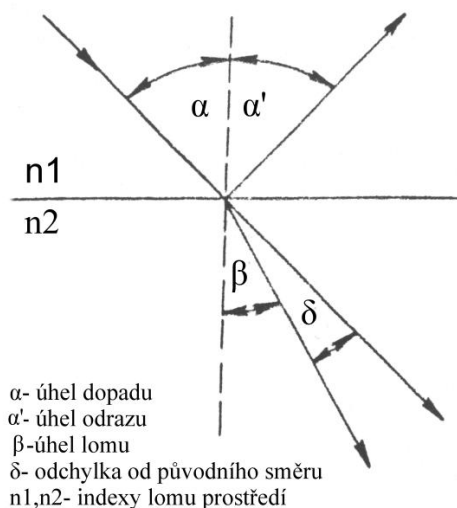


Téma: Světelná mikroskopie a preparáty v mikroskopii

Úvod:

Mikroskopie je základní metoda, která nám umožňuje pozorovat velmi malé biologické objekty. Díky mikroskopu můžeme vidět vnitřní strukturu a detaily preparátů, jež lidské oko není schopné zachytit. Světelný mikroskop využívá k ozáření preparátů viditelné světlo, proto se také řídí zákony optiky (Obr. 1). Je to výhoda, co se týká ceny a dostupnosti. Ovšem velkým omezením je právě složení viditelného světla a jeho vlnová povaha, kdy se jedná o celé spektrum záření s různými vlnovými délkami.



Obr. 1: Lom a odraz světla

(převzato web.natur.cuni.cz/parasitology/parpages/mikroskopickatechnika/)

Na vlnové délce použitého světla a také na objektivu závisí rozlišovací schopnost mikroskopu. Jedná se o důležitou vlastnost mikroskopu. Rozlišovací schopnost je definována jako nejmenší vzdálenost dvou bodů, které jsme schopni ještě rozlišit jako dva samostatné objekty. Udává ji numerická apertura N_A . Lidské oko má rozlišovací mez 0,2 mm, naproti tomu světelný mikroskop v řádech mikrometrů. Nejvyššího rozlišení dosahují mikroskopy elektronové, které mají rozlišovací schopnost v řádech nanometrů, tedy na úrovni krystalických mřížek kovů. Ve světelném mikroskopu jsme tedy schopni pozorovat preparáty na úrovni buněk,

případně některé větší buněčné organely, zatímco elektronový mikroskop umožňuje zobrazení nitrobuněčných struktur.

Kvalitu obrazu v neposlední řadě ovlivňuje i clonění. Kontrast, hloubka ostrosti a rozlišení podrobností jsou vlastnosti, které závisí na správném zaclonění preparátu. Pozorování pomocí mikroskopu je tedy jakýmsi kompromisem. Měli bychom dosáhnout požadovaného zvětšení při ideální hloubce ostrosti a rozlišení s vysokým kontrastem.

Základní pojmy a vztahy:

- Vlnová délka (λ):
 - vzdálenost dvou nejbližších bodů vlnění kmitajících ve stejné fázi
- Index lomu (n):
 - optická hustota prostředí mezi objektivem a preparátem ($n > 1,00$)
 $n = c/v$
(c ... rychlost světla ve vakuu, v ... rychlost světla o určité vlnové délce ve zkoumaném prostředí)
- Numerická apertura (N_A):
 - $N_A = n \cdot \sin \alpha$
(n ... index lomu prostředí, α ... vstupní úhel paprsků do objektivu)
- Rozlišovací schopnost (a):
 - $a = 0,61 \cdot \lambda / n \cdot \sin \alpha$
(λ ... vlnová délka světla, n ... index lomu prostředí, α ... polovina otvorového úhlu kužele paprsků, které mohou vstoupit do objektivu)

