

ΕΚΦΕ ΛΕΥΚΑΔΑΣ
19 Νοεμβρίου 2014

Εργαστηριακές ασκήσεις Βιολογίας

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΕΚΦΕ

Σπυρίδων Χόρτης
Φυσικός

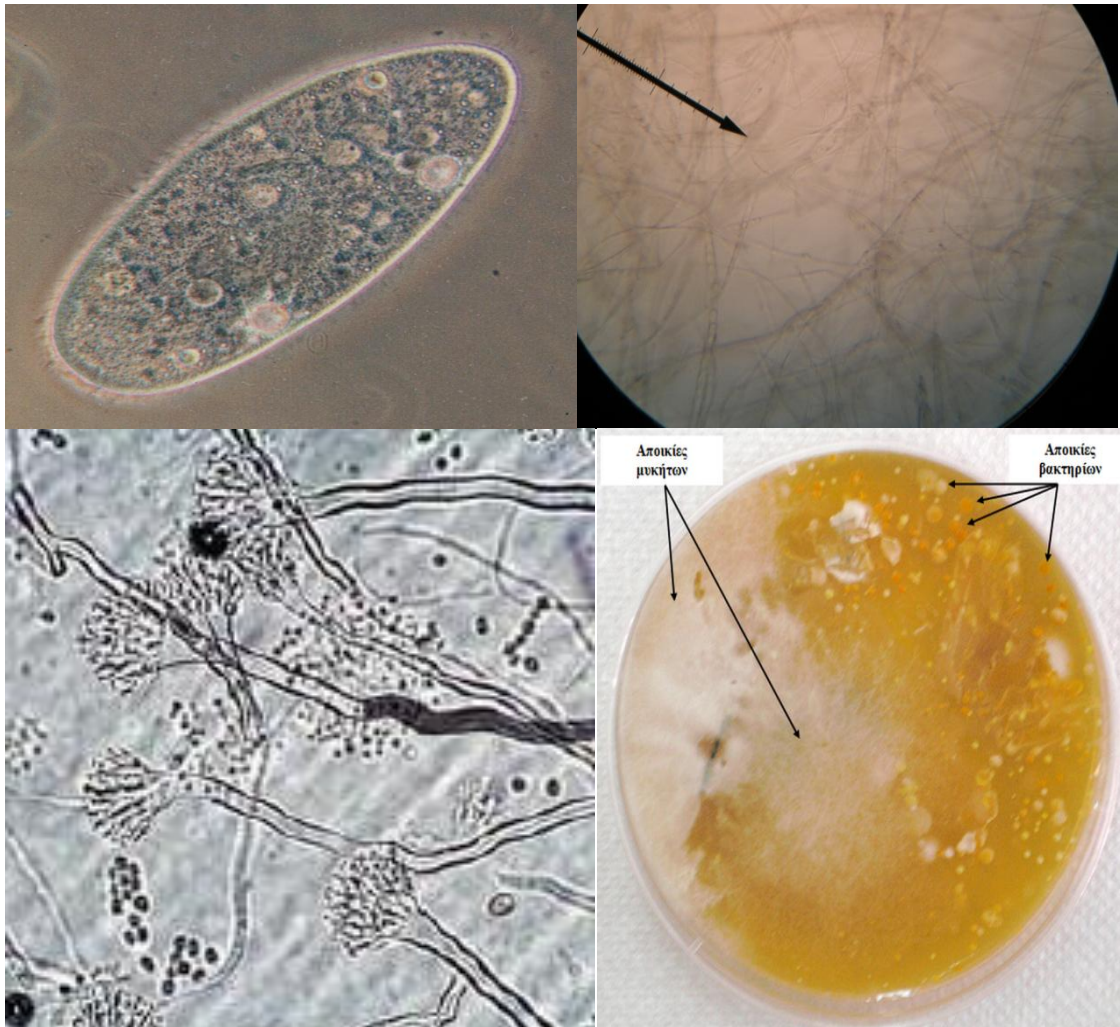
ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ

Δρ. Δημήτριος Χ. Λάζαρης
ΒΙΟΛΟΓΟΣ
ΙΧΘΥΟΛΟΓΟΣ ΕΦΑΡΜ. ΕΡΕΥΝΑΣ & ΤΕΧΝ.

Άσκηση 1. Μικροσκοπική παρατήρηση μικροοργανισμών σε νωπά παρασκευάσματα

Οι **μικροοργανισμοί** είναι μικροσκοπικοί οργανισμοί που δεν είναι ορατοί με γυμνό μάτι διότι έχουν μέγεθος μικρότερο από 0,1 mm. Υπάρχουν σε όλα τα περιβάλλοντα όπως στο έδαφος, στο νερό, στον αέρα, σε διάφορα υποστρώματα (τρόφιμα, αντικείμενα κλπ) καθώς επίσης μπορούν να συμβιώνουν ή να παρασιτούν σε άλλους οργανισμούς. Μπορεί να έχουν ευεργετικό ρόλο (να χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο για παραγωγή χρήσιμων ουσιών σε διάφορους τομείς όπως υγεία και διατροφή) ή να είναι επιβλαβείς (να προκαλούν ασθένειες). Αν και εξαιρετικά μικροί, οι μικροοργανισμοί έχουν μια εξαιρετική ποικιλία σε μορφές και μεγέθη. Διακρίνονται σε 4 βασικές ομάδες:

- **πρωτόζωα** (ευκαρυωτικοί οργανισμοί),
- **μύκητες** (ευκαρυωτικοί οργανισμοί),
- **βακτήρια** (προκαρυωτικοί οργανισμοί),
- **ιοί** (ακυτταρικές, μη αυτοτελείς μορφές ζωής).



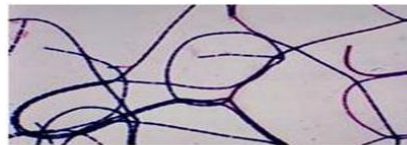
1

Φυσικά μέσα ανάπτυξης μικροοργανισμών για παρατήρηση και μελέτη: χρωματόνερο, νερό ενυδρείου.

