

Εργαστηριακή Άσκηση: Μικροσκόπηση – Αρχές Λειτουργίας Μικροσκοπίου

Τάξη/τμήμα: _____

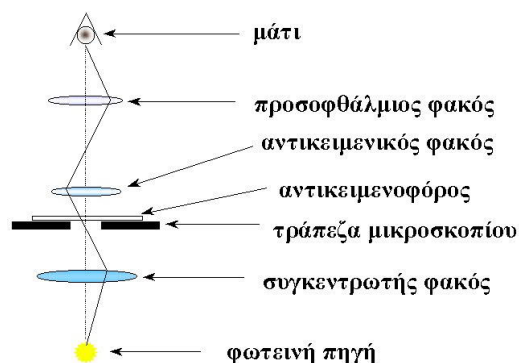
Ημερομηνία: ____/____/____

Όνομα ομάδας: _____

Μέλη ομάδας: _____

A1. ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ - Μικροσκοπία

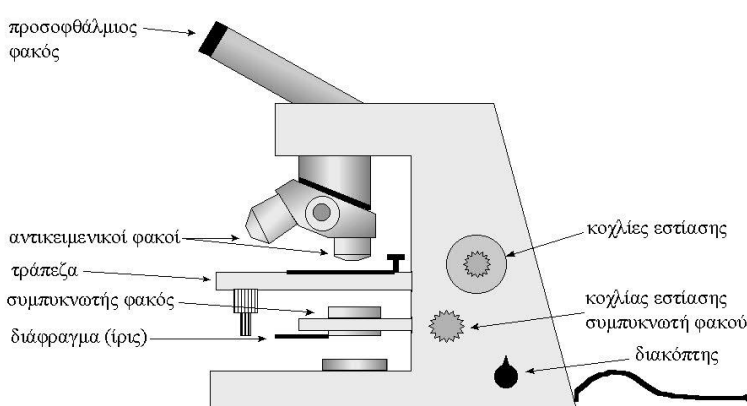
Το μικροσκόπιο επινοήθηκε το 1590 και κατά το 17^ο αιώνα βελτιώθηκε. Το πιο συνηθισμένο, αυτό που βρίσκεται και στις αίθουσες σχολικών ή πανεπιστημιακών εργαστηρίων, είναι το οπτικό μικροσκόπιο (ΟΜ). Η αρχή λειτουργίας του ΟΜ στηρίζεται στην παρατήρηση ενός δείγματος μέσα από το οποίο διέρχεται φως. Στη συνέχεια το φως διαθλάται μέσα από σύστημα φακών, και το είδωλό του δείγματος μεγεθύνεται πριν αυτό φτάσει στο μάτι (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Λειτουργία οπτικού μικροσκοπίου.

Τα σημαντικότερα τεχνικά χαρακτηριστικά ενός μικροσκοπίου είναι η **μεγεθυντική ικανότητα** και η **διακριτική ικανότητα ή ανάλυση**. Η μεγέθυνση αφορά το μέγεθος της εικόνας που φθάνει τελικά στο μάτι μας, ως προς το κανονικό μέγεθος του αντικειμένου. Η ανάλυση αφορά το μέτρο της ευκρίνειας της εικόνας και ορίζεται ως η ελάχιστη απόσταση μεταξύ δύο σημείων, που μας επιτρέπει να τα διακρίνουμε και να τα αναγνωρίσουμε ως δύο χωριστά σημεία.

