

A light micrograph of a plant stem cross-section. The image shows a vascular bundle in the center, characterized by a distinct arrangement of cells. Surrounding the bundle are large, clear, circular cells, likely xylem vessels or large parenchyma cells. The overall structure is a network of cells with varying wall thicknesses and shapes, stained in shades of pink and blue.

# **Biologická laboratorní technika**

## **Buňky živočichů**

# Živočišné buňky - pozorování - dokumentace

Buňky živočichů × buňky rostlin

Buňky živočichů zpravidla menší než rostlinné. Průměrná velikost 5-20  $\mu\text{m}$ , některé větší (vaječné buňky v mm!, nervové buňky s výběžky až desítky cm!

Hlavní rozdíly v metabolických schopnostech, ve výbavě buňky organelami

Eukaryotické buňky:

Buněčná, plazmatická membrána

Vnitřní prostor eukaryotní buňky je tvořen 2 hlavními kompartmenty: cytoplazmatickým a jaderným.

Jádro (nucleus) obsahuje matrix, nukleoplazmu, má jaderný obal

Cytoplasma – membránové systémy, endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie, ribosomy, lysosomy, peroxisomy, mikrotubuly..

Chloroplasty- syntéza org. látek z jednoduchých anorg. molekul při využití světelné energie;

Buněčné stěny s celulózou, proto změny tvaru omezeny;

Buněčné spoje – plasmodezmy;

Velikost a hmotnost zvětšují vakuoly

## **Eukaryotickou buněčnou organizací mají:**

jednobuněčné organizmy (protista)  
buňky jako stavební jednotky živočišných tkání

### **Pozorování živočišných buněk**

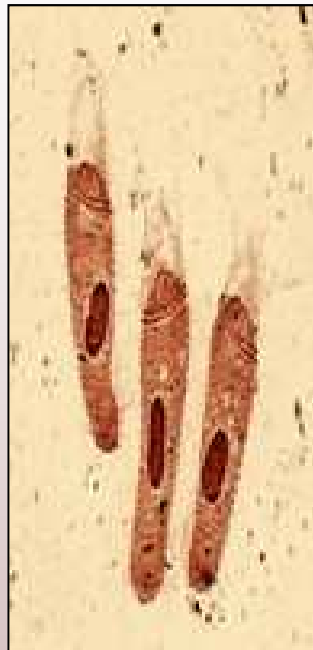
- **Světelným mikroskopem** v procházejícím světle  
při použití fázového kontrastu  
při použití Nomarského DIC (=diferenciální  
interferenční kontrast)  
v odraženém světle s použitím fluorochromů,  
zdroje záření (epifluorescence) a fl. filtrů  
(rozlišovací schopnost světelného mikroskopu = 0,2  $\mu\text{m}$ , zvětšení max 1000x)
- **Transmisním elektronovým mikroskopem – TEM**  
(rozliš. schopnost až 2Å, zvětšení nad 200 000x)
- **Řádkovacím elektronovým mikroskopem – skanovací elektronová  
mikroskopie (SEM)**
- **Konfokálním mikroskopem**

## Světelný mikroskop – procházející světlo

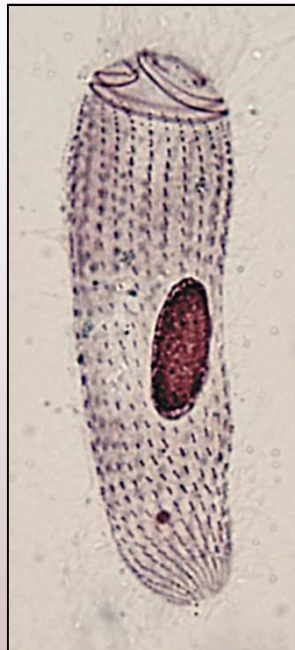
eukaryotické organismy na úrovni buňky - nativní i barvené preparáty – **v barvě**



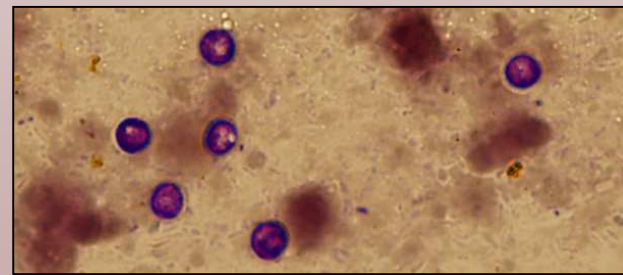
*Cryptocaryon irritans*



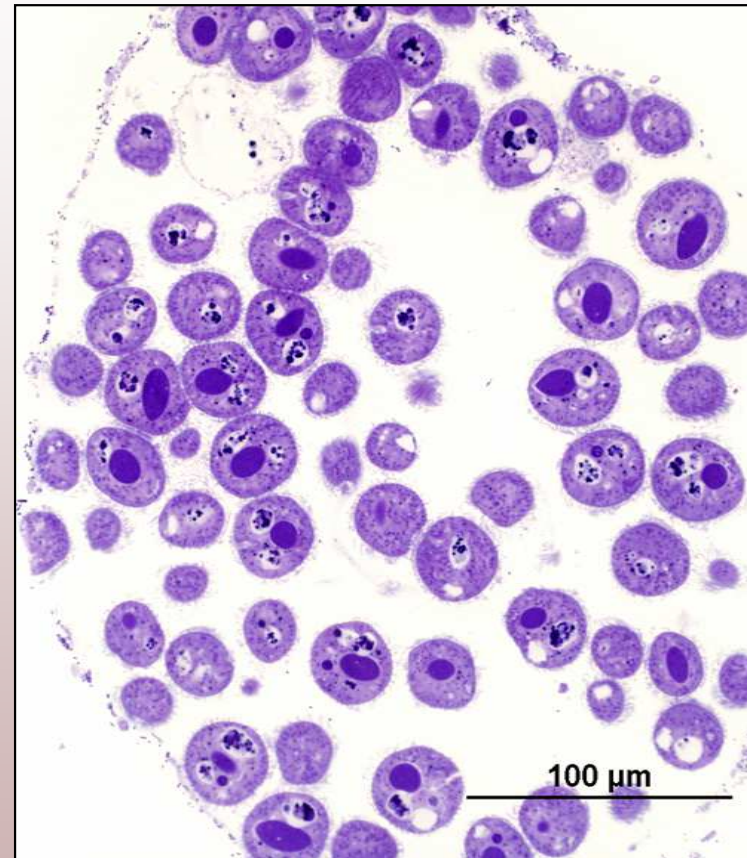
*Boveria licnophora*; *Boveria* sp.



*Epistylis* sp.



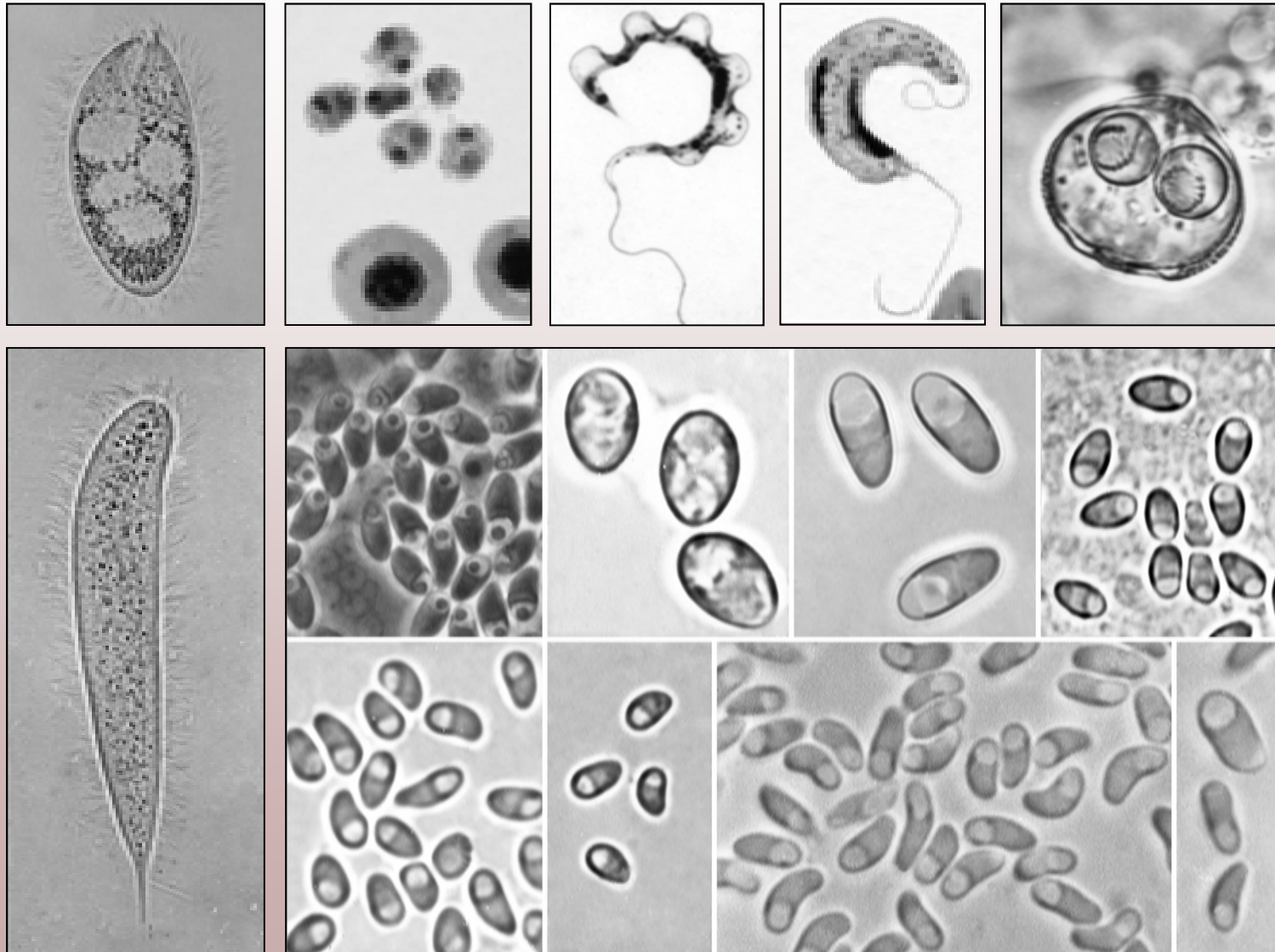
*Cryptosporidium parvum*



*Ichthyophthirius multifiliis* – cysta s tomonty dělicími se v tomity

100  $\mu$ m

**Světelný mikroskop – procházející světlo** eukaryotické mikroorganismy na úrovni buňky, nativní i barvené preparáty – **černobílá reprodukce**

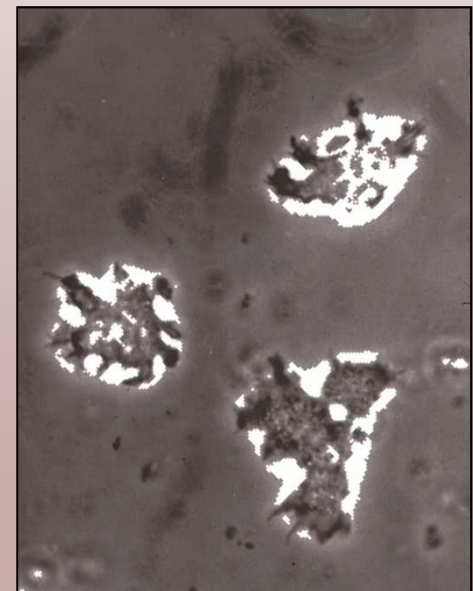


## Mikroskopie s použitím fázového kontrastu

**Optická technika** umožňující zvětšení kontrastu při pozorování transparentních mikroorganismů nebo tkáňových řezů a subbuněčných detailů (jader, organel.. ). Zařízení pro fázový kontrast - obvykle jako doplněk ke světelným mikroskopům vyšší kategorie (pro přímé i invertované). **Speciální objektivy a spec. kondenzor**, který je třeba zamontovat. Pečlivé seřízení je nezbytnou podmínkou docílení efektu. Objekty mohou být pozorovány v tzv. pozitivním a negativním fázovém kontrastu.

Nepříjemným artefaktem je tzv. „**hallo effect**“, pokud je nadměrný.

„Image galleries“ dosažitelné na internetu přesvědčí každého začátečníka, že je nezbytné znát dobře studovaný objekt v procházejícím světle, aby fázový kontrast mohl přinést něco nového. Interpretace samotného fázového kontrastu je obtížná.



## Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC)

Světelné mikroskopy vyšších kategorií mohou být vybaveny zařízením, které vyhodnocuje optickou interferenci ve zvětšeném biologickém preparátu. To **umožňuje velmi dobře pozorovat nebarvené objekty**. Metoda zkontrastňuje nebarvené objekty na základě rozdílů v indexech lomu světla procházejícího jednotlivými komponentami objektu přičemž vytváří trojrozměrný relief .

Mikroskop s Nomarského DIC se liší od běžného světelného mikroskopu vloženým párem **Wollastonových dvojlomných hranolů** (objektivový a kompenzační) **a párem zkřížených polarizátorů světla**. Světlo vstupující do kondenzoru je nejprve polarizováno lineárně, pak prochází prvním hranolovým děličem, přičemž směr jeho polarizace svírá s optickými osami hranolového děliče úhel 45 stupňů. Druhý, shodně orientovaný hranol se nachází těsně za zadní ohniskovou rovinou objektu. Následuje druhý polarizátor, který je zkřížen s prvním. V důsledku rozdělení původně polarizovaného světla hranolem vzniknou dva identické obrazy objektu, které jsou vůči sobě laterálně posunuty (zvětšený, rozdvojený obraz – rozdvojení je pod hranicí rozlišovací schopnosti mikroskopu). Hodnotu fázového rozdílu je možné plynule měnit posouváním obou W hranolů, čímž se výrazně ovlivňuje obraz.

**Zvětšený obraz objektu se jeví jako šikmo osvětlený trojrozměrný objekt.**

**Nevýhoda:** malá hloubka ostrosti, což se přičítá efektu interference, pro níž se podmínky prudce mění při přeostrění o zlomky vlnové délky.

**Výhody:** Odpadá rušivé „halo“ známé z fázového kontrastu. Metoda je využitelná při horním osvětlení i pro fluorescenci.

