

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

**Gaismas mikroskopija kā kodolu – hloroplastu
mijiedarbības pētīšanas metode**

Kursa darbs

Autore: Daiga Krieviņa
Stud. apl. Nr. dk09005
Darba vadītājs: Dr. h. biol. Doc. Tūrs Selga

Rīga 2011

Saturs

SATURS	2
KOPSAVILKUMS	3
KOPSAVILKUMS	3
ABSTRACT	4
IEVADS	5
1. LITERATŪRAS APSKATS	6
1.1. MIKROSKOPIJA	6
1.1.1. <i>Gaismas mikroskopa darbības pamatprincipi</i>	6
1.1.2. <i>Gaismas mikroskopa optiskā sistēma</i>	7
1.1.3. <i>Fluorescentā mikroskopija</i>	11
1.1.4. <i>Lāzerskenējošā konfokālā mikroskopija</i>	14
1.2 TRĪS DIMENSIONĀLU ATTĒLU ANALĪZE	14
1.2.1 <i>Kvalitatīvā analīze</i>	15
1.2.2 <i>Kvantitatīvā metode</i>	15
1.3. KODOLA–HLOROPLASTU KOMPLEKSI.....	16
2. MATERIALI UN METODIKA	17
2.1 MIKROSKOPU PARAMETRISKIE RĀDĪTĀJI	17
2.2 AUGU MATERIĀLS.....	17
2.3 IZMANTOTĀ TEHNIKA UN BAROTNES	17
2.4 PREPARĀTU PAGATAVOŠANA	17
2.5 GAIŠĀ LAUKA MIKROSKOPIJA	18
2.6 KORELATĪVĀS MIKROSKOPIJAS METODE.....	19
2.7 LĀZERSKENĒJOŠĀ KONFOKĀLĀ MIKROSKOPIJA	19
2.7.1 <i>Darbs ar konfokālo lāzerskenējošo mikroskopu</i>	19
2.8 ATTĒLU ANALĪZE.....	21
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA	23
3.1 GAIŠĀ LAUKA MIKROSKOPIJA	23
3.2 KORELATĪVĀ MIKROSKOPIJA	24
3.3 LĀZERA KONFOKĀLĀ SKENĒJOŠĀ MIKROSKOPIJA, ATTĒLU ANALĪZES REZULTĀTI	25
SECINĀJUMI	31
PATEICĪBA	32
LITERATŪRAS SARAKSTS	33

Kopsavilkums

Izmantojot dažādus gaismas mikroskopijas veidus, var pētīt augu šūnu struktūras. Svarīgi ir noskaidrot šūnu organelļu savstarpējo novietojumu, jo tas dod iespēju spriest par šūnu organelļu funkcijām un nozīmi šūnas dzīves ciklā.

Darba mērķis bija noskaidrot, kurš no gaismas mikroskopijas veidiem – gaišā lauka mikroskopija, fluorescentā mikroskopija vai konfokālā lāzera mikroskopija – ir piemērotākais kodola un hloroplastu mijiedarbības pētīšanai. Lai to noskaidrotu, tika gatavoti tabakas lapas, kartupeļa bumbuļa un izolētu organelļu preparāti. Tie tika pētīti ar visiem iepriekš pieminētajiem gaismas mikroskopijas veidiem. Iegūtos attēlus analizēja ar divām programmām: *LCS Lite* un *WICF ImageJ*.

Darba gaitā tika noskaidrots, ka fluoroforu – GFP un hlorofila – ko lokalizācijas pētīšanai piemērotākais mikroskopijas veids ir lāzera konfokālā mikroskopija. Attēli, kas tika iegūti ar gaišā lauka mikroskopiju un fluorescento mikroskopiju, nedeva pilnīgu priekšstatu par organelļu uzbūvi. Telpiskie attēli, kas tika iegūti ar konfokālo lāzera mikroskopu, deva pilnīgāku vizuālo informāciju par fluorescējošo struktūru savstarpējo novietojumu, kā arī 3D attēlus varēja izmantot tālākai datu analīzei.

Darba laikā tika novērots, ka izolētos kodola – hloroplastu kompleksos GFP ir ko lokalizēts ar hlorofilu. Tā kā GFP šūnā ir lokalizēts kodola apvalkā, tad var secināt, ka kodols ir cieši saistīts ar hloroplastiem. Citā pētījumā ar propīdija jodīdu (PI) iekrāsoja kodola nukleīnskābes. Pēc apskates konfokālajā lāzera skenējošā mikroskopā varēja novērot, ka PI fluorescence pārklājās ar hlorofila fluorescenci. Tas liek domāt, ka hloroplasti ir cieši saistīti ne tikai ar kodola apvalku, bet arī ar kodola nukleoplazmu.

Darbs izstrādāts laika posmā no 2010. gada septembra līdz 2011. gada maijam.

Atslēgvārdi: gaismas mikroskopija, konfokālā lāzera skenējošā mikroskopija, fluorescentā mikroskopija, gaišā lauka mikroskopija, kodola – hloroplastu mijiedarbība.

Abstract

We can research plant cells structures with various light microscope modifications. Cells mutual location is important to know because it gives option to reason about organelles functions and meaning in cell life cycle.

Paper purpose was to know which light microscope modification – light microscope, fluorescent microscope or confocal microscope – is the best to research nuclear and chloroplasts interaction. So as to know it, tobacco leaf, potato parings and isolation organelles preparation were prepared. Those were researched with all light microscope modifications. Images were analysed with two programmes: *LCS Lite* and *WICF ImageJ*.

In work was established, that confocal microscope is the best microscope modification for GFP and chlorophyll co localization researchs. Light microscopy and fluorescence microscopy images did not give detailed concept about organelles formations. Confocal microscopy 3D images give detailed visual information about fluorescent structures mutual location and 3D images could be used for further data analysis.

In work was belated, that GFP and chlorophyll are co localization in isolated nuclear – chloroplasts complexes. GFP is localized in nuclear envelope. It means, that nucleus is tightly bound with chloroplasts. Other research nuclear nucleic acids were colored by propidium iodide. In confocal microscope propidium iodide fluorescence covered with chlorophyll fluorescence. It means, that chloroplasts are tightly bound not only nuclear envelope but with nucleus nucleoplasm, too.

Work was done in period from September 2010 to May 2011. gada 25. maijs

Key words: light microscopy, confocal microscopy, fluorescent microscopy, light microscopy, nuclear – chloroplasts interaction.

Ievads

Hloroplastos veidojas svarīgas biomolekulas – ogļhidrāti, proteīni, taukskābes, nukleīnskābes. Tie piedalās arī sēra un slāpekļa savienojumu veidošanā, askorbīnskābes un augu hormonu biosintēzē, kā arī citu sekundāro metabolītu veidošanas procesā. (Jung H. S. et al. 2009) Hloroplasti, izmantojot vienkāršas izejvielas (ūdeni, ogļskābo gāzi, neorganiskos elementus), ražo svarīgas produktus, kas ir izmantojami arī biotehnoloģijā.

Kamēr hloroplasti ir augu šūnā, sintezētās vielas tiek izmantotas šūnas un visa auga dzīvības procesu nodrošināšanai. Lai hloroplastu sintezētos produktus iegūtu, nepieciešamas tos izolēt no šūnas. Izolējot hloroplastu *in vitro*, to dzīvotspēja strauji samazinās. Līdz ar to tie kļūst nederīgi biotehnoloģiskām vajadzībām.

Vairāki autori – Selga T., Kwok E. Y., Hanson M – līdz šim ir novērojuši, ka hloroplasti šūnā var veidot fiziskus kontaktus ar kodolu. Šāds organellu stāvoklis varētu nodrošināt hloroplastu dzīvotspēju *in vitro*.

Hipotēze: Mehāniski apstrādājot tabakas lapas šūnas var izdalīt kodola – hloroplastu veidotus kompleksus.

Darba mērķis: apgūt gaismas mikroskopijas metodes, lai pētītu izolētu hloroplastu – kodolu veidoto kompleksu uzbūvi *in vivo* un *in vitro*.

Darba uzdevumi:

1. Analizēt pieejamo literatūru par dažādu gaismas mikroskopu uzbūvi un funkcijām, hloroplastu dzīvotspēju *in vitro*, iespējamo kodola – hloroplastu kontaktu.
2. Salīdzināt dažādos gaismas mikroskopijas veidus un izvērtēt to trūkumus un priekšrocības.
3. Novērot un izpētīt hloroplastu un kodola formu un savstarpējo novietojumu pēc mehāniskās apstrādes izmantojot iegūtos attēlus.
4. Veikt statistisku attēlu apstrādi programmās Leica Confocal Softwear Lite un WCIF ImageJ, lai noteiktu hloroplastu un kodolu mijiedarbību.
5. Izvērtēt gaismas mikroskopijas metodes ticamību
6. Noteikt piemērotāko metodi pētāmo objektu ko lokalizācijas noteikšanai.

1. Literatūras apskats

1.1. Mikroskopija

1.1.1. *Gaismas mikroskopa darbības pamatprincipi*

Gaismas mikroskops ir optiska ierīce, kurā, izmantojot gaismas viļņus, veidojās palielināts, reāls, apgriezts attēls, kas tiek projicēts uz acs tīkli vai citu attēlu veidojošu ierīci. Attēla veidošanā piedalās divas galvenās mikroskopa lēcu sistēmas – objektīvs un okulārs. (Murphy 2001)

Mehānisms, kādā gaismas viļņu kustība lēcu sistēmā veido attēlu, skaidrojama ar ģeometriskās optikas palīdzību. Vissenāk pazīstami ir gaišā lauka mikroskopi, kuros paraugs tiek apgaismots ar balto gaismu. (Abramowitz 2003)

Kvalitatīva attēla iegūšanu sākotnēji nodrošina labs apgaismojums. Tādu 1893. gadā izveidoja Augusts Koehlers. Izveidojot noteiktu mikroskopa lēcu sistēmu, kurā ietilpa kolektora lēca. Tas samazināja optisko atspīdumu no gaismas avota un nodrošināja vienmērīgu parauga izgaismojumu. (Murphy 2001)

Gaismas viļņi, pārejot no vienas vides citā, maina ātrumu. (Abramowitz 2003) Baltā gaisma sastāv no visu trīs pamatkrāsu gaismas viļņiem: zilās, zaļās un sarkanās krāsas gaismas. (Murphy 2001) Tā kā katras krāsas gaismas viļņi ir ar noteiktu garumu, tad atšķirīgi mainās to ātrums atšķirīgās vidēs un staru laušanas leņķis. Tas nozīmē, ka visas krāsas gaismas stari pēc iziešanas cauri lēcai nekrustojās vienā fokusā¹. Šis fakts ir hromatiskās aberācijas veidošanās pamatā. Hromatiskās aberācijas var atpazīt kā krāsainus oreolus ap objektiem. (Abramowitz 2003)

Eksistē arī sfēriskās aberācijas. Tās saistītas ar atšķirīgu gaismas staru noliekšanās leņķi dažādos attālumos no lēcas centrā. Gaismas stari, kas iet cauri lēcas centram ir paralēli un nenoliecās, bet gaismas stari lēcas perifērijā noliecās ļoti strauji. Rezultātā visi gaismas stari nekrustojās vienā fokusā, un tas ir iemesls, kādēļ redzes lauka malās ir neskaidrs attēls. (Murphy 2001) Lai novērstu dažāda veida aberācijas, tiek veidotas lēcu sistēmas. (Abramowitz 2003)

Attēla veidošanos gaismas mikroskopā nodrošina parauga spēja absorbēt gaismu, gaismas viļņu difrakcija un interference. (Lackie 2010) Difrakcija ir gaismas viļņu noliekšanās ap šķērslī. Difrakcija parasti izraisa interferenci. (Daintith 2009) Interference ir divu vai vairāku viļņu pārklāšanās. Konstruktīvā interference ir tad, kad viļņi pārklājas vienā fāzē. Pilnībā sakrīt gaismas viļņu virsotnes, tie summējās un veidojas gaiša interferences aina,

¹ Fokuss – punkts, kurā krustojās cauri optiskai sistēmai izgājušie gaismas staru kūļi. (Abramowitz 2003)

gaišs attēls. Viļņu pārklāšanos dažādās fāzēs, sauc par destruktīvo interferenci. (Halpern 1998) Interferences aina ir tumša. Šo mehānismu izmanto arī fāzu kontrastu mikroskopijā, kas ļauj pētīt ļoti gaišus un parastajā gaismas mikroskopijā nesaskatāmus, nekrāsotus, dzīvus objektus. (Alberts 1991)

Gaismas stariem virzoties cauri paraugam notiek selektīva baltās gaismas absorbcija, kas atkarīga no objekta krāsas un blīvuma. Šis process nodrošina krāsaina attēla iegūšanu. (Abramowitz 2003) Visas krāsas iedala pozitīvajās krāsās, kas veidojās dažādu viļņu garumu kombināciju rezultātā, un negatīvajās krāsās, kas rodas specifiskas, noteiktu viļņu garumu absorbcijas dēļ. (Murphy 2001)

Pasaulē ir daudzi mikroskopiski objekti, kas satur vairāk kā 70 % ūdens no sava svara. Šādos objektos gaismas staru absorbcija ir ļoti līdzīga kā apkārtējā vidē, tādēļ gaismas mikroskopā tos nav iespējams novērot. Tāpēc lieto speciālas organiskās krāsvielas, kas specifiski saistās ar noteiktām vielām šūnas iekšienē un maina to spēju absorbēt gaismu. (Alberts 1991)

