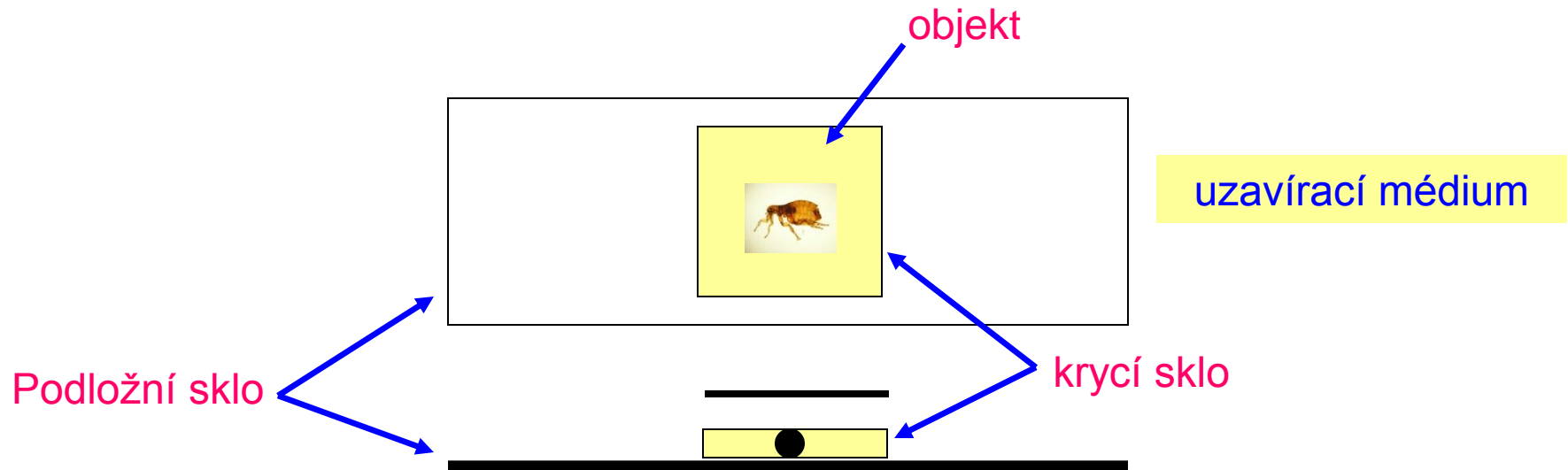


Příprava mikroskopických preparátů

zhotovení - objekt uzavřeme do vhodného média a prohlížíme mezi sklem podložním a krycím

uzavírací médium - tekuté nebo tuhnoucí

X - mikroskopické preparáty bez média (vzduch)



Druhy preparátů

Podle trvanlivosti:

Dočasné - nativní, čerstvé →



← Trvalé – fixovaný materiál



Druhy preparátů

Podle způsobu přípravy:

- **totální (celé objekty)**

Parazit (objekt):
Ctenocephalides felis

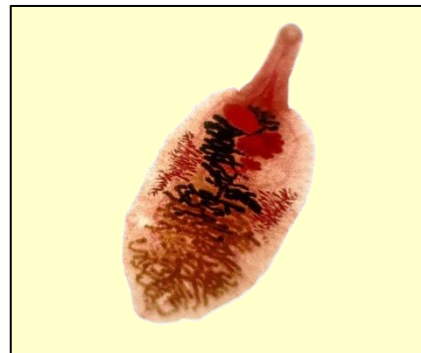
Hostitel:
Felis silvestris f. catus



Médium:
kanadský balzám

Parazit (objekt):
Dicrocoelium dendriticum

Hostitel:
Ovis ammon f. aries



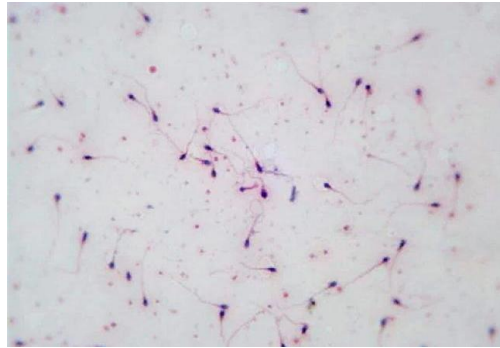
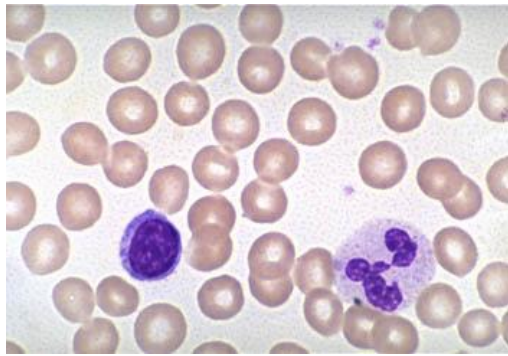
Barvení: železitý
acetokarmín

