

ZAJĘCIA nr 1

ZAGADNIENIA TEORETYCZNE DO PRZYGOTOWANIA NA ĆWICZENIE: „Budowa i zasady posługiwania się mikroskopem optycznym”

Zasady bezpieczeństwa i higieny pracy w pracowni biologicznej. Historia rozwoju mikroskopu optycznego. Budowa i zasady posługiwania się mikroskopem optycznym (zdolność rozdzielcza mikroskopu, immersja, rodzaje obiektywów). Technika przygotowywania preparatów mikroskopowych świeżych. Mikroskop fluorescencyjny (budowa, zasada działania). Metodyka przygotowania preparatów do mikroskopii fluorescencyjnej. Komórka pod mikroskopem. Jedność i różnorodność komórek eukariotycznych. Biometria komórki.

LITERATURA

1. Kurczyńska E.U. Borowska-Wykręt D.: *Mikroskopia świetlna w badaniach komórki roślinnej*. PWN, Warszawa 2013.
2. Ostrowski K., Kawiak J.: *Podstawy cytofizjologii*. PZWL, Warszawa 1997 (i nowsze).
3. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: *Podstawy biologii komórki*. PWN, Warszawa 2009.

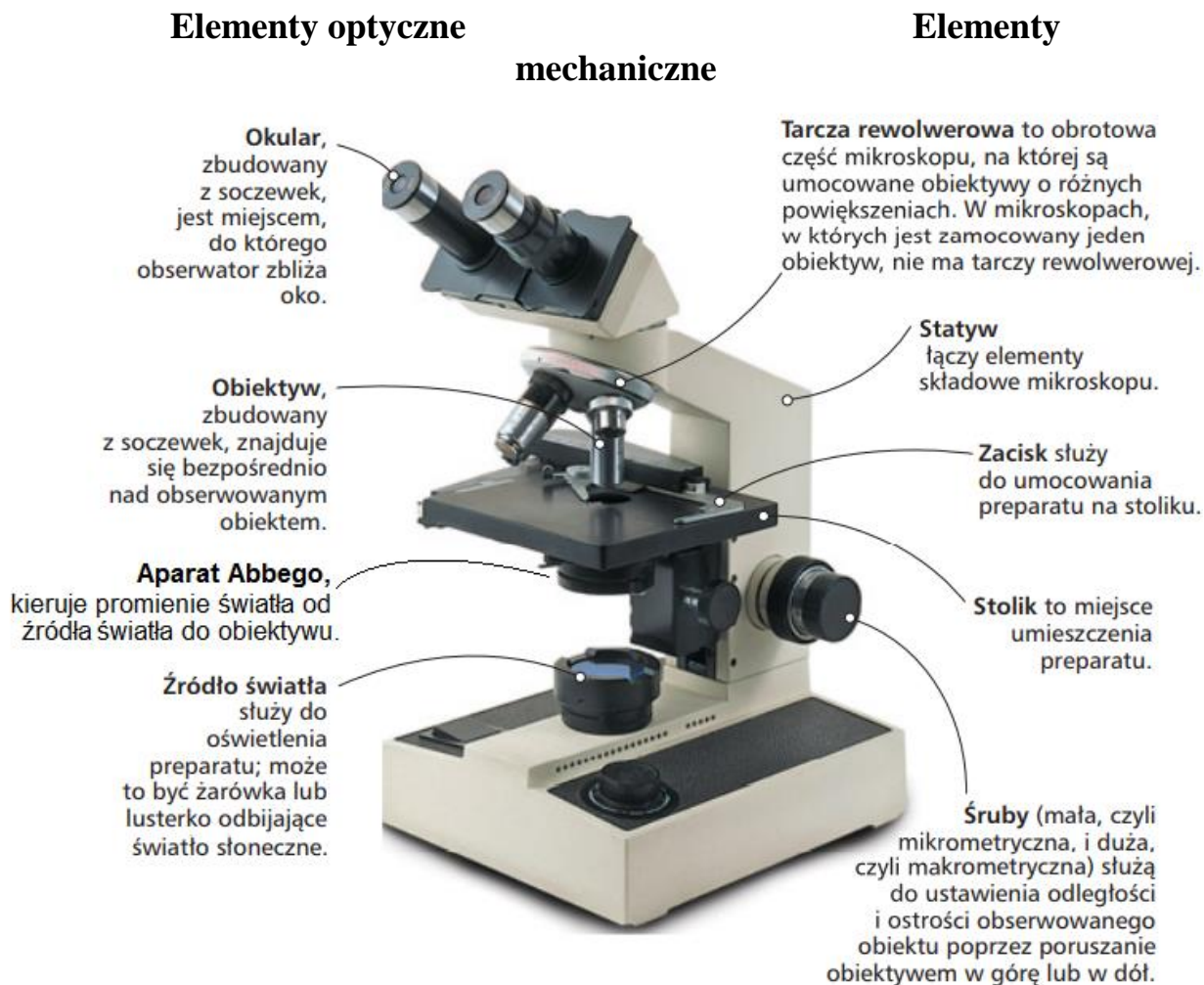
CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

