

Тема: Особенности работы с микроскопом при биологических исследованиях.

Методика приготовления временных препаратов.

Задание:

1. Изучить устройство светового микроскопа.
2. Ознакомиться с работой микроскопа. Обратить особое внимание на последовательность выполнения операций при настройке микроскопа, при микрофотографировании, при завершении наблюдений.
3. Изучить правила оформления цитологического рисунка.
3. Приготовить временный препарат, используя фрагмента марли, волоса человека, растительной ткани.
4. Рассмотреть и зарисовать объекты при малом и большом увеличениях объектива.
5. Рассмотреть и зарисовать при малом и большом увеличениях объектива постоянный микропрепарат «кровь лягушки», обозначить на рисунке форменные элементы крови, обозначить цитоплазматическую мембрану, ядро, цитоплазму эритроцита.

Форма контроля:

- наблюдение преподавателя во время выполнения студентами заданий;
- устная защита лабораторной работы;
- контроль выполнения записей и рисунков в тетради

Теоретическая часть.

Обычно световой поток от источника света при отсутствии препарата образует в поле зрения микроскопа равномерный фон - «невозмущенный свет». При установлении препарата неоднородные частицы объекта, отличающиеся друг от друга и от окружающей среды по поглощению света и показателю преломления, образуют рассеянный свет, который и создает изображение. Изображение объекта в микроскопе увеличенное, обратное, мнимое. При микрофотографировании объекты исследования подразделяют на: прозрачные и непрозрачные, амплитудные и фазовые, изотропные и анизотропные. Для разных объектов, обладающих неодинаковой способностью рассеивать свет, применяют свои, характерные методы наблюдения. *Метод светлого поля в проходящем свете* наиболее распространенный и доступный для наблюдения. Метод светлого поля в проходящем свете используется для изучения прозрачных объектов. К прозрачным объектам относятся срезы и отдельные клетки растений, животные ткани и др. В цитологии, эмбриологии, анатомии и цитохимии метод светлого поля в проходящем свете широко применяется для изучения окрашенных препаратов. Для изучения непрозрачных биологических объектов можно применить метод светлого поля в отраженном (косом) свете. Косое освещение достигается путем смещения апертурной диафрагмы в направлении, перпендикулярном к оптической оси, для этого используется конденсор ОИ-14. *Метод темного поля* разработан австрийским ученым Р. Зигмонди и используется для получения изображения прозрачных объектов, плохо видимых при наблюдении в светлом поле, например, живых клеток. В данном методе используется темнопольный конденсор ОИ-13, освещающий объект сбоку. При наблюдении объектов методом темного поля невозмущенные лучи осветителя не попадают в объектив и изображение создается только рассеянными лучами, идущими от объекта. В объектив попадает свет, отраженный от объекта и создается возможность увидеть на темном поле светящиеся ультрамикроскопические частицы, размер которых меньше предельной разрешающей способности объектива. В темном поле можно вести наблюдения за изменением степени дисперсности коллоидов протопласта, наблюдать явление коагуляции, погибающие и нормальные клетки, т.к. протопласт погибающих клеток светится ярко, а нормальных слабо. В темном поле можно наблюдать митохондрии, бактерии. *Метод фазового контраста и интерференционная микроскопия* применяется для наблюдения прозрачных объектов. В живых клетках, применяя этот метод, можно увидеть процесс митоза, хромосомы, митохондрии, включения, изучать действие на них физических и химических объектов и фиксаторов. Объективы для фазового контраста имеют фазовую пластинку в виде кольца. Апертурная диафрагма на конденсоре тоже кольцевая. Для проведения исследований необходимо к микроскопу иметь фазово-контрастное устройство

КФ-4, КФ-5. К методу фазового контраста близок принцип действия интерференционного микроскопа.

Метод наблюдения в поляризованном свете используется для изучения объектов, обладающих двойным лучепреломлением. Метод применяется для изучения структуры митотического веретена, фибриллярных белков, крахмала, кристаллов. Для этого используются специальные устройства: поляризатор и анализатор. Работая этим методом используют красители метиленовый синий, акридиловый оранжевый, риванол и др. *Метод флуоресцентной и ультрафиолетовой микроскопии* основан на том, что препарат рассматривается в свете, излучаемом самим препаратом, так как ряд соединений в клетке при освещении коротковолновыми лучами фиолетовыми, ультрафиолетовыми и др. лучами способны светиться (флуоресцировать) под микроскопом желто-зеленым или оранжевым светом на темном фоне. Собственная флуоресценция происходит потому, что молекулы объекта после поглощения света.