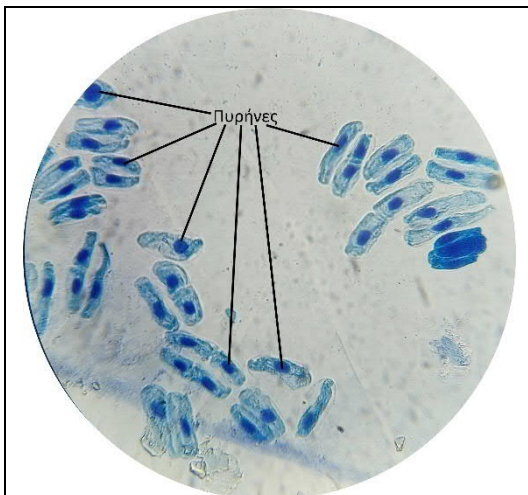
Στη διαδικασία μεγέθυνσης σημαντικό ρόλο παίζουν δύο κατηγορίες φακών: οι **προσοφθάλμιοι** και οι **αντικειμενικοί** (Εικόνα 2). Στα εργαστηριακά μικροσκόπια που χρησιμοποιούνται για εκπαιδευτικούς σκοπούς ο προσοφθάλμιος μεγεθύνει το δείγμα 10 φορές (10X), ενώ ο καθένας από τους τέσσερις αντικειμενικούς, 4X, 10X, 40X, 100X, το μεγεθύνει κατά 4, 10, 40 και 100 φορές αντίστοιχα. Η τελική μεγέθυνση στην οποία τελικά παρατηρείται το δείγμα, προκύπτει αν πολλαπλασιάσουμε τη μεγέθυνση του προσοφθάλμιου με τη μεγέθυνση του αντίστοιχου αντικειμενικού. Για παράδειγμα, αν χρησιμοποιούμε το δεύτερο αντικειμενικό (10X) τότε η συνολική μεγέθυνση θα είναι: $10 \times 10 = 100$ φορές. Άρα, η μέγιστη μεγέθυνση ενός οπτικού μικροσκοπίου είναι $10 \times 100 = 1000$ φορές.



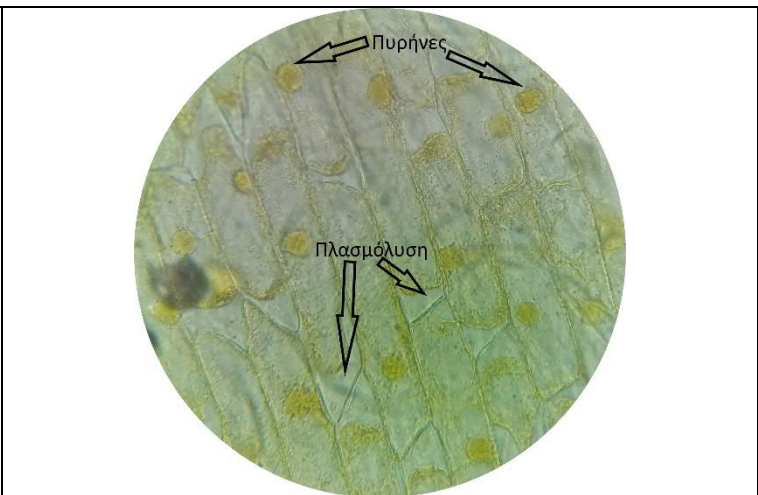
Εικόνα 2. Βασικά μέρη ενός οπτικού μικροσκοπίου

Τρίτη σημαντική παράμετρος στη μικροσκοπία είναι η **αντίθεση**, δηλαδή η ενίσχυση της οπτικής διαφοράς ανάμεσα στα διάφορα συστατικά του δείγματος. Οι περισσότερες τεχνικές βελτιώσεις στην οπτική μικροσκοπία των τελευταίων εκατό χρόνων αφορούν αυτή ακριβώς την παράμετρο, δηλαδή την ενίσχυση της αντίθεσης και επομένως την ικανότητα διάκρισης των διαφόρων συστατικών. Για την παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων χρησιμοποιούνται ορισμένες μη τοξικές χρωστικές ουσίες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να χρωματίζουν συγκεκριμένα κύτταρα ή ενδοκυτταρικά στοιχεία. Η διαφορετική χημική σύσταση των διαφορετικών κυτταρικών στοιχείων προκαλεί τη διαφορετική

