

3. cvičení

Vlastnosti mikroskopovaných objektů, mikroskopické preparáty

Při studiu objektů za pomoci světelného mikroskopu je pozorujeme buď v odraženém nebo procházejícím světle. První možnost používáme např. u objektů víceméně neprůsvitných, u nichž nás zajímají jejich povrchové struktury (např. tělní přívěsky u hmyzu nebo charakter chlupů na listech rostlin), celkový tvar těla nebo počet objektů. Reflexní (odražené) osvětlení se také využívá při mikroskopické preparaci orgánů a tkání. Tzv. horním osvětlením jsou proto vybaveny běžně stereomikroskopy. Tam, kde nás zajímají struktury ležící uvnitř tkání či buněk, potřebujeme, aby světlo prošlo studovaným orgánem či tkání, tj. aby byla daná tkáň **průsvitná** a **průhledná**. To je splněno u některých jednobuněčných organismů a jednoduchých, spíše mladých orgánů mnohobuněčných organismů (např. u mladých kořenů rostlin). U mnohobuněčných organismů je ale často podmínka průhlednosti splněna jedině tehdy, je-li studovaný orgán nařezán na velmi **tenké řezy** nebo je jeho tloušťka zmenšena rozmáčknutím (**roztlakové preparáty**) nebo rozpadem tkáně na jednotlivé buňky (**maceraci**).

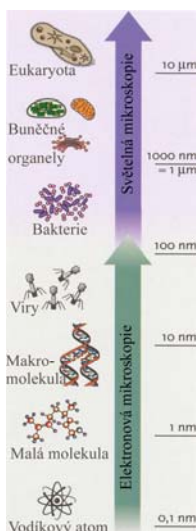
Aby byl studovaný objekt v mikroskopu vidět, musí mít **jiné optické vlastnosti než** jeho **okolí**, musí být kontrastní. Lidské oko je schopné zaznamenat změnu intenzity světla (amplitudy vlny) způsobenou interakcí světla s tělesem (**tělesa**, která takto interagují se světlem, se nazývají **amplitudová**), ale není schopné zaznamenat posun fáze světla po interakci s tělesem (taková **tělesa** se nazývají **fázová**). Některé orgány či organely mají jinou hustotu (např. buněčná stěna), obsahují různá barviva (např. chloroplasty) či inkrustace. Jiné, které se svými optickými vlastnostmi při průchodu bílého světla od svého okolí neodlišují (např. arbuskuly symbiotických hub v kořenech rostlin), se buď barví speciálními barvivy nebo se pozorují speciálními mikroskopickými technikami (viz 4. a 5. cvičení).

Další podmínkou, která musí být splněna, abychom mohli studovaný objekt pozorovat v mikroskopu, je jeho velikost. Ta musí být větší než **mez rozlišení mikroskopu**

$$d = (1,22 * \lambda) / (2 * NA_{obj})$$

Ve skutečnosti se na rozlišovací schopnosti mikroskopu podílí nejen objektiv, ale i kondenzor (určuje, kolik světla a pod jakým úhlem osvětluje preparát). Ve jmenovateli by tedy správně mělo být $NA_{obj} + NA_{kond}$

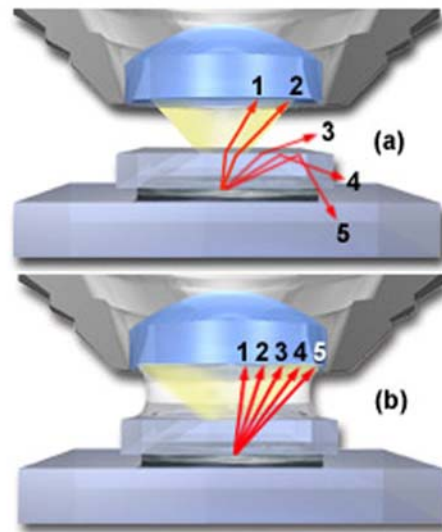
Viditelné světlo má vlnovou délku v rozsahu přibližně 400 až 700 nm. Při použití výkonných objektivů je jejich NA (při použití imerzního média) 1 – 1,4. Rozlišovací schopnost mikroskopů vybavených těmito objektivy dosahuje stovek nanometrů (při použití fialového světla se přiblížíme hranici 200 nm). Představu o tom, co můžeme vidět světelným mikroskopem a na co už světelný mikroskop nestačí, nám podává Obr. 41.