Устройство биологического рабочего микроскопа (на примере МБР-1)

1. Механическая система, рис. 1:

1. Основание или подставка.
2. Коробка с микрометрическим механизмом.
3. Тубусодержатель. Он подвижно соединен с микрометрическим механизмом.
4. Головка, которая присоединяется к тубусодержателю.
5. Стопорный винт.
6. Тубус. Тубус фиксирован подвижно. Ослабив стопорный винт, можно вынуть тубус и гнезда и заменить его, при необходимости, другим.
7. Специальный винт для центрирования головки. (Винт используется только специалистом при настройке и регулировке микроскопа).
8. Революционная пластинка или револьвер, в гнезда которого ввинчивается объектив.
9. Столик микроскопа (предметный столик), имеет отверстие для размещения изучаемого объекта - микропрепарата.
10. Микропрепарат.
11. Зажимы или клеммы для фиксации микропрепарата.
12. Винты для плавного передвижения во всех направлениях в горизонтальной плоскости диска верхней части столика. Этот механизм используется при работе с объективами большого увеличения.
13. Винт для закрепления вращающегося диска предметного столика при обычной работе.
14. Рукоятки макрометрического винта (кремальеры). Вращая кремальеры можно быстро поднимать и опускать тубусодержатель вместе с тубусом и таким образом осуществлять грубую фокусировку.
15. Микрометрический винт (винт точной фокусировки). С помощью микрометрического винта можно плавно поднимать и опускать предметный столик и осуществлять точную фокусировку. Микрометрическим механизмом пользуются при работе с сильными объективами.
16. Рукоятка, с помощью которой опускают и поднимают конденсор.

2. Наблюдательная система микроскопа.

Служит для получения увеличенного изображения исследуемого материала. Наблюдательная система имеет следующее устройство:

17. Окуляр, который вставлен в отверстие тубуса. В учебном процессе обычно используются окуляры, дающие увеличение в 7, 10, 15 раз ($\times 7$, $\times 10$, $\times 15$).
18. Объектив, который ввинчен в гнездо революционной пластинки. В учебном процессе обычно используются объективы малого увеличения ($\times 8$), большого увеличения ($\times 20$, $\times 40$) и масляноиммерсионный объектив ($\times 90$).

Общее увеличение микроскопа при той или иной комбинации окуляра и объектива равно произведению увеличений каждого из них.

3. Осветительная система микроскопа служит для направления световых лучей на исследуемый объект и состоит из следующих узлов:

19. Подвижное зеркало. Имеет две поверхности - плоскую и вогнутую. При работе в рассеянном свете устанавливается вогнутая поверхность зеркала, а при использовании специального источника света - плоская.
 20. Конденсор. Представляет собой систему линз, собирающих лучи и направляющих их в объектив через отверстие в предметном столике и исследуемый объект.
 21. Винт для фиксирования конденсора.
 22. Апертурная ирисовая диафрагма конденсора, которая помогает регулировать освещенность объекта. Это достигается с помощью специальной ручки.
 23. Перемещающая специальную ручку (23) диафрагмы конденсора можно регулировать величину проходящего через неё светового потока.
- Интенсивность освещенности объекта можно регулировать также и перемещением конденсора вверх и вниз с помощью рукоятки (16).

При перемещении конденсора вверх освещенность объекта увеличивается, а при перемещении его вниз - уменьшается.

Микроскоп является точным прибором, узлы и устройства наблюдательной системы и осветительной системы имеют общую оптическую ось, поэтому он требует бережного использования, а также соблюдения определенных правил работы с ним.

4. Правила при работе с микроскопом.

