukture (ključne riječi: stanica, jezgra, jezgrica, kromatin, kromosom, kromatide, kraci kromosoma, centromer, sekundarno utanjenje, satelit).

### Pitanja:

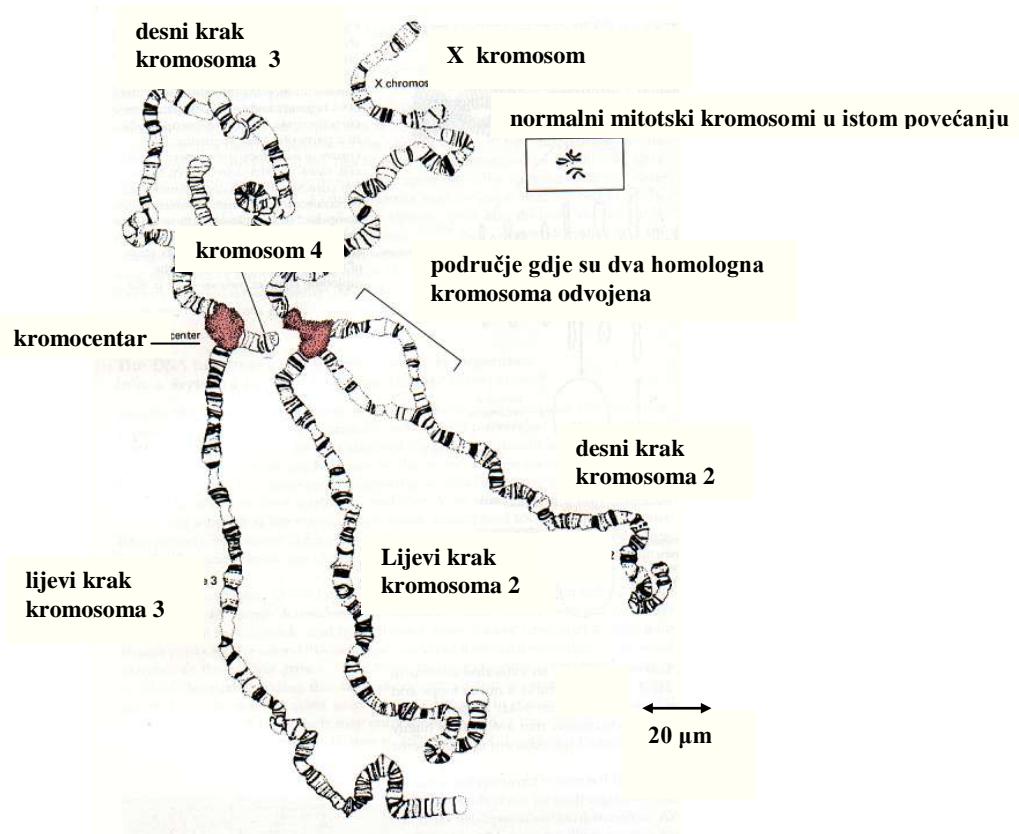
1. Jesu li sve interfazne jezgre jednake veličine? Ako nisu objasnite zašto.

## Vježba 8. Endomitoza. Politeni kromosomi i C-mitoza

### ENDOMITOZA, POLITENIJA I DIVOVSKI KROMOSOMI

Kod nekih somatskih (tjelesnih) stanica može doći do kvantitativne promjene genoma putem **endomitoze**. Pod pojmom endomitoze podrazumijevamo replikaciju DNA iza koje ne slijedi mitozna. U takvom endociklusu, koji se može ponavljati, nastaju poliploidne (endopoliploidne) jezgre. Te su jezgre veće od diploidnih jezgara, a s obzirom na postojeći odnos veličine jezgre prema citoplazmi, nalaze se također u većim stanicama.

Poseban slučaj endopoliploidnih jezgara su jezgre s **politenim ili divovskim kromosomima**. Divovski kromosomi nalaze se u stanicama žlijezda slinovnica dvokrilaca (sl. 8.1), ali također (iako rjeđe) i u biljnim stanicama nekih leguminoza. Potpuno opuštene kromatide divovskih kromosoma, koje nastaju u slijedu uzastopnih replikacijskih ciklusa, ostaju zajedno i grade do 10  $\mu\text{m}$  debele kromosomske snopove. Ti su kromosomi i do 100 puta duži od metafaznog kromosoma iste vrste. Divovski kromosomi prisutni su u stanici u haploidnom broju jer su homolozi sparni (somatsko sparivanje homolognih kromosoma). E. G. Balbiani opisao je divovske kromosome još 1881. godine. Na kromosomu kojeg tvori snop kromatida, uočava se poprečna prugavost, pri čemu se neperiodički izmjenjuju tamne i svijetle pruge. Tamne pruge nazivaju se kromomerne ploče jer nastaju gomilanjem kromomera. Poprečne pruge su vrlo grub odraz linearnog poretka gena na kromosomu. Aktivacija gena, koju je moguće umjetno potaknuti pomoću hormona (npr. hormon presvlačenja – ecdison), očituje se u mjestimičnom opuštanju kromosoma. Poprečne pruge pretvaraju se u labave, difuzne strukture – nabreknuća (engl. puffs). Veliki "puffovi" nazvani su "Balbianijevi prstenovi". Mikroautoradiografija ( $^3\text{H-U}$ ) jasno pokazuje da su nabreknuća mjesta intenzivne transkripcije tj. oni su morfološka manifestacija genske aktivnosti.



