

Методы: микроскопия

Устройство светового микроскопа, виды световой микроскопии.
Устройство электронного микроскопа. Понятие увеличения и разрешения в микроскопии.

Как решается проблема низкой контрастности биологических объектов в разных видах микроскопии?

Наблюдение живых и фиксированных объектов

Методы: микроскопия

Микроскопия бывает:

1) **СВЕТОВАЯ** (на препарат на правлен пучок фотонов)

1а светлопольная

1б темнопольная

1в фазово-контрастная

1г DIC

1д флуоресцентная (широкопольная)

1е конфокальная

2) **ЭЛЕКТРОННАЯ** (на препарат направлен пучок электронов)

2а трансмиссионная

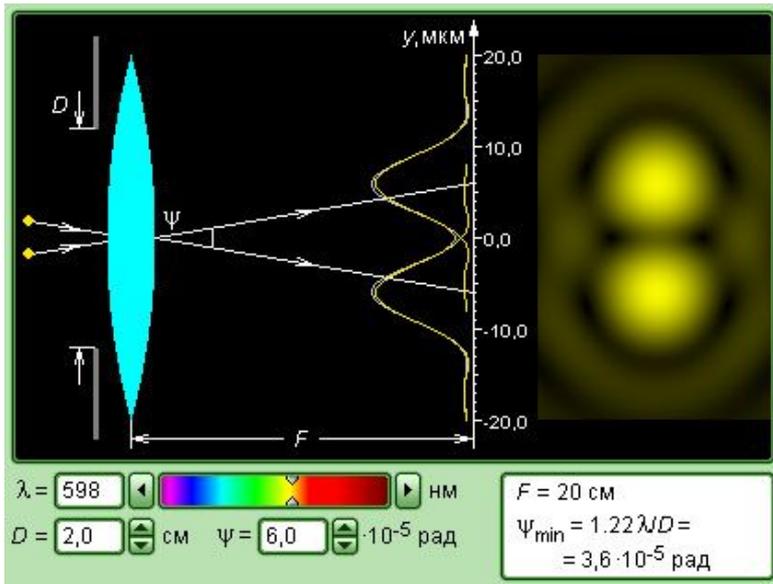
2б сканирующая

Первый микроскоп – Роберт Гук



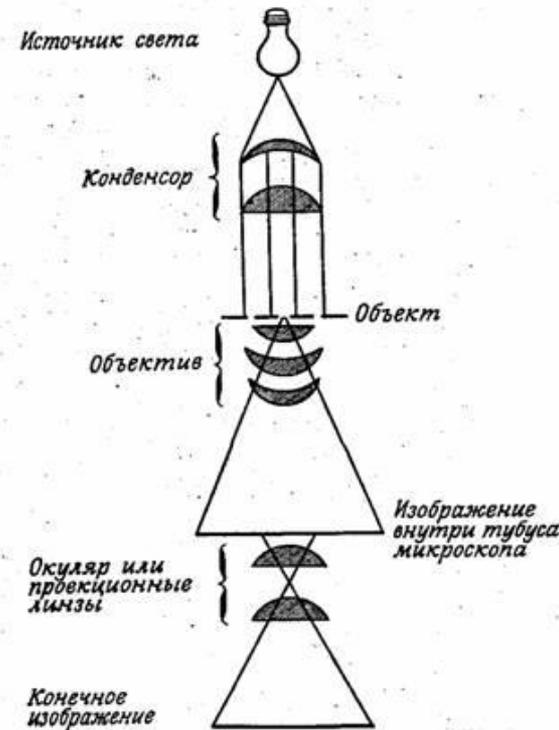
- Наклонил тубус
- Поставил источник света и линзу перед ним
- Вставил третью линзу перед объективом и окуляром

Теория и микроскоп Аббе. Критерий Рэля



Изображение в микроскопе формируется в результате интерференции прямого и дифрагированного света.

Объектив, окуляр микроскопа и их расположение рассчитываются математически. Предел разрешения микроскопа – около половины длины волны ($0,5\lambda/NA$).

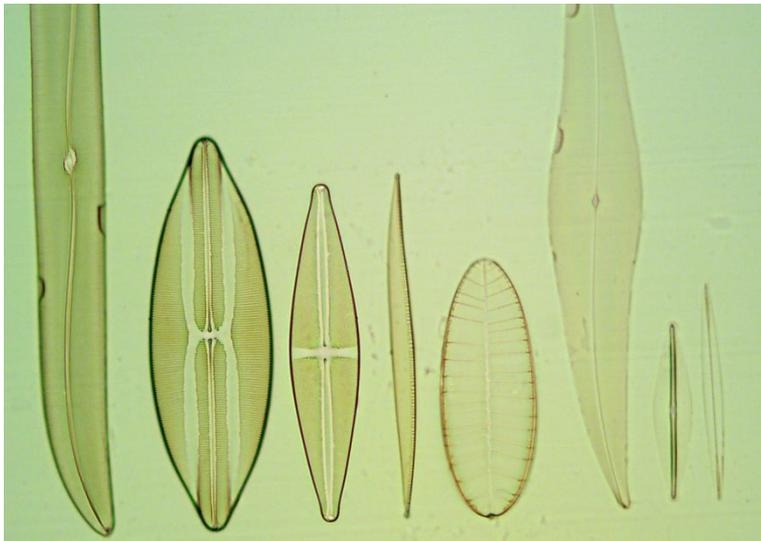


ОБЩИЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ С МИКРОСКОПОМ

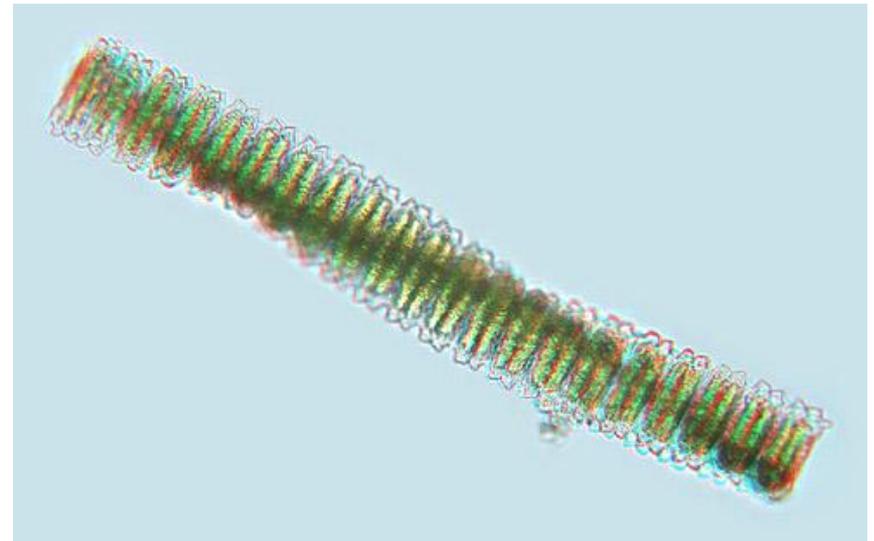
1. Нельзя переносить микроскоп за «горловину»: необходимо всегда второй рукой поддерживать его снизу.
2. При работе с микроскопом нельзя применять большие усилия. Ни в коем случае нельзя касаться пальцами поверхности линз, зеркал и светофильтров.
3. Чтобы предохранить внутренние поверхности объективов, 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.