1. Следует переносить микроскоп с одного места на другое, удерживая его одной рукой за тубусодержатель, а другой – за основание. Ни в коем случае нельзя перемещать микроскоп, удерживая его рукой только за тубус.
2. Рукоятку микрометрического винта нельзя грубо вращать (при одном обороте винта столик перемещается на 0,1 мм, что вполне достаточно для точной фокусировки). Рукоятку микрометрического винта вращают вверх-вниз всего лишь на четверть оборота.
3. При переводе объектива револьверную пластинку следует вращать плавно, не допуская повреждения защелкивающего механизма.
4. Во избежание повреждений линз объектива и микропрепарата не следует опускать тубус, глядя в окуляр.
5. Оптические стекла микроскопа протирают специальной фланелевой салфеткой, либо чистой марлевой салфеткой, без какого-либо нажима (перед протиранием можно подышать на линзы). Сильно загрязненные линзы протирают салфеткой, слегка смоченной в бензине, а затем чистой сухой салфеткой. Ни в коем случае нельзя развинчивать объективы (это заканчивается их порчей).
6. После работы с иммерсионным объективом (x90) с него удаляют иммерсионное масло сначала чистой фильтровальной бумагой, а затем марлевой салфеткой, слегка смоченной в бензине. Если масло осталось на объективе и засохло, удалить его сможет только специалист. Нельзя погружать в масло неиммерсионные объективы (x8, x20, x40). Если по ошибке это все же произошло, следует немедленно удалить масло с линзы объектива салфеткой, смоченной в бензине, а затем тщательно протереть сухой чистой салфеткой.
7. После окончания работы микроскоп необходимо закрыть специальным чехлом. Микроскопы хранят в закрытых от пыли шкафах.

