

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Биологический факультет
Кафедра клеточной биологии и гистологии

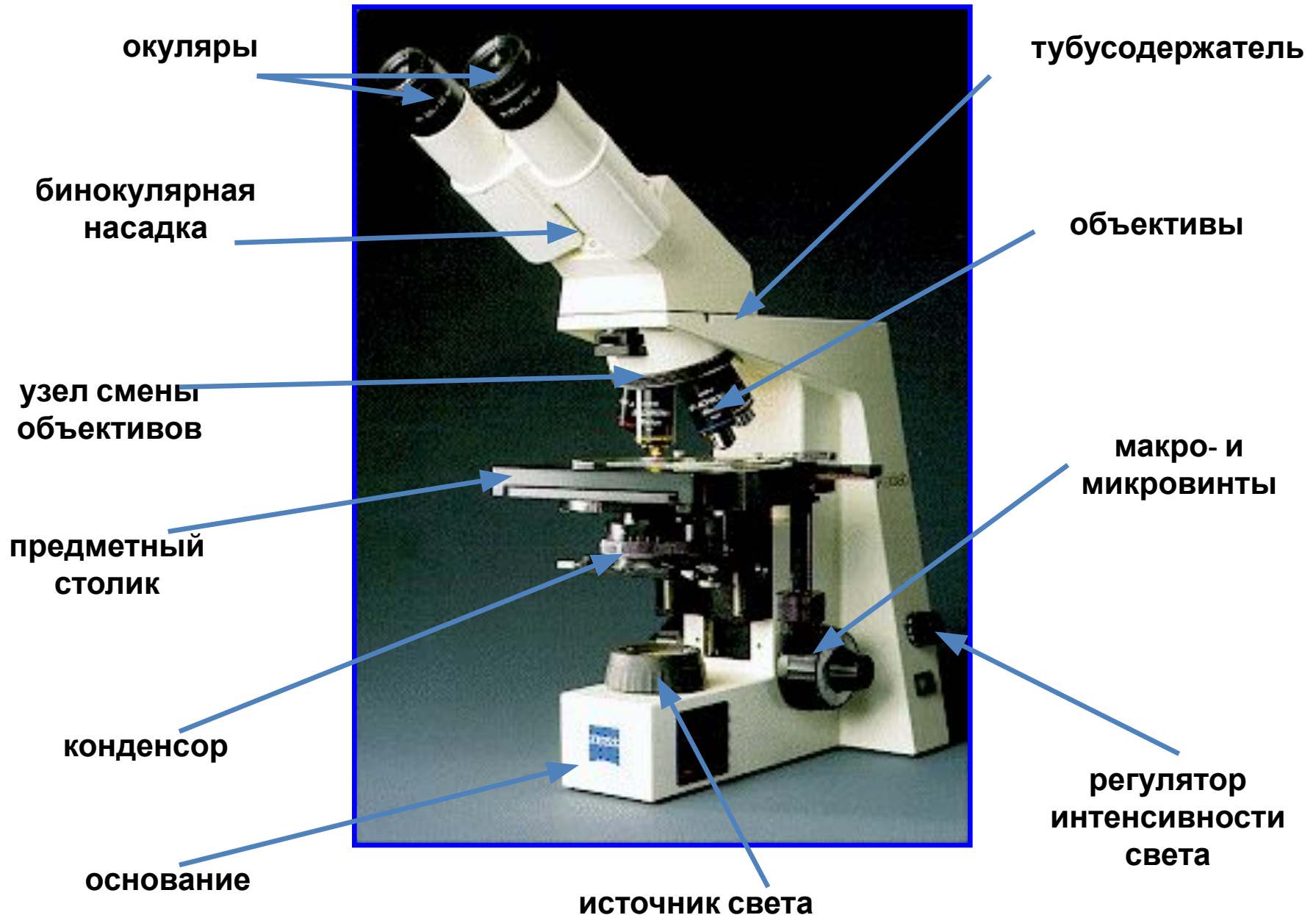
Занятие 1.

Световая микроскопия

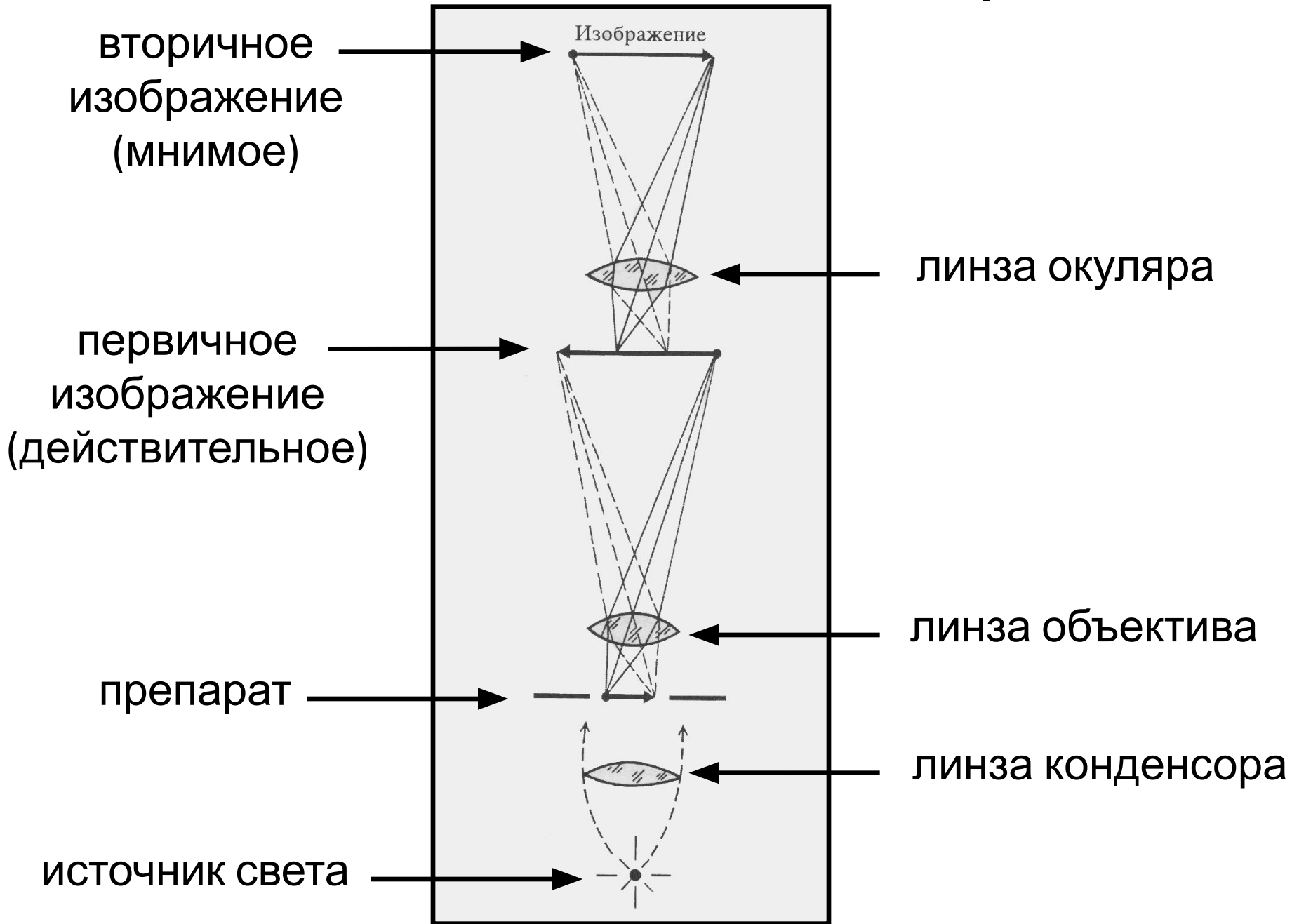
Доронина Татьяна Валерьевна

2019 год

Строение светового микроскопа



Оптическая система светового микроскопа



Разрешающая способность светового микроскопа

λ - длина волны света, используемого для освещения объекта

$$d = \frac{0.61\lambda}{n \sin \alpha}$$

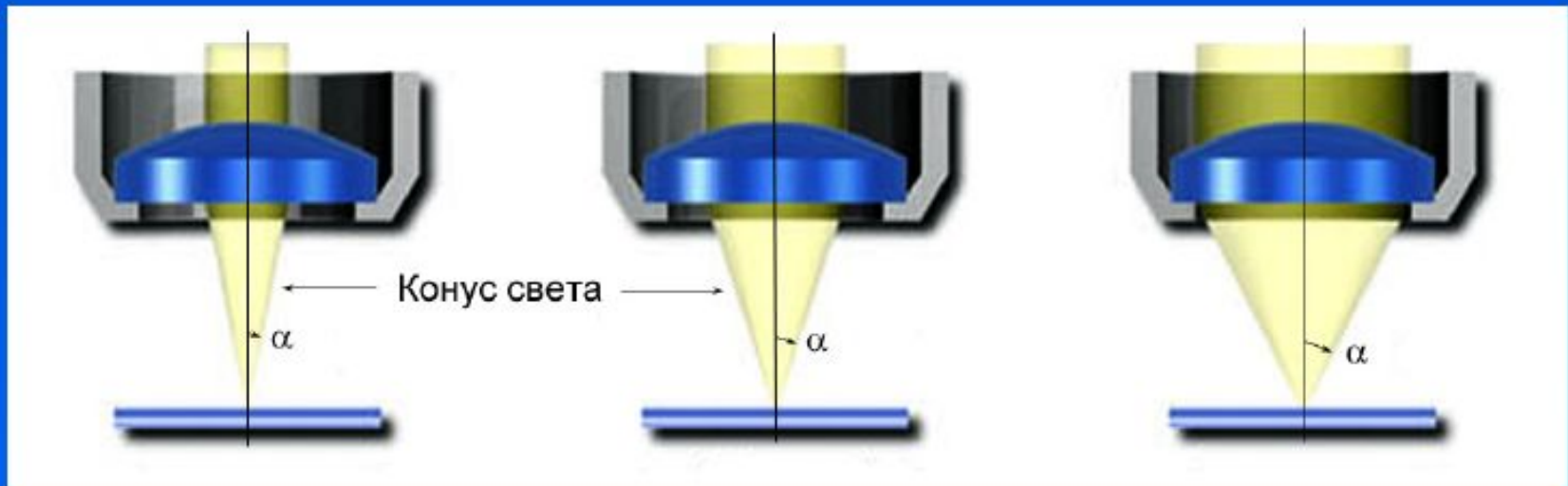
n – показатель преломления среды, лежащей между объектом наблюдения и объективом

α - угол между оптической осью объектива и наиболее отклоняющимся лучом, попадающим в объектив

A - числовая (нумерическая) апертура

$$A = n \sin \alpha$$

Числовая апертура объектива



Числовая апертура (NA) – синус половинного угла (α) конуса света, собираемого объективом.