## Nomarského diferenciální interferenční kontrast – Olympus BX51



**Cysty améb – kmen 4717L**



***Trichodina* sp.**

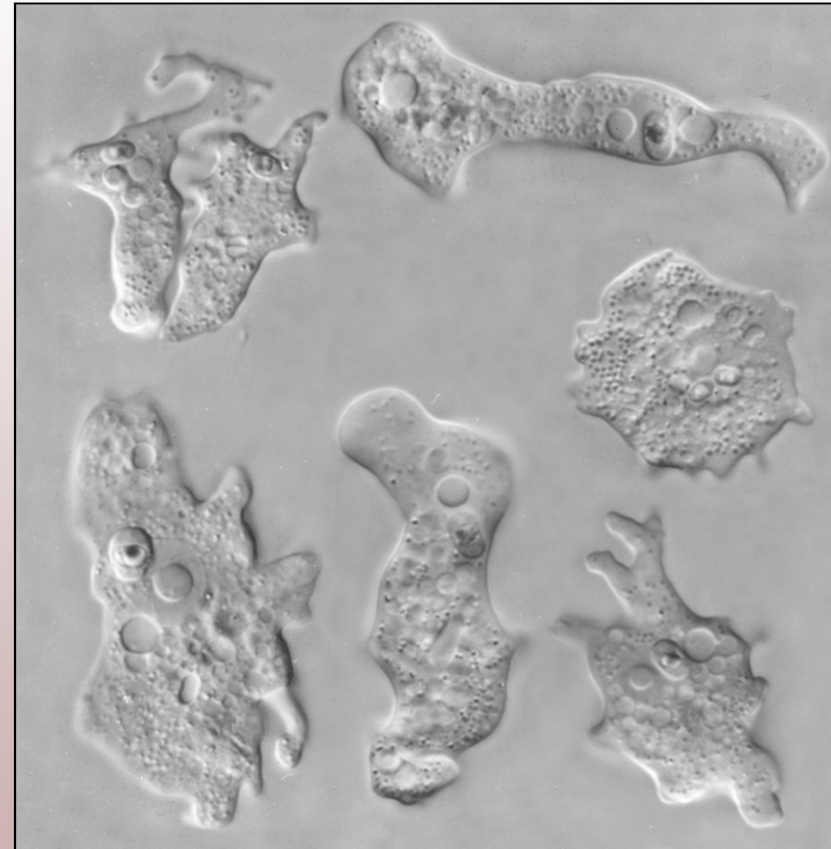
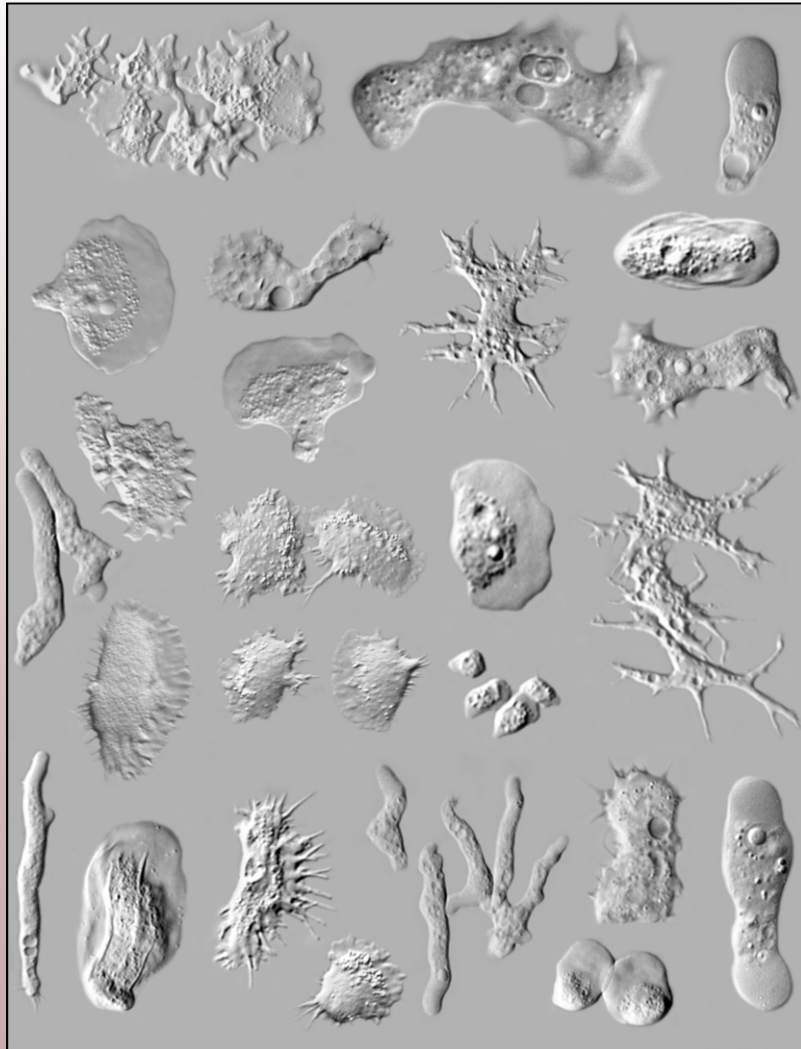


***Chilodonella* sp.**



# Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC) - Olympus BX51

## černobílá reprodukce



Pohybující se trofozoity volně žijících améb různých rodů pozorované a dokumentované ve „visuté kapce“

## **Fluorescenční mikroskopie pozorování v odraženém světle - epifluorescence**

**Podstata:** buzení viditelného záření v objektech, které obsahují tzv. fluorochromy, látky schopné měnit dopadající UV záření na odražené barevné, viditelné záření. Některé biol. objekty takové látky již obsahují (může docházet k tzv. autofluorescenci – viz příklady mořských organismů), jiným je dodáváme barvením).

Klíčovým termínem je **fluorofor** – látka schopná absorbovat světlo určité vlnové délky a následně emitovat světlo o větší vlnové délce. Světlo různých vlnových délek je možné od sebe oddělit pomocí filtrů. Do okuláru může pronikat pouze pozitivní emitovaný signál na černém pozadí.

**Fluorofóry** jsou detekovány pomocí **fluorescenčního mikroskopu**. Ten je velmi podobný klasickému světelnému mikroskopu, liší se tím, že je doplněn o **velmi silný zdroj světla** (obvykle UV lampa) a dvěma typy filtrů. (Filtr mezi zdrojem světla a vzorkem – excituje fluorofory světlem vybraných vlnových délek, druhá sada filtrů vpouští do objektivu světlo emitované příslušným fluoroforem). (Transformace klasického světelného mikroskopu vyšší třídy na fluorescenční je běžná).

## Fluorescenční mikroskopie pokrač.

Revolucí ve využití fluorescenční mikroskopie při studiu živých buněk bylo **využití zeleného fluorescenčního proteinu (GFP)**, který se mol. biol. technikami váže na různé buněčné proteiny. Dnes je k dispozici velké množství vesměs heterocyklických sloučenin, které se od sebe liší absorpčními i emisními vlnovými délkami. Mohou pokrýt celé spektrum viditelného světla. S využitím příslušných filtrů je možné pozorovat současně několik struktur.

Fluorescenční mikroskopie je nejčastější metodou pro detekci specifických molekul (proteinů, lipidů, oligo- nebo polysacharidů i sekvencí DNA a RNA). Specifické reagensy pro rozpoznání jednotlivých struktur v buňce se získávají kovalentní vazbou fluoroforů na protilátky, využívá se i kovalentní spojení vhodných fluoroforů s látkami, které se specificky vážou na určitou buněčnou strukturu (faloidin- jed z muchomůrky se váže na polymerovaný aktin).

Pro **pozorování struktur v živých buňkách** jsou k dispozici i látky, které pronikají přes plasmatickou membránu do buněk a akumulují se v charakteristické lokalizaci (mitotracker, ER-tracker atd.)

## Fluorescenční mikroskopie pokrač.

### **Příklady:**

Detekce jádra pomocí fluorescenční látky interkalující do DNA  
(DAPI – modrá emise, Hoechst)

**Komplikace:** „fotobleaching“; detekce části světelného signálu pod a nad rovinou ostrosti

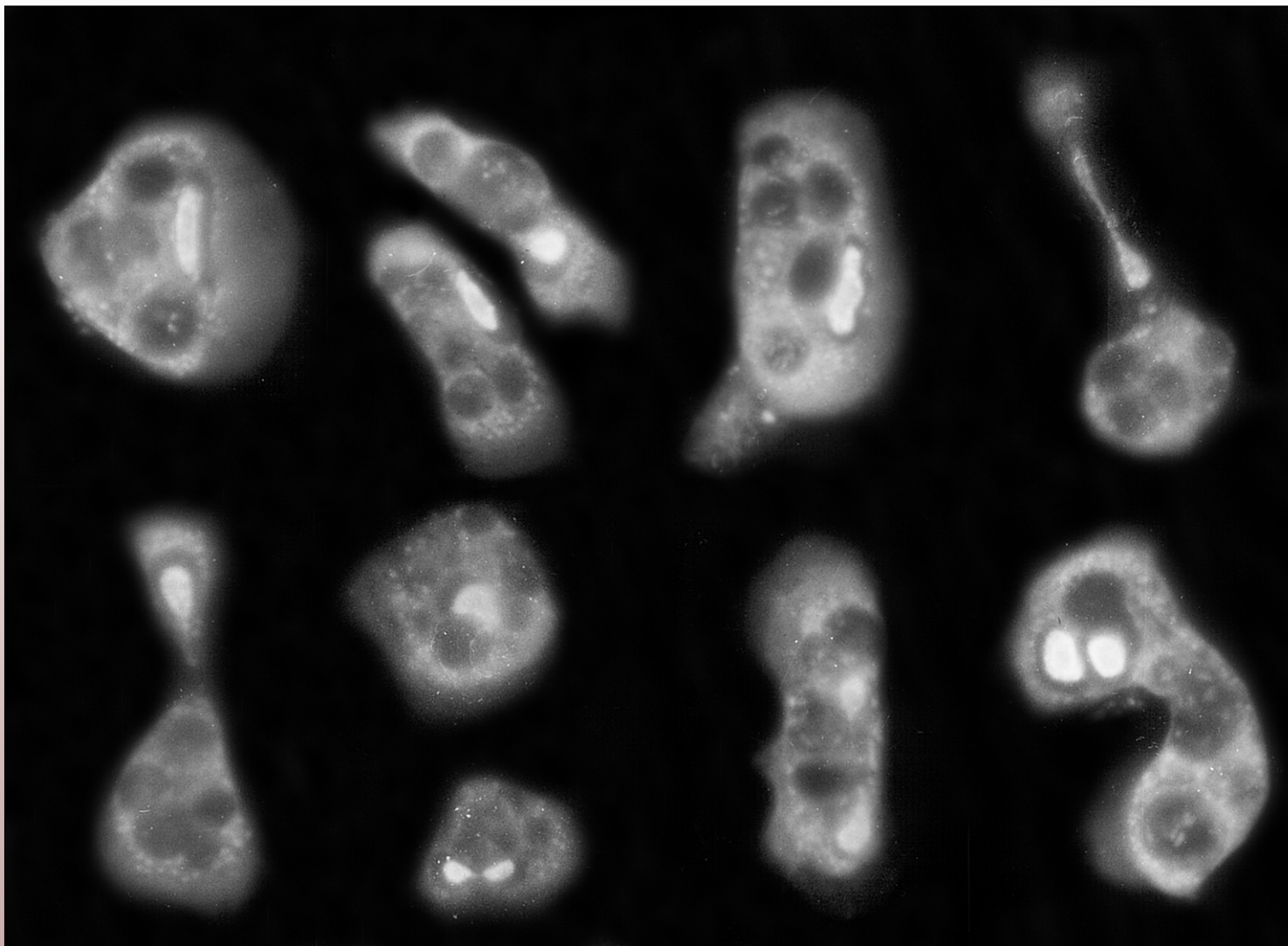
**FISH** – využití fluoroforů i při identifikaci a lokalizaci specifických sekvencí nukleových kyselin pomocí komplementární oligo- nebo polynukleotidové označené sondy / proby (digoxigenin, biotin)...

Nucleic Acid Stains - Molecular Probes – Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals

<http://www.probes.com>



## Fluorescence – černobílá reprodukce



Volně žijící améba z čeledi Vannellidae

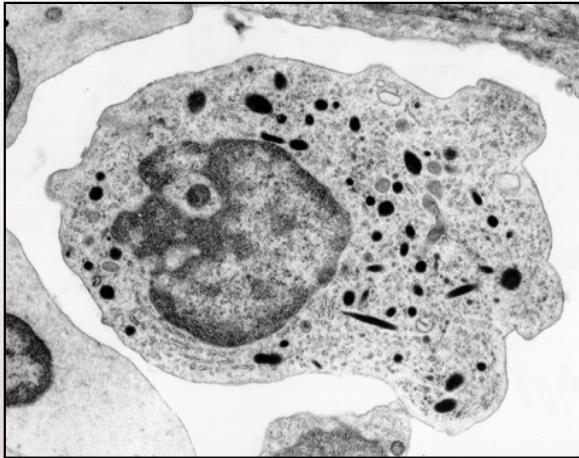
## **Transmisní elektronová mikroskopie**

**Zjednodušeně:** Hlavní části světelného a elektronového mikroskopu jsou shodné. Sestávají ze zdroje světla, kondenzorové čočky, držáku preparátu, objektivové čočky a projektivové čočky (okuláru). Podstatný rozdíl mezi světelným a elektronovým mikroskopem spočívá v tom, že se v prvním případě používá k vytvoření obrazu viditelné světlo, ve druhém paprsek elektronů. Ten se většinou získává termoemisí.

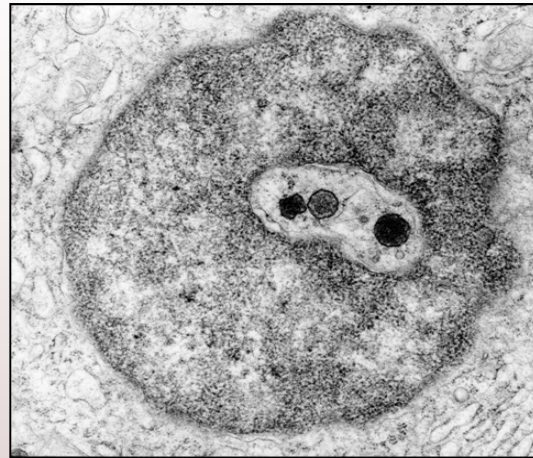
Čočky světelného mikroskopu jsou ze skla, čočky elektronového mikroskopu jsou tvořeny elektromagnetickým polem. Prostředí, kterým procházejí světelné paprsky je vzduch, pro nerušený průstup proudu elektronů je třeba vytvořit v tubusu elektronového mikroskopu vysoké vakuum. Konečný obraz, získaný světelným mikroskopem můžeme pozorovat po výstupu paprsků z okuláru přímo okem, obraz v elektronovém mikroskopu pozorujeme nepřímo, projekcí na stínítko.

**Příprava materiálu** pro prohlížení v transmisním elektronovém mikroskopu: Fixace, odvodnění, zalití do pryskyřice, poloténkové a ultratenké krájení bločků.