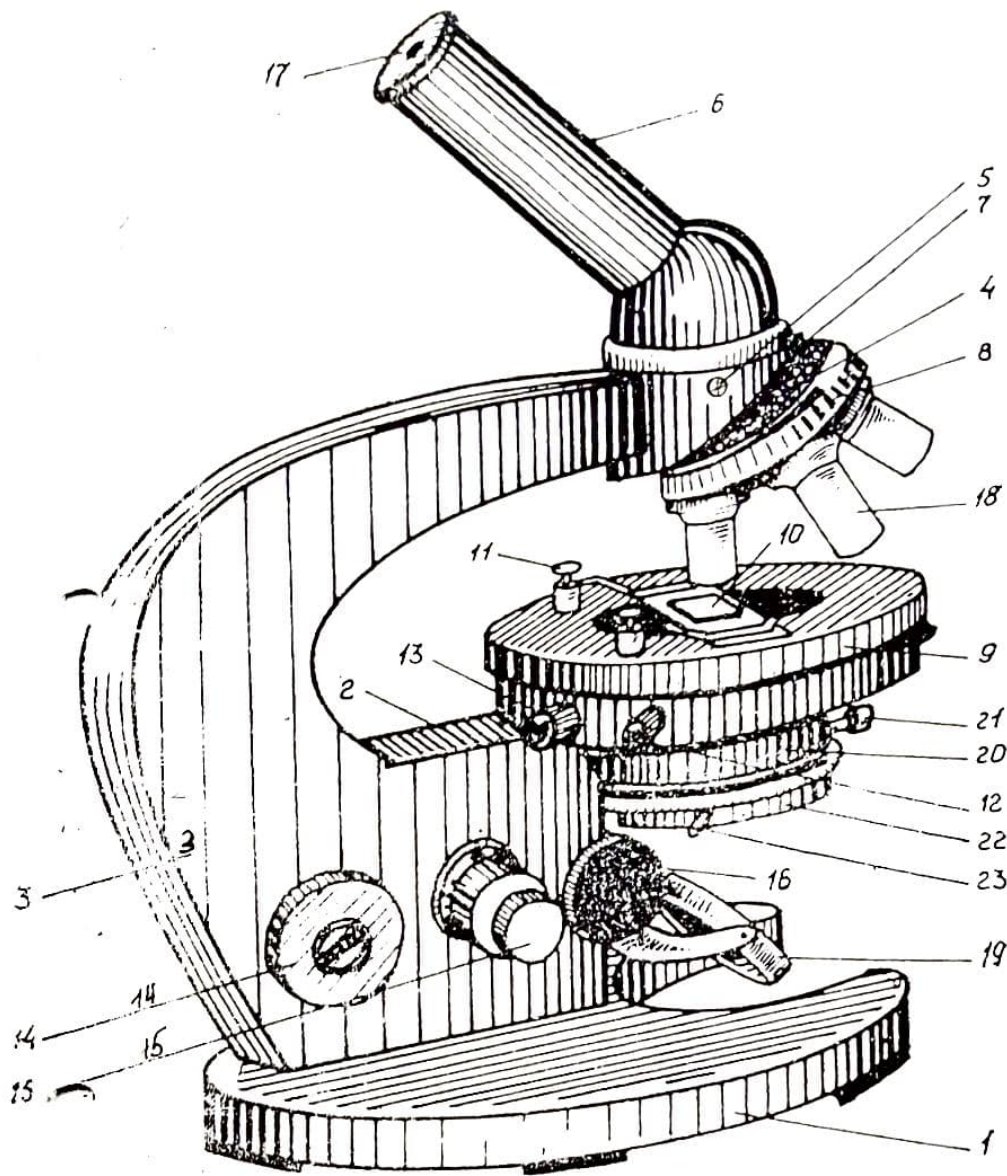


Рис. 1. Устройство биологического рабочего микроскопа МБР-1

5. Работа с микроскопом МБР-1

1. Установка микроскопа в рабочее положение.

1. Установите микроскоп на поверхности рабочего стола против своего левого плеча (тубусом к себе, предметным столиком от себя).

2. Поворотом револьверной пластинки поставьте объектив малого увеличения (x8) над отверстием предметного столика таким образом, чтобы он занимал срединное (центрирование) положение по отношению к тубусу (при этом срабатывает защелкивающий механизм). С помощью рукоятки макрометрического винта установите расстояние между объективом и поверхностью предметного столика около 1 см. Следует помнить, что изучение любого препарата начинается с использования объектива малого увеличения.

3. Откройте полностью апертурную диафрагму под конденсором и поднимите конденсор вверх до упора.

4. Глядя в окуляр левым глазом и одновременно вращая в разных направлениях вогнутую поверхность зеркала, нужно добиться яркого и равномерного освещения всего поля зрения. Установленное освещение должно сохраняться до конца работы с микроскопом.

Если же оно случайно будет нарушено, то всю процедуру настройки освещения нужно повторить с самого начала, используя объектив малого увеличения.

2. Работа с объективом малого увеличения.

1. С помощью рукоятки макрометрического винта поднимите тубус с отцентрированным объективом малого увеличения и поместите препарат в центре предметного столика.
2. Опустите конденсор, оставляя диафрагму открытой.
3. Вращая рукоятку макрометрического винта от себя и глядя на препарат сбоку, чтобы не раздавить его, опустите объектив примерно на 0,5 – 1 см до покровного стекла.
4. Глядя левым глазом в окуляр и вращая рукоятку винта на себя, медленно поднимайте объектив до появления резкого изображения, фокусное расстояние при этом составляет 5 – 8 мм. Если после прохождения фокусного расстояния не удалось увидеть изучаемый объект, работу следует повторить, начиная с пункта 2.
5. При необходимости микроскоп можно сфокусировать вначале на край покровного стекла, а затем разыскать объект, осторожно передвигая препарат рукой.
6. Изучая препарат при малом увеличении, подходящий участок препарата поставьте в центре поля зрения, зафиксируйте препарат на столике клеммами.

3. Работа с объективом большого увеличения (x20. x40)

1. Осторожным движением револьверной пластинки поставьте в рабочее положение объектив x20. Поднимите конденсор вверх до упора. С помощью **микровинта** добейтесь появления резкого изображения объекта, вращая микровинт в обе стороны не более, чем на пол оборота. Если после прохождения фокусного расстояния, которое составляет ~ 1 мм, не удалось увидеть изучаемый объект, работу следует повторить, начиная с пункта 2. Резкость света регулируем с помощью винта конденсора. Если микроскоп укомплектован объективами x20 и x40, то объективы устанавливают последовательно, сначала x20, а затем x40; при этом следует помнить, что изучаемую область препарата все время необходимо перемещать в центр поля зрения микроскопа.
2. Изучая выбранный участок препарата можно, при необходимости, передвигать его, пользуясь двумя винтами для перемещения диска столика.
3. Закончив изучение препарата, необходимо, вращением револьверной пластинки, вернуть объектив малого увеличения в следующей последовательности: 40 → 20 → 10. Лишь только после этого препарат может быть снят с предметного столика. Ни в коем случае не следует снимать препарат со столика при опущенном объективе большого увеличения, т. к. ведет к порче препарата и объектива.

