

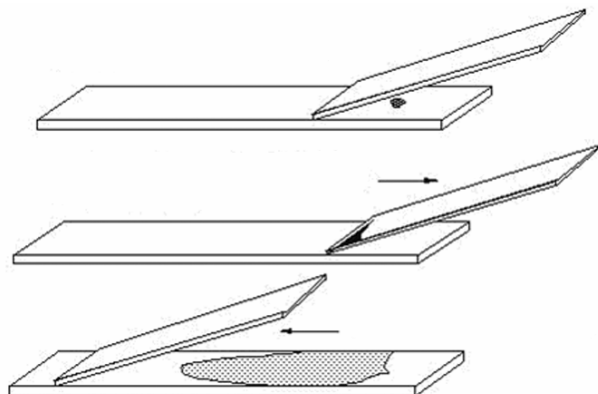
Téma: Preparáty v mikroskopii

Úvod:

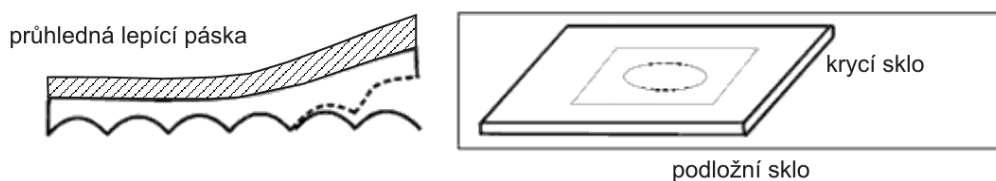
Mikroskopický preparát je objekt uložený mezi podložním a krycím sklem. Preparáty pro světelnou mikroskopii zhotovujeme buď nativní (čerstvé) nebo trvalé. U trvalých preparátů pracujeme s materiálem usmrceným, který je vždy potřeba zafixovat. Nativními preparáty mohou být živé objekty ve vodě nebo ve fyziologickém roztoku jako jsou například prvoci, řasy, buňky, listy mechu, epidermis rostlin a další. Nativní preparáty se používají například pro sledování buněčného dělení, zjišťování tvaru a struktury buněk kvasinek a při určování morfologických znaků plísní, pro klinicko-biologický průkaz vegetativních forem střevních parazitů a při studiu buněčných útvarů, které se obtížně barví. Mikroskopická technika nativního preparátu využívá odlišné světlostnosti částic v pozorovaném objektu. Pro pozorování objektů, které mají jen nepatrně odlišný index lomu od okolního prostředí je nutno k pozorování objektů použít například techniku fázového kontrastu či vitální barvení. Vitální barvení je takové barvení, které nám umožní zachytit zcela neporušené živé objekty. Mezi vitální barviva patří například neutrální červen, methylenová modř či Janusova zeleň. Nativní preparáty mají tedy tu výhodu, že pozorujeme živý objekt beze změn a poškození způsobených barvením či fixací. Naproti tomu jejich zřejmou nevýhodou je to, že jsou určeny k okamžitému pozorování a nelze je skladovat a prohlížet opakovaně a také výběr vhodných preparátů je omezený. Tento problém řeší trvalé preparáty. Trvalé preparáty byly před mikroskopickým pozorováním usmrceny, fixovány a vhodným způsobem obarveny. Každý hotový trvalý preparát je potřeba opatřit popisem, který musí obsahovat stručný název preparátu (popřípadě také datum sběru, lokalitu a jméno sběratele), dále použité uzavírací médium a u obarvených preparátů způsob barvení. Štítky s uvedenými údaji lepíme po stranách krycího skla. Při manipulaci bereme mikroskopický preparát vždy za hrany podložního skla kvůli otiskům prstů. Některé preparáty je možno pozorovat i bez krycího skla (např. krevní roztěr)