1а. Светлопольная микроскопия.

(Биологический объект чаще всего имеет низкую контрастность. Но не всегда. А еще он иногда имеет цвет.)



Подборка диатомовых водорослей (*sp.?*), объектив x20 (из лекционных презентаций проф. Воробьева И.А.)



Desmidium swartzii

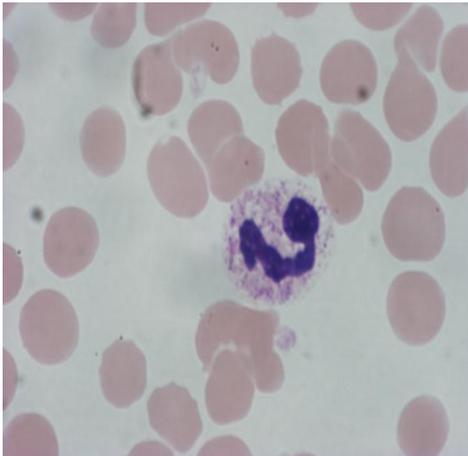
(с www.microscopy-uk.org.uk)

NB! Эти препараты не окрашены. Полезно помнить, что некоторые биологические объекты имеют собственный цвет (а иногда флуоресценцию) и очень удачные характеристики светопреломления. Их можно наблюдать в светлопольный (или флуоресцентный) микроскоп просто так. Жалко, что таких объектов мало.

1а. Светлопольная микроскопия.

(Улучшить контрастность в светлопольной микроскопии тяжело. Но можно добавить цвет. Препарат можно покрасить и исследовать в светлопольном микроскопе.)

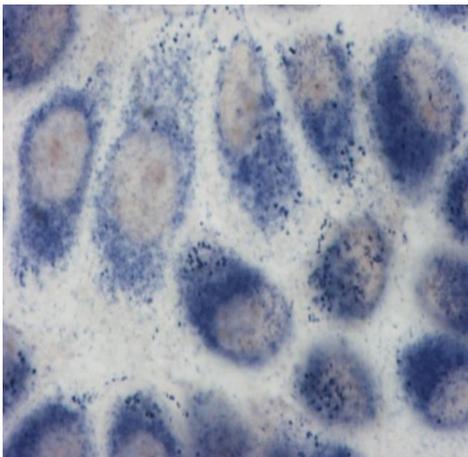
Отдельные клетки:



Мазок крови, окрашенный по Гимза (азур+эозин), объектив x100.

Видны эритроциты и сегментоядерная клетка.

Отснято Смирновой Т. А.

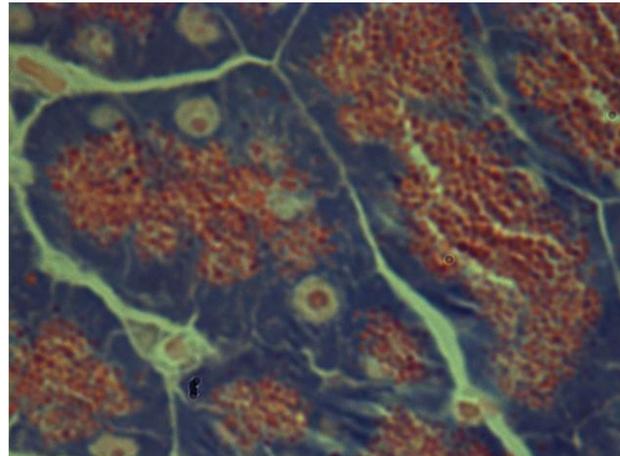


Клетки культуры СПЭВ.

Реакция на сукцинат дегидрогеназу, объектив x100.

Отснято Смирновой Т. А.

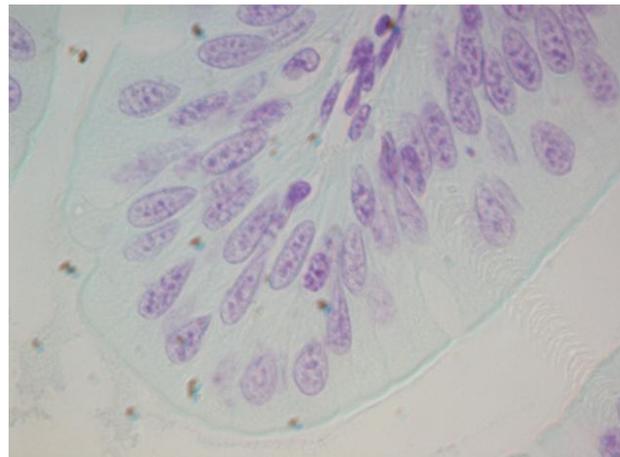
Срезы тканей:



Поджелудочная железа, окрашенная по Маллори, объектив x100.

Видны ациноциты с синей цитоплазмой и бледными ядрами, а также красные гранулы секрета в просвете ацинуса.

Отснято Смирновой Т.А.



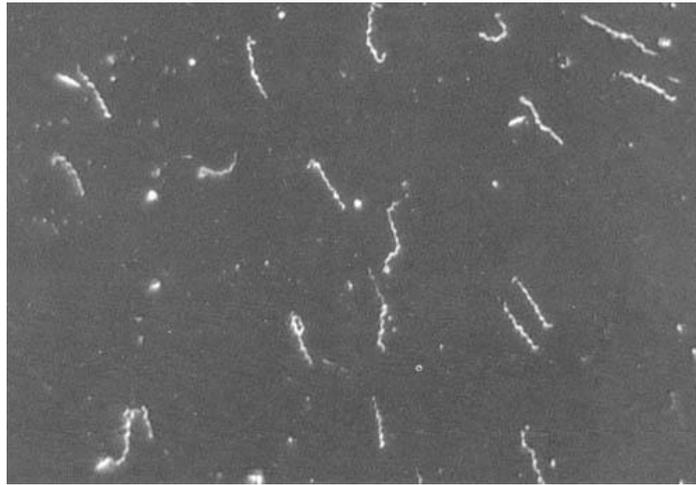
Ворсинка кишки, окрашенная по Фельгену, объектив x40.