1.1.2. Gaismas mikroskopa optiskā sistēma

Objektīvs

Objektīva galvenās funkcijas ir sakopot no parauga virzošos gaismas starus un projicēt uz okulāra lēcas precīzu, reālu, palielinātu, apgrieztu attēlu. Objektīva kvalitāti nosaka tā lēcu sistēma. (Murphy 2001) Atkarībā no tā, kā lēcu sistēma vada gaismas starus un cik lielā mērā novērš dažādas aberācijas, objektīvi tiek iedalīti vairākās grupās. (Davidson 1999)

Ahromātiskie objektīvi samazina sarkanās un zilās gaismas hromatiskās aberācijas. (Abramowitz 2003). Tas skaidrojams ar objektīva lēcu sistēmas spēju apvienotu vienā fokusā zilās gaismas viļņus ar garumu 486 nm un sarkanās gaismas viļņus ar garumu 656 nm. (Murphy 2001) Tā kā objektīvs neveic zaļās gaismas hromatisko aberāciju, apkārt attēlam var veidoties zaļš oreols. (Davidson 1999) Objektīvs izlīdzina dzeltenī zaļās gaismas sfēriskās aberācijas. Lēcu sistēma ir piemērota, lai skatītos objektu maksimums 30 – 40 reižu lielā palielinājumā. (Murphy 2001) Lai iegūtu labākas kvalitātes attēlu, jālieto zaļās gaismas filtri un fotomikrogrāfijā ieteicams veidot melnbaltu attēlu. (Abramowitz 2003)

Labākas kvalitātes ir fluorīda jeb semi-apohromātiskais objektīvs. Tā lēcas satur dabīgo vai sintētisko fluorīdu. (Abramowitz 2003) Fluora materiāli samazina krāsu izkliedi (Murphy 2001) un labāk novērš optiskās aberācijas. (Davidson 1999) Fluorīda objektīvs novērš zilās un sarkanās gaismas hromatiskās aberācijas, kā arī zilās un zaļās gaismas sfēriskās aberācijas. Semi-apohromātiskais objektīvs ir piemērots fotomikrogrāfijai baltās gaismas spektrā (gaišā lauka mikroskopijā). (Abramowitz 2003) Salīdzinot ar ahromātisko objektīvu, šim ir daudz

augstāka izšķirtspēja (Davidson 1999) un tā maksimālā skaitliskā aperatūra ir 1,3. (Murphy 2001)

Vislabākais ir apohromātiskais objektīvs. (Abramowitz 2003) Tie var sastāvēt pat no 12 dažādām lēcām. (Murphy 2001) Tas veic četru krāsu – tumši zilas, zilas, zaļas un sarkanas – hromatiskās aberācijas, kā arī trīs krāsu – tumši zilas, zilas un zaļas – sfēriskās aberācijas. Apohromātiskie objektīvi nodrošina vislielāko palielinājumu un skaitlisko aperatūru.

Visi iepriekš apskatītie objektīvi nodrošina pietiekami labu palielinājumu, bet to veidotie attēli ir izliekti. Tādēļ ir izveidoti objektīvi, kas nodrošina plakana attēla iegūšanu. Tos iedala līdzīgi kā iepriekš apskatītos objektīvu tipus: planārais ahromātiskais objektīvs, planārais semi-apohromātiskais objektīvs un planārais apohromātiskais objektīvs. (Abramowitz 2003) Vislabāko attēla kvalitāti var panākt ar planāro apohromātisko objektīvu, kura skaitliskā aperatūra ir 1,4. To parasti lieto fluorescentajā mikroskopijā, jo šādi objektīvi nodrošina ultravioletās gaismas staru caurlaidību. (Murphy 2001)

Visus objektīvus iedala divās lielās grupās – sausie un imersijas objektīvi. Sausā tipa objektīvos starp objektīva frontālo lēcu un segstikliņa augšējo virsmu atrodas gaiss, bet imersijas objektīvos starp objektīva lēcu un priekšmetstikliņu ir ievietota kāda vide ar lielāku gaismas laušanas koeficientu. (Abramowitz 2003)

Uz objektīva korpusa parasti ir norādīti visi svarīgākie objektīvu raksturojošie parametri: objektīva ražotājs, objektīva veids atkarībā no optiskās korekcijas, palielinājums, skaitliskā aperatūra, imersijas vide, tubusa garums, segstikla biezums, kā arī var būt norādīta speciāla informācija par dažādiem optiskiem rekvizītiem, un attālums starp objektīva frontālo lēcu un segstikla augšējo virsmu. (Davidson 1999)

Objektīva palielinājums

Objektīva palielinājums ir skaitlisks lielums, kas norāda, cik reizes objektīvs palielinās patieso objektu, bet tas nenorāda mikroskopa kopējo palielinājumu. Mikroskopa palielinājumu iegūst sareizinot objektīva un okulāra palielinājumus.

Strādājot ar neliela palielinājuma objektīviem, starp objektīva lēcu un segstikliņu ir gaiss, bet izmantojot 100x palielinājumu tiek lietota noteikta imersijas vide. Katrs objektīvs ir piemērots noteikta veida imersijas vielai, kas tiek norādīta uz objektīva ar noteiktiem simboliem un krāsas kodu. (Abramowitz 2003)

Skaitliskā aperatūra

Skaitliskā aperatūra ir skaitlisks lielums, kas raksturo leņķi, kādā gaismas stari krīt uz objektu. (Davidson 1999) Skaitlisko aperatūru (N.A.) aprēķina pēc formulas: $N.A. = n \cdot \sin\alpha$, kur n – gaismas laušanas koeficients videi, kas atrodas starp segstikliņa virsmu un okulāra frontālo lēcu, α – $1/2$ no leņķiskās aperatūras. (Abramowitz 2003) Ja starp priekšmeta stikliņu

un objektīva frontālo lēcu ir gaiss, maksimālā N.A. = 1, jo gaismas laušanas koeficients ir 1 un $\alpha < 90^0$. (Alberts 1991)

Ievietojot starp segstikliņu objektīva lēcu imersijas vidi ar lielāku gaismas laušanas koeficientu, var palielināt objektīva skaitlisko aperatūru. Visbiežāk lieto imersijas eļļu.

Skaitliskā aperatūra ietekmē objektīva izšķirtspēju un redzes lauka dziļumu. Jo lielāka ir skaitliskā aperatūra, jo lielāka ir objektīva izšķirtspēja. Skaitliskā aperatūra svārstās no 0,04 līdz 1,4 plan-apohromātiskajiem objektīviem. (Abramowitz 2003) Pielietojot eļļas imersijas plan – apohromātiskos objektīvus var sasniegt skaitlisko aperatūru 1,5. Dažiem objektīviem, kas tiek lietoti fluorescentajā mikroskopijā, objektīvā ir iemontēta īrisa diafragma, kas palielina skaitlisko aperatūru. Uz šādiem objektīviem ir norādīts speciāls marķējums – *I, Iris* vai *W/Iris*. (Davidson 1999)

Izšķirtspēja

Izšķirtspēja ir skaitlisks lielums, kas norāda mazāko attālumu, kādā var saskatīt divus punktus un tie nesaplūst vienā objektā. Skaitliski izšķirtspēja ir atkarīga no absorbētās gaismas viļņa garuma un skaitliskās aperatūras. (Abramowitz 2003)

Laterālo izšķirtspēju objekta plaknē pa „xy” asi nosaka difrakcijas aina. Tās rezultātā ap gaismas punktu veidojās izplūduši, gaiši riņķi (*Airy disks*), kas samazina izšķirtspēju. (Spring *et al.* 1997. cit. pēc Claxton *et al.* 2006) Matemātiski izšķirtspēju (d) pa „xy” asi aprēķina:

$$d = \frac{0,61\lambda}{N.A.}, \text{ kur } \lambda - \text{absorbētās gaismas viļņa garums, N.A.} - \text{skaitliskā aperatūra.}$$

(Abramowitz 2003) Jo skaitliskais lielums d mazāks, jo izšķirtspēja ir augstāka. (Wallace 2010)

Izšķirtspēju pa objektīva „z” asi, kas ir perpendikulāra parauga „xy” asīm, aprēķina pēc formulas: $d = 2\lambda\eta/(N.A.)^2$, kur η – gaismas laušanas koeficients imersijas videi. Izmaiņas formulā nosaka fakts, ka difrakcijas aina pa objektīva asi nav sfēriska, bet ovāla. (Wallace 2010)

Teorētiski mazākais objekts, ko var apskatīt gaismas mikroskopā, kad gaismas viļņa garuma 488 nm un N.A.= 1,4, ir 0,2 mikrometrus liels pa „xy” asi un 0,4 mikrometrus pa „z” asi. (Murphy 2001) Tas saistīts ar to, ka īsākais redzamās gaismas viļņa garums ir ~ 0,4 mikrometri, bet praktiski lielākā skaitliskā aperatūra - 1,4. (Albert 1991)

Praktiski izšķirtspēja ir mazāka. Atkarībā no palielinājuma, skaitliskās aperatūras un imersijas vides, fokālās plaknes dziļums ir variabls lielums (1. tabula).

Redzes lauka dziļums atkarībā no palielinājuma un skaitliskās aperatūras. (Spring K. R. 2010)

TABLE 1.

Depth of Field versus Magnification and Numerical Aperature. (Spring K. R. 2010)

Magnification Palielinājums	Numerical aperature Skaitliskā aperastūra	Depth of field (μm) Redzes lauka dziļums (μm)
4 x	0,10	15,5
10 x	0,25	8,5
20 x	0,40	5,8
40 x	0,65	1,0
60 x	0,85	0,40
100 x	0,95	0,19

Objektīviem ar lielu skaitlisko aperatūru un palielinājumu ir salīdzinoši neliels fokusa dziļums. Tas būtiski samazina spēju ar mikroskopijas palīdzību pētīt mikroskopiskus, telpiskus objektus. Piemēram, pētīt hromosomu novietojumu mitozē ar parasto gaismas mikroskopu ir ļoti grūti, jo hromosomu izmērs pārsniedz fokālās plaknes dziļumu, tādējādi vienā optiskā griezumā nevar saskatīt visu hromosomu un noteikt to formu. (Czepulkowski 10/2000)

Okulārs

Okulārs darbojās kā lupa, kas sakopo gaismas starus, kas nāk no objektīva un veido reālu palielinātu attēlu. (Abramowitz 2003) Okulāru parasti kombinē ar objektīvu, lai panāktu lielāku kopējo attēla palielinājumu. (Davidson 1999)

Atkarībā no lēcu un diafragmas savstarpējā novietojuma, okulārus iedala divās grupās: Ramsden (pozitīvā) tipa un Huygenia (negatīvā) tipa okulāri.

Ramsden tipa okulāros lēcu sistēma ir savienota vienotā sistēmā un atrodas virs okulāra fiksētās diafragmas. Tas ļauj mainīt attālumu starp lēcām un diafragmu tā, lai projicētais attēls sakristu ar lēcas fokusu. Šī tipa okulāri ir piemēroti labas kvalitātes objektīviem.

Huygenia tipa okulāri parasti ir vecāku tipu mikroskopiem. Šiem okulāriem okulāra fiksētā diafragma atrodas starp divām lēcām. Diafragma veido atvērumsu, kuru var saskatīt skatoties mikroskopā. (Abramowitz 2003) Negatīvā tipa okulārus parasti lieto kopā ar ahromātiskajiem objektīviem, kam palielinājums ir no piecām līdz 40 reizēm. (Davidson 1999)

Izvēloties okulāru, svarīgi ir divi parametri – palielinājums, kas norādīts uz okulāra korpusa, un redzes lauka diametrs, kas svārstās no 18 mm – 26,5 mm. Redzes lauka diametru

nosaka okulāra fiksētās diafragmas atvērums. (Abramowitz 2003) Okulāra palielinājums parasti ir no piecām līdz 25 reizēm. (Davidsons 1999)

Kondensors

Kondensors atrodas virs apgaismojuma lampas zem objekta. (Abramowitz 2003) Kondensors sakopo gaismas starus, kas nāk no apgaismojuma avota, un paralēli virza uz objektu tā, lai tas visās vietās tiktu apgaismots ar vienādu intensitāti. (Davidson 1999)

Kondensorus iedala vairākās grupās atkarībā no korekcijas pakāpes. Vienkāršākais un lētākais ir Abbe tipa divu lēcu kondensors. Izmantojot spilgtu gaismu, kondensors nemazina sfēriskās un hromatiskās aberācijas, tādēļ ir piemērots mikroskopiem, kam ir neliela skaitliskā apertūra un korekcijas iespējas. Ar šāda tipa aprīkojumu nevar veikt augstas kvalitātes pētījumus. (Abramowitz 2003)

Ahromātiskais kondensors samazina hromatiskās aberācijas. Tā skaitliskā apertūra ir 0,95. Lieto sausā tipa objektīviem. Var lietot gan melnbaltu, gan krāsainu attēlu veidošanai.

Aplanātiskais kondensors samazina sfēriskās aberācijas zaļās gaismas viļņu diapazonā. Nemazina hromatiskās aberācijas, tādēļ vislabākos attēlus var iegūt pielietojot melnbalto fotomikrogrāfiju. (Davidson 1999)

Vislabākais ir aplanātiskais – ahromātiskais kondensors. Tas ir piemērots augstas kvalitātes pētījumiem, jo nodrošina gan sfērisko, gan hromatisko aberāciju korekcijas. Uz šī tipa kondensora būs norādīts gan tā korekcija, gan skaitliskā apertūra.

