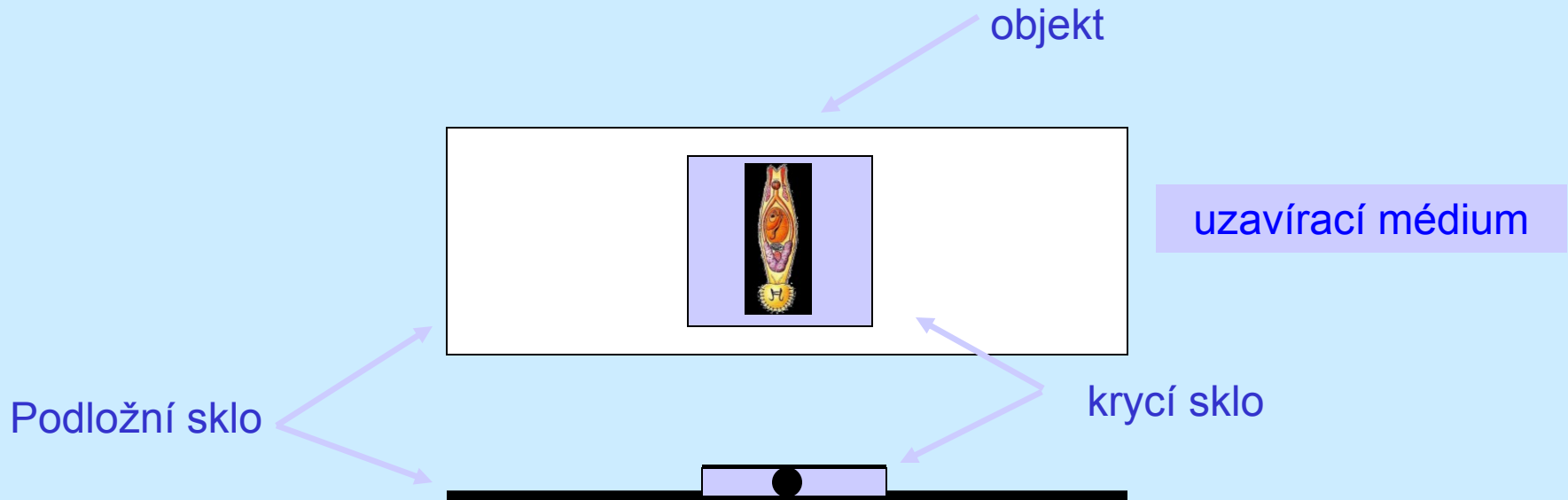


Příprava mikroskopických preparátů

zhotovení - objekt uzavřeme do vhodného média mezi podložní a krycí sklo a prohlížíme

uzavírací médium - tekuté nebo tuhnoucí,

x mikroskopické preparáty bez média



Druhy preparátů

Podle trvanlivosti:

•dočasné – nativní – živý materiál



Objekt: trepka

Médium: voda

•trvalé – fixovaný materiál



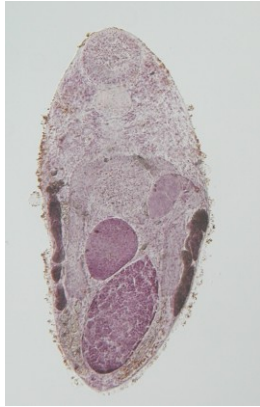
Objekt:
Lamproglena
(Copepoda)

Médium:
kanadský
balzám

Druhy preparátů

Podle způsobu přípravy:

- **totální (celé objekty)**



Objekt: motolice

Médium:
kanadský
balzám



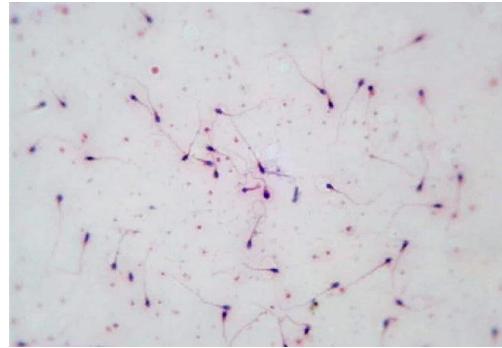
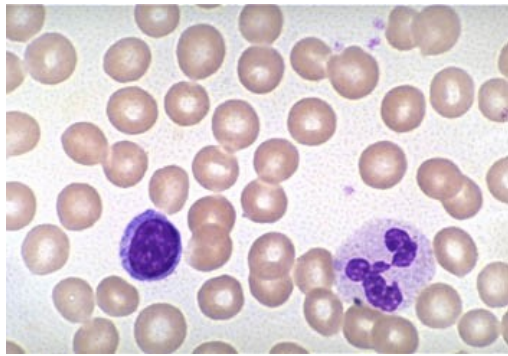
Objekt:
Xenopsylla
cheopis

