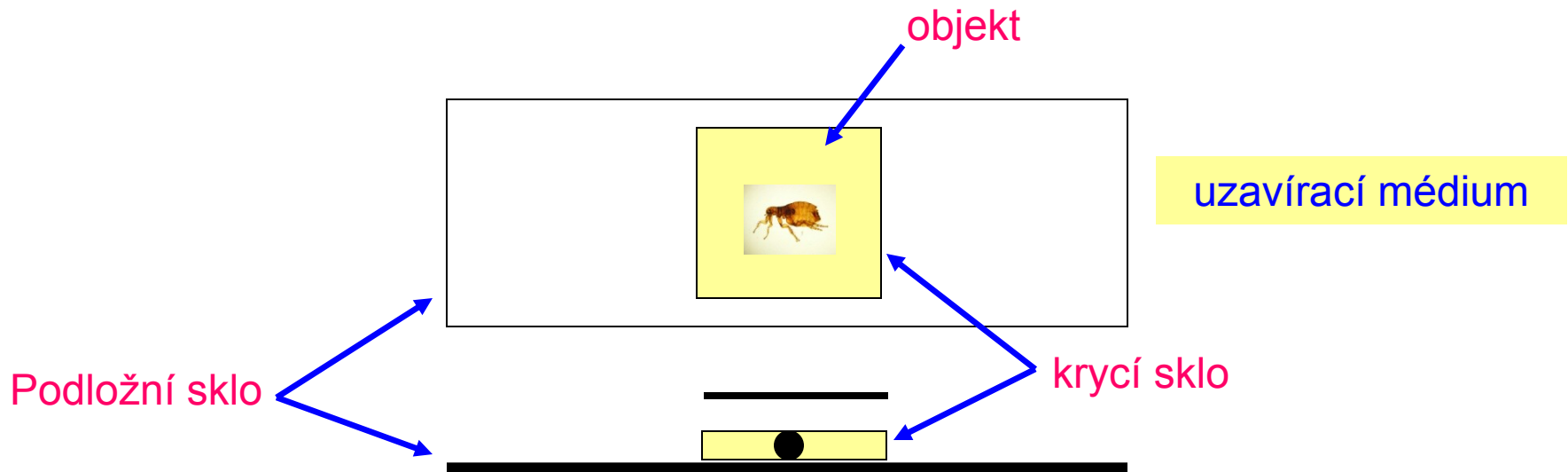


## Příprava mikroskopických preparátů

**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*

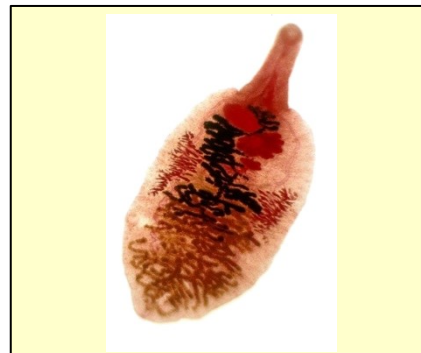
Hostitel:  
*Felis silvestris f. catus*



Médium:  
kanadský balzám

Parazit (objekt):  
*Dicrocoelium dendriticum*

Hostitel:  
*Ovis ammon f. aries*



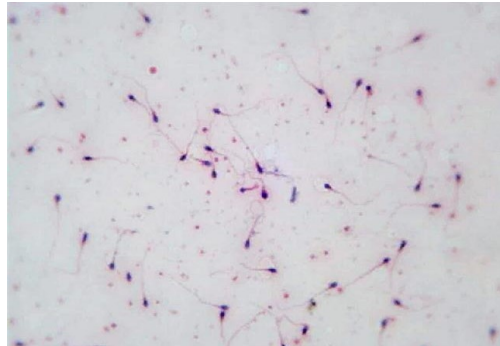
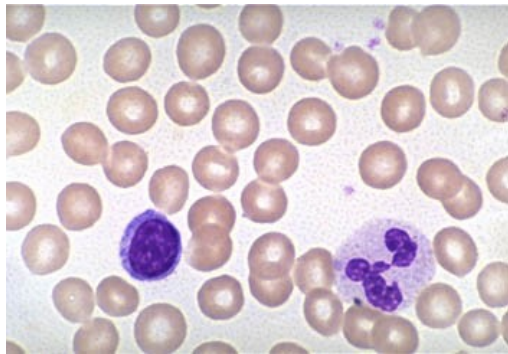
Barvení: železitý  
acetokarmín