I. Omówienie podstawowych zasad bezpieczeństwa i higieny pracy w pracowni biologicznej:

1. zasady zachowania się w pracowni biologicznej,
2. zabezpieczenia osobiste,
3. postępowanie z materiałem biologicznym, odczynnikami chemicznymi, mikroskopami
4. postępowanie w razie wypadku (zatrucie, skaleczenie, porażenie prądem, pożar).

II. Zapoznanie z podstawowym wyposażeniem pracowni biologicznej (mikroskopy optyczne, szkło laboratoryjne, preparaty mikroskopowe) oraz zasady jego użytkowania.

A. Budowa mikroskopu optycznego



Części mechaniczne - opis ważniejszych elementów

podstawa - zapewnia stabilność przyrządu i jest wyposażona w źródło światła

statyw - łączy wszystkie części mikroskopu, utrzymuje w stałej odległości układ optyczny obiektywów od okularów

tubus - metalowa rurka przystosowana w górnej części do zakładania okularu, w dolnej zaś zakończona tarczą obrotową zwaną rewolwerem, w której znajdują się obiektywy

stolik mikroskopowy, na którym umieszcza się oglądany preparat, wyposażony jest w urządzenie do przesuwania preparatu za pomocą pokręteł znajdujących się pod stolikiem

śruba makrometryczna umożliwia znalezienie obrazu

śruba mikrometryczna służy do ustawienia właściwej ostrości obrazów

Części optyczne - opis ważniejszych elementów

Aparat oświetlający (Abbego)

Najważniejszą z części aparatu oświetlającego jest kondensator umieszczony bezpośrednio pod stolikiem przedmiotowym. Składa się on najczęściej z kilku soczewek skupiających w specjalnej oprawie, przymocowanej do statywu za pomocą łożyska saneczkowego oraz śruby umożliwiającej opuszczanie i podnoszenie kondensatora. Jego zadaniem jest dobre i prawidłowe oświetlenie badanego preparatu przez skupienie promieni świetlnych odbitych od lusterka. Do regulowania wielkości pola oświetlanego służy przesłona (diafragma), a do tłumienia zbyt jasnego oświetlenia szklane filtry umieszczane w ramkach. Najprostszym sposobem oświetlenia preparatu jest użycie zwykłej lampy stołowej, której światło kieruje się do kondensatora przy pomocy lusterka.

Okulary

Umieszczone są w nasadce dwuocznej zwanej tubusem. Zbudowane są z zespołu soczewek płasko-wypukłych. Powiększają na zasadzie lupy obraz tworzony przez obiektyw mikroskopu, dodatkowo mogą korygować wady obrazu z obiektywu.