Для иммерсионного объектива величина апертуры умножается на коэффициент преломления иммерсионной жидкости (масла, воды):

$$NA = n \cdot \sin \alpha$$

Применение иммерсии

Иммерсия позволяет уменьшить эффект отражения света на границе раздела фаз.

Гомогенная иммерсия позволяет свести этот эффект к нулю.

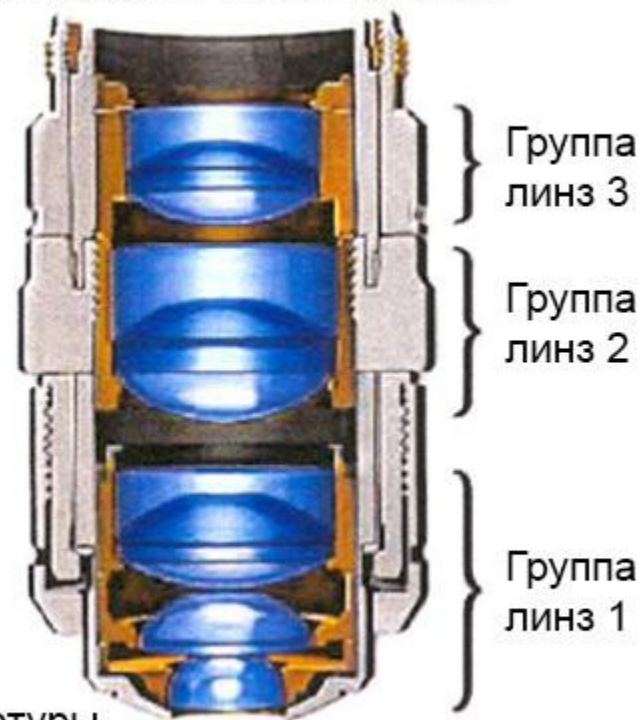
За счет иммерсии растет эффективная апертура объектива и разрешающая способность микроскопа возрастает в полтора раза.

Иммерсия также увеличивает светособирающую силу объектива.



МАРКИРОВКА ОБЪЕКТИВА

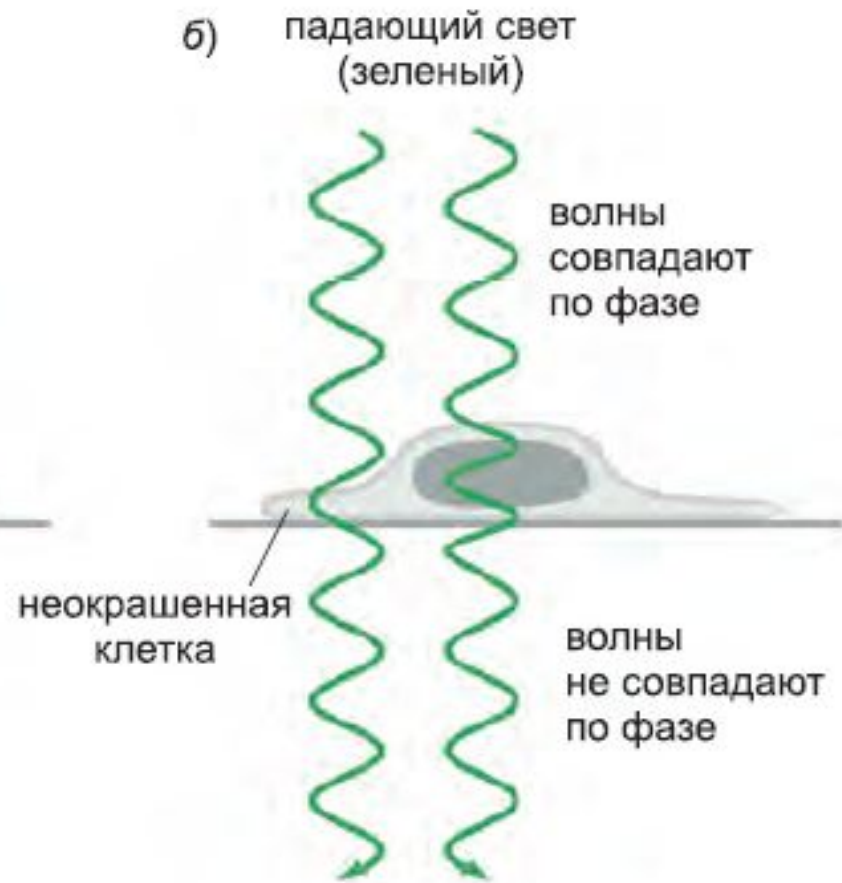
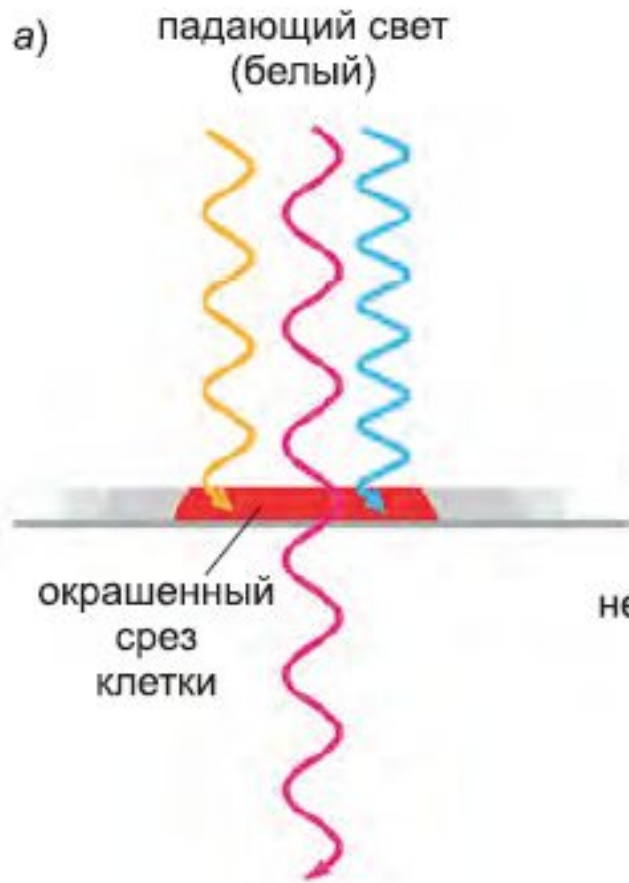
АНАТОМИЯ ОБЪЕКТИВА