Obr. 41 (Kremer 2002)

Opakovaně se v textu mluví o **imerzním médiu** a nutnosti jeho použití u objektivů, případně kondenzorů, s numerickou aperturou větší než 1. Ale proč, co to znamená? Ve druhém cvičení jsme si vysvětlili pojem numerická apertura a víme, že závisí jednak na úhlu, pod kterým do optické soustavy může vstupovat světlo, jednak na indexu lomu prostředí, kterým světlo před vstupem do soustavy prochází (viz Obr. 26). Víme také, že

prostředí se mohou svým indexem lomu lišit (zatímco vzduch má index lomu téměř roven 1, sklo má index lomu 1,5 až 1,72). Pokud je mezi preparátem a objektivem vzduch, budou se paprsky při přechodu ze skla do vzduchu lámat od kolmice (z prostředí opticky hustšího do opticky řidšího). Některé z nich se odkloní natolik, že optickou soustavu objektivu minou, jiné, které na optické rozhraní krycího skla a vzduchu dopadnou hodně šikmo (nedosáhnou mezního úhlu), se odrazí zpět do skla (Obr. 42 a).



Obr. 42 (<http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/immersion.html>)

Pokud mezi preparát a objektiv vložíme médium o podobných optických vlastnostech jako má sklo (Obr. 42 b), nebude docházet k lomu paprsků a ty budou procházet rozhraním krycí sklo / imerzní médium / čočka objektivu přímo. Čočka objektivu tak zachytí širší kužel světla a tudíž i více informace o detailech v preparátu. Využití možnosti homogenního přechodu světla mezi preparátem a objektivem má smysl pro silnější objektivy (60x a více), které mají malou pracovní vzdálenost a velké světelné požadavky. Pro přesná měření a mikrofotografii se doporučuje použít imerzní médium nejen mezi krycí sklo a objektiv, ale i mezi horní čočku kondenzoru a podložní sklo.

Kromě nejběžnějšího imerzního oleje s indexem lomu 1.515 se pro některé objektivy používá jako imerzní médium voda ($n=1.33$) nebo glycerin ($n=1.47$). Pro speciální účely se v kombinaci se speciálními objektivy používají média s velmi vysokým indexem lomu (bromonaftalen, $n=1.66$, methylenjodid, $n=1.74$).

Při pozorování v mikroskopu musíme umístit sledovaný objekt přesně do určité vzdálenosti pod čelní čočku objektivu, abychom detaily viděli ostře. Přitom vidíme víceméně ostře detaily ležící v určitém rozsahu nad a pod vlastní zaostřenou rovinou. Tato oblast víceméně ostrého obrazu se nazývá **hloubka ostrosti**. Body ležící nad a pod oblastí viděnou ostře mohou působit rušivě nebo, dle svého charakteru (neprůsvitnost, neprůhlednost), mohou znemožňovat ostré vidění.

Příprava mikroskopických preparátů

Dostatečně tenké a průhledné biologické objekty, jako jsou např. prvoci, pohlavní buňky, buňky z tkáňových kultur, jedno a dvouvrstevné epitely a pokožky, lze sledovat zaživa (**in vivo**) v tzv. **nativních mikroskopických preparátech**. Ačkoli tak získáváme víceméně věrný obraz o stavbě biologických objektů, je třeba si uvědomit, že podmínky při mikroskopování jsou většinou pro sledovaný organismus či jeho část značně stresující (zahřívání zdrojem světla, nedostatek kyslíku atd.) a mohou vést k výskytu různých anomálií (artefaktů) nebo až ke smrti studovaného objektu. Prostředím, ve kterém objekty sledujeme, je buď voda nebo fyziologický roztok (v průběhu mikroskopování dbáme, aby tekutina nevyschla, případně ji doplňujeme). Ke zjištění fyziologického stavu buněk nebo jejich částí se používají **vitální barviva**. Řada barviv je pro živé systémy jedovatá, takže sice barvíme zaživa, ale současně s barvením buňky usmrcujeme. Pokud sledujeme objekt nebo děj v původním místě (např. tkáni), hovoříme o sledování **in situ**, pokud ne (tkáňové kultury, buňky z macerovaných či rozmixovaných tkání "ve zkumavce" - **in vitro**), sledování probíhá **extra situm**.