**Slika 8.1.** Slika divovskih (politenih) kromosoma iz stanice žlijezde slinovnice vinske mušice (*Drosophilla melanogaster*). (Prilagođeno prema Alberts i sur., 1994)

## C-MITOZA, KARIOTIP I KARIOGRAM

U eksperimentalnim uvjetima djelovanjem nekih citostatika (npr. kolhicina) može se izazvati tip endomitaze koji se naziva **C-mitoza**. Citostatik sprječava formiranje diobenog vretena, pa stoga u metafazi mitoze izostaje nakupljanje kromosoma u ekvatorijalnoj ravnini. Maksimalno kondenzirani kromosomi ostaju raspršeni po stanici (metafazna ploča) i stoga ih je moguće izbrojiti i analizirati njihovu morfologiju. Morfologija pojedinog kromosoma određena je položajem centromera (primarno suženje) i nukleolarnog organizatora (sekundarno suženje). **Centromer** dijeli kromosom na dva **kraka**, pa njegov položaj određuje duljinu krakova. Ako je centromer smješten u sredini (medijalno) oba kraka su jednako dugačka, a kromosom je **metacentričan**. Ako je centromer smješten malo dalje od sredine kromosoma (submedijano) tada je jedan krak nešto duži od drugoga, a kromosom je **submetacentričan**. **Akrocentričan** je kromosom čiji je centromer smješten blizu kraja kromosoma (subterminalno), a **telocentričan** kromosom ima centromer na kraju te on nema krakove u pravom smislu. Kod nekih kromosoma uočava se nakon sekundarnog suženja još mali fragment kromosoma koji se naziva satelit pa takve kromosome nazivamo satelitnim kromosomima. Kod luka uočite ćete par takvih satelitnih kromosoma.





**Slika 8.2.** Kariotip vrste *Anemone hortensis*. (preparati i snimci V. Besendorfer)

Skup svih kromosoma u jednoj stanici čini njezin **kariotip** (sl. 8.2). Kariotip svih stanica jednog organizma u pravilu je jednak, pa govorimo o kariotipu nekog organizma ili vrste. Kariotipovi različitih vrsta mogu se znatno razlikovati. Ako želimo sistematski prikazati kromosome nekog kariotipa izrađujemo **kariogram** (sl. 8.3). Kromosome s mikrofotografije izrežemo i poredamo ih kao parove homolognih kromosoma po veličini. Shematsko prikazivanje kromosoma, kojim se žele jasnije prikazati značajke i razlike između pojedinih kromosoma, naziva se **idiogram**. Danas postoje programi pomoću kojih se brzo i pouzdano obrađuje mikroskopska slika pomoću računala. Analiza kromosoma važna je ne samo za određivanje pojedinih vrsta organizama i proučavanje njihove filogenije, već također (npr. u slučaju ljudskog genoma) za otkrivanje promjena broja i morfologije kromosoma, što može biti povezano s pojavom nekih bolesti (o tome više na kolegiju Genetika).



**Slika 8.3.** Kariogram vrste *Anemone hortensis*. (preparati i snimci V. Besendorfer)

## CITOLOŠKE TEHNIKE – IZRADA PREPARATA PRI ISTRAŽIVANJIMA KROMOSOMA

Među citološkim tehnikama koje se primjenjuju u istraživanjima kromosoma, najčešće se koristi tehnika "gnječenja" (squash technique). Obrada kromosoma odvija se u više stupnjeva, a to su:

1. prethodna obrada (predtretman)
2. fiksacija
3. pohranjivanje materijala
4. bojenje
5. izrada preparata

Svi navedeni postupci ne moraju se uvijek primijeniti: npr. boja može ujedno biti i fiksativ, pa se bojanje i izrada preparata obave istovremeno.

### 1. PRETHODNA OBRADA

Živi materijal može se obraditi prije fiksacije ako istraživanje to zahtijeva. Primjerice, ako želimo utvrditi morfologiju i broj kromosoma za neku biljnu ili životinjsku vrstu potrebni su nam preparati u kojima ćemo jasno vidjeti kromosome. Najlakše je kromosome istraživati kad su maksimalno kondenzirani, a to je u metafazi, no oni su tada svi u središtu stanice svojim centromerima u ekvatorijalnoj ravnini te se međusobno preklapaju. Tehnikom gnječenja nećemo ih moći dovoljno razmaknuti da pojedinačno svi budu vidljivi. Primijenit ćemo stoga kemijske spojeve koji sprječavaju formiranje diobenog vretena, a ne utječu na proces kondenzacije kromatina. Takvi spojevi su kolhicin,  $\alpha$ -monobromnaftalen, 8-oksikinolin i dr. Obradom živog materijala kolhicinom postići će se to da kromosomi koji su dosegli maksimalan stupanj kondenzacije i koji su jasno vidljivi, ostanu raspršeni po stanici, jer nema funkcionalnog diobenog vretena te se ne mogu smjestiti u ekvatorijalnu ravninu. Postupkom gnječenja razmaknu se još jače i tako ih je moguće prebrojiti i proučiti njihovu morfologiju. Rabi se 0,05 – 1,0% vodena otopina kolhicina (alkaloid iz mrazovca *Colchicum autumnale* L.). Materijal se obrađuje 4-6 sati u prikladnim posudicama koje nisu začepljenje (zrak, stanično disanje), a zatim se fiksira. **OPREZ, navedeni spojevi su štetni po zdravlje!!**

