



## Великий практикум з загальної генетики

# Лабораторна робота № 3

**Тема:** Підготовка матеріалу для підрахунку хромосом. Підрахунок кількості хромосом у різних об'єктів. Визначення мітотичного індексу

**Мета:** вивчити методику фіксації матеріалу та його підготовки для підрахунку хромосом, приготувати реактиви для подальшої роботи, вивчити методику підрахунку хромосом на різному матеріалі, відпрацювати вивчені методики, навчитись визначати мітотичний індекс

### Завдання 1. Дофіксаційна обробка

Якщо підрахунок хромосом планується проводити на кінчиках кореня потрібно заздалегідь провести пророщування насіння для отримання для фіксації корінців. Зазвичай використовують корінці не більш ніж 2 см довжиною з добре вираженою меристемою. Можна також використовувати корінці вкорінених пагонів, живців або свіжовикопані корінці. Дослідним шляхом встановлено, що дофіксаційна обробка матеріалу покращує результати дослідження. Деякі речовини викликають фізичні зміни цитоплазми та хромосом вони краще вкорочуються та розподіляються по клітини. До таких речовин належать колхіцин, 8-гідрооксіхінолін, парадіхлорбензол,  $\alpha$ -монобромнафталін, аценафтен, хлоралгідрат, кумарін, ескулін, хлорфуренол, метронізадол. Обробка корінців цими речовинами проводиться перед їх фіксацією. Тривалість обробки та концентрація діючих речовин залежить від виду рослин та визначається найчастіше дослідним шляхом. Для колхіцину частіше всього використовують концентрацію 0,01% та тривалість обробки від 3 годин.

**Приготування реактиву колхіцину.** 1 г колхіцину, що розчинений у 100 см<sup>3</sup> дистильованої води утворює 1% розчин цієї речовини, який може зберігатися протягом року. Для використання у дослідах його розбавляють до необхідної концентрації.

Практичне завдання – приготувати розчин колхіцину.

Охолодження також викликає певні зміни у клітинах. Тривала витримка у холодній воді або холодильнику викликає у клітинах зміни які дозволяють отримувати препарати з добре розподіленими та слабко вкороченими хромосомами.

Окрім корінців для підрахунку хромосом можна використовувати молоді листочки та пилок. Рослинний матеріал перед дослідженням може бути зафіксований.

### Завдання 2. Фіксація досліджуваного матеріалу

Фіксація – це специфічна обробка матеріалу, що надає змогу швидко перервати процеси життєдіяльності у об'єкта, але дозволяє зберегти тонку структуру його клітин та робить його здатним сприймати барвник.



## Великий практикум з загальної генетики

Матеріал що було попередньооброблено промивають 96% спиртом та перекладають у фіксатор. У кардіологічних дослідженнях можна використовувати спиртово-оцетовий, Карнуа, Баталля та льодову оцтову кислоту, спиртово-оцтовому фіксаторі (3:1) та фіксаторі Карнуа (6:3:1) матеріал можна витримати 1-6 годин, потім промити у 96% спирті до зникнення запаху оцту (три рази) та перенести у 70% спирт для зберігання.

У фіксаторі Баталля об'єкт витримують від 5 хвилин та більше, у ньому ж можна і зберігати матеріал або перенести об'єкти у 70% спирт після промивки 96%.

В льодовій оцтовій кислоті корінці фіксують від 12 годин до 3 діб (у холодильнику) і після промивання у 96% спирті (кілька разів) переносять на зберігання у 70% спирт.

У фіксаторі Навашина фіксація триває 24 години та більше, після чого матеріал промивають у проточній воді (1-2 години), а потім проводять крізь спирти: 10%- 1 година, 20-30% - 1-2 години, 40-50% - 1-2 години, 60% - до ранку, 70% - від 2 годин до необхідного часу зберігання.

Спиртово-оцтовий фіксатор (3:1): спирт 96% - 3 частини, льодяна оцтова кислота – 1 частина.

Фіксатор Карнуа (6:3:1): спирт 96% - шість частин, хлороформ – три частини, льодяна оцтова кислота – одна частина.

Фіксатор Баталля (5:1:1:1): спирт 96% - п'ять частин, формалін 40% від комерційного – одна частина, хлороформ – одна частина, льодяна оцтова кислота – одна частина.