Médium:
kanadský balzám

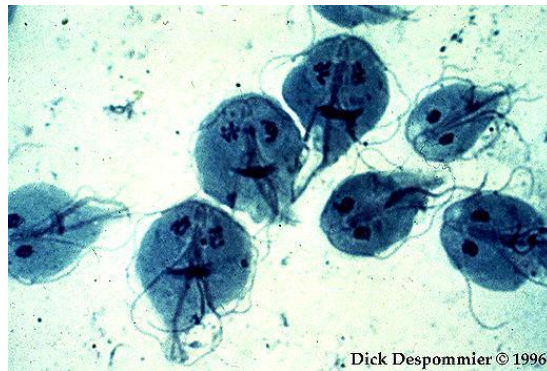
Druhy preparátů

Podle způsobu přípravy:

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



- **suché** (krevní roztěry, spermie)



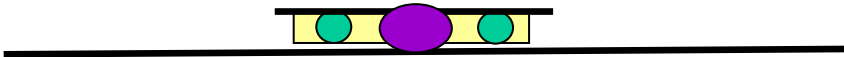
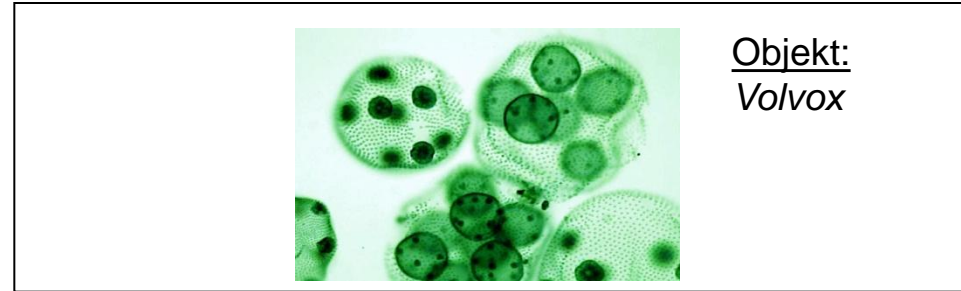
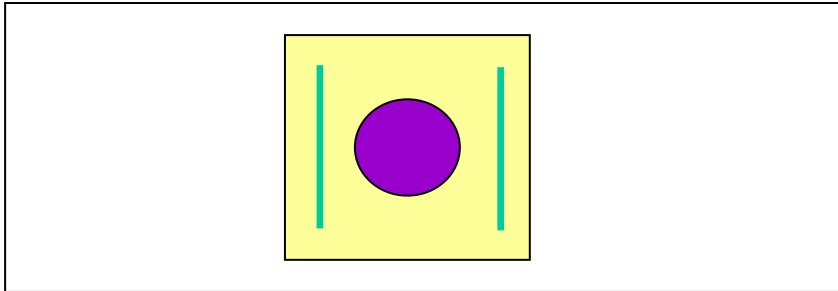
Objekt: *Giardia intestinalis*

- **vlhké** (střevní prvoci)