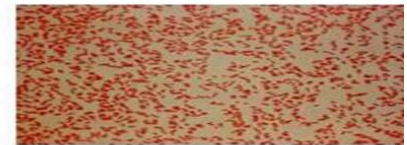
Άσκηση 2. Μικροσκοπικές παρατηρήσεις μόνιμων παρασκευασμάτων

α. Βακτήρια

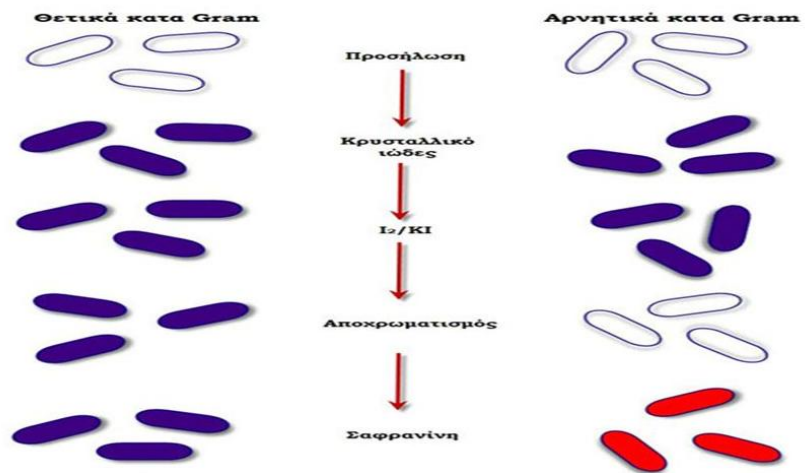
Τα **βακτήρια** (λιγότερο ορθά βακτηρίδια) είναι μικροσκοπικοί, μονοκύτταροι (σπάνια πολυκύτταροι), προκαρυωτικοί οργανισμοί, που συναντούνται σε κάθε είδους βίοτοπο και σε πολύ μεγάλους αριθμούς, όπως σε δισεκατομμύρια ανά γραμμάριο γόνιμου κηποχώματος ή σε εκατομμύρια σε μια σταγόνα σάλιου. Τα βακτήρια έχουν πολύ απλή κυτταρική δομή. Η κυτταρική μεμβράνη τους αποτελείται από *ημικοτταρίνες* ή *πηκτινοειδείς* ουσίες, συνεπώς δεν υφίσταται τυπικά κυτταρικός πυρήνας καθώς και σύνθετα οργανίδια. Η **χρώση κατά Gram (Gram stain)** κατατάσσει τα είδη των βακτηρίων σε δύο μεγάλες ομάδες, τα **Gram (+)** και τα **Gram (-)**. Η διαφορά αυτή οφείλεται στη χημική σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων και ιδιαίτερα στην ύπαρξη ή μη **πεπτιδογλυκάνης**.



Gram(+) βακτήρια



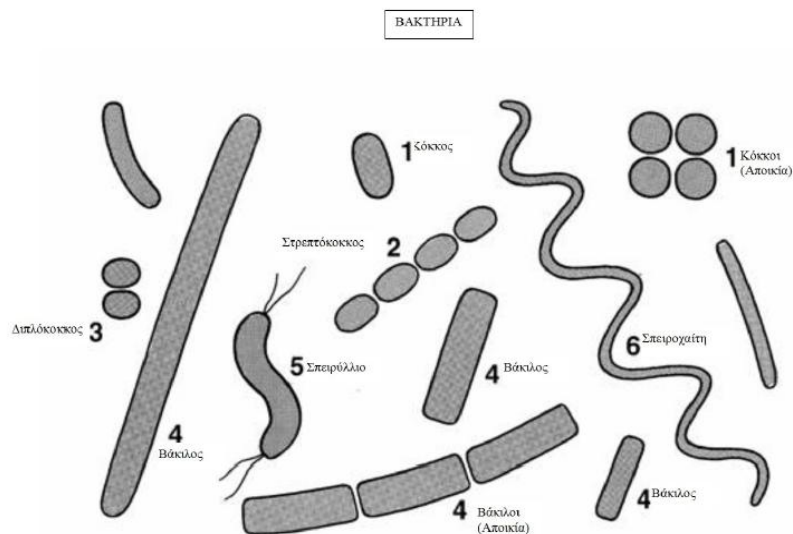
Gram(-) βακτήρια



Η τεχνική της χρώσης κατά Gram των βακτηρίων, επινοήθηκε από τον Δανό μικροβιολόγο **Christian Gram** (1853-1938) και βελτιώθηκε το 1921 από τον **Hucker**, παρέχοντας μεγαλύτερη σταθερότητα στη χρώση και καλύτερα αποτελέσματα στην ασφαλή διάκριση. Βασίζεται στην ιδιότητα των βακτηρίων να συγκρατούν **Gram (+)** ή όχι **Gram (-)** μία μπλε χρωστική (το κρυσταλλικό ιώδες) μετά από μία ήπια κατεργασία χρωματισμού και αποχρωματισμού. Έτσι μετά την επίδραση της μπλε χρωστικής, τα **Gram (+)** δεν αποχρωματίζονται όταν επιδράσει επάνω τους οινόπνευμα ή ακετόνη, ενώ

Η τεχνική της χρώσης κατά Gram των βακτηρίων, επινοήθηκε από τον Δανό μικροβιολόγο **Christian Gram** (1853-1938) και βελτιώθηκε το 1921 από τον **Hucker**, παρέχοντας μεγαλύτερη σταθερότητα στη χρώση και καλύτερα αποτελέσματα στην ασφαλή διάκριση. Βασίζεται στην ιδιότητα των βακτηρίων να συγκρατούν **Gram (+)** ή όχι **Gram (-)** μία μπλε χρωστική (το κρυσταλλικό ιώδες) μετά από μία ήπια κατεργασία χρωματισμού και αποχρωματισμού. Έτσι μετά την επίδραση της μπλε χρωστικής, τα **Gram (+)** δεν αποχρωματίζονται όταν επιδράσει επάνω τους οινόπνευμα ή ακετόνη, ενώ

2



τα Gram (-) αποχρωματίζονται και αυτά στη συνέχεια χρωματίζονται κόκκινα από μία άλλη χρωστική (σαφρανίνη). Τα Gram (-) έχουν πιο πολύπλοκο τοίχωμα και γι' αυτό χρωματίζονται πιο δύσκολα.