6. Правила оформления цитологического рисунка.

Несмотря на все современные технические достижения, ценность биологического рисунка не пропадает, так как он является не просто упрощенным изображением объекта, а результатом анализа, выполненного самым сложным на сегодняшний день анализатором изображений – человеческим мозгом. Студентам важно заниматься именно зарисовкой биологических объектов, так – как выполняя эту работу, они внимательно всматриваются в препарат и замечают такие детали, на которые не всегда обратили бы внимание при беглом просмотре препарата.

Рисунок в течение нескольких столетий был одним из основных инструментов в руках исследователей и фактически единственным способом регистрации собственных наблюдений. В результате на грани науки и изобразительного искусства сформировалась традиция научного рисунка, частью которой является биологический рисунок. По словам Максимилиана Волошина «научный рисунок - художественная дисциплина, которую еще не знает современная живописная школа». В настоящее время большинство художников-создателей современного биологического рисунка - являются по образованию биологами.

Научиться рисовальной технике можно, с самого начала следуя достаточно простым рекомендациям.

Основными требованиями к научному рисунку являются информативность, четкость, лаконичность и научная достоверность.

Бумагу для рисунка лучше всего выбирать максимально белую, плотную, гладкую и немелованную. Начинать рисунок нужно с прорисовки общих контуров объекта, при этом линии замкнутых контуров должны быть сплошными и не обрываться. Следует избегать повторного обведения контура, так – как оно создает дополнительные несуществующие структуры. При более детальной прорисовке объекта следует сразу же дифференцировать линии по толщине (основные контуры рисуются более толстыми, а структурные детали – более тонкими линиями). Для этого следует либо изменять силу нажима карандаша, либо применять для тонких линий карандаш с более тонким и твердым грифелем. На те участки, где рисунок должен быть темнее, ставят много точек как можно ближе друг к другу, а там, где объект имеет более светлые области, точек ставится мало. На самые светлые области рисунка точки вообще не наносятся. Наиболее темные внутренние контуры рисунка можно выделить точками более крупного размера. В биологии используют препараты различных типов: живой, мазок, отпечаток, тотальный препарат (временный или постоянный), гистологический срез. Препараты могут быть окрашены различными красителями, но в любом случае, рисунок выполняется черным грифелем, либо черной тушью (в публикациях, отчетах, диссертациях, дипломных работах и др.)

При оформлении рисунка необходимо соблюдать следующие правила:

1. На поле, где находится рисунок объекта, ставятся только сноски в виде цифр или букв, указывающие на определенную структуру.

2. Под рисунком указывается его номер и название.

После названия раскрываются названия структур в соответствии с номером сноски. Далее указывается увеличение объекта, например, Об.8, Ок.20.

Внимательно рассмотрите примеры оформления рисунков, прежде чем выполнить свои рисунки в рабочей тетради.

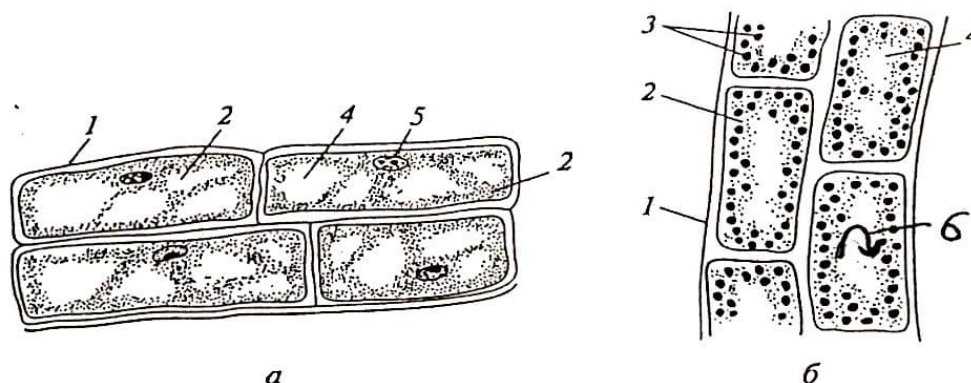


Рис. 2. Строение растительных клеток:

А – эпидермис лука, Б – лист элодеи; 1 – клеточная стенка, 2 – цитоплазма, 3 – хлоропласты, 4 – вакуоли с клеточным соком, 5 – ядро с ядрышком, 6 – циклоз.
Об..., ок....