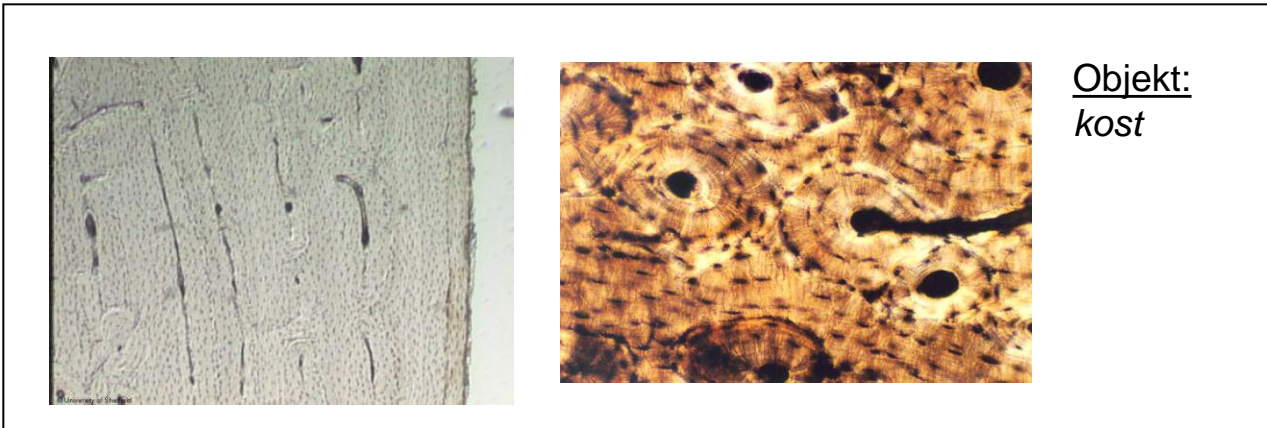
Druhy preparátů

Podle způsobu přípravy:

2. Vlhká komůrka (visutá kapka s objekty)

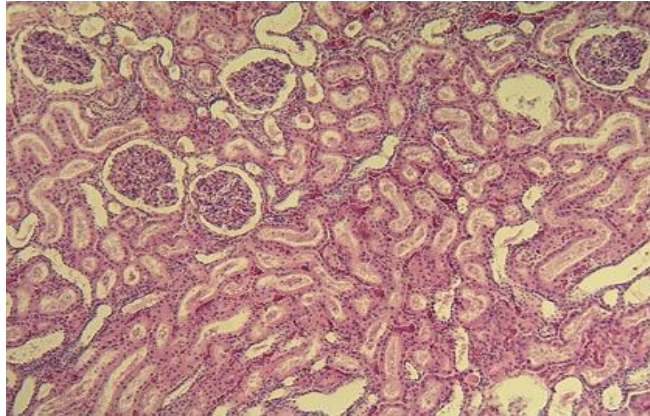


3. Výbrusy (tvrdý materiál - kosti, zuby)



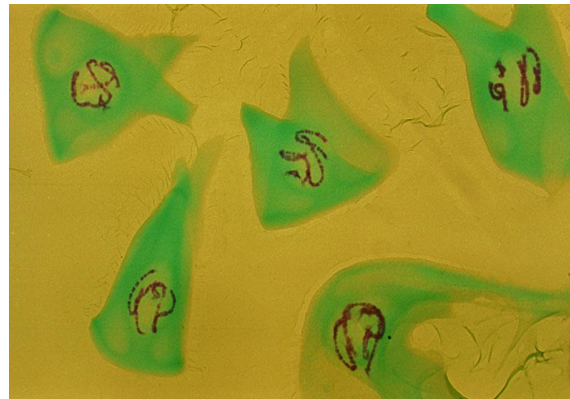
Podle způsobu přípravy:

4. Řezové preparáty (histologické řezy – polotenské, tenké, tlusté řezy žiletkou)



Objekt: *ledvina*
savce

5. 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

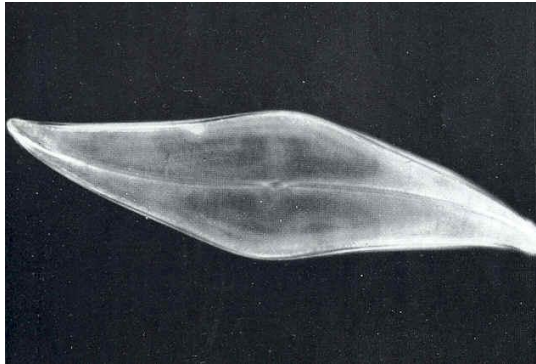
malé rozdíly v přirozeném kontrastu

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

- suché preparáty



Pleurosigma
(*Diatomaceae*)
Suchý preparát.
Temné pole.
Mikroskop
AMPLIVAL ZEISS
Jena.