Obiektywy

Wszystkie obiektywy mikroskopowe składają się z kilku soczewek. Połączenie kilku soczewek w obiektywie ma na celu wytworzenie obrazu bardziej podobnego do przedmiotu oraz usunięcie niektórych wad optycznych. W mikroskopie obiektywy zamocowane są na tarczy rewolwerowej, znajdującej się nad stolikiem przedmiotowym. Obiektywy oznaczają się cyframi, co wskazuje na ich powiększenie. Powiększenie obiektywów ma zwykle wartości od 10 do 100 razy.

Specyfikacja obiektywu



Wyróżniamy:

- obiektywy suche
- obiektywy mokre (zanurzalne – immersyjne)

Obiektywy suche dają powiększenia mniejsze (od 5 do 60 razy). Między ich powierzchnią czołową, a oglądanym preparatem znajduje się powietrze. W obiektywach immersyjnych dających powiększenie od 60 do 100 razy, ilość promieni świetlnych biegnących od oglądanego preparatu do takiej soczewki jest niewielka. Aby zapobiec ich rozpraszaniu stosuje się olejek immersyjny. Soczewkę tego obiektywu zanurza się w cieczy (najczęściej jest to olejek cedrowy) poprzez umieszczenie tej cieczy na oglądanym preparacie.

Rodzaje mikroskopu optycznego:

- **ultrafioletowy** - źródłem światła są promienie UV o długości fali od 240 do 400 nm;
- **fluorescencyjny** - wykorzystuje zjawisko fluorescencji obiektów oświetlonych niewidzialnym światłem UV;
- **z ciemnym polem widzenia** - wykorzystuje się odbijanie i uginanie części promieni na drobnych przedmiotach, które dzięki temu stają się widoczne na ciemnym tle;
- **kontrastowo - fazowy**, który umożliwia obserwację ubogich w kontrasty obiektów i ich struktur bez potrzeby barwienia preparatów.

Podstawowe parametry charakteryzujące mikroskopy optyczne:

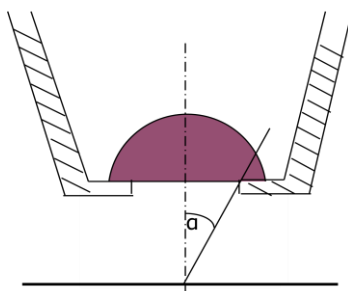
Apertura numeryczna obiektywu (NA)

Apertura numeryczna obiektywu to kąt zawarty między osią optyczną obiektywu a skrajnym promieniem świetlnym, który jeszcze wpada do soczewki czołowej obiektywu. Kąt ten zależy od współczynnika załamania światła w środowisku zawartym między preparatem a soczewką czołową obiektywu. Od apertury numerycznej zależy zdolność rozdzielcza mikroskopu oraz jasność obrazu mikroskopowego.

$$NA = n \cdot \sin \alpha$$

n – współczynnik załamania światła (dla powietrza $n = 1$, dla olejku immersyjnego $n = 1,515$)

α – kąt pomiędzy główną osią optyczną obiektywu a najbardziej skrajnym promieniem wpadającym do obiektywu po ugięciu na preparacie i biorącym jeszcze udział w tworzeniu obrazu



Graficzne przedstawienie kąta aperturowego

Zdolność rozdzielcza mikroskopu

Zdolność rozdzielcza mikroskopu to najmniejsza odległość między dwoma punktami, które dostrzegane są jeszcze jako dwa oddzielne punkty; wyraża się wzorem:

$$d = \frac{\lambda}{2NA}$$

λ - długość fali światła użytego do obserwacji

NA- apertura numeryczna

Powiększenie mikroskopu

Powiększenie całkowite (P_c) mikroskopu to iloczyn powiększeń okularu (P_{ok}) i obiektywu (P_{ob}) oraz ewentualnie powiększeń pośrednich układów optycznych.

