**Тема 4:** **Световой микроскоп и основные приемы работы с ним.**

Установка освещения, центрирование, фокусировка, выбор светофильтров. Методы наблюдения при помощи микроскопа: темного поля, фазового контраста. Подсчет клеток в счетных камерах. Прокариотические клетки. Клетки эукариотических организмов. Форма клеток.

**Основные вопросы для изучения:**

1. ДНК, строение и функции.
2. Транскрипция. Трансляция.
3. Функциональные системы клеток: система энергетического обеспечения, система поглощения, система экскреции, система движения.
4. Устройство светового микроскопа. Методика приготовления микропрепаратов.

**Целевая установка:**

Ознакомиться с устройством светового микроскопа. Уметь устанавливать освещение, центрировать, фокусировать, выбирать светофильтры. Овладеть методикой приготовления препаратов для световой микроскопии.

**Формируемые понятия:**

Функциональные системы клеток: система биосинтеза белка (ДНК, транскрипция, трансляция, мРНК, тРНК, рибосомы, аминокислоты, генетический код), сирстема энергетического обеспечения (митохондрии, АТФ), система поглощения (осмос, фагоцитоз, пиноцитоз, ротоглотка), система экскреции (сократительная вакуоль, порошица), система движения (реснички, жгутики); темное поле, фазовый контраст, счетные камеры, прокариоты, эукариоты, форма клеток (кокки, палочки). Устройство светового микроскопа. Методика приготовления микропрепаратов.

**Значение изучаемого материала для последующего использования:**

Знание данного материала необходимо для занятий по цитогенетики, а также проведения цитогенетических исследований.

**Медицинские аспекты.**

Использование методов световой микроскопии в практической медицине для выявления и анализа про- и эукариот.

**Оснащение занятия:**

Световые микроскопы, предметные и покровные стекла, предметные стекла с лункой, бактериологические петли, спиртовки, кристаллизатор с мостиком для предметных стекол, 2 стакана для промывания препаратов, пинцет для взятия предметных стекол, фильтровальная бумага, иммерсионное масло, ветошь для обработки микроскопа, дистиллированная вода, этиловый спирт (96%), штаммы *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphilococcus aureus* АТСС 25923 24ч культуры в жидкой питательной среде, *Paramecium caudatum* в жидкой питательной среде*,* кровь золотистого хомячка.

**Вопросы, подлежащие проверке при промежуточной и экзаменационной аттестации:**

1. ДНК, строение и функции.
2. Транскрипция. Трансляция.
3. Функциональные системы клеток: система синтеза белка, система энергетического обеспечения, система поглощения, система экскреции, система движения.
4. Устройство светового микроскопа. Методика приготовления микропрепаратов.

**Некоторые аспекты темы.**

**Устройство светового микроскопа**. Световая микроскопия является основным, специфическим методом изучения микроскопических биологических объектов: клеток и внутриклеточных структур. Световой микроскоп позволяет изучать объекты с размерами в десятые доли микрона – в тысячи раз более мелкие, чем объекты, доступные для изучения невооруженным глазом.

*Примечание. 1 микрон, или 1 микрометр – это одна миллионная часть метра, или одна тысячная часть миллиметра. Иначе: 1 мкм = 10–6 м = 10–3 мм.*

Современный световой микроскоп – это точный оптико-механический прибор. Существует множество моделей световых микроскопов. Любой световой микроскоп состоит из двух систем: оптической и механической. Оптическая система включает осветительную и наблюдательную системы. Осветительная система предназначена для освещения объекта. К ней относятся: источник света (зеркало или электрический осветитель) и многолинзовый конденсор, формирующий световой поток. В состав конденсора кроме линз входят: ирисовая диафрагма, регулирующая количество света, и разнообразные светофильтры. При использовании естественного освещения свет направляется на входную линзу конденсора с помощью двустороннего зеркала. При использовании рассеянного света используется вогнутая сторона зеркала, при использовании точечного источника света – плоская сторона зеркала. Электрические осветители разнообразны по своему устройству и характеристикам. Наблюдательная система обеспечивает увеличение размеров объекта: полезное, бесполезное и общее. Наблюдательная система включает: объективы, призму и окуляр монокулярной насадки. При использовании бинокулярной насадки в ее состав входят призма и призменный блок. Объектив служит для формирования обратного (перевернутого) действительного изображения препарата. Это полезное увеличение, поскольку позволяет увидеть детали, неразличимые невооруженным глазом. Призма служит для изменения направления лучей на 45 градусов, что облегчает работу с микроскопом. Для рассматривания полученного изображения используется окуляр, который дает прямое мнимое увеличение, то есть используется как лупа. Это бесполезное («слепое») увеличение, поскольку при использование даже самых мощных окуляров не удается увидеть новые детали изображения. Общее увеличение микроскопа равно произведению увеличения объектива на увеличение окуляра (при использовании бинокулярной насадки это произведение умножается на собственное увеличение бинокулярной насадки – обычно в 1,5 раза). Объективы. Наиболее важной частью наблюдательной системы является объектив. К его важнейшим характеристикам относятся: полезное увеличение и разрешающая способность. Разрешающая способность – это расстояние между точками (линиями), на котором они видны раздельно. Разрешающая способность зависит от длины волны света и от апертуры объектива, чем меньше длина света и чем больше апертура, тем выше разрешающая способность. Поэтому часто используют синие светофильтры для уменьшения длины волны света. Для увеличения апертуры между препаратом и фронтальной линзой объектива помещают иммерсионную среду: дистиллированную воду (n = 1,33), глицерин (n = 1,45) или иммерсионное масло (n = 1,51). Обычно разрешающую способность (в микрометрах) указывают для монохроматического света с длиной волны 589 нм (желто-оранжевый свет). Окуляры обеспечивают дополнительное увеличение от 5´ до 20´. Иногда в состав окуляров вводятся дополнительно различные сетки и шкалы (окуляр-микрометры).Разрешающая способность светового микроскопа ограничена длиной световых волн: от 400 до 700 нм в видимой части спектра и до 250 нм в ультрафиолетовой области. Это не позволяет изучать частицы с размерами менее 100...300 нм (несколько десятых микрона).Механическая система микроскопа служит для размещения элементов оптической системы и управления ими.