Médium:  
kanadský balzám

# Druhy preparátů

## Podle způsobu přípravy:

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



- **suché** (krevní roztěry, spermie)



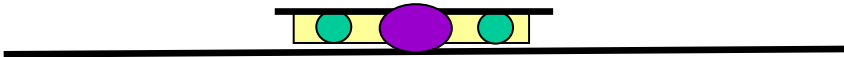
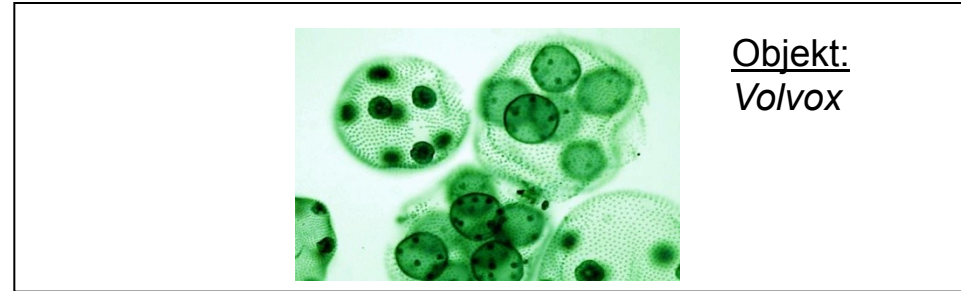
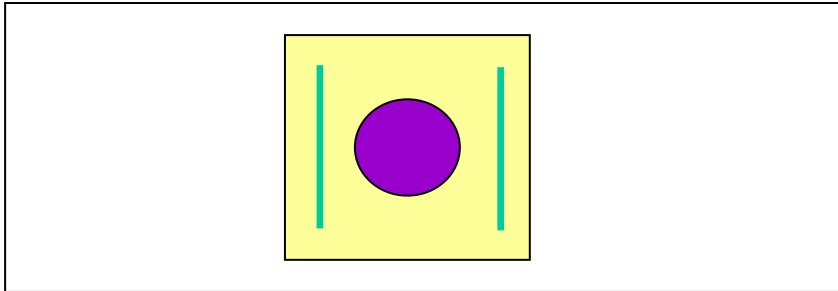
Objekt: *Giardia intestinalis*

- **vlhké** (střevní prvoci)