Фіксатор Баталля (5:5:1:1): спирт 96% - п'ять частин, хлороформ – п'ять частин, льодяна оцтова кислота – одна частина, формалін 40% від комерційного – одна частина.

Фіксатор Навашина: 1% хромово кислота (розчин А), 10% формалін (розчин Б). Розчини А та Б змішують перед фіксацією у співвідношенні 6А:4Б, 8А:2Б, 5А:5Б.

Практичне завдання – приготувати фіксатори для рослинного матеріалу.

### **Завдання 3.** Мацерація матеріалу

Після запропонованих фіксаторів матеріал краще всього зберігати у 70% спирті при температурі 0-4<sup>0</sup> С ( у холодильнику). Однак тривале зберігання у спирті погіршує якість наступного фарбування, а тому зберігати матеріал більш ніж 2 місяці не рекомендується.

Хромосоми добре помітні на препаратах в тих випадках коли клітини розташовані в один шар та не щільно примикають одна до одної. Це досягається шляхом мацерації зафіксованого матеріалу. Мацерацію можна здійснювати за допомогою мацеруючих розчинів або ферментів, що викликають розчинення пектинових речовин у стінках клітин.

Існує кілька способів мацерації.

Тверді об'єкти можна піддати впливу 1 н соляної кислоти (час обробки підбирають дослідним шляхом для кожного об'єкту). У деяких випадках кілька крапель 1 н соляної кислоти додають безпосередньо до барвника якщо він виготовлений на основі оцтової кислоти.



## Великий практикум з загальної генетики

В якості мацеруючого розчину використовують також гарячу 45% оцтову кислоту. В цьому випадку матеріал вміщують в маленький бюкс з невеликою кількістю кислоти, накривають кришкою та протягом кількох секунд нагрівають на спиртівці. Щоб рідина не перегрівалася її періодично прибирають з полум'я та охолоджують. З розчину кислоти матеріал переносять на предметне скельце у краплю барвника.

Доволі часто для мацерації використовують водні розчини ферментів: пектази, цитази та целюлази, як окремо так і в суміші. У 5% водному розчині пектинази підкисленому HCl корінці зазвичай витримують 2-5 годин при температурі 25-27° С, більш твердий матеріал витримують біля 12 годин.

Практичне завдання – провести мацерацію кількох об'єктів різними мацеруючими ми розчинами та порівняти їх ефективність.

### **Завдання 4.** Фарбування за Фелінгом з холодним та гарячим гідролізом

Корінці безпосередньо з фіксатору або 70% спирту вміщують на 10 хвилин у 1 н соляну кислоту для промивки, а потім переносять для гідролізу у соляну кислоту розведену дистильованою водою 1:1 при кімнатній температурі. Від правильного визначення тривалості гідролізу за часом залежить інтенсивність фарбування хромосом. Цей час в свою чергу залежить від рослинного об'єкту та фіксатору в якому його було зафіксовано. Для кожного рослинного об'єкту він визначається дослідним шляхом та зазвичай буває від 20 хвилин до 2-3 годин.

Можна проводити гідроліз також при температурі 60° С. В цьому випадку матеріал після фіксатору або спирту промивають 1 н соляною кислотою нагрітою до 60° С та витримують у ній деякий час. Для коренців які зберігалися у 70% спирту час обробки кислотою збільшують. З гарячої соляної кислоти матеріал переносять на 10 секунд у холодну 1 н соляну кислоту для зупинки процесу гідролізу і, після цього, у барвник.

Для підтримки сталої температури гідролізу його проводять у хімічному стакані вміщеному у водяну баню або ультратермостат.

Кислотний гідроліз вивільняє альдегідні групи з якими взаємодіє фуксинсірчана кислота (реактив Шиффа), що викликає червоно-фіолетове забарвлення ДНК локалізованої у хромосомі. Якщо гідроліз триває занадто довго то інтенсивність забарвлення зменшується чи навіть воно зовсім зникає. Якщо концентрація ДНК у клітинах замала слід використовувати інші барвники.