$$P_c = P_{ok} \times P_{ob}$$

B. Obsługa mikroskopu optycznego

1. Podłącz kabel stołu roboczego do gniazdka elektrycznego.
2. Podłącz kabel mikroskopu do gniazdka elektrycznego pod blatem stołu.
3. Ustaw mikroskop na stole, tak abyś miał do niego swobodny dostęp.
4. Upewnij się, że nad stolikiem ustawiony jest obiektyw o najmniejszym powiększeniu (10x lub 5x). Jeśli nie, przekręć tarczę rewolwerową mikroskopu ustawiając odpowiedni obiektyw (słysząc wtedy charakterystyczne kliknięcie).
5. Umieść gotowy preparat mikroskopowy (szkiełkiem nakrywkowym do góry) na stoliku i umocuj go za pomocą zacisku. Upewnij się, że Twój preparat jest w centrum pola widzenia.
6. Patrząc na mikroskop z boku, podnieś (za pomocą śruby makrometrycznej) stolik z preparatem maksymalnie do góry, ale tak aby nie dotykał soczewki obiektywu (UWAGA!! Postępuj ostrożnie żeby nie zniszczyć preparatów oraz soczewek obiektywu).
7. Patrząc w okular upewnij się, że pole widzenia w mikroskopie jest jasne i właściwie oświetlone, światło nie razi w oczy, a jednocześnie dobrze oświetla pole widzenia w mikroskopie; w razie konieczności dostosuj jasność obrazu do swojego oka za pomocą pokrętki potencjometru (jeśli mikroskop go posiada) oraz aparatu Abbego. Obserwując preparat przy małym powiększeniu obiektywu, aparat Abbego opuść maksymalnie w dół; im większe będzie powiększenie obiektywu, tym aparat Abbego powinien znajdować się wyżej.
8. Po ustawieniu stolika z preparatem, patrz w okular i jednocześnie bardzo powoli opuszczaj stolik za pomocą śruby makrometrycznej, aż do momentu znalezienia obrazu (poprzez obniżanie stolika masz pewność, że nie zgnieciesz preparatu podczas obserwacji).

9. Jeśli nie znajdziesz obrazu, wówczas musisz podnieść stolik ponownie do góry, blisko obiektywu, ale tak żeby preparat go nie dotykał i ponownie, powoli opuszczaj stolik z preparatem aż do chwili uzyskania obrazu.
10. Od tej chwili należy używać wyłącznie śruby mikrometrycznej w celu uzyskania ostrości obrazu.
11. Jeśli obraz wymaga większego powiększenia zmień obiektyw i ustaw ostrość wyłącznie śrubą mikrometryczną.
12. Skonsultuj otrzymany obraz z prowadzącym zajęcia.
13. Po skończonej obserwacji przekręć tarczę rewolweru na obiektyw o najmniejszym powiększeniu.
14. Stolik opuść śrubą makrometryczną maksymalnie do dołu, wyjmij preparat, wyczyść mikroskop.
15. Wyłącz mikroskop wyłącznikiem na podstawie i przykryj workiem ochronnym.
16. Odłącz kabel od stołu roboczego.
17. Preparaty trwale odnieś do teczek, szkiełka podstawowe z preparatów świeżych umyj pod bieżącą wodą i wytrzyj do sucha bibułą.

UWAGI:

- Nie dotykaj palcami soczewek, nie odkręcaj obiektywów.
- Jeśli nie używasz mikroskopu wyłącz źródło światła i przykryj mikroskop workiem ochronnym.
- Zawsze podczas przenoszenia mikroskopu trzymaj go obiema rękami. Jedną ręką chwyć statyw, a drugą podtrzymuj podstawę mikroskopu.
- Zawsze zaczynaj mikroskopować od najmniejszego obiektywu.

C. Dokumentacja obserwacji mikroskopowych

Wyniki obserwacji zapisuje się w postaci rysunku. Dobrze wykonany rysunek pomaga zrozumieć budowę obserwowanego organizmu lub jego fragmentu (komórki).