Podle techniky přípravy můžeme preparáty rozlišovat na:

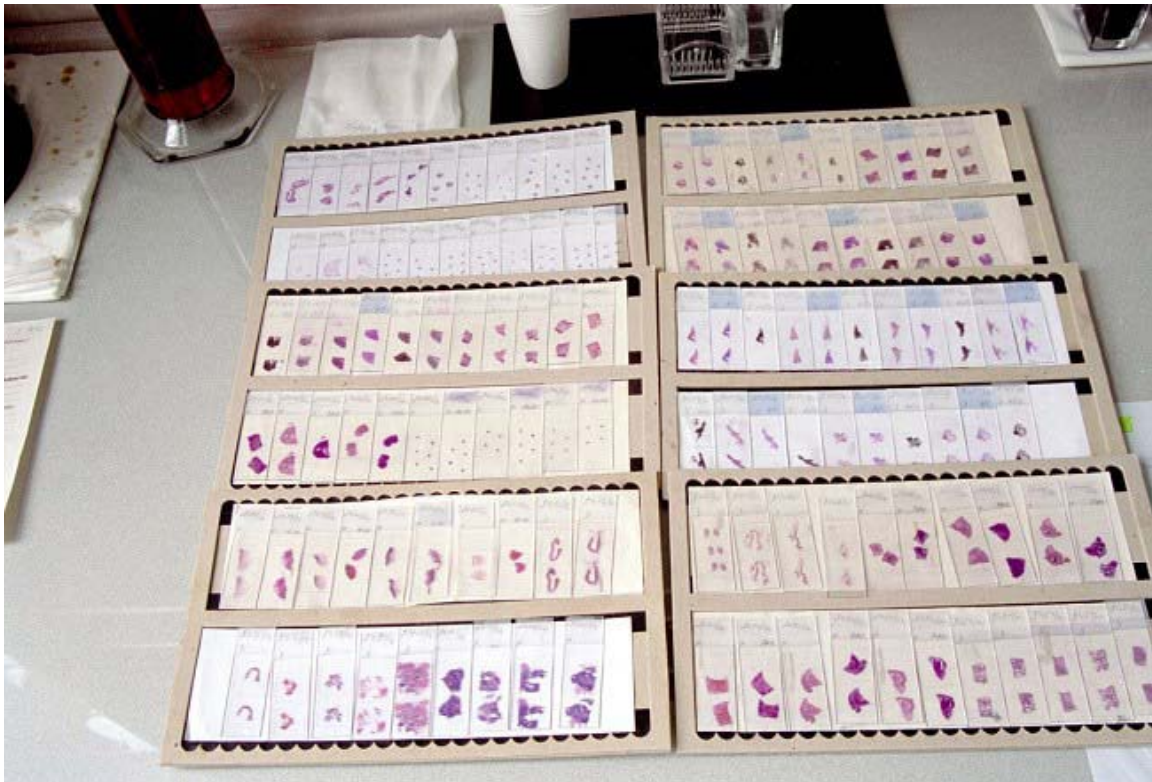
totální preparáty, kdy do vhodného média uzavíráme celý drobný objekt nebo průhledné části těla

preparáty roztěrové a nátěrové, kdy se roztok se studovanými buňkami (např. senný nálev s prvoky, střední obsah s parazity, krev, mokvající řez tělním orgánem) rozetře do tenké vrstvy na sklíčku a po fixaci (usmrcení) a případném obarvení se sleduje (většinou imerzním objektivem)

roztlaky - buňky v tkáni se rozvolní tlakem přes krycí sklo do tenké vrstvy; používá se např. pro pozorování chromozómů

mikroreliefové a adhezivní preparáty pro studium povrchových struktur objektů, kdy se na povrch nanese tenká vrstva rychle schnoucího roztoku, např. bezbarvého laku, který se po zaschnutí buď sám, nebo s vrstvou svrchních buněk strhne a pozoruje pod mikroskopem

Nejčastější jsou **preparáty řezové** (Obr. 43).