## Transmisní elektronová mikroskopie



Lymfocyt



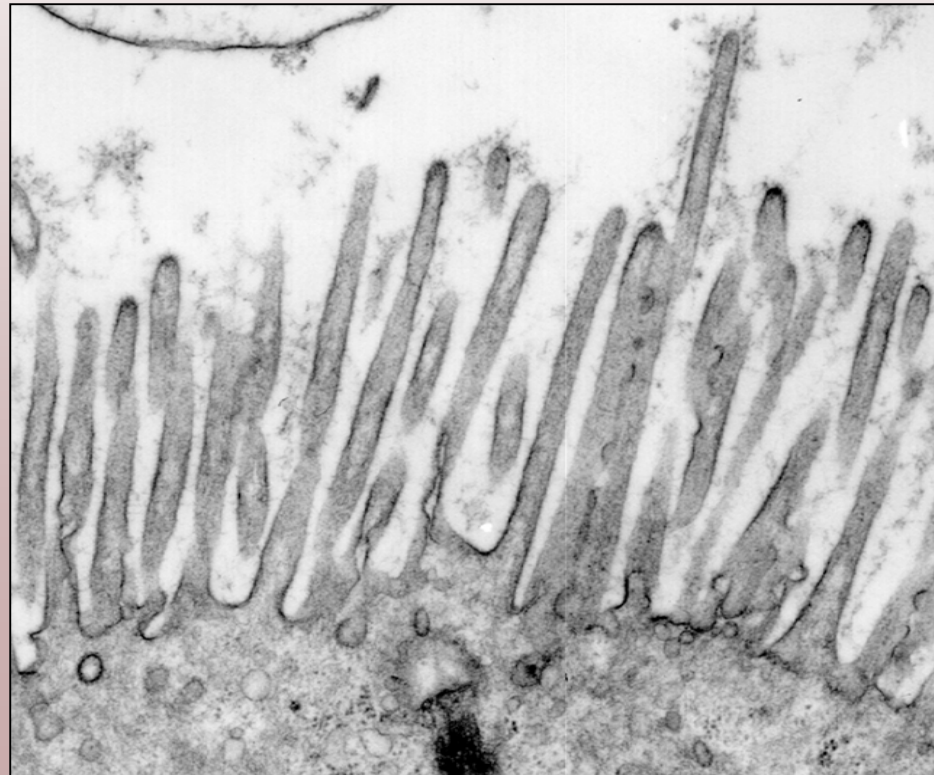
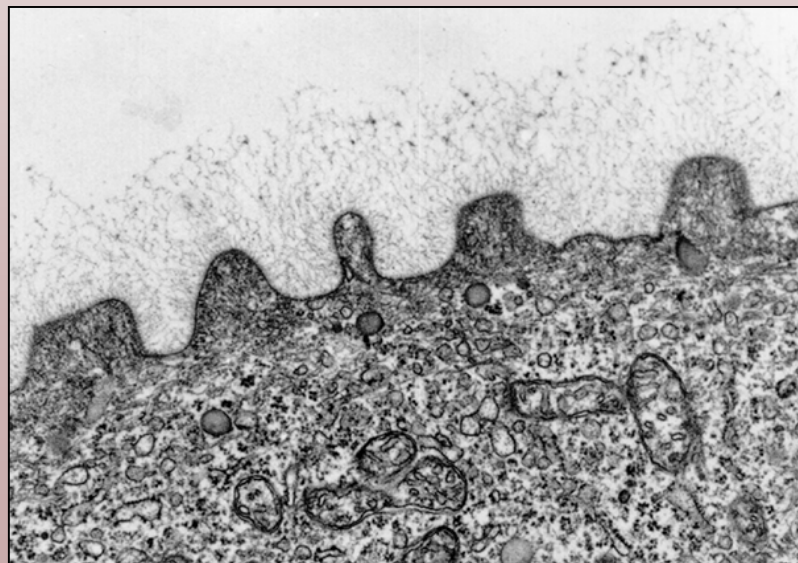
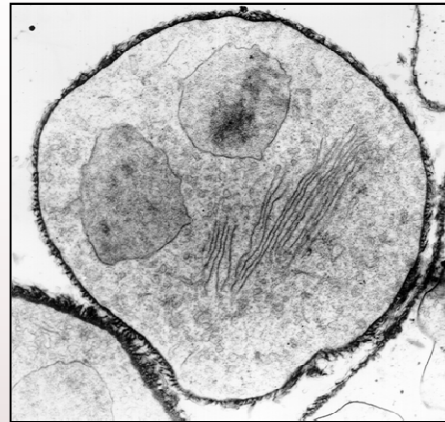
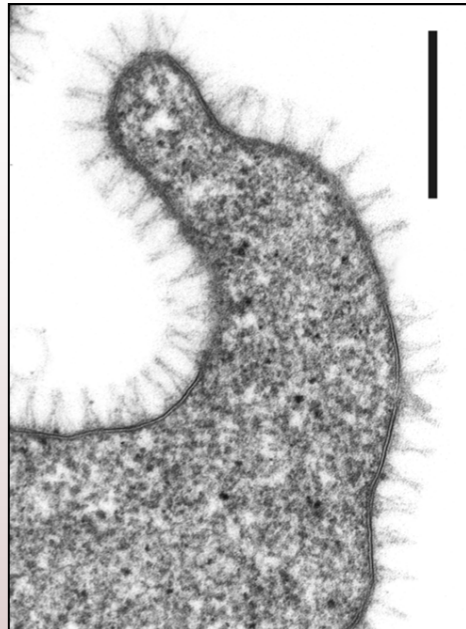
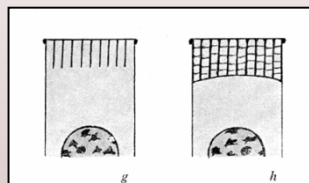
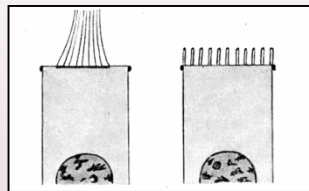
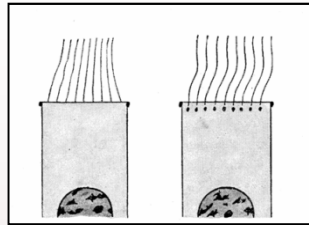
Heterofil



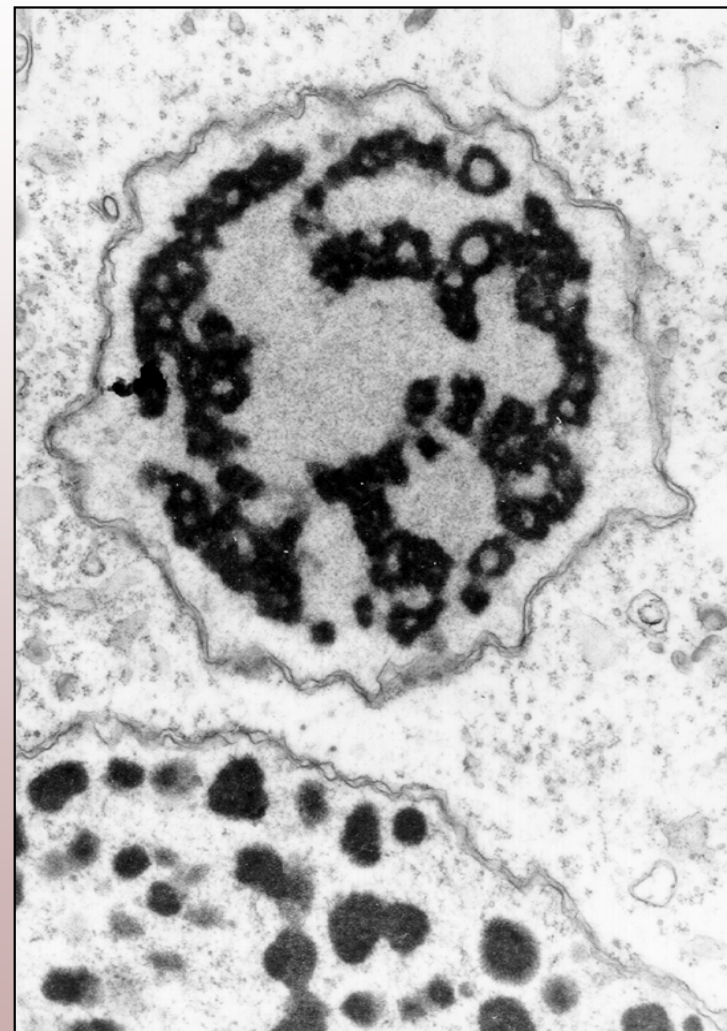
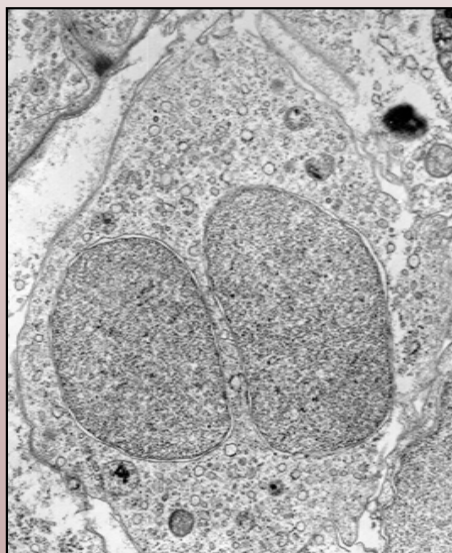
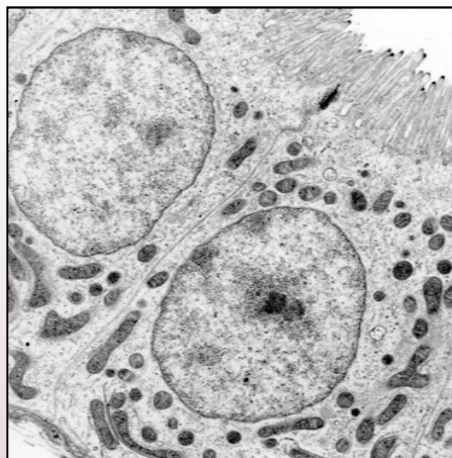
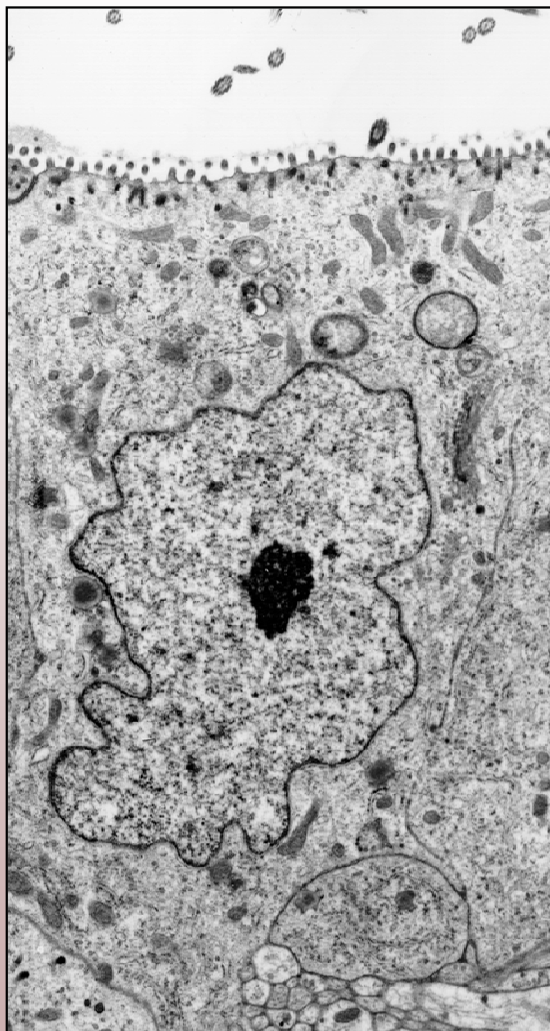
Erythrocyt



