

Mikroskopbild av rotceller från vitlök 400x förstoring.

Foto: Ammie Berglund

Kromosomjakt

– mitos i vitlöksrötter (Elevinstruktion)

Tänk att man kan se arvs massa så tydligt som i bilden här ovanför. Men det krävs lite tur också - det gäller att hitta celler som håller på att dela sig, dvs är i mitos. I den här laborationen används yttersta spetsarna på små unga vitlöksrötter.

Bakgrundsteori

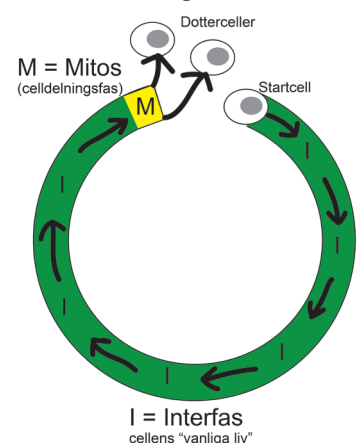
Vitlök (*Allium sativum*) har en diploid kromosomuppsättning på 16 kromosomer ($2n=16$). I varje cellkärna finns alltså 16 DNA-trådar som ligger rullade runt små proteinkulor som kallas histoner. I en vanlig cell som inte håller på att dela sig är de här 16 DNA-trådarna ganska utsträckta och långa. Generna som finns där längs DNA-trådarna är lätta att komma åt för de enzymer som kopierar informationen inne i cellkärnan. Kopior av gener (RNA) skickas ut i cellen och fungerar som ritningar för proteiner som ribosomer kan bygga. Om man tänker sig en cells livscykel som ett år så är cellen största delen av året i den här aktiva perioden: tänk januari-november. Men när december kommer är det dags för en cell att gå in i sk. celldelning.

Celldelningen – mitosen – sker under en kort tid under cellens liv totalt sett. DNA-trådarna rullas ihop och generna blir svåra att komma åt och aktiviteten att skriva av gener går tillfälligt ner. När celldelningen är klar har det bildats två dotterceller.

När man tar en vitlöksklyfta, skalar den och placerar i vatten kommer celler i rotanlagan att aktiveras och efter en tid börjar de dela sig med vanlig celldelning: mitos.

Ett tag innan mitosfasen tar sin början kopieras hela arvs massan. För vitlök innebär det att varje cell som är redo för mitos innehåller 32 DNA-trådar. Alla 16 kromosomer har kopierats och hänger ihop som kopior i en punkt som kallas centromer. I centromeren kopplas det på proteintrådar som kan flytta och dra i DNA-trådarna. När DNA-molekylerna packats ihop blir de som tjocka korvar – det är härifrån begreppet kromosomer kommer: *chromos* för färg och *soma* för kropp.

Färgämnet orcein binder bra till DNA. Eftersom DNA-molekylerna har rullats ihop tätt så kommer vi se dem som tydligt färgade kroppar när vi tittar i mikroskop. Men vi ser dem inte på det viset i alla celler - kom ihåg – bara precis när det är dags för själva celldelningen. Därför måste man ha lite tur också i den här laborationen och lyckas ta en rotspets med många celler som var på väg in i mitosfasen när du knipsade av dem från vitlöksklyftan. Lycka till!





Groning av vitlösklyftor (2-3 dygn innan laboration):

Antingen gör din lärare detta, eller så får ni elever i uppgift att göra det själva i förväg. Skala lika många klyftor som du har elever/labbgupper så har du lite backup om vissa inte gro. Var extremt noga med att få bort alla torra skalrester. Det finns groningshämmande ämnen i det torra skalet som hindrar cellerna i rotanlaget att komma igång och dela sig. Placera dem med den platta delen nedåt i vatten. Ett enkelt sätt som gör att man inte behöver kontrollera att rötterna har vatten hela tiden är att ta något flytande material (skumplast t ex) och göra små hål och stoppa ned vitlösklyftorna i så flyter de ovanpå vätskeytan. Efter 1-3 dygn bildas rötter som är lämpliga att ta när de är 0.5-2 cm långa.



Vitlöksrötter av lämplig längd på en klyfta som fått gro i ca 40 timmar. Klyftan sattes i ett hål i en gammal innersula till en träningssko och flöt på vatten i en plastlåda.

Riskbedömning

Saltsyra är frätande. Skyddsglasögon och förkläde krävs under laborationen. Acetoorceinlösningen är måttligt frätande och starkt färgande. Akta kläderna! Använd handskar vid färgningsstegen. Var försiktig när skalpell och tunna objektglas används (risk för skärskada). Laborationen bedöms som icke riskfylld för elever med viss laborativvana.