Obr. 43 (<http://www.nemjbc.cz>)

Příprava **trvalých** řezových preparátů je značně zdlouhavá (většinou trvá několik dní), ale umožňuje opakované prohlížení téhož preparátu i po delší době (roky až desítky let) nebo současné studium preparátů získaných během delšího časového úseku.

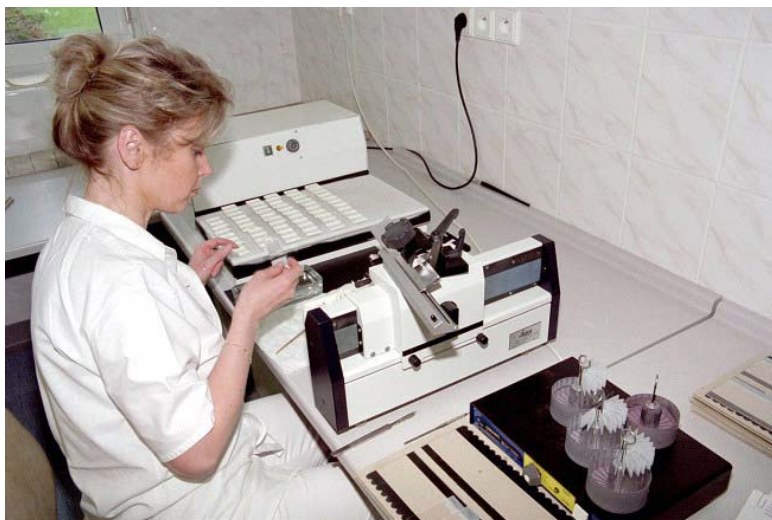
Postup přípravy trvalého řezového preparátu:

1. **Odběr tkáně** by měl probíhat rychle a šetrně, aby byly buňky co nejméně poškozeny a aby byly vystaveny působení vnějších vlivů co nejkratší dobu. Proto máme po ruce vždy připraven fixační roztok, do kterého tkáň ihned přeneseme. Důležitá je také volba velikosti odebraného vzorku, protože příliš velký kus tkáně se nemusí dostatečně profixovat. U živočišných tkání se před přípravou vzorku ze silně prokrveného orgánu zbavíme krve propláchnutím vhodným fyziologickým roztokem (kanylací přívodní arterie)
2. **Fixace** je rychlé usmrcení buněk fixačním prostředkem, který zabraňuje autolytickým procesům v odumírající tkáni a tvorbě **artefaktů** (uměle vzniklé nebo pozmeněné struktury buněk). Fixační médium by mělo fixovanou tkáň rychle pronikat, nemělo by měnit strukturu buněk a fixovaná tkáň by měla zůstat barvitelná. Fixační prostředky mohou být fyzikální (teplem nebo vyschnutím, rychlým hlubokým zmrazením, kdy se nestihnou v buňkách vytvořit krystalky ledu) nebo chemické (organické i anorganické sloučeniny, nejčastěji ve směsích). Výběr fixační metody záleží na cílech studia (celkový preparát, cytologické nebo histochemické studie), metoda musí být vždy jasně definovaná a reprodukovatelná. Fixační médium musí být před dalším zpracováním vzorku důkladně vypráno, podle metody buď alkoholem nebo vodou.
3. **Zalévá se** do roztoku rychle tuhnoucího média, které zpevní tkáň a umožní její řezání. Postup zalévání závisí na použitém médiu. Při zalévání **do parafinu** musí být tkáň nejdříve odvodněna (provedením

preparátu vzestupnou alkoholovou řadou), poté je prosycena rozpouštědlem parafínu ((benzenem), roztokem parafínu v benzenu, a nakonec vlastním parafínem. Po prosycení je objekt zalit parafínem v papírové zalévací komůrce a do ztuhnutí ponechán ve vodní lázni. Tukové tkáně a řídké tkáně, které by se v jiném médiu smrštily, se zalévají **do želatiny** (fixáž se vypírá vodou), pro elektronovou mikroskopii **do umělých pryskyřic**.

- Řezání** se většinou provádí na **mikrotomech** (Obr. 44), které umožňují přípravu řezů o známé tloušťce (několik mikrometrů). Především v botanice se příprava preparátu může urychlit **ručním řezáním**, kdy se objekt bez předchozí fixace a zalévání řeže buď přímo v ruce žiletkou (u větších pevných kusů, např. stonků), nebo se nejdříve upevní do kousku bezové duše, mrkve, bramboru či řepy a žiletkou nebo ručním mikrotomem se pak řeže spolu s okolním zpevňujícím pletivem.