συμπεριφορά τους απέναντι στην ίδια χρωστική, με αποτέλεσμα αυτά να χρωματίζονται διαφορετικά. Οι χρωστικές διακρίνονται χημικά σε δύο κατηγορίες, στις *βασικές ή κατιονικές* και στις *όξιμες ή ανιονικές*. Σε μια βασική χρωστική η χρωμοφόρος ομάδα είναι θετικά φορτισμένη, άρα συνδέεται ισχυρά με συστατικά που είναι αρνητικά φορτισμένα (όπως για παράδειγμα το DNA και τα χρωμοσώματα του πυρήνα) (Εικόνα 3). Τέτοια βασική χρωστική είναι το μπλε του μεθυλενίου. Από την άλλη, το Lugol (ένα διάλυμα με ιωδιούχο κάλιο) δεν έχει χρωμοφόρες ομάδες, αλλά χρησιμεύει ως μικροχημικός δείκτης, γιατί εμφανίζει αποτέλεσμα (χρωματίζει έντονα το κυτταρόπλασμα) (Εικόνα 4). Επιπλέον το Lugol χρησιμοποιείται ως χρωματικός δείκτης για την ανίχνευση του αμύλου.



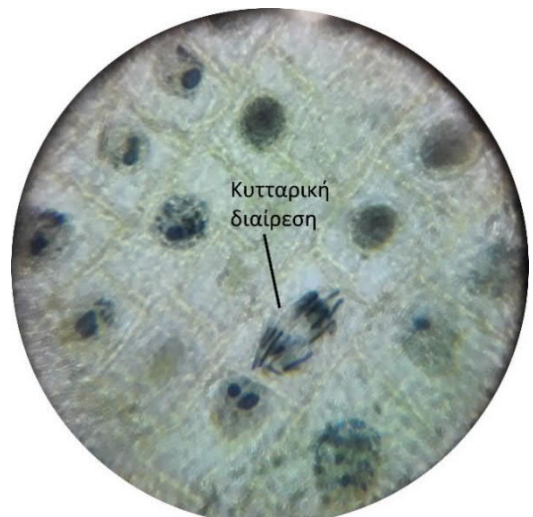
Εικόνα 3. Χρώση φυτικών κυττάρων (κύτταρα μεριστώματος κρεμμυδιού) με μπλε του μεθυλενίου. Χαρακτηριστική επιλεκτική χρώση των πυρήνων.



Εικόνα 4. Χρώση φυτικών κυττάρων (κύτταρα επιδερμίδες κρεμμυδιού) με Lugol. Παρατηρήστε τους πυρήνες και τα σημεία όπου το κυτταρόπλασμα έχει συρρικνωθεί και υπάρχει κενός χώρος λόγω του φαινομένου της πλασμόλυσης.

Καθώς οι χρωστικές χρωματίζουν μόρια του κυττάρου όταν αυτά εμπλέκονται σε κάποια βιολογική διεργασία, μπορούμε να παρατηρήσουμε τη σχετική διεργασία. Για παράδειγμα, η χρώση με μπλε του μεθυλενίου φυτικών κυττάρων του μεριστώματος που διαιρούνται, επιφέρει χρωματισμό των χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση της μίτωσης (κυτταρική διαίρεση) (Εικόνα 5).

Στη δεκαετία του 1950, έγινε η μεγάλη πρόοδος στην κυτταρική βιολογία με την έλευση το ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (ΗΜ). Στην περίπτωση αυτή δεν χρησιμοποιείται φως, αλλά δέσμη ηλεκτρονίων που είτε διέρχεται μέσα από το δείγμα είτε πέφτει πάνω στην επιφάνειά του. Με αυτό το μικροσκόπιο η μεγέθυνση μπορεί να ξεπεράσει τις 500.000 φορές.



Εικόνα 5. Στάδια μίτωσης σε μεριστωματικά κύτταρα.

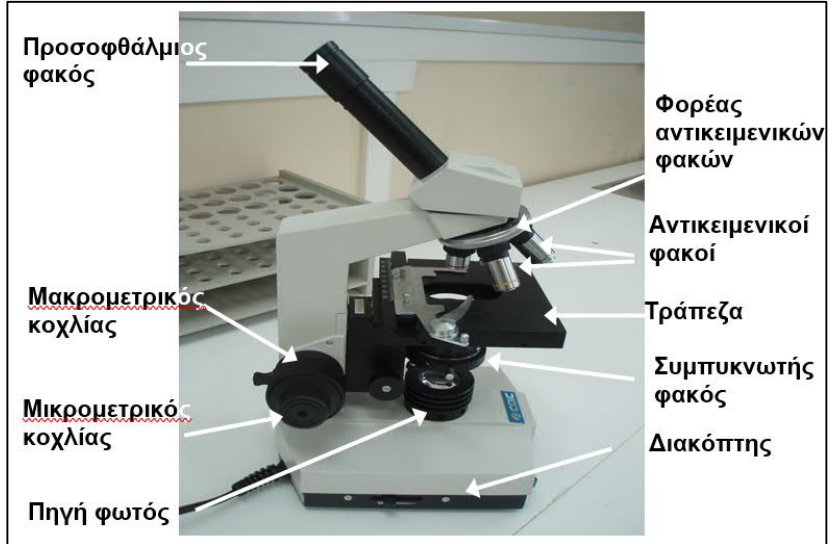
Α2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ – Αρχές μικροσκοπίας

Εστιάσετε, αρχίστε την παρατήρηση σας ξεκινώντας από τη μικρότερη μεγέθυνση (4X) και προχωρώντας προς τη μεγαλύτερη. Μετακινήστε το παρασκεύασμα για να δείτε κύτταρα σε μεγαλύτερο εύρος. Η συνολική μεγέθυνση αυτού που βλέπετε υπολογίζεται από το γινόμενο της μεγέθυνσης του

προσοφθάλμιου φακού (που είναι πάντα 10X) και των διαφόρων αντικειμενικών (4X, 10X, 40X). ΜΗΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΕ ΤΟΝ 4° ΦΑΚΟ (100X), ΘΑ ΚΑΤΑΣΤΡΑΦΕΙ, ΚΑΘΩΣ ΘΕΛΕΙ ΕΙΔΙΚΗ ΠΡΟΕΡΓΑΣΙΑ ΓΙΑ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΕΙ.

Β. ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ

1. Κατεβάστε την τράπεζα χρησιμοποιώντας τον μακρομετρικό κοχλία. Βάλτε τον μικρότερο αντικειμενικό περιστρέφοντας τον φορέα αντικειμενικών φακών. Τοποθετήστε την αντικειμενοφόρο στην τράπεζα και στερεώστε την με το έλασμα.
2. Πατήστε τον διακόπτη για να ανάψει η λάμπα του μικροσκοπίου. Ρυθμίστε τη φωτεινότητα περίπου στη μέση. Κεντραρίστε το δείγμα σας με τους κάθετους κοχλίες. Ανεβάστε την τράπεζα με τον μακρομετρικό μέχρι, λίγο πριν το δείγμα έρθει σε επαφή με το φακό (Δεν "βάζουμε" δύναμη).
3. Κοιτάξτε από τον προσοφθάλμιο και κατεβάστε την τράπεζα ελαφρώς, αν χρειάζεται για να εστιάσετε. Διορθώστε την εστίαση, αν χρειάζεται, με τον μικρομετρικό κοχλία. Σχεδιάστε τις δομές που φαίνονται στο οπτικό σας πεδίο (ΟΠ).
4. Βάλτε την αμέσως μεγαλύτερη μεγέθυνση περιστρέφοντας τον φορέα των αντικειμενικών φακών. Επαναλάβετε τα βήματα 1, 2, 3. Αν χάσετε το δείγμα από το οπτικό σας πεδίο (ΟΠ), θα πρέπει να ξεκινήσετε πάλι από την αρχή χρησιμοποιώντας τον μικρότερο φακό.



Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

1° Πείραμα: Εστιάστε και Παρατηρήστε το χαρακτήρα ενός γράμματος από ένα κείμενο. Για διευκόλυνση, μπορείτε να κόψετε ένα μικρό, μη συμμετρικό γράμμα από ένα κείμενο και να παρατηρήσετε το χαρακτήρα.