Видна светло-зеленая цитоплазма и ядра, окрашенные реактивом Шиффа.

Отснято Смирновой Т.А.

16. Темнопольная микроскопия.

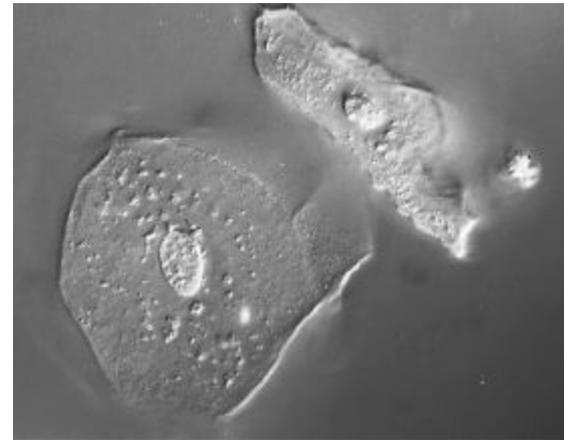
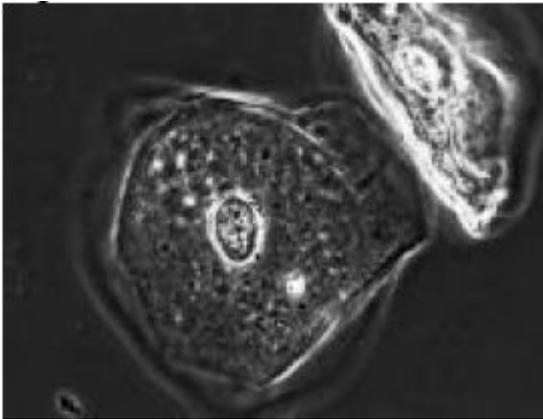
(В объектив микроскопа не попадает прямой свет. Попадает только свет, рассеянный препаратом. Препарат не окрашен.)



Treponema pallidum. Бледная трепонема в темнопольном световом микроскопе (объектив x40).

1в и 1г. Фазовый контраст и дифференциальный интерференционный контраст.

(Оба метода используют физические свойства света для искусственного увеличения контрастности объекта. Объект не окрашен.)

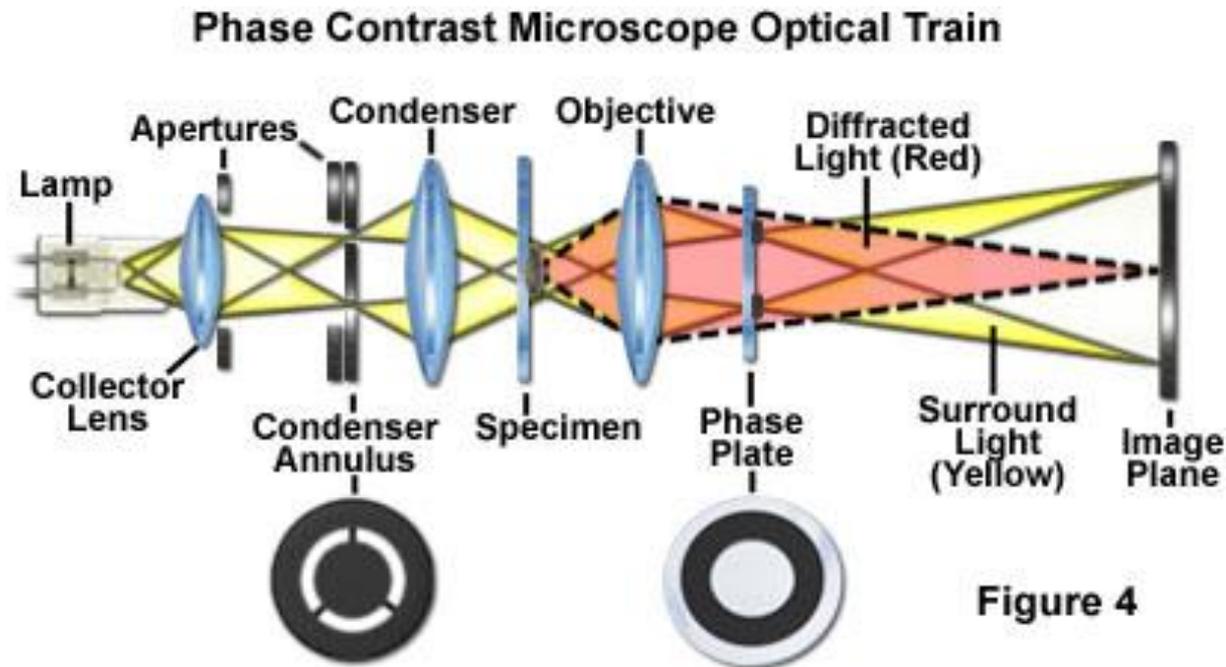


Эпителиальные клетки щеки. Слева – фаза, справа – DIC.
(Картинки взяты из книги R. Bagnell – Light Microscopy)

NB! Фазовый контраст в практикуме был, DIC - нет. Здесь просто сравните, какие получаются картинки.