Liela nozīme kondensora darbības principos ir ģirisa diafragmai. Tā atrodas zem kondensora vai ir iemontēta korpusā. (Abramowitz 2003) Mainot ģirisa diafragmas atvērumu, maina gaismas staru kvantu daudzumu, kas nokļūst kondensora lēcu sistēmā un tālāk caur paraugu nonāk objektīvā. Ģirisa Diafragma nodrošina attēla kontrastu un redzes lauka dziļumu. (Davidson 1999)

Kondensora izvēle ir cieši saistīta ar objektīva kvalitāti. Ja lieto objektīvus, kuru palielinājums ir līdz četrām reizēm, tad ir jānoskrūvē kondensora augšējā lēca vai arī jālieto kondensors ar flip-top lēcām. Ir pieejami arī speciāli kondensori, kas paredzēti nelielu palielinājumu objektīviem, fāzu kontrastu mikroskopijai, tumšā lauka mikroskopijai, polarizētās gaismas mikroskopijai un interferences mikroskopijai. (Abramowitz 2003)

1.1.3. Fluorescentā mikroskopija

Fluorescentais mikroskops ir gaismas mikroskops, kurā reģistrē monohromatisku gaismas viļņu ierosinātu parauga fotoluminiscenci. Parasti tiek lietota ultravioletā gaisma, kas izraisa gaismas viļņu emisiju redzamās gaismas spektrā. (Murphy 2001)

Eksistē divas fluorescentās mikroskopijas metodes. Caurstarotās gaismas fluorescences mikroskopijā paraugs tiek apstarots cauri kondensora lēcai, un emitētie gaismas viļņi nonāk

objektīvā. Gaismas stari neiet cauri emisijas filtram, tādēļ veidojas liels fona signāls. (Albani, *et al.* 2008) Epi – fluorescentes mikroskopijā paraugs tiek apstarots cauri objektīvam ar noteikta garuma gaismas viļņiem. (Lackie 2010) To nodrošina izejošais filtrs un emisijas filtrs. (Albani, *et al.* 2008)

Ar fluorescentās mikroskopijas palīdzību var pētīt tikai tās parauga daļas, kas spēj luminiscēt noteiktā viļņa garuma diapozonā. Fluorescenci nodrošina molekulas, kas absorbē īsākus, bet emitēt garākus gaismas viļņus. (Alberts 1991) Šāda īpašība piemīt fluoroforiem (Tsien 2005) jeb fluorohromiem (Davidsons 1999) Fluorofori ir atomu grupas vielas molekulā, kas spēj absorbēt gaismas viļņu enerģiju un vēlāk to izdalīt fluorescences veidā. (Cammack *et al.* 2008) Molekulu luminiscenci sauc par sekundāro fluorescenci. (Davidson 1999) Fluorofori specifiski saistās ar bioloģiskajām makromolekulām un tādā veidā norāda uz to atrašanās vietu. Plaši pazīstami fluorofori ir propīdija jodīds, rodamīns, zaļais fluorescentais proteīns (GFP), fikobiliproteīns. (Tsien 2005) Propīdija jodīds krāso nedzīvu šūnu nukleīnskābes un emitē oranžas krāsas gaismas starus. (Patel 10/2000) Propīdija jodīda absorbcijas maksimums ir 340 nm, bet emisijas maksimums 600 nm līdz 610 nm. (Czepulkowski 10/2000) Zinātniskos pētījumos plaši pielieto GFP. (Stephens, Allan 2003) GFP šūnā lokalizēts pie plazmatiskās membrānas, endoplazmatiskajā tīklā, cieši pie kodola, kā arī kodoliņos. GFP absorbcijas maksimums ir 488 nm, bet emitētās gaismas max - 507 nm. (Cutler 1999)

Svarīga ir autofluorescence. (Tsien 2005) Autofluorescence ir parādība, kad dažas vielas spēj fluorescēt nepiesaistot fluoroflorus. (Lackie 2010) Šīs vielas dēvē arī par endogēniem fluoroforiem. Kā labu endogēnā fluorofora piemēru var minēt hlorofilu a, kam gaismas absorbcijas maksimumi ir pie 440 nm un 660 nm, un hlorofilu b, kas absorbē gaismas viļņus pie 640 nm un 460 nm. Hlorofilam raksturīga emisija ir pie 660 nm līdz 678 nm. (Vikmane 2011) Pie endogēniem fluoroforiem pieskaita arī reducētos piridīna nukleotīdus – NADH un NADPH – , kas absorbē ultravioletās gaismas viļņus. (Tsien 2005) Autofluorescence var sagādāt grūtības strādājot ar fluorescento mikroskopu, jo endogēnie fluorofori emitē tādas pašas gaismas viļņus kā fluorofori, kas lietoti kā fluorescentās krāsvielas. (Lackie 2010) Zinātniskos pētījumos plaši pielieto zaļo fluorescento proteīnu (GFP). (Stephens, Allan 2003) Visbiežāk izmanto GFP, kura absorbcijas maksimums ir 488 nm, bet emitētās gaismas max - 507 nm. (Cutler 1999)

Emitētie gaismas viļņi virzās cauri objektīvam uz otru optisko filtru, kas nodrošina tikai emitēto gaismas viļņu caurlaidību. Tas nodrošina spožs attēla veidošanos uz melna fona. (Yu *et al.* 2006)

Kā fluorescentās mikroskopijas priekšrocības var minēt precīzus olbaltumvielu lokalizācijas, jonu koncentrācijas un citu vielu pētījumus dzīvās šūnās. (Yu *et al.* 2006) Dzīvu šūnu pētījumi dod iespēju pētīt proteīnu un olbaltumvielu ietekmi uz šūnas augšanu un attīstību, iekšējas regulācijas procesiem. (Stephens, Allan 2003) Izmantojot ultravioleto gaismu, dzīvas šūnas ātri iet bojā. Tas saistīts ar to, ka īsi gaismas viļņi satur lielu enerģiju, kas sarauj kovalentās saites un veido brīvos radikāļus. Tie savukārt denaturē bioloģiskās makromolekulas. (Murphy 2001) Lai paildzinātu un stabilizētu šūnu dzīvotspēju, jānodrošina konstanta temperatūra, mitrums un oglekļa (IV) oksīda daudzums. Katram šūnu tipam minētie parametri ir savādāki.

Galvenokārt, lai pēc iespējas ilgāk saglabātu šūnu dzīvotspēju, jāsamazina apgaismojuma ilgums un intensitāte. Tādēļ nepieciešams jaudīgs detektors, kas spēj reģistrēt zemāku fluorescenci. Samazinot skābekļa piekļuvi šūnām, var samazināt radikāļu veidošanos šūnās. (Stephens, Allan 2003)

Fluorescentā mikroskopija ir piemērota arī nelielu fluorescējošo molekulu identifikācijai, jo spēj detektēt ļoti nelielus vielas daudzumus - 50 molekulas uz vienu kubikmikrometru. (Davidson 1999)

Izmantojot fluorescento mikroskopiju, var apskatīt optiskos griezumus, kas ir 50 vai vairāk mikrometrus biezi. (Sandison *et al.* 1994 cit. pēc Claxton *et al.* 2006)

Kā trūkumus var minēt limitētu izšķirtspēju, kas parasti ir 0,25 mikrometri pa „xy” asi un 0,4 mikrometri pa „z” asi, ja skaitliskā apertūra 1,4, un, apstarojot objektu ar augstas enerģijas gaismas viļņiem, ar laiku iestājas fotobalošana – fluorofori pakāpeniski gaismas staru enerģijas iedarbības rezultātā zaudē spēju fluorescēt. (Yu *et al.* 2006) Ja paraugs ir biezāks par diviem mikrometriem (Lichtmann 1994 cit. pēc Claxton *et al.* 2006), tad sekundārā fluorescences, kas veidojās no objekta emitētajiem gaismas viļņiem, bieži veido trokšņus un samazina izšķirtspēju. Tas veido maldīgu fokālo plakni². (Wilson 1989 cit. pēc Claxton *et al.* 2006) Izšķirtspēju un attēla kontrastu mazina arī cauri objektam plūstošais gaismas stars, kas ir nepietiekami sakoncentrēts. Okulārā vai detektorā nonāk arī gaismas stari no fona. Tie veido attēla neprecizitātes. (Wright 2002 cit. pēc Claxton *et al.* 2006)

Bioloģisku objektu pētījumos svarīga ir telpisku (3D) attēlu rekonstrukcija. Telpiskus attēlus var iegūt ar optiskiem skeneriem. Ar programmas palīdzību, pakāpeniski skenējot paraugu, iegūst telpisko informāciju skaitliska koda veidā. Pārveidojot kodēto informāciju, veido 3D attēlu. Šāda telpisku attēlu iegūšana ir kvalitatīva, bet ļoti dārga un grūti pieejama. (Chiari Y. *et al.* 2008)

² Fokālā plakne – vertikāla plakne, kurā atrodas fokālais punkts. (Abramowitz 2003)

Telpiskus mikroskopisku objektu attēlus var iegūt izmantojot parasto gaismas mikroskopu un digitālo kameru. Veidojot vairākus secīgus objekta attēlus pie dažādiem fokusa dziļumiem, iegūst secīgu attēlu sistēmu. Attēlus apstrādājot attiecīgās datorprogrammās iegūst telpiskus objekta rekonstrukciju. (Niederöst *et al.* 2003)

1.1.4. Lāzerskenējošā konfokālā mikroskopija

Lāzerskenējošā konfokālā mikroskopija ir mūsdienu kvalitatīvākais optiskās mikroskopijas veids. Izmantojot konfokālo mikroskopiju, var apskatīt dzīvus un fiksētus paraugus līdz pat 100 mikrometru biezumam.

Konfokālajā mikroskopijā salīdzinot ar caurstarojošās gaismas mikroskopiju var regulēt redzes lauka dziļumu, samazināt vai pilnībā novērst fona ietekmi uz redzamo attēlu, kā arī veidot bieža parauga optisko griezumu sērijas. (Claxton *et al.* 2006) Optisko griezumu biezums svārstās no 0,5 – 1,5 mikrometriem. (Sandison 1994 cit. pēc Claxton *et al.* 2006) Redzes lauka dziļumu nosaka gaismas signāla un fonu trokšņu attiecība, kā arī fona intensitāte. (Guthoff *et al.* 2009)

Salīdzinot attēlus, kas iegūti ar tradicionālo fluorescējošo mikroskopiju un konfokālo mikroskopiju, tie ir daudz kvalitatīvāki. (Wilson 1989 cit. pēc Claxton *et al.* 2006)

Lāzers emitē gaismas starus, kas cauri gaismas avota pinhola atvēršanai nonāk uz parauga un izraisa parauga gaismas emisiju. Emitētie gaismas stari cauri objektīvam, dihromātiskajam spogulim un detektora pinhola atvēršanai nonāk detektorā, kurā tiek uztverts fotonu raidītais signāls un pārveidots elektriskajā signālā. (Stelzer 2000) (1. pielikums)

Paraugu tiek skenēti paralēli optiskajai asij (z ass) un horizontālajā plaknē (x un y ass). (Lichtmann 1994 cit. pēc Claxton *et al.* 2006) Mikroskops ir iestādīts tā, lai detektors uztver gaismas starus tikai no fokālās plaknes. (Guthoff *et al.* 2009)

Attēla kvalitāti nosaka vairāki konfokālā mikroskopa aparatūras iestatījumi: lāzera stara līnija un intensitāte, skenēšanas ātrums, sprieguma lielums, pinhola atvērums, attēla tuvinājums, emitētās gaismas reģistrācijas diapozons.

1.2 Trīs dimensionālu attēlu analīze

Attēlus, kas veidoti ar konfokālo lāzera skenējošo mikroskopu, var analizēt izmantojot fluorescences intensitāti. Lai attēlu analīze ir kvalitatīva, ir jāievēro tas, ka uzlabojot attēla kvalitāti pēc tā izgatavošanas, var mainīties iegūtie rezultāti. Attēlu analīzei vispiemērotākie ir nepārveidoti attēli.

Attēlu analīzi var veikt ar kvalitatīvām un kvantitatīvām metodēm.

1.2.1 Kvalitatīvā analīze

Visvieglākā metode, kā noteikt divu krāsas kanālu ko lokalizāciju, ir vizuāls novērtējums. Vietā, kur saplūdis sarkanās un zaļās krāsas kanāli, veidosies dzeltenas krāsas pikseļi. Šī metode ir ļoti vienkārša, bet jutīga pret attēlu kvalitātes uzlabojumiem. Tā iemesla dēļ, kvalitatīvās ko lokalizācijas noteikšanas metodes ir ieteicams papildināt ar kvantitatīvajām metodēm. (Collins T. 2006)

1.2.2 Kvantitatīvā metode

Kvantitatīvās analīzes metodes ir ļoti daudzveidīgas. Mūsdienās tās parasti veic ar pielāgotām datora programmām, kuras balstās uz matemātisko algoritmu bāzes. Bieži pielietotas metodes ir *Scatter plot* (iegūst krāsu kanālu sadalījuma grafiku), Pīrsona kritērija koeficienta (R_r) noteikšana, daļēji nosedzošais koeficients (*overlap coefficient*) katram krāsas kanālam atsevišķi (k_1 , k_2) un summāri (R), ko lokalizācijas koeficients katram krāsas kanālam (M_1 , M_2), intensitātes korelācijas koeficients (ICQ). (Smallcombe A. 2001) Vizualizēt fluorescences intensitātes mērījumus un veikt aprēķinu var izmantojot dažādas programmas, piemēram, ImageJ. (Collins T. 2006)

Pīrsona korelācijas koeficients ir rādītājs, ar kura palīdzību kvantificē korelācijas daudzumu balstoties uz fluorescences intensitāti. Pīrsona koeficients svārstās no viens līdz mīnuss viens. Viens atbilst pilnīgai ko lokalizācijai, bet mīnuss viens – ko lokalizācija nav novērojama. Nulle atbilst nejaušai ko lokalizācijai. Negatīvas Pīrsona korelācijas koeficienta vērtības nav adekvāti vērtēt. Pīrsona koeficientu aprēķina pēc formulas, balstoties uz divu krāsas kanālu fluorescences intensitāti.