Médium:
kanadský
balzám

Druhy preparátů

Podle způsobu přípravy:

- **roztěry** (z tekutin, v nichž jsou rozptýleny drobné objekty)



- **suché** (krevní roztěry, spermie)



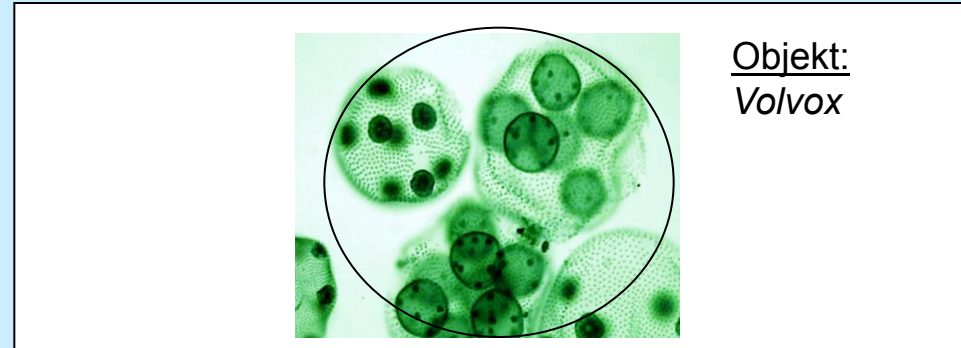
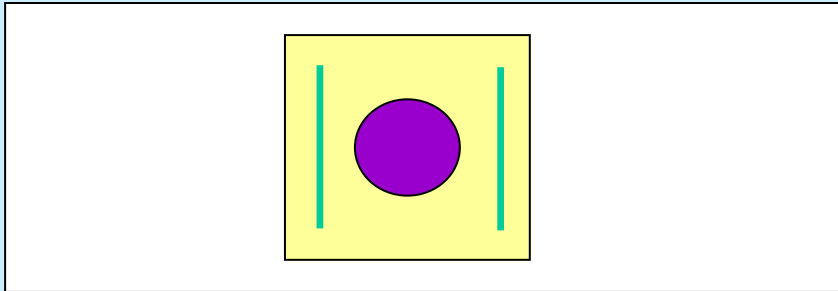
Objekt: *Giardia intestinalis*

- **vlhké** (střevní prvoci)

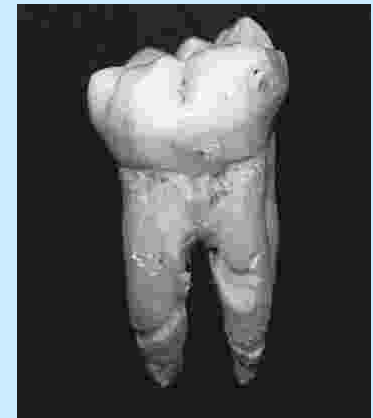
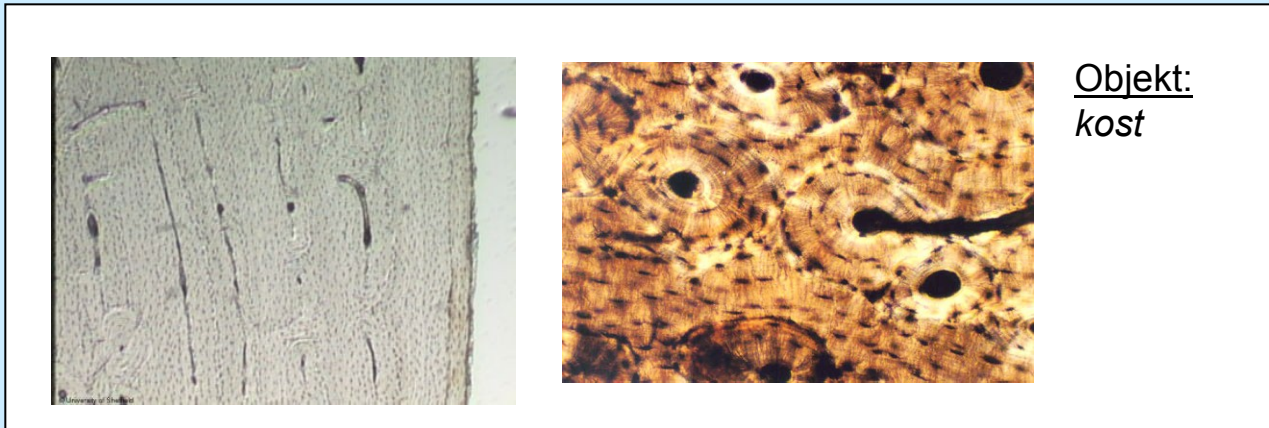
Druhy preparátů