**Tablica 8.1.** Prethodne obrade koje se najčešće primjenjuju za analizu kromosoma (Sharma i Sharma 1972).

CITOSTATIK	KONCENTRACIJA	TRAJANJE PRETRETMANA	TEMPERATURA
ledena voda	-	24 h	4 °C
kolhicin	0,5 - 1 % 0,05%	30 min. - 1h 3-4 h	najpovoljnija između 8 i 16 °C
$\alpha$ -monobrom- naftalen	zasićena otopina	10 min. - 4 sata	10 -16 °C
8-hidroksikinolin	0,002 M	3 - 4 sata	12 -16 °C



## 2. FIKSACIJA

Svrha fiksacije je da usmrtimo stanice, ali tako da ostanu što sličnije živim stanicama. U istraživanjima kromatina i kromosoma najčešće se upotrebljava mješavina octene kiseline i alkohola.

**Tablica 8.2.** Fiksativi koji se najčešće upotrebljavaju u istraživanjima jezgre i kromatina/kromosoma.

FIKSATIV	ETANOL (96%)	OCTENA KISELINA	KLOROFORM
CARNOY I	3 volumna dijela	1 volumni dio	-
CARNOY II	6 volumnih dijelova	1 volumni dio	3 volumna dijela

## 3. POHRANJIVANJE MATERIJALA

Ponekad je materijal dostupan samo povremeno pa ga treba pohraniti i sačuvati. Životinjski i biljni materijal obično se čuvaju u fiksativu ili alkoholu (70% etanol).

## 4. BOJANJE (bojanje aceto-bojama)

a) Najčešće se upotrebljavaju boje karmin i orcein koje se pripremaju kao 1-2% otopina u 45% octenoj kiselini.

Priprema otopina boje:

**Orcein-octena kiselina** (radna otopina: 1% u 45% octenoj kiselini):

Laganim kuhanjem otopiti 2,2 g orceina u 100 ml ledene octene kiseline (tikvicu začepiti čepom kroz koji je provučeno povratno hladilo). Ohladiti, razrijediti i filtrirati potrebnu količinu boje (čuva se nerazrijeđena boja).

**Karmin-octena kiselina** (radna otopina: 0,5% u 45% octenoj kiselini)

Pomiješati 45 ml ledene octene kiseline i 55 ml destilirane vode i dodati 0,5 g karmina. Otopinu lagano kuhati 5 minuta u tikvici s povratnim hladilom. Dobro promućkati, ohladiti i filtrirati. Neki primjenjuju nekoliko puta jaču koncentraciju boje, koju kuhaju dulje vremena.

b) **Feulgenova nuklealna** (nukleus = jezgra, -al = nastavak za aldehide) reakcija je citokemijska reakcija kojom se kvalitativno i kvantitativno mogu dokazati molekule DNA u stanicama. Blagom hidrolizom otcjepljuju se purinske baze u DNA molekuli, pa se oslobađaju aldehidne skupine, koje reagiraju sa Schiffovim reagensom dajući crveno do ljubičasto obojen spoj.

**Leukobazični fuksin** (Schiffov reagens za Feulgenovu nuklealnu reakciju):

1 g bazičnog fuksina prelije s 200 ml kipuće destilirane vode. Snažno promućkati, ohladiti i filtrirati. Filtratu dodati 30 ml 1N HCl i 3 g kalijevog metabisulfita ( $K_2S_2O_5$ ). Otopina se ostavi u dobro začepljenoj posudi 24 sata u mraku da se obezboji. Doda se 0,5 g aktivnog ugljena, mućka oko 1 min i profiltrira. Pohraniti u začepljenoj posudi na 4°C.

## 5. IZRADA PREPARATA (tehnika gnječenja)

### Vježbe

**Zadatak 1.** Izradite preparate divovskih kromosoma iz stanica žlijezda slinovnica vinske mušice (*Drosophilla melanogaster*). Nacrtajte sliku koju vidite pod slabim povećanjem, a zatim pod imerzijom nacrtajte dio kromosoma na kojem se nalazi nabreknuće.

#### Upute za izradu preparata:

1. U kapi fiziološke otopine, pod lupom, otkinite iglicom glavu ličinke. Žlijezde slinovnice pričvršćene su uz farings, a prepoznaju se po svjetlucavom staklastom izgledu i velikom stanicama.
2. Na izolirane žlijezde kapnite kap boje (orcein ili acetokarmin)
3. Pokrijte pokrovnicom i gnječite kuckanjem iglicom po stakalcu ("squash"). Pri tome ispadnu jezgre iz stanica, a kromosomi se rašire.

**Zadatak 2.** Napravite nekoliko preparata C-mitoze i pronađite mjesta gdje su dobro vidljivi kromosomi koji su maksimalno spiralizirani (poput onih u metafazi mitoze) i koji su dovoljno razmaknuti da ih pojedinačno možete analizirati i izbrojiti te nacrtajte jednu metafaznu ploču.