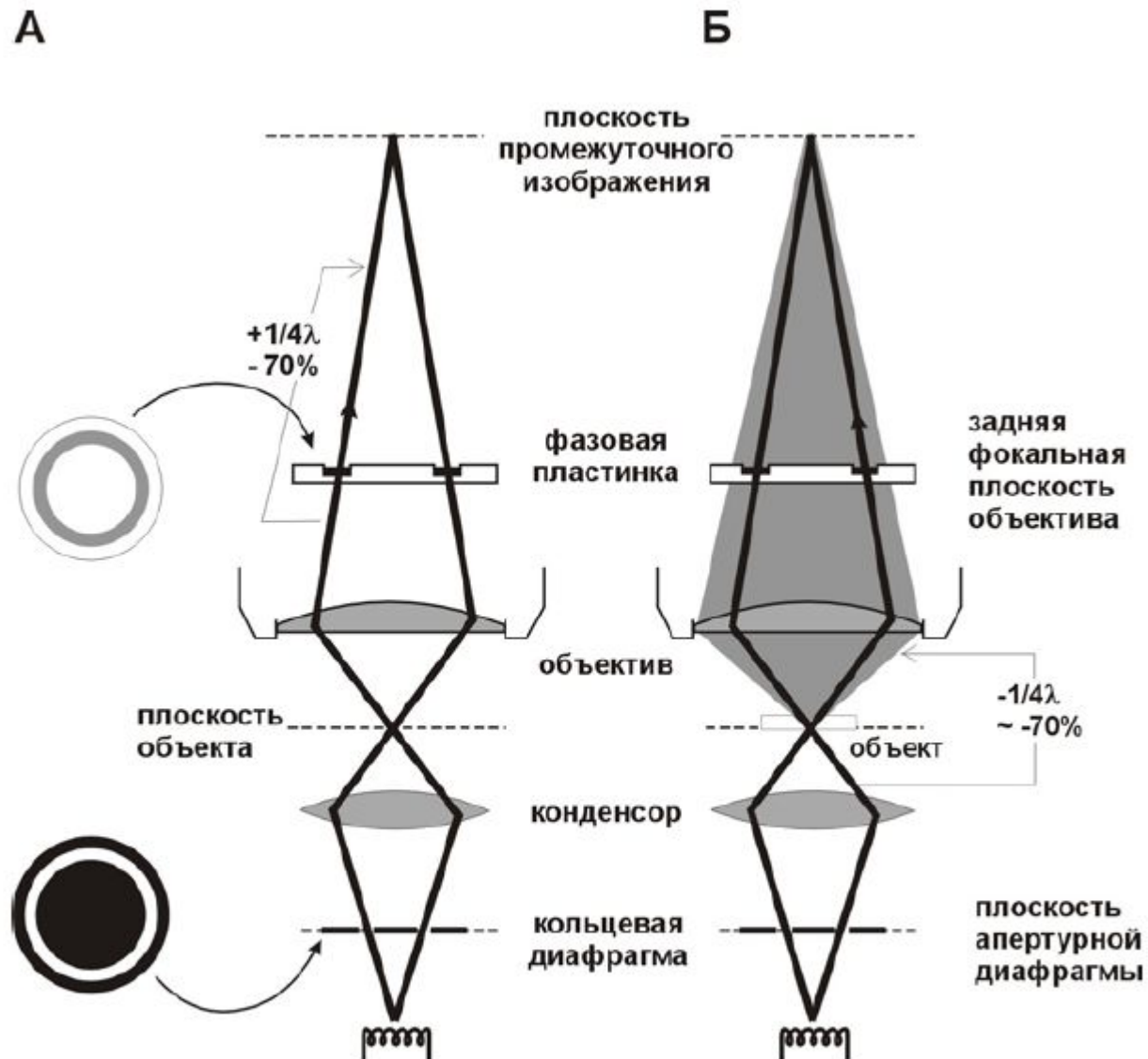


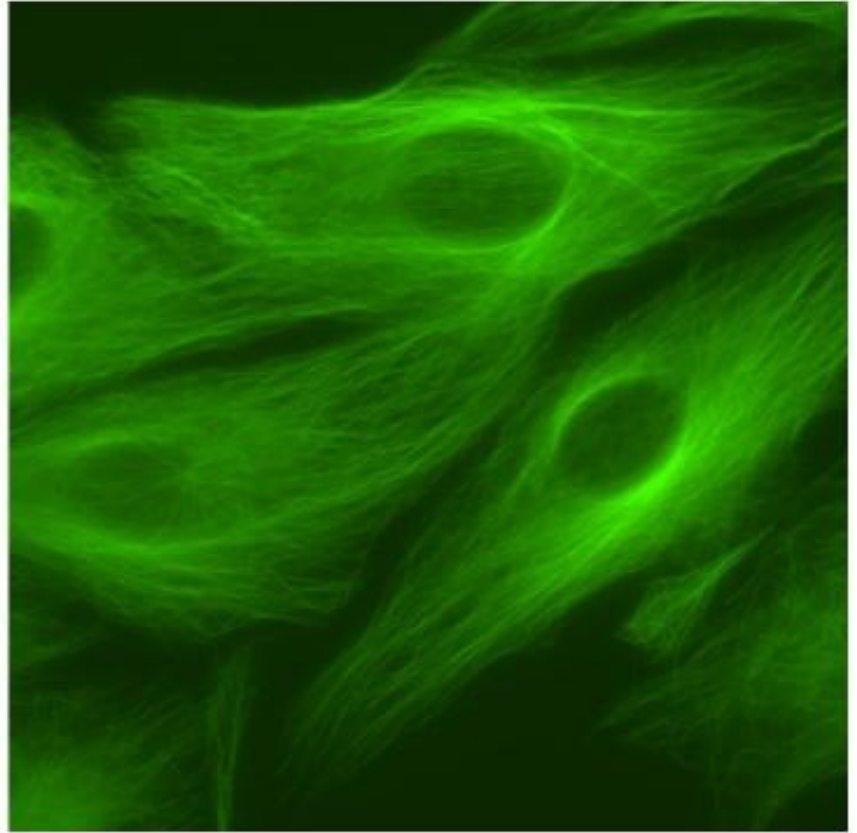
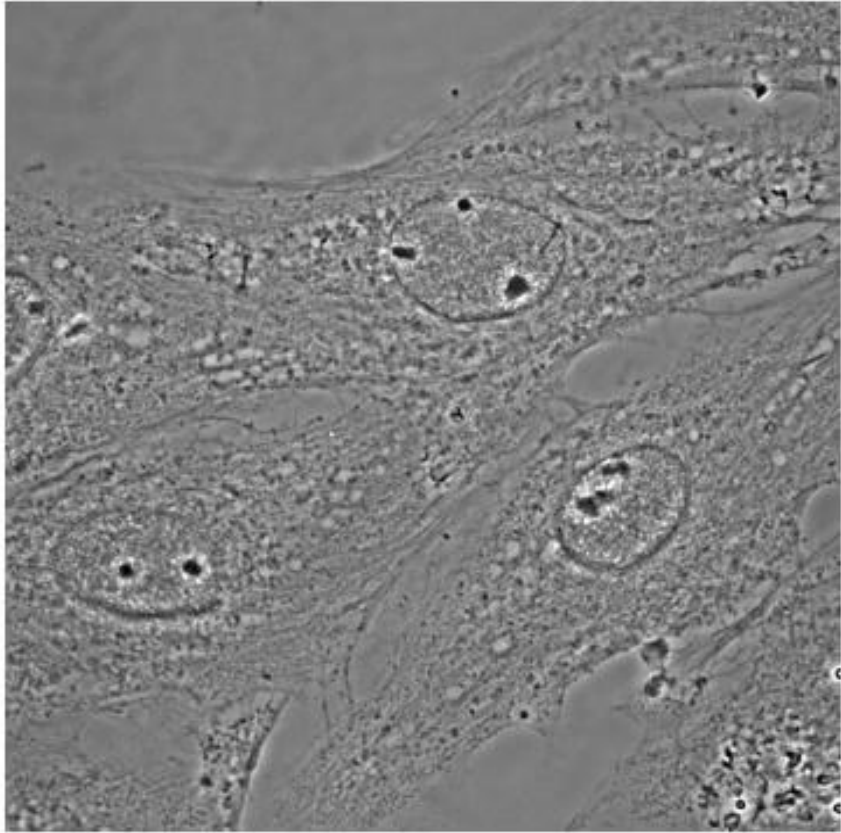
Общие правила работы с микроскопом

1. Нельзя переносить микроскоп за «горловину»: **необходимо** всегда второй рукой **поддерживать его снизу**.
2. При работе с микроскопом нельзя применять большие усилия. Ни в коем случае **нельзя касаться пальцами поверхности линз, зеркал и светофильтров**.
3. Чтобы предохранить внутренние поверхности объективов, а также призмы тубуса от попадания пыли, **необходимо всегда оставлять окуляр в тубусе**.
4. Объективы должны находиться в чистом состоянии. По окончании работы на микроскопе **необходимо тщательно удалить остатки иммерсионного масла** с фронтальной линзы объектива.
5. **После окончания работы** на препарат должен быть **наведен объектив с малым** увеличением. Нельзя оставлять «смотрящим вниз» объектив с увеличением 40x или 90x.
6. **Запрещается использовать иммерсионную жидкость с неиммерсионными объективами**.