Фазовый контраст –Фриц Цернике, нобелевский лауреат 1953 года

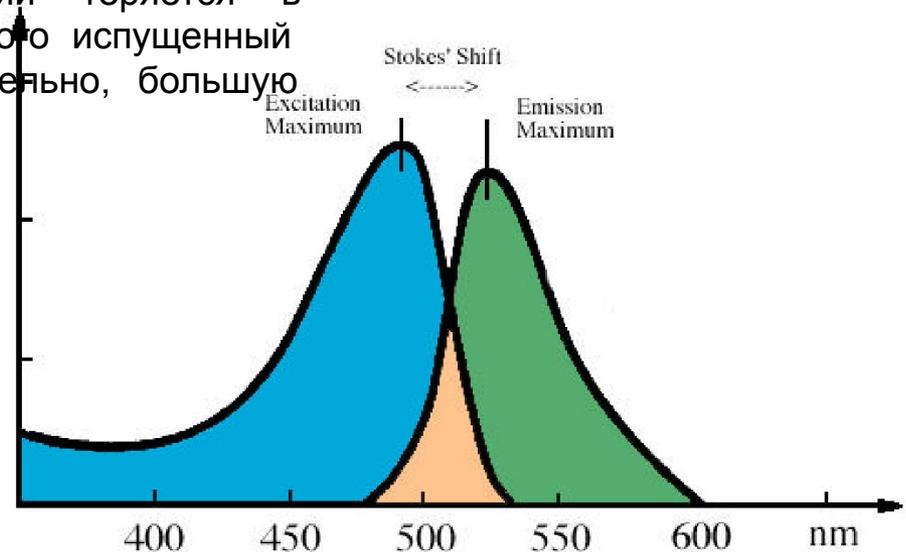
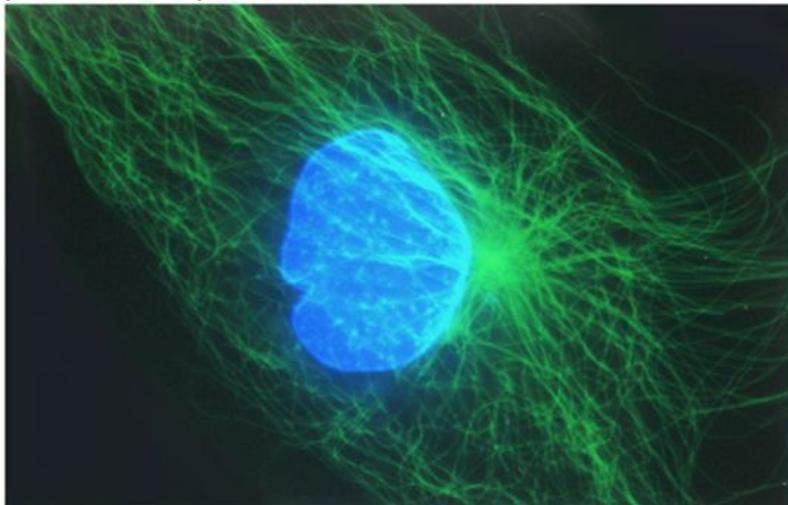
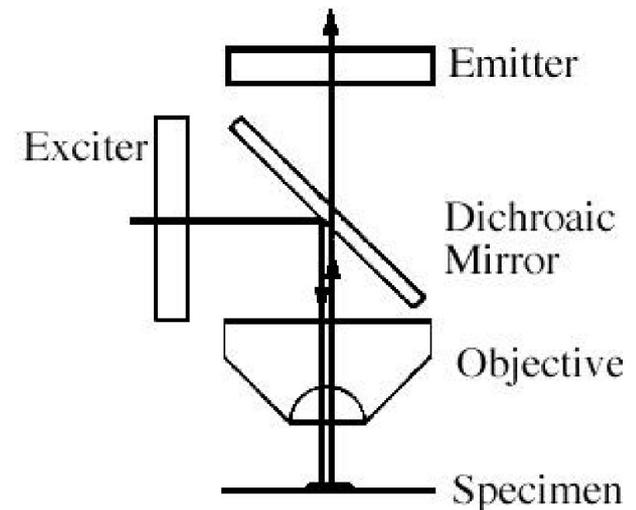
Цернике ввел понятие «Коэффициент рефракции» -скорость прохождения света через различные объекты. Биологический объект в среднем замедляет движение волны света на $\lambda/4$. Сдвиг фазы нельзя зарегистрировать, но можно зарегистрировать сдвиг амплитуды, т.е. интенсивности. Интерференцию световых лучей мы будем видеть как увеличение контраста.



Флуоресцентная микроскопия

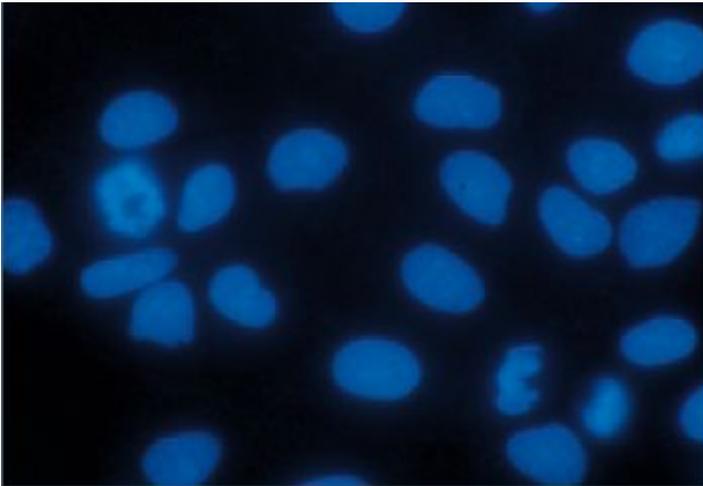
Стоксов сдвиг — разница длин волн максимумов спектров **поглощения** — разница длин волн максимумов спектров поглощения и **флуоресценции** — разница длин волн максимумов спектров поглощения и флуоресценции. Измеряется в обратных сантиметрах, реже в **нанометрах** — разница длин волн максимумов спектров поглощения и флуоресценции. Измеряется в обратных сантиметрах, реже в нанометрах, в силу нелинейной зависимости энергии фотона от длины волны. Назван в честь физика **Джорджа Стокса**. Когда система (**молекула** Когда система (молекула или **атом**) поглощает энергию, она переходит в возбужденное состояние. Существует несколько возможностей для её возврата в основное состояние. Одним из них является испускание. Вследствие разных причин часть поглощенной энергии теряется в

это испущенный
вательно, большую

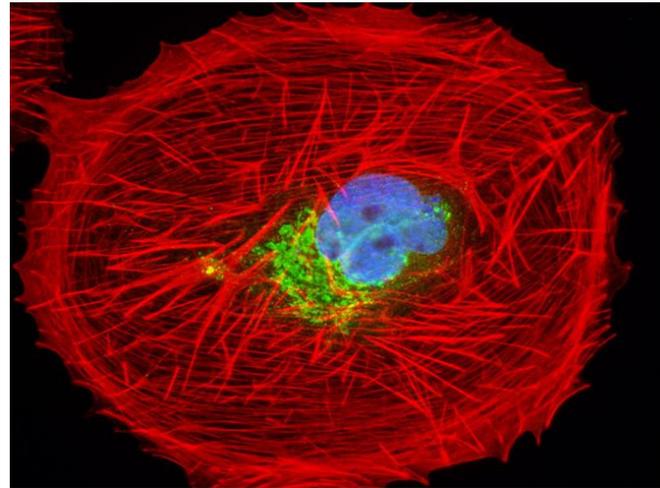


1д. Флуоресцентная микроскопия (широкого поля).

(Метод основан на свойстве флуоресцентных молекул поглощать фотон одной длины волны с последующим излучением фотона другой длины волны. Длины волн возбуждения и детекции задаются светофильтрами.)