- 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

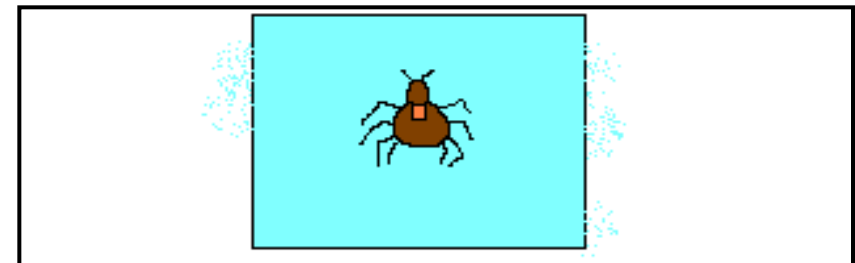
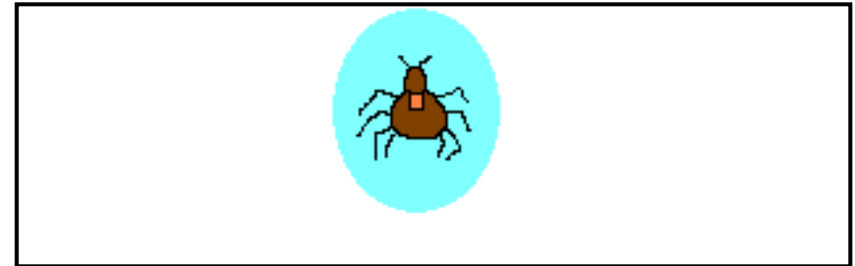
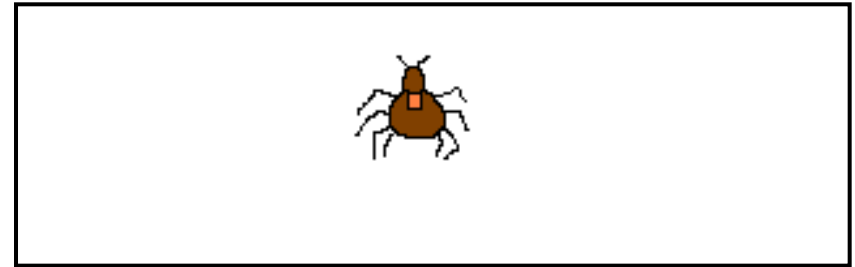
ryby, obojživelníci - 0,64% NaCl

plazi - 0,80% NaCl

ptáci, savci - 0,90% NaCl

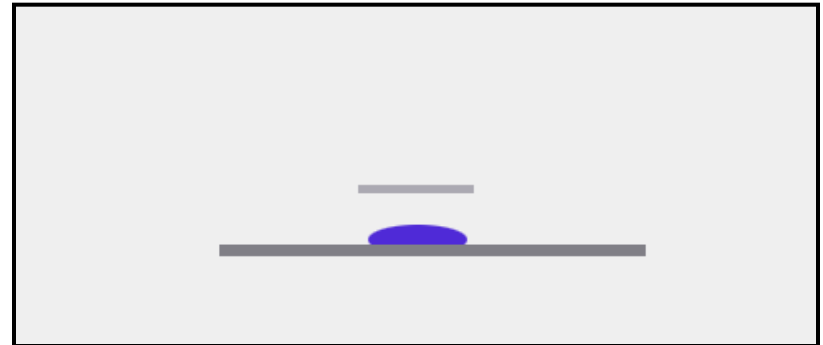
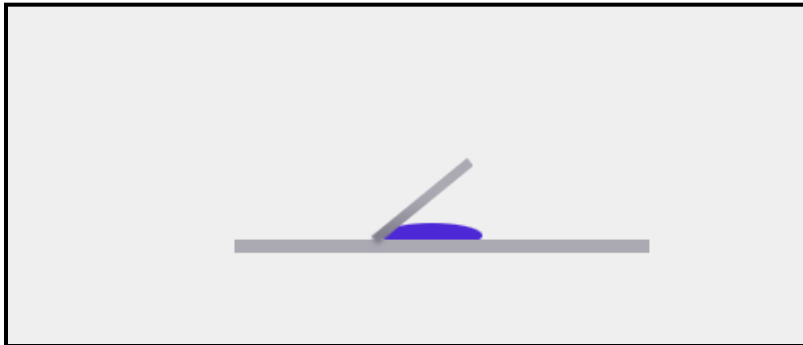
Příprava nativního preparátu

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



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.

