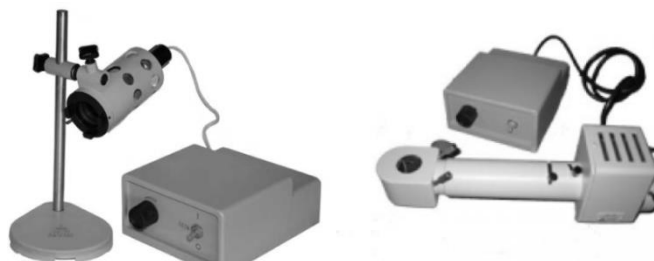


## РАБОТА С МИКРОСКОПОМ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫМИ УСТРОЙСТВАМИ К НЕМУ

Для проведения цитологических исследований используются микроскопы МБР-1, МБР-3, Биолан, Биомед-5 и др. К микроскопам прилагаются в комплекте осветители, обеспечивающие оптимальное освещение препарата. Микроскоп либо соединяется с осветительным прибором (рис. 1), либо осветительный прибор встроен непосредственно в микроскоп (рис. 2).



ОИ-19

ОИ-35

Рис. 1. Осветительные приборы



Рис. 2. Микроскоп марки «Биомед-5»

При проведении различных генетических исследований (подсчет числа хромосом, изучение кариотипа, спорогенеза, гаметогенеза и др.) пользуются рисовальным аппаратом (рис. 3).



РА-7

РА-4

Рис. 3. Рисовальные аппараты

С помощью рисовального аппарата изображение отбрасывается на лист бумаги, что дает возможность обвести карандашом контуры изучаемого объекта.

Наряду с зарисовкой в цитологии и других науках широкое распространение получил метод микрофотографии.

Измерение микроскопических объектов (пыльцевых зерен, хромосом, тетрад микроспор и т. д.) проводят с помощью специальных линеек: окуляра-микрометра и объекта-микрометра (рис. 4).



Рис. 4. Микрометр окулярный MOB 1-16 и объект-микрометр

**Материалы и оборудование:** микроскоп, осветитель, рисовальный аппарат, объект-микрометр, окуляр-микрометр, постоянный препарат, карандаши, бумага.

**Задание 1.** Изучить устройство микроскопа.

Микроскоп – это оптический прибор, с помощью которого можно получить увеличение объекта и рассмотреть мелкие детали его строения.

В микроскопе выделяют две системы: оптическую и механическую.

Оптическую систему составляют конденсор, объектив и окуляр, которые используются для рассматривания объекта и увеличения его изображения.

Пучок света от источника освещения собирается в конденсоре и направляется на объект. Проходя через объект, лучи света попадают в систему линз объектива; они строят первичное изображение, которое увеличивается с помощью линз окуляра. Главной оптической частью микроскопа, определяющей его основные возможности, является объектив. Объективы и окуляры в современных микроскопах сменные, что позволяет изучать клетки при разных увеличениях.

Объектив представляет собой цилиндр с многолинзовой системой. Линзу, обращенную к препарату, называют фронтальной. Объектив дает увеличенное, действительное, обратное изображение объекта и выделяет тонкие детали его структуры.

Непосредственно от объектива зависит качество изображения объекта. Недостатки линз (абберации) приводят к тому, что изображение может быть окрашенным, размазанным, искривленным.

Различают следующие типы аббераций:

- 1) сферическая абберация (изображение точки передается в виде кружка рассеяния);
- 2) астигматизм (кружки рассеяния имеют эллипсоидную форму);
- 3) кома (в изображении точки наблюдается односторонняя деформация);
- 4) кривизна поля зрения (не позволяет одновременно видеть резко центр и края поля зрения);
- 5) дисторсия (нарушение подобия между объектом и его изображением).

В зависимости от аббераций различают оптику:

- а) анастигматическую (свободную от астигматизма);
- б) апланатическую (лишенную комы и сферической абберации);
- в) ортоскопическую (без дисторсии).

Различают два вида несовпадений: хроматизм положения и хроматизм увеличения. Хроматизм положения наблюдается в том случае, когда изображения различных цветов располагаются на неодинаковом расстоянии от оптической системы; хроматизм увеличения – когда изображения различных цветов находятся в одной плоскости, но имеют неодинаковые размеры.

Хроматизм положения может быть исправлен объективами: ахроматическими и апохроматическими. В зависимости от того, в какой степени исправлены aberrации, различают следующие объективы: ахроматы, апохроматы, планахроматы, планапохроматы.