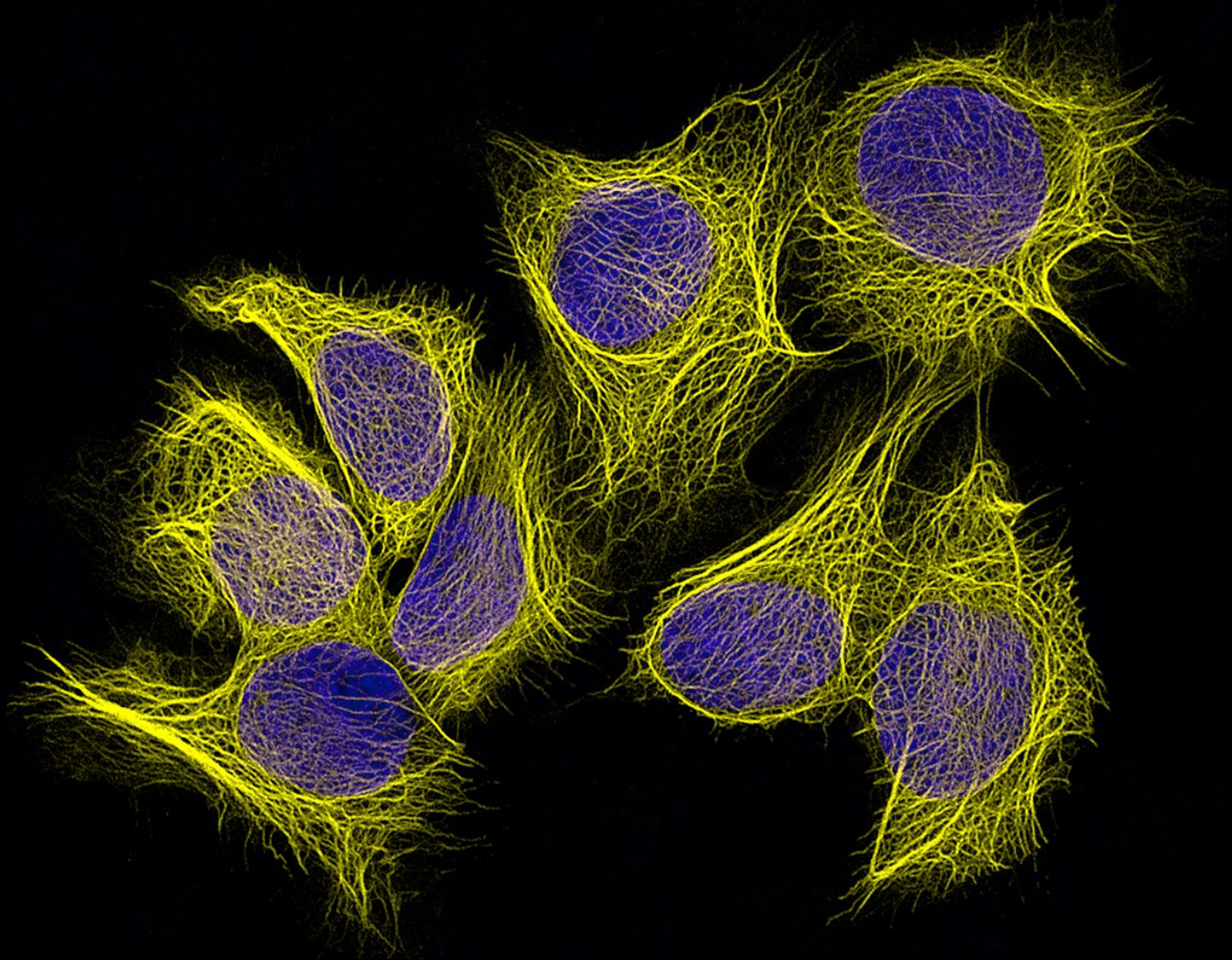


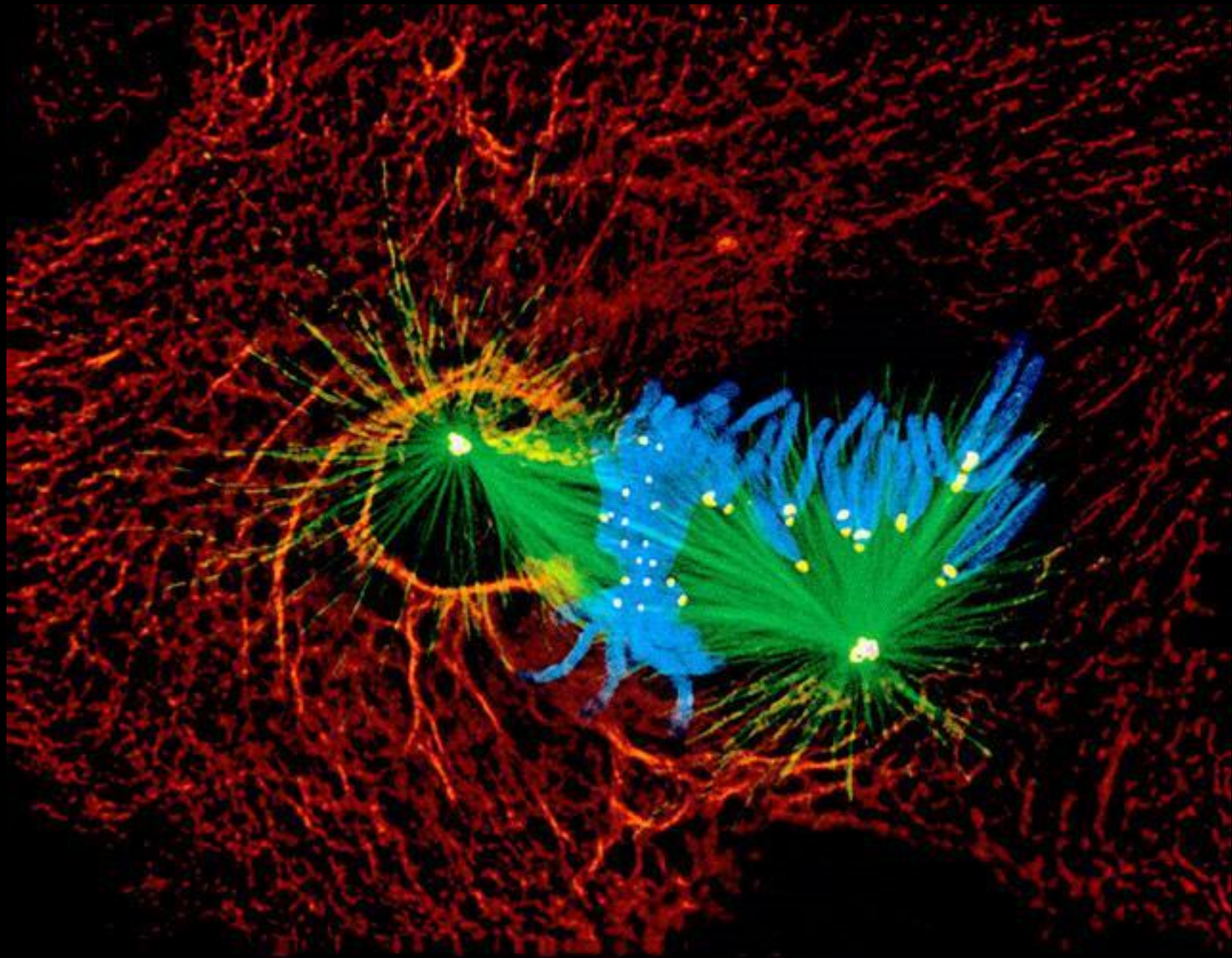
Фазово-контрастная микроскопия



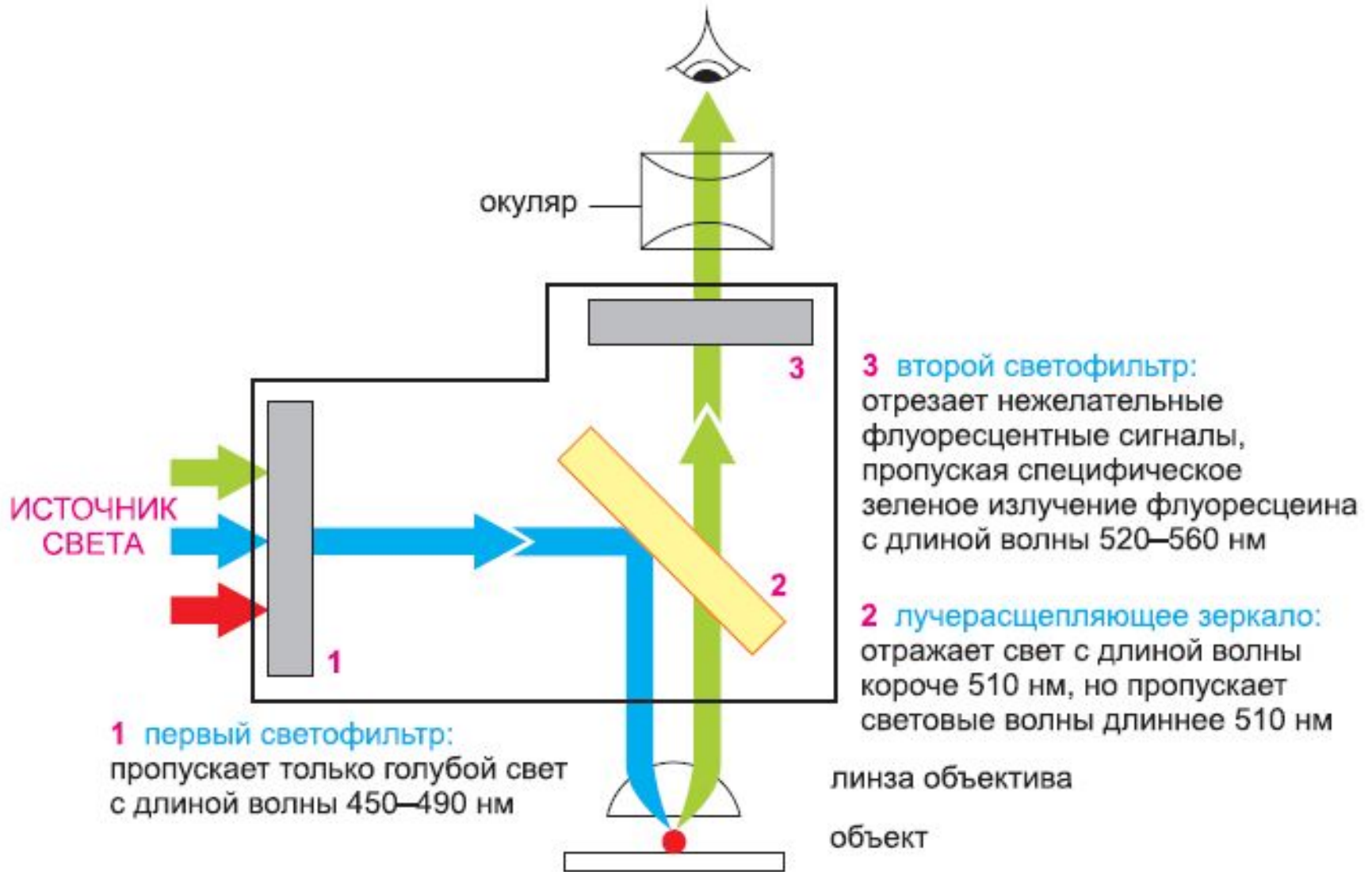


Флуоресцентная микроскопия





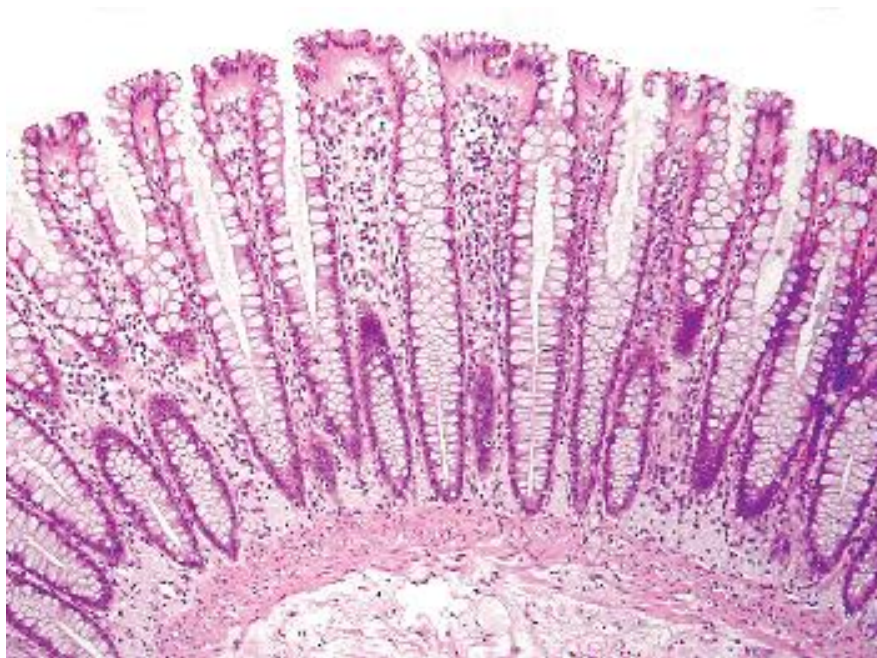
Флуоресцентная микроскопия



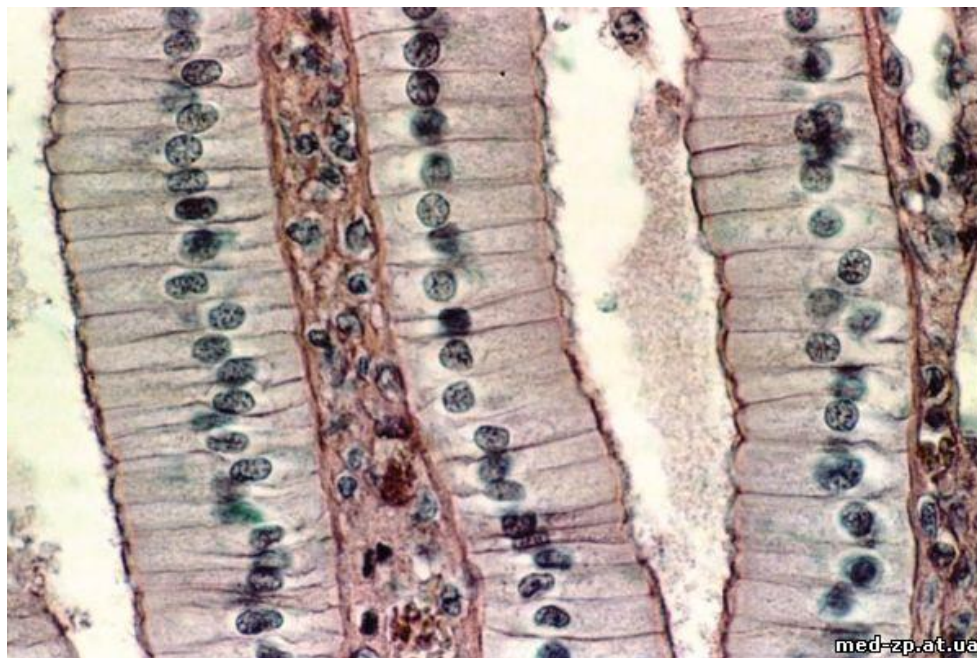
Основы микроскопической техники

Приготовление гистологических препаратов

Световая микроскопия (обычная)



стенка толстой кишки



эпителиальная ткань

Объекты

- Мазки (костный мозг, кровь, ликвор);
- Пленки (брыжейки, нервная ткань);
- Отпечатки (печень, селезенка);
- Клетки культур;
- Гистологические срезы;
- Давленные препараты;
- Живые клетки (окрашенные с помощью витальных красителей)