Summārais daļēji nosedzošais koeficients svārstās no nulles līdz viens. Viens norāda uz pilnīgu ko lokalizāciju, bet nulle – ko lokalizācija nav novērojama. Nosaka tad, ja pikseļu skaita attiecība abos krāsu kanālos ir ~ 1 .

Daļēji nosedzošais koeficients katram krāsas kanālam atsevišķi ir ļoti jutīgs uz parauga balošanu un atšķirīgu fluorescences intensitāti.

Ko lokalizācijas koeficienti nosaka, kādā mērā viens krāsu kanāls pārsedz otru krāsas kanālu. Šī metode ir ļoti jutīga uz fona korekcijām, tādēļ izmantojama attēliem, kur fons bez pārveidojumiem ir augstas kvalitātes.

Intensitātes korelācijas koeficients norāda vai krāsas kanālu fluorescences intensitātes mainās sinhroni vai asinhroni. Sinhroni mainīga intensitāte norāda uz ciešu ko lokalizāciju, un koeficienta vērtība ir no nulles līdz pluss 0,5. Asinhroni mainīga intensitāte norāda uz ko

lokālizācijas neesamību, un koeficienta vērtība svārstās no mīnusa 0,5 līdz nullei. (Smallcombe A. 2001)

1.3. Kodola– hloroplastu kompleksi

Šūnas kodolam un hloroplastiem ir pierādīts ciešs funkcionālais kontakts. Plastīdu genoms spēj sintezēt tikai apmēram 100 proteīnus, bet pārējos proteīnus kodē kodola genoms. Plastīdu genoms ietekmē arī kodola genoma funkcijas, tādēļ starp kodolu un plastīdām pastāv abpusējs vielu un signālu transports. (Jung H. S. *et al.* 2009) Piemēram, augos svarīgu fotosintēzes fermentu RUBISCO veido lielā subvienība, kuras proteīnus kodē plastīdas DNS, un mazā subvienība, kuras proteīnus kodē kodola DNS. Tas ir pierādījums, ka plastīdas ir atkarīgas no kodola. (Bell *et al.* 09/2000) Izolēti hloroplasti nespēj producēt saharozi, jo tiem trūkst svarīgi gēni, kas nepieciešami sintēzes procesā. (Edwards, Walker 1983 cit. pēc Archer *et al.* 05/2004)

Starp šūnas orgānoīdiem var novērot arī fizisku kontaktu. Augstāko augu tabakas (*Nicotiana tabacum*) un *Arabidopsis thaliana* šūnās hloroplastu stromules – hloroplastu membrānu izaugumi, kas pildīti ar stromu – saplūst ar kodola ārējo membrānu. Šāds orgānellu fizisks kontakts nodrošina efektīvāku metabolismu. (Kwok *et al.* 2004) Augu šūnās hloroplastu – kodolu kompleksi ir sastopami dažāda vecuma šūnās. Tas liek domāt, ka augstāko augu šūnās kompleksi ir ilgstoši un noturīgi veidojumi. (Selga *et al.* 2010) Līdzīgas struktūras bija novērojis jau Pssingham 1980. gadā.

Gaismas mikroskopā var novērot, ka hloroplasti var saskarties ar kodola membrānu, būt savienoti ar to vai iegrimt kodola ārējā apvalkā. Apskatot hloroplastu – kodolu kompleksus skenējošā elektronu mikroskopā, var redzēt struktūras, kas savieno kodolu ar hloroplastiem. Izolēti kodola – hloroplastu kompleksi saglabāja fluorescenci dažas nedēļas. Tas varētu liecināt, ka kodola – hloroplastu kompleksi ir neatkarīgas šūnas sastāvdaļas. (Selga *et al.* 2010)

2. Materiāli un metodika

2.1 Mikroskopu parametriskie rādītāji.

Viens no galvenajiem parametriskajiem rādītājiem ir mikroskopa izšķirtspēja. To aprēķināja pēc formulām:

$$d = \frac{0,61\lambda}{N.A.}, \lambda - \text{absorbētās gaismas viļņu garums, NA} - \text{skaitliskā apertūra, } d -$$

izšķirtspēja pa „xy” asi;

$d_1 = 2\lambda\eta/(N.A.)^2$, η – gaismas laušanas koeficients imersijas videi (imersijas eļļai $\eta = 1,4$).

Lai aprēķinātu precīzu mikroskopa izšķirtspēju, bija nepieciešams zināt precīzu ierosinātās gaismas viļņa garumu. Tā iemesla dēļ parametra rādītāju aprēķināja *Leica DM RA-2* mikroskopam pa „xy” asi un „z” asi. Iegūtos datus apkopoja tabulā.

2.2 Augu materiāls

Tabaka (*Nicotiana tabaccum L.*), kurā ekspresēts zaļais fluorescentais proteīns (GFP).

Kartupeļa bumbuļi.

2.3 Izmantotā tehnika un barotne

1. Gaismas mikroskopas *Leica DM 2000* ar *HCX PL FLUOTAR 100x/1,30 OIL* objektīvu un *HC PLAN 10x/22* okulāru.

2. Konfokālais lāzera skenējošais mikroskops *Leica DM RA-2*.

3. Centrifūga *EPPENDORF „Mini Spin”*, Vācija

4. Vortekss *BIOSAN*, Latvija.

5. Fotoaparāts *Canon Power Shot S70*

6. MS barotne

2.4 Preparātu pagatavošana

Veselas lapas preparāta pagatavošana mikroskopijai

Izvēlējās nobriedušu tabakas lapu no auga apikālās daļas. Ar žiletas palīdzību no lapas plātnes daļas, kurā nav galvenās lapas dzīslas, izgriezta fragmentu 10 mm x 5 mm. Objektu novietoja uz priekšmeta stikliņa ūdens pilienā un pārklāja ar segstikliņu. Lai samazinātu preparāta žūšanas ātrumu un nodrošinātu ūdens neiekļūšanu lāzera konfokālā mikroskopa objektīvā, segstikla malas pārklāja ar līmlenti. Pēc nepieciešamības ar pipeti papildināja ūdeni zem segstikla. Visam paraugam bija jābūt ūdenī un zem segstikla nevajadzēja būt gaisa burbuļiem. Apskatot preparātu lāzera konfokālajā mikroskopā 100 x lielā palielinājumā, lietoja imersijas eļļu.

Izolētu hloroplastu – kodolu kompleksu preparāta pagatavošana mikroskopijai

Nobriedušu tabakas lapu novietoja uz gludas virsmas tā, lai apakšējā epiderma būtu vērsta uz augšu. Izvēlējās lapas segmentus, kuros nav galvenās lapas dzīslas. Ar skalpeļa palīdzību noņēma lapas apakšējo epidermu. Tad, izmantojot skalpeli, atdalīja lapas parenhīmu. Procesa laikā tika sagrauta šūnas sieniņa un plazmatiskā membrāna. Suspensiju ievietoja ependorfā, kurā bija 1 ml šķidrā barotne. Visu ependorfa satur filtrēja caur neilona filtru. Filtrātu iepildīja otrā ependorfā un pievienoja barotni, lai kopējais tilpums būtu 1,5 ml.

Suspensiju centrifūgē 2 minūtes pie 900 apgriezieniem. Atsūca supernatantu. Kodola – hloroplastu kompleksi atrodās nogulsnes frakcijā. Nogulsnes atšķaidīja ar barotni un 15 mikrolitrus uznesa uz priekšmeta stikliņa. Uzklāja segstiklu. Preparātu apskatot konfokālajā mikroskopā, segstikla malas pārklāja ar līmlenti.

Krāsota kodola – hloroplastu kompleksa preparāta pagatavošana

Ependorfā ienesa 1 ml iepriekš pagatavotas suspensijas, kas saturēja kodola – hloroplastu kompleksus un hloroplastus. Pievienoja 0,5 ml fiksatoru – 4% glutaraldehīda šķīdumu. Visu fiksēja 10 minūtes. Tad ependorfu centrifugēja 2 minūtes pie 900 apgriezieniem. Atsūca supernatantu, kas saturēja fiksatoru un nogulsnēm pievienoja barotni (kopējais tilpums 1,5 ml). Ependorfa saturu samaisīja vorteksā un centrifugēja 2 minūtes pie 900 apgriezieniem. Tad atkal atfiltrēja supernatantu un nogulsnēm pievienoja barotni, lai kopējais tilpums 1,5 ml. Ependorfā pievienoja 15 mikrolitrus propīdija jodīda un paraugu krāsoja 20 minūtes. Tad ependorfu centrifugēja 2 minūtes pie 900 apgriezieniem, atfiltrēja supernatantu. Nogulsnēm pievienoja barotni ar kopējo tilpumu 1,5 ml un atkārtoja centrifugāciju.

Piecpadsmi mikrolitrus nogulsnes uznesa uz priekšmeta stikliņa. Paraugu pārklāja ar segstiklu un apskatīja mikroskopā.

2.5 Gaišā lauka mikroskopija

Izmantoja Leica DM 2000 mikroskopu ar planāro fluorīda objektīvu. Iepriekš sagatavotu tabakas lapas vai kartupeļa bumbuļa preparātu novietoja uz priekšmetgaldiņa.

Mikroskopam ar adaptera palīdzību pievienoja digitālo fotoaparātu *Canon Power Shot S70*. Izvēlējās piemērotāko tuvinājumu un fotogrāfēja vēlamu attēlu. Pēc parauga apskates un fotografēšanas, nemainot aparatūras uzstādījumus, mikroskopā ievietoja mikroskopisko lineālu un nofotografēja, lai vēlāk izmantotu kā mēroga skalu.

2.6 Korelatīvās mikroskopijas metode

Korelatīvās mikroskopijas metodē apvienoja gaišā lauka mikroskopiju un fluorescento mikroskopiju. Izmantoja Leica DM 2000 mikroskopu ar planāro fluorīda objektīvu. Ar korelatīvās mikroskopijas metodi apskatīja nefiksētu izolēto hloroplastu un hloroplastu – kodola preparātu.

Preparātā gaišā lauka mikroskopijā atrada un apskatīja hloroplastu – kodola kompleksus pie 20 x liela palielinājuma, tad pie 40 x liela palielinājuma. Kad objekts bija atrasts, tad uz segstikla uzpilināja imersijas eļļu un uzstādīja 100 x lielu palielinājumu. Iestādīja asumu.

Mikroskopam ar adaptera palīdzību pievienoja digitālo fotoaparātu Canon Power Shot S70. Uzstādīja piemērotāko attēla tuvinājumu un fotogrāfēja hloroplastu – kodola kompleksu. Nemainot mikroskopa un digitālā fotoaparāta uzstādījumus, pārslēdza caurstarojošās gaismas režīmu uz fluorescentās mikroskopijas režīmu. Fotogrāfēja objektu vēl vienu reizi.

Pēc parauga apskates un fotogrāfēšanas, nemainot aparatūras uzstādījumus, mikroskopā ievietoja mikroskopisko lineālu un nofotografēja, lai vēlāk izmantotu kā mēroga skalu.

2.7 Lāzerskenējošā konfokālā mikroskopija

Izmantoja *Leica DM RA-2* mikroskopu ar konfokāli skenējošo galvu *TCS-SL*. Lietoja planāro apohromātisko eļļas imersijas objektīvu. Izejošo staru sadalītājs (*Excitation Beam Splitter FW*) - DD 488/543. Skaitliskā apertūra 1,40. Paraugus apskatīja pie 100 reižu liela objektīva palielinājuma. (HCX PL APO CS 100.0 x1.40 OIL PH) Fluorescences ierosināšanai izmantoja 488 nm garu Ar lāzera staru. Darba laikā lietoja 25 % - 30 % no akustiski – optiskā izturības filtra (*AOTF*) maksimālās vērtības. PMT vērtība hlorofila emisijas diapazonā 700/-15 V, GFP emisijas diapazonā 750/-10 V.

2.7.1 Darbs ar konfokālo lāzerskenējošo mikroskopu

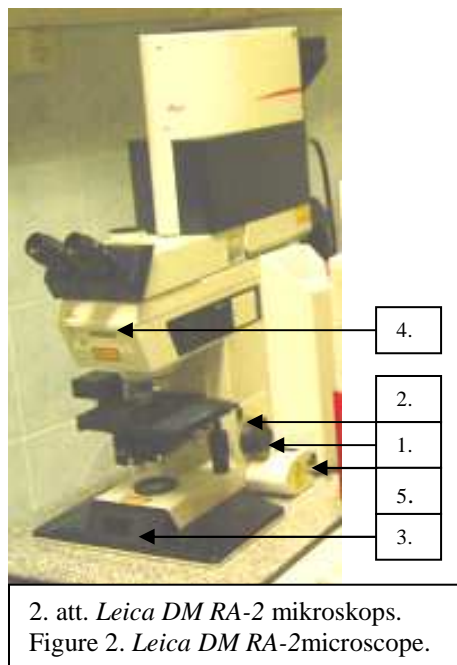
Mikroskopēšanas sistēma sastāv no lāzera avota bloka, stateniskā luminiscences mikroskopa (2.attēls), konfokālās skenējošās galvas un datora ar datorprogrammu *Leica Confocal Softwear*. Strādājot ar mikroskopu precīzi bija jāievēro darbību secība, lai nebojātu lāzera bloku. Visas darbības aprakstītas secībā, kādā tās jāveic.

