

## **Postvitální barvení mikroskopického preparátu kultury prvoků**

### **Cíl, teorie:**

- a) Pozorovat jednobuněčná eukaryotní protozoa
- b) Provést postvitální barvení nativního preparátu kultury prvoků

**Vitální barvení** mikroskopických preparátů se používá v případě nativních preparátů, které pozorujeme okamžitě po zhotovení preparátu. Vitální barvení se používá pro vizualizaci a zlepšení kontrastu vybraných částí buňky, které pozorujeme. Pro barvení používáme vitální barviva, která nepůsobí na buňky toxicky, jedná se o vodné roztoky poměrně ředěných organických barviv. Podle toho, jak při přípravě preparátu postupujeme, rozlišujeme několik typů barvení - intravitální, supravitální a postvitální.

**Intravitální barvení** znamená, že barvivo přímo proniká do pozorované buňky či buněk, barvivo rozpouštíme ve fyziologickém roztoku nebo izotonické tekutině, malé vodní živočichy přeneseme přímo do roztoku barviva ve vodě. **Supravitální barvení** znamená, že barvení působí po stanovenou dobu na buňky, pletivo či tkáň vyňaté z organismu. Kousky tkání se vkládají přímo do roztoku barviv většinou na 5-30 minut. **Postvitální barvení** znamená, že vizualizujeme barvivem odumírající buňky či tkáň.

Příklady známých barviv, která je možné použít jako vitální barviva, barviva v ředěných koncentracích nejsou toxická pro buňky:

**Neutrální červen** – používá se k barvení jader a vakuol. K barvení živých buněk se používá koncentrace 1:50 000 až 1:100 000, vyšší koncentrace jsou toxické pro buňky. K testu vitality tkáňových kultur se užívá v koncentraci 0,1 až 0,5%. V odumřelých buňkách barví jádra.

Podobně lze použít toluidinovou modř či nilskou modř.

**Methylenová modř** – buňky in vivo v nativních preparátech barví v koncentraci nejvýše 0,01%. Lépe proniká do buněk při teplotě kolem 30°C.

**Methylenová zeleň** – barví chromatin, koncentrace 0,5%.

**Janusova zeleň B** – barvivo se používá na barvení mitochondrií. Ředění 1:20 000 až 1:50 000.

**Sudan III** - barví oranžově tukové buňky, dá se použít i jako vitální barvivo.

**Eosin** – 0,1% až 0,5% vodný roztok eosinu se používá pro test vitality tkáňových kultur, barví se jen mrtvé buňky.

### **Materiál a přístrojové vybavení:**

Kultura prvoků, nejlépe rodu *Paramecium ssp.*, nejvýhodněji *Paramecium caudatum*, zkumavky, kádinky 10 ml, 25 ml, pipetman 200 µl se špičkami, optický mikroskop, preparační souprava, podložní sklíčka, vata, imerzní olej, pipety, destilovaná voda, metylenová zeleň 0,5%, Lugolův roztok, pracovní rukavice.

### **Vlastní pracovní postup**

- a) Připravíme si ředěný roztok metylénové zeleni v digestoři.
- b) Do destilované vody na podložním sklíčku přidáme kulturu trepek.
- c) Při přípravě preparátu využijeme vlákna vaty, abychom zastavili a ohraničili místo pohybu prvoků.
- d) Preparát pozorujeme a na základě znalostí buněk prvoků, popíšeme jednotlivé organely v buňce.
- e) Roztok ředěného barviva připipetujeme ke hraně krycího sklíčka a pomocí filtračního papíru prosajeme barvivo do preparátu.
- f) Pozorujeme obarvený makronukleus nálevníků.

### **Získané výsledky a vyhodnocení**

Do protokolu popíšeme výsledky postvitálního barvení zhotoveného preparátu prvoků.

### **Diskuse a závěr**

Zjistíme, s jakými výsledky se setkali další studenti ve skupině, provedeme diskusi.