Podle způsobu přípravy:

Vlhká komůrka (visutá kapka s objekty)



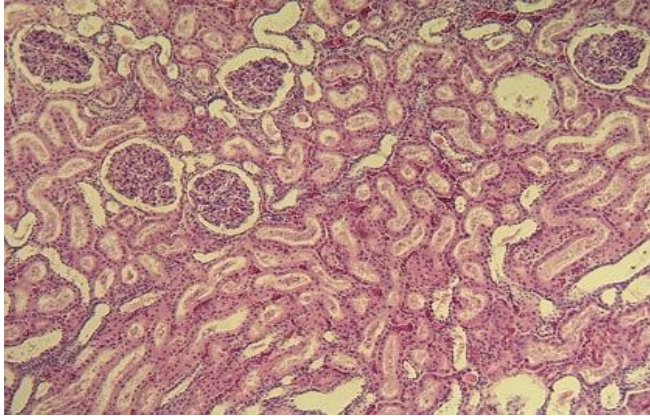
Výbrusy (tvrdý materiál - kosti, zuby)



Druhy preparátů

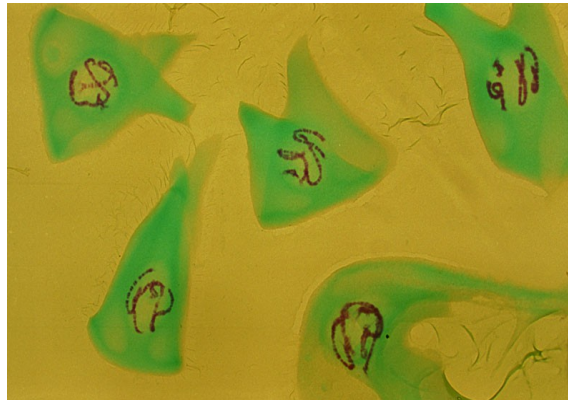
Podle způsobu přípravy:

Řezové preparáty (histologické řezy – poloténkové, tenké, tlusté řezy žiletkou)



Objekt: *ledvina savce*

Roztlaky (karyotypy)



Objekt: *obří chromozómy, slinné žlázy larvy pakomára*

Nativní preparáty

studium nativních preparátů - nejstarší metoda v biologii

- výhody:**
- neporušený objekt
 - možnost pozorovat pohyb buněk
 - činnost organel - pohyb bičíků, řasinek, kontraktilní vakuoly
- nevýhody:**
- omezený výběr materiálu (velikost, sezóna)
 - časové omezení
 - malé rozdíly v přirozeném kontrastu
- izolované buňky** (krev, lymfa, leukocyty, roztlačené vazivo, chrupavka na řezech, pozorování buněčného dělení, průkaz vajíček, cyst nebo vegetativních stádií střevních parazitů ve stolici, tvar a struktura buněk kvasinek atd.)

drobné organismy

Tekutiny pro nativní preparáty

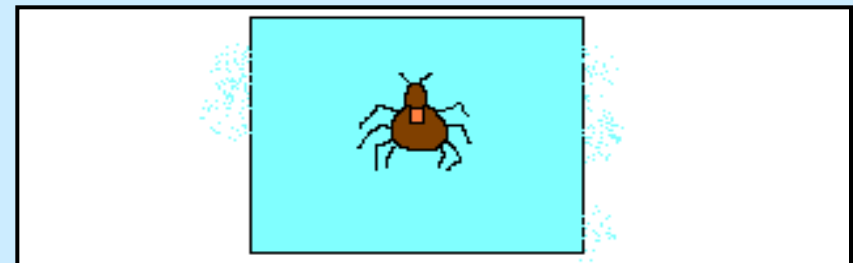
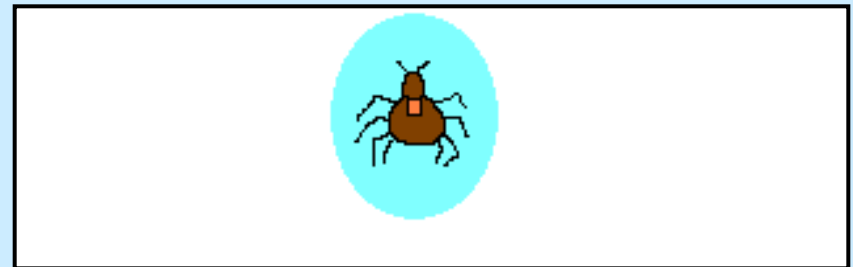
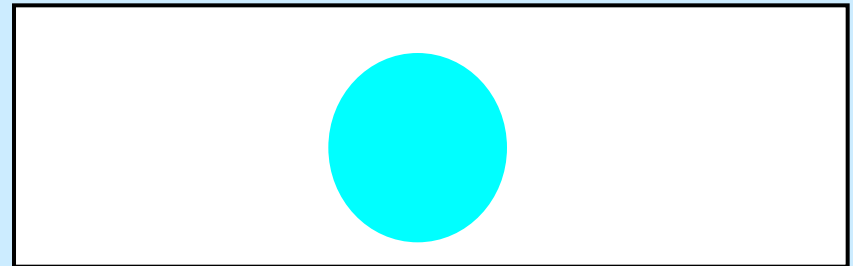
- přirozené prostředí - pro volně žijící organismy (voda sladká, mořská)
- umělé izotonické prostředí - fyziologický roztok, krevní sérum,