Объективы ахроматы имеют исправленную сферическую aberrацию, кому и хроматическую aberrацию положения для двух длин волн (у микроскопов МБР-1, МБР-3, Био-мед-5).

Объективы апохроматы – исправлены aberrации для трех длин волн.

Эти объективы входят в комплект исследовательских микроскопов МБИ-3, МБИ-6, МБИ-15 и др.

У объективов ахроматов и апохроматов имеется такой недостаток, как кривизна изображения. Для исправления его созданы объективы с плоским полем зрения – планахроматы и планапохроматы.

Объективы бывают сухие и иммерсионные. Сухие объективы применяются обычно при небольших увеличениях (от 56 до 600 раз). В этом случае между объективом и препаратом находится слой воздуха (показатель преломления его равен 1). Из-за разницы показателей преломления предметного стекла и воздуха часть световых лучей отклоняется и не попадает в глаз наблюдателя. Поэтому сухие объективы не позволяют рассматривать слишком мелкие объекты, для этого используют иммерсионные объективы, дающие увеличение в 900–1350 раз. Преимущество иммерсионной системы заключается в том, что между объектом на предметном стекле и объективом находится среда с одинаковым показателем преломления (кедровое масло имеет показатель преломления 1,515; вода – 1,33). Благодаря тому, что лучи не преломляются и попадают в объектив, достигается наилучшее освещение и хорошая видимость мельчайшего объекта.

Светособирающую силу объектива характеризует числовая или нумерическая апертура, которая зависит от показателя преломления среды, находящейся между фронтальной линзой объектива и покровным стеклом, и величины угла, расположенного между оптической осью объектива и крайнего выхода лучей из объектива, и определяется по формуле:

$$A = n \cdot \sin \alpha,$$

где  $n$  – показатель преломления среды;

$\sin \alpha$  – половинный угол входного отверстия объектива.

Нумерическая апертура указывается на объективе. Более сильные объективы соответственно имеют более высокую нумерическую апертуру. Так, для малого объектива с увеличением 9× нумерическая апертура составляет 0,20; для сильного объектива с увеличением 90× нумерическая апертура равна 1,25. Величина нумерической апертуры определяет разрешающую способность объектива, которая определяется по формуле:

$$d = \lambda / A,$$

где  $\lambda$  – длина волны света, нм;

$A$  – нумерическая апертура.

Разрешающая способность микроскопа представляет собой величину наименьшего диаметра частиц, которые можно видеть в микроскоп, или наименьшее различимое расстояние между двумя точками. Она зависит от длины волны света и числовой апертуры. Разрешающая способность может быть улучшена только за счет увеличения нумерической апертуры и уменьшения длины волны света. Так, разрешающая способность светового микроскопа равна 2000 Å (ангстрем), электронного – 10 Å, в то время как глаз человека имеет разрешающую способность всего 0,15 мм.

Кроме разрешающей способности, объектив характеризуется определенным фокусным расстоянием и увеличением. Слабые объективы имеют большее фокусное расстояние (50–60 мм), сильные – меньшее (1–3 мм). Рабочее расстояние от объектива до препарата

соответственно должно быть: для объектива с увеличением  $9\times - 13,8$  мм;  $20\times - 0,6$  мм;  $90\times - 0,12$  мм.

В связи с этим большое значение при работе с микроскопом имеет толщина покровного стекла (0,17 мм) и предметного (1,2 мм).

Окуляр состоит из 2–3 линз, вмонтированных в металлический цилиндр. Подобно лупе, он дает прямое, мнимое, увеличенное изображение изучаемого объекта. С помощью окуляров исправляются остаточные аберрации. Окуляры Гюйгенса и ортоскопические окуляры предназначены для работы с ахроматами малых и средних увеличений, планахроматами малых увеличений; компенсационные окуляры – с объективами апохроматами, планахроматами и ахроматами больших увеличений.

Сочетание увеличения объектива ( $V_{об}$ ) и окуляра ( $V_{ок}$ ) позволяет определить общее увеличение микроскопа ( $V_M$ ). Оно определяется по формуле:

$$V_M = V_{об} \cdot V_{ок}.$$

Однако нужно знать, что увеличение микроскопа находится в зависимости от длины тубуса. Нормальная длина тубуса 160 мм, но некоторые старые микроскопы имеют иную длину тубуса. При бинокулярной насадке увеличение микроскопа устанавливают по формуле:

$$V = V_{об} \cdot V_{ок} \cdot V_n,$$

где  $n$  – собственное увеличение микроскопа, равное  $1,5\times$ .

