

CVIČENÍ Z BUNĚČNÉ BIOLOGIE

1. SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE A PREPARÁTY V MIKROSKOPII

TEORETICKÝ ÚVOD:

Mikroskopie je základní metoda, která nám umožňuje pozorovat velmi malé biologické objekty. Díky mikroskopu můžeme vidět vnitřní strukturu a detaily preparátů, jež lidské oko není schopné zachytit. Světelný mikroskop využívá k ozáření preparátů viditelné světlo, proto se také řídí zákony optiky. Je to výhoda, co se týká ceny a dostupnosti. Ovšem velkým omezením je právě složení viditelného světla a jeho vlnová povaha, kdy se jedná o celé spektrum záření s různými vlnovými délkami.

Na vlnové délce použitého světla a také na objektivu závisí rozlišovací schopnost mikroskopu. Jedná se o důležitou vlastnost mikroskopu. Rozlišovací schopnost je definována jako nejmenší vzdálenost dvou bodů, které jsme schopni ještě rozlišit jako dva samostatné objekty. Udává ji numerická apertura (N_A). Lidské oko má rozlišovací mez 0,2 mm, naproti tomu světelný mikroskop v řádech mikrometrů. Nejvyššího rozlišení dosahují mikroskopy elektronové, které mají rozlišovací schopnost v řádech nanometrů, tedy na úrovni krystalických mřížek kovů. Ve světelném mikroskopu jsme tedy schopni pozorovat preparáty na úrovni buněk, případně některé větší buněčné orgány, zatímco elektronový mikroskop umožňuje zobrazení nitrobuněčných struktur.

Kvalitu obrazu v neposlední řadě ovlivňuje i clonění. Kontrast, hloubka ostroty a rozlišení podrobností jsou vlastnosti, které závisí na správném zaclonění preparátu. Pozorování pomocí mikroskopu je tedy jakýmsi kompromisem. Měli bychom dosáhnout požadovaného zvětšení při ideální hloubce ostroty a rozlišení s vysokým kontrastem.

Základní pojmy a vztahy:

- Vlnová délka (λ):
 - vzdálenost dvou nejbližších bodů vlnění kmitajících ve stejné fázi

- Index lomu (n):
 - optická hustota prostředí mezi objektivem a preparátem ($n > 1,00$)
 - $n = c/v$
 - (c ... rychlost světla ve vakuu, v ... rychlost světla o určité vlnové délce ve zkoumaném prostředí)
- Numerická apertura (N_A):
 - $N_A = n \cdot \sin \alpha$
 - (n ... index lomu prostředí, α ... vstupní úhel paprsků do objektivu)
- Rozlišovací schopnost (a):
 - $a = 0,61 \cdot \lambda / n \cdot \sin \alpha$
 - (λ ... vlnová délka světla, n ... index lomu prostředí, α ... polovina otvorového úhlu kužele paprsků, které mohou vstoupit do objektivu)

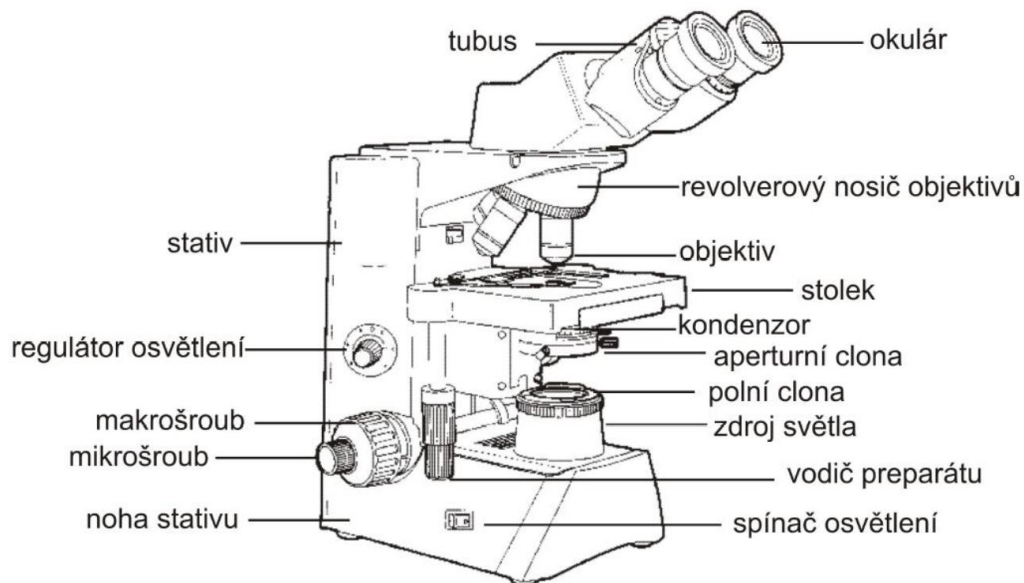
Stavba mikroskopu (Obr. 1):

Přístroj má části mechanické, osvětlovací a optické. Celou kostru mikroskopu tvoří stativ s masivní nohou zajišťující stabilitu. Na něj je upevněn stolek nesoucí svorky k uchycení preparátu s křížovým posuvem. Rameno stativu nese nahoře tubus s okuláry a dole revolverové zařízení s objektivy. Pro hrubé zaostření nám slouží makrometrický šroub, doostřujeme mikrošroubem.