Zasady wykonywania rysunku biologicznego:

- wykonuj rysunek ołówkiem w trakcie obserwacji
- rysuj tylko i wyłącznie to, co widzisz
- staraj się zachować właściwe proporcje wszystkich elementów rysowanego obiektu
- rysuj ciągłymi liniami, nie szkicuj
- nie koloruj ani nie cieniuj rysunku
- opisuj rysunek za pomocą ciągłych linii (wskaźników), które powinny się znajdować wyłącznie z prawej strony rysunku
- linie wskaźników nie mogą się przecinać
- rysunek należy podpisać i podać powiększenie, pod którym obserwowano preparat

D. Obserwacja mikroskopowych preparatów trwałych przy powiększeniu obiektywu 10x, 20x, 40x

- ✓ Obserwacja mikroskopowa tkanki prawidłowej i nowotworowej pacjentów z rakiem nerki, rakiem jelita grubego oraz nerki prawidłowej i niedokrwionej szczura z nadciśnieniem naczyniowo-nerkowym. Preparaty barwione metodą H+E.

- ✓ Pleśniak biały *Mucor mucedo*
Obserwacja strzępek grzybni, zarodni z zarodnikami

E. Obserwacja mikroskopowych preparatów trwałych z zastosowaniem immersji olejkowej

Immersja - polega na tym, że przestrzeń zawartą między soczewką czołową obiektywu a preparatem wypełniamy cieczą immersyjną, tzn. o dużym współczynniku załamania światła (większym od 1). Na przykład w wody wynosi 1,33 zaś olejku immersyjnego 1,55. Zastosowanie immersji powoduje zwiększenie zdolności rozdzielczej mikroskopu. Poza tym, jeśli stosujemy immersję, to do obiektywu wchodzi szersze wiązki światła i dzięki temu uzyskujemy lepszą jasność obrazu. Dzieje się tak dlatego, że immersja zwiększa aperturę numeryczną obiektywu, a jasność obrazu w danym powiększeniu jest proporcjonalna do kwadratu apertury.

Instrukcja mikroskopowania z olejkim immersyjnym

1. Znajdź ostrość obrazu pod powiększeniem obiektywu 10x, 20x, 40x.
 2. Na szkiełko nakrywkowe preparatu nałóż 1-2 krople olejku immersyjnego.
 3. Umocuj preparat przy pomocy zacisków na stoliku.
 4. Zmień obiektyw na 100x.
 5. Śrubą mikrometryczną delikatnie ustaw ostrość obrazu.
 6. Obserwuj charakterystyczne elementy preparatu, poruszając stolikiem przedmiotowym wzdłuż i wszerz.
 7. Przed wyjęciem preparatu z zacisków podnieś tubus.
 8. Po zakończeniu mikroskopowania, oczyść obiektyw i szkiełko nakrywkowe alkoholem.
-
- ✓ Trofozoit rzęsiątka pochwowego *Trichomonas vaginalis*
Obserwacja różnorodności kształtów trofozoitów

F. Wykonanie preparatu świeżego

1. Umieścić szkiełko podstawowe na ręczniku papierowym na Twoim stole. Na środek szkiełka podstawowego nanieść pipetą kroplę wody.
2. Liść pelargonii delikatnie natnij skalpelem i wytnij możliwie najcieńszy fragment epidermy. Pamiętaj, że epiderma nie zawiera chloroplastów, a Twój skrawek powinien być przezroczysty.
3. Za pomocą pensety przenieś skrawek do kropli wody.
4. Przykryj skrawek szkiełkiem nakrywkowym (zrób to ostrożnie, ale energicznie, żeby nie zostały pęcherzyki powietrza, które utrudniają oglądanie preparatów).
5. Usuń delikatnie nadmiar wody ręcznikiem papierowym. Preparat jest gotowy do obserwacji. Oglądaj go pod powiększeniem obiektywu 10x, 20x, i 40x.