NaCl v destilované vodě,
Ringerův roztok, Lockeho roztok

kroužkovci	- 0,45% NaCl
ryby, obojživelníci	- 0,64% NaCl
plazi	- 0,80% NaCl
ptáci, savci	- 0,90% NaCl

Příprava nativního preparátu

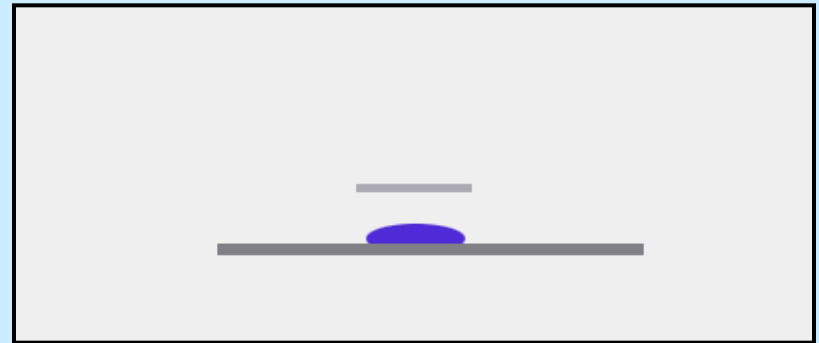
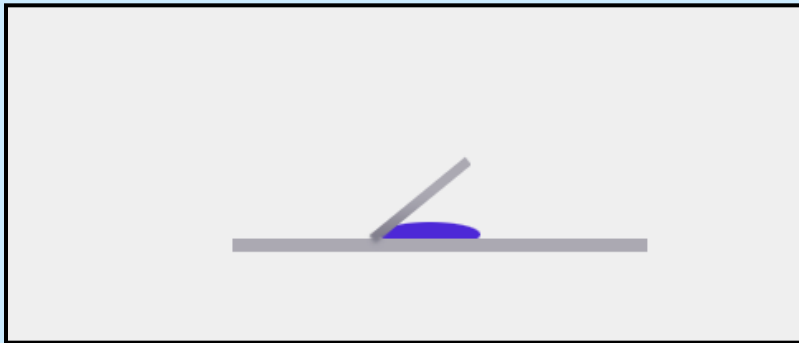
1. Kapka média **do středu** podložního skla (pozor na velikost kapky)
2. Vložíme objekt, správně orientujeme
3. Přikryjeme krycím sklíčkem
4. Stolek mikroskopu ani podložní sklo nesmí být vlhké
5. Médium nesmí být na krycím skle
6. Přebytek média – odsajeme od hrany krycího skla
7. Nedostatek média – přikápneme k hraně krycího skla – prosaje se
8. V preparátu nesmějí být bubliny



Příprava nativního preparátu

Jak položit krycí sklíčko?

- hranou na podložní sklo pod úhlem 45° , podepřít jehlou a přiklopit
- uchopit za hrany do dvou prstů, položit kolmo shora



Vitální barvení

Barvení je biochemická metoda, kterou se přidá k objektu specifická barvicí látka (barvivo) a slouží k prokázání výskytu (kvalifikaci) nebo množství (kvantifikaci) specifické látky ve zkoumaném objektu nebo ke zvýraznění vnitřních struktur.