Materiel och kemikalier

- Vitlösklyftor med rötter (ta minst 3-5 rötter)
- Macereringsvätska (saltsyra-HAc lösning) i liten petriskål med lock (ättika luktar!)
- Svart pappersbit (mörkt underlag att lägga under petriskålen och objektglas)
- Pincett och skalpell (knipsa rötter från klyftorna och sedan skära av rotspetsar)
- Handskar (till steg där färgningsvätskan används)
- Färgningsvätska aceto-orcein (droppflaska med droppipett)
- Objektglas (3-5 st), täckglas (3-5 st) och pappershandukar

Utförande

Uppmjukning av vävnaden

1. Ta med pincett av 3-5 rötter från vitlösklyftan
2. Placera rötterna i en liten petriskål med macereringsvätska (saltsyra-HAc lösning). Roten ska vara täckt av lösningen. Låt ligga i minst 15 minuter (gör inget om den ligger lång tid, jobba med mikroskopet på ett annat preparat under väntetiden).
3. Ställ petriskålen på mörkt underlag, det gör det enklare att se när rötterna blivit mjuka och vilken del som är själva rotspetsen. OBS rotspetsen bibehåller en vitgul kompakt struktur medan övriga celler blir mer genomskinliga. Den här uppmjukande behandlingen förstör cellmembranen och gör att färgämnet kan ta sig in i cellerna.

Färgning och squashning

OBS! Orcein färgar kromosomer och färgar även DIG - handskar behövs!

4. Ta upp roten med pincett och lägg på ett rent objektglas. Titta noga var du har spetsen. Använd skalpell och spara endast SPETSEN (1-2 mm av den gulvita spetsen). Peta undan övriga rotdelen.



5. Tillsätt en droppe orcein på rotspetsen. Hacka försiktigt med skalpellen så att rotspetsen i droppen med orceinet sönderdelas. Det kan upplevs svårt att hacka så små mängder, men det finns hundratals celler där, gör så gott du kan så går det oftast bra.
6. Låt färgen verka i ca 5 minuter. Medan du väntar kan du förbereda ett mikroskop. Du kan också ta upp en ny rotspets och förbereda ett preparat till (börja om på punkt 4 med en ny rot). Det är inte säkert att det första preparatet blir bra, smart med reserv på gång.
7. Lägg på ett täckglas (OBS tänk på att de tunna glasen är sköra, risk för att skära sig!)
8. Placera objektglaset (med täckglaset uppåt) på en dubbelvikt pappershandduk. Vik över papperet.
9. Lägg ett nytt objektglas ovanpå papperet mitt över objektglaset med roten på.
10. Squasha, dvs lägg ett tryck med tummen på det översta objektglasets mitt. Nu ska färglösningen tryckas ut och pappershandduken får en mörklilafärgad fyrkant (runtom täckglaset). Syftet med squashningen är att sprida ut cellerna till ett tunt lager.

Mikroskopstudier

Dag satt studera preparaten i mikroskop. Börja med lägsta förstoringen och gå upp till 400x (det är 10x förstoring i okularen där du tittar och tillsammans med 40x-objektivet blir det 400 gångers förstoring. Rita av eller fota med mobilkamera genom mikroskopets okular några celler som du studerat.

Som handledning till vad det är man kan se i mikroskopet kan man titta på bilder i läromedel, på nätet (sök exempelvis på mitos + microscope + allium så hittar du enkelt bra bilder) eller ta en titt på sista sidan.

Frågor att fundera på

- Varför skulle ni titta på cellerna från själva rotspetsen och inte resten av roten?
- En person får ett preparat där det är svårt att se en cell i taget, det är som om cellerna ligger huller om buller i tjocka lager. Vilket steg i metoden har inte fungerat som det ska?
- En person får ett preparat som är väldigt svagt rosafärgat, det går nästan inte att se ens cellkärnorna. Vilket/vilka moment i laborationen kan ha gått fel?
- En person som tittar i mikroskop ser bara avlånga celler med helt rosafärgade cellkärnor, inga verkar ha synliga kromosomer. Vad kan detta bero på?
- En person påstår att det är viktigt att man gör denna laboration och tar rötterna mellan klockan 8 och klockan 11 på dagen för att få se kromosomer. Personen lägger till att det inte blir lika bra resultat på eftermiddagen. Hur skulle en tänkbar biologisk förklaring kunna formuleras för att stödja ett sådant argument? Hur skulle man kunna göra en undersökning för att pröva om det stämmer?

Reflektera

- Vad lärde du dig av denna laboration?
- Har laborationen väckt några frågor?



Vad är det man kan se?