β. Ανθρώπινο αίμα με ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια

Σε περίπου 3-5 λίτρα αίματος στον υγιή άνθρωπο περιέχονται περίπου 55% πλάσμα και 45% κύτταρα. Τα κύτταρα είναι τα ακόλουθα:

Ερυθροκύτταρα (1): Έχουν σχήμα αμφίκιουλου δίσκου. Αποτελούν το 38% με 48% του πλήρους αίματος. Υπάρχουν περίπου $5 \times 10^6 / \text{mm}^3$ αίματος υγιούς ανθρώπου. Η κύρια λειτουργία τους είναι η μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς. Περιέχουν **αιμοσφαιρίνη** (μεταλλοπρωτεΐνη με σίδηρο) που δεσμεύει το οξυγόνο. Δεν έχουν πυρήνα και άλλα κυτταρικά οργανίδια, όπως μιτοχόνδρια. Παραμένουν 100-120 μέρες στην κυκλοφορία και τελικά καταστρέφονται κυρίως στον σπλήνα. Παράγονται στον μυελώδη ιστό των οστών.

Αιμοπετάλια (2): Δεν είναι κύτταρα αλλά κυτταρικά θραύσματα (από το κυτταρόπλασμα των **μεγακαρυοκυττάρων** που βρίσκονται στον μυελό των οστών), μήκους 2 - 4 μm , χωρίς πυρήνα. Αποτελούν λιγότερο από το 1% του πλήρους αίματος. Αριθμούν 250.000 - 400.000/ mm^3 αίματος. Συμβάλλουν στην πήξη του αίματος.

Λευκοκύτταρα (3): Τα λευκοκύτταρα εμφανίζουν αμοιβαδοειδή κίνηση. Έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τα τοιχώματα των αγγείων και να φαγοκυτταρώνουν μικρόβια. Ξεχωρίζουν τόσο από την προέλευση τους όσο και από το σχήμα του πυρήνα τους. Με το αίμα μεταφέρονται απλώς από τον τόπο παραγωγής τους (τον αιμοποιητικό ιστό και τα λεμφοκυτογόνα όργανα) στις θέσεις δράσης τους στον χαλαρό συνδετικό ιστό των διάφορων οργάνων. Υπάρχουν περίπου 5000 - 11000/ mm^3 αίματος. Διακρίνονται στα **κοκκιοκύτταρα** (με κοκκία στο κυτταρόπλασμα) και στα **μη κοκκιώδη** (δεν υπάρχουν κοκκία).

(α) Κοκκιοκύτταρα. Η παρουσία ειδικών κοκκίων στο κυτταρόπλασμα τους, που προσλαμβάνουν διαφορετικές χρωστικές, αποτελεί και την βάση για την κατάταξη τους.

Ουδετερόφιλα (4): Είναι τα πολυπληθέστερα λευκοκύτταρα (34-75%). Έχουν **πολύλοβο πυρήνα** (ονομάζονται **πολυμορφοπύρηνα**) και πολλά κοκκία μικρού μεγέθους (που δε βάφονται καλά με τις συνήθεις χρωστικές και δύσκολα διακρίνονται με το φωτομικροσκόπιο).

Ηωσινόφιλα (3): Είναι το 0-5% των λευκοκυττάρων. Έχουν **δίλοβο** συνήθως **πυρήνα**. Τα κοκκία τους είναι σχετικώς μεγάλα και βάφονται με όξινες χρωστικές (όπως η ηωσίνη στην οποία οφείλουν το όνομα τους).

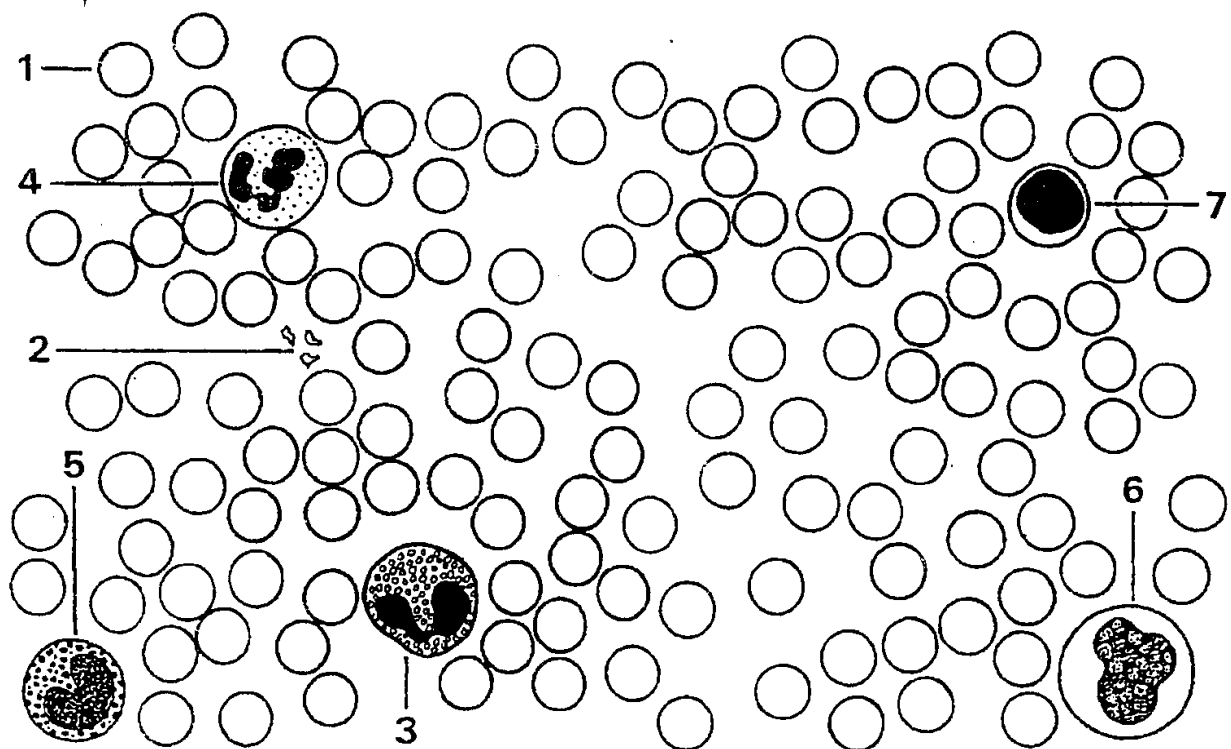
Βασεόφιλα (5): Τα λιγότερα λευκοκύτταρα (0-3%). Ο πυρήνας τους είναι συνήθως **δίλοβος** και τα σχετικώς μεγάλα κοκκία τους περιέχουν ουσίες που βάφονται με βασικές χρωστικές.