Простая флуоресценция. Ядра, окрашенные DAPI. Объектив х63. (Взято из книги Н.Г. Kapitza Microscopy from the very beginning)

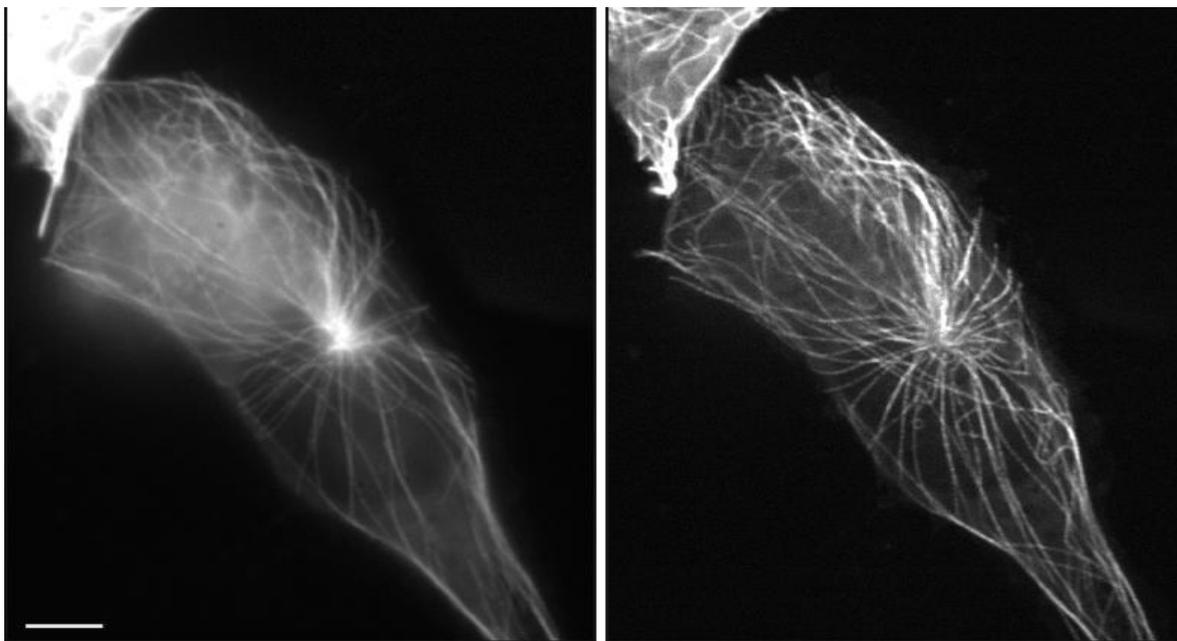


Клеточная линия CV-1. Объектив х100(?). Тройная флуоресценция: **актин**, **аппарат Гольджи**, **ядро** (Взято с сайта microscopyu.com)

NB! Не забывайте, что в одной клетке можно детектировать несколько флуоресцентных сигналов при помощи разных комбинаций светофильтров. Изображения с каждого набора светофильтров снимаются последовательно, а в дальнейшем – накладываются друг на друга. И да, эти фотографии очень красивы в цвете, но иногда попадают и в ч/б, особенно на экзамене.))

1е. Конфокальная флуоресцентная МИКРОСКОПИЯ.

(Отличие от широкопольной флуоресценции в том, что конфокальная система обеспечивает фокусировку луча и детекцию сигнала с отдельно взятого маленького участка препарата без засветки от соседних участков.)

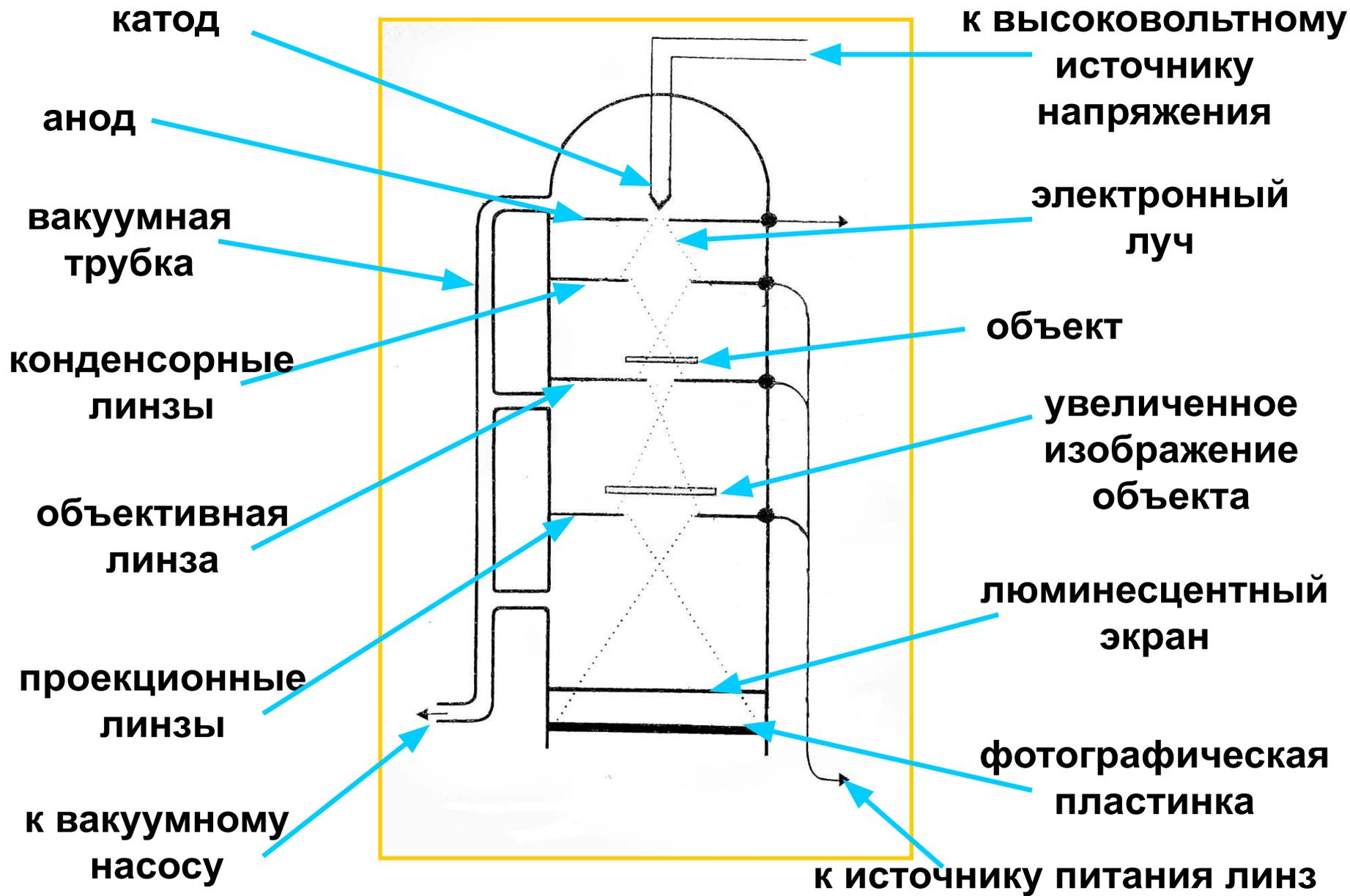


Микротрубочки в живой клетке. Слева обычная флуоресцентная микроскопия; справа - конфокальная система с диском Нипкова (Взято из лекционного курса «Видеомикроскопия» профессора Воробьева И.А. за 2012 год)