# Transmisní elektronová mikroskopie – povrch buněk

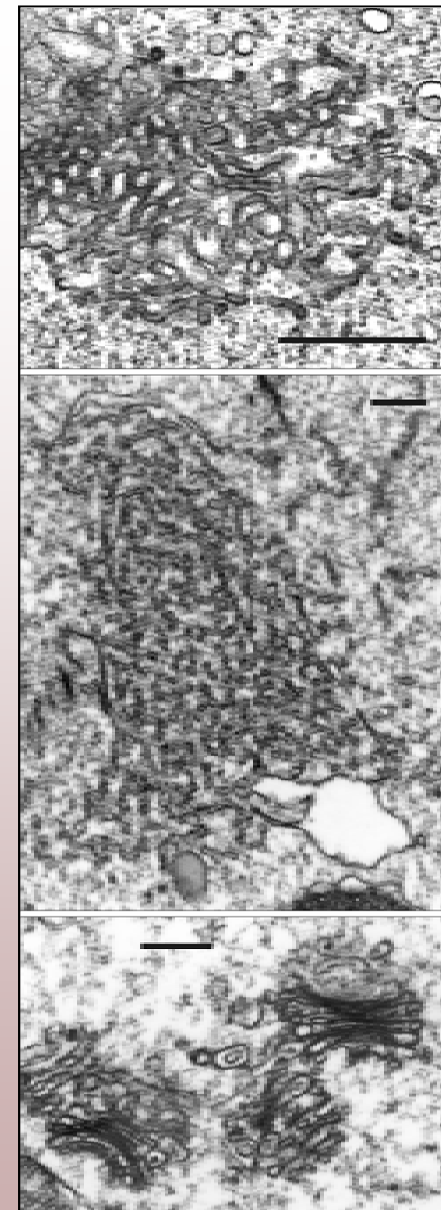
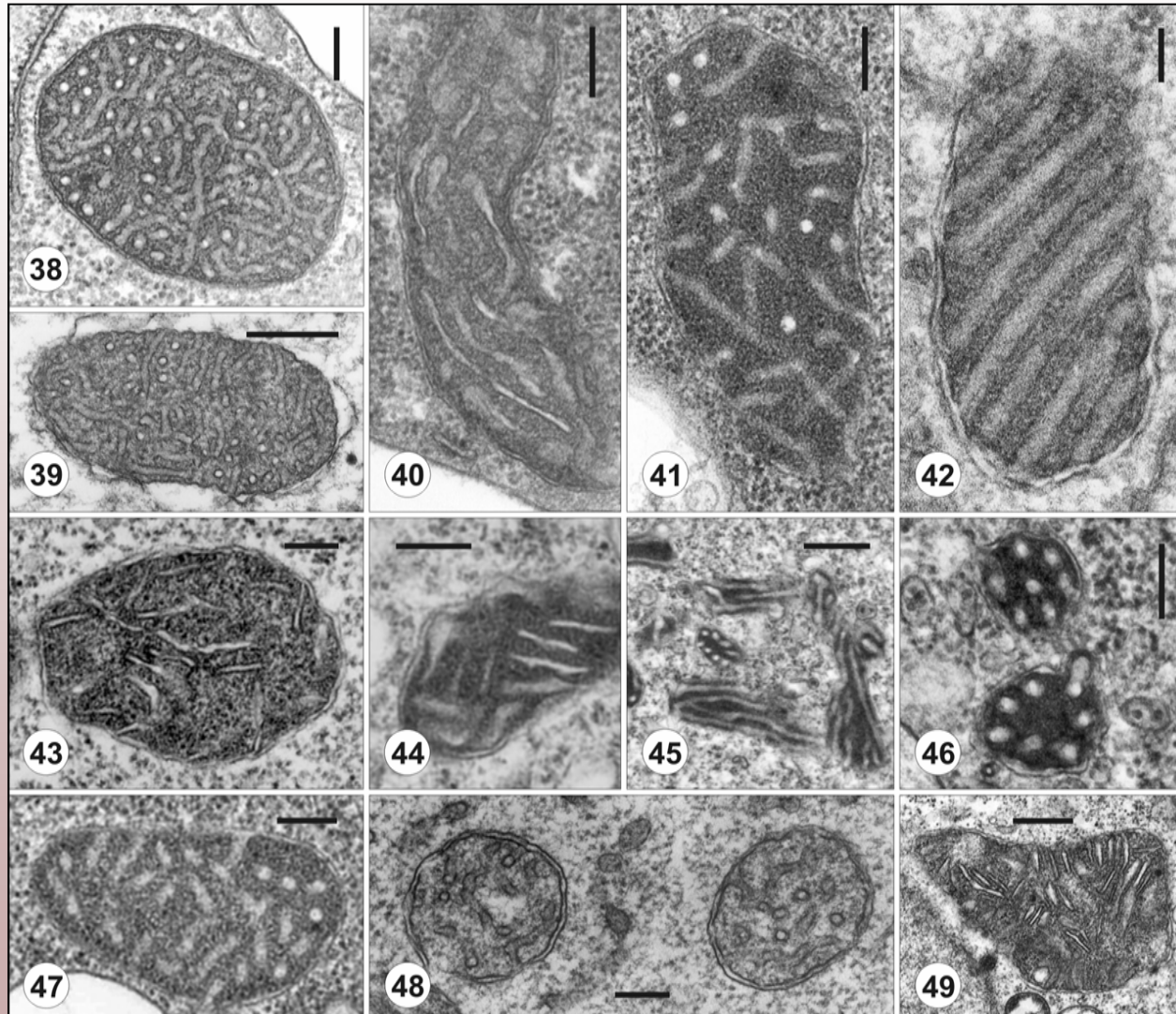


## Transmisní elektronová mikroskopie – jádra buněk



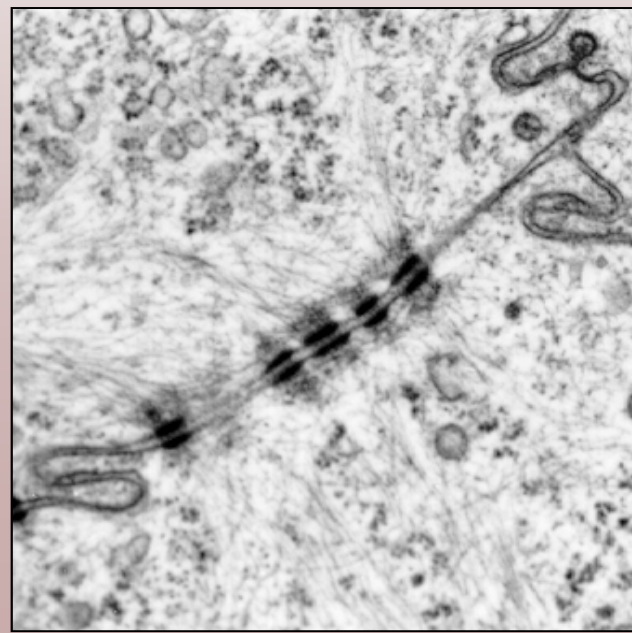
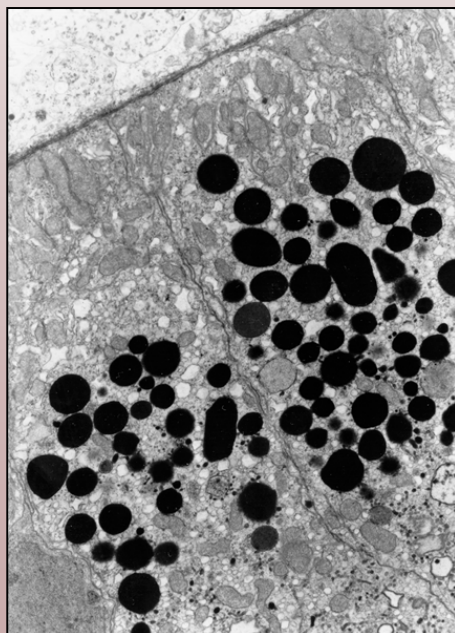
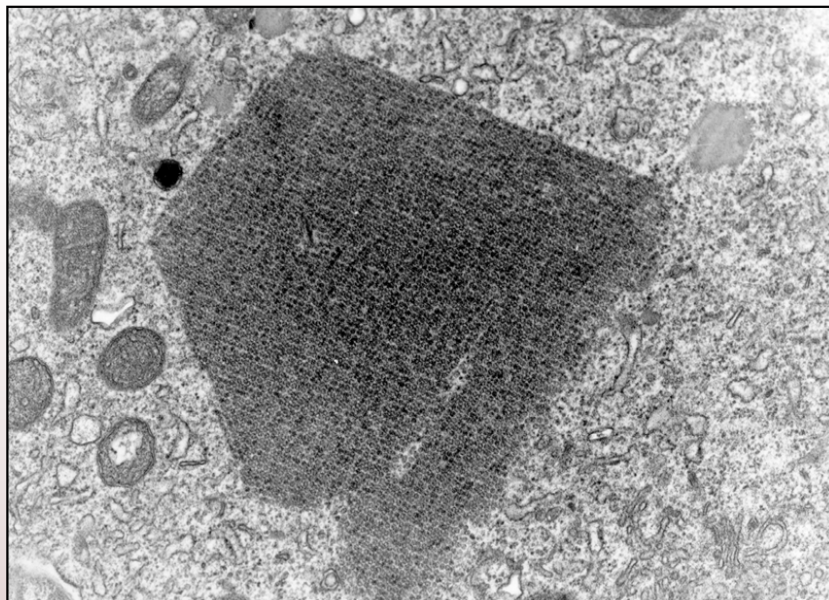
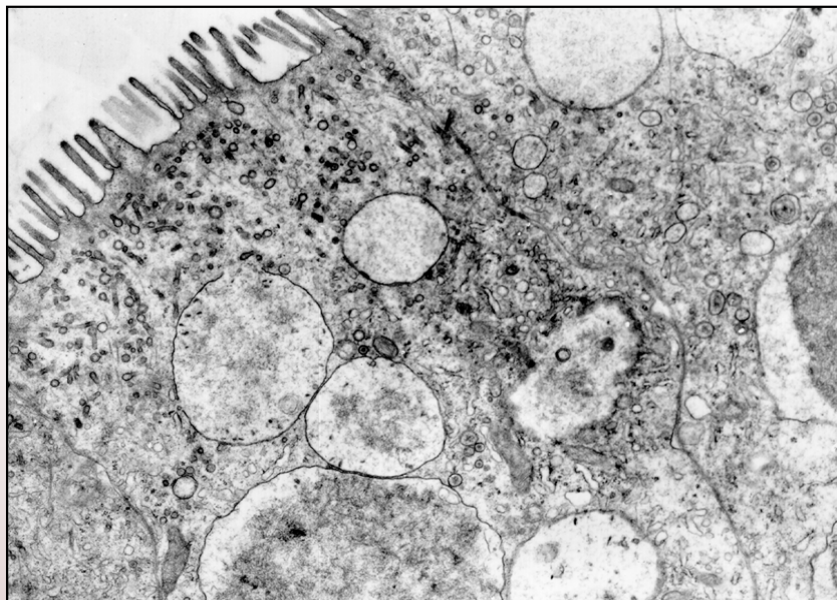
# Transmisní elektronová mikroskopie

## Mitochondrie volně žijících améb (38–49)



Golgiho aparát

# Transmisní elektronová mikroskopie – cytoplasma a buněčné spoje



## Řádkovací / rastrovací / skanovací elektronová mikroskopie

Preparát se „prohlíží“ bod po bodu a celkový obraz vzniká složením jednotlivých bodů (signálů). Svazek elektronů generovaný elektronovým dělem a soustředěný do co nejmenší plochy. Nejlepší možné rozlišení závisí na rozměru tohoto bodu. Odražené, sekundární elektrony vytvářejí „obraz“. **Používá se hlavně k získání informace o povrchovém reliéfu zobrazovaného vzorku.** Dosažitelné rozlišení (t.j. nejmenší rozlišitelná vzdálenost detailů objektu) = 2-3 nm (TEM nad 0,1 nm, světelná mikroskopie 0,2  $\mu\text{m}$ ).

**Příprava vzorků** – fixování, odvodnění, sušení při tzv. kritickém bodu, pozlacení povrchu (naprášením).



## Konfokální mikroskopie

Při zkoumání silných vzorků (tkáňových řezů) nebo velkých buněk je kvalita zobrazení a tím i praktická rozlišovací schopnost mikroskopu nepříznivě ovlivňována překrýváním obrazu roviny do níž je mikroskop právě zaostřen. Rušivého zamlžení obrazu zářením z mimo ohniskových rovin se lze do značné míry zbavit pomocí konfokální mikroskopie.

Éra konfokální mikroskopie začíná v 70 tých letech min. století, kdy byl zkonstruován první spolehlivý konfokální mikroskop s tzv. rozmítaným laserovým paprskem. Nyní je na trhu cca 10 verzí konfokálních mikroskopů.

Termín „**confocal**“ je definován jako „**at the same focal plane**“. Finální obrázek produkovaný mikroskopem má stejnou rovinu zaostření jako objekt. („Object and its image are confocal“). Světlo, které je nad a pod rovinou ostrosti je odfiltrováno / eliminováno, získáváme ostrý obraz obsahující informaci (příslušné emitované fotony) pouze z roviny ostrosti. To má mimořádný význam pro zobrazení fluorescence. Konfokální obraz může být získán jen po vyvolání fluorescence (autofluorescence což je přirozená tendence emitovat fotony v důsledku excitace, nebo po použití fluorochromů / fluoroforů, příp. při imunofluorescenci, kdy jsou fluorochromy vázány na protilátky)

## Konfokální mikroskopie pokrač.

**Nevýhodou** je to, že pro získání využitelně silných signálů vyžaduje mimořádně silné zdroje světla typu laserů a speciální technologii detekce fotonů z roviny ostrosti.

Možnost prostorové rekonstrukce pozorovaných mikroskopických objektů, která se opírá o několik desítek až stovek **optických řezů** jedním objektem, postupně snímaným při plynule se měnící hloubce zaostření. Ze souborů **optických řezů** lze mj. generovat stereoskopické páry – zvětšené obrazy celého trojrozměrného viděné pravým a levým okem (působivé plastické obrazy preprátů) objektu.

**Vertikální optické řezy** závisí na volbě rastrovacího algoritmu mikroskopu.

Nová metoda konfokální mikroskopie = snímání fluorescenčních obrazů pomocí tří fotonásobičů se spektrálními filtry pro modrou, červenou a zelenou barvu. Rekombinací dílčích obrazů v základních barvách získáváme optický řez v reálných barvách emitované fluorescence.

**Při použití konfokální mikroskopie dosahuje zlepšení kontrastu takové úrovně, že se objeví struktury, které při pozorování klasickým světelným mikroskopem nejsou vůbec pozorovatelné.**

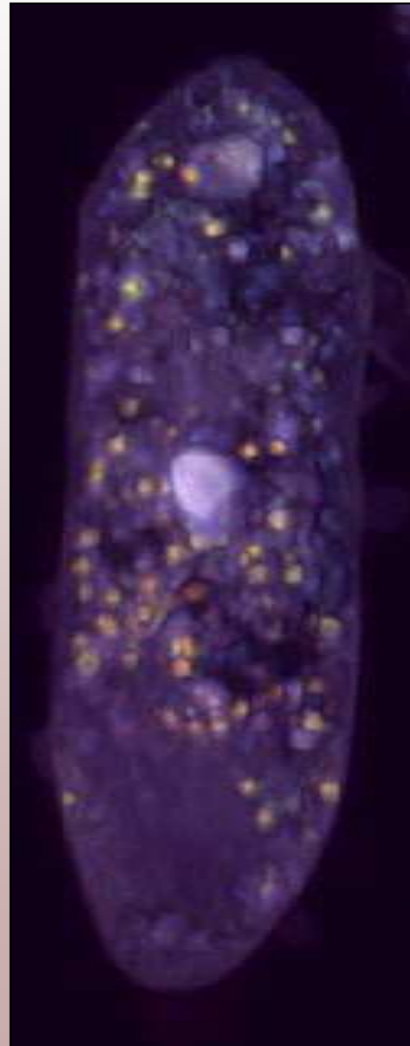
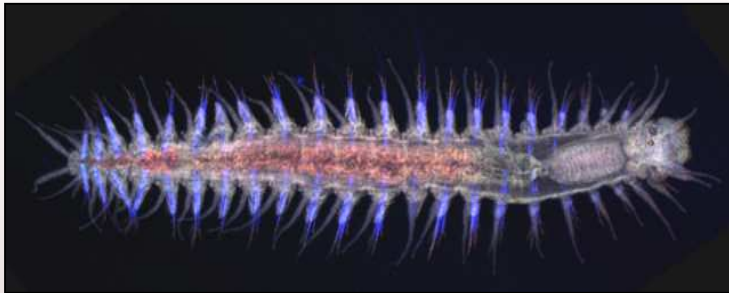
## Konfokální mikroskopie pokrač.

### **Aplikace konfokální mikroskopie**

Biologie a lékařský výzkum – např. studium složité architektury neuronových sítí v mozkové tkáni (po použití Golgiho metody kontrastování neuronů částčkami stříbra). Použití tzv. fluorescenčních sond pro studium intracelulární koncentrace fyziologicky významných iontů (např.  $K^+$  a  $Ca^{2+}$ , měření membránových potenciálů atd.).



## Konfokální mikroskop – autofluorescence mořských živočichů



**Autor:**  
**Doc. RNDr. Josef Reischig, CSc**  
**Lékařská fakulta UK v Plzni**  
**Ústav biologie**

Konfokální mikroskop  
Autor snímků Doc. J. Reischig, CSc



**Krab-larva**

Klíště-larva  
Roztoč



# **Praktikum – pozorování živočišných buněk ve světelném mikroskopu a jejich dokumentace**

**3 - 5 úloh**

***Tetrahymena* spp. – barvený preparát**

***Trichodina/Trichodinella* spp. - barvený preparát**

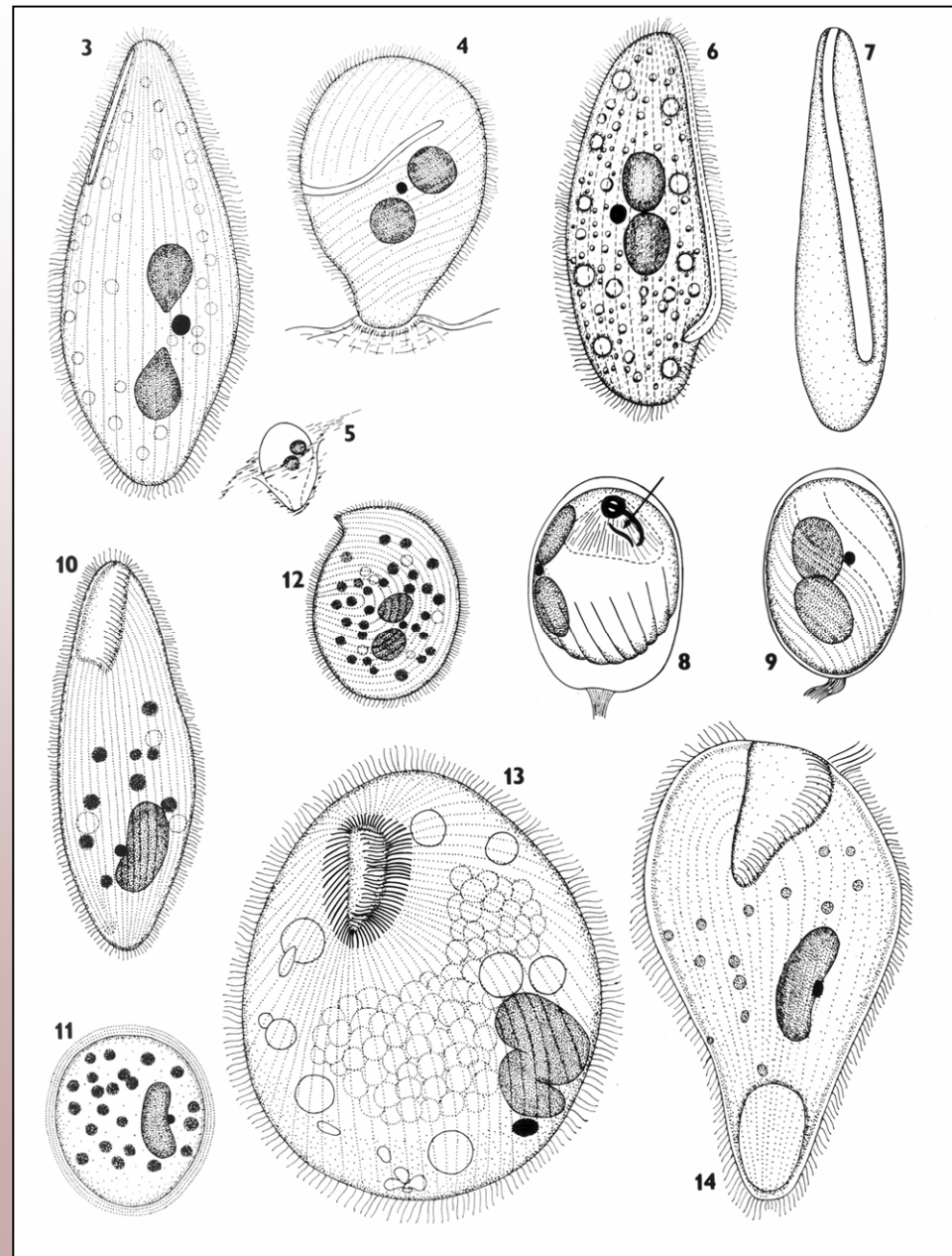
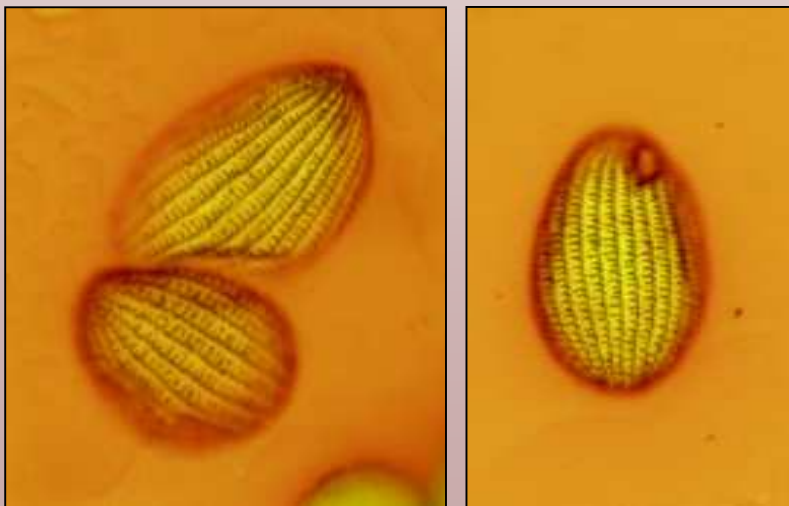
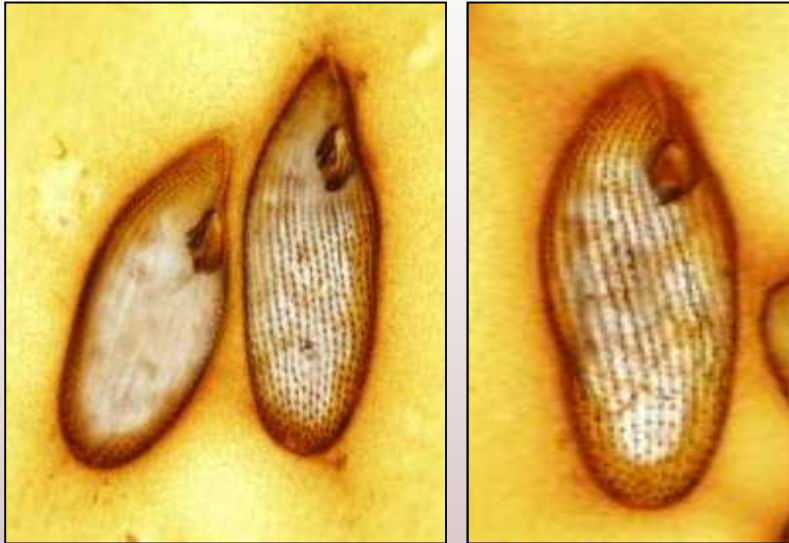
***Raphidascaris acus* – histolog. řez**

**Trofozoity živých améb**

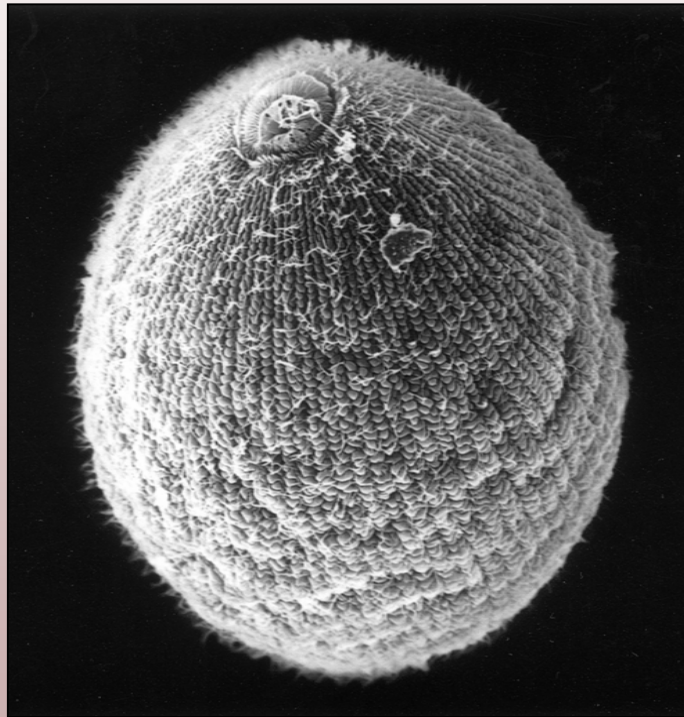
***Blepharisma americanum* – živí nálevníci**

## *Tetrahymena corlissi* a příklady kreseb různých nálevníků

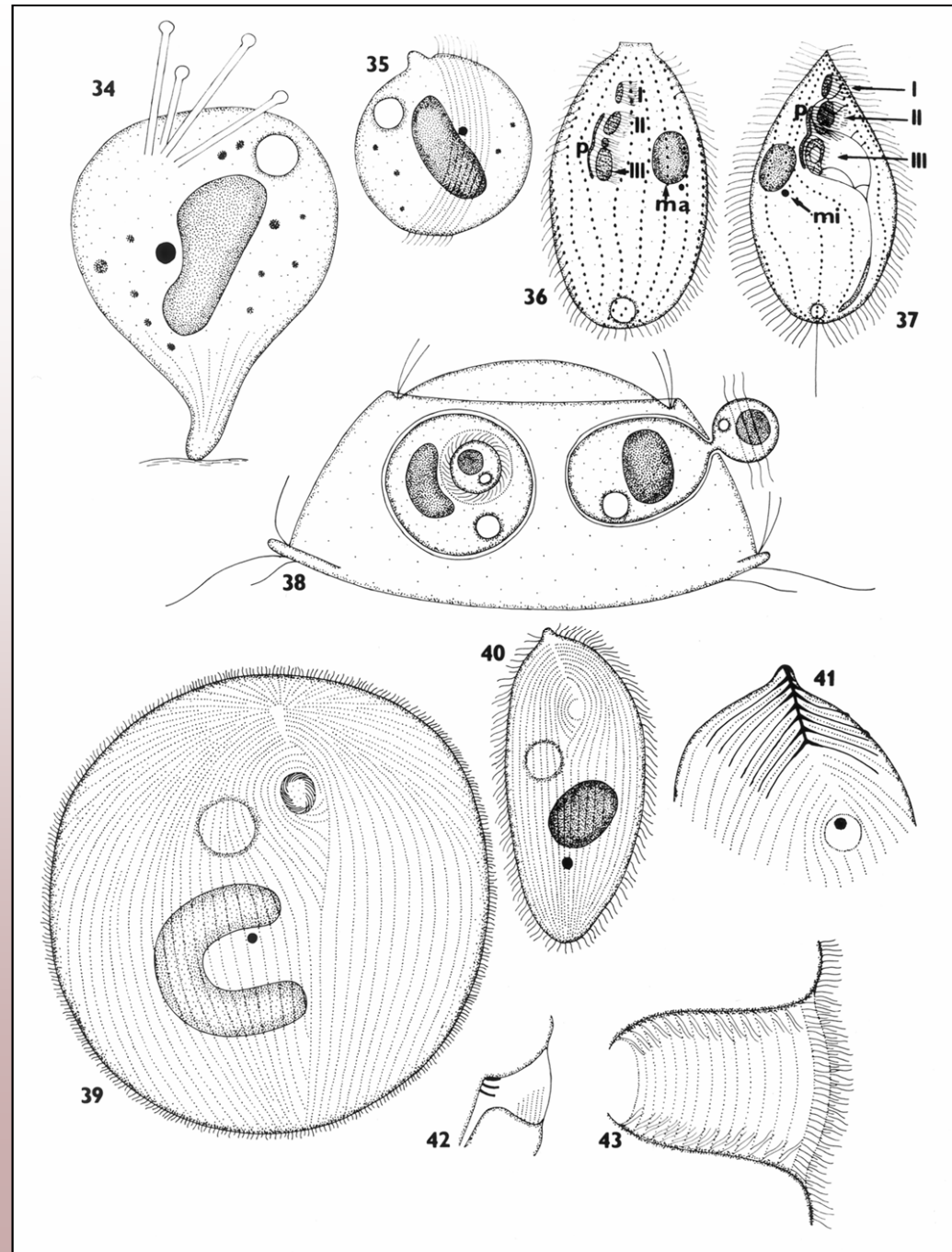
Jednoduché, čisté linie, zaznamenání všech důležitých detailů, topografie atd. Řady kinetid, buněčná ústa, makro- a mikronukleus