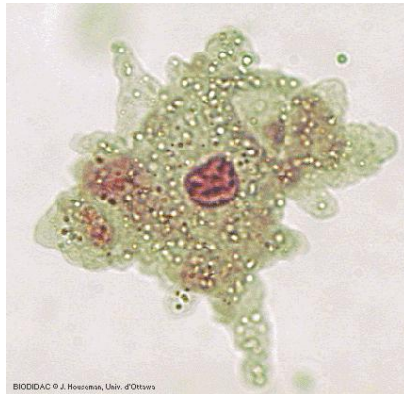
Barvení (buněk, tkáně) za živa je **vitální barvení**

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: ameba

Médium: voda

Barvení: vitální

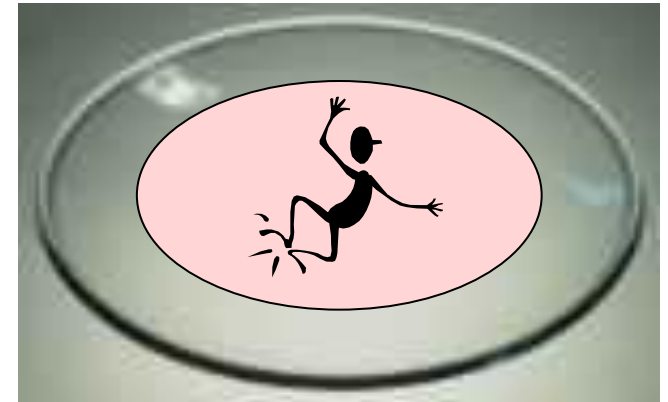
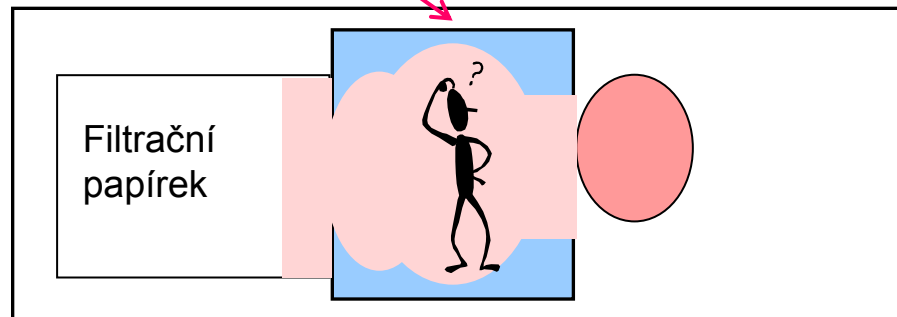
Druhy barvení

Intravitální

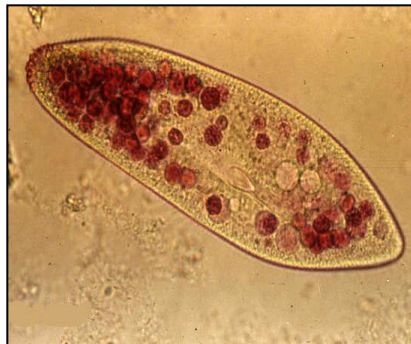
Barví se normální živé buňky, přímo v těle organismu

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

nebo tzv. **prosáváním**



Objekt:
Paramecium
caudatum



Médium:
voda

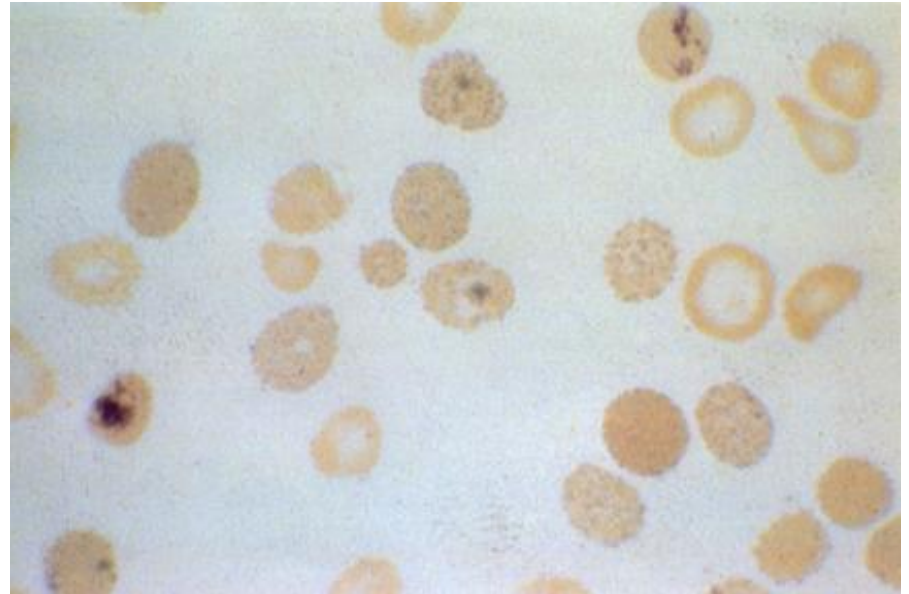
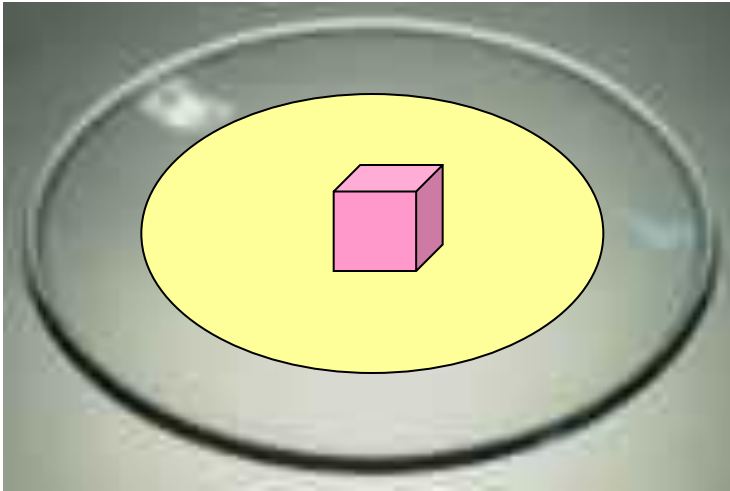
Barvení:
vitální

Příklad:
neutrální červeň -
potravní vakuoly
vakuoly

Druhy barvení

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

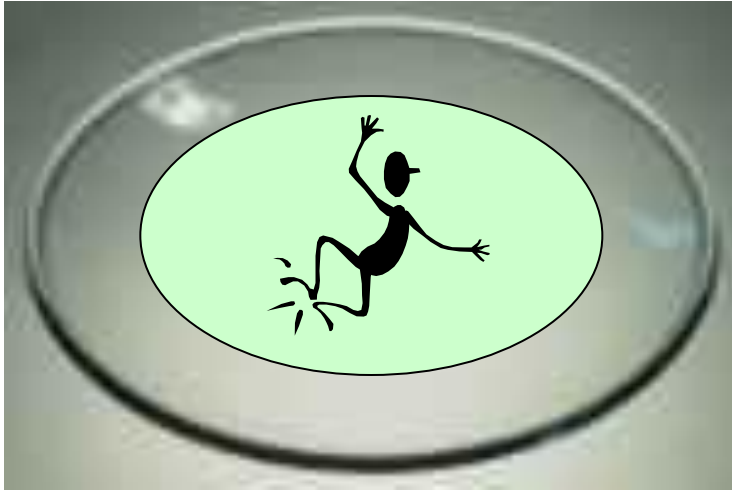
propustnost membrán je větší u oslabených buněk



Supra vital stain in hemoglobin H disease that reveals Heinz bodies (golf ball appearance).