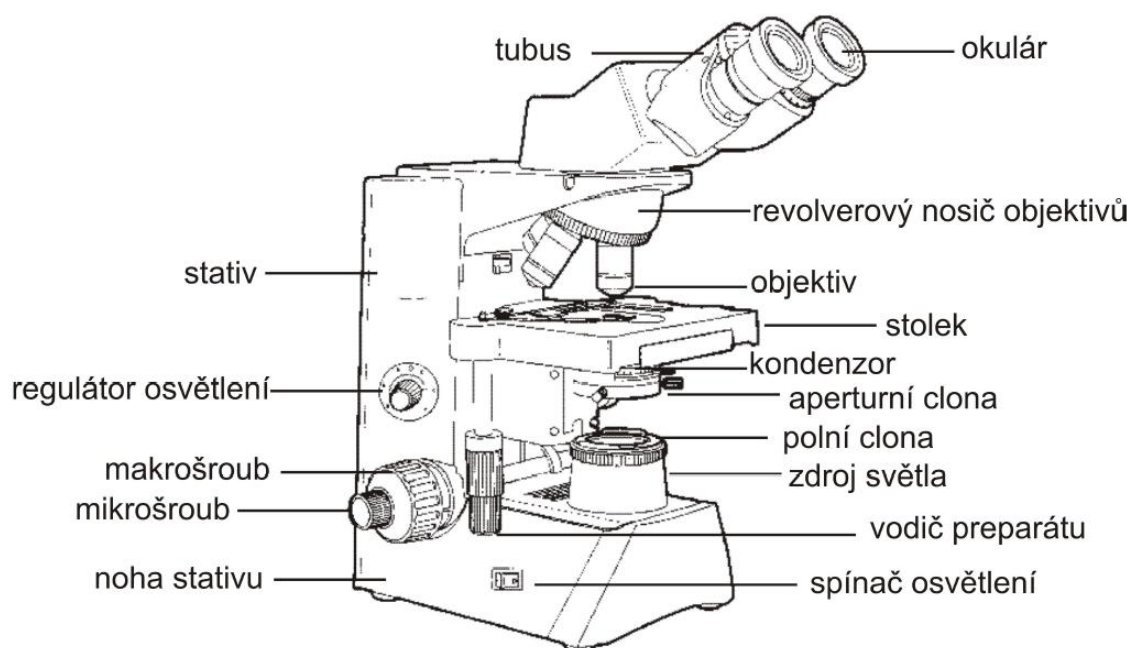
Stavba mikroskopu (Obr. 2):

Přístroj má části mechanické, osvětlovací a optické. Celou kostru mikroskopu tvoří stativ s masivní nohou zajišťující stabilitu. Na něj je upevněn stolek nesoucí svorky k uchycení preparátu s křížovým posuvem. Rameno stativu nese nahoře tubus s okuláry a dole revolverové zařízení s objektivy. Pro hrubé zaostření nám slouží makrometrický šroub, doostřujeme mikrošroubem.

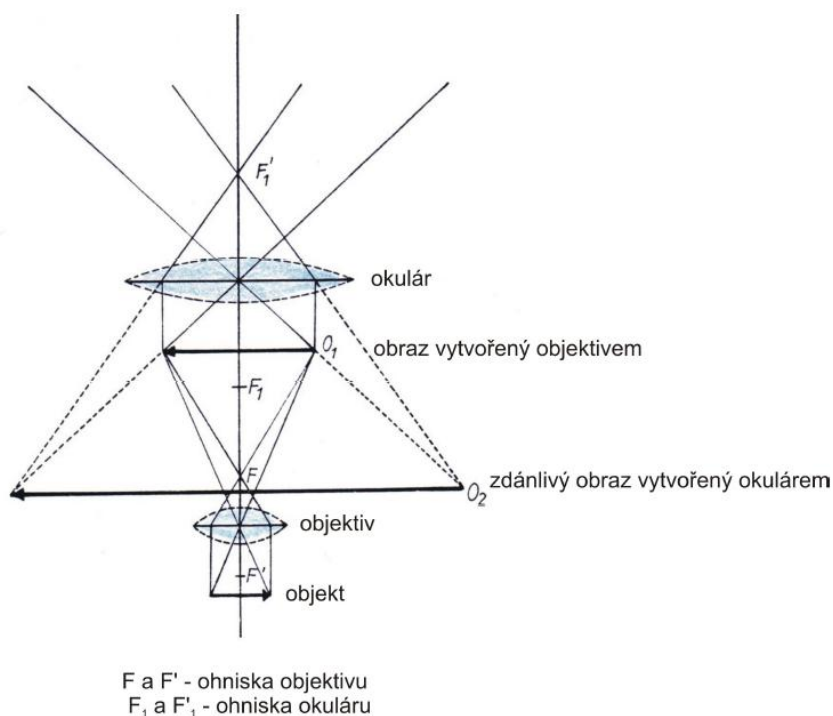
Nedílnou součástí každého mikroskopu tvoří osvětlovací zařízení. To nejjednodušší je otáčivé zrcátko. Školní mikroskopy jsou vybaveny lampou s kolektorovou čočkou. Nad lampou se nachází polní clona, aperturní irisová clona regulující množství procházejícího světla a kondenzor. Ten vytváří širší kužel paprsků směřovaných na preparát, čímž zajišťuje jeho lepší prosvětlení.