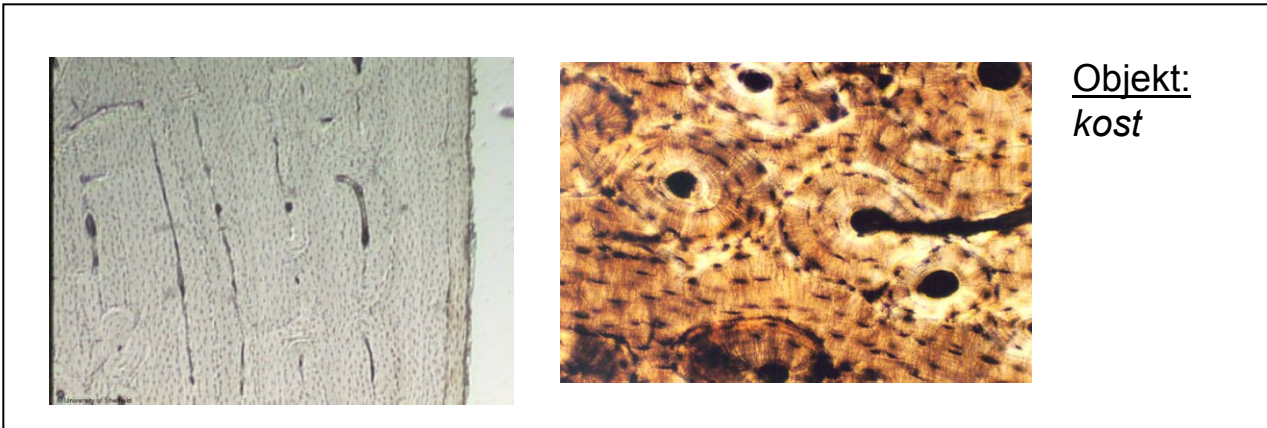
# Druhy preparátů

## Podle způsobu přípravy:

### 2. Vlhká komůrka (visutá kapka s objekty)

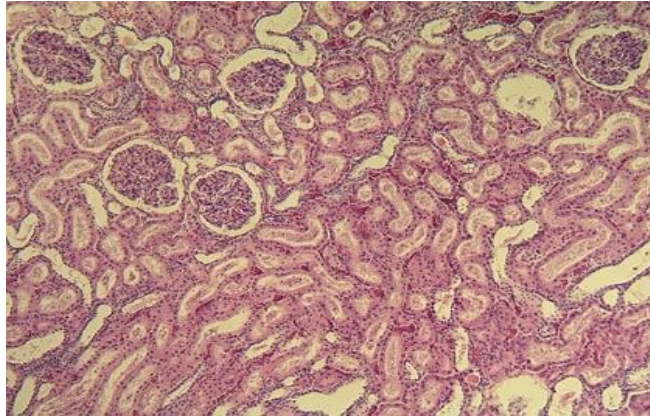


### 3. Výbrusy (tvrdý materiál - kosti, zuby)



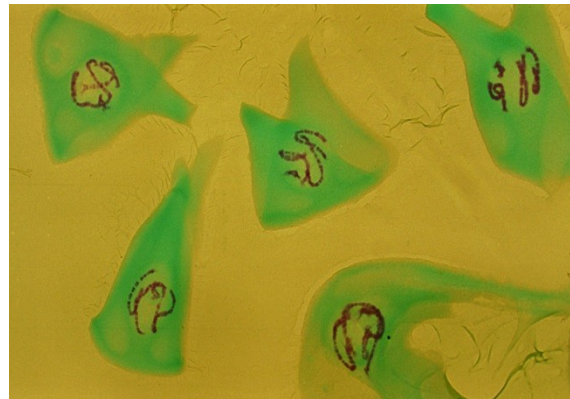
## Podle způsobu přípravy:

### 4. Řezové preparáty (histologické řezy – poloténké, 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

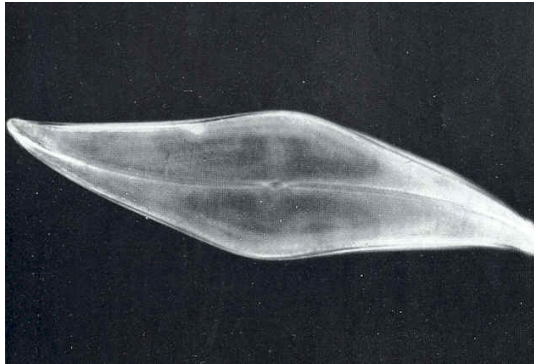
**izolované buňky** (krev, lymfa, leukocyty, roztlačené vazivo, chrupavka na řezech, pozorování buněčného dělení, průkaz vajíček, cyst nebo vegetativních stádií střevních parazitů ve stolici, tvar a struktura buněk kvasinek atd.)