Окуляр с нужным увеличением выбирают в зависимости от увеличения объектива:

$$V_{ок} = 500 \cdot A / V_{об}.$$

Конденсор – специальный осветитель, расположенный под предметным (объектным) столиком микроскопа. Он состоит из двух или трех линз, собирающих от зеркала свет в пучок, направляемый в плоскость препарата. Имеет суживающуюся апертурную диафрагму. На качество изображения влияет местоположение конденсора (перемещая конденсор, можно изменить качество изображения), степень открытия диафрагмы (открывая и закрывая ее, можно изменить глубину резкости, освещенность). Диафрагма бывает дисковой, колпачковой, ирисовой (у биологических рабочих и биологических исследовательских микроскопов).

Зеркало (расположено под конденсором) отражает падающий на него свет и направляет его в конденсор для освещения препарата. Зеркало имеет две поверхности – плоскую (используемую при любом источнике света и при любом увеличении) и вогнутую (используемую при искусственном освещении). Для лучшего освещения объекта в биологических микроскопах вместо зеркала используют различные типы осветителей.

Механическая система микроскопа состоит из подставки, коробки с микрометренным механизмом и микрометренным винтом, тубусодержателя, винта грубой наводки, кронштейна конденсора, винта перемещения конденсора, револьвера, предметного столика.

Микрометренный винт служит для незначительного перемещения тубусодержателя и объектива на расстояния, измеряемые микрометрами.

Тубус – цилиндр, в который сверху вставляют окуляры. Он подвижно соединяется с головкой тубусодержателя и фиксируется стопорным винтом в определенном положении.

Тубусодержатель несет тубус и револьвер, предназначенный для быстрой смены объективов. Для передвижения тубусодержателя и объектива с целью фокусировки объекта при малом увеличении служит винт грубой наводки.

Предметный столик имеет в середине круглое отверстие. Предметный координатный столик обеспечивает перемещение препарата, установленного в препаратодователь, в горизонтальной плоскости по двум взаимно перпендикулярным направлениям с помощью рукояток, расположенных с левой стороны на препаратодователе.

**Задание 2.** Изучить принцип работы с микроскопом.

Микроскопы выпускаются в различных вариантах комплектации. В базовой комплектации микроскоп предназначен для наблюдения биологических и других прозрачных объектов в проходящем свете светового поля. С помощью микроскопа можно исследовать окрашенные и неокрашенные препараты в виде мазков и срезов, расположенных на предметном стекле без покровного и с покровным стеклом толщиной 0,17 мм.

Микроскоп «Биомед-5» имеет увеличение от 40 до 1600 крат, числовая апертура его составляет 1,25 МИ. В зависимости от степени исправления аберрации объектив микроскопа «Биомед-5» относится к ахроматам (4×/0,10; 10×/0,25; 40×/0,65; 100×/1,25 МИ). Освещение установлено по Келеру.

При работе с микроскопом его ставят у края стола так, чтобы окуляры находились напротив глаз, и в течение работы его не передвигают. Открывают полностью диафрагму, поднимают конденсор в крайнее верхнее положение. Столик центрируют. Ставят объектив 8× в рабочее положение – на расстояние 1 см от предметного столика, так как работу с микроскопом всегда начинают с малого увеличения. Глядя в окуляры, добиваются равномерного освещения. Кладут на предметный столик препарат и, глядя сбоку, опускают объектив с помощью винта грубой наводки так, чтобы между фронтальной линзой и препаратом было расстояние в 4–5 мм. Глядя в окуляр и вращая винт грубой наводки на себя, плавно поднимают объектив до положения, при котором хорошо видно изображение объекта. С помощью микрометрического винта добиваются хорошей видимости изображения препарата.

Для изучения какого-либо участка объекта при большем увеличении ставят этот участок в центр поля зрения, затем поворотом револьвера переводят объектив на большее увеличение (объектив не поднимать!). Затем с помощью микрометрического винта добиваются четкой видимости изображения объекта. После окончания работы с большим увеличением поворотом револьвера устанавливают малое увеличение и только после этого снимают препарат.