Витальные красители

- Акридиновый оранжевый (ядро)
- Янус зеленый (митохондрии)
- Нейтральный красный (лизосомы)

Гистологические препараты

постоянные

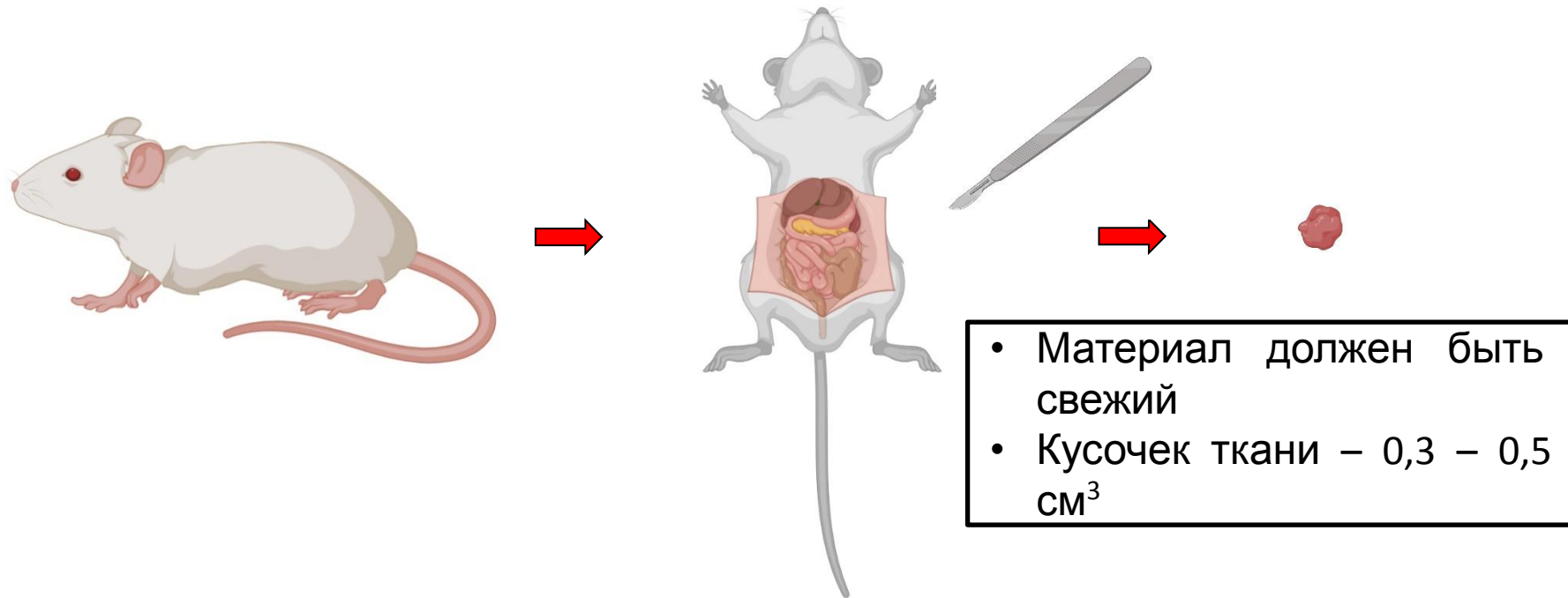
нужна фиксация клеток



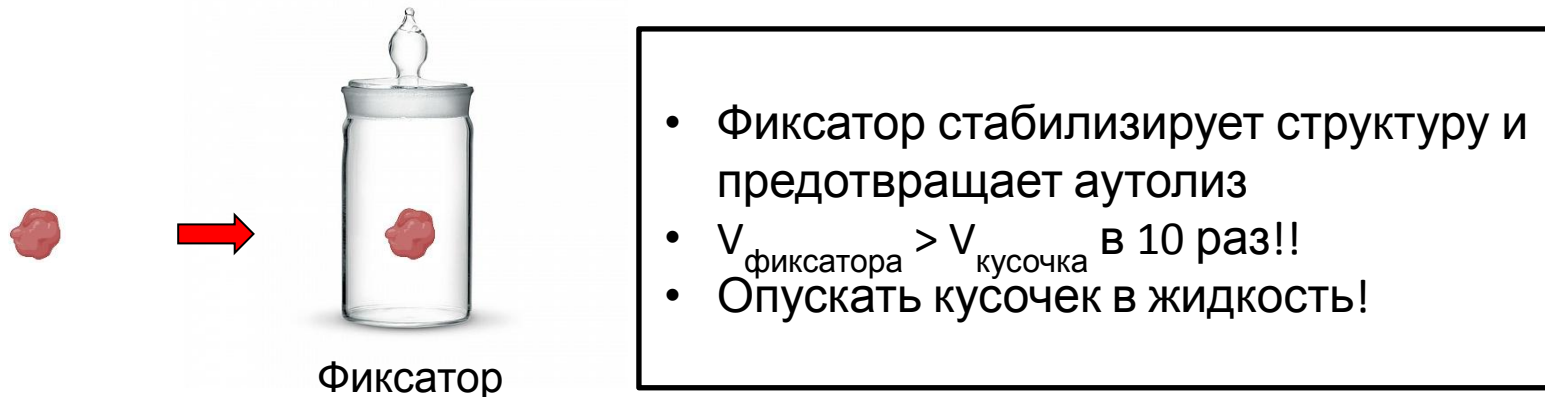
временные

живые клетки

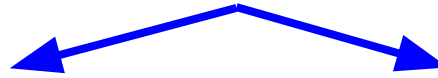
1. Забор материала



2. Фиксация



Фиксаторы



простые

(из одного вещества или его раствора)

- Спирты
- Ацетон
- Альдегиды:
(формалин, глутаровый альдегид)
- Тетраоксид осмия

сложные

(из нескольких компонентов)

- Фиксатор Буэна
(пикриновая и ледяная уксусная кислота, формалин)
- Фиксатор Карнуа
(ледяная уксусная кислота, хлороформ, спирт)
- ФСУ (формалин, спирт, уксусная кислота)

3.