1. Ieslēdz lāzera avotu, tad skeneri.
2. Iedarbināja mikroskopu (5.).
3. Ievietoja preparāru.

Preparāta ievietošana

- a. Novietoja preparātu uz priekšmetgalda,
- b. pacēla priekšmetgaldu ar makroskrūvi (1.) vai elektronisko skrūvi (2.),

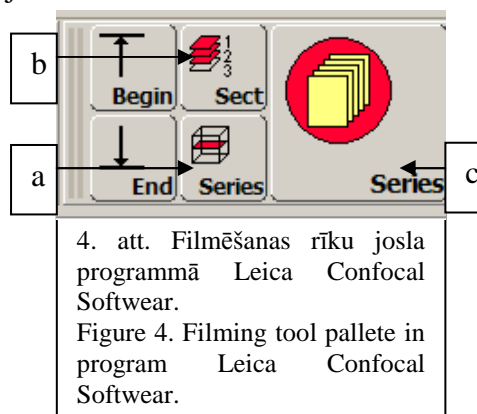
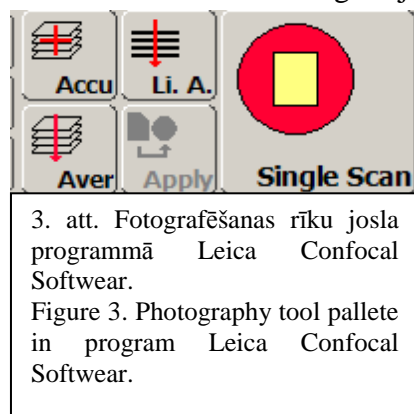
- c. iestādīja priekšmetgaldā 0 robežu (3.),
- d. gaismas filtru iestādīja 3. pozīcijā, bet apskatot paraugu fluorescencē lietoja 4. pozīciju (4.),
- e. ar ieslēgtu caurejošo gaismu (5.), griežot maksroskrūvi, atrada meklējamo objektu.



4. Ieslēdza datoru un aktivēja programmu *Leica Confocal SoftWare*. Izvēlējās izvēlni *Company*.
5. Veica attiecīgos iestatījumus (1A) (2.pielikums):
 - a. izvēlējās Ar/He-Ne lāzera staru 488 nm, intensitāti ~ 30 % (A) un to aktivēja,
 - b. iestādīja pozīciju uz stara sadalītāja DD 488/543 (B),
 - c. iestādīja pinhola atvērumu – 180 mikrometrus (C),
 - d. izmainīja monitora ekrānam pienākošā signāla jaudu (PMT). Hlorofila kodējošā kanāla PMT ir 700/-15 V, GFP ir 750/-10 V (D),
 - e. norādīja emisijas kanālu diapazonu un kodējošo krāsu. GFP emisijas diapazons ir no 500 nm līdz 550 nm, bet hlorofila emisijas diapazons ir no 660 nm līdz 690 nm (E),
 - f. izvēlējās objektīvu HCX PL APO CS 100.0 x1.40 OIL PH (F),
 - g. izvēlējās attēla formātu – 1024 * 1024 (G),
 - h. izvēlējās asis, pa kādām notiks parauga skenēšana (H).
6. Sāka parauga skenēšanu, izvēloties funkciju *Continuous* (I).
7. Atrada objektu, palielināja ar funkciju *Zoom in* (J).

8. Objekta fotografēšana (3. attēls):

- a. ar funkciju *aver* izvēlējās vidējo summāro attēlu no trīs secīgiem viena attēla skenējumiem, tā mazinot trokšņu radītās neprecizitātes
- b. apstādināja funkciju *continuous* un ar funkciju *Single Scan* nofotografēja objektu.



9. Objekta filmēšana (4. attēls):

- a. izvēlējās objektu un pie izvēlnes *Series* (a) uzstādīja vēlamo skenēšanas dziļumu pa „z” asi,
- b. ar funkciju *Sect* (b) uzstādīja vēlamo optisko griezumu attēlu skaitu (parasti tie ir no 10 līdz 20 attēli atkarībā no kopējā dziļuma pa „z” asi),
- c. aktivēja funkciju *Series* (c) un izveidoja optisko griezumu sēriju.

10. Izvēloties funkciju *Process*, veica attēlu sērijas pārveidi 3D animācijā.

11. Beidzot darbu izslēdza datoru, mikroskopu, skeneri, bet lāzera avotu pirms izslēgšanas dzesēja 10 minūtes.

2.8 Attēlu analīze

Attēlus apstrādāja programmā *LCS Lite* un *WCIF ImageJ*. Programmās tika veikta vispārēja attēla apstrāde, kā arī sīkāki fluorescences intensitātes mērījumi un grafiski atveidojumi. Programmu *WCIF ImageJ* iespējams lejuplādēt <http://www.uhnresearch.ca/wcif>.

Programma LCS Lite.

Ar funkciju rindu, kas atrodas *Quantify/Profile* izveidoja divu krāsas kanālu fluorescences intensitātes grafikus fona rajonā un kodola – hloroplastu kolokalizācijas reģionā. Pēc fona intensitātes grafika tika noteikta maksimālā trokšņu fluorescences intensitāte zaļajā un sarkanajā spektrā. Analizējot ko lokalizācijas reģiona grafiku, trokšņu fona maksimālā vērtība tika izmantota kā atskaites punkts, no kura sāk analizēt krāsu kanālu

saplūšanu. Šāda metode izslēdz fona trokšņu radīto rezultātu kļūdu. Tiek pieņemts, ka grafika daļa, kas atrodas virs noteiktās vērtības, raksturo GFP un hlorofila fluorescenci.

Programma WCIF ImageJ.

Programmā WCIF ImageJ tika veikta attēlu statistiskā analīze. Izmantoja programmā Leica Confocal Software veidotos 3D attēlus, kuros katrs krāsas kanāls attēlots atsevišķi. Apstrādei izvēlās kvalitatīvāko attēlu, kurā ir vismazākais fona trokšņu daudzums. Veicot statistisko analīzi nav ieteicams attēlus pārveidot. Ko lokalizācija tika analizēta atsevišķām attēla daļām, kurās bija iespējama ko lokalizācija. Tas deva iespēju iegūt precīzākus datus.

Pirms attēlu statistiskās apstrādes attēlus pārveido par 8 bitu attēliem. To dara ar izvēlni *Image/Type*. Tālāko apstrādi veic ar funkciju *Plugins/Colocalization Analysis*. Šajā izvēlnē ir pieejami dažādi fluorescences intensitātes ko lokalizācijas testi. Darbā tika izmantoti divu veidu testi: *Manders coefficient* un *Colocalization Finder*. Tika iegūti vairāki intensitātes koeficienti un ko lokalizācijas grafiks. Grafika centrālajā daļā analīzes laikā iezīmējas noteikts rāmis, kurā tiek attēloti ko lokalizētie pikseļi.

Lai skaidrotu iegūto koeficientu sniegto informāciju, ir nepieciešams zināt to galējās vērtības, variācijas un to nozīmi.

Analīzes laikā tika iegūti sekojoši rādītāji:

R_r – Pīrsona koeficients; $-1 < R_r < 1$. Ja $R_r > 0$, ko lokalizācija ir notikusi, ja $R_r \leq 0$, ko lokalizāciju nav iespējams definēt.

R – pārklāšanās koeficients; $0 < R < 1$. Viens – pilnīga ko lokalizācija. Vērā ņemams, ja krāsas kanālu attiecība $ch1:ch2 \sim 1$.

M_1 – sarkanās krāsas ko lokalizācijas koeficients; $0 < M_1 < 1$. Norāda, kādā attiecībā sarkanais krāsas kanāls pārklāj zaļo krāsas kanālu.

M_2 – zaļās krāsas ko lokalizācijas koeficients; $0 < M_2 < 1$. Norāda, kādā attiecībā zaļais krāsas kanāls pārklāj sarkano krāsas kanālu.

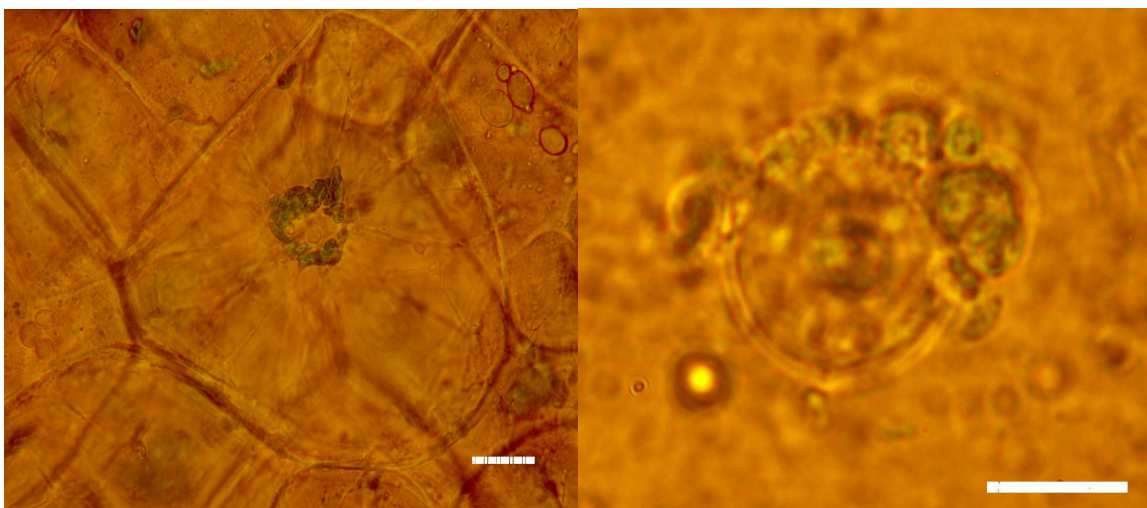
Ja krāsas kanālu pārklāšanās attiecības ir vērā ņemamas un līdzīgās attiecībās, tad $M_1 = M_2 = 1$.

ICQ – intensitātes korelācijas koeficients; $-0,5 < ICQ < 0,5$. Norāda abu kanālu intensitātes variācijas veidu. Iespējama ir sinhrona vai asinhrona variācija. Ja $-0,5 < ICQ < 0$, tad intensitātes variēšana ir asinhrona. Ja $ICQ = 0$, tad fluorescences intensitātes sinhronitāte ir nejauša. Ja $ICQ > 0$, tad intensitātes variēšana ir sinhrona. (Collin T. 2006.)

3. Rezultāti un diskusija

3.1 Gaišā lauka mikroskopija

Gaišā lauka mikroskopijā pētīja kartupeļa bumbuļa mizas šūnas (4. a att.), kurās centrā bija redzamas kodols ar daudziem hloroplastiem, un izdalītus kodola – hloroplastu kompleksus (4.b att.) no kartupeļa bumbuļa mizas šūnām.



4. attēls. Gaišā lauka mikroskopija. a - kartupeļa mizas parenhīmas šūna ar kodola – hloroplastu kompleksu centrā. Mērogs 50 mikrometri. b – izdalīts kodola – hloroplastu komplekss no kartupeļa mizas parenhīmas šūnām. Mērogs 10 mikrometri.
FIGURE 4. Light microscopy. a – potato parings parenchyma cell with nuclear – chloroplasts complex in centre. Scale bar 50 micrometre. b – refined nuclear – chloroplasts complex from potato parings parenchyma cells. Scale bar 10 micrometre.

Gaišā lauka mikroskopijā 40 reižu lielā palielinājumā varēja saskatīt šūnas sienīņu un lielākās organellas – šūnas kodolu un plastīdas -, kā arī cietes ieslēgumus. Apskatot kartupeļa mizas šūnas parenhīmas šūnas mikroskopā, varēja novērot divu veidu šūnas – šūnas, kas saturēja daudz cietes graudus un šūnas, kurās bija maz cietes graudu, bet varēja novērot plastīdas.

Simts reižu lielā palielinājumā varēja saskatīt tās pašas orhanellas, kuras novēroja 40 reižu lielā palielinājumā, bet papildus varēja novērot lielāko organellu morfoloģiskās atšķirības. Novēroja, ka kodols un hloroplasti no apkārtējās vides bija norobežoti ar membrānu. Hloroplasti un kodols nebija homogēni.

Gaišā lauka mikroskopijā varēja saskatīt, ka izolēti hloroplasti un kodols divdimensiju plaknē savstarpēji mijiedarbojās (4.b attēls).

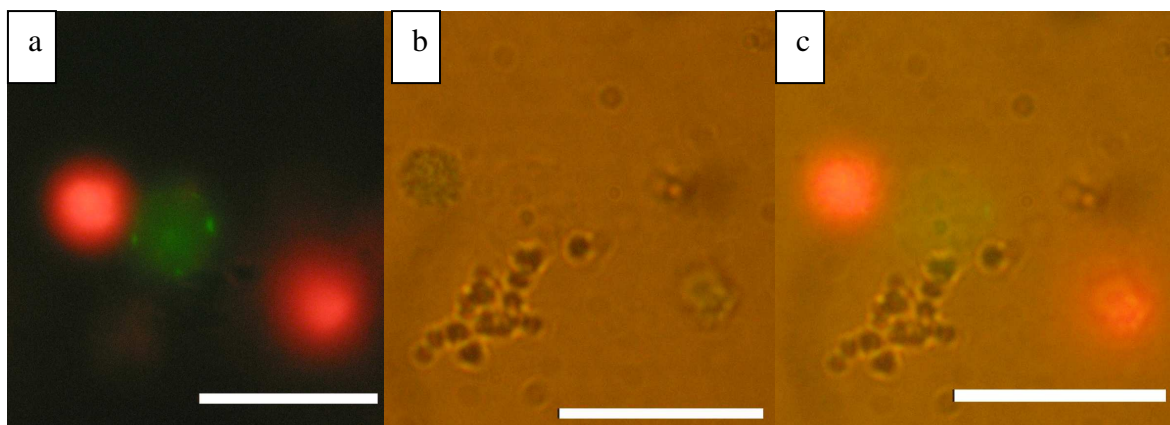
Pētot paraugus ar gaišā lauka mikroskopiju objektus nevarēja apskatīt trīsdimensiju veidā. Tas neļāva precīzāk spriest par organoīdu savstarpējo novietojumu un iespējamās ko lokalizācijas kopējo laukumu. Divdimensionālie attēli nebija piemēroti tālākai datu analīzei.