**Задание 3.** Освоить работу с рисовальным аппаратом.

Установить свет и сфокусировать препарат. Вынуть из тубуса окуляр и закрепить рисовальный аппарат РА-4 хомутиком. Окуляр вставить на место. Откидная оправа аппарата должна лечь на окуляр. Зеркало установить под углом 45° к штанге. При наклонном тубусе микроскопа для зарисовки следует использовать наклонный столик с таким расчетом, чтобы его поверхность была перпендикулярна оси тубуса. Чтобы увидеть одновременно изображение объекта, бумагу и конец карандаша, нужно уравнивать освещенность карандаша и изображения объекта. Для регулирования яркости изображения объекта необходимо пользоваться реостатом осветителя и набором сменных дудчатых светофильтров на секторе аппарата.

С помощью рисовального аппарата обвести карандашом на бумаге контуры изображения деталей препарата.

**Задание 4.** Освоить работу с микрометром для измерения объектов и провести измерения пылевых зерен пшеницы, ржи и других культур.

Вставить окуляр-микрометр в соответствующий окуляр микроскопа и, вращая глазную линзу, получить резкое изображение его шкалы.

Поместить объект-микрометр на столик микроскопа и получить резкое изображение его шкалы.

Совместить изображение шкалы объекта-микрометра со шкалой окуляра-микрометра

и установить, сколько делений объекта-микрометра приходится на определенное число делений окуляра-микрометра. Разделить первую величину (число делений объекта-микрометра) на вторую (число делений окуляра-микрометра) и умножить полученную величину на 10 (цена деления объекта-микрометра в микрометрах). Полученный результат будет являться ценой деления окуляра-микрометра для данного объектива и окуляра.

Определить размеры пыльцевого зерна пшеницы, а затем ржи в делениях окуляра-микрометра, передвигая препарат на столике и поворачивая вокруг оси окуляр-микрометр. Измерить 10 пыльцевых зерен пшеницы, большой диаметр 10 пыльцевых зерен ржи и занести полученные данные в табл. 1. Определить истинные размеры пыльцевых зерен ржи (пшеницы) путем умножения числа делений окуляра-микрометра на цену одного деления (объектив 40×, окуляр-микрометр 7×).

Таблица 1. Диаметр пыльцевых зерен пшеницы и ржи

Культура, сорт	Номер пыльцевого зерна	Диаметр пыльцевого зерна	
		в делениях окуляра-микрометра	в микрометрах

После заполнения таблицы проанализировать полученные данные и сделать заключение о значении величины пыльцевого зерна для способа опыления растения (самоопыление или перекрестное опыление).

### СПОСОБЫ ПОДГОТОВКИ К ИССЛЕДОВАНИЮ И МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ КЛЕТКИ

Различные методы исследований способствуют накоплению данных о строении, функциях, химическом составе клетки и ее структурных компонентах. К таким методам относятся:

- 1) прижизненные наблюдения;
- 2) изучение фиксированных и окрашенных клеток тканей;
- 3) цитохимические исследования;
- 4) дифференциальное центрифугирование;
- 5) автордиография;
- 6) метод культуры клеток и тканей;
- 7) микрургия и др.

**Материалы и оборудование:** проросшие семена в растительных, проросшие луковицы, почки, молодые листочки; пинцеты, препаровальные иглы, лезвия, пенициллиновые флаконы с пробками, этикетки.

**Задание 1.** Изучить методику подготовки материала к фиксации и виды фиксаторов.

Фиксация с последующим окрашиванием клеток и тканей является самым распространенным способом подготовки объектов к исследованию. Фиксация представляет собой быстрое умерщвление клетки с сохранением ее прижизненной структуры. Искажение структур клетки (в цитологии носит название артефакта) очень нежелательно. В цитологической и эмбриологической практике применяется большое число фиксирующих жидкостей в зависимости от цели и характера исследования. Наиболее часто применяемые в цитогенетической практике фиксаторы делятся на спиртовые и водные.

К спиртовым фиксаторам относят:

- 1) Карнуа (6:3:1) – спирт, хлороформ, уксусная кислота;
- 2) упрощенный Карнуа, или уксусный алкоголь (3:1);
- 3) Чемберлена (90:0,5:0,5) – спирт, формалин, уксусная кислота.

К водным фиксаторам относят:

1) Навашина (10:4:1) – 1 % хромовая кислота, 16 % формалин (от 40 % медицинского), ледяная уксусная кислота;

2) Левитского (1:10) – хромовая кислота, формалин.