}



70° спирт



96° спирт



100° спирт

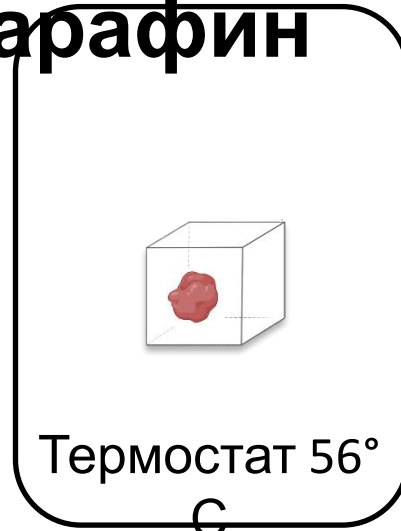


хлороформ
(или
толуол,
или ксилол)

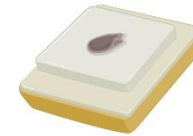
4. Заливка в парафин



хлороформ (толуол) +
парафин
(парафиновая
“каша”), 37 ° (жидкая)

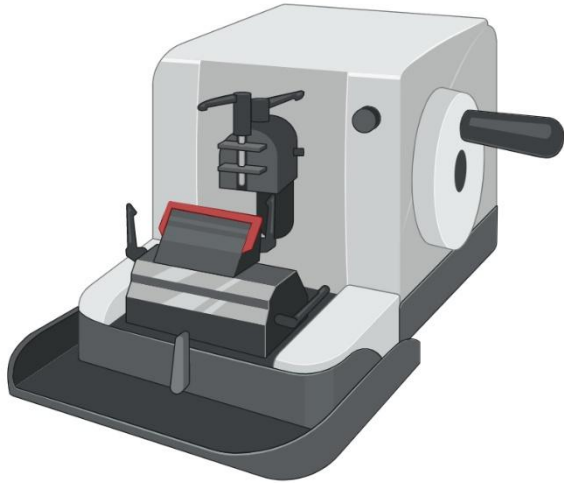


расплавленный
при 56° парафин
(в бумажной коробочке)



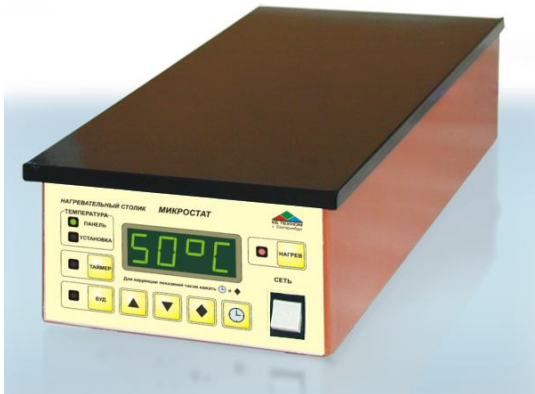
из затвердевшего
парафина - кубики с
заключенным в них
объектом.
Кубики наклеиваются на
деревянные подставки
и укрепляются на
микротоме.

5. Получение срезов на



Получение срезов толщиной 2-4
МКМ.

6. Наклеивание срезов на предметное



нагревательный столик

Ленту срезов переносят на предметное стекло,
заранее смазанное белком, расправляют
под биноклем с помощью препаровальных
игл

и кладут на нагревательный
столик (37 °), чтобы срезы хорошо присохли.

7.

Парафинировани



хлороформ
(или
толуол,
или ксилол)
2 смены

100°
спирт
2 смены

96° спирт

70° спирт

дистиллированн
ая
вода

Для того чтобы срез ткани, залитый в парафин, окрасить, его надо подвергнуть обработке, в результате которой из среза удаляется парафин, препятствующий проникновению красителя, и ткань пропитывается водой, после чего может быть окрашена водными красителями

8.

Окрашивание

Ядерные
красители

Цитоплазматические
красители

“основны

“протравны

В основном представляют собой
карбоновые

или сульфоновые кислоты, которые в
тканях

связываются с основными белками
цитоплазмы, содержащими аргинин,
лизин, октолизин, октолизин.

**фуксин,
светлый зеленый и
др.**

(образуют с муклеиновыми
кислотами и кислыми
белками ядра
солеобразные

гема “оксили

н,

кармин,

ализарин и

др.

**азур, толуидиновый
синий,**

**метиленовый синий,
метиловый зеленый,
и др.**

Красители

Натуральные
красители

Синтетические
красители

Красители

Основные красители
(гематоксилин, тионин,
кармин, азур,
метиленовый зеленый)

Кислотные красители
(эозин, кислый фуксин,
конго красный)

Нейтральные
красители
судан III, судан IV,
метиленовый синий

Красители

Прогрессивные
красители

Регрессивные
красители

Гематоксилин

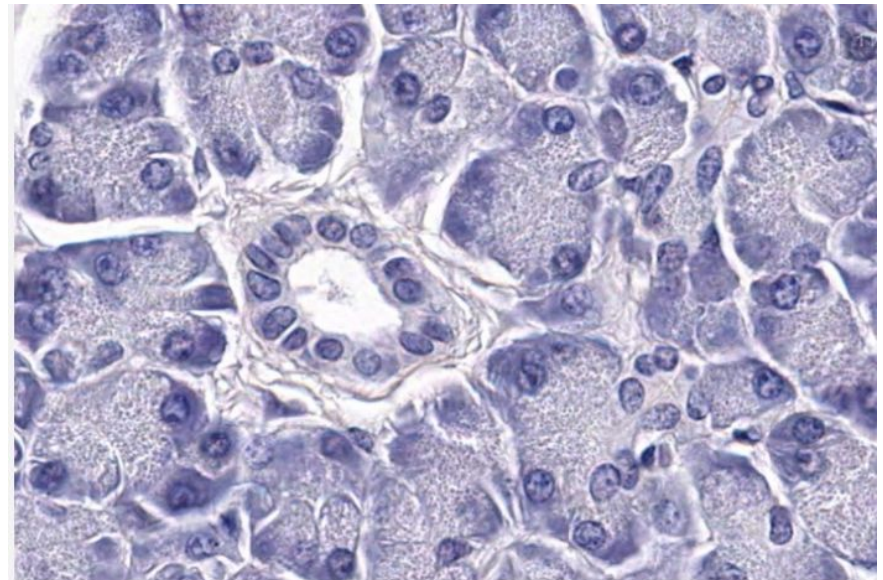


Гематоксилин
(бесцветный)



Гематеин
(окрашен)

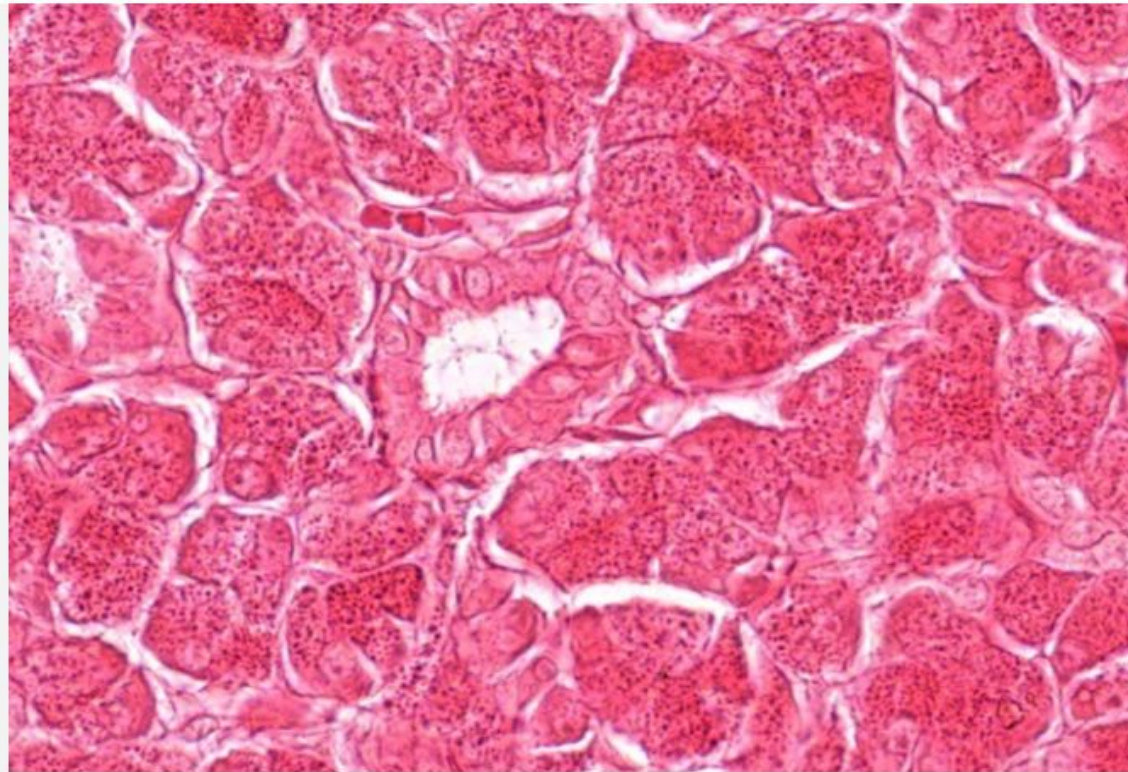
С протравой гематеин образует
солеобразное соединение – лак,
которое окрашивает ядра