NB! Случай ч/б флуоресцентной картинки. Слайд для общего развития, т.к. фото с конфокального микроскопа в практикуме не было. Обратите внимание на то, что картинка с широкопольной флуоресценции исходно более размыта. Но не волнуйтесь: после грамотной обработки её качество будет не хуже, чем у картинки с конфокала.

Какие препараты
(живые/фиксированные?)
можно наблюдать при помощи
описанных методов?

ЭЛЕКТРОННЫЙ ТРАНСМИССИОННЫЙ МИКРОСКОП. СХЕМА.

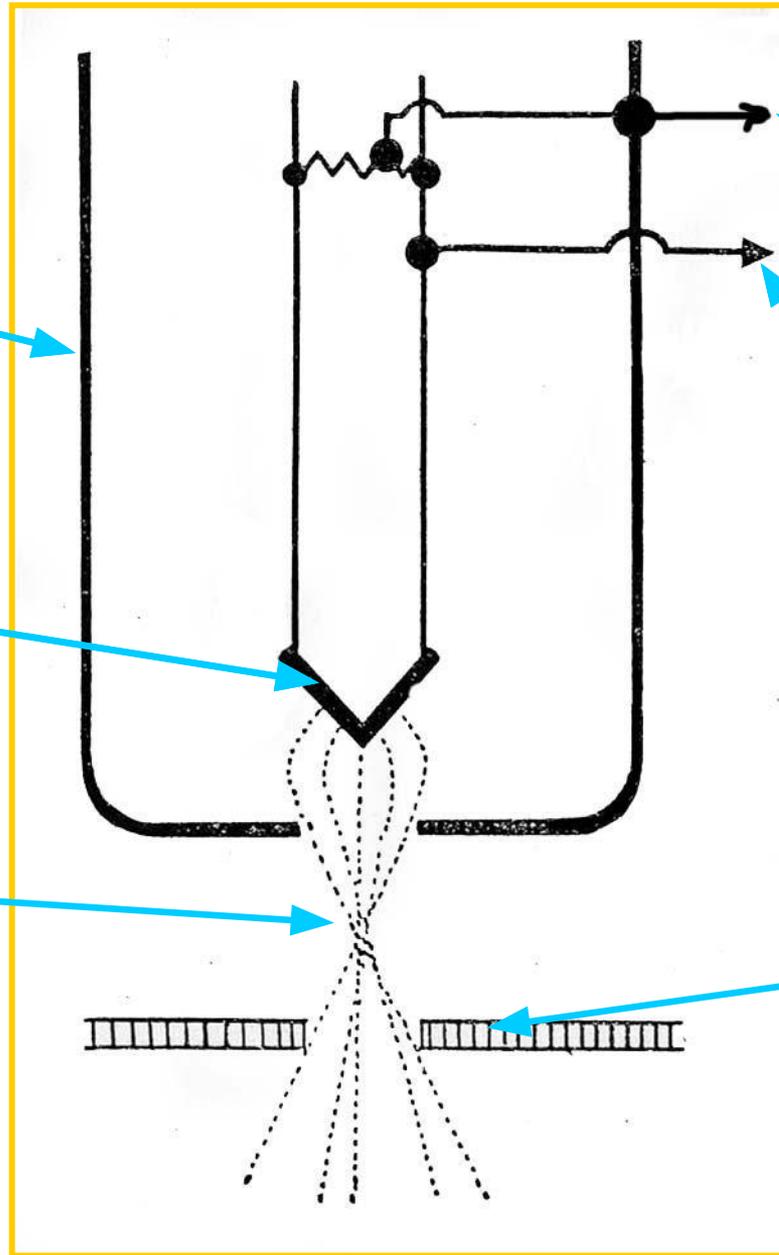


ЭЛЕКТРОННАЯ ПУШКА. СХЕМА.

защитный
экран
катода

нить катода

активный
источник
электронов



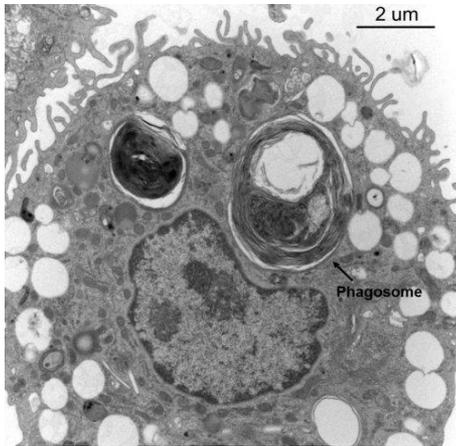
к высоковольтному
источнику
напряжения

к источнику
питания нити
накала

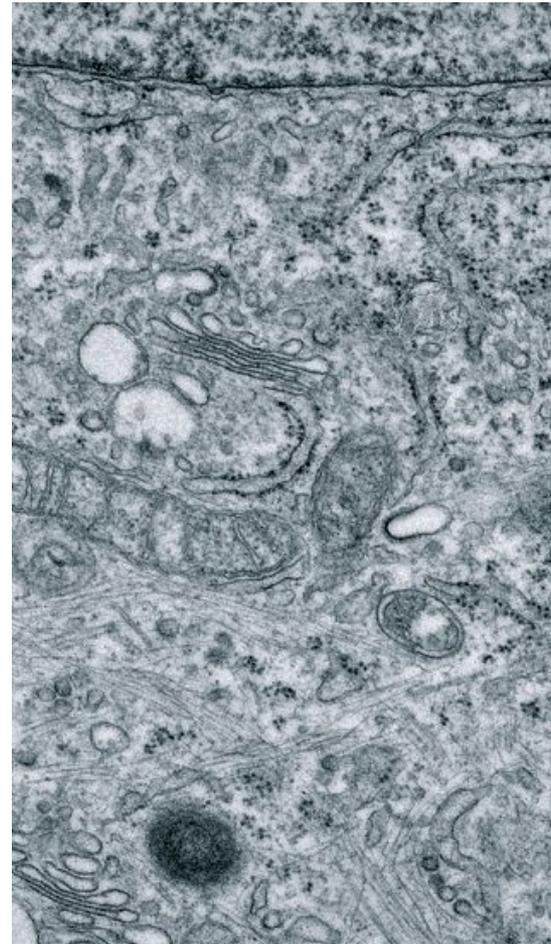
анод

2а. Трансмиссионная электронная микроскопия.