Cellmembran och cellvägg: det som avgränsar växtceller är både cellmembran (innerst) och cellvägg (utanpå). När man tittar i mikroskop så är det svårt att skilja dem åt – men du ser att cellerna har en viss form. Om man fått tag i själva rotspetsens celler så är cellerna som kvadrater. Om man fått med celler som är en bit från spetsen så är de mer avlånga som rektanglar (och de har slutat dela sig, de är istället inne i en fas av cellförlängning som också är en del av förklaringen till att rötter blir längre när de växer).

Cellkärna: dessa brukar vara lätta att hitta – rosa/lila-färgade cirklar inuti cellerna. De flesta celler du ser kommer inte vara i celldelningsfasen vi kallar mitos – de flesta celler kommer vara i sk. interfasa och då är DNA-molekylerna så utspridda att vi bara upplever det som en rosafärgad cirkel.

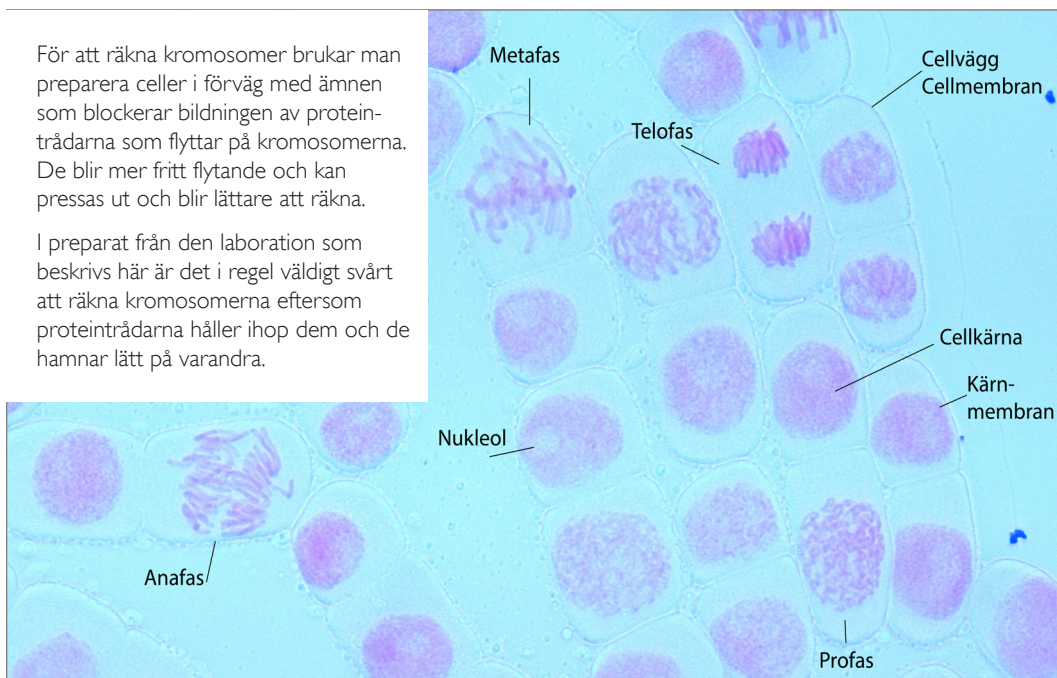
Kärnmembran: Det är själva membranet som håller ihop cellkärnan. Det är kärnmembranet som gör att cellkärnorna ser ut som klot/cirklar i de flesta cellerna. Men när det är dags för mitos så löses kärnmembranet upp och arvsmassan sprider ut sig mer i cellen.

Nukleol: i cellkärnorna som inte är i mitos utan har en mer jämnt rosa/lila färg syns ofta ljusare områden. Dessa kallas nukleoler och motsvarar områden där DNA används för att bilda stora mängder av rRNA som sedan bildar ribosomer (i de områdena blir det mindre rosa/lila färg eftersom DNA inte är så tätt packat där).

Kromosomer: om du har tur att se celler i mitos så är kromosomerna som tjockare korvar som ligger lite olika ordnade beroende på hur långt de kommit i skedet där kromosomerna ska delas upp i två celler. För att beskriva mitos har man namngett olika faser: profas, metafase, anafas, telofas och cytokines. Det är proteintrådar som drar och flyttar kromosomerna under mitos. De håller fast dem inom cellen (men cellkärnans membran löses upp under mitosen).

För att räkna kromosomer brukar man preparera celler i förväg med ämnen som blockerar bildningen av proteintrådar som flyttar på kromosomerna. De blir mer fritt flytande och kan pressas ut och blir lättare att räkna.

I preparat från den laboration som beskrivs här är det i regel väldigt svårt att räkna kromosomerna eftersom proteintrådar håller ihop dem och de hamnar lätt på varandra.



Det kan också vara bra att ha koll på hur luftbubblor och kanter mot luft i preparatet ser ut: skarpa svarta konturer:

