

Mikroskop, mikroskopiranje in osnove biološkega risanja

Ime in priimek avtoric: **doc. dr. Martina Lužnik, doc. dr. Živa Fišer**

Naslov: **Mikroskop, mikroskopiranje in osnove biološkega risanja**

Študijski program in predmet:

- Študijski program: **Varstvena biologija, dodiplomski študijski program; Agronomija, dodiplomski visokošolski strokovni študijski program**
- Študijski predmet: **Splošna botanika, Splošna zoologija, Biologija rastlin**
- Izvajalka študijskega programa: **Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije**

Študijsko leto: **2024/2025**

Kraj in letnica izdelave: **Izola, 2025**

KOLOFON

Ime in priimek avtorja: **doc. dr. Martina Lužnik, doc. dr. Živa Fišer**

Naslov dela: **Mikroskop, mikroskopiranje in osnove biološkega risanja**

Tipologija dela: **2.05 Drugo učno gradivo**

Kraj in letnica izdelave: **Izola, 2025**

Založba: **Samozaložba**

Licenciranje: **Odprti dostop Creative Commons CC BY-SA**



Kazalo

UVOD	4
1. DEL: MIKROSKOP	5
1.1 SVETLOBNI MIKROSKOP	5
NUMERIČNA APERTURA	8
POVEČAVA IN LOČLJIVOST MIKROSKOPA	9
GLOBINSKA OSTRINA	10
NAPAKE LEČ IN MIKROSKOPA	11
OKULAR	12
OSVETLITEV	12
1.2 PRIPRAVA PREPARATOV ZA SVETLOBNO MIKROSKOPIJO	14
IZDELAVA MOKREGA PREPARATA	14
PRIPRAVA TRAJNIH HISTOLOŠKIH PREPARATOV	15
VELIKOST CELIC – MERJENJE S POMOČJO MIKROSKOPA	17
1.3 RAVNANJE S SVETLOBNIM MIKROSKOPOM	19
1.4 FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA	20
1.6 ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA	22
1.6.1 PRESEVNI ALI TRANSMISIJSKI ELEKTRONSKI MIKROSKOP (TEM)	22
1.6.2 VRSTIČNI ALI SCANNING ELEKTRONSKI MIKROSKOP (SEM)	23
2. DEL: BIOLOŠKE SKICE - ZAKAJ SO V DANAŠNJEM ČASU ŠE POMEMBNE?	25
2.1 POSEBNOSTI PRI RISANJU BIOLOŠKIH PREPARATOV	25
2.2 RISANJE PREPARATOV PRI NIZKIH IN VISOKIH POVEČAVAH	26
2.2.1 NIZKE POVEČAVE	27
2.2.2 VISOKE POVEČAVE	31
2.3 PROTOKOLI	33
IZVLEČEK	35
UPORABLJENA LITERATURA IN VIRI	35
SEZNAM PRIPOROČENE LITERATURE ZA ŠTUDIJ	37

UVOD

Gradivo, ki je pred vami, je nastalo tekom let, ko sta avtorici vodili laboratorijske vaje pri različnih predmetih na UP FAMNIT, na katerih je bila obvezna uporaba svetlobnega mikroskopa. Čeprav so se študentje s svetlobnim mikroskopom najverjetneje srečali v srednji šoli, morda celo že v osnovni, pa sta delovanje in zgradba mikroskopa, ki posledično vplivata na videz in kakovost slike, marsikomu nepoznana. Zakaj s svetlobnim mikroskopom ne moremo doseči kakovostne slike pri povečavi 5.000x, če pa vemo, da lahko tako povečavo dosežemo z dodajanjem novih leč? Zakaj pri svetlobni mikroskopiji iščemo kompromis med kontrastom in osvetljenostjo objekta? Na taka in podobna vprašanja odgovarja to gradivo.

Različne laboratorijske vaje zahtevajo tudi risanje bioloških skic. V dobi pametnih telefonov se zdi, da je praksa risanja nepotrebna. Pa vendar lahko z risanjem prikažemo veliko več strukturnih posebnosti, kot jih lahko prikaže ena sama fotografija. Da pa to dosežemo, morajo biti skice primerno narisane in označene. Temu je posvečen drugi del gradiva, ki na številnih konkretnih primerih prikazuje pravila biološkega risanja.

Gradivo je uporabno pri vseh predmetih, pri katerih laboratorijske vaje predvidevajo uporabo svetlobnega mikroskopa. Tako bodo po njem najverjetneje segali študentje 1. letnika Varstvene biologije pri predmetih Splošna zoologija in Splošna botanika, za osvežitev znanja pa tudi pri predmetih, ki sledijo. Obenem bo gradivo koristilo tudi študentom drugih študijskih programov, ki se z mikroskopom in risanjem srečajo v manjšem obsegu.

V Izoli, 18. 10. 2024

Doc. dr. Martina Lužnik in Doc. dr. Živa Fišer

1. DEL: MIKROSKOP

Mikroskop je optična naprava za opazovanje objektov, ki so premajhni, da bi jih lahko videli s prostim očesom. Z njim povečujemo zorni kot, pod katerim opazujemo slike. Disciplina, ki raziskuje majhne objekte s tako napravo, se imenuje mikroskopija. Svetlobna mikroskopija se uporablja že več kot 300 let, približno 70 let pa je v uporabi tudi elektronska mikroskopija, ki dosega večje ločljivosti in povečave.

Osnovna strukturna enota vsakega organizma je celica. Celice so v veliki večini s prostim očesom nevidne, zato si moramo pri opazovanju teh majhnih struktur pomagati z mikroskopom. Velikost celic opisujemo v metričnih enotah (ponavadi v mikrometrih ali μm) ali v povečavah. Povečava človeškega očesa je 1x. Običajno povečevalno steklo poveča objekte 5x, kar pomeni, da je slika objekta pod povečevalnim steklom 5x večja, kot če bi jo opazovali s prostim očesom. Svetlobni mikroskop običajno nudi izbor različnih povečevalnih leč, povečave pa segajo ponavadi do 1000x.

Pomemben faktor pri mikroskopiranju predstavlja ločljivost (resolucija) ali minimalna razdalja med dvema točkama, da ju še lahko zaznamo kot dve točki. Človeško oko ima ločljivost 100 μm . Najboljši svetlobni mikroskopi imajo ločljivost 0,2 μm , kar je 500x bolje kot človeško oko. Ločljivost mikroskopa pogojuje ostrino povečane slike. Ločljivost pri svetlobnem mikroskopiranju omejuje valovna dolžina vidne svetlobe, ki jo uporabljamo za nastanek slike. Najkrajša valovna dolžina, ki jo še zazna človeško oko, je okoli 400 nm (=0,4 μm). Večjo ločljivost dosežemo tako, da namesto vidne svetlobe uporabimo snop elektronov, ki ima veliko nižjo valovno dolžino (0,005 nm). S tem lahko dosežemo ločljivost do 0,4 nm, kar omogoča ostro sliko tudi pri povečavi 100.000x. Mikroskop, ki za nastanek slike namesto svetlobe uporablja elektronske snope, imenujemo elektronski mikroskop.

1.1 SVETLOBNI MIKROSKOP

Svetlobni mikroskop (Slika 1) omogoča povečavo slike do 2.000x (Slika 2). Objekti, ki jih opazujemo s svetlobnim mikroskopom, morajo biti prosojni – torej dovolj tanki, da skozi njih preide svetloba. Objekti so ponavadi nameščeni na objektno stekelce (mikroskopski preparat), vir svetlobe pa se nahaja pod preparatom.

Svetlobni mikroskop je sestavljen iz mehaničnih (stojalo, mizica, noga) in optičnih delov (sistem leč, objektivi, okularji, kondenzor). Na zgornji strani stojala mikroskopa je nameščen tubus, ki nosi objektivne in okularje. Na stojalo je običajno pritrjen revolver, v katerem je privitih več objektivov. Na nasprotni (zgornji) strani tubusa so okularji.

Ob straneh stojala sta nameščena dva vijaka, ki služita izostritvi slike. Večji, makrometrski vijak, služi bolj grobemu ostrenju in ga uporabljamo pri najmanjši

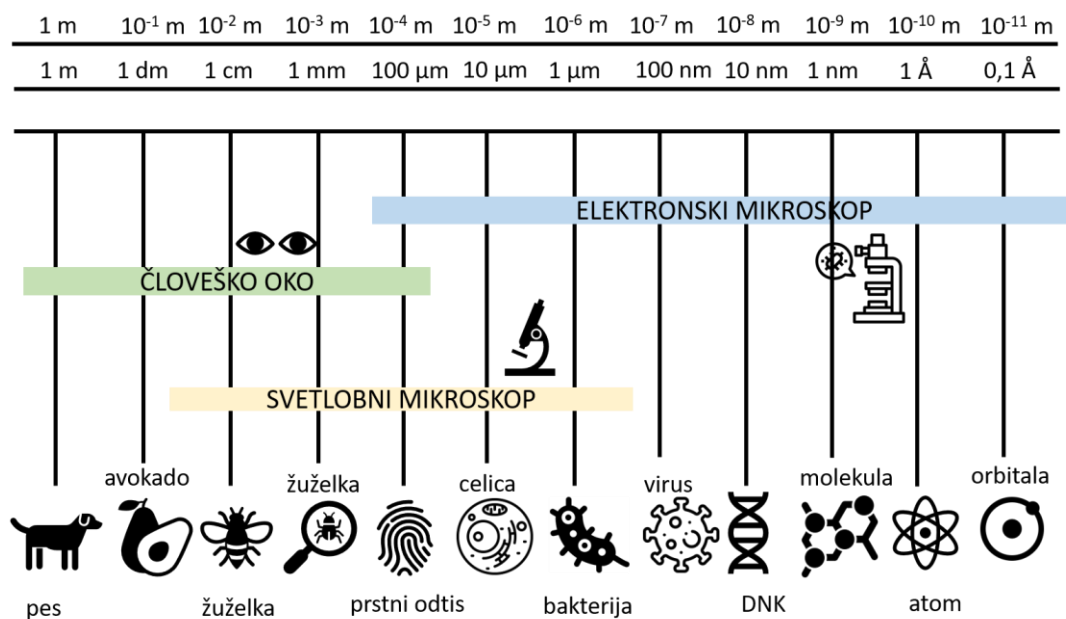
povečavi. Z manjšim, mikrometrskim vijakom, ostrimo sliko pri večjih povečavah. Pod objektivi je nameščena mizica, na katero položimo preparat (objektno stekelce). Stekelce fiksiramo z vzmetjo za vpenjanje preparata, premikamo pa ga z vijakom, ki je nameščen pod mizico. Na sredi mizice, tik pod mestom, kamor vpnejo preparat, je odprtina, skozi katero prihaja svetloba. Ta svetloba potuje od žarnice do kondenzorja ter skozi preparat naprej v objektiv.



Slika 1: Zgradba svetlobnega mikroskopa Leica DM300. Fotografija: Živa Fišer.

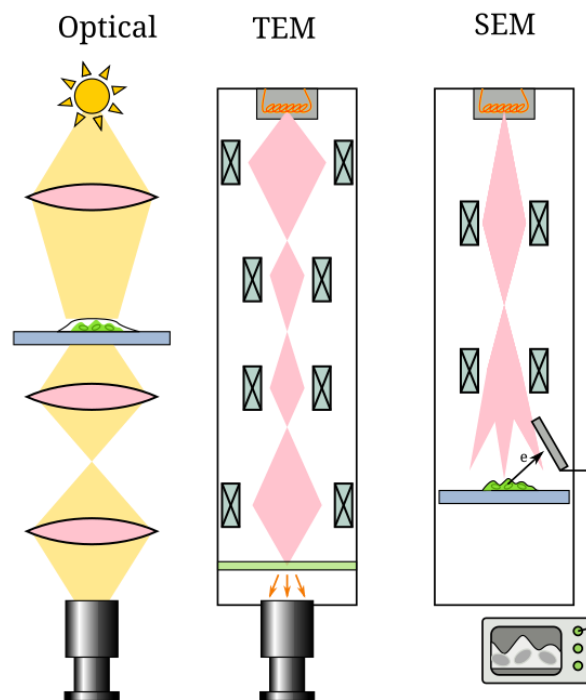
Kondenzor, objektiv in okular predstavljajo osnovni sistem leč, ki nam poveča sliko preparata. Vsak okular ima svojo povečavo (najpogosteje 10x). Okular je lahko eden, v tem primeru govorimo o monokularnem mikroskopu. Če sta okularja dva, je to binokularni mikroskop, če pa so okularji trije, služi tak mikroskop za snemanje s kamero ali fotoaparatom in ga imenujemo trinokularni mikroskop. Pri binokularnih in trinokularnih mikroskopih lahko razdaljo med okularjema uravnavamo s pomočjo distančnika medzenične razdalje. Na enem od okularjev je nameščen zobat obroč, s katerim okular priredimo dioptriji naših oči.

Pod mizico se nahaja kondenzor z lečami. Te zbirajo in preslikajo svetlobo, ki prihaja iz žarnice, v ravnino objekta, ki ga opazujemo. Pri nekaterih mikroskopih lahko kondenzor z vijakom dvigamo ali spuščamo. Kvaliteta kondenzorja je odvisna od kotne odprtine leče, ki vpliva na numerično aperturo kondenzorja (glej razlago dalje v besedilu). Aperturno zaslonko lahko z ročico odpiramo ali zapiramo in tako določamo količino svetlobe, ki prihaja v optični sistem. Z aperturno zaslonko pod kondenzorjem lahko uravnavamo kontrastnost slike, s tem pa vplivamo na numerično aperturo celotnega sistema leč. Kondenzorjeva apertura in izostrenost sta bistveni za kar najboljši izkoristek zmogljivosti objektiva, medtem ko aperturna zaslonka omogoča doseganje primerne osvetljenosti in kontrasta.



Slika 2: Primerjava velikosti, zmogljivosti mikroskopov in primerov objektov, ki jih lahko pri posameznih povečavah opazujemo. Slika: Živa Fišer.

Na vrtljivi revolver je privitih več objektivov. Z obračanjem revolverja lahko namestimo objektiv s povečavo, ki nam ustreza. Vsak objektiv ima vgravirano povečavo (v našem primeru so povečave objektivov 4x, 10x, 40x in 100x). Objektiv, ki ima vgravirano črno črto in oznako OIL, OEL ali HI, je namenjen opazovanju z imerzijskim oljem, medtem ko so ostali objektivni namenjeni suhemu opazovanju (med lečo objektiva in krovim stekelcem je zrak). **Objektiv** deluje kot projekcijska leča, ki v mikroskopu preslika sliko v zgornji del tubusa (v ravnino okularja), in to tako, da dobimo realno, povečano in obrnjeno sliko predmeta. To je »primarna slika«, ki nastane v zraku. V resnici gledamo to sliko skozi **okular**, ki deluje kot povečevalno steklo. Končna slika nastane na mrežnici opazovalca. Opazovalcu pa se zdi, da je objekt v ravni virtualne / navidezne slike, ki je pod objektom (Slika 3).



Slika 3: Pot svetlobe skozi svetlobni mikroskop, TEM in SEM in nastanek slike. Vir: FDomenic (<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MicroscopesOverview.svg#/media/File:MicroscopesOverview.svg/2>)

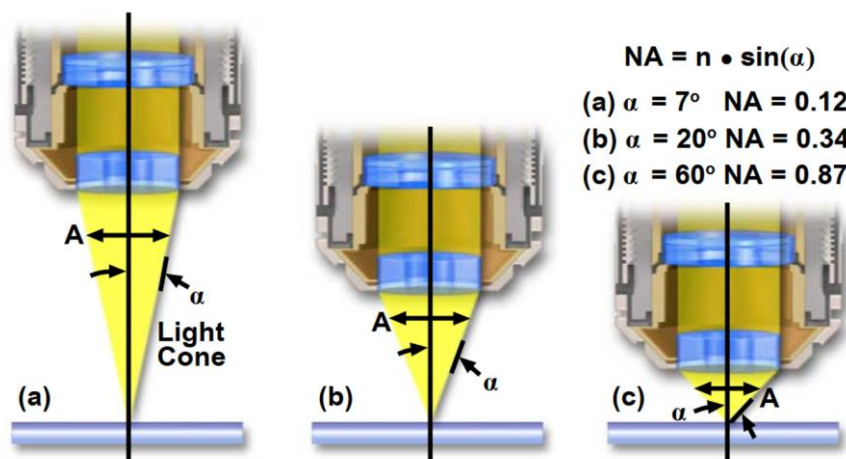
NUMERIČNA APERTURA

Numerična apertura je vrednost, ki nam pove, koliko svetlobe lahko zbere neka leča (Slika 4). Je produkt vrednosti lomnega količnika medija, ki je med objektom in lečo (n), ter sinusa polovice kotne odprtine leče ($\sin(\alpha)$).

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

Lomni količniki sredstev, ki jih uporabljamo pri mikroskopiranju, so 1 (zrak) 1,3 (voda) in 1,5 (imerzijsko olje), kotna odprtina leče (2α) je od 30° do 180° , kar pomeni, da je $\sin(\alpha)$ lahko največ 1. Iz tega sledi, da so vrednosti za numerično aperturo med 0,25 in 1,4.

Na objektivu je ob povečavi vedno izpisana vrednost NA, vedeti pa moramo, da so objektivi z večjo NA bolj kompleksni in tudi dražji (kateri objektiv na vašem mikroskopu je torej najdražji?). Na objektivu sta poleg povečave in NA zapisani še dve pomembni vrednosti. Število 160 pomeni, da lahko objektiv uporabljamo pri vseh mikroskopih s standardno dolžino tubusa 160 mm. Vrednost 0.17, ki je vgravirana samo pri objektivih s povečavo nad 40x pa pomeni, da je največja dovoljena debelina krovne stekelca 0.17 mm. Bliže kot je okular objektu, ki ga gledamo, večja je kotna odprtina leče, kar vodi do večje vrednosti numerične aperture.



Slika 4: Primerjava vrednosti numerične aperture pri različnih kotnih odprtinah leče. Vir: Michael W. Davidson (<https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/numerical-aperture>).

POVEČAVA IN LOČLJIVOST MIKROSKOPA

Povečavo mikroskopa sestavljata povečava objektiv in povečava okularja (njun zmnožek). Povečava objektiv nam pove, kolikokrat je realna slika večja od predmeta. Standardne povečave objektivov so 4x, 10x, 20x, 40x, 63x in 100x. Načeloma ni omejitve pri povečavi mikroskopa, omejena je le **koristna povečava** (kolikokrat lahko nek predmet povečamo in pri tem še ohranimo ustrezno ločljivost).

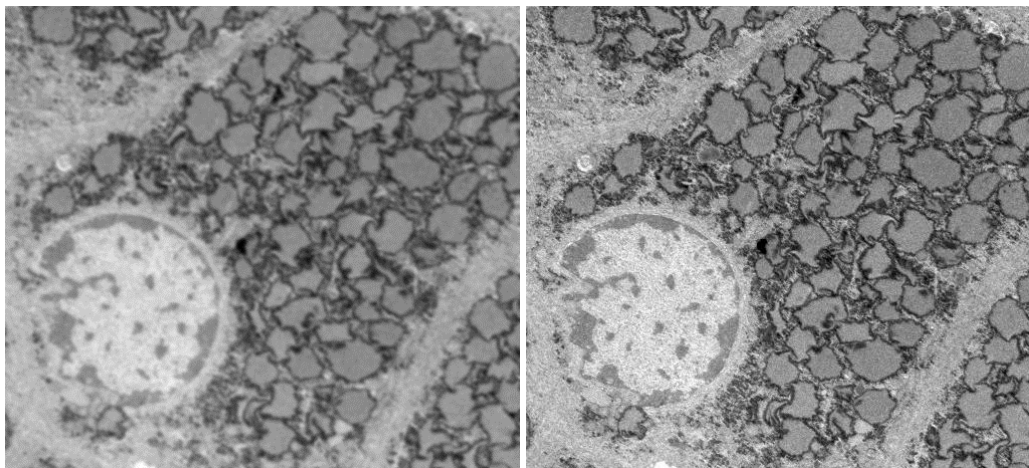
Praktično lahko mejo koristne povečave določimo tako, da vrednost NA za dani objektiv pomnožimo s 1000. Primer: ob uporabi objektiv 40x (z NA 0,65) je meja koristne povečave 650x. Če bi uporabili okular z 20x povečavo, bi presegli mejo koristne povečave, saj bi bila povečava 800x. Ob uporabi okularja z 10x povečavo, pa je povečava mikroskopa pod to mejo (400x povečava).

Ločljivost mikroskopa je zmožnost razločiti najmanjše podrobnosti opazovanega objekta. Ločljivost lahko definiramo kot najmanjšo razdaljo med dvema točkama, ki ju še vidimo kot ločeni točki. Če sliko objekta povečamo do take mere, da je meglena in nerazločna, z nadaljnjim povečevanjem sicer povečamo sliko, vendar je ta še bolj nerazločna (Slika 5).

Ločljivost je odvisna od sistema leč oz. njihove kvalitete. Boljšo ločljivost imajo objektiv, ki lahko sprejmejo širok snop svetlobe (torej imajo večjo **kotno odprtino** in večjo **NA**). Ločljivost (d) je odvisna od valovne dolžine svetlobe (λ) pri kateri objekt opazujemo in numerične aperture (NA) objektiv:

$$d = 0,61 \cdot \lambda / NA$$

Manjša vrednost **d** pomeni **boljšo** ločljivost mikroskopa. Teoretično je ločljivost svetlobnega mikroskopa omejena na $0,2 \mu\text{m}$ (pri $NA = 1,4$ in $\lambda \approx 0,55 \mu\text{m}$ (vidna svetloba)).



Slika 5: Jetrne celice dvoživke s presevnim elektronskim mikroskopom. Primerjava slike z nižjo (levo) in višjo (desno) ločljivostjo. Fotografija: Martina Lužnik.

Iz formule za ločljivost (d) ugotovimo, da lahko to vrednost zmanjšamo (torej izboljšamo ločljivost) na različne načine:

- (1) Zmanjšamo valovno dolžino svetlobe: s posebnimi filtri lahko uporabimo svetlobo iz vijoličnega dela spektra ($\approx 0,42 \mu\text{m}$). S posebno optiko in tehnologijo pa lahko uporabimo tudi UV svetlobo ($< 0,40 \mu\text{m}$).
- (2) Povečamo kotno odprtino leče (do teoretičnega maksimuma $\alpha = 90^\circ$ in $NA = 1$). V praksi je največja NA objektivna $0,95$, povečamo pa jo lahko še z uporabo imerzijske tekočine.
- (3) Povečamo lomni količnik medija (N). Zakaj pri uporabi $100\times$ objektiv uporabljamo imerzijsko olje? To postane jasno, če vemo, da je lomni količnik zraka 1 , vode $1,33$ in imerzijskega olja $1,52$. Ta objektiv ima $NA 1,25$, vendar je to res samo pri uporabi imerzijskega olja. Praktično uporabni so objektivi z največjo NA do $1,4$.

GLOBINSKA OSTRINA

Globinska ostrina je področje okoli naostrenega objekta (nad in pod njim), v katerem je slika še vedno ostra (Slika 6). Ta vrednost je pri mikroskopu zelo majhna in je obratno sorazmerna z NA . Praktično lahko povečamo globinsko ostrino z zmanjšanjem NA oz. kotne odprtine, torej debelejšje preparate gledamo z objektivom z manjšo NA .

Objektiv: povečava (NA v oklepaju)	Okular: povečava	Globinska ostrina
10x (0,25)	10x	0,0335mm
40x (0,65)	10x	0,0026mm

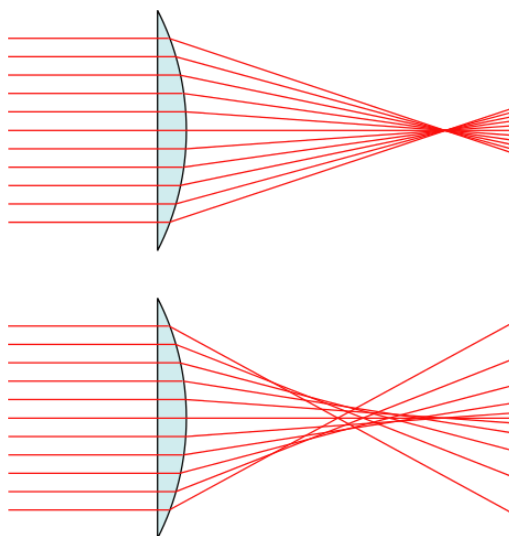
100x (1,25)	10x	0,0005mm
		
Odprtost zaslonke: f/22 Globinska ostrina: 12,4 cm	Odprtost zaslonke: f/4,0 Globinska ostrina: 2,2 cm	Odprtost zaslonke: f/1,4 Globinska ostrina: 0,8 cm

Slika 6: Fotografije kock, posnete z različno odprtimi zaslonkami in s posledično različnimi globinskimi ostrinami (g.o.). Največja globinska ostrina je pri levi sliki, najmanjša pa pri desni. Vir: Alex1ruff (https://en.wikipedia.org/wiki/Depth_of_field#/media/File:Dof_blocks_f22.jpg)

NAPAKE LEČ IN MIKROSKOPA

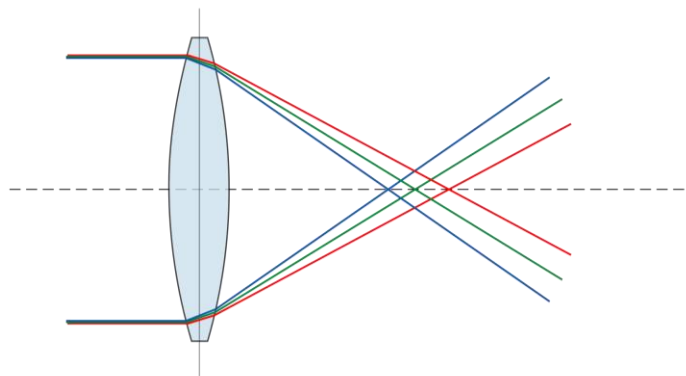
Sistemi leč niso nikoli popolni, vedno pride do napak, ki popačijo sliko. Leče imajo sferične ploskve, ki ne oblikujejo popolne slike. S kombinacijo različnih leč (konveksne, konkavne, ploske; silicijevo ali fluoritno steklo) pa lahko te napake v veliki meri odpravimo.

Najpomembnejša napaka leč je **sferična aberacija**. Do napake pride pri prehodu svetlobe skozi različne dele leče; zunanji del leče ima večjo moč ostrenja kot osrednji. Sferična aberacija povzroči, da nekaj svetlobe, ki bi morala biti v osrednjem delu, difundira navzven (Slika 7). Posledica sferične aberacije je ukrivljena slika, saj se svetloba na robu leče lomi bolj kot v sredini. Ta difuzija povzroči izgubo kontrasta, tako da je slika meglena. Pri boljših mikroskopih se sferična aberacija pojavi le pri uporabi predebelega krovnega stekelca. Na objektivih z večjo povečavo je označena primerna debelina krovnega stekelca (0,17 mm).



Slika 7: Sferična aberacija. Idealna leča (na vrhu) zbere vse žarke v eno točko na optični osi. Realna leča s sferičnimi površinami (spodaj) različne žarke projicira na različna mesta vzdolž optične osi. Vir: Mglg (https://en.wikipedia.org/wiki/Spherical_aberration#/media/File:Spherical_aberration_2.svg).

Poleg sferične aberacije je pomembna napaka leč tudi **kromatična aberacija**. Rob leče deluje kot prizma, ki razkloni belo svetlobo v barvne komponente (žarke različne valovne dolžine). Ker se modra svetloba lomi bolj kot rdeča, pride pri prehodu svetlobe skozi bikonveksno lečo do kromatične aberacije. Posledica kromatične aberacije je slika, ki ima moder ali rdeč rob (Slika 8). To napako lahko odpravimo s kombiniranjem leč iz različnih materialov. Druge napake leč so še astigmatizem, koma, distorzija in ukrivljenost slike.



Slika 8: Kromatična aberacija posamezne leče povzroči, da se svetloba različnih valovnih dolžin zbere na različnih mestih optične osi. Vir: Bob Mellish (https://en.wikipedia.org/wiki/Chromatic_aberration#/media/File:Chromatic_aberration_lens_diagram.svg).

OKULAR

Najpogosteje se uporablja **Huygensov okular**. Problem tega okularja je, da pride pri uporabi z akromatskimi objektivi večje povečave do lateralne obarvanosti – ta problem so rešili tako, da so vstavili dve leči, eno za drugo. Obstajajo tudi drugi tipi okularjev, sistemi več kot dveh leč npr. širokokotni, kompenzacijski, hiperravninski, okularji za fotomikrofografijo itd. Za lažje opazovanje in bolj sproščeno pozicijo oči se uporabljajo binokularni mikroskopi – torej tisti z dvema okularjema.

OSVETLITEV

Pri osvetlitvi lahko mikroskopist največ naredi za čim boljšo sliko preparata. Preparat osvetljuje **vgrajena lučka**, ki je usmerjena navzgor, proti kondenzorju. Nekateri mikroskopi imajo tudi **poljsko zaslonko**, s katero nastavljamo velikost osvetljenega polja na preparatu.

Kondenzor zbira žarke lučke in jih usmerja v ravnino preparata. Kondenzor mora prepustiti vsaj takšen stožec svetlobe, kot ga je zmožen uporabiti objektiv. To pa ne pomeni, da mora biti vedno osvetljena polna NA, saj se z osvetljenostjo manjša kontrast. Pri zelo kontrastnem preparatu z veliko podrobnosti je smiselno uporabiti skoraj polno osvetlitev NA; pri slabo kontrastnem, pa je bolje zmanjšati osvetljenost NA in tako preprečiti »spran« videz slike. Z **zaslonko kondenzorja** uravnavamo osvetlitev NA objektiva. Zaslonko lahko vidimo, če odstranimo okular in pogledamo skozi tubus, hkrati pa zapiramo in odpiramo zaslonko. Osvetlitev je najboljša, če je zaslonka odprta ravno toliko, da ne zakriva leče objektiva. Ko je zaslonka bolj zaprta se poveča kontrastnost slike, hkrati pa se zmanjša ločljivost in pride do artefaktov. Najpogosteje se uporablja Abbejev kondenzor, v katerega sta vgrajeni dve leči. Ima nekaj pomanjkljivosti, vendar je dovolj dober za splošno mikroskopijo. Za zahtevnejše delo je priporočljiv akromatski kondenzor, ki je sistem več leč in pri katerem sta odpravljeni sferična in kromatska aberacija.

Köhlerjeva osvetlitev je osvetlitev pri kateri uporabimo poljsko zaslonko za nadzor osvetlitve. Novejši mikroskopi imajo vgrajeno **fiksno osvetlitev**, tako da centriranje ni potrebno, osvetlitev pa je enakomerna pri vseh povečavah. Optično je taka osvetlitev ekvivalentna Köhlerjevi osvetlitvi.

1.2 PRIPRAVA PREPARATOV ZA SVETLOBNO MIKROSKOPIJO

IZDELAVA MOKREGA PREPARATA

Le v redkih primerih lahko celično ali tkivno strukturo bioloških objektov opazujemo s prostim očesom. Tkiva ali posamezne celice so namreč za to premajhne. Da jih lahko opazujemo pod mikroskopom, jih moramo ustrezno pripraviti: samo dovolj tanke rezine omogočajo, da skozi objekt potuje dovolj svetlobe za ustrezno sliko. Pogosto si pri pripravi manj kontrastnih preparatov pomagamo tudi z barvanjem.



Slika 9: Primer rezanja mehkejših objektov s pomočjo britvice in stiropora. Fotografija: Živa Fišer.

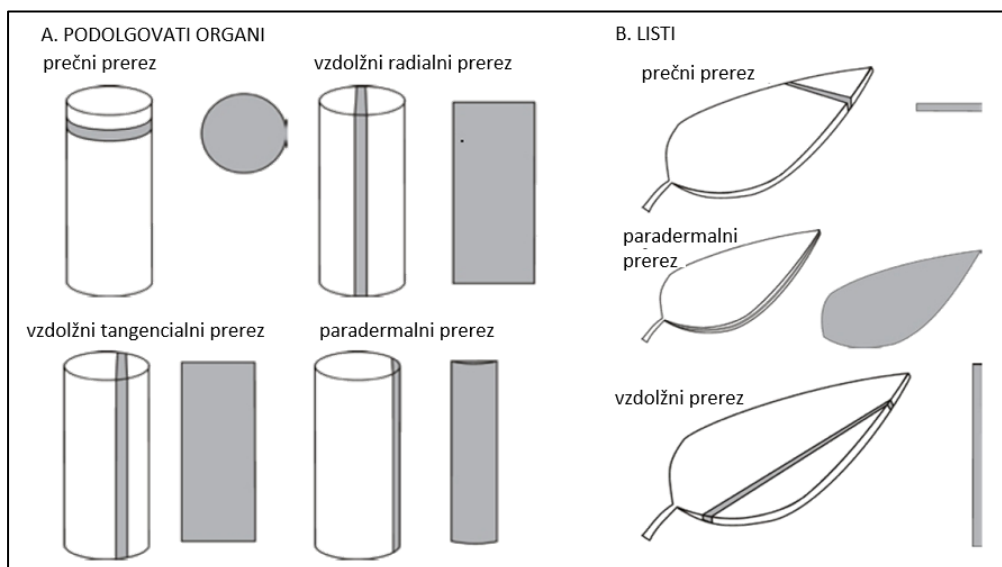
Zaradi same narave tkiv je priprava rastlinski preparatov za ogled tkiv in celic lažja kot priprava živalskih preparatov (Slika 9). Rastline lahko pogosto režemo kar s prosto roko ob pomoči medija, v katerega vpnemo tkivo (npr. stiropor, stržen mladih vej, pluta...).

Tudi za opazovanje rastlinskih tkiv in celic moramo ponavadi pripraviti tanke rezine. Možni načini rezanja podolgovatih organov so prikazani na Sliki 10a:

- prečni (transverzalni) prerez
- vzdolžni (longitudinalni) radialni prerez
- vzdolžni tangencialni prerez
- paradermalni prerez.

Liste režemo na tri načine (Slika 10b): prečno, paradermalno ali vzdolžno.

Mokrih preparatov (to so sveži preparati, ki jih položimo v kapljico vode) ponavadi ne barvamo, saj so dovolj kontrastni za hitro preverjanje in opazovanje struktur. Nekatera barvila pa lahko uporabimo za hitro preverjanje kemične sestave celičnih struktur, kot na primer jodovico za preverjanje škroba.



Slika 10: Možni načini rezanja rastlinskih organov. A: podolgovati organi, B: listi. Vir: Peterson in sod. 2008.

PRIPRAVA TRAJNIH HISTOLOŠKIH PREPARATOV

Histologija je disciplina v biologiji in medicini, ki raziskuje mikroskopsko zgradbo in delovanje celic in tkiv na osnovi opazovanja **tkivnih rezin**. Uporablja se tudi izraz mikroskopska anatomija. Na osnovi zgradbe tkiv in celic sklepamo o njihovi funkciji in delovanju. S pomočjo različnih histoloških tehnik pripravimo histološke preparate pri katerih ohranimo čimbolj naravno strukturo tkiva. Za boljšo vizualizacijo in diferenciacijo tkiv uporabimo selektivno barvanje tkiv.

1. ODVZEM TKIVA

Odvzem tkiva je tisti korak, ki se najbolj razlikuje pri pripravi zooloških in botaničnih preparatov. Pri odvzemu tkiva živali moramo upoštevati etične pomisleke. Če je možno, uporabimo nedestruktivne metode (kot je biopsija), v primeru, da je treba žival usmrtiti pa se držimo etičnih standardov (predhodno narkotiziranje itd.). Vsekakor je treba pred delom pridobiti ustrezna dovoljenja v skladu z zakonodajo in se seznaniti s standardi ravnanja z živalmi in z njimi delati spoštljivo.

Za čim boljši rezultat je pomembno vedeti, v kakšnem okolju se je tkivo nahajalo in ga potem prenesti v podobno okolje (izotoničnost, pH), ki tkiva ne poškoduje ali spremeni. Najbolje je uporabiti ustrezno fiziološko raztopino za izbrano vrsto živali.

2. FIKSACIJA TKIVA

S fiksacijo zaščitimo tkivo pred propadanjem, saj ustavimo vse biološke reakcije in ohranimo čim bolj naravno strukturo celic ter njihovih organelov. Poznamo kemijsko in fizikalno fiksacijo (z zamrzovanjem), izbira fiksativa pa je odvisna od nadaljnje obdelave

tkiva in vrste analize (klasična histologija s svetlobnim mikroskopom, mikroskopska struktura celic, imunohistokemija s protitelesi itd.). Pomembno je, da fiksativ prodre do vseh delov tkiva, še preden to razpade. Pri imerzijski fiksaciji mora biti košček dovolj majhen (nekaj milimetrov), volumen fiksativa mora biti veliko večji kot tkivo, fiksacija pa poteka pri razmeroma nizki temperaturi (kar preprečuje razgradnjo tkiva, vendar tudi upočasnjuje prodiranje fiksativa).

Najpogosteje se uporabljajo zmesi aldehydov, ki se vežejo na proteine v tkivu, tako da nepovratno zamrežijo amino skupine. Ta proces ustavi delovanje proteinov in jih do neke mere denaturira. Primer fiksativov na osnovi aldehydov so formalin, glutaraldehid, Carnoy idr. Osmijev tetroksid se veže na lipide, zato je uporaben za analizo celične membrane in lipidov. Uporabljajo se tudi drugi fiksativi, npr. očetna kislina in pikrinska kislina. Vsi fiksativi so zelo škodljivi, zato moramo pri delu z njimi upoštevati vse previdnostne ukrepe (rokavice, halja, uporaba digestorija).

V nekaterih primerih želimo ohraniti proteine (encime) v aktivni obliki, zato lahko uporabimo fiksacijo z zamrzovanjem. Tkivo moramo zamrzniti v najkrajšem času, da preprečimo nastanek kristalov, ki bi lahko poškodovali vzorec. To dosežemo s tekočim dušikom.

3. PROCESIRANJE TKIVA IN VKLAPLIJANJE V TRDEN MEDIJ

Sledi izpiranje fiksativa, temu pa dehidracija tkiva (odstranitev vode). Dehidracija je pomembna, saj so mediji, v katere vklapljam tkivo, običajno hidrofolni (najpogosteje parafin). Tkivo zato prenesemo v kopel alkohola naraščajoče koncentracije, običajno pričnemo s 70 % etilalkoholom, nadaljujemo z 90% in 96% etilalkoholom in nato s 100% propil alkoholom. Pred prenosom v parafin pa vzorce še bistrimo v ksilenu. Ko je tkivo prepojeno s parafinom (po okoli 24h), ga prenesemo v modelčke skupaj z medijem in pustimo, da se strdi.

4. PRIPRAVA REZIN

Tkivo narežemo z mikrotomom, napravo, ki omogoča natančno rezanje serije rezin določene debeline (od 5 do 10 μm). Rezone z noža prenesemo v vodne kapljice na segretem objektnem stekelcu, kjer se primerno raztegnejo, ter jih posušimo. Stekelca primerno označimo. Pred barvanjem moramo rezine ponovno hidrirati, saj so barvila vodotopna. Postopek je obraten kot pri dehidraciji, ostanke alkohola pa na koncu odstranimo z destilirano vodo.

Zamrznjeno tkivo režemo v kriostatu, to je hlajen prostor, v katerem je mikrotom. Take rezine lahko takoj barvamo.

5. BARVANJE REZIN

Tkiva barvamo iz več razlogov. Večina celic in organelov, z izjemo tistih, ki vsebujejo pigmente, je brez barve, zato jih s svetlobnim mikroskopom lažje opazujemo, če jih

predhodno obarvamo. Nekatera barvila uporabljamo za histokemijske teste, kar pomeni, da nam dobljena barva na posameznem delu mikroskopskega preparata nakazuje kemijsko sestavo obarvane strukture (identifikacija in lokalizacija snovi v preparatu). Osnova vseh histokemijskih reakcij je specifična vezava barvila na določeno kemijsko substanco v preparatu. Ta substanca je bodisi fiziološka sestavina celice ali pa nastane v prvem delu reakcije iz molekul, ki so v celici prisotne.

Najpogostejša barvila, ki jih uporabljamo pri svetlobni mikroskopiji **rastlinskih** preparatov, so:

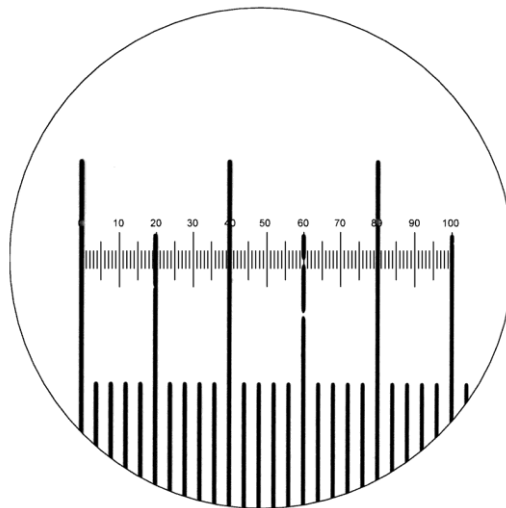
- Anilin modro - obarva kalozo rumeno.
- DAPI - obarva jedra; opazujemo pod UV-svetlobo.
- Jodovica (I_2KI) - obarva škrob modro-vijolično.
- Kisli fuksin - obarva proteine rdečkasto.
- Safranin - tkiva obarva rdečevijolično.
- Sudan - obarva lipide oranžnordeče. Obarva kutikulo ter kutinizirane in suberizirane celične stene.
- Toluidin modro O - metakromatsko barvilo, tkiva obarva v različno barvo glede na vezavna mesta v tkivu in glede na pH barvila. Celične stene, ki vsebujejo pektine, se obarvajo rdečerožnato, lignificirane celične stene pa modro ali modrozeleno. Modro se obarvajo tudi jedra in razne fenolne spojine.

Ena izmed bolj razširjenih metod barvanja zooloških preparatov je diferencialno barvanje z eozinom in hematoksilinom. Hematoklislin je bazično barvilo in obarva jedra modrovijolično, eozin pa je kislo barvilo in obarva citoplazmo rdečkasto. Obstaja seveda še cela vrsta barvanj, ki različno obarvajo komponente celic in tkiv (npr. kolagenska vlakna, maščobe itd.).

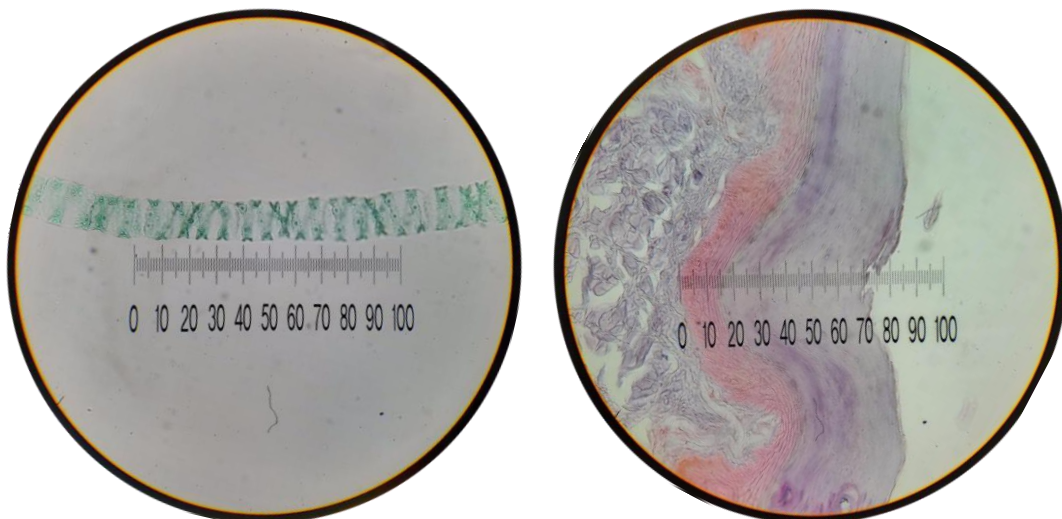
Po barvanju rezine ponovno dehidriramo, jih zalijemo s kanadskim balzamom, ki ima enak lomni količnik kot steklo, in pokrijemo s krovnim stekelcem. Trajni preparat je pripravljen za pregledovanje po nekaj dneh, ko se popolnoma posuši.

VELIKOST CELIC – MERJENJE S POMOČJO MIKROSKOPA

Velikost objekta in struktur na njem lahko izmerimo na različne načine. Strukturo lahko primerjamo z neko fiksno strukturo znane velikosti, najbolj preprosta je primerjava z velikostjo vidnega polja pri neki povečavi. Natančneje je, če izmerimo strukturo z okularnim merilcem. Če velikost razmika okularnega merilca ni znana, jo moramo umeriti s pomočjo mikrometrске mrežice (objektno merilce na tovarniškem preparatu; Slika 11). Okularno merilo moramo umeriti pri vsaki povečavi posebej. Ko poznamo velikost razmika okularnega merila pri različnih povečavah, lahko izmerimo objekte tako, da okularno merilo usmerimo čez strukturo, ki jo želimo izmeriti (Slika 12).



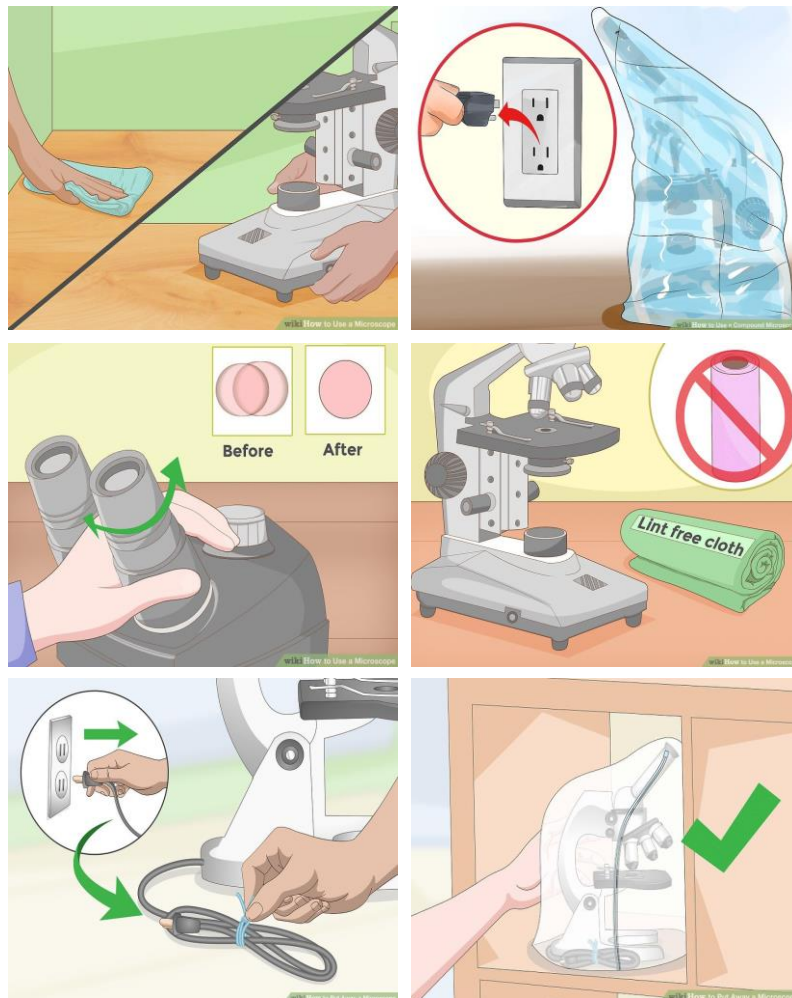
Slika 11: Prikaz umerjanja okularnega merila (zgornje merilo s številkami) s tovarniškim objektnim merilom z znano velikostjo razmika (običajno 10 μm).



Slika 12: Levo: merjenje spirogire pri povečavi 100x. Desno: koža dlani pri povečavi 400x. Fotografija: Martina Lužnik.

1.3 RAVNANJE S SVETLOBNIM MIKROSKOPOM

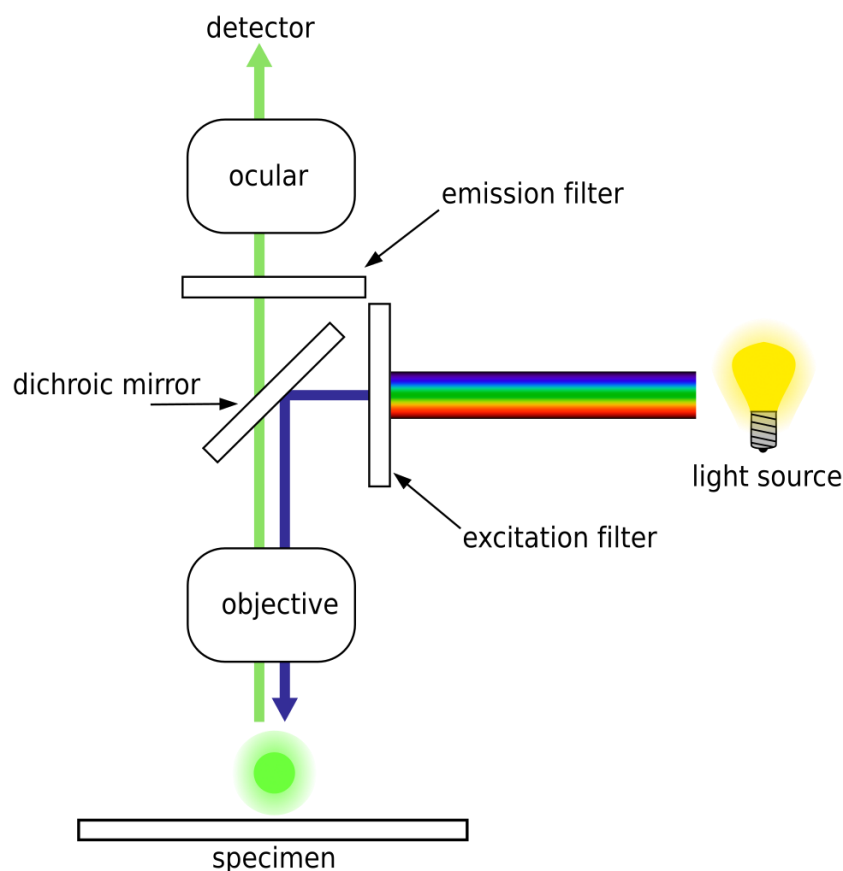
- Z mikroskopom ravnamo pazljivo (Slika 13). Pri prenašanju ga primemo pod bazo ali za stativ. Če ga želimo premakniti na mizi, ga nikoli ne vlečemo, temveč ga privzdignemo.
- V binokularni mikroskop gledamo z obema očesoma. Ob začetku mikroskopiranja vedno prilagodimo medzenično razdaljo ter dioptrijo.
- Z opazovanjem objekta začnemo tako, da objekt najprej izostrimo pri najnižji povečavi z makrometrskim vijakom, nato z obračanjem revolverja z objektivami višamo povečavo in ostrimo le še z mikrometrskim vijakom.
- Pri 1000x povečavi uporabljamo imerzijsko olje, ki ga po uporabi očistimo z objektivami in stekelca s posebno temu namenjeno krpicco ali papirjem za čiščenje leč.
- Po uporabi imerzijskega olja nikoli ne prestavimo takoj na 400x povečavo (objektiv bi se zapackal!), temveč v drugo smer, na najmanjšo povečavo.
- Mizico premikamo počasi in pazimo, da se s stekelcem na mizici ne "zaletimo" v objektiv. Preden menjamo preparat ali ko zaključimo z mikroskopiranjem, prestavimo na objektiv z najmanjšo povečavo.
- Ob zaključku dela mikroskop očistimo s krpicami za leče, preverimo, da na mizici ni preparata, pospravimo kabel (nikoli ga ne ovijemo okoli mikroskopa temveč ga zvitega položimo ob njega), mikroskop pokrijemo in ga pospravimo v omaro.



Slika 13: Rokovanje z mikroskopom. Vir: <https://www.wikihow.com/Use-a-Microscope>

1.4 FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA

Fluorescenca je sposobnost nekaterih atomov in molekul, da emitirajo svetlobo po predhodni ekscitaciji z zunanjim virom energije. Fluorescenčni mikroskop nam omogoča opazovanje preparatov, v katerih so prisotne molekule, ki fluorescirajo. Te molekule so lahko prisotne v samem preparatu (fluorescirajo na primer klorofili, karoteni), kar imenujemo primarna fluorescenca ali autofluorescenca. V drugih primerih pa moramo strukture obarvati s posebnimi fluorescentnimi barvili, ki jih imenujemo fluorokromi. Tu govorimo o sekundarni fluorescenci.



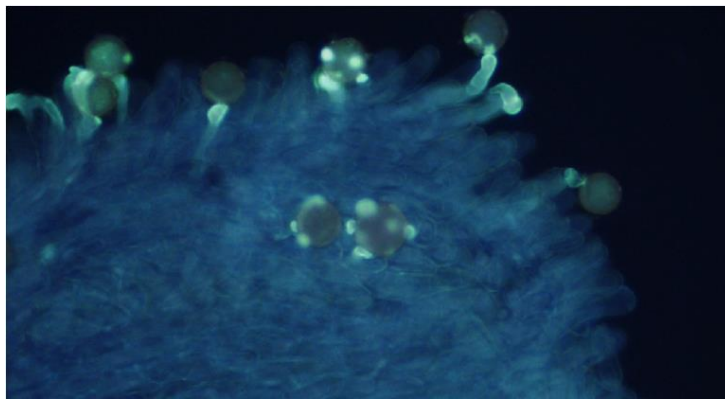
Slika 14: Diagram, ki prikazuje osnovni princip epi-fluorescenčne mikroskopije. Svetlobni vir emitira svetlobo, ki se odbije od dikromatskega ogledala skozi objektiv in naprej v vzorec. Fluorokromi, prisotni v vzorcu, po ekscitaciji emitirajo svetlobo daljše valovne dolžine (fluorescenca), ta gre nazaj skozi objektiv in čez dikromatsko ogledalo in proizvede končno sliko na detektorju (oko ali kamera). Vir: Henry Mühlpfordt

(https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_microscope#/media/File:FluorescenceFilters_2008-09-28.svg)

Fluorescenčni mikroskopi, ki so uporabljeni v današnjem času, sledijo dizajnu Johana Ploema iz 60. let 20. stoletja. Princip delovanja je sledeč (Slika 14): svetloba, ki jo oddaja svetlobni vir (ekscitacija), se odbije od dikromatskega ogledala, nadaljuje pot skozi objektiv in vzburi (ekscitira) fluorokrome v vzorcu. Dikromatsko ogledalo deluje kot

navadno ogledalo za svetlovo krajših valovnih dolžin (torej jo odbije proti vzorcu), svetlobo daljših valovnih dolžin pa prepušča. Fluorescentna svetloba, ki jo odda vzorec (emisija), gre nazaj proti dikromatskemu ogledalu. Ker ima emitirana svetloba zdaj daljšo valovno dolžino, se ne odbije od dikromatskega ogledala temveč gre skozi njega v detektor (to so lahko oči ali elektronska naprava, npr. CDD kamera).

Uporaba fluorescentnega mikroskopa ima velik pomen v nekaterih bioloških in medicinskih vejah, na primer pri opazovanju živih celic in tkiv, za zaznavanje proteinov preko tehnike fluorescentnih protiteles ali pri raziskavah in situ hibridizacije nukleinskih kislin (Slika 15).



Slika 15: Kalitev pelodnih mešičkov dinarske smiljke (*Cerastium dinaricum*) na brazdi pestiča. Pod fluorescenčnim mikroskopom se vidi kaloza (fluorescira rumeno-zeleno) v pelodnih mešičkih. Preparat obarvan z barvilom anilin modro in fotografiran s fluorescenčnim mikroskopom Nikon Eclipse 55i. Fotografija: Živa Fišer.

1.5 NEKATERI DRUGI TIPI SVETLOBNE MIKROSKOPIJE

Najpogosteje uporabljena tehnika svetlobe mikroskopije za opazovanje bioloških vzorcev je **mikroskopija v svetlem polju**. Objekti, ki jih opazujemo, se pojavijo na svetlem polju. **Mikroskopijo v temnem polju** uporabljamo predvsem za opazovanje manj kontrastnih živih vzorcev. Dobimo svetlo sliko na temnem polju. Pri tehniki **faznega kontrasta** izkoriščamo specifične lastnosti struktur celice, kot so optična gostota in lomni količnik. Ko skozi objekt potuje svetlobni žarek, pride do povečanja faznega zamika valovnih dolžin, kar zaznamo kot razliko v kontrastu. Strukture, ki so optično gostejše, vidimo temnejše od ostalih.

1.6 ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

1.6.1 PRESEVNI ALI TRANSMISIJSKI ELEKTRONSKI MIKROSKOP (TEM)

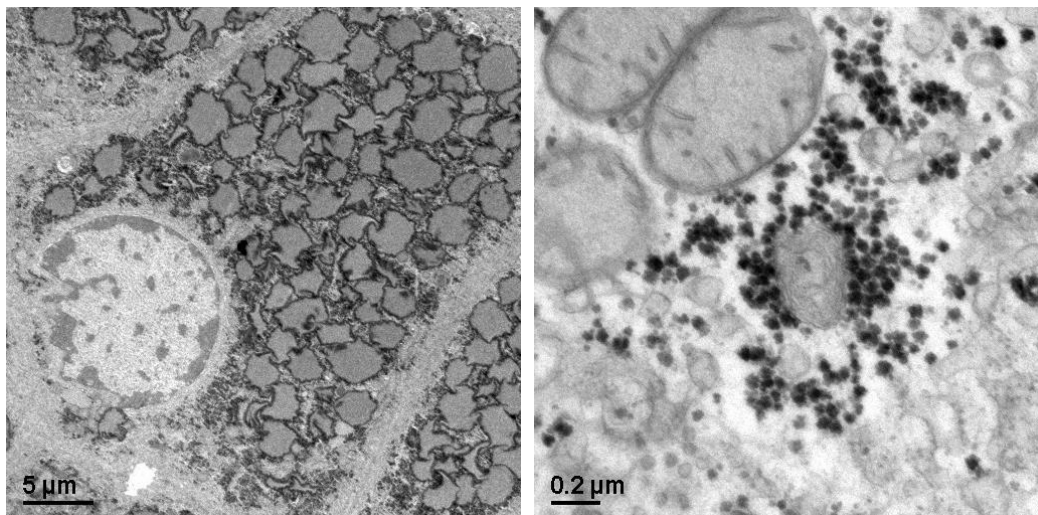
Presevni ali transmisijski elektronski mikroskop (TEM) omogoča vizualizacijo bioloških vzorcev pri povečavah in ločljivostih, ki daleč presegajo možnosti svetlobne mikroskopije. Uporabljamo ga za opazovanje mikroskopske strukture celice (ultrastrukture), saj ima veliko večjo ločljivost kot svetlobni mikroskop ($d = 1-2 \text{ nm}$). To je za biološke strukture približno 100-krat boljša ločljivost. Slika nastane zaradi sipanja elektronov kratke valovne dolžine ($\lambda = 0,005 \text{ nm}$) na atomih z visokim atomskih številom.

Elektroni potujejo po cevi (vakuumu) od elektrode skozi preparat do zaslona. Usmerjajo jih elektromagnetne leče, ki imajo enako funkcijo kot steklene leče v svetlobnem mikroskopu. Elektroni se elastično in neelastično sipajo in odbijajo; tisti, ki gredo skozi, pa se zberejo v žariščni ravnini, in tako dobimo sliko na ekranu ali fotografskem filmu. Do zadostnega sipanja elektronov v preparatu lahko pride le, če je ta impregniran s težkimi kovinami, saj so sicer biološke strukture slabo kontrastne (večina elementov ima nizko atomsko število).

Priprava preparatov za TEM – ultratanke rezine

Zaradi lastnosti elektronskega mikroskopa je priprava preparatov za elektronsko mikroskopijo nekoliko drugačna. Predvsem morajo biti preparati zelo tanki (ultratanke rezine), saj elektroni slabo prodirajo skozi preparat (Slika 16). Osnovne faze priprave pa so podobne kot pri pripravi histoloških preparatov. Fiksacija zelo majhnih koščkov tkiva mora potekati čim hitreje, uporabljamo pa aldehydne fiksative in osmijev tetroksid. Po dehidraciji tkiva vklopimo v zelo trdne umetne smole (npr. epoksi), ki jih lahko režemo na izjemno tanke rezine.

Za orientacijo v vzorcu najprej naredimo t.i. poltanke rezine (debelina $1 \mu\text{m}$). Te nam služijo za orientacijo v koščku tkiva s pomočjo svetlobnega mikroskopa. Režemo jih z ultramikrotomom s steklenim ali diamantnim nožem. Barvamo jih skupaj s smolo s toluidinskim modrilom. Preparate za TEM režemo na t.i. ultratanke rezine debeline 40-60 nm in jih prenesemo na nosilec (mrežico). Preparatov ne barvamo, temveč kontrastiramo s solmi težkih kovin, najpogosteje s svinčevim citratom in uranil acetatom.



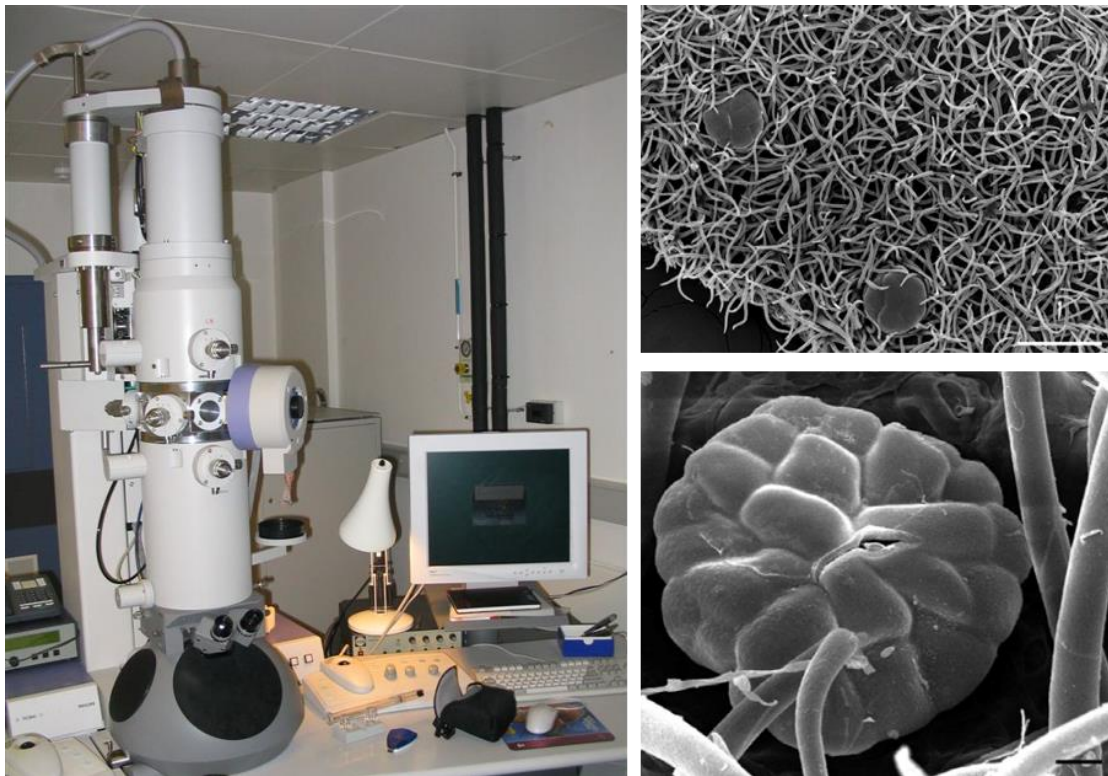
Slika 16: Jetrne celice dvoživke s presevnim elektronskim mikroskopom. Levo: vidna je celotna celica z okroglim jedrom in številnimi lipidnimi kapljami; desno: detajl celice z mitohondriji in zrcni glikogena. Fotografiji: Martina Lužnik.

1.6.2 VRSTIČNI ALI SCANNING ELEKTRONSKI MIKROSKOP (SEM)

Vrstični elektronski mikroskop (Slika 17) uporabljamo za opazovanje površine in s tem tridimenzionalne zgradbe preparata. Podobno kot pri TEM se tudi pri SEM namesto svetlobnega vira uporablja ozek snop elektronov z zelo kratkimi valovnimi dolžinami, ki izhaja iz elektronske puške. Ta potuje po površini preparata in izbija iz njega sekundarne elektrone, ki jih zaznava detektor. Signal se potem pretvori v sliko površine preparata, ki jo opazujemo na ekranu. Globinska ostrina pri SEM je zelo velika, ločljivost pa manjša kot pri TEM.

Priprava preparatov za SEM

Biološke preparate moramo pred opazovanjem najprej dehidrirati in jih nato posušiti pri kritični točki s pomočjo tekočega CO₂. Ker je prevodnost bioloških preparatov slaba, jih moramo pred opazovanjem naprašiti s kovinskim prahom (zlato, srebro, platina).



Slika 17: Vrstična (SEM) mikroskopija. Levo: Vrstični elektornski mikroskop Tecnai 12. Foto: David J Morgan. (https://en.wikipedia.org/wiki/Microscope#/media/File:Electron_Microscope.jpg). Desno zgoraj: fotografija listne povrhnjice. Desno spodaj: detajl večceličnega žleznega laska. Fotografiji: Živa Fišer.

2. DEL: BIOLOŠKE SKICE - ZAKAJ SO V DANAŠNJEM ČASU ŠE POMEMBNE?

Biološke skice predstavljajo pomemben del razumevanja in učenja bioloških struktur. Študentje se v zadnjih letih vedno pogosteje sprašujejo, zakaj je skiciranje bioloških preparatov potrebno, saj lahko v današnjem času s pomočjo pametnega telefona in mikroskopa ali lupe posnamemo kakovostno fotografijo mikroskopskega ali makroskopskega objekta. V prid biološkemu skiciranju govori več dejstev:

1) Po eni strani fotografije večinoma ne morejo prikazati vseh struktur v eni sliki, po drugi strani pa je izgled struktur, ki jih fotografija zajame, pogosto preveč podroben in nepotreben za razumevanje snovi, ki jo pri opazovanju posameznega objekta obravnavamo. Preveč podrobnosti na fotografiji lahko namreč opazovalca zmede, da ne opazi strukture, ki bi jo moral opazovati. Pri opazovanju struktur pod mikroskopom lahko uravnavamo globinsko ostrino in skiciramo objekt, v katerem zajamemo strukture, za prikaz katerih bi potrebovali več fotografij.

2) Aktivno zapisovanje in risanje pomaga pri pomnjenju, nastale skice pa omogočajo trajen oris opazovanih struktur in lahko služi pri kasnejšem učenju.

3) Weekes (2005) poleg tega tudi navaja, da je pri procesu biološkega risanja za opazovalca najpomembnejši pravzaprav čas, ki ga posveti opazovanju objekta, in ne samo skiciranje.

2.1 POSEBNOSTI PRI RISANJU BIOLOŠKIH PREPARATOV

Material:

- oster svinčnik
- šilček
- radirka
- ravnilo
- prazni beli listi

Pravila, ki jih moramo upoštevati pri risanju bioloških skic:

PRIPRAVA

1. Za risanje skic, označevanje in zapisovanje naslovov ter ostalega teksta uporabljamo izključno svinčnik (najbolje trdote HB do 2H).
2. Rišemo na prazen brezčrtni papir, vse skice morajo biti označene.
3. Če opazujemo objekt pod mikroskopom, najprej ustrezno nastavimo osvetlitev, povečavo in ostrino.
4. Najprej se seznanimo z objektom. Ogledamo si ga sprva kot celoto, šele nato identificiramo strukture, ki jih moramo opazovati. Pri skiciranju se osredotočamo nanje in ne na druge strukture.
5. Ko smo seznanjeni z objektom, se odločimo, kateri del objekta bomo skicirali.

6. Tudi med skiciranjem še opazujemo preparat pod mikroskopom. Nekateri so sposobni hkratnega opazovanja pod mikroskopom in skiciranja, vendar to zahteva veliko prakse.

NASLOVI

7. Vse skice morajo imeti naslov. Naslov se nahaja nad skico, na skrajni levi strani lista. Pod naslovom zapišemo povečavo. Če je možno, v naslovu navedemo tudi latinsko ime vrste - to ime podčrtamo.

8. Desno od naslova zapišemo naše ime in datum.

RISANJE

9. Pri risanju je natančnost ključnega pomena, zato objekt najprej dobro opazujemo, šele nato ga narišemo.

10. Rišemo, kar vidimo in ne kar mislimo, da moramo videti.

11. Risbe in diagrami morajo biti čimbolj enostavni, narisani z neprekinjenimi črtami ter neosenčeni. Če rišemo okrogle ali ovalne strukture, se morajo črte stikati.

12. Slike naj bodo na levi strani papirja; na desni je prostor, predviden za oznake.

13. Slike morajo biti dovolj velike, da lahko na njih označimo vse opazovane strukture. Več kot je struktur, večja mora biti skica.

14. Če želimo osenčiti dele slike, tega ne naredimo z barvanjem ali "megljenjem", temveč senčimo z gostimi pikicami.

15. Pri rastlinskih celicah nakažemo prisotnost celične stene z dvema črtama, ki se bolj ali manj tesno prilegata ena k drugi.

16. Ko želimo prikazati posamezno celico, narišemo tudi, kako se ta celica stika s sosednjimi; na ta način prikažemo, kakšen je videz celotnega tkiva.

OZNAKE NA SKICI

17. Črte, ki služijo označevanju, morajo biti vzporedne ena z drugo in se ne smejo križati; vedno jih rišemo z ravnilom. Črte vodijo natančno do centra strukture, v primeru večjih struktur ali plasti pa jih označimo z oglatim zaklepajem.

18. Črte se nikoli ne zaključijo s puščico, saj lahko ta zakrije manjše strukture.

19. Oznake ob skicah pišemo razločno - z malimi ali velikimi tiskanimi črkami.

20. Pri oznakah je dobrodošlo, da značilnosti označenih struktur (npr. velikost, oblika, barva...) opišemo z besedami.

MERILO

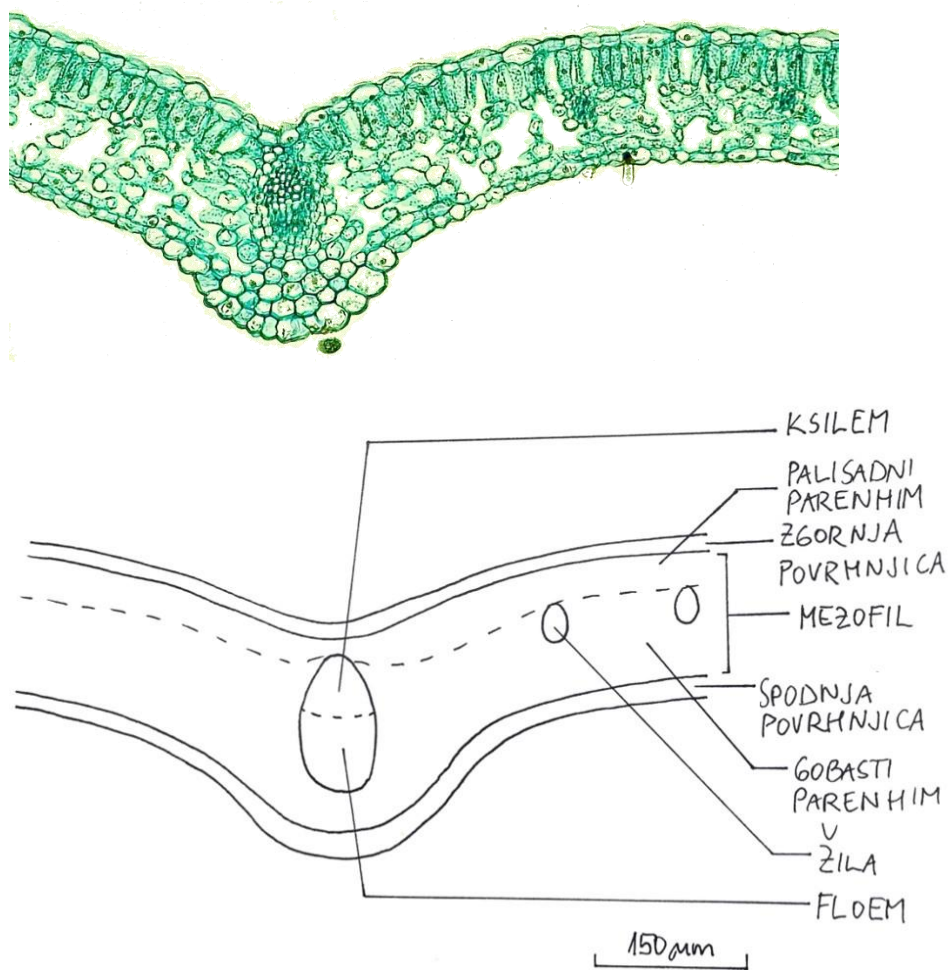
21. Merilo se mora nahajati pod skico, narisano mora biti z ravnilom. Velikost merila mora biti skladna s skico. Pri opazovanju struktur pod mikroskopom so oznake merila v mikrometrih, pri opazovanju makroskopskih preparatov pa lahko tudi v milimetrih ali centimetrih.

2.2 RISANJE PREPARATOV PRI NIZKIH IN VISOKIH POVEČAVAH

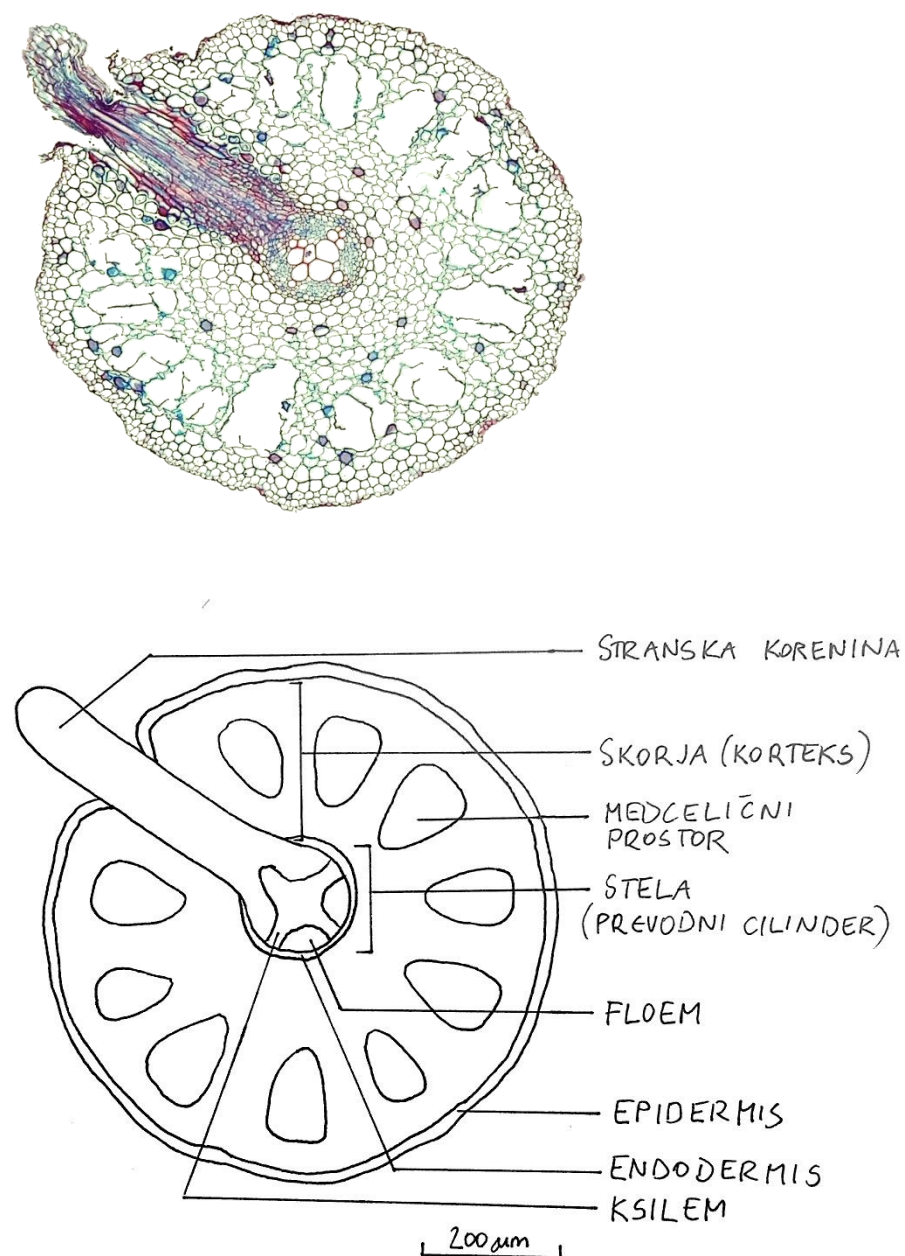
Najboljši način opazovanja mikroskopskih preparatov je kombiniranje opazovanja pod nizkimi in visokimi povečavami. Uporaba obojih je komplementarna in tudi pri izdelavi skic je pogosto smiselno, da skiciramo objekt pod različnimi povečavami.