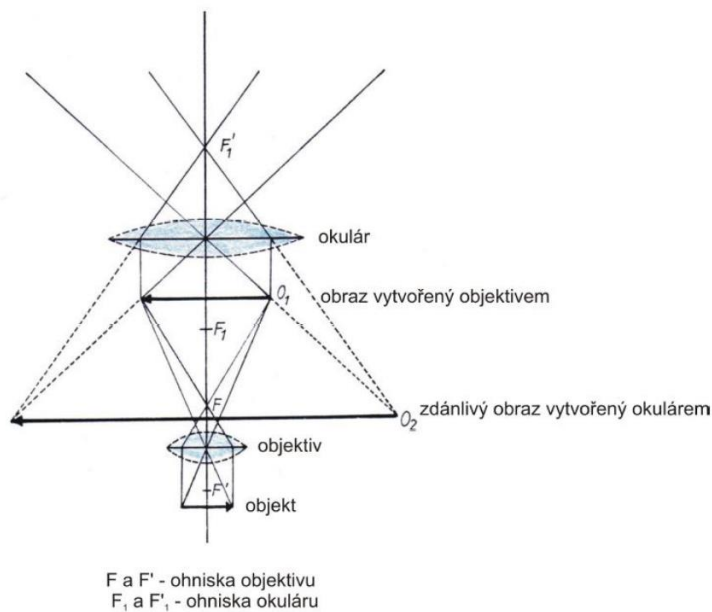
Nedílnou součást každého mikroskopu tvoří osvětlovací zařízení. To nejjednodušší je otáčivé zrcátko. Školní mikroskopy jsou vybaveny lampou s kolektorovou čočkou. Nad lampou se nachází polní clona, aperturní irisová clona regulující množství procházejícího světla a kondenzor. Ten vytváří širší kužel paprsků směřovaných na preparát, čímž zajišťuje jeho lepší prosvětlení.

Nejdůležitější úlohu hraje optika. Mikroskop je tvořen dvěma soustavami čoček (objektiv a okulár). Blíže preparátu je objektiv. Jedná se o soustavu čoček, jež vytváří skutečný, ale převrácený obraz pozorovaného objektu. Rozlišujeme objektivy suché a imerzní. Imerzní olej vyplňuje prostor mezi objektivem a preparátem (tam, kde je u suchých objektivů vzduch). Zamezuje ztrátám světla, paprsky procházející preparátem jsou směřovány přímo do objektivu.

Dále pozorujeme obraz přes okulár jako lupou. Výsledný obraz pozorovaný světelným mikroskopem je neskutečný, převrácený a zvětšený (Obr. 2).



Obr. 1: Stavba světelného mikroskopu.



Obr. 2: Konstrukce vzniku obrazu ve složeném mikroskopu.

Úkol č. 1: Pozorování tištěného písmene

Pomůcky: nůžky, automatická pipeta + špičky, světelný mikroskop + mikroskopické potřeby

Postup:

1. Z novin vystříhnete libovolné písmeno.
2. Vložte do kapky vody na podložním skle a přikryjte krycím sklíčkem.
3. Pozorujte nejdříve pouhým okem a obraz zakreslete.
4. Vložte preparát pod mikroskop a pozorujte písmeno při malém zvětšení, obraz zakreslete.
5. Oba pozorované obrazy porovnejte a pozorované skutečnosti vysvětlete. Poznamenejte si také hodnoty zvětšení objektivu a okuláru. Sledujte, jakým směrem se pohybuje obraz při posunu preparátem po stole mikroskopu.

Úkol č. 2: Pozorování buněk cibule kuchyňské

Materiál: cibule kuchyňská (*Allium cepa*)

Pomůcky: pinzeta, skalpel, automatická pipeta + špičky, světelný mikroskop + mikroskopické potřeby

Postup:

1. Z vnitřní vyduté suknice cibule kuchyňské sloupněte pinzetou epidermis a skalpelem ji nařežte na kousky o rozměrech přibližně 5x5 mm.
2. Připravené kousky epidermis ihned vložte do kapky vody na podložním skle.
3. Přikryjte krycím sklíčkem a pozorujte.
4. Zakreslete do protokolu a запиšte zvětšení objektivu a okuláru.

Úkol č. 2: Pozorování vakuol cibule kuchyňské

Materiál: cibule kuchyňská (*Allium cepa*)

Chemikálie: 0,33% roztok neutrální červeně

Pomůcky: pinzeta, skalpel, automatická pipeta + špičky, světelný mikroskop + mikroskopické potřeby

Postup:

1. Z vnitřní vyduté suknice cibule kuchyňské sloupněte pinzetou epidermis a skalpelem ji nařežte na kousky o rozměrech přibližně 5x5 mm.
2. Připravené kousky epidermis ihned vložte do kapky neutrální červeně na podložním skle a inkubujte po dobu 20-30 minut.
3. Poté epidermis přeneste do kapky vody na podložním skle, přikryjte krycím sklíčkem a pozorujte.
4. Zakreslete do protokolu a zapište zvětšení objektivu a okuláru.

Otázky:

1. Jaká je vlnová délka části spektra viditelného světla? Jaké jsou vlnové délky ultrafialového a infračerveného záření? Schematicky porovnejte.
2. Proč je nezbytné při přípravě preparátů používat fixaci?
3. Jaká je funkce vakuol?

Použitá literatura:

Hejtmánek, M. (2001): Úvod do světelné mikroskopie.

Vymětalová, V. (2001): Laboratorní cvičení z biologie.

Klusoňová, H. *et* Lenčo, J. (2006): Praktická cvičení a otázky ze základů cytologie a genetiky.

Knoz, J. *et* Opravilová, V. (1992): Základy mikroskopické techniky.