

Mikroskoplaben

Optikk, preparering og celler under lupen

KM1 – Naturvitenskapelige praksiser

■ Leeuwenhoek og det lille dyret i tannbelegget

Antoni van Leeuwenhoek var en nederlandsk tøyhandler uten formell vitenskapelig utdanning. Men han hadde en enestående evne til å slipe glasslinser: hans beste enkeltlinsemikroskoper nådde forstørrelse på $\sim 270\times$, langt over noe annet på 1600-tallet.

I 1676 skrapte han tannbelegg fra sin egen munn, la det i litt vann og betraktet det under mikroskopet. Det han så forandret biologien for alltid: mikroorganismer. Han kalte dem 'animalcules' – små dyr. Han skrevet til Royal Society i London: 'Jeg har funnet i min munn levende skapninger i stort antall. Slike finnes etter min mening ikke i munnen av en herre.'

Royal Society var skeptisk og sendte en delegasjon til Nederland. Leeuwenhoek demonstrerte. De var overbevist. Mikrobiologien var født.

Mikroskopets prinsipper

Et mikroskop er et optisk instrument som forstørrer bilder av svært små objekter. Det grunnleggende prinsippet er lysbrytning: lysstråler bøyes når de passerer gjennom kurvede glassoverflater (linser). En konveks linse fokuserer lyset og lager et forstørret bilde.

Tabell 1: Viktige mikroskopbegreper

Begrep	Definisjon	Typiske verdier
Forstørrelse	Forholdet mellom bildestørrelse og objektstørrelse	Okulær: $10\times$; Objektiv: $4\text{--}100\times$; Total: $40\text{--}1000\times$
Oppløsningsevne	Minste avstand mellom to punkter som kan skilles	Lysmikroskop: $\sim 200\text{ nm}$; Elektronmikroskop: $<1\text{ nm}$
Arbeidsdistanse	Avstand fra objektivlinse til preparatoverflate	Lavt objektiv: cm; Oljeimmersjon: mm
Dybde av felt	Tykkelse av plan der preparatet er skarpt	Minker med okt forsterkning

Lysmikroskopets oppbygning

Et moderne biologisk lysmikroskop har: **lyskilde** (LED eller halogen) → **kondensor** (samlers lys mot preparat) → **objektglass** med preparat → **objektivlinser** ($4\times$, $10\times$, $40\times$, $100\times$ oljeimmersjon)

→ **tubus** → **okulærlinse** (10× eller 15×). Total forstørring = objektiv × okulær.

Lysmikroskopets grunnleggende begrensning er bølgelengden til synlig lys (400–700 nm). To punkter nærmere hverandre enn ~200 nm kan ikke skilles – det er diffraksjonsgrensen. Dette er grunnen til at celler (~10 µm) vises godt, men ribosom (~25 nm) og DNA-dobbeltspiralen (~2 nm) er usynlige.

Preparering og farging

De fleste biologiske prøver er fargeløse og gjennomsiktige. Farging gjør strukturer synlige. Hematoxylin og eosin (H&E;) er standardfarging i histologi: hematoxylin farger cellekjerne blå, eosin farger cytoplasma og bindevev rosa. Gram-farging skiller bakterier i gram-positive (blå-lilla) og gram-negative (rød-rosa).

■ Forberedelse av et våtpreparat – steg for steg

1. Legg en dråpe prøvemateriale midt på et rent objektglass
2. Legg et dekkglass i 45° vinkel mot dråpen og senk forsiktig ned
3. Unngå luftbobler – de ses som runde, mørke ringer
4. Fjern overflødig væske med filterpapir langs kanten
5. Start med laveste forstørring (4×), fokuser gradvis
6. Bruk grovfokus (stor ratt) for grovinstilling, finfokus (liten ratt) for skarp bilde

Celler under mikroskopet

Under lysmikroskopet kan vi se: cellekjerne (nucleus), cellemembran, cytoplasma, vakuoler (store i planteceller), kloroplaster (grønne, planteceller), cellevegg (planteceller, stiv) og mitokondriene (vanligvis for små til å se detaljer).

Tabell 2: Cellulære strukturer og synlighet

Struktur	Synlig i lysmikroskop?	Farge (ufarget)	Typisk størrelse
Cellekjerne	Ja	Mork/graablå	5–10 µm
Cellevegg (plante)	Ja	Blekgul	0,1–1 µm tykk
Kloroplast	Ja (grønn)	Grønn	5–8 µm
Vakuole (plante)	Ja	Klar	Opptil 90% av cellevolum
Mitokondrier	Knapt	Svakt	1–10 µm (avlang)
Ribosom	Nei	–	25 nm
DNA-trad	Nei	–	2 nm i diameter

■ *Hookes Micrographia og loppen som forandret verden*

I 1665 publiserte Robert Hooke en av historiens vakreste vitenskapelige bøker: Micrographia. Han brukte et sammensatt mikroskop (objektivlinse + okulærlinse) og laget detaljerte tegninger av det han så. En loppe som fylte en hel side. Et nåleøye som avslørte sin ru, ujevne karakter. En flue-øye med hundrevis av enkeltlinser. Kork som bestod av ruteformede strukturer – han kalte dem 'celler' etter munkerommene (cella = lite rom på latin).

Hooke var ikke klar over at cellene han så var cellevegger til døde celler. Levende celler med kjerne og organeller ble ikke beskrevet fore Leeuwenhoek. Men 'celle' som begrep stammer fra Hooke – ett ord som definerte biologien.