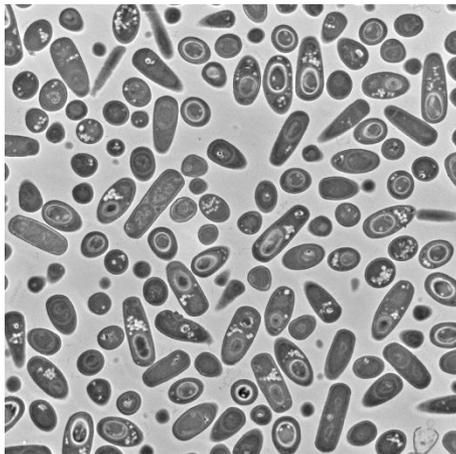
(На срезах или целых объектах, если они достаточно тонкие.)



Срез эукариотической клетки с фагосомой (из семинарской презентации Гариной А.С.)



Еще один срез эукариотической клетки. Участок цитоплазмы с органеллами (из семинарской презентации Гариной А.С.)

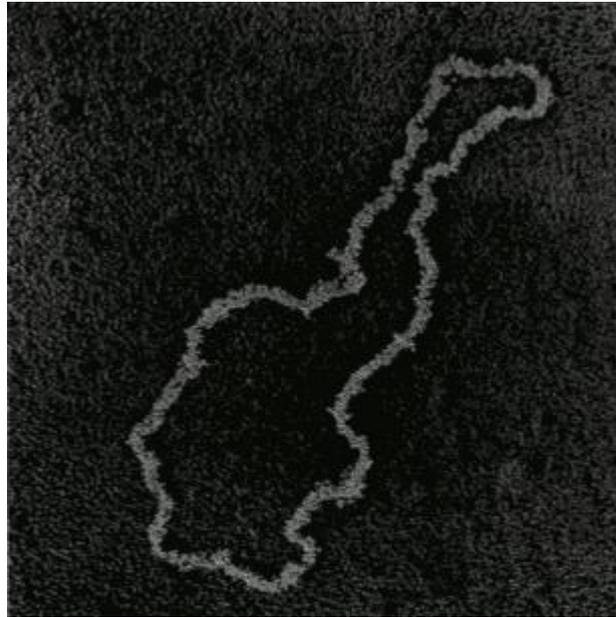


Bacillus subtilis (взято из EML Image gallery)

NB! На этом слайде позитивное контрастирование. Распространенные агенты: четырехокись осмия (он же и фиксатор), цитрат свинца, уранил ацетат.

2а. Трансмиссионная электронная микроскопия.

(На срезах или целых объектах, если они достаточно тонкие.)

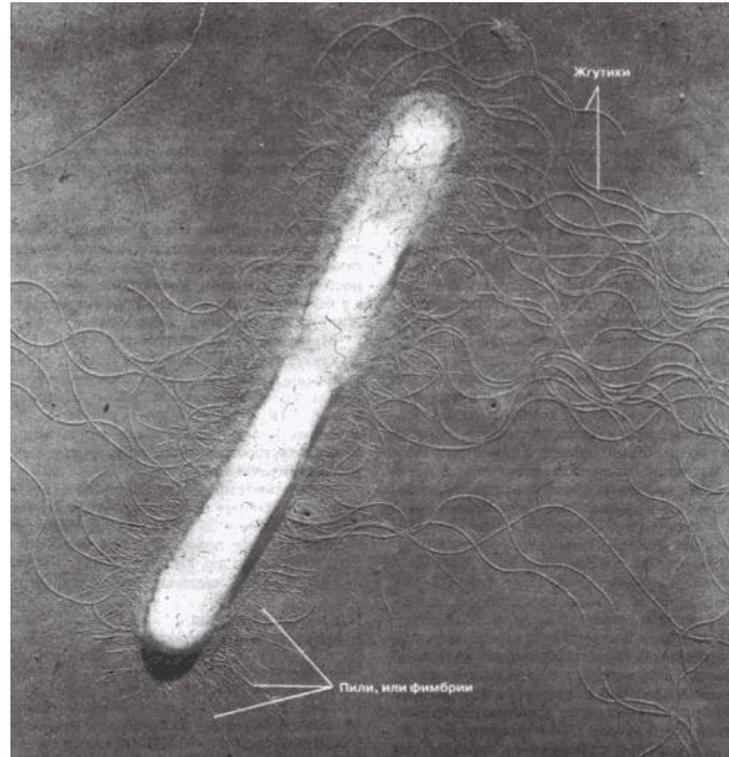


Выделенная бактериальная плазмида. ТЭМ. НегК.

NB! Контрастирование негативное (в качестве подложки фосфовольфрамовая к-та, например), а микроскопия все равно трансмиссионная!

2а. Трансмиссионная электронная микроскопия.

(На срезах или целых объектах, если они достаточно тонкие.)

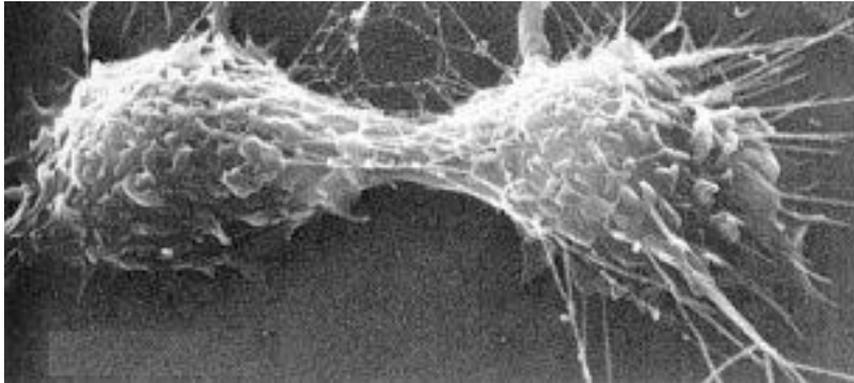


Палочковидная бактерия. ТЭМ. Круговое напыление.