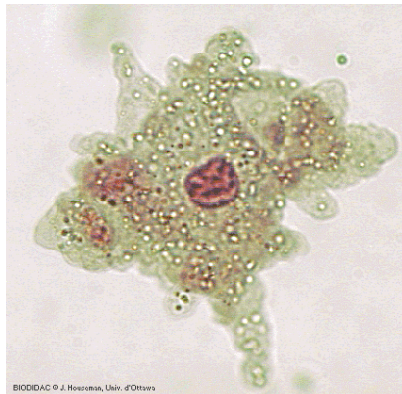
Barvení (buněk, tkáně) za živa je **vitální barvení**

Do živé buňky pronikají pouze tzv. **vitální barviva**

Vodné roztoky barviv o nízké koncentraci

(zásobní 0,5 -1%, k použití se silně ředí - až 0,05%

možnost rozpustit ve fyziologických tekutinách



Objekt: améba

Médium: voda

Barvení: vitální

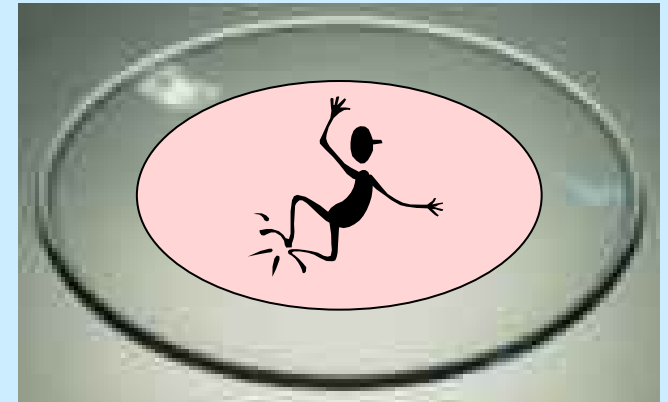
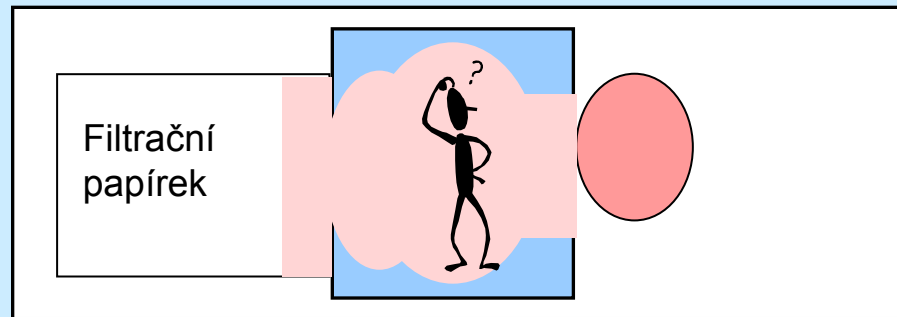
Druhy barvení

Intravitální

Barví se normální živé buňky, přímo v těle organismu

Drobné objekty se **vkládají přímo** do nízkoprocentních roztoků těchto barviv, nebo se vstříkují do živého organismu (obratlovci)

nebo tzv. **prosáváním**



Objekt:
Paramecium
Médium: voda
Barvení: vitální

Příklad:

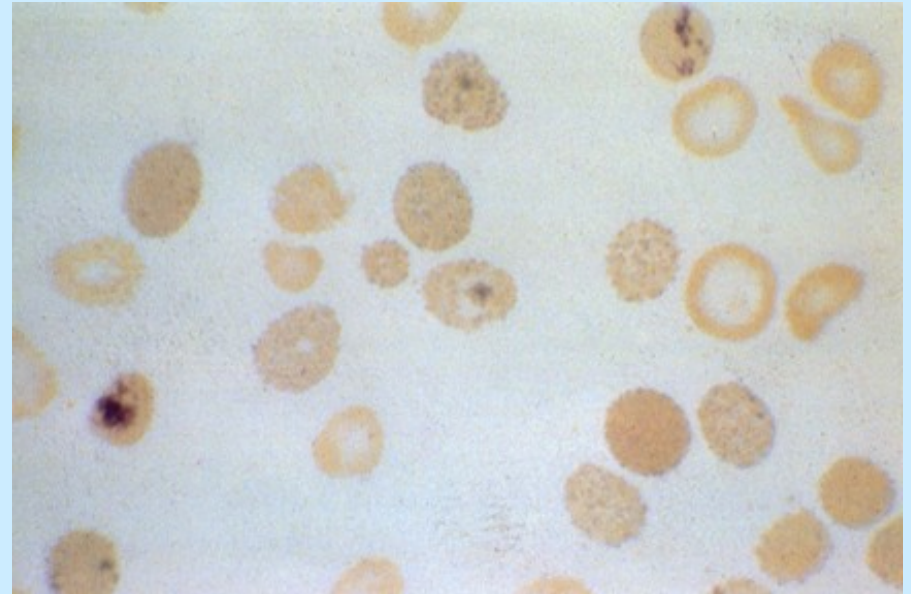
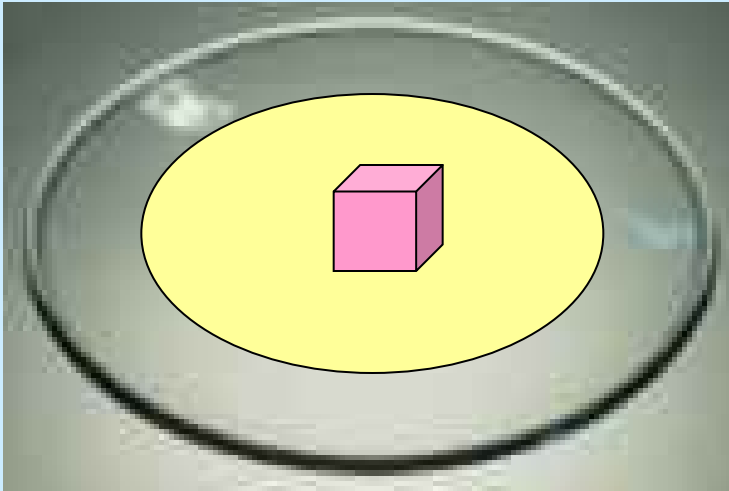
**neutrální červeň -
potravní vakuoly**