### **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

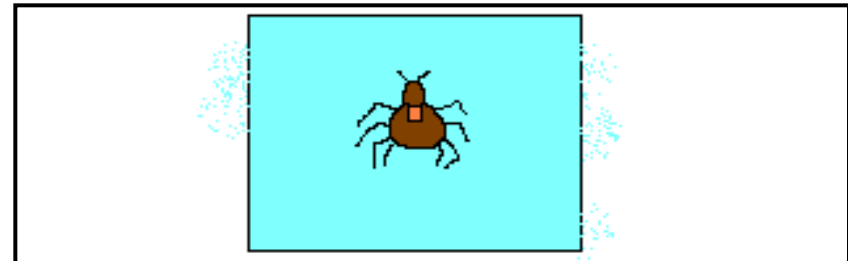
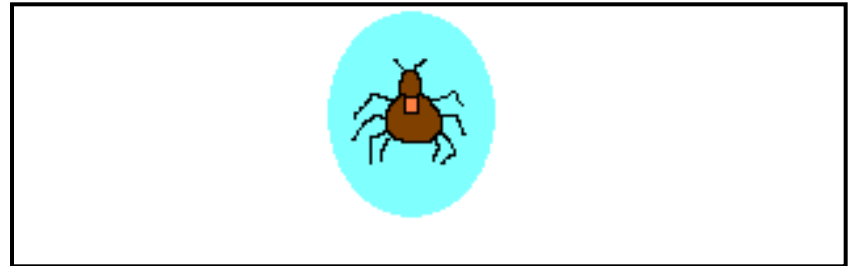
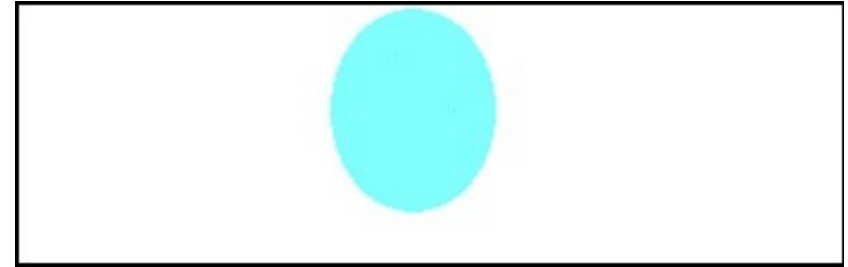
plazi - 0,80% NaCl

ptáci, savci - 0,90% NaCl



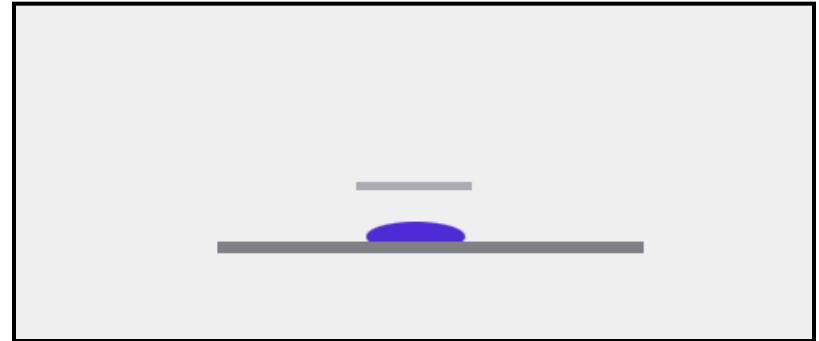
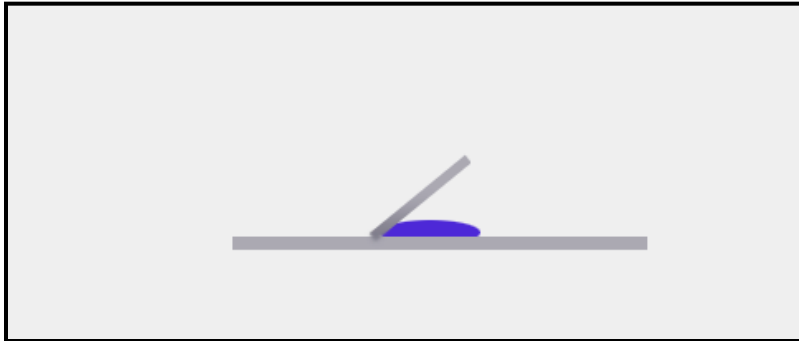
# Příprava nativního preparátu

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  $45^\circ$ , 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.