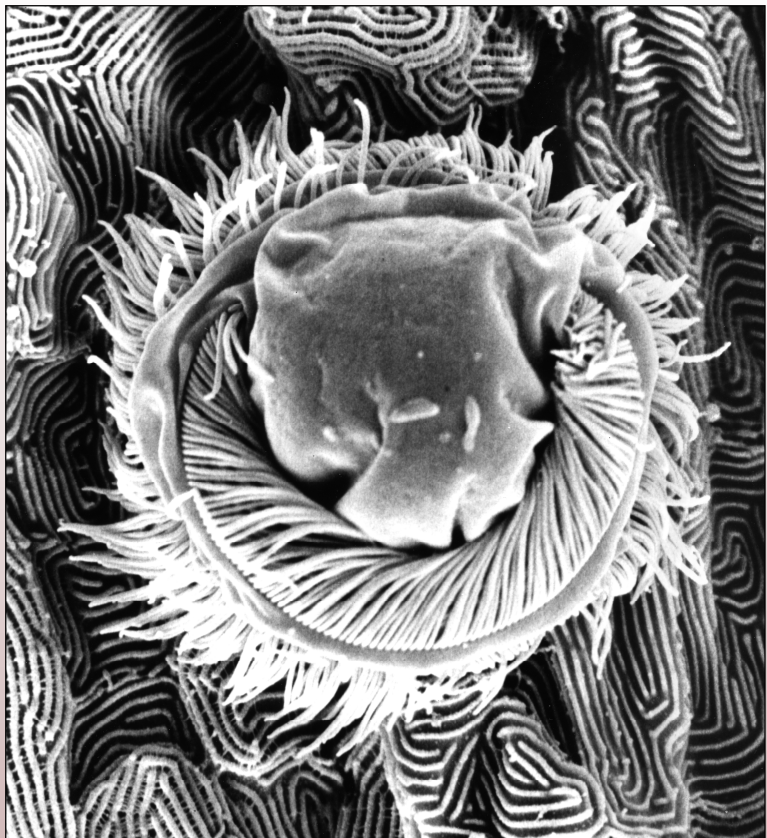


Příklady kreseb různých skupin nálevníků



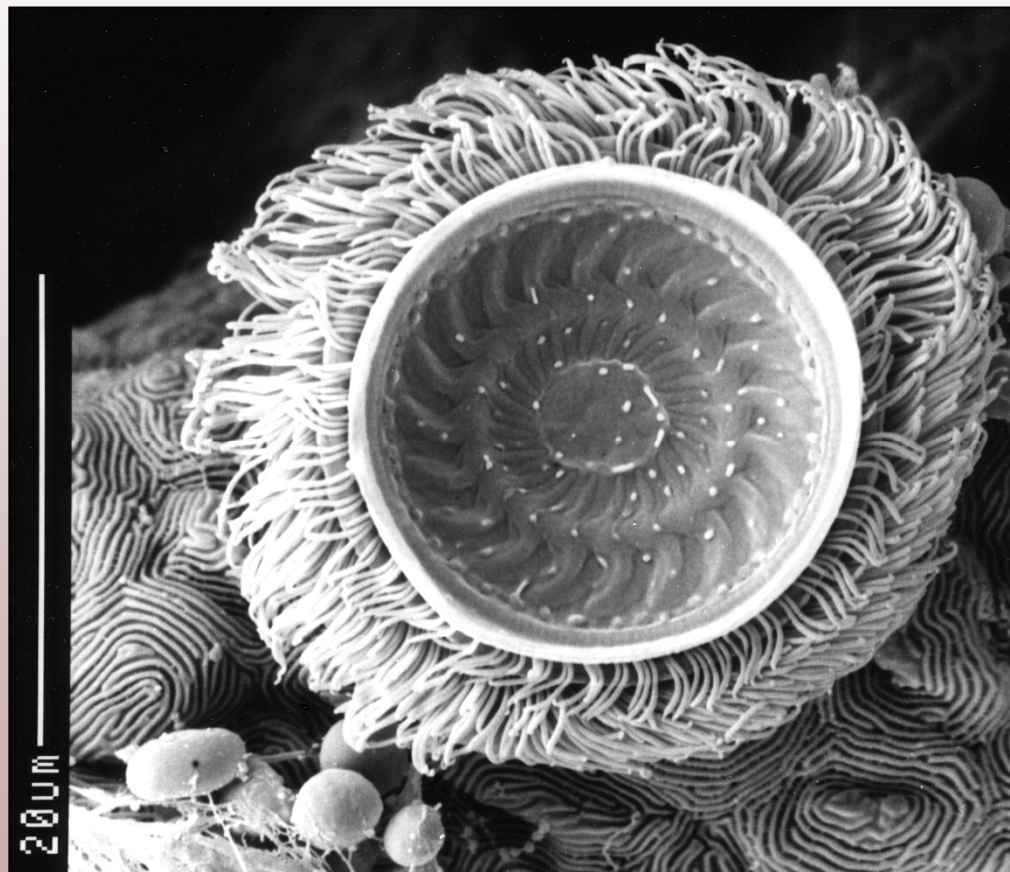
*Cryptocaryon irritans*  
Řádkovací elektronový mikroskop





Skannovací elektronová  
mikroskopie

***Trichodina* sp.** Kruhobrvý nálevník  
(Mobilina) na žábřácích ryby

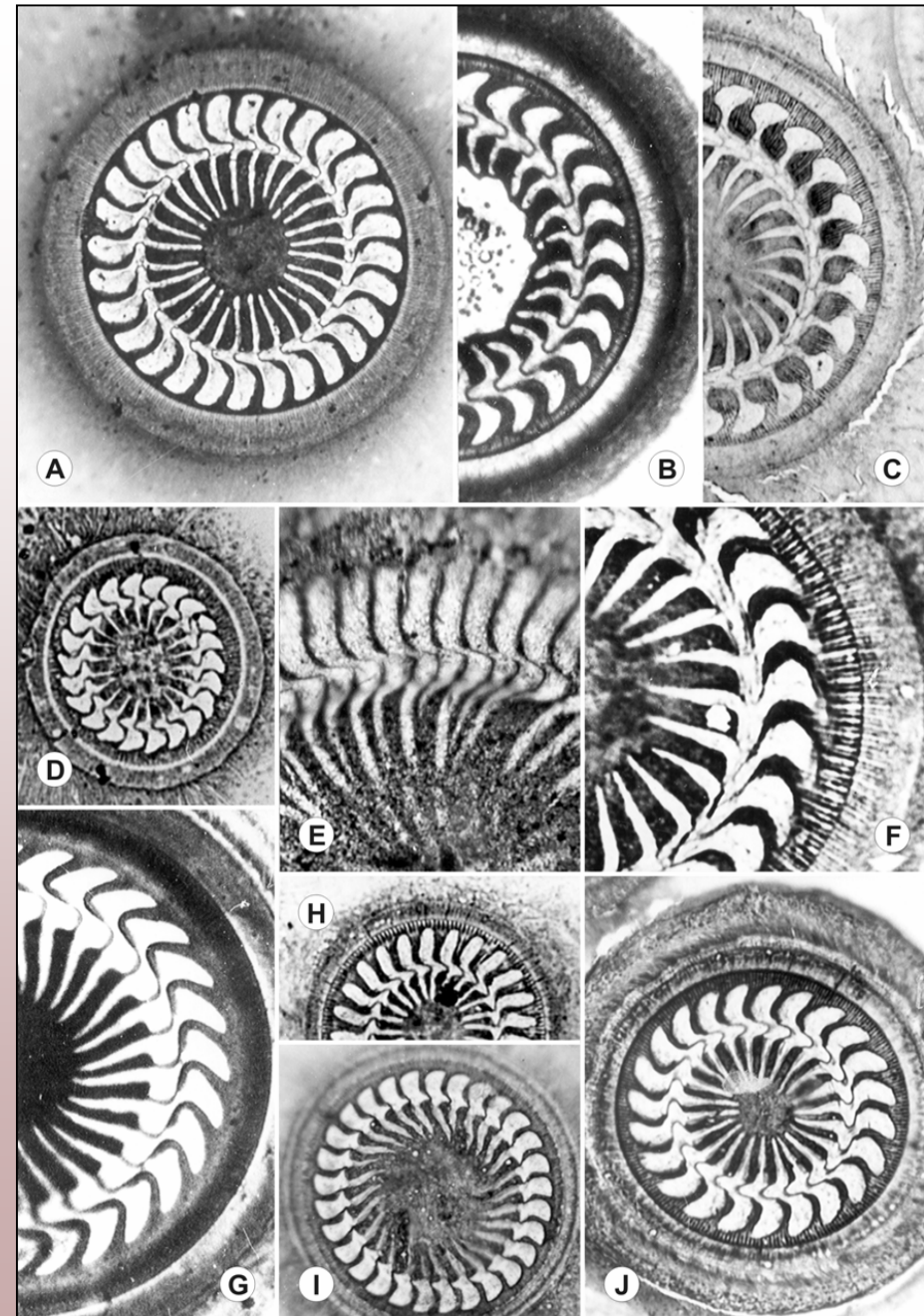
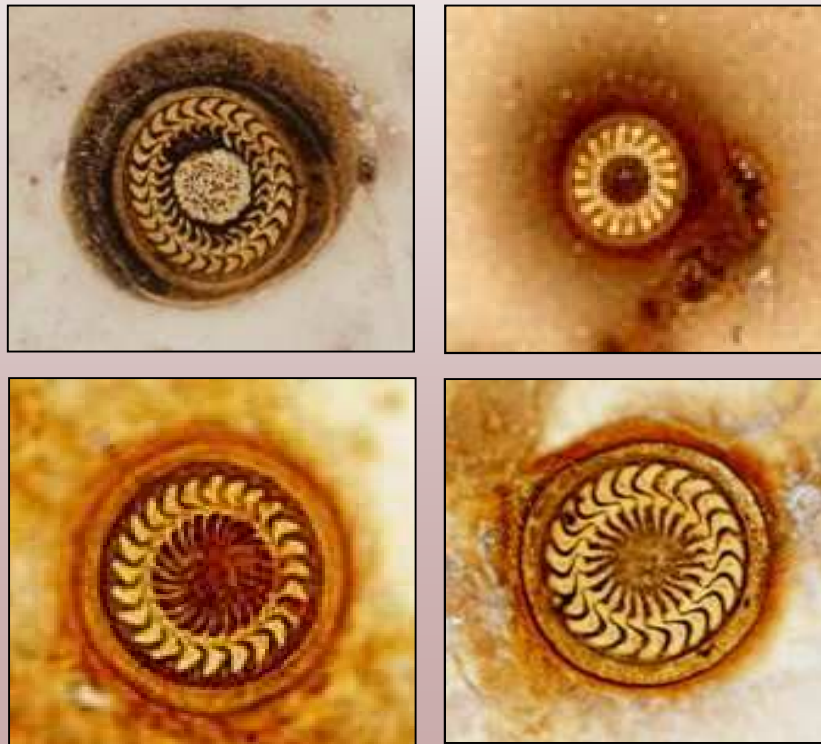


***Trichodina* sp.; *Trichodinella* sp.**

Kruhobrví nálevníci - Mobilina

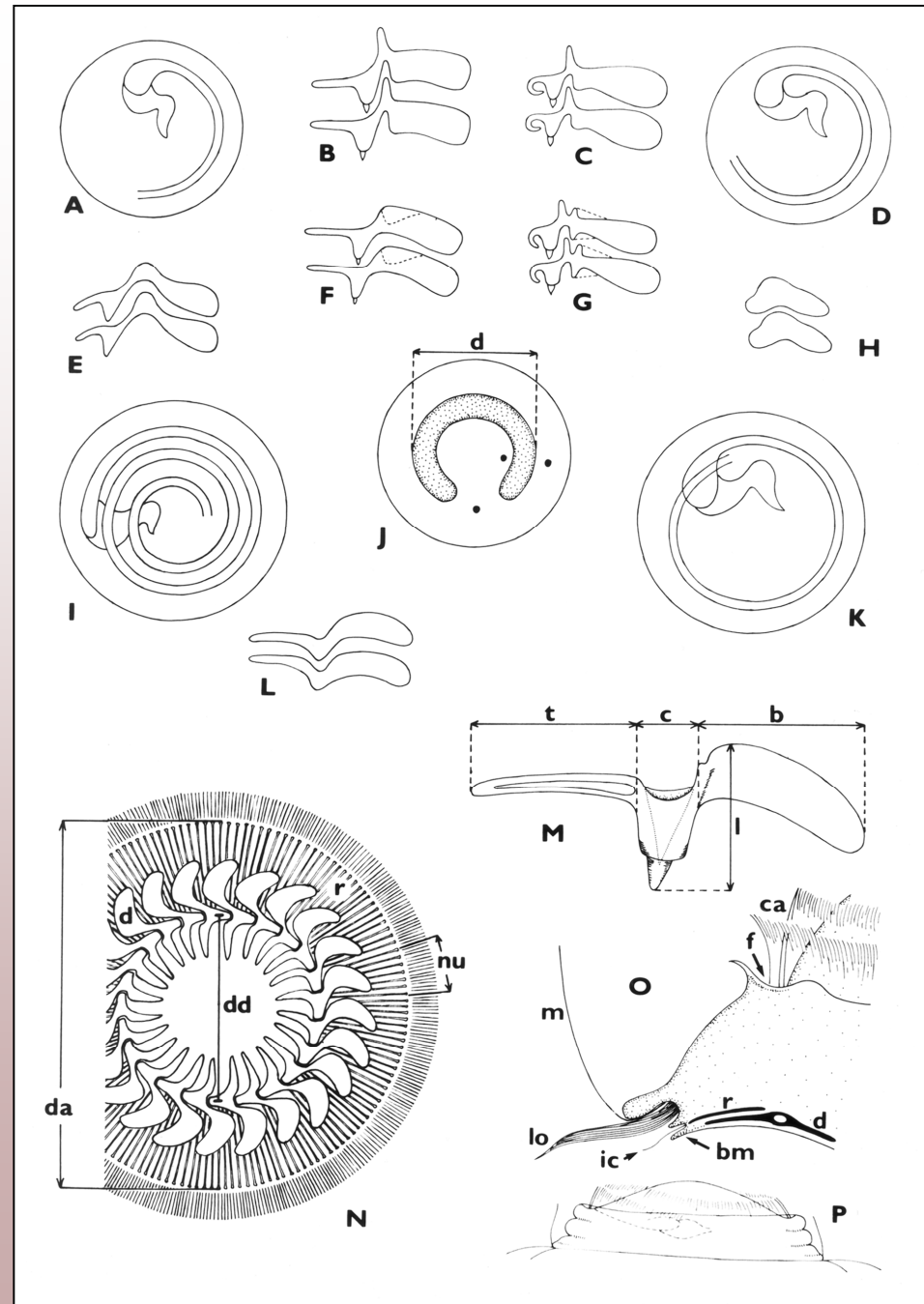
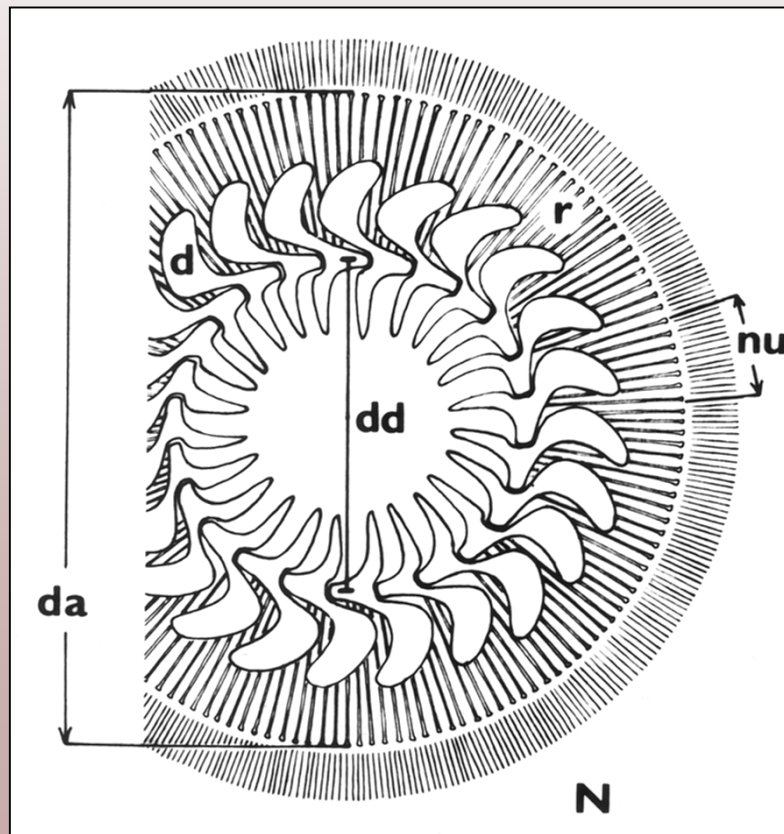
Příchytný disk impregnovaný stříbrem  
metodou podle Kleina:

Suchý roztěr, 2% AgNO<sub>3</sub> 8 min, ponořit  
do destil vody a působit UV 20-30 min



# Kresby diagnostických detailů trichodin A-P

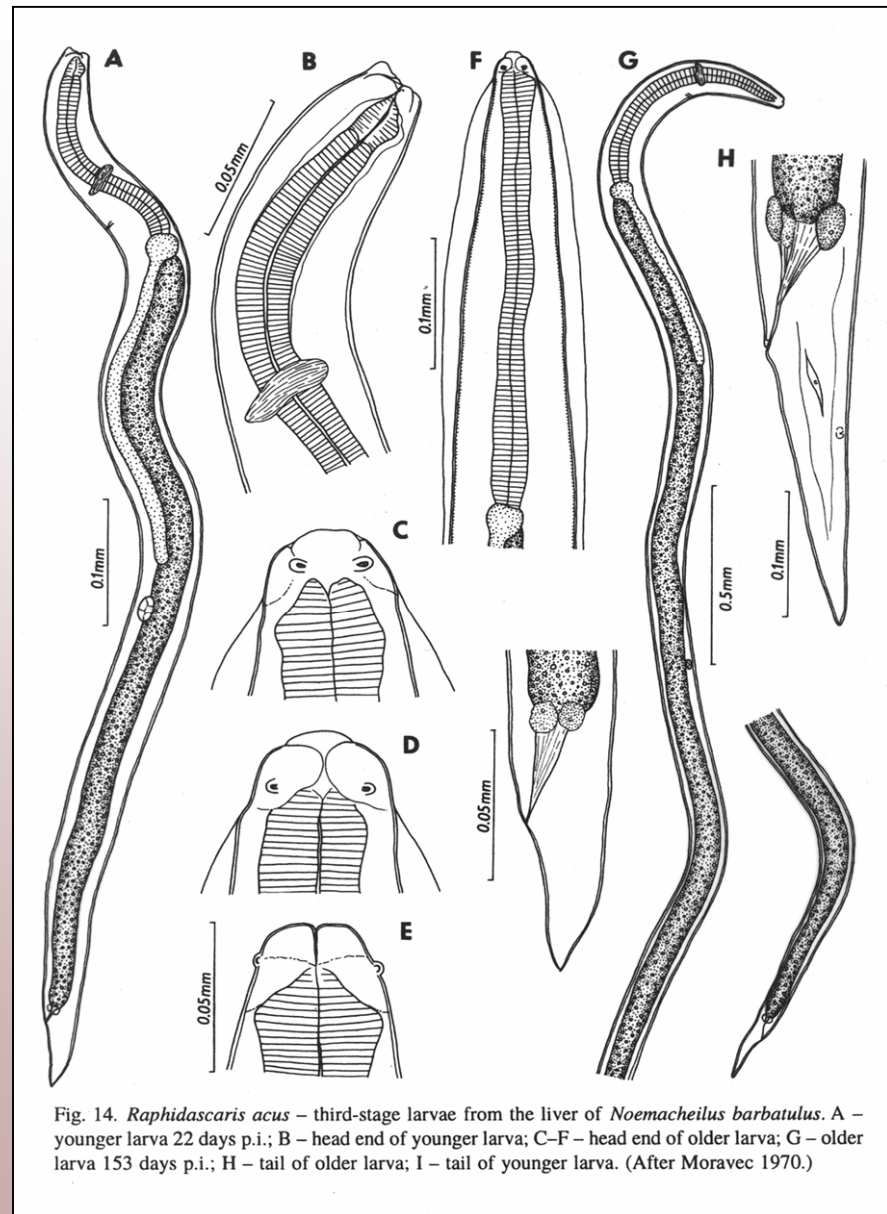
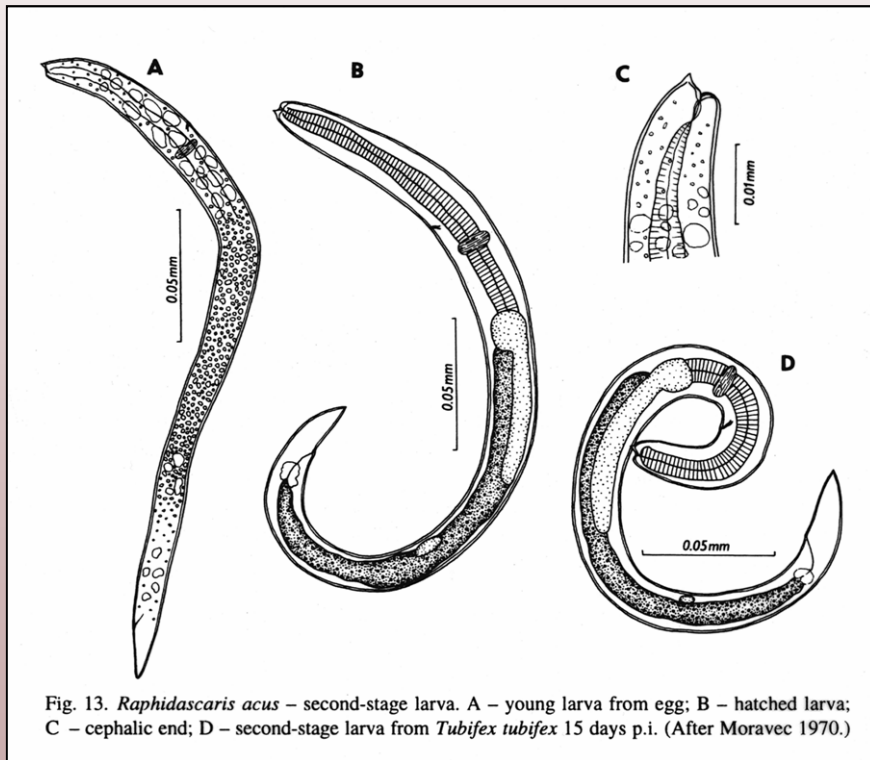
- d – zoubky adhezivního disku
- da – průměr adhezivního disku
- dd – průměr kruhu zoubků
- r – radiálně uspořádané tyčinky
- n – počet tyčinek na jeden zoubek





## Larvy nematodů *Raphidascaris acus*

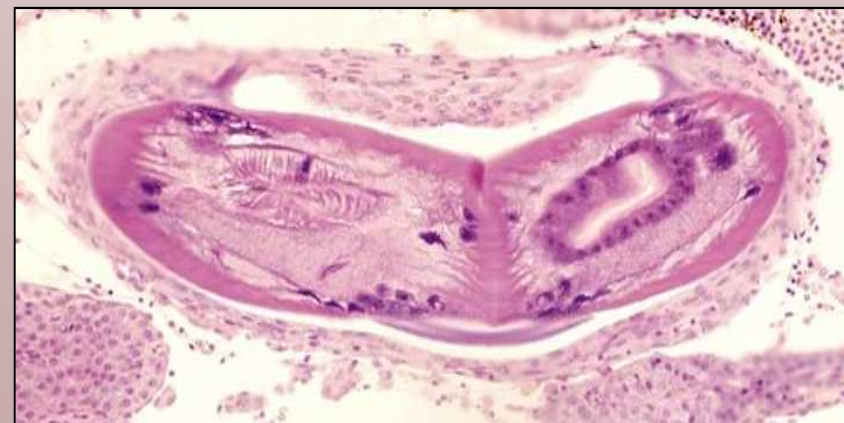
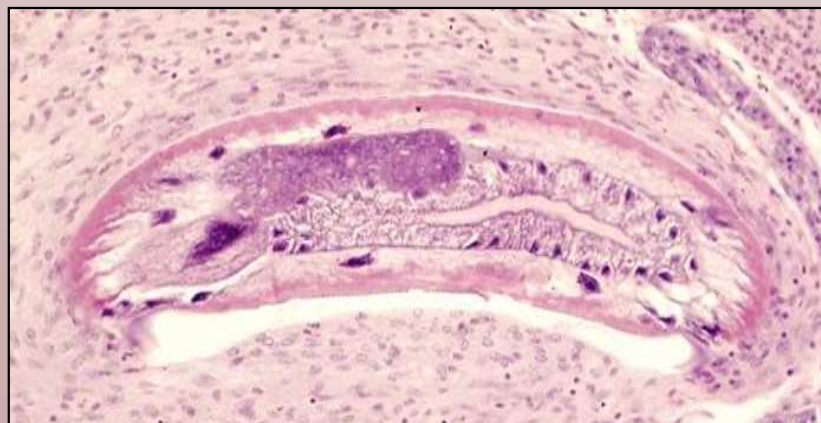
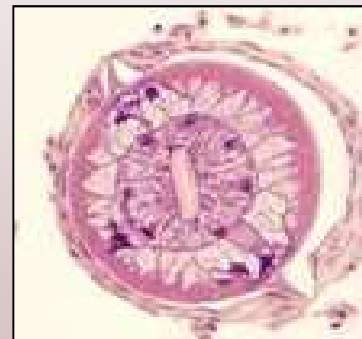
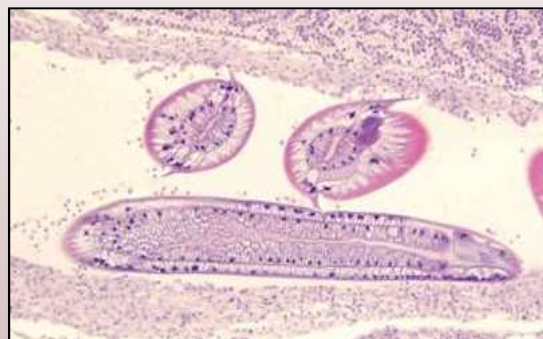
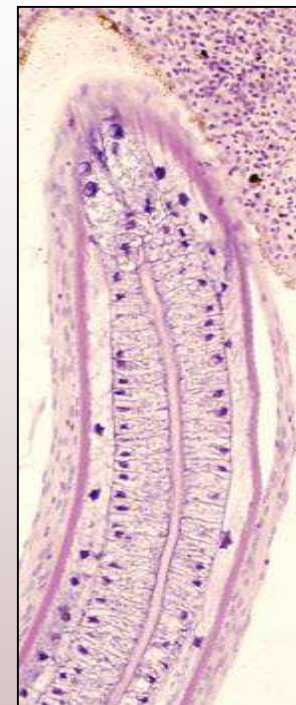
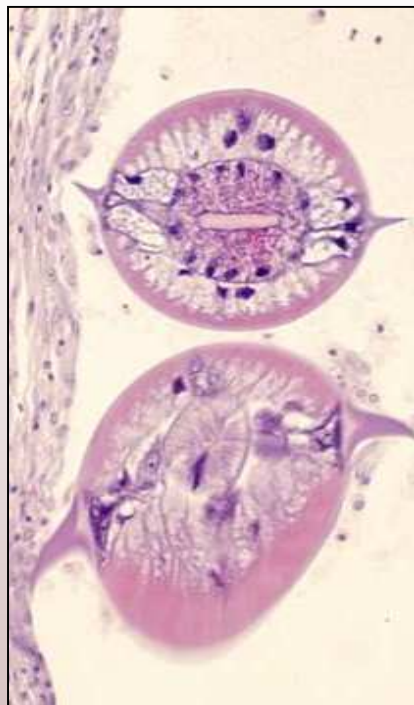
Larva z vajíčka (Fig. 13 A) a vylíhnutá larva (Fig. 13B), larva z nitěnky (Fig, 13.D)  
 Fig. 14 larvy z jater mřenky mramorované dokumentované po jejich uvolnění z tkáně



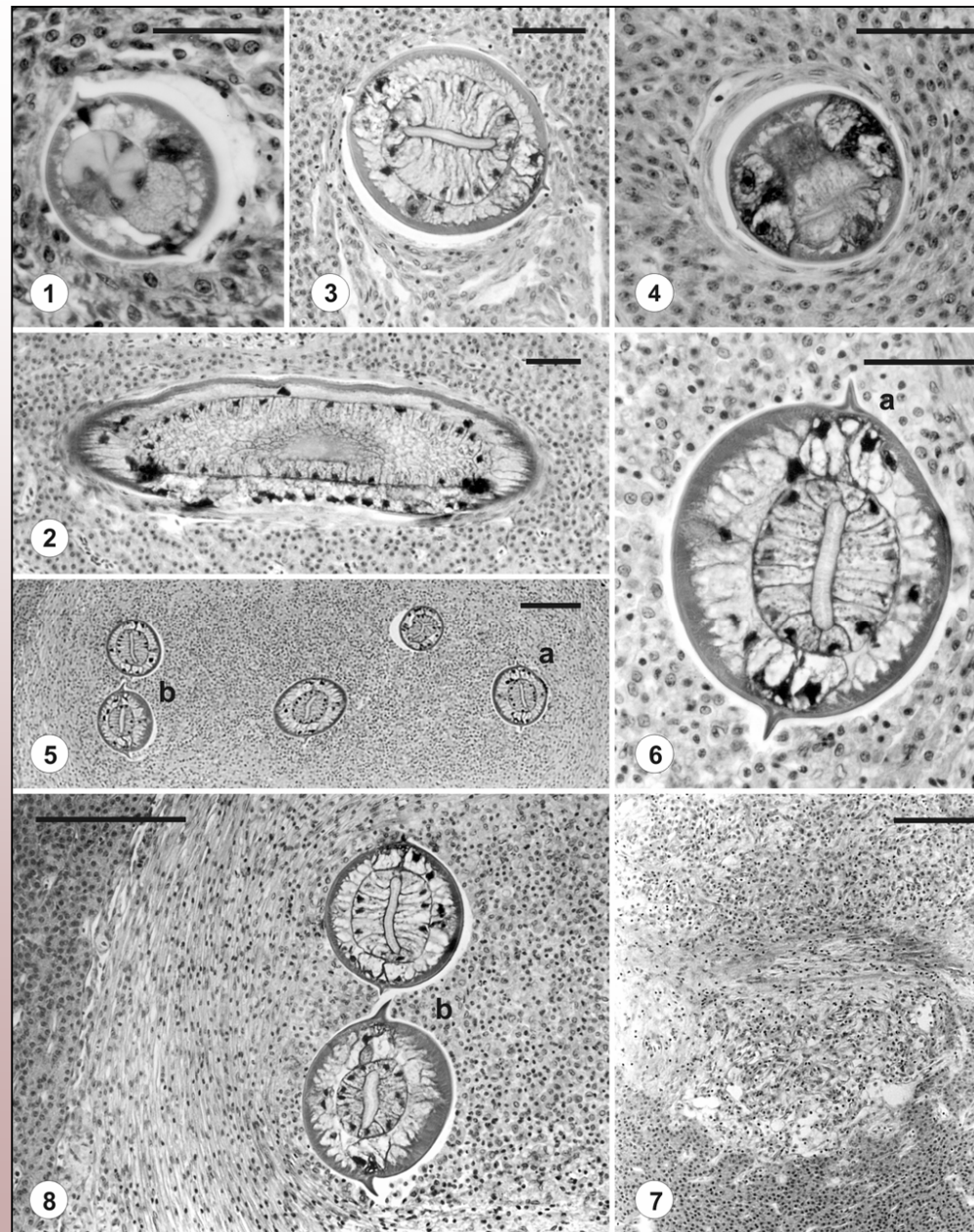
Moravec F.