prvoků

Druhy barvení

Supravitální - barvíme živé buňky vybrané z těla (kousky tkáně)

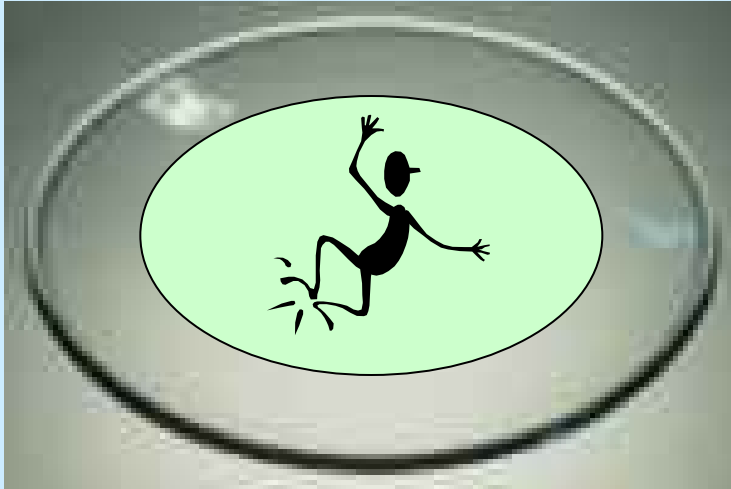
propustnost membrán je větší u oslabených buněk



Supravitální barvení – Heinzova tělíčka v krvinkách (onemocnění)

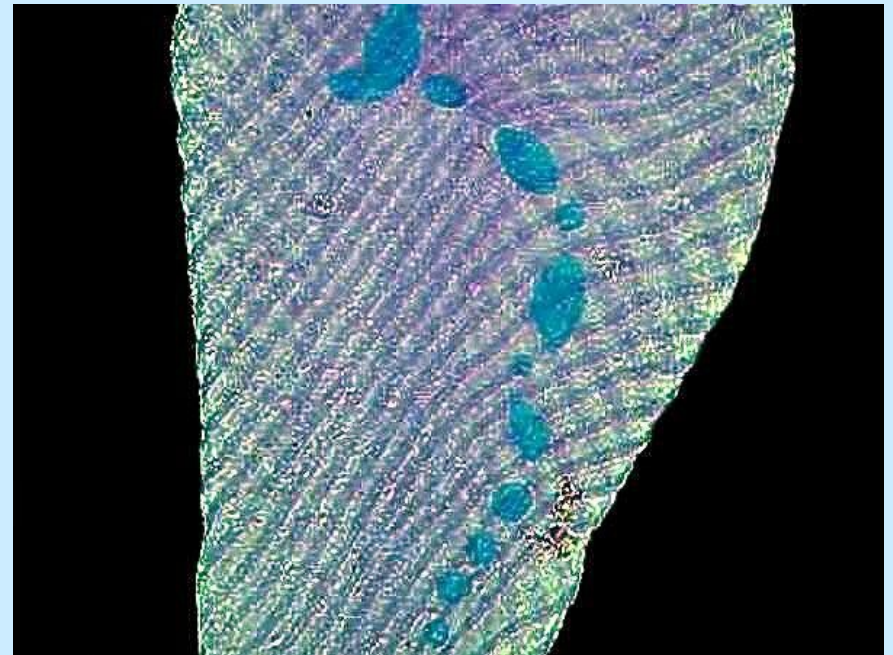
Druhy barvení

Postvitální - barví se odumírající buňky



Příklad:

**metylová zeleň - makronukleus
nálevníků**



Spirostomum minus -Methyl Green Acetic makronukleus

Neutrální červeň

Barví potravní vakuoly- soustavy vakuol, tzv. vakuom (potravní vakuoly u buněčného jícnu mají kyselý obsah – malinově červené, vakuoly vzdálenější jsou žlutočervené - alkalické prostředí) - změna chemizmu během cyklózy. NČ je indikátorem pH daného prostředí. Používaná koncentrace 1:50 000 – 100 000

Kongo červeň

Barví potravní vakuoly a cytoplazmu (u jícnu modré, vzadu červené- v závislosti na kyselosti). Používaná koncentrace 1:10 000. U perlooček barví chemoreceptory na antenulách

Janusova zeleň B

barví mitochondrie černě (drobné černé tečky v plazmě). 1:10 000

Metylénová zeleň

Příklad barvení postvitálního, zabarví makronukleus odumírající trepky (je velmi citlivá na alkalické prostředí, proto se používá v slabě kyselém prostředí- do 1% vodního roztoku kapneme několik kapek kyseliny octové)

Metylová modř

- obsah vakuol tmavomodrý, u živočichů též neurony

Metylová violet

- cytoplazmatické granulky na fialovo, po delší době i jádro

Úkol č. 1

Modelový organismus – trepka (*Paramecium* sp.), zhotovení nativního preparátu, vitální barvení

„zrnková“ kultura

Pro pozorování v mikroskopu nutno zpomalit rychlý pohyb trepky

Používá se:

- **nejjednodušší je mírný tlak na krycí sklo pomocí jehly (pozor na rozdrcení objektů)**
- **zaklínění mezi řasy a detrit**
- **komůrky z vaty**
- **zahuštění prostředí:**
 - 1% agar- 1 kapka zahřátá na 40°C
 - rosol zo semen druhu *Cydonia vulgaris* (kdoule)
 - 3% roztok želatiny nebo metylcelulózy
 - řídský škrob
- **narkotizace:** parami éteru, dioxid uhličitý, metylalkohol, chlorid horečnatý, kyselina octová
- **ochlazení preparátu**

Úkol č. 1

Modelový organismus – trepka (*Paramecium* sp.), zhotovení nativního preparátu, vitální barvení

1. Na podložní sklo kápneme kapku vody s trepkami
2. Vložíme rozcupovanou vatu a přikryjeme krycím sklem (zpomalení pohybu)
3. Pozorujeme práci kontraktilních vakuol
4. Barvíme:

a) intravitálně neutrální červení – potravní vakuoly (různé pH)

b) postvitálně metylenovou zelení – makronukleus

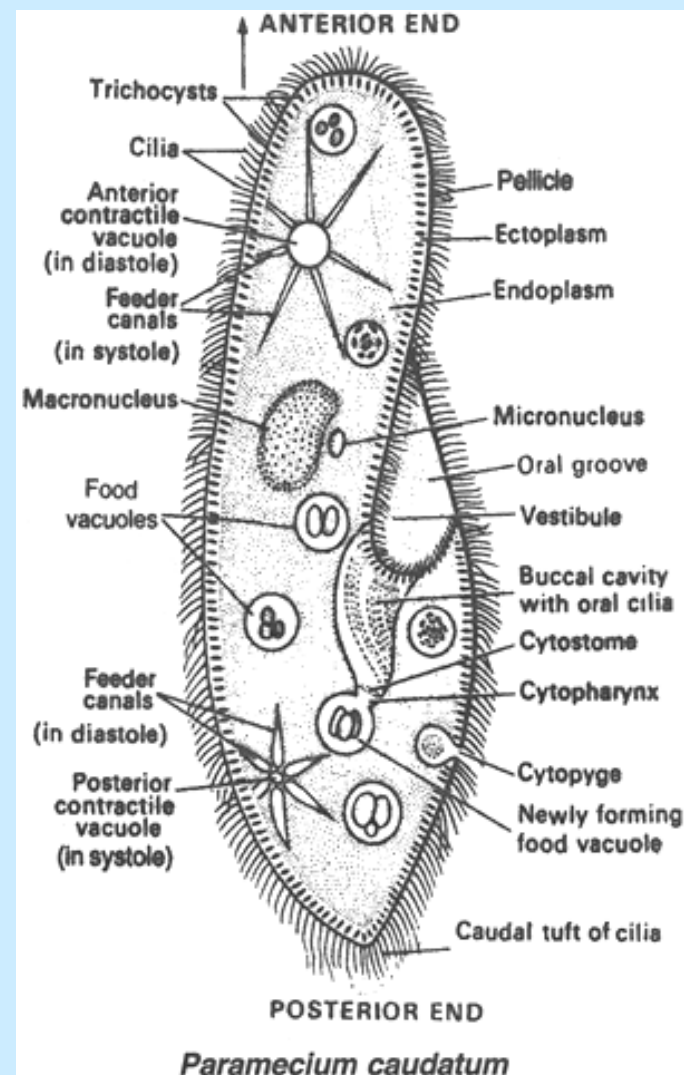
5. Prohlížíme pod binokulárním mikroskopem