Izmantojot gaišā lauka mikroskopijas metodi bija samērā grūti precīzi identificēt izolētus šūnas organoīdus ārpus šūnas. Galvenais metodes trūkums bija spēja saskatīt tikai lielākās šūnas struktūras.

Gaišā lauka mikroskopija bija piemērota vispārējai parauga novērtēšanai un vispārējai šūnu struktūru pētīšanai, bet nebija piemērota precīziem ko lokalizācijas pētījumiem.

3.2 Korelatīvā mikroskopija

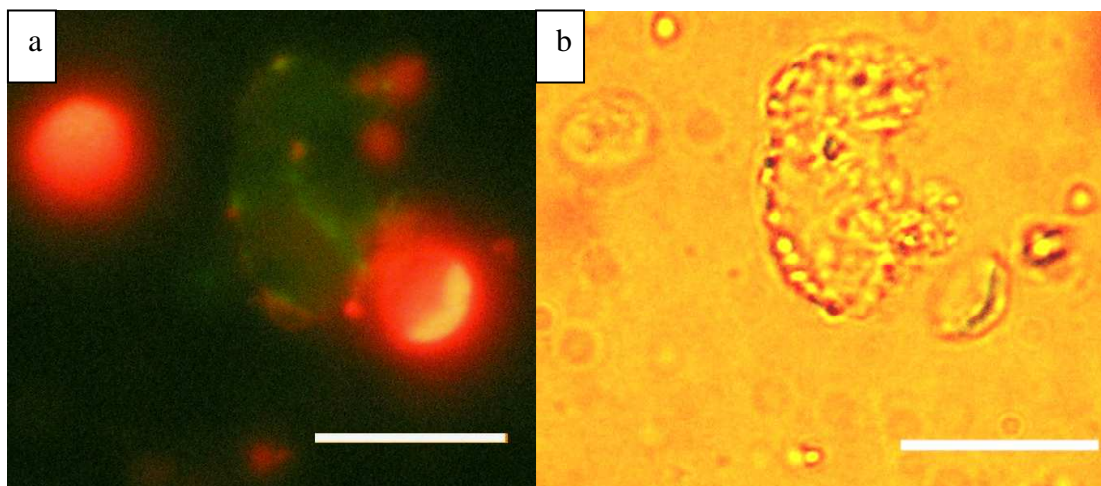
Mehāniski izdalītus hloroplastu – kodola kompleksus apskatīja gaišā lauka un fluorescentajā mikroskopijā 100 reižu lielā palielinājumā. Gaišā lauka mikroskopijā (5.b., 6.b attēli) varēja novērot kodolu un hloroplastu formu, kā arī to savstarpējo novietojumu. Kodoli gaišā lauka mikroskopijā novērojami kā ovāli vai apaļi, gandrīz bezkrāsaini veidojumi. Kodoli, salīdzinot ar hloroplastiem, bija lielāki, vidēji 15 – 20 mikrometri diametrā. Hloroplasti gaišā lauka mikroskopijā bija novērojami kā ovāli veidojumi ar zaļu nokrāsu. Hloroplasti bija no 10 līdz 15 mikrometriem gari. Pilnībā nevarēja spriest par organoīdu formu, jo objekti vai to daļas, kas neatrodās fokālajā plaknē, bija neskaidri.



5. attēls. Kodola – hloroplastu komplekss korelatīvā mikroskopijā. a – fluorescentā mikroskopija (zaļš – kodola apvalks, sarkans – hloroplasti), b – gaišā lauka mikroskopija, c – gaišā lauka mikroskopija un fluorescentā mikroskopija. Mērogs – 20 mikrometri.
FIGURE 5. Nuclear – chloroplast complex in the corelative microscopy. a – fluorescent microscopy (green – nucleus, red – chloroplasts), b – light microscopy, c – fluorescent and light microscopy. Scale bar 20 micrometre.

Apskatot to pašu kompleksu fluorescentajā mikroskopā (5.a, 6.a attēli), zaļā krāsā varēja redzēt GFP fluorescenci, bet hlorofila autofluorescenci sarkanā krāsā. Fluorescentajā mikroskopijā varēja redzēt ne tikai lielos, veselos hloroplastus, bet arī atsevišķas granas gan pie kodola, gan brīvi peldot barotnē (6.a attēls).

Fluorescentajā mikroskopijā varēja redzēt, ka kodoli ar hloroplastiem atrodās cieši kopā, bet nevarēja noteikt tiešu ko lokalizāciju, jo nebija redzamas gaismas spektra pārklāšanās zonas. Izmantojot korelatīvās metodes iespējas, gaišā lauka mikroskopijā precīzi varēja identificēt kodolus un hloroplastus (5. c)



6. attēls. Kodola – hloroplastu komplekss korelatīvā mikroskopijā. a – fluorescentā mikroskopija (zaļš – kodola apvalks, sarkans – hloroplasti), b – gaišā lauka mikroskopija. Mērogs – 10 mikrometri.

FIGURE 6. Nuclear – chloroplasts complex in the correlative microscopy. a – fluorescent microscopy (green – nucleus, red – chloroplasts), b – light microscopy. Scale bar 10 micrometre.

Korelatīvās mikroskopijas priekšrocības salīdzinājumā ar gaišā lauka mikroskopiju bija spēja precīzi identificēt šūnas organellas pateicoties fluorescences īpašībām, bet gaišā lauka mikroskopijā varēja pētīt organoīda iekšējo struktūru. Negatīvais aspekts bija tas, ka korelatīvā mikroskopija tāpat kā gaišā lauka mikroskopija deva priekšstatu tikai par organoīdu novietojumu divdimensionālā plaknē.

3.3 Lāzera konfokālā skenējošā mikroskopija, attēlu analīzes rezultāti

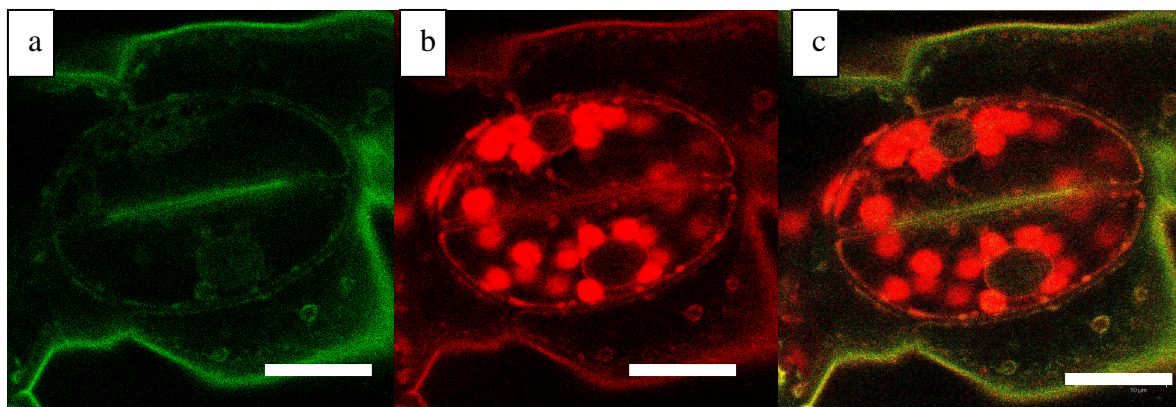
Lāzera konfokālajā skenējošā mikroskopijā apskatīja tabakas lapas preparātus (7. attēls) un izolētu tabakas lapu kodola – hloroplastu kompleksu preparātu (3. pielikums).

Dzīvas lapas preparāta labi varēja saskatīt GFP fluorescenci un noteikt tā lokalizācijas vietu. GFP lokalizējās endoplazmatiskajā tīklā, kas koncentrējas pie šūnas sienīņas, un kodola apvalkā (7. a attēls).

Hlorofils fluorescēja sarkanā krāsā un norādīja uz hloroplastu lokalizāciju (7. b attēls). Atvārsnītes šūnās varēja redzēt, ka lielākā daļa hloroplastu bija novietoti pie kodola, bet atsevišķi hloroplasti atradās citoplazmā atstātos no kodola apvalka (7. c attēls).

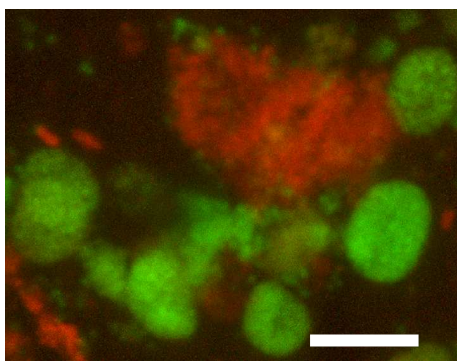
Izolētos kodola – hloroplastu kompleksos varēja novērot, ka kodolu un hloroplastu mijiedarbība nezuda pēc mehāniskas apstrādes. Novērojama hloroplastu savstarpējā ko lokalizācija (1. pielikums).

Hlorofila fluorescence norādīja, ka hloroplastots tilokoīdi, kas sakārtoti granās nebija izvietoti vienmērīgi pa visu hloroplastu. Hloroplasta un kodola ko lokalizācijas vietā bija novērojami dzeltenas krāsas pikseļi. Tas izskaidrojams ar zaļā un sarkanā spektra pārklāšanos. Tā rezultātā attēlā veidojās dzeltenas krāsas pikseļi. (Comeau et. al 2006).



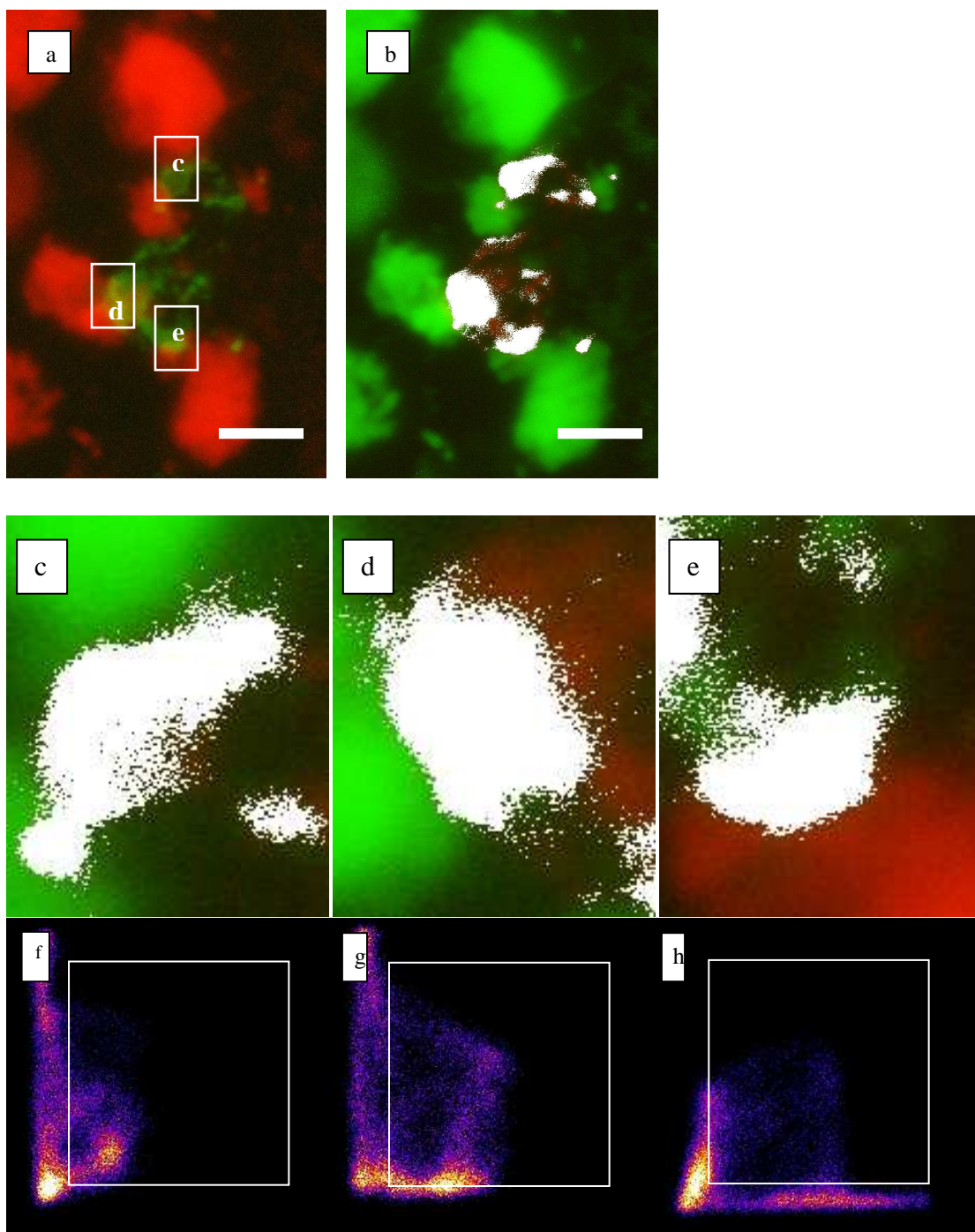
7. att. Tabakas lapas atvārsnītes šūnas lāzera konfokālajā mikroskopā. a – aktīvs zaļais kanāls (GFP fluorescence), b – aktīvs sarkanais kanāls (hlorofila fluorescence), c – summārs attēls. Palielinājums 100 x. Mērogs 10 mikrometri.
 FIGURE 7. Tobacco leaf stomata cells in Confocal microscopy. a – active green canal (GFP fluorescence), b – active red canal (chlorophyll fluorescence), c – summary image. Magnification 100 x. Scale bar 10 micrometre.