(β) Μη κοκκιώδη.

Μονοκύτταρα (6): Είναι τα μεγαλύτερα σε μέγεθος και αποτελούν το 3-15% του πληθυσμού των λευκοκυττάρων. Ο πυρήνας τους εμφανίζει μια εντομή. Είναι οι πρόδρομοι των **μακροφάγων** που εγκαθίστανται στους ιστούς και μαζί συγκροτούν το σύστημα των μονοκυττάρων-μακροφάγων, που αποτελείται από εδραία κύτταρα διάφορων ιστών. Εκτός από τη φαγοκυττάρωση ειδικεύονται και στην παρουσίαση του αντιγόνου στα κατάλληλα λεμφοκύτταρα (**αντιγονοπαρουσιαστικά**). Παράγονται στο μυελό των οστών.

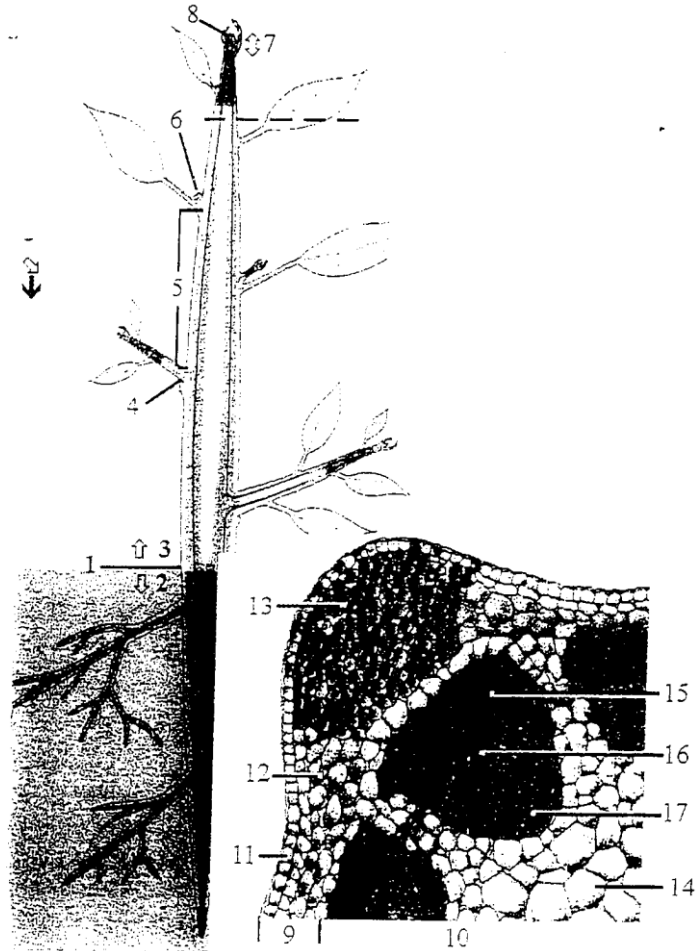
Λεμφοκύτταρα (7): Παρόμοια σε μέγεθος με τα λευκοκύτταρα, με σχετικά μεγάλο, σφαιρικό πυρήνα ο οποίος καταλαμβάνει σχεδόν το σύνολο του ενδοκυττάριου χώρου. Αποτελούν το 12-50% των λευκοκυττάρων. Συγκροτούν το ανοσοβιολογικό σύστημα που είναι υπεύθυνο για την ειδική άμυνα του οργανισμού αναγνωρίζοντας το ξένο από τον εαυτό και δρουν είτε αναπτύσσοντας **ειδική κυτταρική αντιγονικότητα** είτε σκοτώνοντας ξένα κύτταρα, είτε παράγοντας ειδικά αντισώματα έναντι εκείνων των ξένων ουσιών που δρουν ως αντιγόνα. Τα λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε **T** και **B**. Τα **T** προέρχονται από κύτταρα του αιμοποιητικού ιστού, αλλά ωριμάζουν και εξελίσσονται αφού μεταναστεύσουν στον θύμο αδένα, από όπου επανεισέρχονται στην κυκλοφορία και εποικίζουν τα λεμφικά όργανα. Διακρίνονται αρκετοί τύποι λεμφοκυττάρων-T ανάλογα με τους ειδικούς υποδοχείς επιφανείας, τη δραστηριότητά τους, ορισμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά (μικρά και μεγάλα λεμφοκύτταρα) και άλλα στοιχεία. Τα **B** προέρχονται από κύτταρα του αιμοποιητικού ιστού και βρίσκονται στα λεμφικά όργανα πλην του θύμου. Αναγνωρίζουν ξένα αντιγόνα και μετατρέπονται σε πλασματοκύτταρα.

Πλασματοκύτταρα. Είναι η ενεργός μορφή των λεμφοκυττάρων-B, όταν κάποιο μονοκύτταρο τους παρουσιάσει ένα αντιγόνο. Τα πλασματοκύτταρα παράγουν το ειδικό για κάθε αντιγόνο αντισώμα (**χυμική ανοσία**). Συνεπώς υπάρχουν τόσα είδη πλασματοκυττάρων όσα και τα αντιγόνα.



γ. Βλαστός δικοτυλήδονου φυτού - Εγκάρσια τομή

Το **φυτικό έμβρυο** των δικοτυλήδονων φυτών αποτελείται από το **υποκοτύλιο (2)** με το αρχέφυτρο της ρίζας. Κάτω από τη θέση των κοτυληδόνων **(1)** και το **επικοτύλιο (3)** με το αρχέφυτρο του βλαστού πιο πάνω από τις κοτυληδόνες ο βλαστός επιμηκώνεται και αποκτά **γόνατα (4)**, δηλαδή τα σημεία από τα οποία αναπτύσσονται τα φύλλα. Το τμήμα μεταξύ των γονάτων είναι το **μεσογονάτιο διάστημα (5)**. Η πάνω γωνία μεταξύ βλαστού και φύλλου ονομάζεται **μασχάλη (6)** και από αυτή αναπτύσσεται ο **μασχαλιαίος οφθαλμός (6)**, που μπορεί να είναι βλαστοφόρος ή ανθοφόρος. Στην κορυφή του βλαστού υπάρχει ο **κορυφιαίος οφθαλμός (7)** που είναι μεγαλύτερος από τους μασχαλιαίους. Η αρχική κατά μήκος αύξηση του βλαστού οφείλεται στη μιτωτική διαίρεση του **μεριστώματος (8)** που είναι στην άκρη του κορυφαιού οφθαλμού. Η περαιτέρω αύξηση του βλαστού γίνεται με επιμήκυνση των κυττάρων του.