- v procházejícím světle !!! **aperturní clona při výměně objektivu !!!**

- v temném poli (DF) – **ne pro studium morfologie**

- ve fázovém kontrastu - **Ph1 pro 10x a 20x, Ph2 pro 40x**

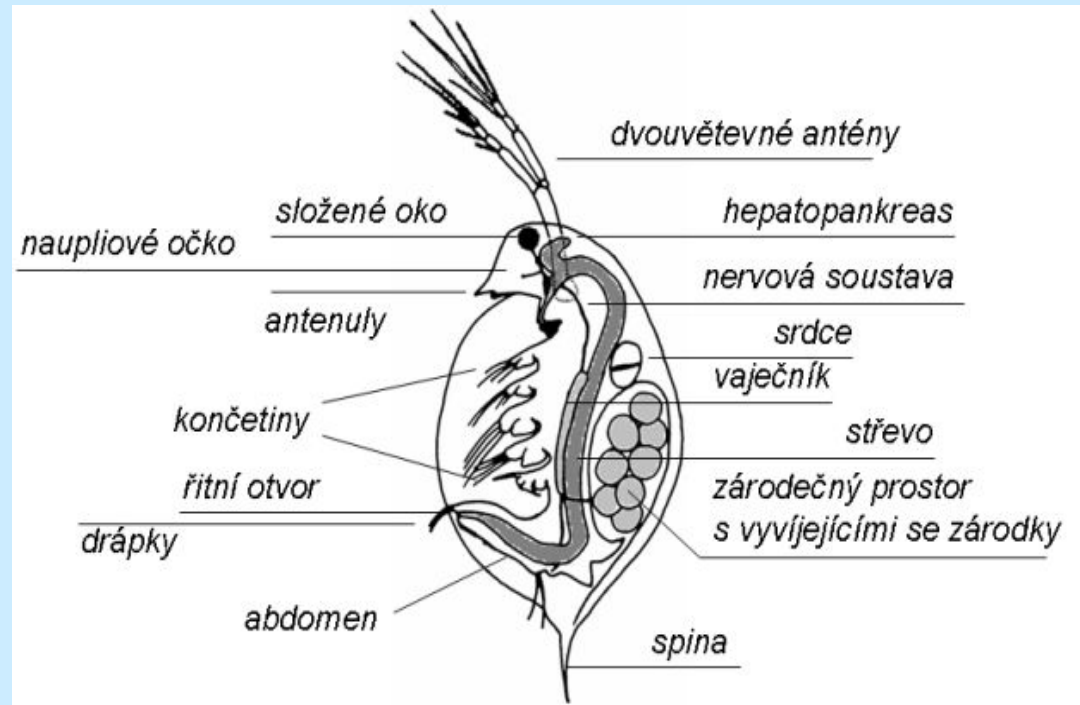
Při DF a Ph aperturní clona je úplně otevřená a neovlivní kontrast obrazu – nehýbeme jí



Úkol č. 2

Modelový organismus – perloočka (*Daphnia*) zhotovení nativního preparátu, vitální barvení chemoreceptorů

- Perloočku dejte do kapky vody na podložním skle a přidejte kapku **tuše**. Pozorujte asi po 15 minutách. Suspenze tuše se zachycuje na filtračních brvách končetin a po několika minutách tmavě zbarví trávicí trubici
- **Metylová modř** - na hodinovém sklíčku barvíme slabým roztokem (1:10000) po dobu asi 10 minut. Tělní svalovina, srdce, brvy na tykadlech 2. páru, na nožkách i vajíčka se intenzivně modře probarví



- **Kongo červeně** - chemoreceptory na antenulách se zbarví intenzivně červeně po asi 15 minutách