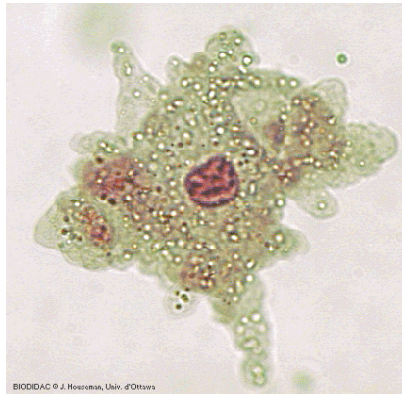
Barvení (buněk, tkáně) za živa je **vitální barvení**

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

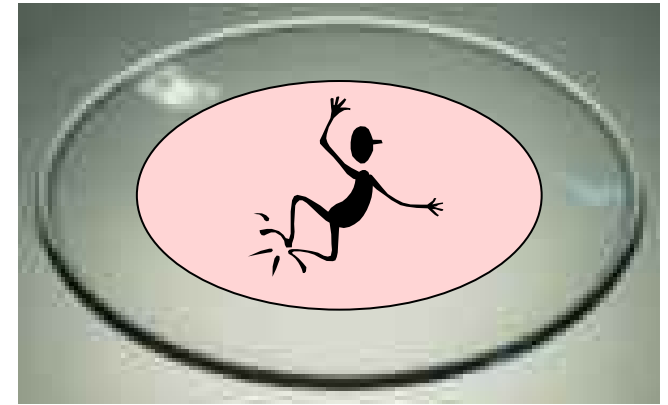
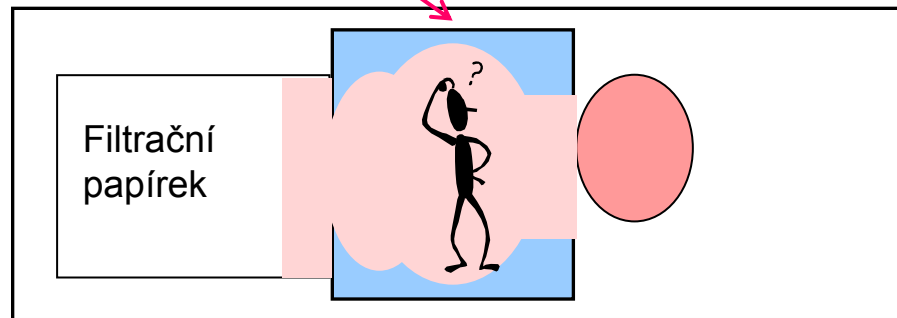
# Druhy barvení