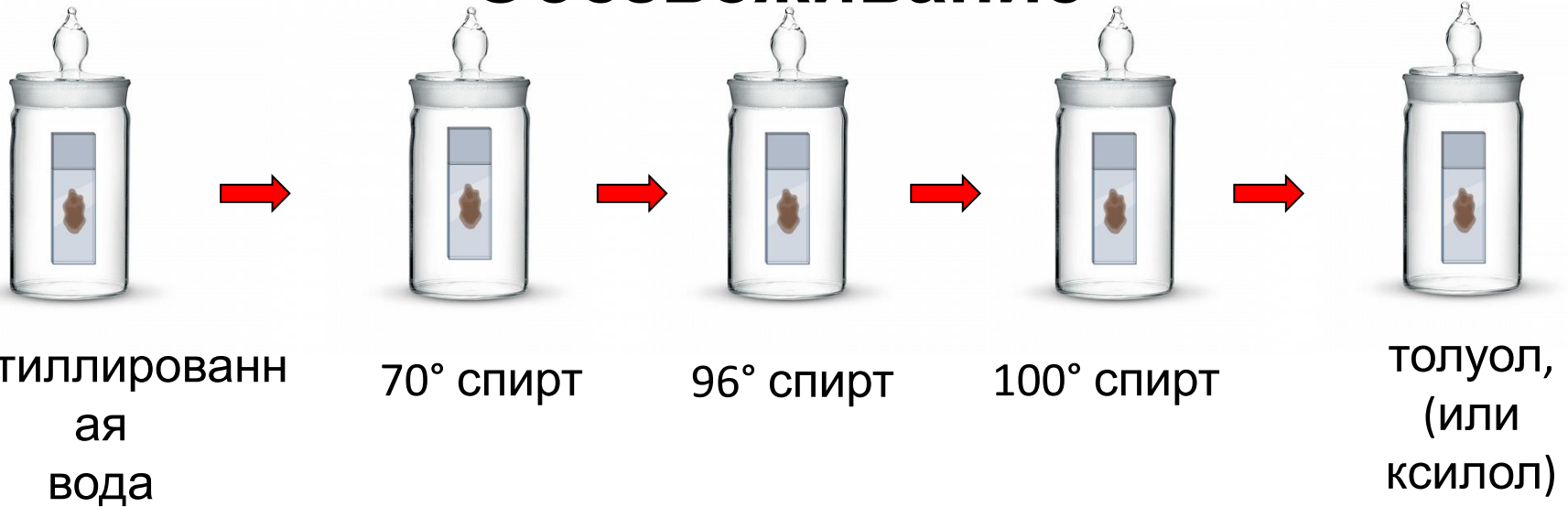
Кампешевое дерево (Южная

ЭОЗИН

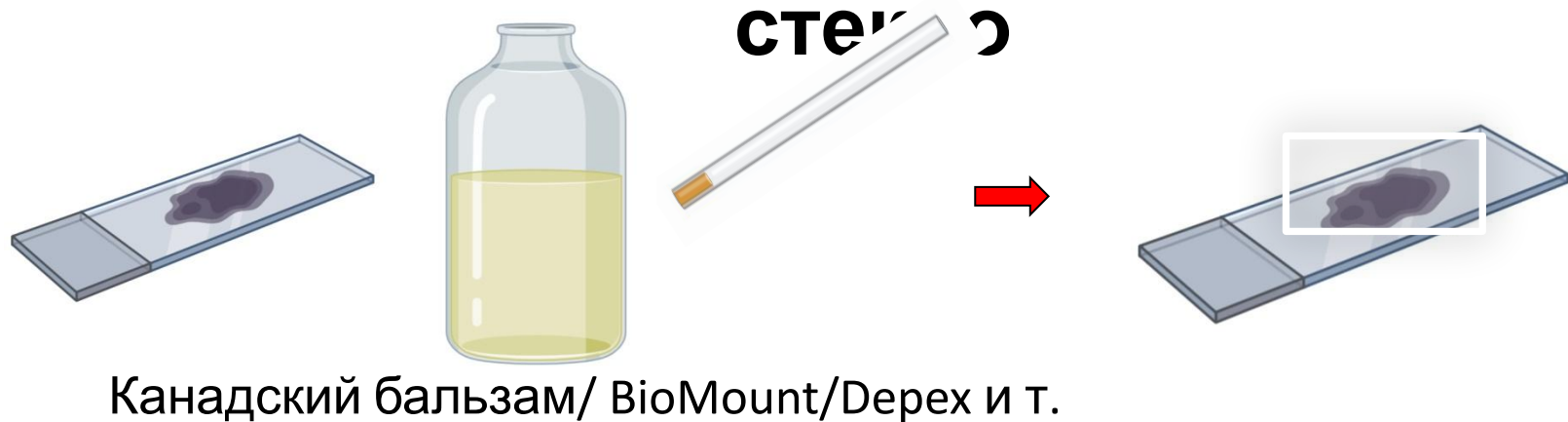
Цитоплазматический краситель



9. Обезвоживание



10. Заключение под покровное стекло



Гистологические препараты

постоянные

временные

фиксация клеток

живые клетки

обезвоживание

заливка в парафин

получение срезов на микротоме

наклеивание срезов на предметное стекло

депарафинирование

окрашивание

обезвоживание

заклучение под покровное стекло в каплю канадского бальзама

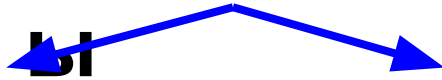
Культура клеток и тканей

Клетки могут расти в культуре в течение длительного времени, если:

- снабжать клетки необходимыми питательными веществами
- обеспечить асептические условия на всех стадиях работы

Культур

ы



тканевые
трехмерная
структура

клеточные
растут в виде
монослоя, не
формируют

трехмерных комплексов

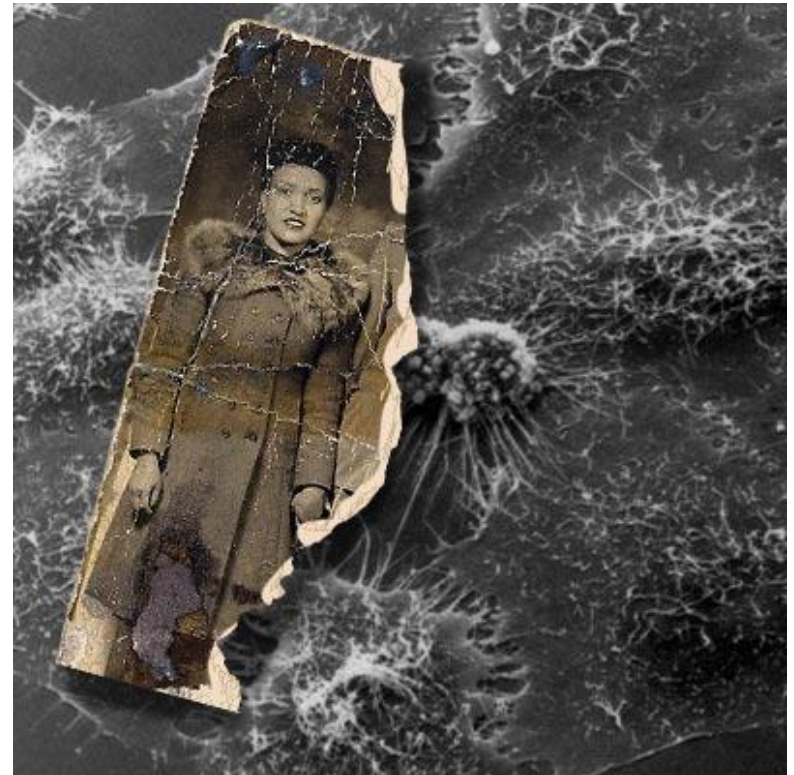
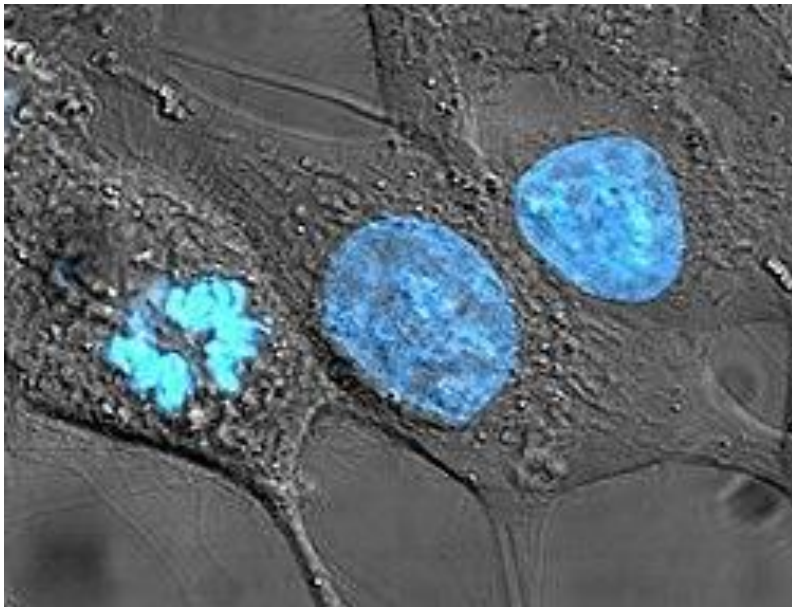
Первичная культура – культура клеток, взятая непосредственно из живого организма

Пассирование (субкультивирование) – процесс пересева клеток
Эмбриональные ткани выдерживают 50 пассажей, обычные – 20
(лимит Хейфлика)