#### Upute za izradu preparata:

1. Vrške korijena luka, boba ili neke druge vrste stavite u otopinu **kolhicina** (0,05%) ili alfa-monobromnaftalena (zasićena otopina, nekoliko kapi alfa-monobromnaftalena u 5-10 ml destilirane vode → dobro promućkati) 4-6 sati, na sobnoj temperaturi.
2. Korjenčiće isprati\*\* vodom (lagano isprati u posudi s vodom) i pincetom prebaciti u **fiksativ** (fiksiranje traje najmanje 1 sat).
3. Isprati\*\* korjenčiće vodom (1-2 puta) i prebaciti u 1M HCl, predgrijanu na 60°C i **hidrolizirati** 6-8 min. (Optimalno vrijeme hidrolize odrediti eksperimentalno.) (Tijekom hidrolize maceriraju se stanice i u DNA molekuli dolazi do odcjepljenja purinskih baza čime se oslobađaju aldehidne skupine koje će reagirati sa Schiffovim reagensom)
4. Nakon ispiranja\*\* korjenčiće prebaciti u malu posudicu s 1-2 ml Schiffova reagensa (vidi praktikum 8) dobro začeptiti i staviti u mrak najkraće 30 minuta ili još bolje 1-2 sata.
5. Ako je citokemijska reakcija uspjela vidjet ćete ljubičasto obojene vrhove korijena. Intenzitet obojenja vrlo je slab u zoni produžnog rasta korijena. (Zašto?)
6. Stavite na čisto predmetno staklo kap 45% octene kiseline i načinite preparat tehnikom gnječenja koju ste već primjenjivali. Po želji moguće je još pojačati obojenje tako da se preparat načini u kapi acetokarmina.

7. Ako želite izraditi trajni preparat namažite pokrovno stakalce bjelančevinastim glicerinom (pomiješajte jednake volumene bjelanjka jajeta i glicerola te profiltrirajte, mješavina se drži neko vrijeme u hladnjaku). Stavite kap (promjer najviše 1 mm) mješavine na stakalce, razmažite je jagodicom prsta i provucite par puta kroz plamen (isparit će voda). Na tako priređenu pokrovnicu zalijepit će se stanice.
  8. Da biste odvojili predmetnicu od pokrovnice položite preparat sa pokrovnicom na dolje u posudu koja sadrži 40% etanol. Stavite neku podlogu u posudu da preparat ne leži na dnu, jer pokrovnica tada neće moći otpasti s predmetnice.
  9. Kad je predmetnica otpala izvadite je pincetom i prebacite redom na 2 minute u manje posude (štedi se alkohol) u koje ste stavili 80% etanol, te 2x 96% etanol (ili još bolje apsolutni).
  10. Predmetnicu obrišite i na nju stavite kap sintetske smole "EUPARAL" te pažljivo položite predmetnicu na kojoj je zalijepljen i dehidriran vaš materijal.
  11. Preparat treba sušiti nekoliko dana na 60°C. (Možete ga staviti na radijator, u pećnicu ili slično toplo mjesto). Takav preparat traje godinama.
  12. ( U laboratorijskim uvjetima dehidriranje preparata obavi se brzo smrzavanjem pomoću suhog leda (CO<sub>2</sub>). Ako vam je to dostupno izbjegnite odvajanje ljepljive pokrovnice i prijenos kroz niz alkohola, nego preparat smrznite, odvojite pokrovnicu, uronite predmetnicu u 96% etanol, ostavite da se posuši na zraku i uklopite preparat).
- \*\* U rutinskom radu može se izostaviti ispiranje korjenčića vodom.

#### **ZA SLIJEDEĆU VJEŽBU**

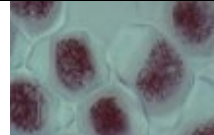
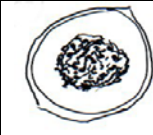
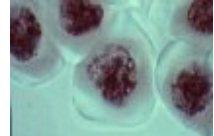





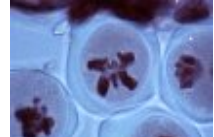



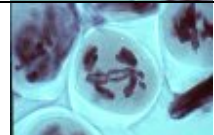

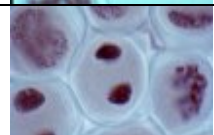
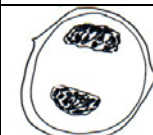



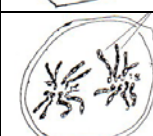


- Slike pojedinih faza PROFAZE I (leptoten, zigoten, pahiten, diploten i dijakineza)

## Vježba 9. Mejoza

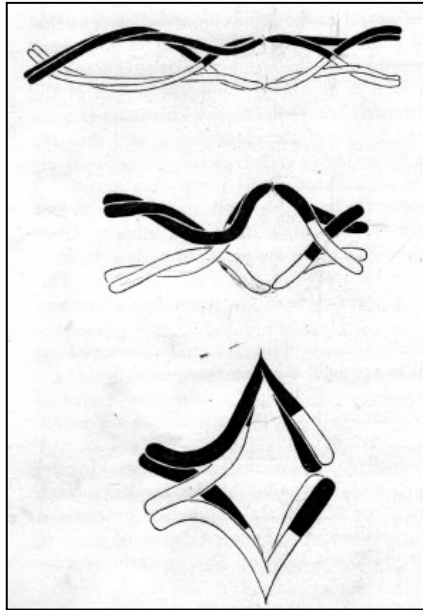
U organizama koji se spolno razmnožavaju dva su ključna događaja: **oplodnja** (spajanje gameta tj. spolnih rasplodnih stanica) i **mejoza**. Trenutak nastupanja mejoze, u životnom ciklusu različitih eukariotskih organizama, je različit.

