



Cvičení 2: Optická mikroskopie

Cílem praktického cvičení je seznámení se s optickým mikroskopem a jeho částmi. Poté bude provedeno pozorování kultivované buněčné kultury a buněk z bukální sliznice při různých zvětšeních pomocí optického mikroskopu, zakreslení buněk a jejich organel a pozorování změny morfologie buněk po použití toxické látky.

Optický mikroskop

Mikroskop, který je na Obrázku 1 se skládá z optické soustavy, osvětlovací soustavy a mechanického zařízení.

Optická soustava je složena ze tří hlavních součástí:

Objektiv vytváří zvětšený, skutečný a převrácený obraz předmětu, který se klade za jeho předmětové ohnisko ve vzdálenosti optické délky-D od obrazového ohniska.

Okulár umožňuje pozorování obrazu pouhým okem. Předmětem pro okulár se stává obraz vytvořený objektivem. Okulár tento obraz mění na zvětšený, převrácený a zdánlivý.

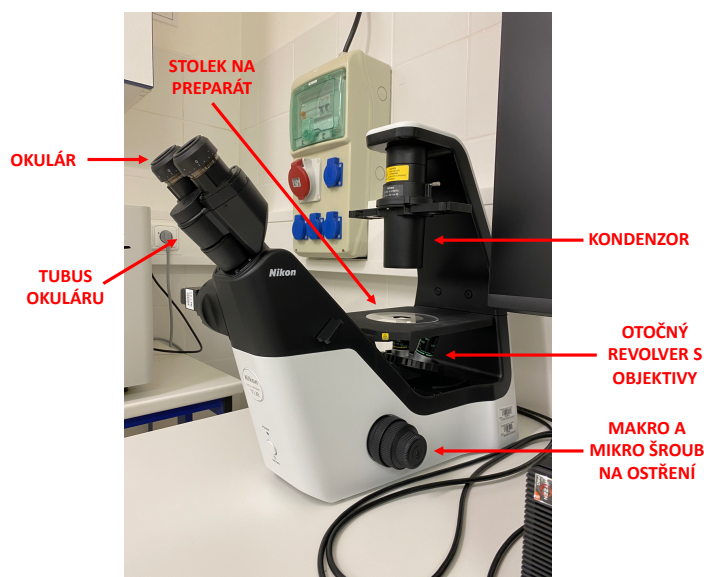
Tubus nastavuje vzájemné polohy objektivu a okuláru (veličina D optická délka /interval mikroskopu). Optická délka tubusu leží obvykle v rozmezí hodnot 150 až 200 mm. Konstrukce optických soustav také závisí na způsobu využití mikroskopu:

- Pro pozorování jedním okem – monokulární mikroskopy
- Pro pozorování oběma očima – binokulární mikroskopy – jsou výhodnější, protože při pozorování dochází k menší únavě.

Osvětlovací soustava - zajišťuje osvětlení pozorovaného předmětu:

Mikroskopem můžeme pozorovat předměty průhledné i neprůhledné. V prvním případě se předmět osvětluje procházejícím světlem a v druhém případě světlem odraženým.

Konstrukce osvětlovací soustavy závisí zřejmě na tom, k jakému druhu pozorování bude mikroskop použit. Především záleží na tom, půjde-li o pozorování v procházejícím nebo v odraženém světle. Kromě toho je v obou případech možné konstruovat osvětlovací soustavu pro práci v tmavém nebo ve světlém poli. Velmi často jsou mikroskopy zařízeny pro práci v polarizovaném světle (světelné vlny kmitají obvykle ve všech směrech kolmých na jejich směr šíření), v takovém případě bývají osvětlovací soustavy vybaveny polarizátorem (snižuje oslnění vyvolané rozptýleným nebo odraženým světlem). Pro náročnější účely se k osvětlení preparátu využívá především umělých zdrojů, které bývají většinou malých rozměrů.



Obrázek č. 1: jednotlivé části optického mikroskopu

Pro pozorování buněčných preparátů se hojně využívá inverzního mikroskopu. Jedná se o typ optického mikroskopu, který se od klasického typu liší tím, že má optickou soustavu obráceně, tj. objektivy jsou pod pozorovaným objektem a zdroj světla s kondenzorem nad ním. Umožňují pozorování v procházejícím světle ve světelném poli a využívají metodu fázového kontrastu.

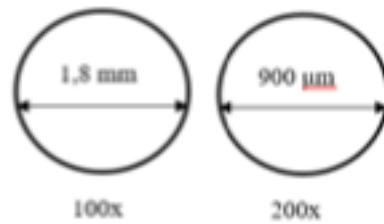
Pozorování buněčné linie 3T3

Jedná se o buněčnou linii myších fibroblastů (fibroblast = základní buňka vazivové tkáně produkující extracelulární matrix např. kolagen), jejíž název je odvíjen od způsobu kultivace, tzv. 3T3 protokolu. Každý třetí den byly buňky pasážovány a bylo přenášeno (z angl. „transfer“) 3×10^5 buněk do nové kultivační lahvičky. Tato buněčná linie může růst v podmínkách *in vitro* neomezeně, přestože se nejedná o nádorovou linii. Myší 3T3 fibroblasty patří k adherentním buňkám. Mikroskopicky lze pozorovat buněčné jádro s jadérky a četné výběžky cytoplazmy.

Připravte buněčnou suspenzi 3T3 myších fibroblastů do patřičné laboratorní nádoby a nádobu vložte na pracovní stůl mikroskopu. Pozorujte různá místa preparátu při zvětšení 10x a 20x a zakreslete alespoň dvě odlišné buňky, popište jejich orgány a všimněte si jejich morfologie. Zkuste najít i dělící se buňky. Poté k preparátu přidejte patřičný objem etanolu a pozorujte změnu morfologie buněk, tu také zakreslete a porovnejte s původním nákresem.

Stěr z bukální sliznice

Před odebráním bukální sliznice (sliznice tváře) si důkladně vodou vypláchněte ústa, aby byly odstraněny bakterie a zbytky jídla. Potom jedním koncem vatové tyčinky několikrát seškrábnete povrch bukální sliznice a získaný materiál rychle rozetřete v tenké vrstvě na čisté podložní sklo. Tento nativní preparát pozorujete v normálním světelném poli. Zakreslete buňky s pozorovanými detaily, uveďte zvětšení mikroskopu a odhad velikosti buňky.



Obrázek č. 2: velikosti zorného pole při daném zvětšení

Vypracování protokolu

- 1) Formální stránka (úprava, hlavička, úvod, popis praktické části, závěr)
- 2) Faktická stránka (nákres a popis 3T3 linie, před a po působení ethanolu, nákres a popis buněk z bukální sliznice)
- 3) Úvod – zadání cvičení, praktická část – popis cvičení a jednotlivých kroků, závěr – shrnutí cvičení, komentář a odpověď na případné otázky