**Таблиця 1.** Зв'язок тривалості гідролізу та фіксатору

<b>Фіксатор</b>	<b>Час хвилини</b>	<b>Температура гідролізу, ° С</b>
Льодяна оцтова кислота	12	20
Спиртово-оцтовий	7	60
Спиртово-оцтовий	20	20
Баталля	20	20
Карнуа	8	60



## Великий практикум з загальної генетики

Фарбування проводять протягом 15 та більше хвилин. Пофарбований матеріал промивають протягом 1-2 хвилин у 45% оцтовій кислоті та вміщують на предметне скло у краплю оцтової кислоти. Кореневий чохлак відрізають та прибирають разом з непофарбованою частиною корінця. Якщо фарбування недостатнє можна додати під покривне скельце краплю ацетокарміну. Коренці розрізають на дрібні шматочки, накривають покривним скельцем та постукавши для розподілення клітин вміщують під мікроскоп та рахують хромосоми.

### Завдання 5. Прискорені методи фарбування хромосом

Швидкодіючими барвниками є барвники на основі оцтової чи пропіонової кислот. До них належать ацетокармін, ацетоорсеїн, ацетолакмоїд, пропіононий лакмоїд, оцтовий та пропіононий гематоксилени.

При роботі з твердим матеріалом попередньо проводять мацерацію. Для фарбування шматочки рослинного матеріалу вміщують у барвник та кілька разів нагрівають його над полум'ям не допускаючи закипання. Після цього для інтенсифікації забарвлення можна помістити препарат на кілька годин у холодильник або одразу переносити матеріал у краплину 45% оцтової кислоти чи у краплю пропіонової кислоти (в залежності від того на якій було виготовлено барвник) усі не пофарбовані частини коренців видаляють, пофарбовану частину подрібнюють та накривши покривним скельцем постукують по препарату для рівномірного розподілення клітин.

**Приготування ацетокарміну.** У скляну колбу на 200-250 мл наливають 55 мл дистильованої води, додають 45 мл льодяної оцтової кислоти та 2-5 г карміну. Потім колбу зі скляною воронкою вміщують у водяну баню або над невеликим полум'ям. Якщо нагрівання проводять на електричній плитці під колбу ставлять асбестову пластинку. Розчин кип'ятять протягом 30-60 хвилин, охолоджують та фільтрують. Відфільтрований розчин вміщують у ємність з притертою скляною пробкою де він може зберігатися невизначено тривалий час.

### Завдання 6. Методика підрахунку хромосом у листках

При підрахунку хромосом у листках зазвичай не використовують дофіксаційну обробку матеріалу. Але іноді для накопичення мітозу листки обробляють 0,05% розчином колхіцину або витримують у холодній воді у холодильнику протягом кількох годин. Для дослідження використовують основу молодих листочків які одразу фіксують ацеталкоголем (3:1) або занурюють безпосередньо у маленький тигель з ацетокарміном або ацетолакмоїдом, що виконують подвійну роль і фіксатора і барвника. Для зафіксованого матеріалу використовують ті самі барвники. Тигель нагрівають кілька разів на спиртівці, але рідину не доводять до закипання. Профарбовані основи листочків переносять у 45% оцтову кислоту для зменшення забарвлення цитоплазми. Препарат готують у краплі 45% оцтової кислоти. Для цього невеличкий шматочок пофарбованої тканини вміщують на предметне скло та розрізають на невеличкі шматочки які



## Великий практикум з загальної генетики

розподіляють у краплині оцтової кислоти. Матеріал роздавляють постукуючи по покривному скельцю. Зайву рідину прибирають фільтрувальним папером. Меристема листків характеризується великою кількістю дрібних клітин у стані поділу. Майже всі хромосомні пластинки видно з полюсу тому зручно рахувати хромосоми.

### **Завдання 7.** Методика підрахунку хромосом у пилковому зерні

Хромосоми в пилковому зерні зручніше рахувати під час першого мітозу. У різних рослин мітотичний поділ у пилкових зернах спостерігається у різний час доби і це залежить в першу чергу від температурного фактору. Тому час відбору матеріалу встановлюється дослідним шляхом для кожного рослинного об'єкту. Відомо, що за умови теплої погоди мітоз починається раніше та проходить інтенсивніше. Розмір пиляків у пилкових зернах яких можна знайти перший мітоз залежить від об'єкту дослідження. Ацетокармін в якості барвника більш ефективний для пилкових зерен.

Спосіб приготування препарату залежить від розмірів пиляка. Великий пиляк вміщують на предметне скло у краплю ацетокарміну, видаляють широкий кінчик і вміст видавляють у барвник. Оболонки пиляка видаляють після чого краплю барвника з пилком накривають покривним скельцем. Дрібні пиляки вміщують у барвник повністю. Приготований препарат кілька разів нагрівають не доводячи до закипання. Надлишок ацетокарміну прибирають фільтрувальним папером. Дрібні пиляки легко мацеруються при нагріванні та легко роздавляються при постукуванні по покривному скельцю.