2.2.1 NIZKE POVEČAVE

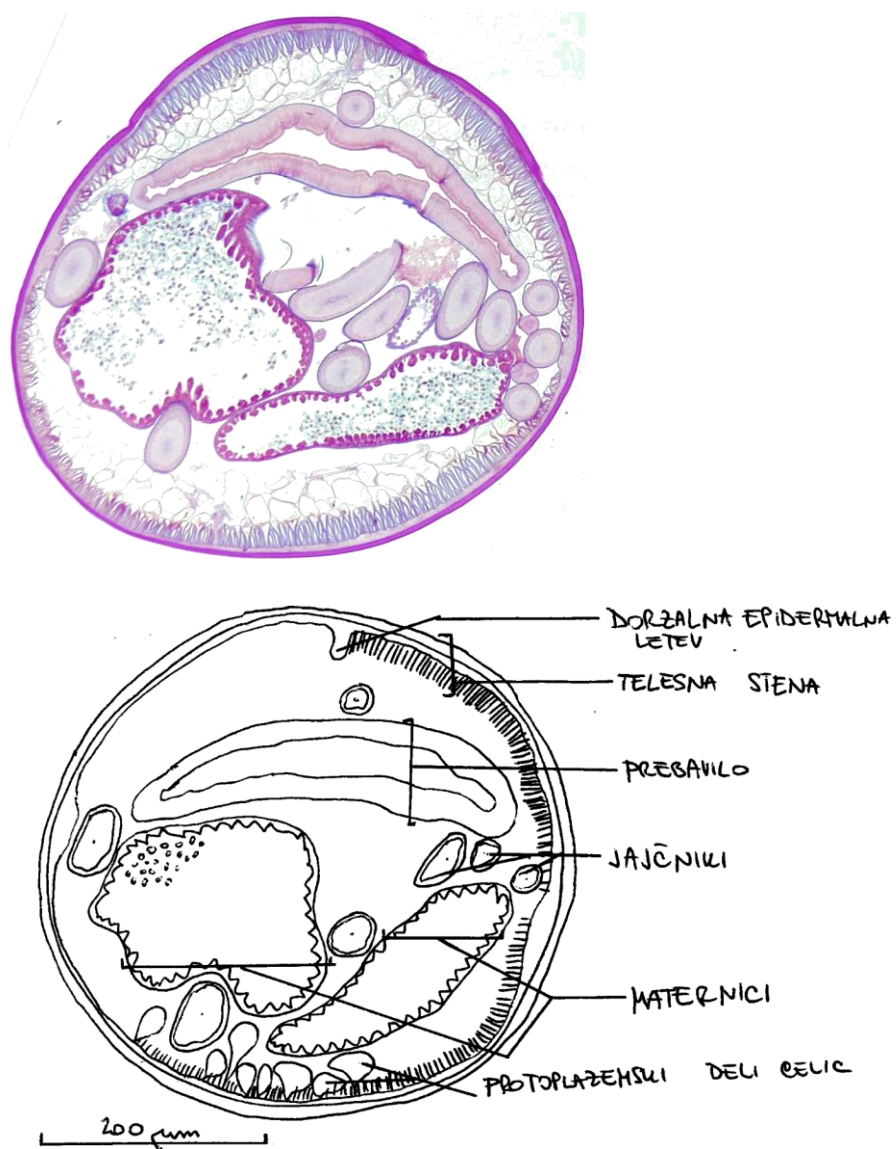
Namen risanja pod nizko povečavo je običajno prikazati razporeditev posameznih tkiv znotraj organa, na primer v prečnem prerezu lista (Slika 18), korenine rastline (Slika 19), telesa gliste (Slika 20) ali kože dlani (Slika 21). Tkiva na skici razmejimo z mejnimi črtami. Pri nizkih povečavah ne rišemo posameznih celic. Končna skica pravzaprav predstavlja grob zemljevid razporeditve tkiv, za opredelitev natančnejše strukture posameznih tkiv in celic, ki jih gradijo, pa moramo uporabiti večje povečave. Če je struktura, ki jo opazujemo, simetrična, ni treba skicirati celega objekta, temveč le izsek (npr. polovico prečnega prereza stebela ali lista).



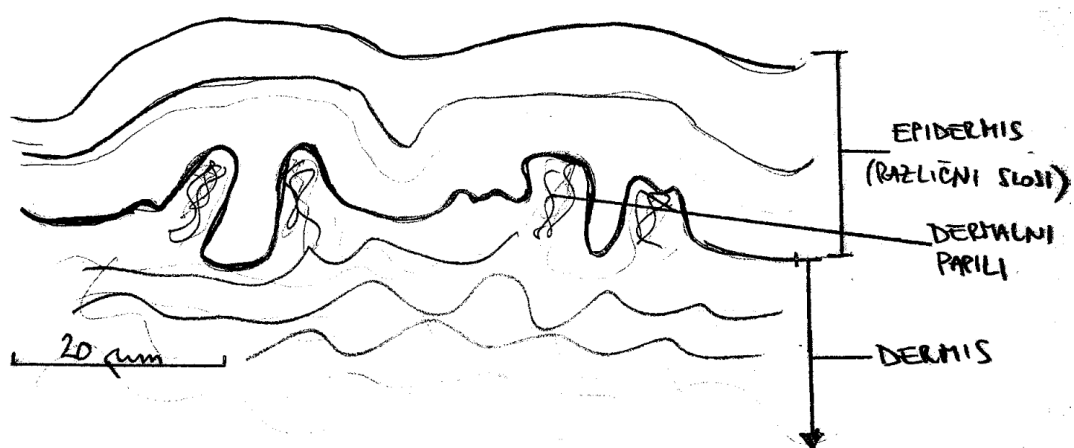
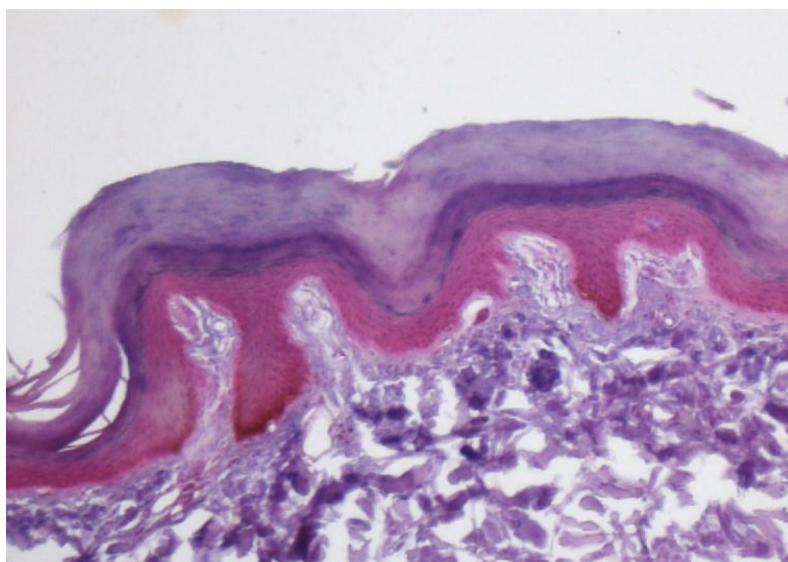
Slika 18: Prečni prerez lista teloha pod 100x povečavo. Fotografija in skica: Živa Fišer.



Slika 19: Prečni prerez korenine dvokaličnice s stansko korenino pod 100x povečavo. Fotografija in skica: Živa Fišer.



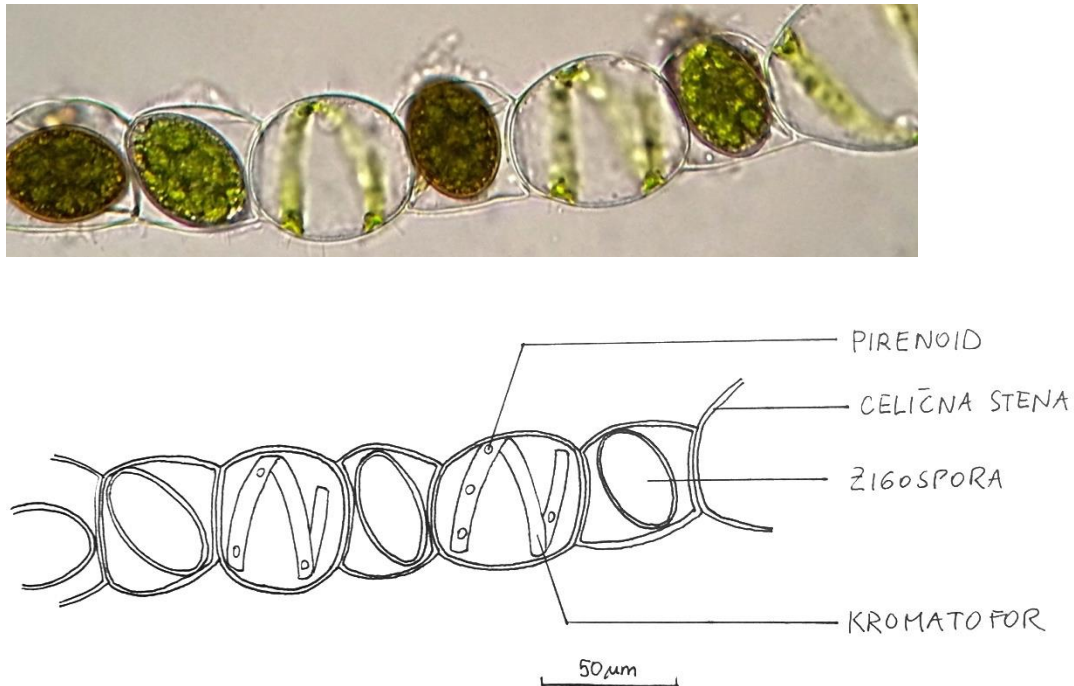
Slika 20: Prečni prerez samice gliste (*Ascaris* sp.) pod 40x povečavo. Fotografija in skica: Martina Lužnik.



Slika 21: Preparat kože dlani, ki prikazuje epidermis in vrhnji del dermisa (z vezivnim tkivom) pod 100x povečavo. Fotografija in skica: Martina Lužnik.

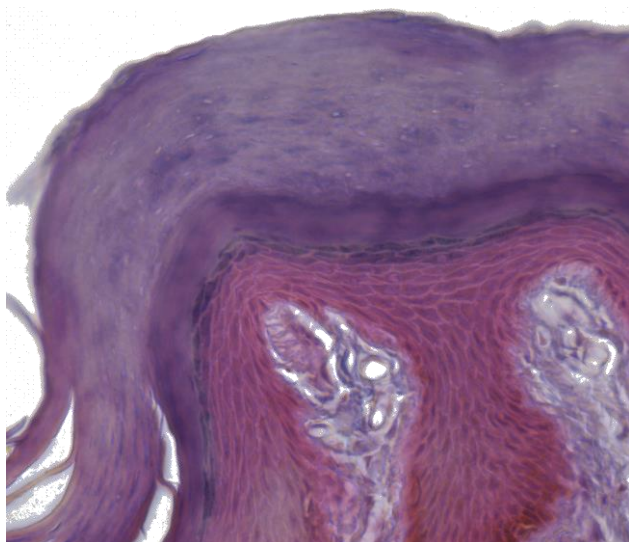
2.2.2 VISOKE POVEČAVE

Namen risanja pod velikimi povečavami je prikaz podrobnosti. Če je cilj opazovanje posameznih celic, skiciramo nekaj sosednjih celic (npr. Slika 22); če so vse celice enake, lahko skiciramo približno tri celice, kar nam omogoči tudi razumevanje, kako ležijo ena napram drugi v tkivu. Za natančen prikaz struktur v celicah je dovolj, da jih skiciramo le v eni celici. Še vedno velja, da struktur, na primer jedra in jedrca znotraj njega, ne senčimo.