Obr. 44 (<http://www.nemjbc.cz>)



Před vlastním řezáním se ztuhlý bloček ořeže tak, aby kolem studovaného objektu zůstaly 3 až 4 mm zpevňující hmoty. Pro krájení parafinových řezů se používají sáňkové nebo rotační mikrotomy, pro řezání nezalitých tkání nebo tkání zalitých v želatině se používá zmrazovací mikrotom. Pokud chceme znát vzdálenost jednotlivých řezů nebo jejich pořadí (třeba pro následnou prostorovou rekonstrukci studovaného objektu), musíme přenášet řezy na podložní sklo v pořadí, ve kterém byly uříznuty, a celou sérii necháme pak „natáhnout“ a vyrovnat na regulovatelné plotýnce při teplotě 40 až 45°C.. Pokud na pořadí nezáleží, přenášíme řezy do misky s teplou vodou, kde se jednotlivé řezy „natáhnou“ a vyrovnají, a následně štětečkem na podložní sklo. Podložní skla se před nanesením řezů potírají glycerin-bílkem, aby se na ně řezy přilepily, což usnadní jejich pozdější barvení.

- Barvením** řezů se zviditelní nebo zvýrazní buněčné nebo tkáňové struktury, které by jinak byly těžko odlišitelné od okolní tkáně. Před vlastním barvením musíme z tkáně odstranit parafín (opačným postupem, než byl použit při zalévání) a sestupnou alkoholovou řadou řezy převedeme do destilované vody. Vlastní barvení se provádí ve speciálních kyvetách s drážkami na zasunutí podložních skel podle přesných návodů (Obr. 45).



Obr. 45 (<http://www.nemjbc.cz>)

6. Na závěr se řezy opět odvodňují vzestupnou alkoholovou řadou, zakápnou se kanadským balzámem a přikryjí krycím sklem.

Pro střednědobé uchování (několik měsíců) je některé objekty možno po obarvení zakápnout na krycím skle odbarvovacím roztokem a po přiložení krycího skla omezit odpařování roztoku (a vznik bublin) přetřením okrajů kanadským balzámem nebo levnějším bezbarvým lakem na nehty (používá se např. u roztlakových preparátů kořenů barvených pro studium arbuskulární mykorrhizy).

Použití imerzního média

1. zaostříme objekt nejsilnějším neimerzním objektivem
2. revolverový nosič objektivů pootočíme do polohy mezi tento a imerzní objektiv
3. na vyhledané místo v preparátu kápneme imerzní médium
4. pootočíme revolverovým nosičem na imerzní objektiv, takže se jeho čelní čočka ponoří do média (při této proceduře nesjíždíme stolkem, přišli bychom o přibližné zaostření objektu!)
5. pokud v okuláru vidíme hledaný objekt, lehce doostříme mikrošroubem; pokud nevidíme hledaný objekt, opatrně přiblížíme při pohledu z boku stolek s preparátem co nejbližší k čočce objektivu a při pohledu do okulárů stolek oddalujeme, až nalezneme hledaný objekt. Doostříme mikrošroubem. Pokud opakovaně nenalezneme hledaný objekt, opakujeme celý postup od 1. (Pozor, aby se do oleje nenamočily neimerzní objektivy!)
6. po ukončení práce s imerzním objektivem očistíme jeho čelní čočku gázou namočenou v benzínu, čistící směsi (7 dílů éteru : 3 díly alkoholu) nebo xylenu. Pokud jsme mikroskopovali trvalý preparát, očistíme také krycí sklo. Nikdy nenecháme na stolku preparát s objektivem namočeným v imerzním oleji (olej vyschne, zatvrdne a může zcela znehodnotit imerzní objektiv!)
7. Pro práci s imerzním olejem používáme pouze objektivy k tomu určené!

Úloha č. 4: barvení pórů hyalocytů na větvních listech rašeliníku tupolistého (*Sphagnum obtusum*)

Úloha č. 5: rozsivky, pozorování s imerzí