UWAGA:

Pamiętaj, aby podczas obserwacji preparatów świeżych nie dopuścić do wyschnięcia obserwowanych skrawków. Wodę można nanieść na preparat umieszczając pipetkę przy krawędzi szkiełka nakrywkowego.

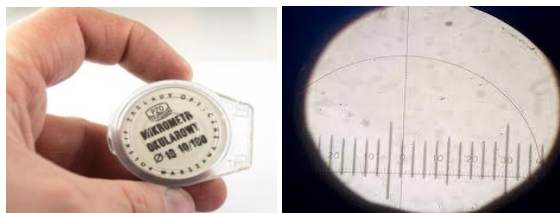
G. Obserwacja preparatów świeżych

- ✓ Epiderma liścia pelargonii *Pelargonium* sp.
Obserwacja komórek epidermy z włoskami mechanicznymi i wydzielniczymi
- ✓ Komórki epidermy liścia kosańca niemieckiego *Iris germanica*
Obserwacja kształtu i budowy komórek epidermy

H. Pomiar komórki pod mikroskopem optycznym

Aby zmierzyć badany obiekt należy posłużyć się mikrometrem okularowym.

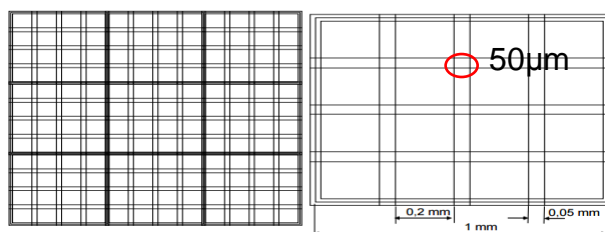
Mikrometr okularowy jest małym, szklanym krążkiem zaopatrzonym w skalę. Mikrometr umieszcza się w obudowie okularu. Większość mikrometrów zawiera skalę składającą się z 100 jednostek (kreszek). Wykorzystanie mikrometru musi być poprzedzone określeniem odległości między sąsiednimi kreskami skali, oddzielnie dla każdego obiektywu. Aby ustalić tę odległość należy wyznaczyć współczynnik mikrometryczny.



Mikrometr okularowy

1. Wyznaczenie współczynnika mikrometrycznego

- Na stoliku przedmiotowym mikroskopu należy położyć skalę przedmiotową (skala obiektywowa - komora Bürkera). Odszukać mały kwadrat o znanej długości boku ($50\text{ }\mu\text{m}$)



Komora Bürkera

- Wyjmij z tubusu okular i włóż między jego soczewki mikrometr okularowy (skala okularowa)
- Określ, ile działek mikrometru okularowego pokrywa się z bokiem kwadratu komory Bürkera
- Teraz możesz wyliczyć współczynnik mikrometryczny
- Jest to iloraz długości boku kwadratu i liczby działek mikrometru okularowego, które mieszczą się w tym boku (np. 10 działek mikrometru mieści się w jednym boku kwadratu, wtedy współczynnik mikrometryczny wynosi $50/10=5$)
- Znając odległość między działkami mikrometru przedmiotowego (5), możemy obliczyć wymiary interesującego nas obiektu

2. Pomiar dowolnej komórki przy danym powiększeniu mikroskopu

- Wyjmij skalę obiektywową (komorę Bürkera)
- Na stoliku przedmiotowym mikroskopu umieść preparat mikroskopowy
- Zmierz dowolną komórkę (długość, szerokość) za pomocą mikrometru okularowego przy danym powiększeniu obiektywu mikroskopu np. 20x, 40x
- Policz, ile podziałek skali mikrometru okularowego odpowiada np. długości zmierzonej komórki
- Oblicz wymiary komórki, uwzględniając współczynnik mikrometryczny (ilość podziałek mieszczących się w długości komórki x współczynnik mikrometryczny)

- ✓ Zmierzenie komórki epidermy liścia pelargonii *Pelargonium* sp.
- ✓ Zmierzenie komórki epidermy liścia kosańca niemieckiego *Iris germanica*