1. U višestaničnih životinja, mnogih praživotinja i nekih nižih biljaka, mejoza direktno prethodi diferencijaciji gameta (gametna ili finalna mejoza).
2. U nekih alga, gljiva i praživotinja mejoza se zbiva odmah nakon oplodnje, tj. zigota se dijeli mejozom, pa nastaju haploidne vegetativne stanice (početna ili inicijalna mejoza).
3. U biljaka, mejozom nastaju haploidne spore, a zatim slijede mitoze, pa nastaje haploidni gametofit s jajnom odnosno spermalom stanicom (intermedijalna mejoza).

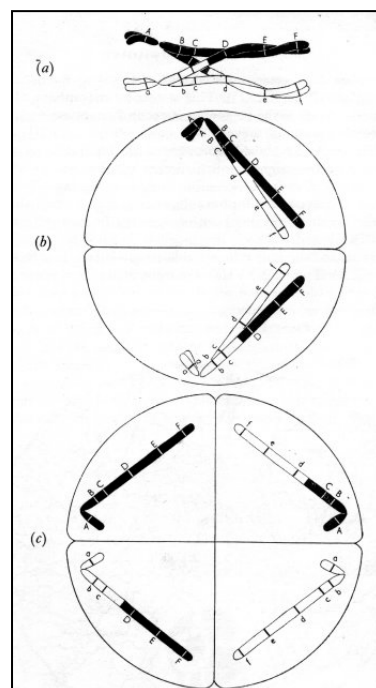
U diploidnoj jezgri svaki kromosom je dva puta zastupljen. Jedan član para potječe od oca, a drugi od majke. Takve parove kromosoma nazivamo **homolozima ili homolognim kromosomima**. Tijekom mitoze, nakon udvostručenja DNA u interfazi, dolazi do razdvajanja sestrinskih kromatida (anafaza), pa svaka stanica kći naslijedi po jednu kopiju od oba homologa. Gamete ili u biljaka spore koje su rezultat mejoze, naslijede samo po jedan homolog od svakog para, jer se homolozi međusobno prepoznaju i sparuju, a zatim razdvajaju u anafazi I. Sparivanje očinskog i majčinskog kromosoma značajka je mejoze (sl. 9.1). Dva sparena homologna kromosoma čine **bivalent** (sl. 9.2), a budući da su kromosomi udvostručeni bivalent čine četiri kromatide (kromatidske tetradе). Nakon razdvajanja homologa, koji su činili bivalent nastaju dvije jezgre (telofaza I) s polovičnim brojem kromosoma s po dvije kromatide. U drugoj mejotskoj diobi odvajaju se kromatide, pa nastaju četiri haploidne jezgre s jednostrukim kromosomima (sl. 9.3).

		<b>Profaza I, leptoten</b> – udvostručeni kromosomi čine klupko tankih niti, na kojima se uočavaju jače obojena mjesta – kromomere.
		<b>Profaza I, zigoten</b> – započinje sparivanje homologa, odgovarajuće kromomere homologa točno se podudaraju. (Sinaptonemski kompleks ne vidi se svjetlosnim mikroskopom).
		<b>Profaza I, pahiten</b> – kromosomi spareni čitavom dužinom čine bivalente. (U ovoj fazi dolazi do genetičke rekombinacije tj. crossing-overa).
		<b>Profaza I, diploten</b> – homologzi se razmiču, ali ih i dalje drže zajedno prekriženja – hijazme - koje su posljedica crossing-overa. Bivalenti se sve više kondenziraju.
		<b>Profaza I, dijakineza</b> – jasno vidljivi bivalent s hijazmama koje se pomiču prema krajevima (terminalizacija hijazmi), raspršeni po stanici.
		<b>Metafaza I</b> – bivalenti su smješteni u središtu diobenog vretena i to tako da su hijazme u ekvatorijalnoj ravnini, a centromeri su usmjereni prema suprotnim polovima.
		<b>Anafaza I</b> – homologzi se razdvajaju putujući prema suprotnim polovima (redukcija broja kromosoma). svaki kromosom čine dvije kromatide.
		<b>Telofaza I</b> – kromosomi se despiraliziraju i oblikuju se dvije jezgre.
		<b>Profaza II</b> – nakon interkineze (tijekom koje se ne udvostručuje DNA) ponovno se spiraliziraju kromosomi.
		<b>Metafaza II</b> – kromosomi se postavljaju u ekvatorijalnu ravninu i to svojim centromerima (kao u mitozu), nema relacijske spirale tj. kromatide nisu omotane jedna oko druge.
		<b>Anafaza II i telofaza II</b> – kromatide se razdvajaju i postaju samostalni kromosomi, koji se despiraliziraju i oblikuju se nove jezgre koje su genetički različite.