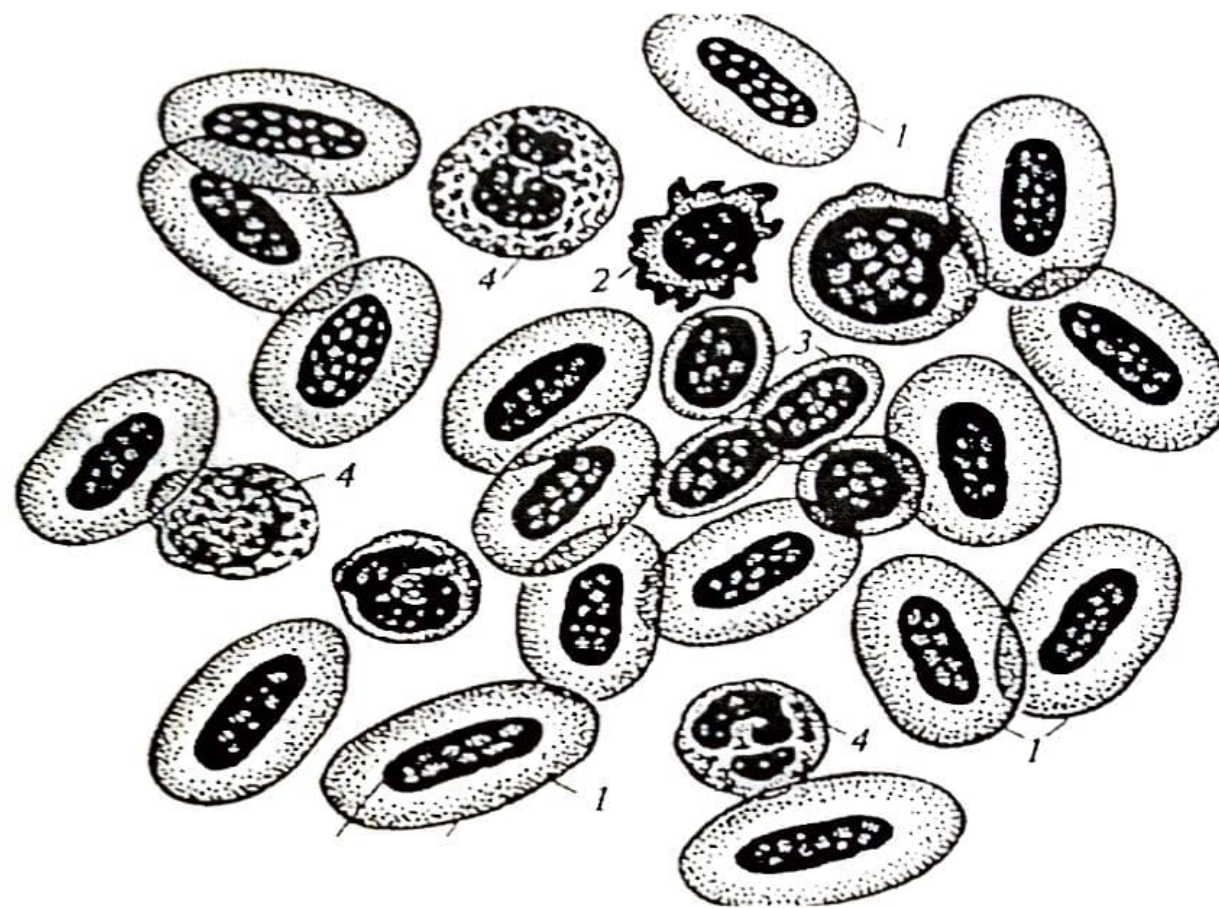


Рис.3. Кровь лягушки.

1 – эритроцит, 2 – лимфоцит, 3 – тромбоцит, 4 – лейкоцит.

Увеличение: об. –....., ок. –.....