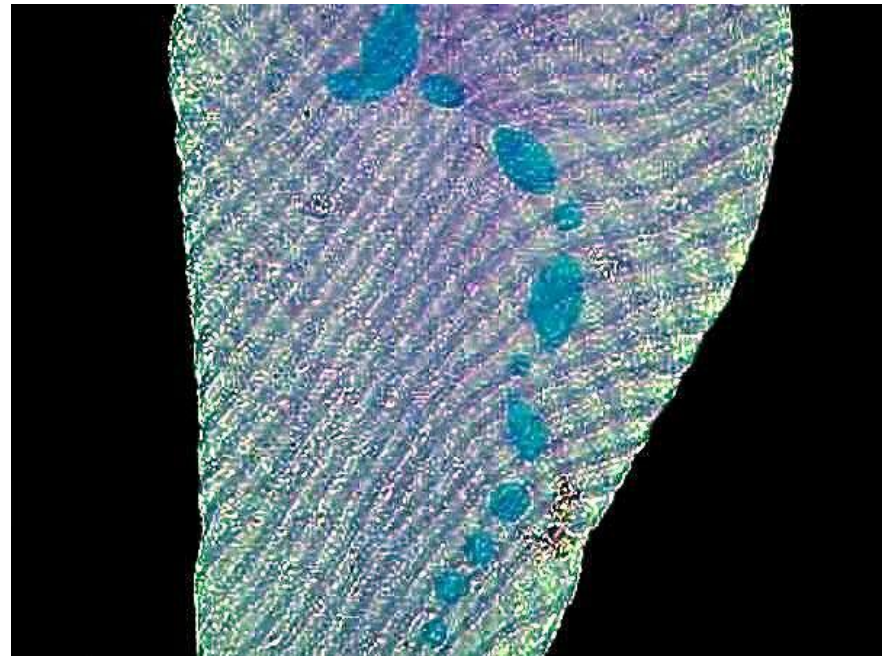
Druhy barvení

Postvitální - barví se odumírající buňky



Příklad:

**metylová zeleň - makronukleus
nálevníků**



Spirostomum minus which I stained with Methyl Green Acetic - the long macronucleus.

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 (tj. cytoplazmatického proudění – distribuce živin, metabolitů, organel,). 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

Metylenová 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 kápneme 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 – treпка (*Paramecium* sp.), zhotovení nativního preparátu, vitální barvení

Pro pozorování v mikroskopu nutno zpomalit rychlý pohyb trepky

Používá se:

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

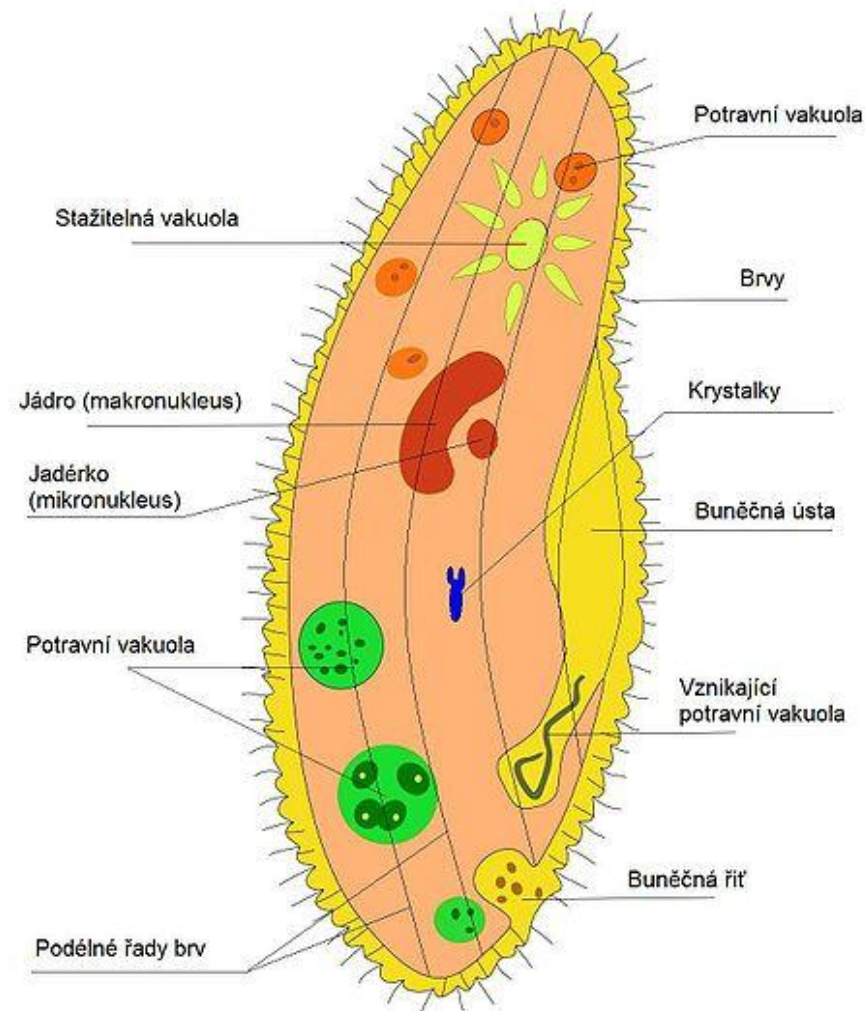
Úkol č. 1

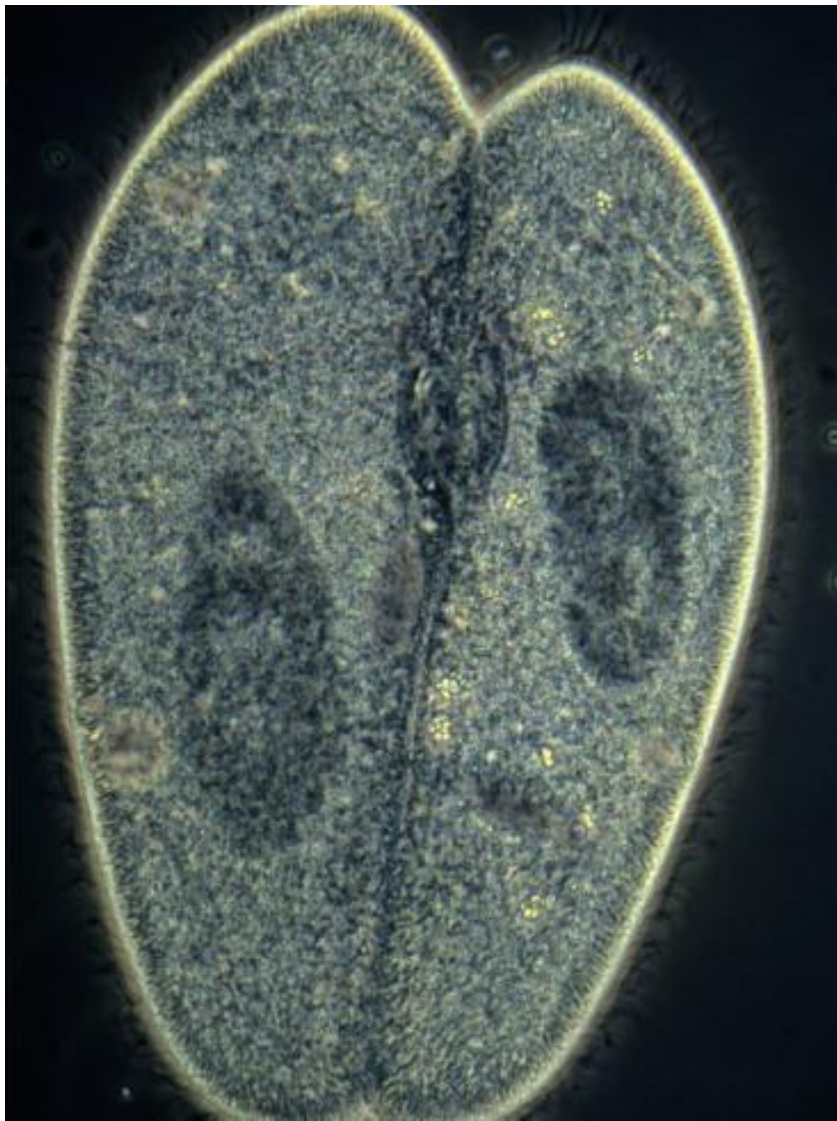
Modelový organismus – trepka (*Paramecium* sp.), zhotovení nativního preparátu, vitální barvení

1. Na podložní sklo kápneme kapku vody s trepkami
2. Vložíme rozcupovanou vatu a přikryjeme krycím sklem (zpomalení pohybu)
3. Pozorujeme práci kontraktálních vakuol
4. Barvíme:
 - a) intravitálně **neutrální červení** – potravní vakuoly (různé pH)
 - b) postvitálně **metylenovou zelení** – makronukleus

Trepky: „zrnková“ kultura

- zpomalení pohybu: (**vlákna vaty**, želatina, metylcelulóza, páry éteru, kyselina octová)





Konjugace trepek – fázový kontrast

Trepka se rozmnožuje většinou nepohlavně. Jedinec vyrostle na dospělém a jednici a po čase se oddělí. Trepky mají i pohlavní rozmnožování. Nazývá se konjugace. Jedinci splynou buněčnými ústy, generativní jádro prodělá redukční dělení, vegetativní se 2X rozpadá. Následuje vznik 4 jader, 3 z nich zanikají a čtvrté se haploidně rozdělí na 2. Jádra v buňkách splynou v synkarion. Konjuganti se rozestoupí. Následují 3 za sebou jdoucí jaderná dělení. Výsledkem konjugace je vznik 8 trepek.