Для більш інтенсивного фарбування хромосом у пилковому зерні бутони з пиляками краще попередньо зафіксувати у спиртово-оцтовому (3:1) фіксаторі або у фіксаторі Баталля (5:5:1:1), а вже потім фарбувати.

У стадії метафази першого мітозу після фарбування ацетокарміном добре помітні яскраво-червоні хромосоми на фоні рожевої цитоплазми.

**Завдання 8.** Практично виконати підрахунок хромосом на різних об'єктах (в залежності від наявного рослинного матеріалу листки, коренці, пиляки різних видів) використовуючи різні методи фарбування (за Фелінгом та прискорені методи фарбування) та барвники.

### **Завдання 9.** Визначення мітотичного індексу

Роздивіться надані рисунки та мікрофотографії, знайдіть і порахуйте кількість клітин, що знаходяться на різних стадіях клітинного циклу. Дані запишіть до лабораторного зошита в таблицю 2.



## Великий практикум з загальної генетики

**Таблиця 2.** Підрахунок кількості клітин

Номер рисунок	Кількість клітин на стадії:					
	Профаза (П)	Метафаза (М)	Анафаза (А)	Телофаза (Т)	Інтерфаза (І)	Разом (N)
1						
2						

Після підрахунку кількості клітин розрахувати рівень мітотичної активності за допомогою мітотичного індексу.

Мітотичний індекс розраховують за формулою:

$$MI = \frac{(П+М+А+Т)}{N}, \text{ де}$$

MI – мітотичний індекс;

П – кількість клітин на стадії профазі;

М – кількість клітин на стадії метафазі;

А – кількість клітин на стадії анафазі;

Т – кількість клітин на стадії телофазі;

N – загальна кількість клітин.

Мітотичний індекс виражають у проміле ‰-тисячних частках цілого.

Далі зробіть розрахунок відносної тривалості кожної фази мітози у % за такими формулами:

$$\text{А) тривалість профазі } T_{\text{п}} = \frac{П \times 100}{П+М+А+Т}$$

$$\text{Б) тривалість метафазі } T_{\text{м}} = \frac{М \times 100}{П+М+А+Т}$$

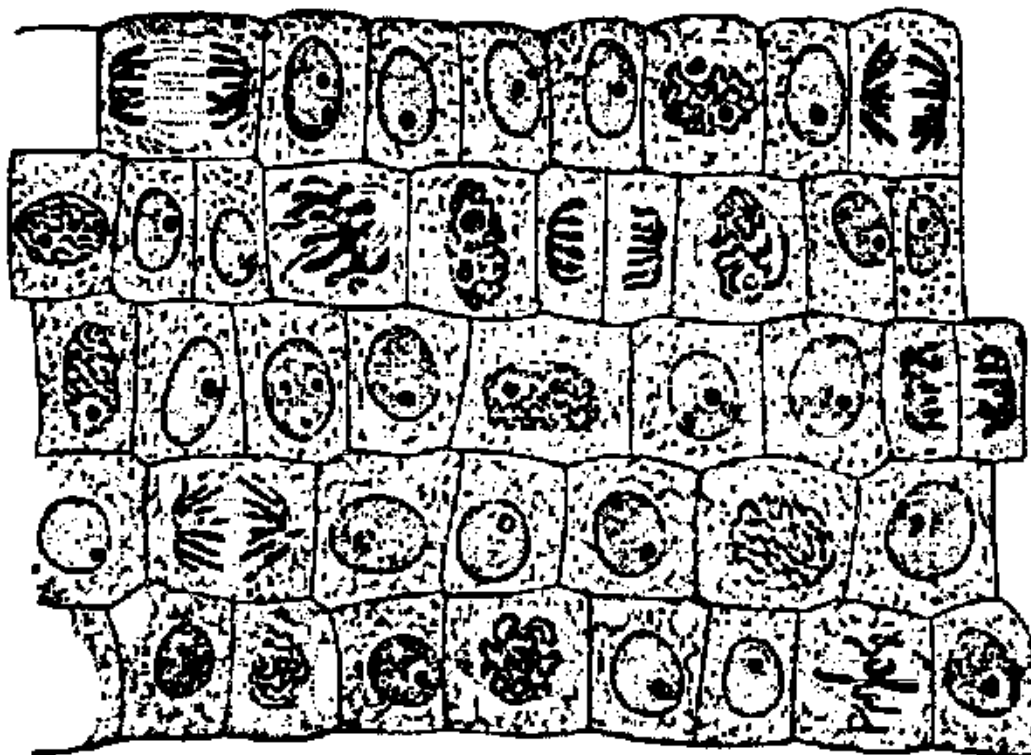
$$\text{В) тривалість анафазі } T_{\text{а}} = \frac{А \times 100}{П+М+А+Т}$$