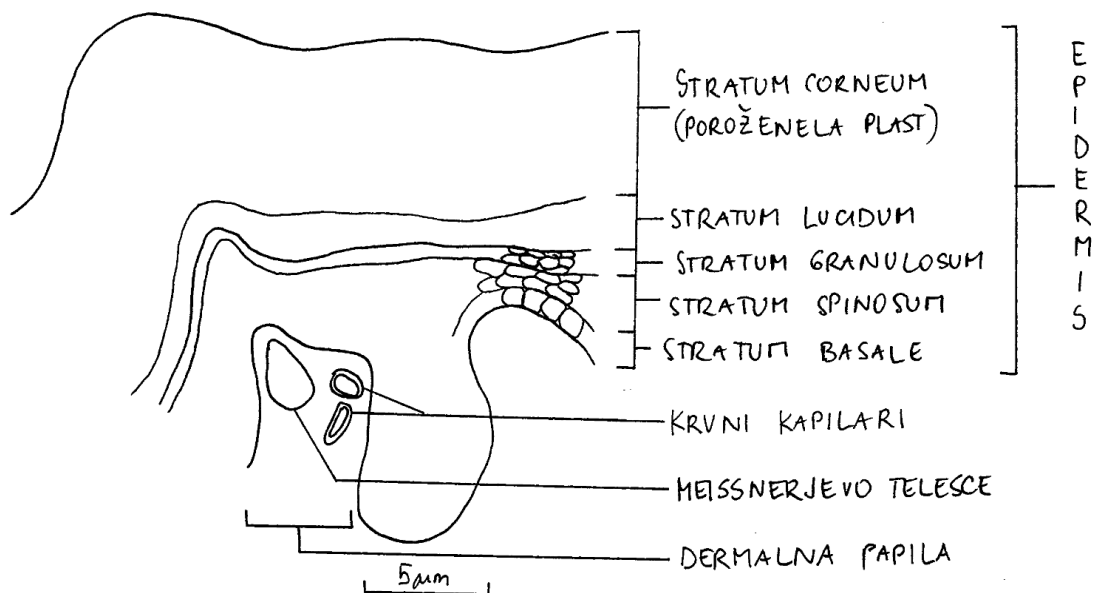


Slika 22: Razmnoževanje pri spirogiri pri 400x povečavi. Fotografija in skica: Živa Fišer.

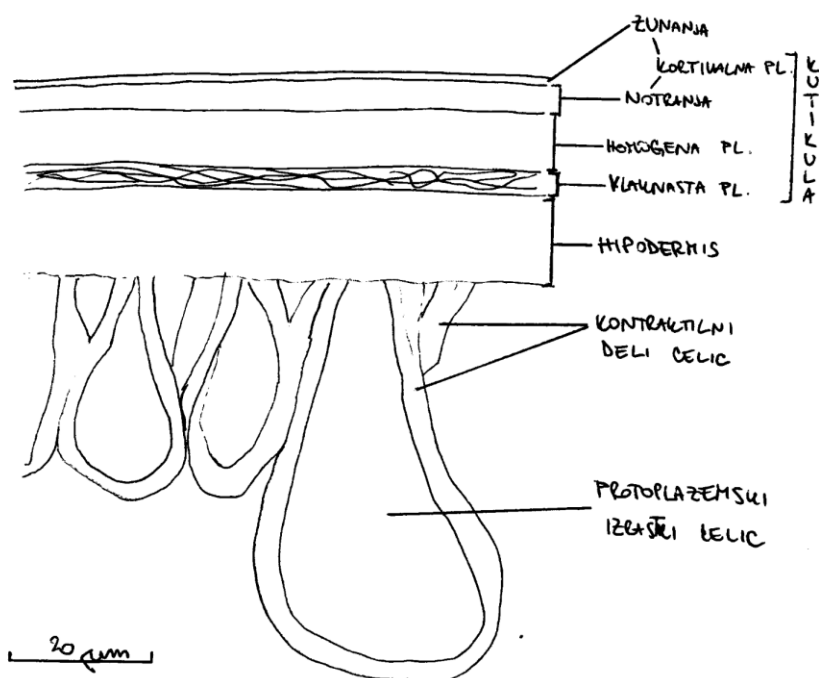
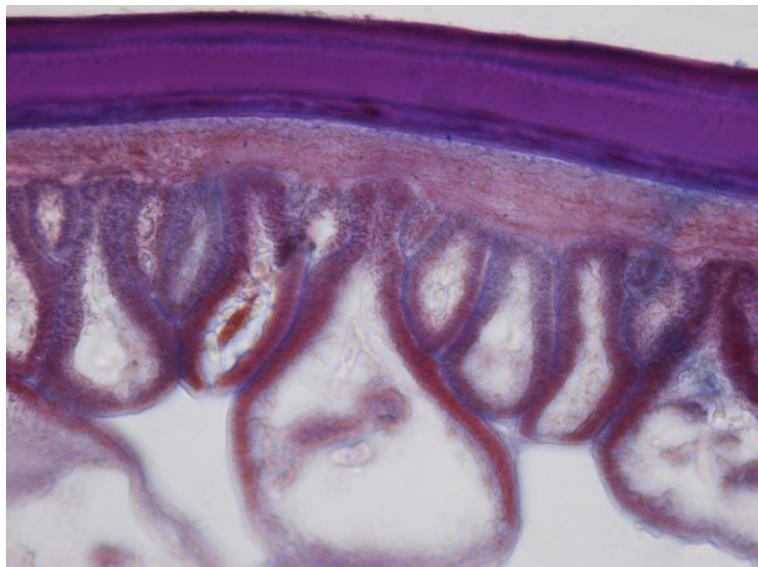
Pri številnih preparatih z večjimi povečavami prikažemo podrobnosti v tkivu: razporeditev in obliko celic, število slojev celic in podobno (Sliki 23 in 24). Skici tkiva pod manjšo (40x ali 100x povečavo) običajno dodamo eno ali več podrobnejših skic (pri 400x povečavi; Slika 25).



POVEČAVA: 400 X



Slika 23: Koža dlani – različni sloji epidermisa in dermalni papili z Meissnerjevim telescem pri 400x povečavi. Fotografija: Martina Lužnik. Skica: Živa Fišer.



Slika 24: Prečni prerez samice gliste (*Ascaris* sp.) pod 100x povečavo: prikazana je telesna stena (kutikula, hipodermis, epitelno-mišične celice). Fotografija in skica: Martina Lužnik.

2.3 PROTOKOLI

Na naslednji strani je primer pravilno urejenega in ustrezno označenega lista s skicami (Slika 25). Pazite, da na vsakem listu navedete: vaše ime in priimek, naslov vaje, datum; pri posameznem preparatu pa naslov slike vsebuje naziv preparata (lahko tudi številčno oznako preparata, a ni nujno), organizem, del telesa oz. tkiva, ki ga opazujete, ter povečavo, pri kateri preparat opazujete.

predmet: SPLOŠNA ZOOLOGIJA

vaja: VAJA 1 – MIKROSKOP IN MIKROSKOPIRANJE

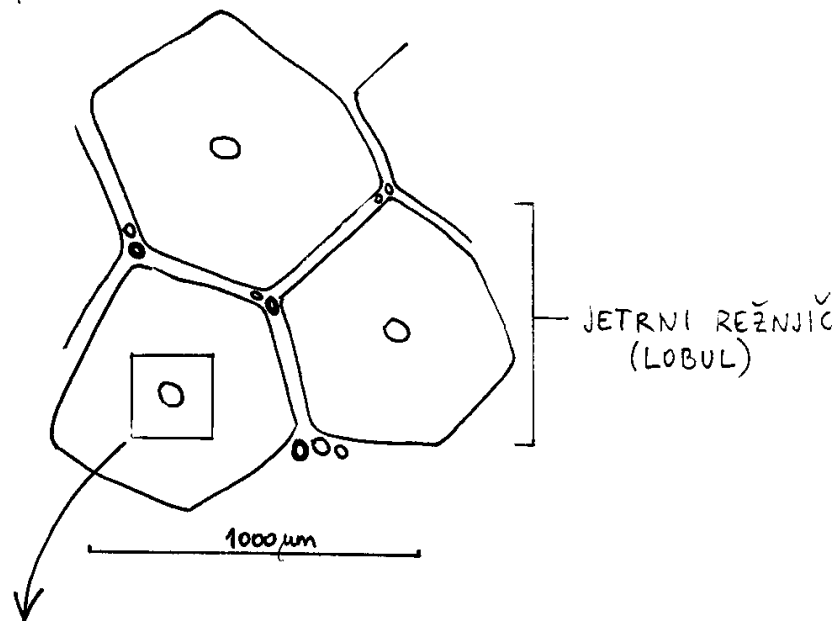
datum: 1. 10. 2024

študent/ka: _____

Jetra sesalca – prašiča (2416)

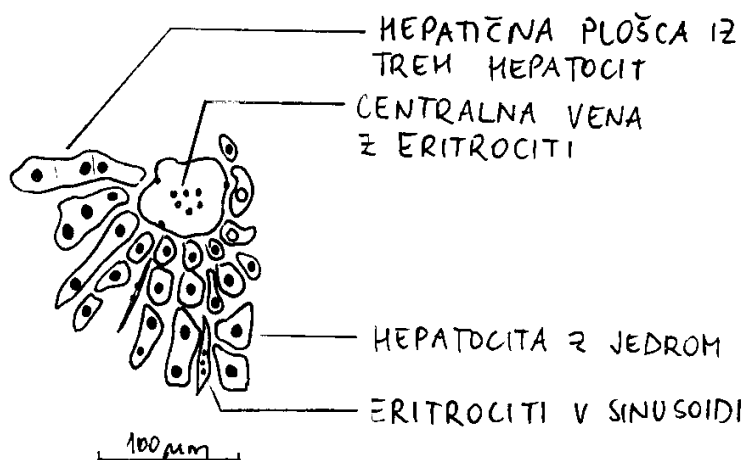
(Zapišemo, kaj gledamo, npr. vrsta živali, kateri organ ali tkivo, lahko tudi številka oznake preparata)

40 X POVEČAVA



Podrobna skica – narisana z navadnim svinčnikom, obvezno merilo!

400 X POVEČAVA



Slika 25: Pravilno izpolnjen protokol. Skici: Živa Fišer.

IZVLEČEK

Gradivo »Mikroskop, mikroskopiranje in osnove biološkega risanja« je sestavljeno iz dveh delov. V prvem delu je predstavljena zgradba in delovanje svetlobnega mikroskopa. Predstavljeni so tudi koncepti v mikroskopiranju, kot so numerična apertura, povečava, ločljivost, globinska ostrina in napake. Opisu svetlobnega mikroskopa sledi opis priprave mikroskopskih preparatov. Ob koncu prvega dela so opisani tudi drugi tipi mikroskopov, kot sta na primer vrstični in presevni elektronski mikroskop.

V drugem delu so predstavljene osnove biološkega risanja. Na primerih je prikazano, kako rišemo objekte pri nizkih in visokih povečavah. Ob koncu je podan primer izdelanega protokola, ki študentom služi v pomoč pri pripravi svojih protokolov pri različnih predmetih.

UPORABLJENA LITERATURA IN VIRI

- A level biology drawing skills: Biological Drawing. OCR Oxford Cambridge and RSA. <https://www.ocr.org.uk/Images/251799-biology-drawing-skills-handbook.pdf>
- Dempsey BC, Betz BJ. 2001. Biological Drawing - A Scientific Tool for Learning. The American Biology Teacher. 63(4): 271-279.
- Susiyawati E. 2017. University Students' Ability to Interpret Visual Representations in Plant Anatomy. Doctoral Thesis. Cutin University.
- Weekes H. 2005. Drawing Students Out: Using sketching exercises to hone observation skills. The Science Teacher, 72(1): 34-37.
- Ghiran Ionita C. 2011. Introduction to Fluorescence Microscopy. V: Light Microscopy. Methods and Protocols. Chiarini-Garica Helio & Melo Rossana C.N. (Eds). Humana Press. Springer New York Dordrecht Heidelberg London. 244 str.
- Kapitza H.G. 1997. Microscopy from the very beginning. Carl Zeiss, Jena, Germany. 44 str.
- Leica Microsystems. 2006. The Theory of the Microscope. Wetzlar, Germany. 19 str.
- Peterson Larry R., Peterson Carol A., Melville Lewis H. 2008. Teaching Plant Anatomy Through Creative Laboratory Exercises. NRC Press. Ottawa, Ontario, Canada. 164 str.
- www.jeolusa.com
- www.leica-microsystems.com
- <https://myscope.training>

Viri uporabljenih slik

- Slika 3: Vir: FDomenic
(<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MicroscopesOverview.svg#/media/File:MicroscopesOverview.svg/2>)
- Slika 4: Vir: Michael W. Davidson (<https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/numerical-aperture>).
- Slika 6: Alex1ruff
(https://en.wikipedia.org/wiki/Depth_of_field#/media/File:Dof_blocks_f22.jpg)
- Slika 7: Mglg
(https://en.wikipedia.org/wiki/Spherical_aberration#/media/File:Spherical_aberration_2.svg).
- Slika 8: Bob Mellish
(https://en.wikipedia.org/wiki/Chromatic_aberration#/media/File:Chromatic_aberration_lens_diagram.svg)
- Slika 10: Peterson Larry R., Peterson Carol A., Melville Lewis H. 2008. Teaching Plant Anatomy Through Creative Laboratory Exercises. NRC Press. Ottawa, Ontario. 164 str.
- Slika 13: <https://www.wikihow.com/Use-a-Microscope>
- Slika 14: Henry Mühlpfordt
(https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_microscope#/media/File:FluorescenceFilters_2008-09-28.svg)
- Slika 17: David J Morgan.
(https://en.wikipedia.org/wiki/Microscope#/media/File:Electron_Microscope.jpg).

SEZNAM PRIPOROČENE LITERATURE ZA ŠTUDIJ

- Paddock S.W. 2018. Microscopy. V: Wilson and Walker's Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 8th Edition. Eds: Hofmann A., Clokie S. Cambridge University Press. Str. 381-423.