Izmantojot propīdija jodīdu, kas šūnās krāsoja nukleīnskābes, bija iespēja pētīt kodola DNS un RNS saistību ar hlorofilu. Izolētā tabakas lapas kodolu – hloroplastu kompleksā (8. attēls) sarkanā krāsā bija novērojamas kodola nukleīnskābes un zaļā krāsā – hlorofila fluorescence. Attēlā bija novērojams, ka kodola nukleīnskābes cieši satuvinātas ar hlorofilu.



8. attēls. Kodola – hloroplastu komplekss. Sarkans – PI, zaļš – hlorofils. Mērogs 5 mikrometri.
 Figure 8. Nuclear – chloroplasts complex. Red – PI, green – chlorophyll. Scale bar 5 micrometre.

Vizualizējot ko lokalizācijas reģionu ar datorprogrammas *WCFI ImageJ* palīdzību (9.b att.), bija redzams, ka tas lielā mērā sakrita ar dzeltenu pikseļu novietojumu summārajā attēlā (9.a). Tas apliecināja, ka vizuāls attēla novērtējums deva daļēji patiesus datus par organelu ko lokalizāciju.



9. attēls. Kodola un hloroplastu ko lokalizācijas vizualizācija. a – Kodola – hloroplastu komplekss. Zaļa GFP fluorescences, sarkana hlorofila fluorescences. b – kodola – hloroplastu komplekss ar iezīmētām ko lokalizācijas vietām. Ko lokalizācijas vietas iezīmējas baltā krāsā. c, d, e – kodola – hloroplastu mijiedarbības reģioni palielinājumā. Apzīmējumi atbilst a attēlam. f, g, h – ko lokalizācijas rajonu c, d, e diagrammas. Uz abscisu ass attēlota hlorofila radītā fluorescences izteikta pikseļos. Uz ordinātu ass attēlota GFP radītā fluorescences izteikta pikseļos. Grafika norobežotā daļa norāda uz ko lokalizēto pikseļu daudzumu.

Mērogs 5 mikrometri.

Figure 9. Nuclear and chloroplasts co-localization visualization. a – Nuclear – chloroplasts complex. Green GFP fluorescence, red chlorophyll fluorescence. b – Nuclear – chloroplasts complex with marked co-localization region. Co-localization region – white color. c, d, e – nuclear – chloroplasts co-localization region megascopic. Nomenclatures correspond to a figure. f, g, h – co-localization region diagrams. X-axis – chlorophyll fluorescence in pixels. Y-axis – GFP fluorescence in pixels. Graphs central region – co-localization pixels sum. Scale bar 5 micrometre.

Sīkāk analizējot kodola un hloroplastu mijiedarbības reģionus palielinātos ko lokalizācijas rajonu attēlos (9. c, d, e att.) varēja novērot, ka hlorofils ar GFP pilnībā pārklājās. Par to liecināja attēlos novērojami pilnīgi baltie reģioni.

Vieglāk ko lokalizēto pikseļu daudzumu bija uztvert analizējot grafikus (9. f, g, h att.). Pirmajā grafikā (9.f att.) bija redzams, ka analizējamajā laukumā bija maz brīvo hlorofila fluorescences radīto pikseļu. Lielākā daļa no hlorofila ko lokalizēts ar GFP salīdzinoši šaurā reģionā. Par to liecināja grafika koncentrēšanās grafika centrālajā norobežotajā daļā nelielā amplitūdā. Grafika koncentrēšanās centrālajā daļā liecināja par pikseļu ko lokalizāciju. (Collin T. 2006) Otrajā grafikā (9. g) bija redzams, ka ko lokalizācija bija notikusi plašākā diapazonā, bet nedaudz vājāk. Par to liecināja grafika izkliede pa centrālo daļu. Trešajā grafikā (9. h att.) varēja novērot GFP un hlorofila ko lokalizāciju samērā plašā amplitūdā, bet tā bija vāja.

Analizēto kodola un hloroplasta mijiedarbību raksturoja arī noteikti fluorescences ko lokalizācijas koeficienti (2. tabula). Tabulā apzīmējumi atbilda iepriekš minētajiem norādījumiem 9. a attēlā.

2. tabula

Ko lokalizācijas koeficienti.

Table 2.

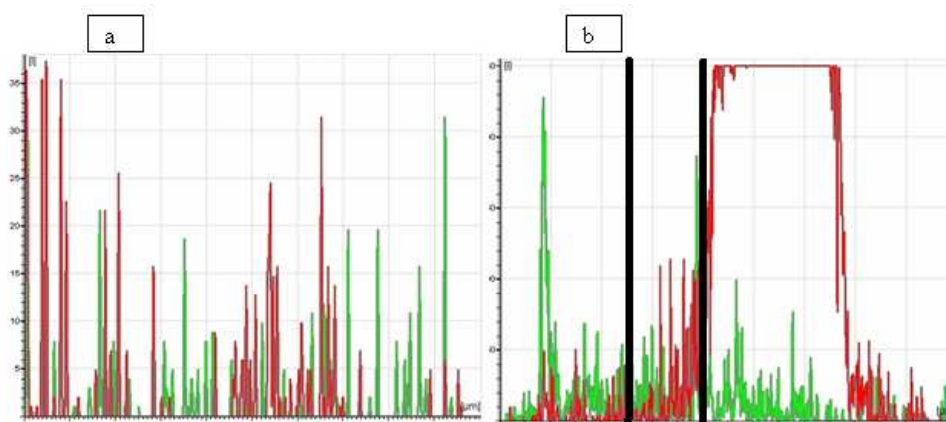
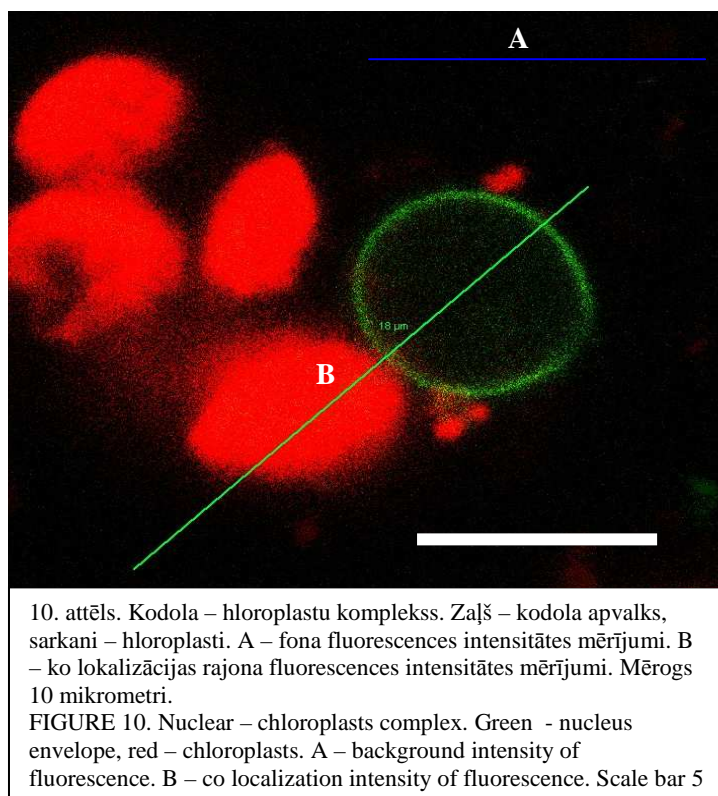
Colocalisation Coefficients.

Pētāmais laukums	c	d	e
Pīrsona koeficients (Pr)	0,14	0,32	0,46
Pārklāšanās koeficients (P)	0,73	0,82	0,74
Krāsu kanālu attiecība (ch1:ch2)	1	1	1
Ko lokalizācijas koeficients sarkanai krāsai (M1)	1	1	1
Ko lokalizācijas koeficients zaļai krāsai (M2)	1	1	1
Intensitātes korelācijas koeficients (ICQ)	0,033	0,164	0,141
Ko lokalizācija, %	27,89	28,59	21,93

Tā kā krāsas kanālu fluorescences intensitātes attiecība visos gadījumos bija viens, tad visi iegūtie rādītāji bija vērā ņemami. Pīrsona koeficients (Rr) visos gadījumos apstiprināja iepriekš novēroto ko lokalizāciju, jo $Rr > 0$. To apstiprināja arī pārklāšanās koeficients (R) > 0 . Sarkanais un zaļais krāsu kanāls pārklājās līdzīgās attiecībās, jo $M1 = M2 = 1$, kas norādīja, ka ko lokalizācija bija notikusi vienmērīgi. Fluorescences intensitāte visos gadījumos abos krāsas kanālos variēja sinhroni, jo $ICQ > 0$. Nosakot ko lokalizāciju procentuāli katrā ko lokalizācijas reģionā tika iegūti līdzīgi dati, kādi tika novēroti ko lokalizāciju attēlojot grafiski. Vislielākā ko lokalizācija bija novērojama variantā d, bet vismazākā ko lokalizācija variantā e.

Pēc iegūtajiem statistiskajiem un vizuālajiem datiem varēja apgalvot, ka attiecīgajā gadījumā kodola apvalkā ekspresētais GFP mijiedarbojās ar hlorofilu.

Veicot atsevišķu krāsu kanālu fluorescences intensitātes mērījumus noteiktos reģionos, varēja novērot GFP un hlorofila ko lokalizāciju (10.attēls). Sarkanās fluorescences fona trokšņa maksimālā vērtība bija 37 vienības, bet zaļā spektra fona trokšņa maksimālā vērtība bija 32 vienības (11. a attēls). Izslēdzot visas vērtības, kas mazākas par fona trokšņu maksimālajām vērtībām, varēja redzēt, ka GFP (zaļā līkne) un hlorofils (sarkanā līkne) bija ko lokalizēti vienā reģionā (11. b attēls). Ko lokalizācija bija trīs mikrometru diapazonā.



11. attēls. Fluorescences intensitāte. Zaļā līkne – GFP fluorescences, sarkanā līkne – hlorofila fluorescences. a – fona trokšņa fluorescences intensitāte (10. A). b – fluorescences intensitāte ko lokalizācijas reģionā (10. B).

Figure 11. Intensity of fluorescence. Green – GFP, red – chlorophyll. a – background intensity of fluorescence (10. A). b – intensity of fluorescence in complex co localization region (10. B)

Pēc konfokālās lāzerskenējošās mikroskopijas metodes datiem varēja apgalvot, ka kodola apvalks un tā nukleīnskābes veidoja ciešu ko lokalizāciju ar hloroplastu hlorofilu. Skenējošajā elektronu mikroskopā bija novērotas morfoloģiskas struktūras, kas saistīja tabakas lapas šūnas kodolu ar hloroplastiem (Selga T. et al. 2010). Kodola un hloroplastu mijiedarbību bija novērojis arī Pssingham zemāko augu šūnās 1980. gadā.

Attēli, kas iegūti ar konfokālo lāzerskenējošo mikroskopu bija augstas kvalitātes, jo tika iegūti ar mikroskopu, kuram bija ļoti laba optiskā sistēma, kas nodrošināja lielu palielinājumu un skaitlisko apertūru.

Konfokālās lāzerskenējošās mikroskopijas galvenā priekšrocība bija spēja apskatīt objektu trīs dimensijās un veidot summārus attēlus, kurus tālāk varēja izmantot fluorescences intensitātes mērījumiem. Fluorescences intensitātes mērījumi un ko lokalizācijas testi fluoroforu savstarpējai mijiedarbībai deva pilnīgu priekšstatu par šūnas fluorescējošo struktūru novietojumu. Tas bija pozitīvi, jo tā varēja noteikt atsevišķu fluorescējošu vielu ko lokalizāciju. Negatīvais aspekts bija tas, ka nevarēja noteikt cik lielā mērā kodola – hloroplastu kompleksā mijiedarbība notika ar struktūrām, kas nefluorescē, piemēram, hloroplastu ārējais un iekšējais apvalks.

Kā galveno konfokālā lāzera skenējošās mikroskopijas metodes trūkumu varēja minēt limitēto izšķirtspēju. Aprēķinot pēc matemātiskām formulām, visu iepriekš apskatīto trīs dimensionālo attēlu izšķirtspēja pa „xy” asi ir 213 nanometri, bet pa „z” asi 697 nanometri. Šis izšķirtspējas ierobežojums noteica to, ka ar šo metodi nevarēja saskatīt mazākas struktūras kā izšķirtspējas minimālās vērtības attiecīgajā plaknē.

Vērtējot iegūtos rezultātus, ka kodola apvalks un tā nukleīnskābes mijiedarbojās ar hlorofilu, svarīgi bija salīdzināt iegūto ko lokalizācijas kopējo garumu ar izšķirtspēju pa „xy” asīm. Tā kā tika iegūts, ka ko lokalizācija bija notikusi trīs mikrometru diapazonā, tad šis rādītājs bija daudzas reizes lielāks nekā limitējošā izšķirtspēja pa „xy” asīm. Izšķirtspēja netraucē pētīt struktūras, kas daudzkārt lielākas par izšķirtspēju. Līdz ar to izšķirtspēja galvenokārt iespaido tikai mazu struktūru pētījumu analīzi (Comeau et. al 2006).