Σε εγκάρσια τομή στο μεσογονάτιο διάστημα του βλαστού διακρίνονται ο **πρωτογενής φλοιός (9)**, περιφερικά και η **κεντρική στήλη (10)**, δηλαδή η συμπαγής εσωτερική περιοχή. Ο φλοιός αποτελείται από: **α) τη μονόστιβη επιδερμίδα (11)**, **β) το παρέγχυμα (12)**, που είναι το λειτουργικό μέρος του φλοιού και **γ) το σκληρέγχυμα (13)** που σχηματίζει στηρικτικές δεσμίδες κατά μήκος του βλαστού. Στην κεντρική στήλη υπάρχει κεντρικά η **εντεριώνη (14)**, μία συμπαγής μάζα παρεγχυματικών κύτταρων και περιφερειακά διατάσσονται οι **ηθμαγγειώδεις δεσμίδες**. Κάθε δεσμίδα αποτελείται από το **φλοιώμα (15)**, το **κάμβιο (16)** και το **ξύλωμα (17)**. Οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες είναι το σύστημα δευτερογενούς ανάπτυξης του βλαστού.

Άσκηση 3. Παρατήρηση πλαστιδίων (χλωροπλάστες, αμυλοπλάστες, χρωμοπλάστες) σε νωπά παρασκευάσματα

Πλαστιδία

Πρόκειται για **κυτταροπλασματικά οργανίδια** που συναντώνται μόνο στα φυτικά κύτταρα. Εμφανίζονται σε τρεις μορφές: τους αμυλοπλάστες (λευκοπλάστες), χρωμοπλάστες και τους σημαντικότερους όλων χλωροπλάστες.

Λευκοπλάστες: μέσα σ' αυτούς σχηματίζονται οι αμυλόκοκκοι.

Χρωμοπλάστες: περιέχουν κόκκινες, κίτρινες και πορτοκαλί χρωστικές. Δίνουν το χαρακτηριστικό χρώμα σε καρπούς (τομάτα), ρίζες, λαχανικών (καρότο) και πέταλα ανθέων.

Χλωροπλάστες: περιέχουν την χρωστική χλωροφύλλη. Το σχήμα και το μέγεθος τους ποικίλει. Ο αριθμός σε κάθε κύτταρο μεταβάλλεται ανάλογα και με τη θέση του κυττάρου στα φυτικά όργανα. Παρατηρούνται εύκολα στα παρεγχυματικά κύτταρα του μεσοφύλλου και του φλοιού του βλαστού των ποωδών φυτών.

Παρασκεύασμα

Υλικό: βλαστός του *Trantescania sp.*

Γίνεται εγκάρσια τομή του βλαστού. Παρατηρούνται χλωροπλάστες σε αριθμό ανά κύτταρο που μειώνεται από την περιφέρεια προς το κέντρο.

Υλικό: Φύλλο ποράκανθου ή λιγούστρου

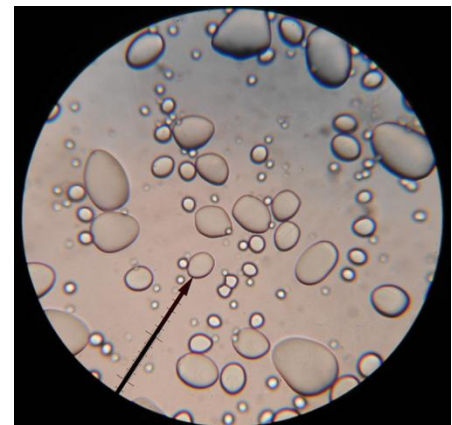
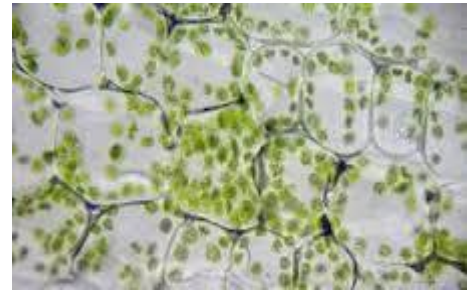
Κόβουμε λεπτές εγκάρσιες τομές του φύλλου με λεπίδα και ετοιμάζουμε το παρασκεύασμα. **Χλωροπλάστες** παρατηρούνται στο μεσόφυλλο. Η παρατήρηση τους είναι πιο εύκολη στο σπογγώδες παρέγχυμα, γιατί περιέχεται μικρότερος αριθμός χλωροπλαστών σε κάθε κύτταρο.

Υλικό: Καρότο

Κόβουμε λεπτές τομές κάθετες στον άξονα του καρότου. Στα κύτταρα παρατηρούνται **χρωμοπλάστες κίτρινο-πορτοκαλί**, σε ποικίλα σχήματα (σφαιρικοί, ατρακτοειδείς, πολυεδρικοί, πλακοειδείς, βελονοειδείς κ.τ.λ.