Nejdůležitější úlohu hraje optika. Mikroskop je tvořen dvěma soustavami čoček. Blíže preparátu je objektiv. Jedná se o soustavu čoček, jež vytváří skutečný, ale převrácený obraz pozorovaného objektu. Rozlišujeme objektivy suché a imerzní. Imerzní olej vyplňuje prostor mezi objektivem a preparátem (tam, kde je u suchých objektivů vzduch). Zamezuje ztrátám světla, paprsky procházející preparátem jsou směřovány přímo do objektivu. Dále pozoruje obraz přes okulár jako lupou. Výsledný

obraz pozorovaný světelným mikroskopem je neskutečný, převrácený a zvětšený (Obr. 3).



Obr. 2: Stavba světelného mikroskopu



Obr. 3: Konstrukce vzniku obrazu ve složeném mikroskopu

Pravidla mikroskopování:

1. Do optické osy mikroskopu nastavíme nejmenší objektiv (4x nebo 10x).
2. Pomocí makrošroubu umístíme stolek úplně nahoru.
3. Osvětlíme zorné pole. Zapneme zdroj světla a regulátorem osvětlení upravíme intenzitu přibližně na 1/2 výkonu.
4. Upravíme rozestup okulárů a zkontrolujeme čistotu optiky.
5. Na stolek položíme preparát, vyhledáme a zaostříme obraz pozorovaného objektu.
6. Ověříme, zda vidíme oběma očima (okuláry) stejně dobře, případně vyrovnáme dioptrickou vadu oka dioptrickým kroužkem v levém okuláru.
7. Pozorujeme preparát a vyhledáme nejvhodnější místo pro pozorování. Toto místo umístíme do středu zorného pole.
8. Během vlastního pozorování vyměníme podle potřeby objektiv za jiný, a to posunem nosiče objektivů, nepohybujeme stolek mikroskopu nahoru nebo dolů, protože by došlo k rozostření.

Časté chyby při mikroskopování:

1. Nedodržování sledu jednotlivých pravidel mikroskopování.
2. Použití nejprve silně zvětšujícího objektivu.
3. Nesprávné osvětlení a clonění.
4. Nevycentrování pozorovaného objektu v zorném poli.
5. Preparát umístěný na stolek mikroskopu krycím sklem dolů.
6. Neproostřování pozorovaného objektu pomocí mikrošroubu.

Typy preparátů pro mikroskopii

Mikroskopický preparát je biologický objekt uzavřený mezi podložním a krycím sklem. Na základě trvanlivosti rozlišujeme dva typy preparátů, dočasné (nativní) a trvalé.

Dočasné preparáty slouží pro aktuální pozorování a nemají dlouhou životnost. Můžeme sledovat např. živé prvky, řasy, listy mechu, epidermis rostlin aj. V nativních preparátech pozorujeme buněčné dělení, tvar a strukturu buněk, morfologii plísní. Vitální barvení (methylenová modř, Janusova zeleň, neutrální červeň) nám umožňuje zachytit neporušené živé objekty.

Trvalé preparáty prochází fixací. Jejím podstatou je denaturace bílkovin v preparátu. To zabraňuje posmrtným změnám tkání a rostlinných pletiv. Podmínkou je ovšem zachování barvitelnosti. Zafixovaný preparát je přenesen na podložní sklo, přidáno uzavírací médium a přiloženo krycí sklo. Uzavíracím médiem je nejčastěji kanadský balzám, parafín, želatina nebo celoidin.

