

Intravitální barvení mikroskopického preparátu kultury prvoků

Cíl, teorie:

- a) Pozorovat jednobuněčná eukaryotní protozoa
- b) Pozorovat pohyb prvoků
- c) Provést intravitální barvení nativního preparátu

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, **supravitální barvení** znamená, že barvení působí po stanovenou dobu na buňky, pletivo či tkáň vyňaté z organismu a **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 červeň – 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.

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, roztok neutrální červeně, pracovní rukavice.

Vlastní pracovní postup

- a) Připravíme si zásobní roztok neutrální červeně v digestoři, provedeme ředění barviva.
- 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 červeně obarvené potravní vakuoly.

Získané výsledky a vyhodnocení

Do protokolu velmi pečlivě popíšeme výsledky intravitálního barvení zhotoveného preparátu kultury *Paramecium caudatum*. Sledujeme zbarvení potravních vakuol a dále pozorujeme, jestli nedochází k barvení jádra viz teorie výše.

Diskuse a závěr

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