Podle způsobu přípravy můžeme rozlišit několik typů preparátů. Nátěrové a roztlačkové preparáty se připravují tak, že se vzorek například měkká tkáň či suspenze částic roztře nebo roztlačí na podložní sklo (viz obrázek č. 1). Mikroreliefní a adhezivní preparáty slouží ke studiu povrchů nebo povrchových vrstev a umožňují pozorovat značné detaily povrchu objektu. Principem přípravy mikroreliefních preparátů je nanesení tenké vrstvy rychle tuhnoucí průhledné hmoty (například bezbarvý lak na nehty, lepidlo, ..) na povrch preparátu. Po uschnutí se otisk sejme průhlednou lepící páskou a přeneseme (přilepíme) na podložní sklo (viz. obr. 2). Reliefní typ preparátu se používá například ke studiu pokožky listu. Z tkání či pletiv se připravují pevné, kontrastní, tenké řezy. Řezový preparát může být nativní (například řez listem) nebo fixovaný a zalitý do bločku. Při přípravě trvalého řezu je nutno ihned po odběru tkáň zafixovat. Fixací se rozumí rychlá denaturace bílkovin buněk a tkání s minimálními změnami struktury, které mají zabránit samovolnému rozkladu živé tkáně (autolýze). K fixaci lze použít jak fyzikálních vlivů jako je teplo, vysušení, hluboké zmrazení, mrazové vysoušení nebo mrazová substituce, tak chemických fixačních činidel. Chemická fixativa jsou například oxid osmičelý, oxid chromový, chlorid rtuťnatý či organické látky jako je například ledová kyselina octová, ethanol, methanol, formaldehyd. Tyto látky jsou jedovaté a při práci s nimi je potřeba dodržovat bezpečnostní předpisy. Po fixaci se vzorky zalévají

do bločků. Jako zalévací hmota se podle typu preparátu používá želatina nebo celoidin a nejčastěji pak parafín. Pro vytvoření kvalitního preparátu je nutné, aby zalévací hmota vždy prostoupila důkladně a homogenně celou tkáň. Bločky se na závěr krájí na ultra tenké řezy (síly několika μm) pomocí speciálních přístrojů zvaných mikrotomy. Tyto řezy se lepí na podložní sklíčka a podle potřeby dále barví.



Obr. 1: Příprava nátěrového preparátu



Obr. 2: Příprava mikoreliéfního preparátu

Úkol č. 1: Příprava nátěrového preparátu

Materiál: epitelové buňky bukální sliznice dutiny ústní

Pomůcky: sterilní tampon upevněný na tyčince; světelný mikroskop a mikroskopické potřeby

Postup:

1. Sterilním vatovým tamponem upevněným na tyčince proved'te stěr epitelových buněk bukální sliznice ústní dutiny.
2. Valivým pohybem tamponu přeneste buňky na podložní sklo.
3. Překryjte krycím sklem.
4. Preparát pozorujte pod mikroskopem.
5. Obraz schematicky zakreslete a запиšte, při jakém zvětšení jste preparát pozorovali.

Úkol č. 2: Příprava nativního preparátu a pozorování chemotaxe

Materiál: kultura nálevníků *Paramecium caudatum*

Chemikálie: jemně krystalická glukóza; voda

Pomůcky: světelný mikroskop a mikroskopické potřeby; automatická pipeta s variabilním objemem + špičky; preparační jehla

Postup:

1. Na podložní sklo naneste 50 μ l vody a ve vzdálenosti asi 0,5 cm 50 μ l kultury nálevníků.
2. Do kapky vody vložte několik krystalů glukózy a obě kapky propojte stružkou.
3. Nálevníky pozorujte pod mikroskopem při malém zvětšení (bez krycího skla).
4. Postupně přidávejte krystalky glukózy a sledujte změny chování nálevníků. Chování nálevníků popište a zdůvodněte.

Otázky:

1. Proč je nezbytné při přípravě trvalých preparátů používat fixaci?
2. Glukóza je pro nálevníky zdrojem potravy. Jak tedy vysvětlíte jejich negativní chemotaxi v roztoku této látky. Vysvětlete, proč v hypertonickém prostředí glukózy buňky nálevníků praskají.

Použitá literatura:

Knoz, J. *et* Opravilová, V. (1992). Základy mikroskopické techniky, Brno.

Vymětalová, V. (2001): Laboratorní cvičení z biologie, Praha.

Klusoňová, H. *et* Lenčo, J. (2006): Praktická cvičení a otázky ze základů cytologie a genetiky, Praha.