**Slika 9.1.** Mejoza u polenovnicama prašnika cvjetnih pupova vrste *Gasteria* sp. ( $2n = 14$ ). Lijevi stupac – snimci faza mejoze (objektiv 100:1, okular 10:1), srednji stupac – crteži faza mejoze (crtano prema mikroskopskom preparatu, koji nije identičan sa snimkama), desni stupac – ime faze i opis. (preparati i snimci M. Krsnik-Rasol)



**Slika 9.2.** Model bivalenta s dvije hijazme. Prikazane su postupne promjene od diplotena preko dijakineze do metafaze I. Kontrakcija i zadebljanje kromosoma prati terminalizaciju hijazme. U dijakinezi i metafazi I položaj hijazme ne podudara se više s mjestom gdje se dogodio crossing-over. (preuzeto iz: McLeish, J. and Snode, B. Looking at chromosomes. Macmillan St. Marin's Press, 1972)



**Slika 9.3.** Genetičke posljedice crossing-overa. (a) bivalent s jednom hijazmom u diplotenu. Neki geni označeni su slovima. Crossing-over se dogodio između kromatide majčinskog kromosoma (bijelo) i kromatide očinskog kromosoma (crno) (U jednom crossing-overu sudjeluju samo dvije kromatide). (b) razdvojeni homolozi nakon mejoze I (anafaza I), (c) Kromosomi u četiri buduće jezgre (anafaza II), svaki je genetički različit. (preuzeto iz: McLeish, J. and Snode, B. Looking at chromosomes. Macmillan St. Marin's Press, 1972)

## Vježba

Na praktikumu ćemo proučavati mejozu koja se događa u polenovnicama prašnika cvjetnih pupova neke od sljedećih biljnih vrsta: *Gasteria* sp. ( $2n = 14$ ), *Aloe* sp. ( $2n = 14$ ), *Allium ursinum* ( $2n = 16$ ), *Vicia faba* ( $2n = 12$ ).

### Upute za izradu preparata:

1. Uzmite npr. cvat biljke *Gasteria* sp. ili *Aloe* sp. čiji su cvjetovi još zeleni i zatvoreni.
2. Otrgnite cvjetni pup, pa ga žiletom i iglicama otvorite i oslobodite prašnike. Nekoliko prašnica stavite na čisto predmetno staklo, na kojem je već kap boje (acetokarmin ili acetoorcein).
3. Pritisnite prašnice, tako da se rasprsu i da iz njih izađe sluzavi sadržaj, koji odmah stavite u boju. Boja fiksira stanice i boji kromatin, odnosno kromosome. Odstranite iz boje krupnije ostatke tkiva prašnice.
4. Položite pokrovnicu, malo pričekajte da boja proдре u stanice (1-2 minute), a zatim prislonite komadić filter-papira uz pokrovnicu i lagano upijte boju dok preparat ne postane proziran (pazite da ispod pokrovnice ne bude puno mjehura zraka). Dobro je preparat još lagano zagrijati.

Ako ste izabrali odgovarajući pup vidjet ćete, već kod slabog povećanja, okrugle stanice u nekoj od faza mejoze. Ako niste uspjeli, postupak ponovite s mlađim ili starijim cvjetnim pupom. Da biste vidjeli cijelu mejozu, morate uzeti nekoliko cvjetnih pupova različite starosti (veličine).

**Zadatak 1.** Pregledajte preparate, uz pomoć slike 9.1. i drugih snimaka mejoze, odredite pojedine faze mejoze u preparatu. Nacrtajte diploten, dijakinezu, metafazu I, anafazu I, metafazu II i anafazu II kako ste ih vidjeli uz pomoć imerzijskog objektiva. Obilježite sve nacrtane strukture.

**Zadatak 2.** Jednostavnim shematskim crtežom prikažite postupak izrade preparata mejoze.

**Zadatak 3.** Riješite zadatke koji se odnose na crossing-over i genetičku rekombinaciju u mejozi.

## Vježba 10. Izolacija jezgara i izdužene niti DNA

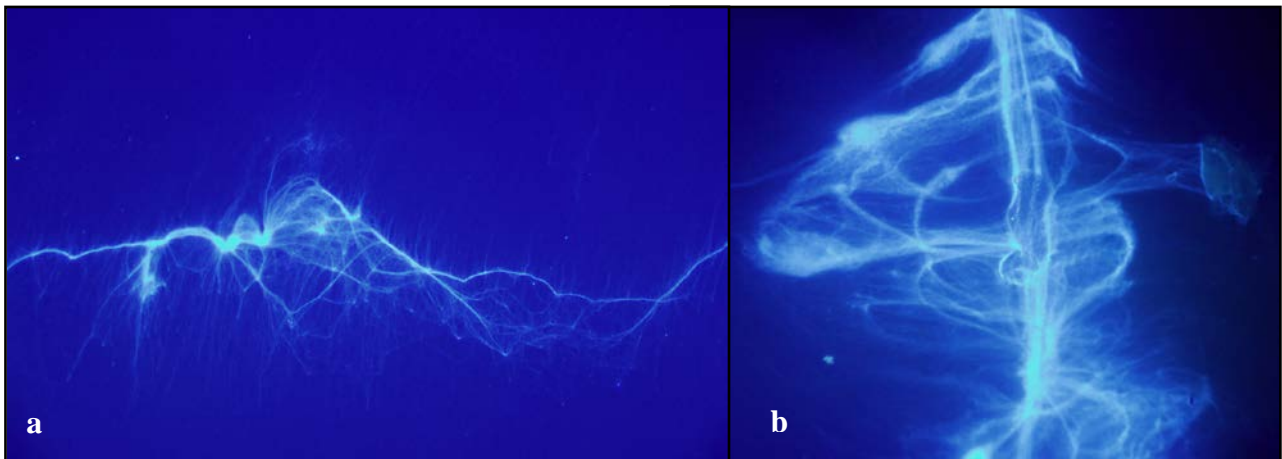
U eukariotskih stanica organizacija molekule DNA je mnogo složenija nego u prokariota. Genom eukariota sastavljen je od više linearnih molekula DNA koje su organizirane u strukture koje nazivamo kromosomi. U interfaznoj jezgri kromosomi su vidljivi u obliku guste zrnate strukture koju nazivamo kromatin. Kromatin je kompleks proteina i molekule DNA. Proteinski dio čine histoni, mali proteini koji proporcionalno imaju više bazičnih aminokiselina (arginin i lizin) te na taj način olakšavaju vezanje na negativno nabijenu molekulu DNA. Histonsku jezgru oko koje se namata molekula DNA čine četiri vrste histona H2A, H2B, H3 i H4 u obliku proteinskih dimera (po dvije molekule svakog histona). Tu strukturu nazivamo nukleosom i ona predstavlja osnovnu strukturu kromatina. Dakle, prvi stupanj pakiranja DNA je stvaranje nukleosoma koji se uz pomoć petog histona H1 gušće pakiraju, a zatim dodatno kondenziraju namatanjem u vlakna debljine 30 nm – kromatinske niti.