$$\text{Г) тривалість телофазі } T_{\text{т}} = \frac{Т \times 100}{П+М+А+Т}$$

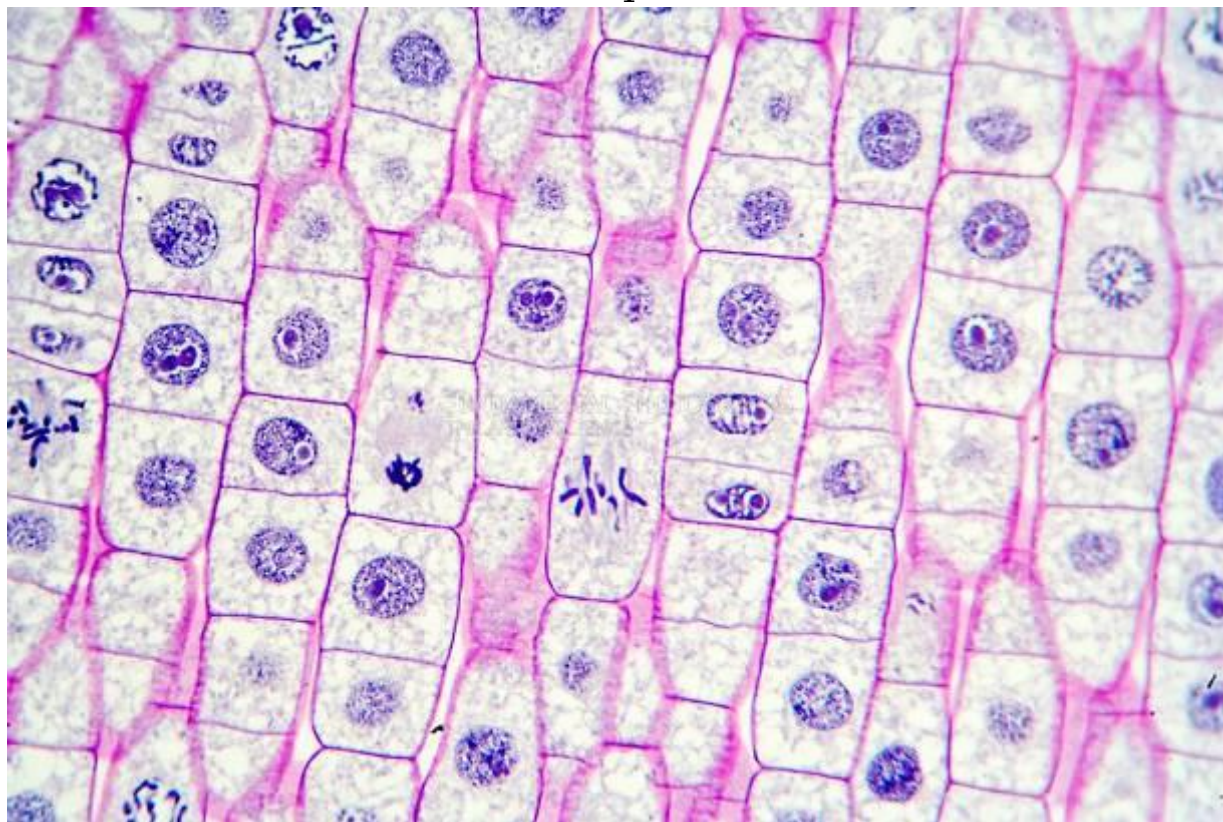
$$\text{Д) тривалість інтерфазі } T_{\text{і}} = \frac{І \times 100}{П+М+А+Т+І}$$



## Великий практикум з загальної генетики



1



2

Для кожного малюнку знайдіть клітину на стадії метафази та підрахуйте кількість хромосом для цієї культури. Отримані дані запишіть до лабораторного зошита.