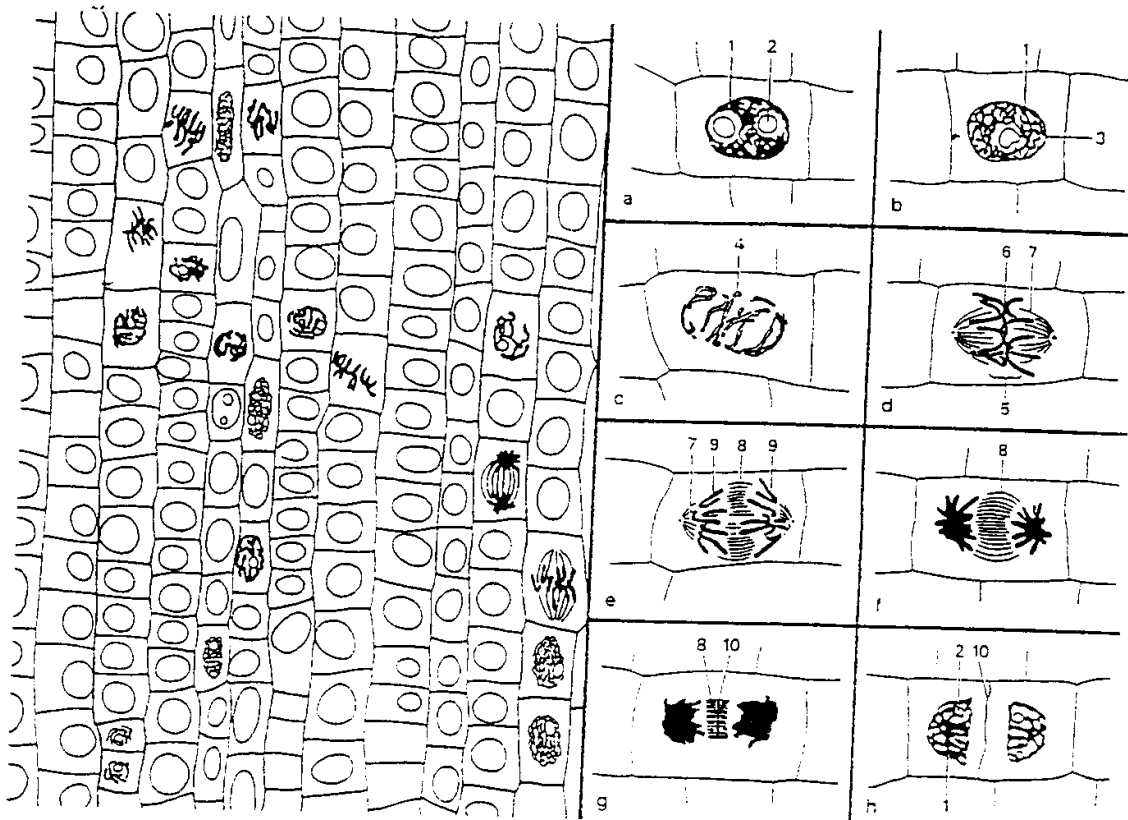
Υλικό: Τομάτα

Ανασηκώνουμε την επιδερμίδα του καρπού και από το μαλακό μέρος παίρνουμε με την βελόνη ένα μικρό τμήμα για να ετοιμάσουμε το παρασκεύασμα.



Άσκηση 4. Φάσεις της μίτωσης σε φυτικό οργανισμό ακροριζίου κρεμμυδιού)

Τα σωματικά κύτταρα διαιρούνται με **μίτωση**, που αποτελεί μια διεργασία διαίρεσης του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος του ευκαρυωτικού κυττάρου. Οι διάφορες φάσεις της μίτωσης φαίνονται σε **ακροριζίο κρεμμυδιού** (διαμήκεις τομές). Στο αριστερό μέρος της εικόνας φαίνεται τμήμα της τομής ενώ δεξιά φαίνονται οι φάσεις της μίτωσης.



Μεσόφαση είναι το διάστημα από το τέλος μιας κυτταρικής διαίρεσης ως την έναρξη της επόμενης. Ο πυρήνας του μεσοφασικού κυττάρου βρίσκεται μέσα στον **πυρηνικό φάκελο** (ή **πυρηνική μεμβράνη**) (3). Περιέχει το δίκτυο της χρωματίνης (1) και έναν ή δύο **πυρηνίσκους** (2). Ο πυρήνας ελέγχει τη σύνθεση των ενζύμων και γενικότερα των πρωτεϊνών, άρα και το μεταβολισμό του κυττάρου. Σε κύτταρα που πρόκειται να διαιρεθούν διπλασιάζεται το γενετικό υλικό πριν το κύτταρο εισέλθει στη μίτωση. Το διπλασιασμένο γενετικό υλικό μοιράζεται εξίσου στα δύο θυγατρικά κύτταρα κατά τη μίτωση, οπότε κάθε θυγατρικό αποκτά ίδιο αριθμό χρωμοσωμάτων με το αρχικό κύτταρο. Η μίτωση ακολουθεί τις παρακάτω φάσεις:

1. Πρόφαση. Το δίκτυο της χρωματίνης συμπυκνώνεται (1). Οι πυρηνίσκοι διαλύονται και αρχίζουν να διακρίνονται τα χρωμοσώματα. Τα **κεντριόλια** του κεντροσωματίου απομακρύνονται και σχηματίζουν δύο εστίες παραγωγής **μικροσωληνίσκων** (8) για το σχηματισμό της ατράκτου. Η πυρηνική μεμβράνη διαλύεται. Τα χρωμοσώματα διακρίνονται πλέον καθαρά (4) και αποτελούνται από δύο χρωματίδες το καθένα, που είναι ενωμένες στο κεντρομερίδιο. Μερικοί μικροσωληνίσκοι (7) συνδέονται σε σημεία αντιδιαμετρικά του κεντρομεριδίου (6) προς τους **κινητοχώρους** των χρωματίδων και αποτελούν τους

μικροσωληνίσκους των κινητοχώρων (7). Οι υπόλοιποι μικροσωληνίσκοι απολήγουν ελεύθερα και λέγονται πολικοί μικροσωληνίσκοι.

2. Μετάφαση. Τα χρωμοσώματα (το καθένα με δύο αδελφές χρωματίδες) μετακινούνται κατά μήκος των μικροσωληνίσκων και τοποθετούνται στο ισημερινό επίπεδο (5) του κυττάρου.

3. Ανάφαση. Το κεντρομερίδιο διαιρείται και οι χρωματίδες διαχωρίζονται και κινούνται προς τους πόλους της ατράκτου. Κατά την έλξη προπορεύεται ο κινητοχώρος και ακολουθούν οι χρωματίδες (9). Στο τέλος της ανάφασης τα δύο όμοια σύνολα των χρωμοσωμάτων (πρώην χρωματίδων) συναθροίζονται στους δύο πόλους του κυττάρου. Αν κατά τη φάση αυτή δε γίνει στο κεντρομερίδιο ο αποχωρισμός των χρωματίδων (μη διαχωρισμός) θα προκύψει αριθμητική χρωμοσωμική ανωμαλία (μονοσωμία στο ένα και τρισωμία στο άλλο θυγατρικό κύτταρο).