**Изготовление препаратов для световой микроскопии.** Цитологические (в т.ч. цитогенетические) препараты делятся на временные и постоянные. Подготовка материала для временных препаратов включает фиксацию и окраску.

Фиксация – это процесс быстрой консервации клеточных структур, при котором все физиолого-биохимические процессы останавливаются, а водорастворимые вещества переходят в нерастворимое состояние. Следовательно, фиксация позволяет сохранить внутриклеточные структуры в неизменном виде на длительное время. Однако при фиксации в клетках могут появляться артефакты – новые структуры, которые отсутствуют в живой клетке, например, разнообразные вакуоли. Для предотвращения появления артефактов необходимо использовать специально подобранные химические растворы – фиксаторы, а сама фиксация должна проводиться в определенных условиях. В частности, желательно использовать охлажденные фиксаторы (до 2...3 градусов); для фиксации нужно брать отдельные клетки или кусочки тканей не толще 5 мм; объем фиксатора должен превышать объем фиксируемого материала в 50...100 раз; фиксатор не должен использоваться для длительного хранения материала; фиксатор не должен использоваться повторно.Наиболее распространенные фиксаторы: формалин (формальдегид, или муравьиный альдегид), этиловый или метиловый спирт (70%, 96% или 100%), уксусный алкоголь (3 части абсолютного спирта (этилового, а лучше – метилового) и 1 части ледяной уксусной кислоты), фиксатор Карнуа (1 часть ледяной уксусной кислоты : 6 частей абсолютного спирта : 3 части хлороформа).Окрашивание позволяет выявлять внутриклеточные структуры, обладающие повышенным сродством к определенным красителям. Красители – это относительно низкомолекулярные органические вещества, обладающие повышенным сродством к определенным химическим компонентам клетки. Существует множество красителей, которые используются для различных целей. Нужно иметь в виду, что выбор красителя связан с характером фиксации и различными методами предварительной обработки клеток.Названия красителей могут соответствовать получаемой окраске (рубин, кармин, метиловый синий, метиленовый синий, генциановый фиолетовый, метиловый зеленый, оранжевый золотой). Иногда русские названия цветов заменяют на немецкие, например: метилблау, генцианвиолет. В других случаях названия носят отвлеченный, исторически сложившийся характер, например: пиронин, фуксин, сафранин, флороглюцин, судан III. Иногда название красителя не соответствует полученной окраске, например, синий тионин дает фиолетово-красное окрашивание. Довольно редко применяются химические номенклатурные названия красителей, например: диметиламинобензальдегид, 8-амино-1-нафтол-5-сульфокислота.Различают основные (щелочные), кислотные и нейтральные красители. Основные красители избирательно окрашивают базофильные клеточные структуры (то есть структуры с кислотными свойствами). Кислотные красители избирательно окрашивают ацидофильные, или оксифильные клеточные структуры (то есть структуры со щелочными свойствами). Нейтральные красители окрашивают и базофильные, и ацидофильные структуры.

Наименее токсичные красители используются для прижизненной окраски клеток. Эти красители обычно применяют в виде водных растворов, например: метиленовый синий (концентрация от 1 : 1000 до 1 : 10000), трипановый синий (0,5%-ный р-р), нейтральный красный (от 1 : 50000 до 1 : 200000).

Красители для фиксированных клеток могут использоваться в чистом виде (водные или спиртовые растворы, концентрация от 0,1% до 1%), например: эозин, фуксин. Часто используют смеси красителей, например, смесь Романовского–Гимза (содержит метилен–азур, метиленовый фиолетовый, метиленовый синий и эозин), окраска по Маллори (последовательное использование кислотного фуксина S, а затем смеси анилинового синего и оранжевого золотого G), азур–эозин, метилблау–эозин.