Organizaciju kromosoma u obliku kromatinskih niti (30 nm) moguće je vidjeti ne samo pomoću elektronskog mikroskopa već i svjetlosnim mikroskopom primjenom tehnologije izduženih niti DNA (slika 10.1). Tehnologija izduženih niti DNA zasniva se na oslobađanju kromatinskih niti iz interfazne jezgre na predmetnom stakalcu. Izdužene niti oslobođene od proteina se dekondenziraju, a stupanj kondenzacije se približava vrijednostima dužine molekule DNA (slika 10.2 i 10.3).

Postupak se sastoji od dvije faze:

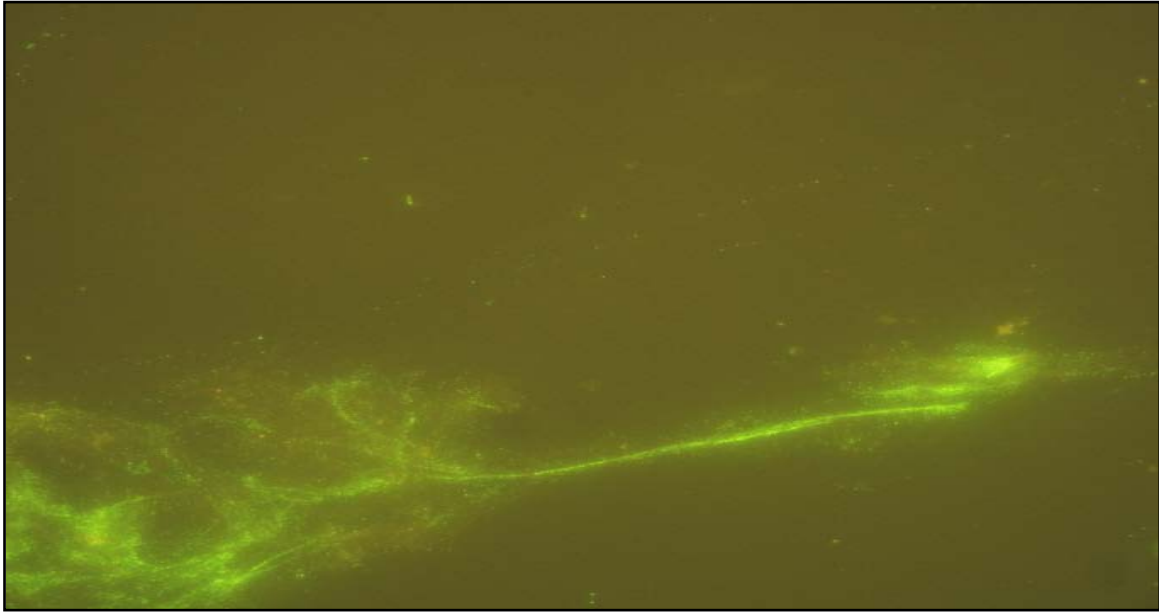
1. izolacija interfaznih jezgara i fiksiranje na predmetno stakalce
2. liza jezgara i ekstrakcija proteina kojim se oslobađaju kromatinske niti iz interfaznih jezgri.

Razaranje jezgara i kromatinske strukture postiže se uporabom deterdženta i EDTA što dovodi do rastezanja niti DNA duž predmetnog stakalca. Stupanj rastezanja niti DNA ovisi o porijeklu DNA (vrsta tkiva, biljna ili životinjska stanica) i uvjetima ekstrakcije proteina.