4. Τελόφαση. Οι χρωματίδες αποκολλώνται από τους μικροσωληνίσκους των κινητοχώρων και σχηματίζεται η πυρηνική μεμβράνη. Η άτρακτος αποσυντίθεται. Τα χρωμοσώματα σχηματίζουν δίκτυο χρωματίνης και επανασχηματίζονται οι πυρηνίσκοι. Στα φυτικά κύτταρα η μίτωση ολοκληρώνεται με το σχηματισμό του φραγμοπλάστη ενός διαχωριστικού κυτταρικού τοιχώματος (10) στο **ισημερινό επίπεδο** του κυττάρου. Στα ζωικά κύτταρα δημιουργείται μία περίσφιξη που διαιρεί το κυτταρόπλασμα στα δύο. Τέλος τα θυγατρικά κύτταρα εισέρχονται στην **μεσόφαση**.



Απαιτούμενα όργανα:

1. Όργανα και υλικά μικροσκοπίας.
2. Βολβοί κρεμμυδιού.
3. Λύχνος υγραερίου.
4. Τριβλία petri ή ύαλοι ωρολογίου.
5. Ένα ρηχό δοχείο.

Απαιτούμενα υλικά/ αντιδραστήρια:

1. Αραιό διάλυμα HCl οξέος (5%)
2. Οξικό καρμίνιο.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

(1) Αφαιρούμε από τη βάση του βολβού του κρεμμυδιού τα υπολείμματα των παλαιών ριζών του, προσέχοντας να μην τραυματίσουμε το βολβό, και τοποθετούμε το κρεμμύδι μέσα στο ρηχό δοχείο, στο οποίο έχουμε ρίξει λίγο νερό. Το νερό αυτό το αλλάζουμε καθημερινά. Ύστερα από 3-4 μέρες θα παρατηρήσουμε ότι τα κρεμμύδια θα έχουν βγάλει πολλές, καινούργιες ρίζες.

(2) Επειδή η μίτωση γίνεται το βράδυ, κόβουμε βράδυ τις ρίζες του κρεμμυδιού και τις βάζουμε σε λίγο ξύδι, για να τις παρατηρήσουμε την άλλη μέρα. Διαφορετικά, φωτίζουμε τα κρεμμύδια τη νύχτα και τα αφήνουμε στο σκοτάδι την ημέρα, ώστε να κάνουμε, γι' αυτά, τη νύχτα μέρα.

(3) Κόβουμε από το άκρο της ρίζας ένα κομμάτι μήκους 0,5 cm. Αφαιρούμε μικρό τμήμα (1mm) από το άκρο του, διότι στα κύτταρα αυτής της περιοχής δε γίνονται συνήθως κυτταρικές διαιρέσεις (μιτώσεις). Τα υπόλοιπα 4 mm της ρίζας τα τοποθετούμε πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Ρίχνουμε μια σταγόνα οξικού καρμινίου, που περιέχει και μικρή ποσότητα αραιού HCl (5%), και το θερμαίνουμε ήπια, μέχρι να φύγουν τα πολλά υγρά, αλλά και χωρίς να ξεραθεί τελείως.

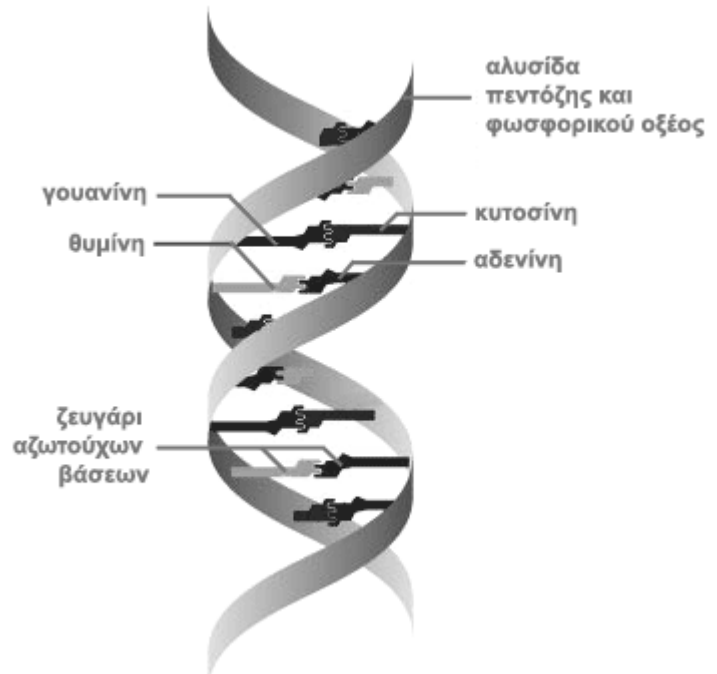
(4) Ρίχνουμε δύο σταγόνες οξικό καρμίνιο, αυτή τη φορά χωρίς HCl. Το ξαναθερμαίνουμε ώσπου να συμποκνωθεί, χωρίς όμως να ξεραθεί εντελώς. Επαναλαμβάνουμε το ίδιο δύο φορές. Τέλος, ξεπλένουμε καλά το παρασκεύασμα με νερό.

(5) Φέρνουμε το ακρόριζο σε καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα και το συνθλίβουμε με ελαφριά πίεση της καλυπτρίδας με τη βοήθεια της λαβής της ανατομικής βελόνας. Το πιέζουμε ελαφρά για να το συνθλίψουμε. Αναζητούμε με το φακό τα διάφορα στάδια της μίτωσης στα κύτταρα της μεριστωματικής ζώνης. Είναι περίπου, η ζώνη που απέμεινε μετά την απομάκρυνση του 1mm από τη ρίζα.