## 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

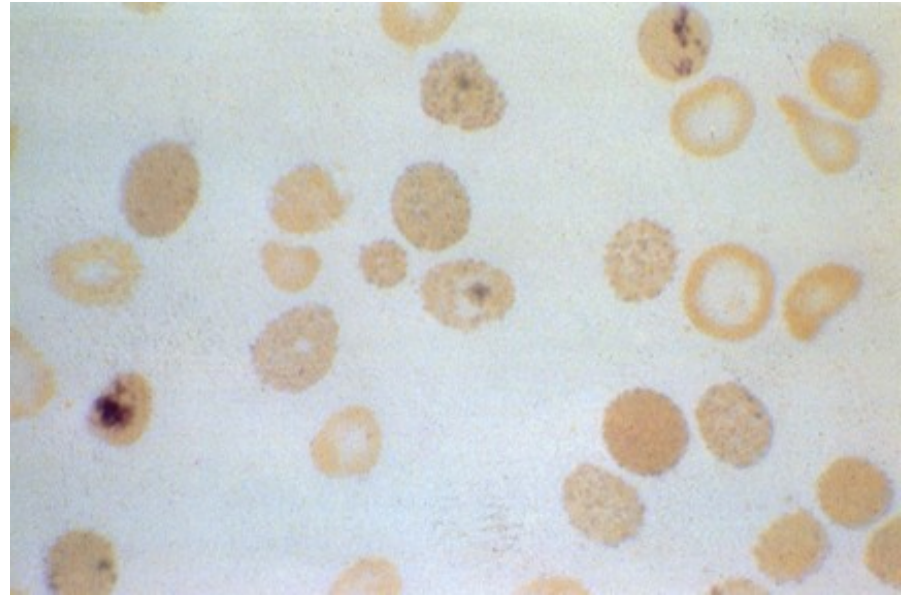
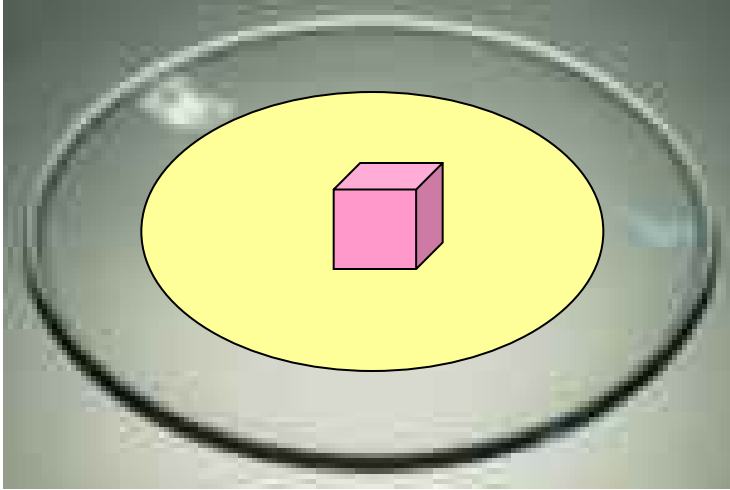
Barvení:  
vitální

**Příklad:**  
**neutrální červeň** -  
potravní vakuoly  
vakuoly

# Druhy barvení

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

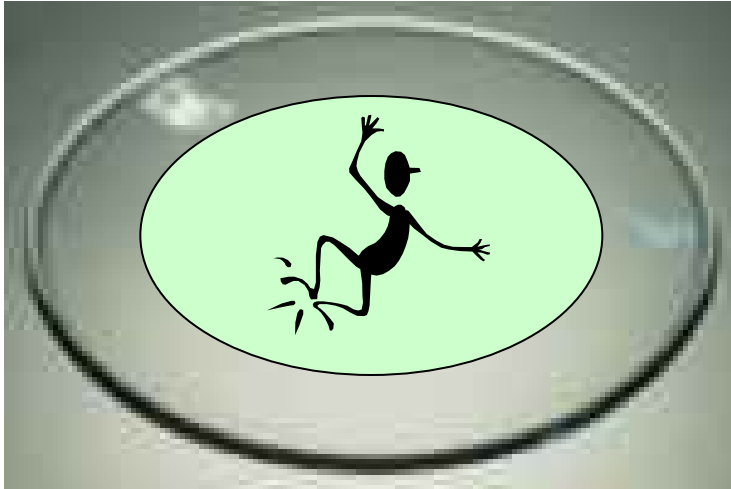
propustnost membrán je větší u oslabených buněk