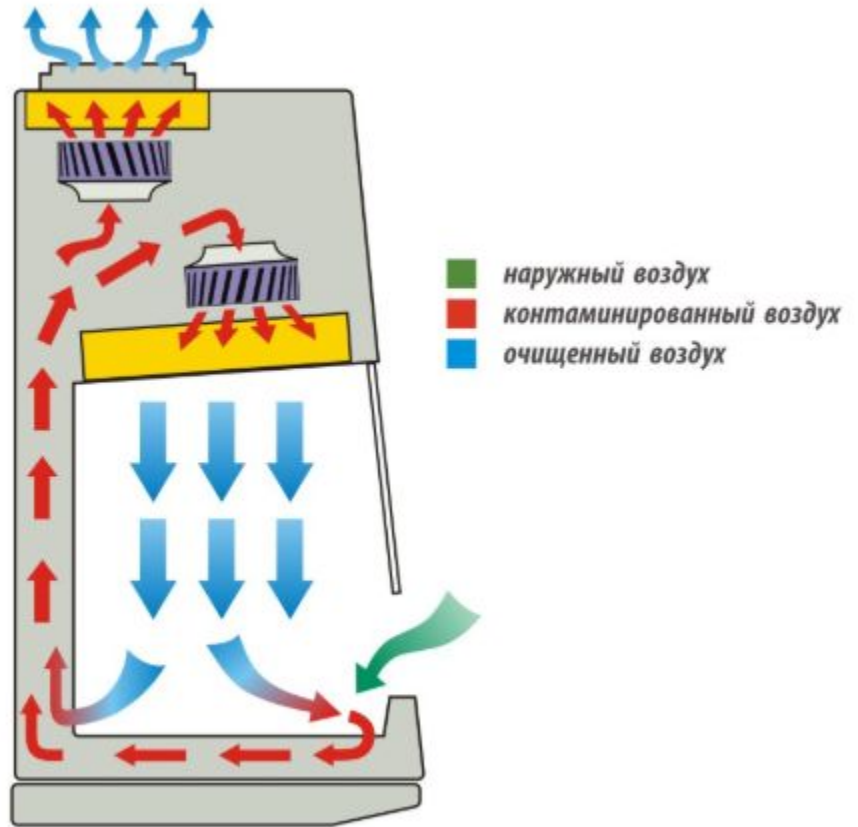
Клонирование – получение клеточной линии из индивидуальной клетки

HeLa

Линия была получена 8 февраля 1951 года из раковой опухоли шейки матки пациентки Генриетты Лакс



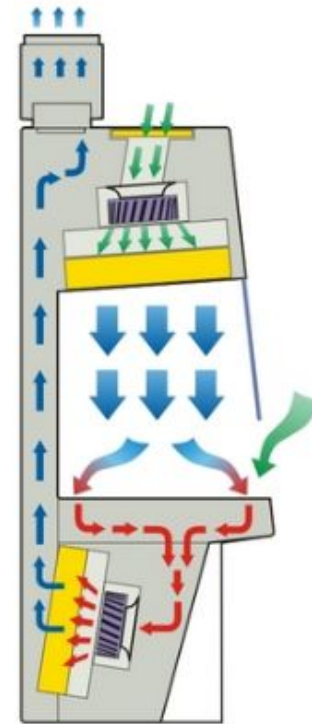
Ламинарный бокс



Ламинарный бокс

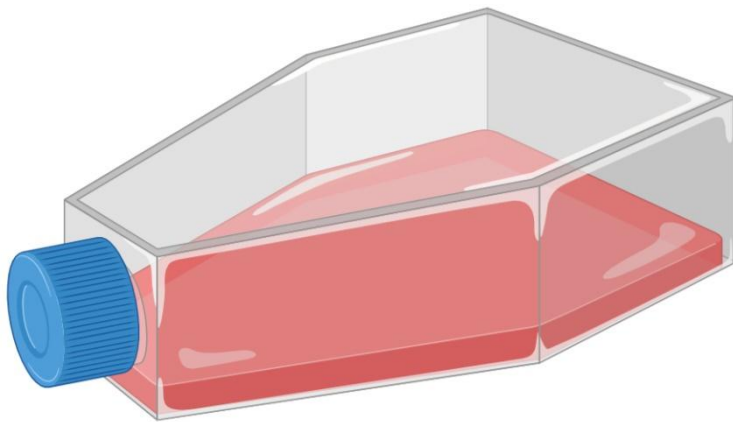


СХЕМА ВОЗДУШНЫХ ПОТОКОВ

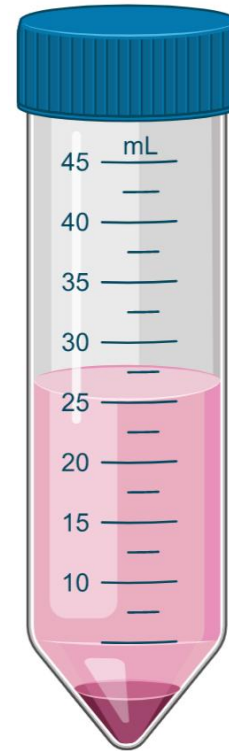


- *контаминированный воздух*
- *наружный воздух*
- *очищенный воздух*

Культуральная посуда

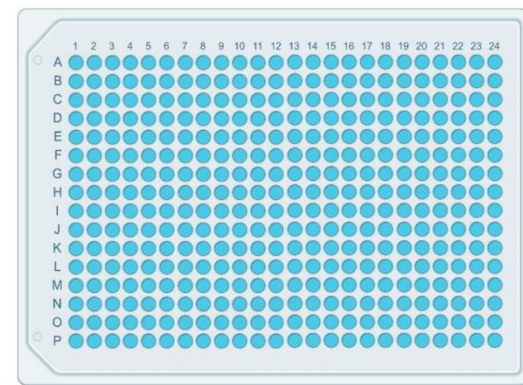
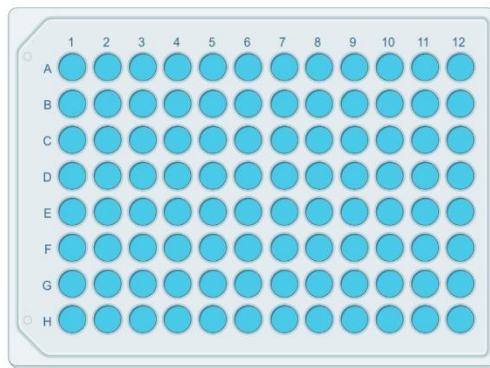
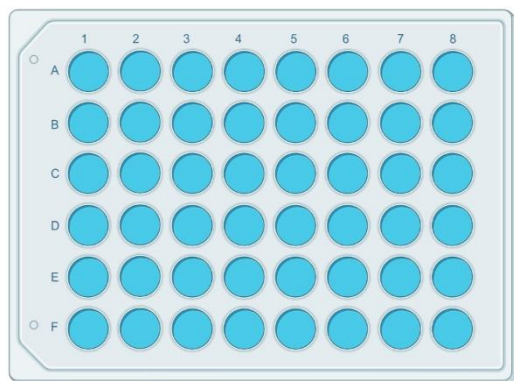
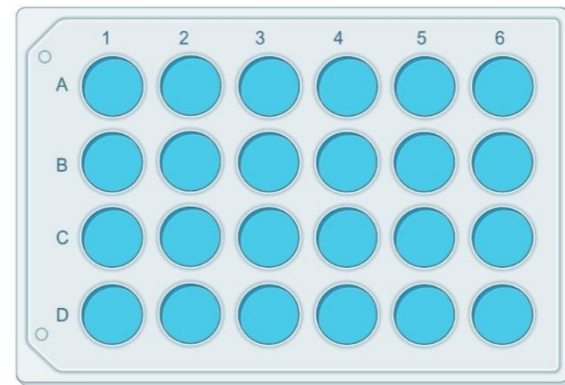
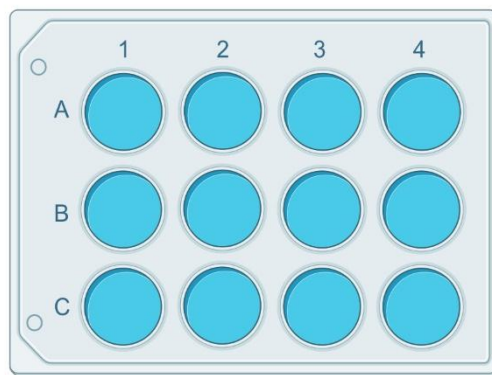
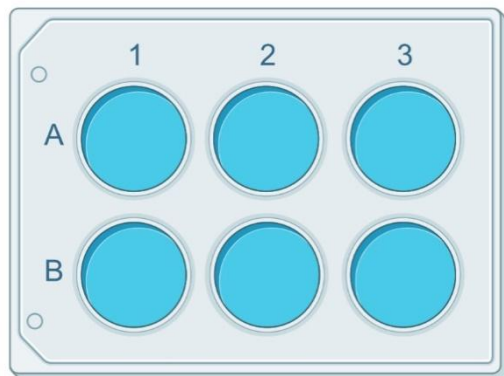


матра
С



фалько
Н

Культуральная посуда



Культуральная среда

- раствор аминокислот, витаминов, глюкозы и т.д. на основе сбалансированного буферного раствора (обеспечивает осмотическое давление)
- рН = 7.2-7.5 (достигается с помощью системы бикарбонат натрия/СО₂)

Для нормального роста клеток нужны:

- Культуральная среда
- Сыворотка
- L-глутамин (добавлять перед началом работы со средой, т.к. в водном растворе быстро разлагается)
- Антибиотики (обеспечение стерильности)

Эпителий почки кролика



просвет
канальца

клетки
эпителия



просвет
канальца

- **Системы микроскопа**

- **Механическая**

- - станина
 - - столик
 - - макровинт
 - - микровинт
 - - винты конденсора

- **Оптическая**

- - объектив
 - - окуляр
 - - фокальная линза (к тубусу)
 - - фронтальная линза (к окуляру)

- **Осветительная**

- - источник света
 - - конденсор
 - - ирисовая диафрагма
 - - светофильтры