Άσκηση 5. Απομόνωση DNA από φυτικά κύτταρα

Το DNA ή αλλιώς **δε(σ)οξυριβονουκλεϊ(νι)κό οξύ** μια μεγαλομοριακή ένωση που συγκροτείται από αζωτούχες βάσεις, φωσφορικές ρίζες και ένα σάκχαρο με πέντε άτομα άνθρακα (πεντόζη), την **δε(σ)οξυριβόζη**. Περιέχει όλες εκείνες τις γενετικές πληροφορίες που καθορίζουν τη βιολογική ανάπτυξη όλων των κυτταρικών μορφών ζωής και των περισσότερων ιών. Όλοι οι οργανισμοί δομούνται και λειτουργούν με πρωτεΐνες, αλλά τις πληροφορίες για αυτές τις πρωτεΐνες τις δίνει το DNA.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα ανιχνεύεται κυρίως μέσα στον πυρήνα του κυττάρου αλλά και σε μερικά άλλα οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια και τα πλαστίδια, επιτρέποντάς τους να αναπαράγονται αυτόνομα (**ημιαυτόνομα οργανίδια**). Το DNA υπάρχει μέσα σε κάθε κύτταρο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς προστατεύεται μέσα στον πυρήνα του κυττάρου. Εάν βρεθεί εκτεθειμένο έξω από τον πυρήνα μπορεί να διασπαστεί από ένζυμα (**νουκλεάσες**) που διασπούν το DNA και που υπάρχουν ελεύθερα στο κυτταρόπλασμα για να προστατεύσουν το κύτταρο απ' την εισβολή ξένου DNA (ϊικού). Τα φυτικά κύτταρα διαθέτουν μια επιπλέον προστασία, το κυτταρικό τοίχωμα.



10

Απαιτούμενα όργανα:

1. δύο δοκιμαστικούς σωλήνες και στατώ
2. τρία ποτήρια ζέσεως των 250ml
3. ογκομετρικός κύλινδρος των 100ml, γυάλινο χωνί
4. κάψα λειοτριβίσης και γουδί
5. ορθοστάτης, μεταλλικός δακτύλιος, διηθητικό χαρτί, ψαλίδι
6. υδροβολέας
7. γυάλινες ράβδους, πλαστικό κουταλάκι, μαχαίρι, ξύλινο καλαμάκι
8. ψηφιακή ζυγαριά
9. λύχνος υγραερίου, τρίποδας στήριξης, πλέγμα θέρμανσης, αναπτήρας και τριμμένος πάγος

Απαιτούμενα υλικά/ αντιδραστήρια:

1. Μπανάνα (ή κρεμμύδι ή ακτινίδιο ή φράουλες ή αρακάς)
2. Υγρό πιάτων (όχι συμπυκνωμένο)
3. Αλάτι
4. Διάλυμα ενζύμου πεψίνης 1% w/v (ή διάλυμα πρωτεΐνάσης 0,1% w/v ή υγρό καθαρισμού φακών επαφής ή χυμό ανανά)
5. Αιθανόλη (παγωμένη)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- (1) Ξεφλουδίζουμε μια μπανάνα και κόβουμε την μισή σε μικρά κομμάτια μέσα σε ένα ποτήρι ζέσεως των 250ml (ή μέσα στην κάψα λειοτριβίσης). Πολτοποιούμε καλά την μπανάνα πιέζοντας με το γουδί.
- (2) Σε ένα δεύτερο ποτήρι ζέσεως των 250ml προσθέτουμε 100 ml νερού (κατά προτίμηση κρύο) και διαλύουμε σ' αυτό 3g αλατιού και 2 κουταλιές του γλυκού υγρού πιάτων. Ανακατεύουμε προσεκτικά με την ράβδο ανάδευσης, ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες.
- (3) Ρίχνουμε το διάλυμα αλατιού/ υγρού πιάτων μέσα στην πολτοποιημένη μπανάνα και συνεχίζουμε να πιέζουμε με το γουδί και να ανακατεύουμε με την γυάλινη ράβδο για 2-3min μέχρι να πάρουμε ένα σχετικά ομοιογενές μίγμα.
- (4) Αφήνουμε το μίγμα να ηρεμήσει για 15min.
- (5) Διηθούμε το μίγμα και κρατάμε το διήθημα μέσα στο τρίτο ποτήρι ζέσεως των 250ml.
- (6) Ρίχνουμε στους δύο δοκιμαστικούς σωλήνες από περίπου 5-6ml διηθήματος (2-3 cm) και προσθέτουμε σε καθένα από αυτούς 3-4 σταγόνες του διαλύματος πεψίνης (ή του δ/τος πρωτεΐνάσης ή του υγρού καθαρισμού φακών επαφής ή του χυμού ανανά).
- (7) Προσθέτουμε στους δοκιμαστικούς σωλήνες από 5-6ml παγωμένης αιθανόλης, αργά και προσεκτικά, έτσι ώστε να σχηματιστεί μία ζώνη οινοπνεύματος πάνω από διήθημα της μπανάνας.
- (8) Αφήνουμε σε ηρεμία για 2-3min τους δοκιμαστικούς σωλήνες. Το DNA θα αρχίσει να συσσωρεύεται στην διαφανή φάση της αιθανόλης. Παρατηρούμε ότι μοιάζει με λευκά «νήματα». Όσο πιο πολύ αφήσουμε τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε ηρεμία (εάν μπορούμε και μία ημέρα) τόσο πιο πολύ θα συμπυκνωθεί το DNA. Τέλος, μπορούμε να συλλέξουμε τα «νήματα» DNA μ' ένα καλαμάκι από σουβλάκι και να τα παρατηρήσουμε στο μικροσκόπιο.



11

Αν δεν εμφανίζεται τίποτα ή εμφανίζονται ελάχιστα νουκλεϊκά οξέα τότε προσθέτουμε λίγες σταγόνες διαλύματος NaCl για να βοηθήσουμε στην συμπύκνωσή τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ε.Κ.Φ.Ε. Ν. Ευρυτανίας. *Εργαστηριακή διδασκαλία των Φυσικών Μαθημάτων.*

Λάζαρης Δ. (2014). *7η εκδήλωση για τις φυσικές Επιστήμες στην Καρδίτσα.* ΣΕΜΙΝΑΡΙΟ ΕΚΦΕ Ευρυτανίας & ΕΚΦΕ Καρδίτσας 5 Μαΐου 2014

Οδηγός Εργαστηριακών Ασκήσεων Βιολογίας Γενικής Παιδείας Β' Τάξης Ε.Λ. (ΟΕΔΒ)