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

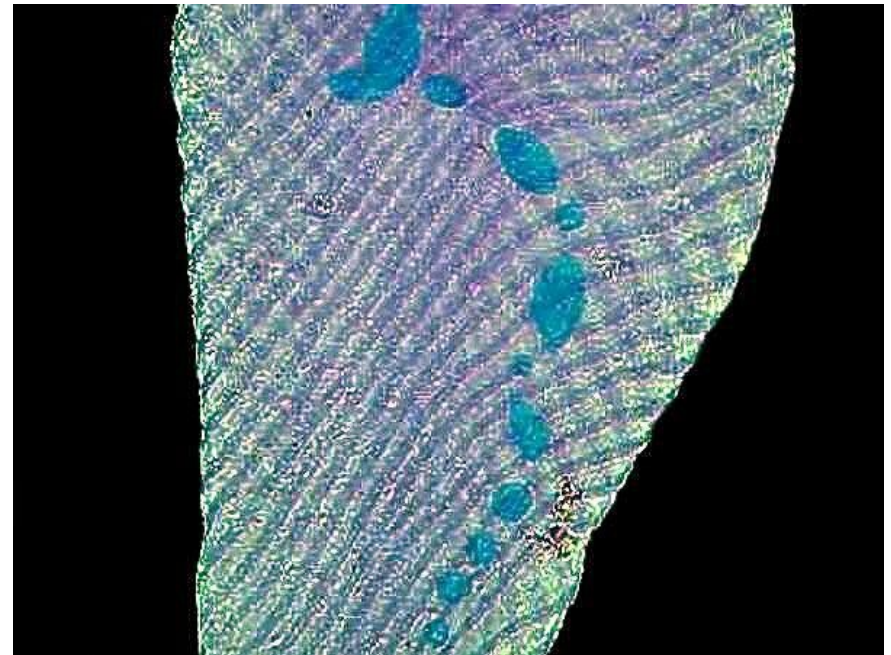
# Druhy barvení

**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**

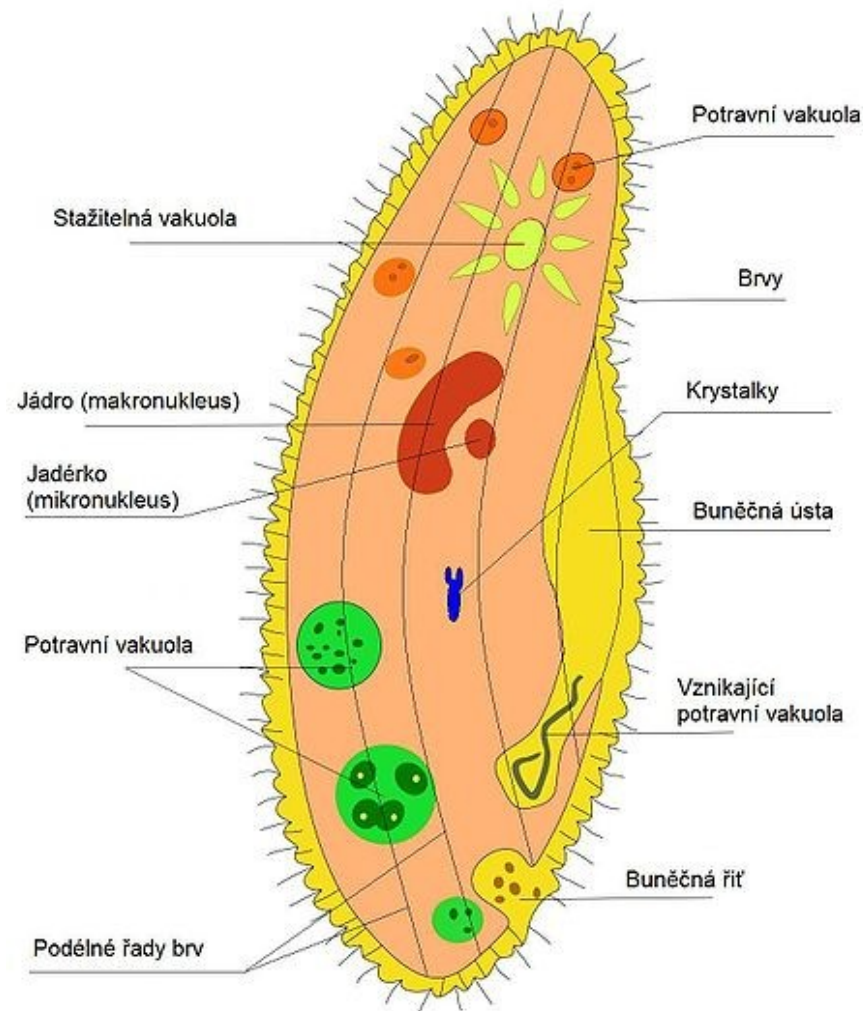
# Úkol č. 1

## 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.**