При работе с фиксаторами следует запомнить три правила:

1. Фиксатор не должен быть теплым.

2. Водные фиксаторы смешивают перед их употреблением.

3. Количество фиксирующей жидкости должно превышать объект в 20–40 раз.

Исследуемый материал в водном фиксаторе выдерживают около 24 ч, а в спиртовом – от 30 мин до 12 ч.

Для изучения строения хромосом, подсчета их числа и определения кариотипа наиболее удобным объектом являются кончики быстро растущих корешков из проросших семян. Семена проращивают в растильнях при соответствующих условиях влажности и температуры. Для фиксации лучше брать короткие корешки длиной 1,0–1,5 см. Перед заготовкой корешков для фиксации материал рекомендуется поместить в холодильник (температура 1–2 °С) на 6–12 ч или залить объект 0,1 % раствором колхицина на 2–4 ч. Под действием холода и колхицина хромосомы сокращаются и хорошо распределяются по всей клетке.

Для изучения мейоза, развития половых клеток и оплодотворения фиксируют бутоны, тычинки и пестики. У злаковых фиксируют целиком зачаточный колос или метелку в состоянии, когда вершина колоса или метелки прощупывается ниже последнего листа на 2–3 см. У представителей других семейств фиксируют отдельные соцветия, цветки, завязи, семена. У древесных культур для лучшей фиксации снимают верхние кроющие листочки и чешуйки. Эмбриологические объекты медленно пропитываются фиксирующими жидкостями, поэтому желательно пользоваться спиртовыми фиксаторами или использовать некоторые специальные приемы, например, погрузить объект на 1–2 мин в 100 % спирт или уксусный алкоголь (фиксатор Карнуа упрощенный: 3 части уксусной кислоты и 1 часть спирта).

**Задание 2.** Провести фиксирование соответствующего материала.

1. Отрезать кончики корешков лука, пшеницы, ржи и других культур длиной 0,5–0,7 см и поместить их в пенициллиновый флакон с фиксирующей жидкостью. Желательно до нарезки корешков залить их водой для лучшего тургора клеток. Во флакон вложить этикетку.

2. Выдержка в фиксирующей жидкости зависит от объекта: нежные тонкие корешки фиксируют в течение 0,5–1,0 ч, грубые колосья и почки – до 24 ч, включая их предварительную обработку спиртом или уксусным алкоголем.

Фиксированный материал хранят в холодильнике в фиксаторе или промывают в 96 % растворе этилового спирта и хранят в 70 % растворе до окрашивания.

**Задание 3.** Провести окрашивание соответствующего материала.

Для окраски временных препаратов чаще всего используют кармин, лакмоид, орсеин, растворенные в уксусной кислоте. Для окраски постоянных препаратов используют гематоксилин, генциановый фиолетовый, фуксин, метиленовый синий.

При исследовании срезов и временных препаратов широко используют окрашивание их различными красителями. Чаще всего эти красители представляют собой сложные органические соединения, комплексные соли. Если в красителе красящим веществом является основание, то они называются основными, если остаток кислоты – кислыми.

К основным красителям относятся: сафранин, генциановый фиолетовый, метиленовый зеленый, синий и фиолетовый, фуксин основной и др.

К кислым красителям относятся: конго красный, эозин, кислый фуксин, пикриновая кислота и др.

Красители обычно применяют в виде водных или спиртовых растворов. Водные растворы чаще готовят в концентрации 1–2 %, спиртовые – на 50–70 % спирте, хранят в темном месте.

В зависимости от объекта и красителя окрашивание ведут двумя способами: прогрессивным и регрессивным. В первом случае срез помещают в слабый раствор красителя и окрашивают довольно продолжительное время. Вначале окраска бывает слабой, со временем она прогрессирует. При регрессивном способе окрашивания срез заведомо переокрашивают в концентрированном красителе, а избыток красителя в дальнейшем отмывают соответствующим растворителем (дифференцировка).

В цитологической и эмбриологической практике часто употребляют так называемую комбинированную окраску препаратов двумя или тремя красителями.

Способы приготовления красителей и методы окраски разработаны различными исследователями и поэтому носят сложные названия: окрашивание гематоксилином по Гейденгайну при приготовлении постоянных препаратов по Навашину; окрашивание реактивом Шиффа (кармином) по Фельгену и др.