Secinājumi

1. Šūnu organellu ko lokalizāciju vislabāk ir pētīt ar konfokālo lāzerskenējošo mikroskopu. Iegūtot telpiskos attēlus var izmantot tālākai attēlu analīzei.
2. Gaišā lauka mikroskopijā var tikai daļēji identificēt organellas. Nevar precīzi noteikt organellu ko lokalizāciju.
3. Korekatīvā mikroskopija dod iespēju precīzi identificēt fluorescējošas struktūras.
4. Ar fluorescento un konfokālo lāzerskenējošo mikroskopiju var analizēt tikai fluorescējošas struktūras.
5. Analizējot fluorescences intensitāti, var noteikt fluorescento struktūru ko lokalizāciju. Ko lokalizācijas analīze balstās uz matemātiskiem aprēķiniem.
6. Kodola apvalkā ekspresētais zaļais fluorescentais proteīns ir ko lokalizēts ar hloroplastos esošo hlorofilu.
7. Šūnu organellas ir ļoti daudzveidīgas un dinamiskas struktūras.

Pateicība

Izsaku pateicību darba vadītājam Tūram Selgam par teorētisko un praktisko zināšanu sniegšanu. Pateicību izsaku arī Valteram Gobiņam par palīdzību tehnisko problēmu risināšanā. Paldies arī Maijai Selgai par teorētisko zināšanu sniegšanu.

Literatūras saraksts

1. Abramowitz M. 2003. *Microscope*. New York: Olympus America Inc., Scientific Equipment Division, Two Corporate Center Drive, 50 pp.
2. Albani, Rene J. 2008. *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Wiley ,270 pp.
3. Bell, Hemsley P., Alan R. 09/2000. *Green Plants: Their Origin and Diversity*. Cambridge: Cambridge University Press, 361 pp.
4. Cammack R., Atwood T., Campbell P., Parish H., Smith A., Vella F., Stirling J. 2006. Oxford: *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*.
5. Chiari Y., Wang B., Rushmeier H., Caccone A. 02/01/2008. *Using digital images to reconstruct three-dimensional biological forms: a new tool for morphological studies.- Biological Journal of the Linnean Society, 95, 425–436.*
6. Claxton N. S., Fellers T. J., Davidson M. W. 2006. Florida: The Florida State University, Department of Optical Microscopy and Digital Imaging, National High Magnetic Field Laboratory, 37 pp.
7. Collin T. 2006. *ImageJ. Image processing and Analysis in Java*. Toronto: Toronto Western Research Institute, 46. pp.
8. Cutler S. R., Ehrhardt D. W., Griffitts J. S., Somerville C. R. 1999. *Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of Arabidopsis at a high frequency. – PNAS March 28, 2000 vol. 97 no. 7 3718-3723*
9. Czepulkowski, Barbara, 10/2000. *Analyzing Chromosomes*. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 219 pp.
10. Daintith J. 2009. *A Dictionary of Physics*. United Kingdom: Market House Books Ltd.
11. Davidson M. W., Abramowitz M. 1999. *Optical Microscopy*. Florida: The Florida State University, 41 pp.
12. Gell, Brockwell C., Smith D., Alastair. 08/2006. *Handbook of Single Molecule Fluorescence Spectroscopy*. Oxford: Oxford University Press, 279 pp.
13. Guthoff R. F., Zhivov A., Stachs O., 01/2009. *In vivo confocal microscopy, an inner vision of the cornea – a major review. – Clinical & Experimental Ophthalmology, Vol. 37 (1), pp. 100-17.*
14. Halpern A. 1998. *Schaum's Outline of Preparatory Physics II : Electricity & Magnetism, Optics, Modern Physics*. Blacklick: McGraw-Hill Professional Book Group, 543. pp.

15. Jonathan W. D. Comeau J.W. D., Costantino S., Paul W. Wiseman P. W. 2006., A Guide to Accurate Fluorescence Microscopy Colocalization Measurements. – Biophysical Society, 91(12): 4611–4622.
16. Jung H. S., Chory J. 2009. Signaling between Chloroplasts and the Nucleus: Can a Systems Biology Approach Bring Clarity to a Complex and Highly Regulated Pathway? – American Society of Plant Biologists, Plant Physiology 152:453-459.
17. Kato N., Reynolds D., Brown M. L., Boisdore M., Fujikawa Y., Morales A., Meisel L. A. 19/05/2008. Multidimensional fluorescence microscopy of multiple organelles in Arabidopsis seedlings. - Plant methods. 4:9
18. Kwok E. Y., Hanson M. R. 2004. Plastids and stromules interact with the nucleus and cell membrane in vascular plants. – Plant Cell Reports, Volume 23, Nr 4. 188 – 195.
19. Lackie J. 2010. Dictionary of Biomedicine. Oxford: Oxford University Press.
20. Murphy D. B. 2001. Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging. New York: Wiley – Liss, 386. pp.
21. Niederöst M., Niederöst J., Ščučka J. 2003. Automatic 3D reconstruction and visualization of microscopic objects from a monoscopic multifocus image sequence. Switzerland: International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences, Vol. XXXIV-5/W10
22. Patel D. 10/2000. Separating Cells. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 177 pp.
23. Sillanpää J., Nyberg M., Laippala P. A new table for work with a microscope, a solution to ergonomic problems. Applied Ergonomics Volume 34, Issue 6, November 2003, Pages 621-628
24. Stelzer E. H. K., Practical Limits to Resolution in Fluorescence Light Microscopy, in R. Yuste, F. Lanni, A. Konnerth (eds.), Imaging Neurons: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 12.1-12.9, 2000.
25. Vikmane M. 2011. Laboratorijas darbi augu fizioloģijā. Rīga: LU Bioloģijas fakultātes Augu fizioloģijas katedra, 53 lpp.
26. Yu, H., Cheng, P.C., Kao, F.J., Lin, P.C. (Editors). (2005). *Multi-modality microscopy*. Singapore: Hackensack, N.J.: World Scientific Publishing, ISBN# 981-256-533-7.
27. Spring K. R., Keller H. E., Davidson M. W. 2010. Microscope Objectives Introduction. Key: <http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/objectives.html>

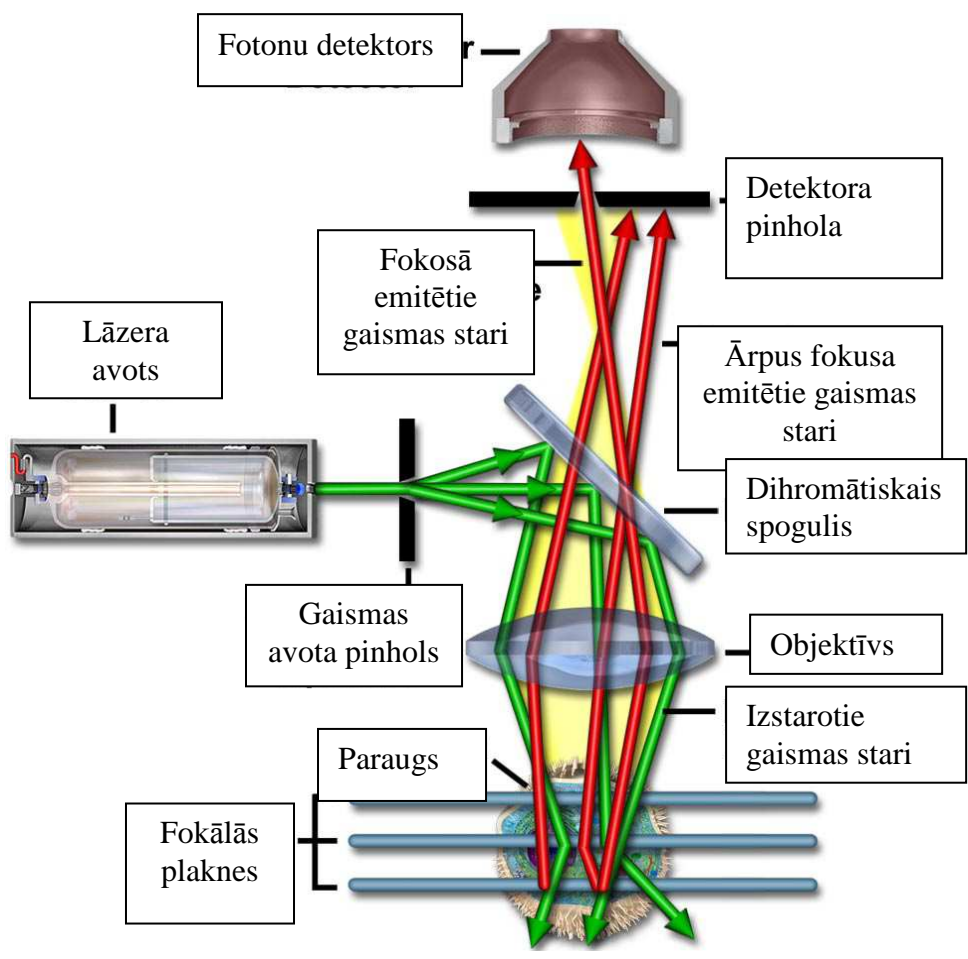
28. Wallace W., Schaefer L. H., Swedlow J. R. 2010. Resolution Criteria and Performance Issues.

Key:

<http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/deconvolution/deconresolution.html>

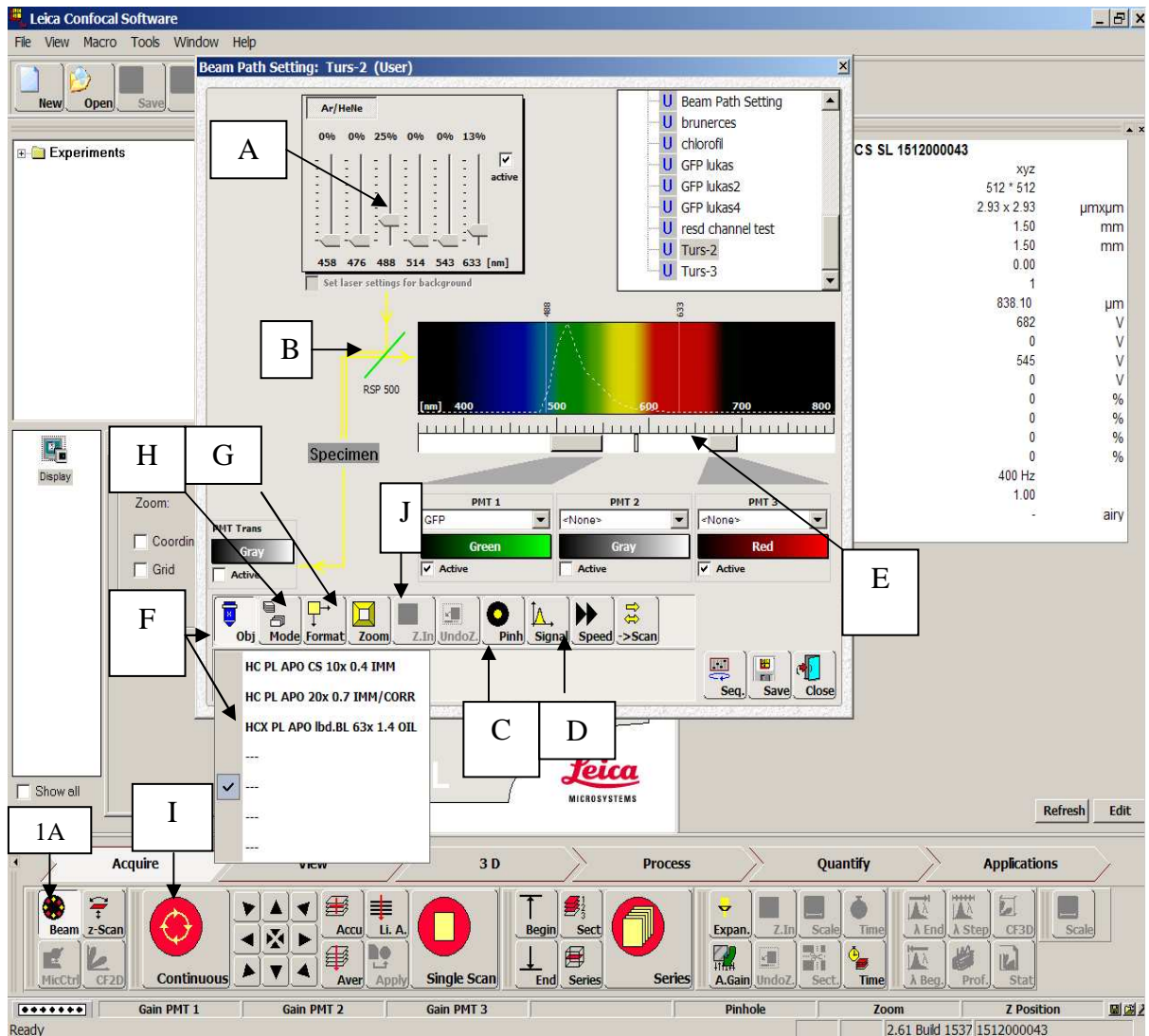
Pielikums

Konfokālā lāzerskenējošā mikroskopa shēma (Claxton *et al.* 2006)



2. pielikums

Programmas Leica Confocal Softwar uzstādījumu logs.



Kodola un hloroplastu komplekss. Zaļš – GFP ekspresija kodola apvalkā, sarkans – hlorofila fluorescences hloroplastos. Mērogs 10 mikrometri.