 Επιλέξτε ένα οπτικό πεδίο (ΟΠ) και σχεδιάστε αυτό που παρατηρείτε.

Μεγέθυνση Προσοφθάλμιου: _____

Μεγέθυνση Αντικειμενικού: _____

Τελική μεγέθυνση Παρατήρησης: _____

2° Πείραμα: Εστιάστε και Παρατηρήστε τα pixels¹ στην οθόνη του κινητού σας.

 Επιλέξτε ένα οπτικό πεδίο (ΟΠ) και σχεδιάστε αυτό που παρατηρείτε.

Μεγέθυνση Προσοφθάλμιου: _____

Μεγέθυνση Αντικειμενικού: _____

Τελική μεγέθυνση Παρατήρησης: _____


¹ Εικονοστοιχείο ή pixel (ακρωνύμιο του αγγλικού *picture element*, στοιχείο εικόνας) είναι ένα «σημείο» μιας εικόνας που εμφανίζεται στην οθόνη ενός υπολογιστικού συστήματος, δηλαδή, για το υπολογιστικό σύστημα, ένα δείγμα πληροφορίας. Στον υπολογιστή η εικόνα αναπαριστάται υπό τη μορφή «ψηφιδωτού». Το εικονοστοιχείο είναι, απλά, μια ψηφίδα του ψηφιδωτού αυτού και, ως εκ τούτου, θεωρείται ως το μικρότερο πλήρες δείγμα μιας εικόνας. Στην οθόνη ενός υπολογιστή οι εικόνες αναπαρίστανται με «υποδιαίρεση» της οθόνης σε ένα δισδιάστατο πίνακα με στήλες και γραμμές. Κάθε «κελί» σε ένα τέτοιο πίνακα είναι ένα εικονοστοιχείο. Ο αριθμός των υποδιαίρεσεων είναι επαρκώς μεγάλος, τόσο ώστε το ανθρώπινο μάτι να μη μπορεί να διακρίνει το ένα εικονοστοιχείο από το άλλο και να βλέπει την εικόνα ενιαία. Η ανάλυση ενός μέσου μπορεί να εκφραστεί σε εικονοστοιχεία ανά μονάδα μήκους, για παράδειγμα 2400 πίξελ ανά ίντσα (ppi). Όσο περισσότερα είναι τα εικονοστοιχεία που χρησιμοποιούνται για να αντιπροσωπεύσουν μια εικόνα, τόσο πιο πολύ το αποτέλεσμα μοιάζει με το πραγματικό. Ο αριθμός εικονοστοιχείων σε μια εικόνα καλείται μερικές φορές ανάλυση, αν και η έννοια αυτή έχει πιο συγκεκριμένο ορισμό (Πηγή: Βικιπαίδεια).

Δοκιμάστε να παρατηρήσετε σημεία της οθόνης με διαφορετικά χρώματα (άσπρο, κόκκινο, πράσινο κ.α.), μετακινώντας ελαφρώς το κινητό με το χέρι σας πάνω στην τράπεζα. Τι παρατηρείτε; Πώς το εξηγείτε;

Δοκιμάστε να παρατηρήσετε τις οθόνες από διαφορετικές μάρκες κινητών και εντοπίστε, αν υπάρχουν, διαφορές. Αν υπάρχουν, πού νομίζετε ότι οφείλονται;

3^ο Πείραμα: Παρατήρηση έτοιμου παρασκευάσματος.

Θα σας δοθεί ένα έτοιμο παρασκεύασμα.

 Επιλέξτε ένα οπτικό πεδίο (ΟΠ) και σχεδιάστε αυτό που παρατηρείτε.

Μεγέθυνση Προσοφθάλμιου: _____

Μεγέθυνση Αντικειμενικού: _____

Τελική μεγέθυνση Παρατήρησης: _____

Εκτιμάτε ότι το παρασκεύασμα έχει υποστεί επεξεργασία με χρωστική; Αν ναι, ποια μέρη βλέπετε να χρωματίζονται εντονότερα;