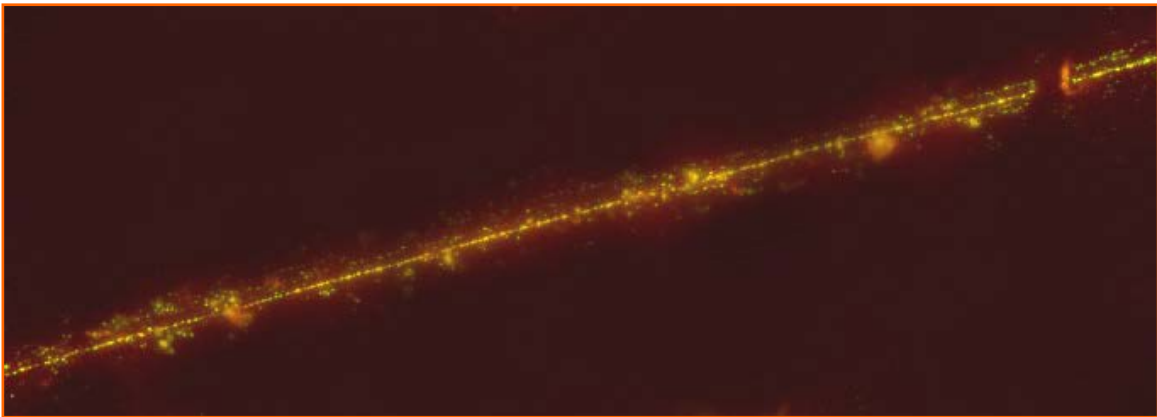


**Slika 10.1.** Izdužene niti DNA vrste *Allium cepa* obojene fluorescencijskom bojom DAPI: **a** - slika pri ukupnom povećanju od 200 X, **b** - slika pri ukupnom povećanju od 400 X. (preparati i snimci B. Balen i P. Peharec)





**Slika 10.2.** Izdužene niti DNA vrste *Anemone hortensis* – krajevi kromosoma. Flourescencijska hibridizacija *in situ* (FISH). Zeleno obilježena sonda prikazuje telomerne ponavljajuće slijedove (TTTAGGG) molekule DNA. (preparati i snimci V. Besendorfer)



**Slika 10.3.** Izdužene niti DNA vrste *Anemone hortensis* – subtelomerni krajevi kromosoma. Flourescencijska hibridizacija *in situ* (FISH). Crveno obilježena sonda prikazuje ponavljajuće slijedove DNA. Preklapanje zelenog i crvenog signala daje žuto obojenje. (preparati i snimci V. Besendorfer)

**IZOLACIJA JEZGARA IZ LISTOVA LUKA (*Allium cepa*)****Vježba****VAŽNO! Cijeli postupak provesti pri temperaturi od 0-4 °C**

1. Na satno stakalce kapnuti 800 µl 400 mM pufera Tris-HCl, pH=7 i u njemu žiletom usitniti listove luka, ili neke druge biljke (otprilike 2-3 lista).
2. Ostaviti 20 min na ledu.
3. Nakon 20 min pipetom pokupiti svu suspenziju u plastičnu tubicu.
4. Provjeriti uspješnost izolacije pod mikroskopom. Kapnuti 3 µl suspenzije na predmetno staklo te kap aceto-boje (orceina ili karmina), lagano promiješati vrhom nastavka te pažljivo staviti pokrovno stakalce.

(Ukoliko se odmah ne radi liza, jezgre se pohranjuju na -20°C u mješavini pufera i 100%-tnog glicerola u volumnom omjeru 1:1.)

**Izrada preparata:**

1. 10 µl suspenzije jezgara kapnuti u centar stakalca i razvući u krug te pričekati 4 min.
2. Na jezgre nakapati 10 µl pufera STE za lizu jezgara te inkubirati 4 min.
3. Preparat ostaviti da se osuši na sobnoj temperaturi (ili staviti na izvor svjetlosti da se brže osuši).
4. Preparat fiksirati 2 minute u acetoalkoholu (1:3 v/v) na sobnoj temperaturi.
5. Preparat osušiti na sobnoj temperaturi (oko 15 min).

**Bojanje preparata s fluorescencijskom bojom DAPI:**

1. Preparat inkubirati 15 minuta u puferu McIlvain pH=7,0.
2. Preparat ocijediti.
3. Na preparat nakapati 100 µl otopine boje DAPI konc. 2,0 µg/ml i taj dio pokriti s unutarnjom stranom crne folije. Sve zajedno pokriti poklopcem i inkubirati 10 minuta.
4. Preparate isprati s deH<sub>2</sub>O.
5. Preparate uklopiti u otopinu pufera McIlvain i glicerola (1:1 v/v). Na preparat kapnuti 20 µl otopine i pažljivo staviti pokrovno stakalce.

Preparate promatrati pod fluorescencijskim mikroskopom pri odgovarajućoj valnoj duljini (360 nm).

**Pufer STE za lizu jezgara**

0,5% (w/v) SDS

5mM EDTA

100 mM TRIS\*

podesiti pH=7 dodavanjem 1M ili 5M HCl

Pufer sterilizirati autoklaviranjem.

\*matična otopina: 1M TRIS-HCl - 60.57 g TRIS baze otopiti u 500 ml deH<sub>2</sub>O i podesiti pH=7,5-7,8 dodavanjem koncentrirane HCl

**pufer McIlvain**

A) 0,4208 g citratne kiseline otopiti u 20 ml deH<sub>2</sub>O

B) 7,1632 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O otopiti u 100 ml deH<sub>2</sub>O ili  
2,8200 g bezvodnog Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> otopiti u 100 ml deH<sub>2</sub>O

Pomiješati 18 ml otopine A i 82 ml otopine B i nadopuniti do 200 ml s deH<sub>2</sub>O

**Zadatak 1.** Shematski prikažite postupak izolacije jezgara.

**Zadatak 2.** Nacrtajte izolirane jezgre obojene orceinom ili acetokarminom. Na predmetno stakalce kapnite kap suspenzije jezgara te kap boje. Pokrijte pokrovnicom. Nacrtajte sliku koju daje objektiv koji povećava 40x.

**Zadatak 3.** Na fluorescencijskom mikroskopu pogledajte izdužene niti DNA.