Podle způsobu přípravy rozlišujeme celou řadu typů preparátů.

Roztlakový preparát se připravuje např. tak, že se macerovaná kořenová špička položí na podložní sklo, přiloží se krycí sklíčko a preparační jehlou se opatrně shora přitlačí.

Mikroreliéfní a adhezivní preparáty jsou využívány pro studium povrchových struktur. Na list se nanese tenká vrstva průhledného laku, který se po zaschnutí překryje lepicí páskou, sloupne a detaily se pozorují přímo na něm.

Zhotovujeme-li preparáty z většího kousku tkáně či pletiva, musíme provést řezy. Žiletkou nebo skalpelem se krájí co nejtenčí řezy, které se přenáší buď do fixačního roztoku nebo do kapky vody. Velmi tenké řezy, na úrovni několika vrstev buněk, vytváří speciální přístroj, mikrotom.

Úkol č. 1: Pozorování tištěného písmene

Pomůcky: světelný mikroskop a mikroskopické potřeby (podložní a krycí sklíčka); pinzeta; voda; proužky filtračního papíru; noviny; nůžky

Postup:

1. Z novin vystříhnete libovolné písmeno.
2. Vložte do kapky vody na podložním skle a překryjte krycím sklíčkem.
3. Pozorujte nejdříve pouhým okem a obraz zakreslete.
4. Vložte preparát pod mikroskop a pozorujte písmeno při malém zvětšení. Obraz zakreslete.
5. Oba pozorované obrazy porovnejte a pozorované skutečnosti vysvětlete. Poznamenejte si také hodnoty zvětšení objektivu a okuláru. Sledujte, jakým směrem se pohybuje obraz při posunu preparátem po stole mikroskopu.

Úkol č. 2: Pozorování buněk cibule kuchyňské

Materiál: cibule kuchyňská (*Allium cepa*)

Pomůcky: pinzeta, skalpel, pipeta, světelný mikroskop a mikroskopické potřeby

Postup:

1. Z vnitřní vyduté suknice cibule kuchyňské sloupněte pinzetou epidermis a skalpelem ji nařežte na kousky o rozměrech přibližně 5 x 5 mm.
2. Připravené kousky epidermis ihned vložte do kapky vody na podložním skle.
3. Přikryjte krycím sklíčkem a pozorujte.
4. Zakreslete do protokolu.

Úkol č. 3: Barvení vakuol cibule kuchyňské

Materiál: cibule kuchyňská (*Allium cepa*)

Chemikálie: 1% roztok neutrální červeně

Pomůcky: pinzeta, skalpel, pipeta, světelný mikroskop a mikroskopické potřeby

Postup:

1. Z vnitřní vyduté suknice cibule kuchyňské sloupněte pinzetou epidermis a skalpelem ji nařežte na kousky o rozměrech přibližně 5 x 5 mm.
2. Připravené kousky epidermis vložte do kapky roztoku neutrální červeně a nechejte barvit 20 – 30 minut.
3. Poté epidermis přeneste do kapky vody na podložním skle.
4. Přikryjte krycím sklíčkem a pozorujte.
5. Zakreslete do protokolu.

Otázky:

1. Jaká je vlnová délka části spektra viditelného světla? A jaké jsou vlnové délky ultrafialového a infračerveného záření? Schematicky porovnej.
2. Proč je nezbytné při přípravě trvalých preparátů používat fixaci?
3. Jaká je funkce vakuol?

Použitá literatura:

- Hejtmánek, M. (2001): Úvod do světelné mikroskopie, Olomouc.
- Vymětalová, V. (2001): Laboratorní cvičení z biologie, Praha.
- Klusoňová, H. et Lenčo, J. (2006): Praktická cvičení a otázky ze základů cytologie a genetiky, Praha.
- Knoz, J. et Opravilová, V. (1992): Základy mikroskopické techniky, Brno
- <http://www.slideshare.net/medik.cz/biologie-pro-bakale-praktikum-2>