## Larvy *Raphidascaris acus* v histologických řezech

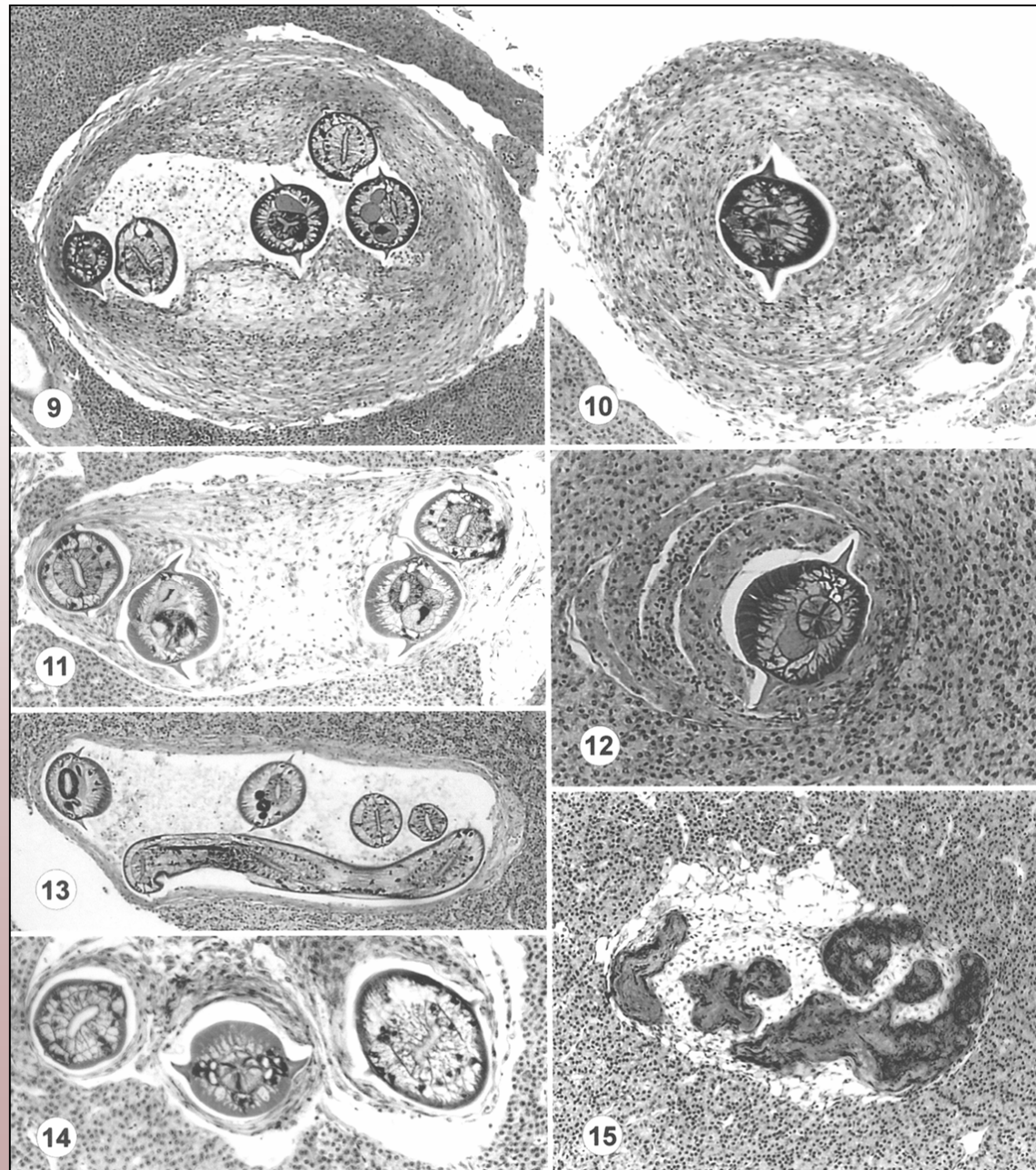
Pro kreslení - najít co nejlepší řez (příčný) s jasnými detaily struktury



Larvy nematodů *Raphidascaris acus*– černobílá reprodukce

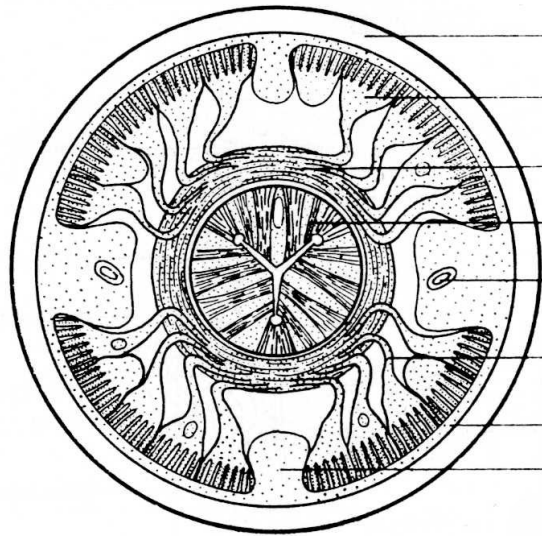


Larvy nematodů *Raphidascaris acus* – černobílá reprodukce



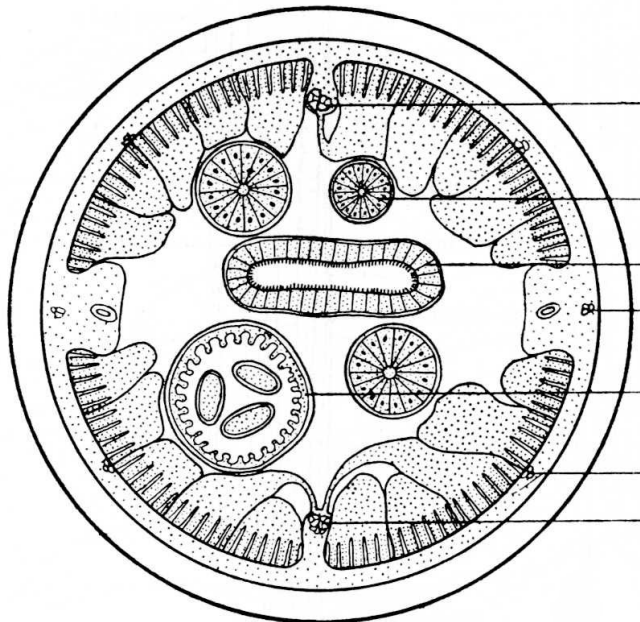
Příčné průřezy tělem nematoda v úrovni hltanu (A), ve střední části těla (B)

A



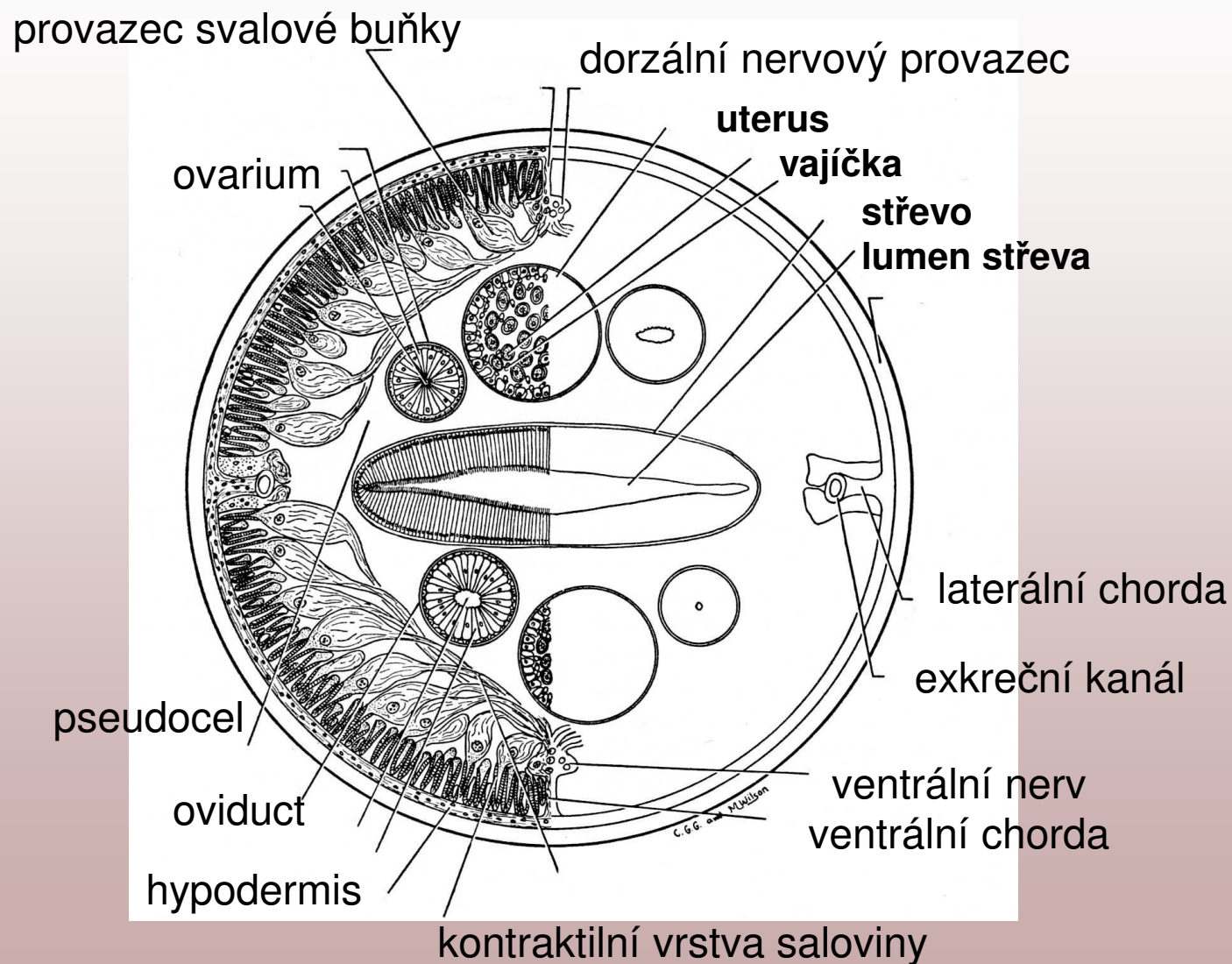
- kutikula
- svalovina
- nervový prstenec
- hltan
- exkreční kanál
- inervační výběžek
- hypodermis
- ventrální nervový provazec

B

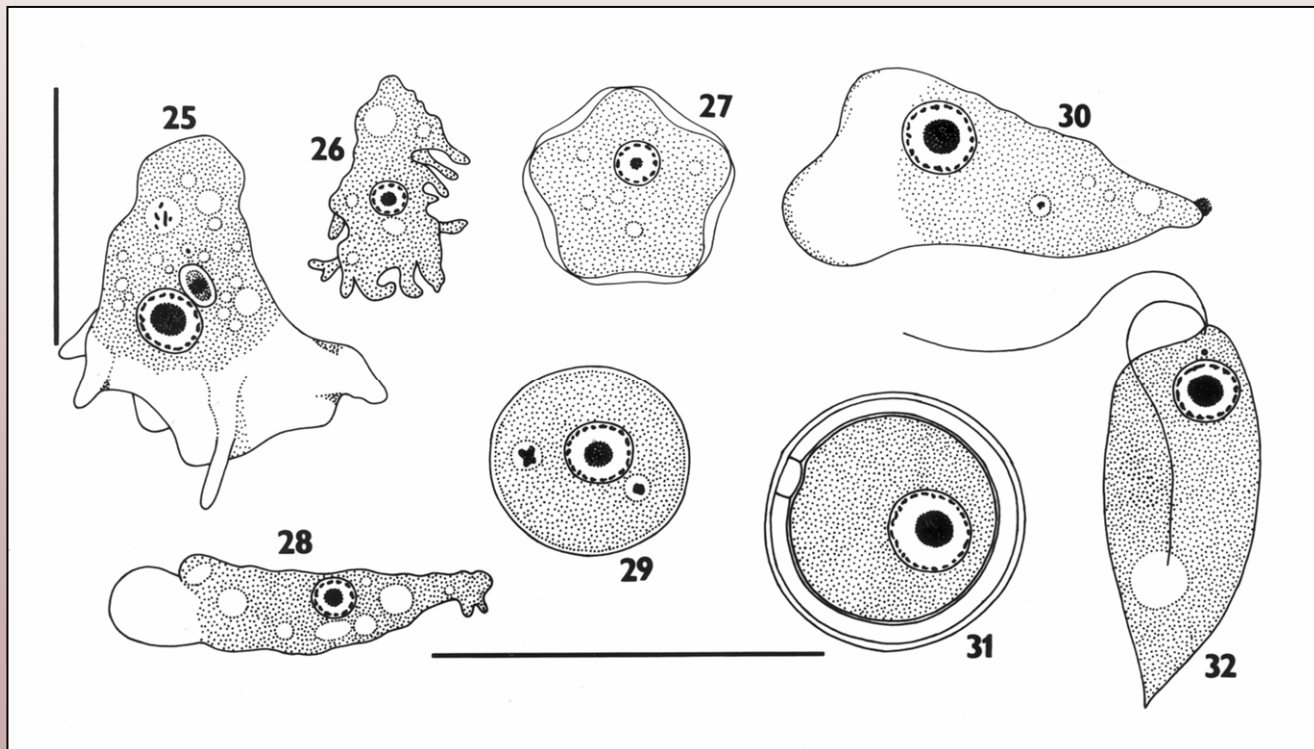


- dorsální nerv
- ovarium
- střevo
- laterální nerv
- děloha
- subventrální nerv
- ventrální nerv

## Příčný řez *Ascaris lumbricoides* v úrovni samičích gonád



# Trofozoity améb (PFG a LOS7N) - Nomarski DIC versus procházející světlo



[https://www.nikoninstruments.com/cz\\_CZ/Ucit-se-a-zkoumat/Techniky](https://www.nikoninstruments.com/cz_CZ/Ucit-se-a-zkoumat/Techniky)





*Blepharisma americanum* CCAP 1607/I