Elektronmikroskopi

Elektronmikroskop bruker elektroner i stedet for lys. Siden elektroner har langt kortere bølgelengde enn lys, er oppløsningsevnen dramatisk bedre. Transmisjonselektronmikroskop (TEM) sender elektroner gjennom ultratynt snitt og gir oppløsning ned til 0,1 nm – atomer er synlige. Sveipeelektronmikroskop (SEM) avbilder overflater i tre dimensjoner.

■ **Forsøk 1: Observer planteceller i løk-epidermis**

Mål: Identifisere typiske planteceller med cellevegg, vakuole og cellekjerne.

Utstyr: Løk (rød er best for kontrast), pinsett, objektglass, dekkglass, jodoppløsning, mikroskop.

Fremgangsmåte:

- Bryt en løk og bruk pinsett til å trekke av det tynne gjennomsiktige skallet (epidermis).
- Legg et lite stykke på objektglass med en dråpe vann.
- Tilsett 1–2 dråper jodoppløsning for å farge cellekjerne.
- Senk et dekkglass forsiktig ned. Bruk filterpapir på kanten.
- Observer på 10× og 40×. Tegn og merk: cellevegg, cellekjerne, vakuole.

Forventet resultat: Tydelige rektangulære celler med tykk cellevegg og store vakuoler. Jod farger cellekjerne brungule.

■ Forsøk 2: Observer dyreceller fra kinn-epithelet

Mål: Sammenligne dyreceller med planteceller – noter fraværet av cellevegg.

Utstyr: Trepinne eller bomullspinne, objektglass, dekkglass, metylenblåttoppløsning, mikroskop.

Fremgangsmåte:

- Skrap forsiktig innsiden av kinnet med en ren bomullspinne.
- Stryk materialet på objektglass og tilsett 1 dråpe metylenblått (farger kjerner blå).
- Legg dekkglass forsiktig ned. La fargen virke 1 minutt.
- Observer på 10× og 40×. Sammenlign med plantecellene.
- Tegn og merk: cellekjerne, cellemembran (merk: ingen cellevegg!), cytoplasma.

Forventet resultat: Uregelmessige, flate celler uten cellevegg. Kjerne tydelig farget blå. Kontrast til plantecellenes stive firkanter.

■ Forsøk 3: Observer bakterier i tannbelegg

Mål: Observere mangfoldet av mikroorganismer i munnhulen – hyll Leeuwenhoeks oppdagelse.

Utstyr: Tannpirker/trespatel, objektglass, kristallfiolett (gram-farging) eller metylenblått, mikroskop.

Fremgangsmåte:

- Skrap forsiktig litt tannbelegg med en tannpirker.
- Utstryk tynt på et objektglass. La det lufttørke.
- Varmfikser: hold glasset over en flamme 2–3 sekunder (preparatet skal ikke bli for varmt).
- Tilsett kristallfiolett i 1 minutt, skyll. Observer.
- Identifiser former: kokker (runde), basiller (stavformede), spiriller (spiral).

Forventet resultat: Tannbelegg inneholder et rikt mikrobielt samfunn. Ulike former synlig. Leeuwenhoeks oppdagelse gjenspekt.

■ Oppgaver

■ Oppgave 1 (basis)

Hva er forskjellen mellom forstørrelse og oppløsningsevne? Forklar med egne ord og gi et eksempel.

■ Oppgave 2 (basis)

Et mikroskop har objektiver merket 4×, 10× og 40×, og okulær merket 10×. Hva er de tre mulige totalforstørrelse?

■ Oppgave 3 (basis)

Forklar steg for steg hvordan du lager et godt våtpreparat for mikroskopiering.

■ Oppgave 4 (middels)

Sammenlign plante- og dyreceller slik de ses i lysmikroskop. Hvilke strukturer har bare planteceller? Hva er formålet med disse strukturene?

■ Oppgave 5 (middels)

Lysmikroskopets oppløsningsgrense er ~200 nm. Forklar diffraksjonsgrensen og beregn: hvis et ribosom er 25 nm og et virus er 100 nm – kan disse ses i lysmikroskop?

■ Oppgave 6 (middels)

Forklar prinsippet bak elektronmikroskopi (TEM). Hvilken informasjon gir TEM som lysmikroskopi ikke kan gi?

■ Oppgave 7 (avansert)

Gram-farging deler bakterier i gram-positive og gram-negative. Forklar den kjemiske årsaken til dette (cellevegg-komposisjon), og diskuter den kliniske betydningen: hvorfor er det viktig å vite om en infeksjonsbakterie er gram-positiv eller gram-negativ?

■ Oppgave 8 (avansert)

Fluorescensmikroskopi bruker fluorescerende fargestoffer koblet til spesifikke antistoffer. Forklar prinsippet og diskuter: hva kan FRET (Förster Resonance Energy Transfer) mikroskopi si oss som ordinær fluorescens ikke kan?

■ Oppsummering

Viktige punkter fra dette kapitlet:

- Lysmikroskop: forstørring 40–1000×, oppløsning ~200 nm. Begrensning: lysets bølgelengde.
- Oppbygning: lyskilde → kondensor → preparat → objektiv → okulær.
- Preparering: våtpreparat, fiksering, farging. H&E-farging; er standard i histologi.
- Planteceller: cellevegg, vakuol, kloroplast (synlig). Dyreceller: uten cellevegg.
- Elektronmikroskop (TEM/SEM): elektroner i stedet for lys → oppløsning til 0,1 nm.
- Leeuwenhoek (1676): oppdaget mikroorganismer i tannbelegg. Mikrobiologiens far.
- Hooke (1665): oppdaget celler i kork. Begrepet "celle" stammer fra Micrographia.