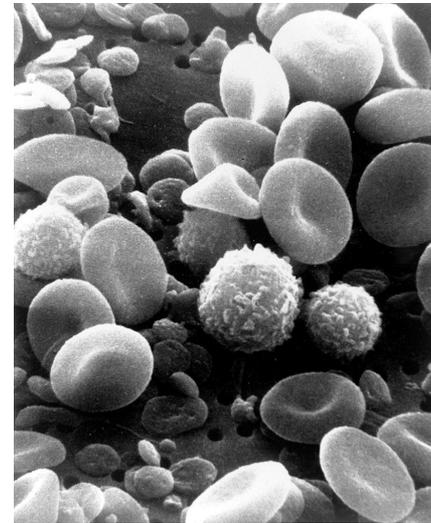
NB! Контрастирование напылением металла (круговым или угловым). Здесь круговое. Угловое, я надеюсь, вы не спутаете ни с чем. А микроскопия все равно трансмиссионная!

26. Сканирующая электронная микроскопия.

(На поверхностях объектов. Препарат равномерно покрывается металлической пленкой. Полученную реплику облучают пучком электронов.)

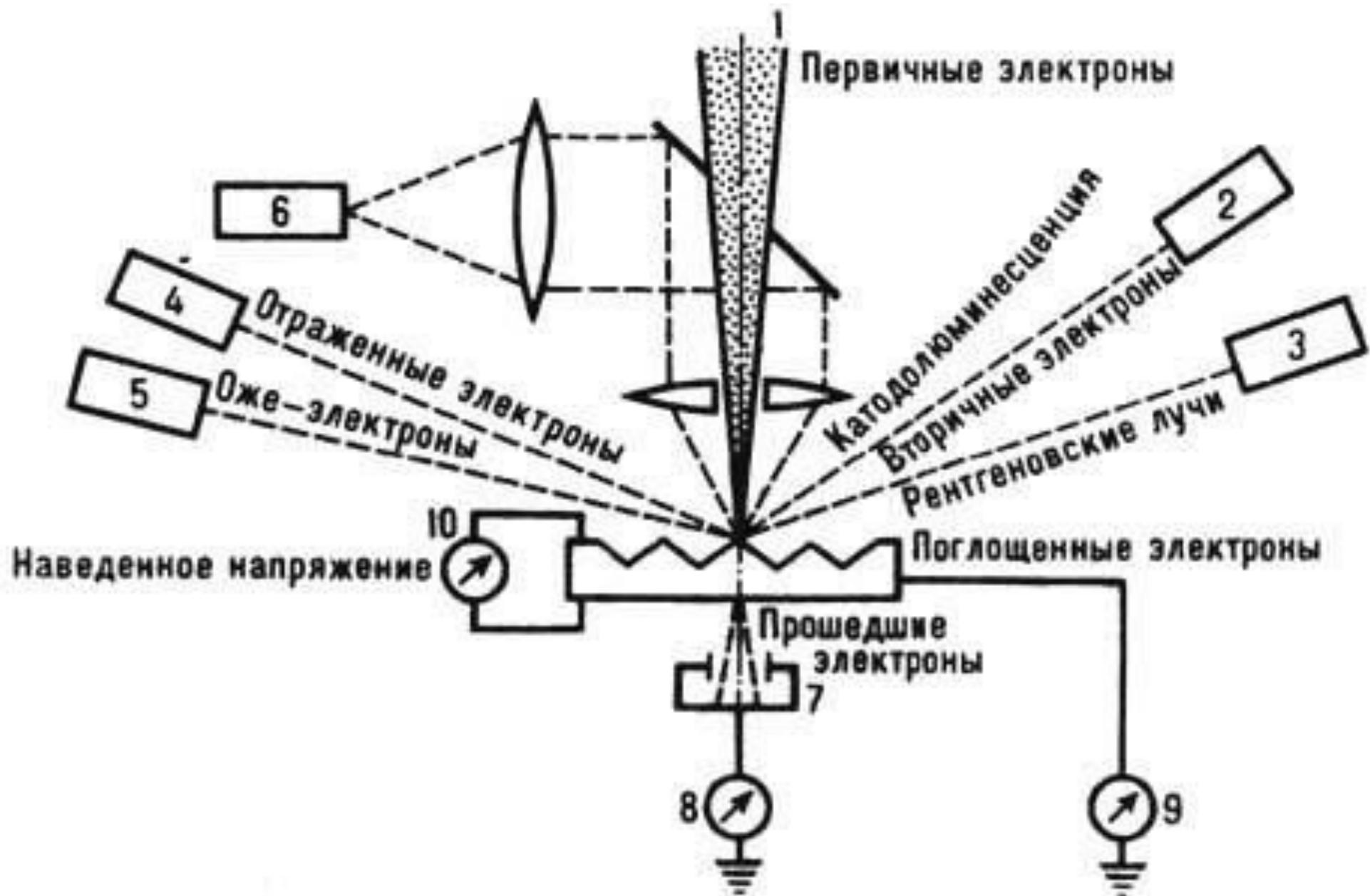


Делящиеся клетки в культуре (?). СЭМ (из семинарской презентации Гараниной А.С.).



Клетки крови. СЭМ (взято из Википедии).

NB! В сканирующей микроскопии детектируются не столько первичные электроны (произведенные электронной пушкой), сколько вторичные электроны (выбитые из металлического слоя на поверхности объекта). Оцените рельефность.



Прокариоты и эукариоты – сходство

1. Плазматическая липопротеидная мембрана с избирательной проницаемостью.
2. ДНК – РНК – белок: ферменты, рибосомы, генетический код.
3. Деление клетки – после репликации ДНК по полуконсервативному механизму.
4. Нуклеозидтрифосфаты как основное промежуточное звено в биоэнергетике.
5. Эффективный синтез АТФ, связанный с мембраной (протонная помпа).

Прокариоты и эукариоты - различия

Прокариоты	Эукариоты
Только плазмалемма	Мембранные органеллы
Одна кольцевая ДНК, опероны	Несколько линейных ДНК, индивидуальные промоторы и энхансеры каждого гена
Транскрипция и трансляция идут одновременно	Транскрипция и трансляция разобщены
Гистонов нет	Хроматин есть
Митотического аппарата нет	Митотический аппарат есть
Цитоскелета нет, транспорт за счет диффузии	Цитоплазма анизотропна, есть цитоскелет и быстрый транспорт вдоль него
Бактериальный жгутик, который вращается в мембране	Центриоль и эукариотический закрепленный жгутик
Размер клетки: 0,5-2 мкм	Размер клетки: 3-50 мкм

