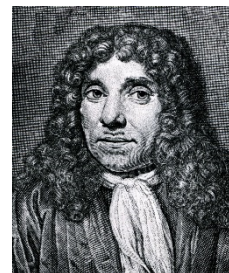


## Dobrodružství mikroskopie aneb Když biologové využívají fyziku (řešení)

(1) Záznamy o prvních mikroskopech pocházejí z přelomu 16. a 17. století, za zakladatele mikroskopie je tradičně považován Nizozemec Antoni van Leeuwenhoek (na obr.). Z téže země pocházejí i Hans a Zacharias Janssenovi, kteří sestrojili mikroskop dokonce ještě o několik let dříve. Ani jeden z nich však nebyl přírodovědec. Zjistěte, jaká byla povolání těchto mužů. Jaký to mělo vliv na to, že právě oni stáli u zrodu mikroskopie?



**Leeuwenhoek: obchodník s textilem, chtěl kontrolovat kvalitu tkanin i na mikroskopické úrovni. Janssenovi: výrobci brýlí, experimentovali se skládáním čoček do optických soustav.**

(2) Mikroskopie se může na první pohled jevit jako „pomocný“ obor sloužící biologům, v němž samotným nedochází k převratným objevům. Opak je však pravdou, badatelé pracující na rozvoji mikroskopie získali několik Nobelových cen! Zjistěte, za co a v jaké oblasti byly tyto ceny uděleny, pomůže vám následující tabulka.



Rok udělení	Objev (oblast)
1953	<b>metoda fázového kontrastu, fyzika</b>
1986	<b>elektronový mikroskop, fyzika</b>
2014	<b>superrezoluční mikroskopie, chemie</b>
2017	<b>kryoelektronová mikroskopie, chemie</b>

(3) Pozorování objektů ve světelném mikroskopu je podmíněno nastavením správné pozice jeho jednotlivých optických členů, především objektivu a kondenzoru. Polohu objektivu, a tedy rovinu ostrosti, upravujeme pomocí zaostřovacího šroubu. Správnou výšku kondenzoru pak snadno najdeme, pokud dodržíme postup tzv. Köhlerova osvětlení. K čemu ale kondenzor slouží a jaké důsledky má chybné nastavení jeho pozice?



**Úkolem kondenzoru je soustředění světla vycházejícího ze světelného zdroje do rovnoměrného svazku směřujícího do preparátu. Při chybném nastavení jeho pozice není preparát vhodně/dostatečně osvětlen (pozorované struktury nejsou dobře viditelné, vznikají artefakty atp.).**

(4) Při hodnocení kvality mikroskopu většinu lidí zajímá jeho zvětšení. To je jistě důležité, avšak neméně zásadní je i jeho rozlišovací schopnost. Prakticky jde o vzdálenost dvou bodů, které mikroskop rozezná jako dva samostatné body. Tedy čím nižší rozlišovací schopnost, tím lépe. Rozlišovací schopnost je definována vzorcem  $d = (1,22 \cdot \lambda) / (2 \cdot NA)$ , kde  $d$  je rozlišovací schopnost,  $\lambda$  vlnová délka použitého světla a  $NA$  numerická apertura (vlastnost objektivu). Vyhledejte vlnové délky světla různých barev a rozhodněte, kterou barvu je vhodné použít, abychom dosáhli co nejlepší rozlišovací schopnosti?



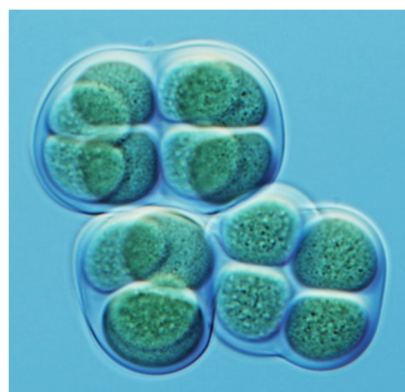
**Nejvýhodnější je modré světlo, má nejnižší vlnovou délku. Ta je ve jmenovateli uvedeného vztahu, proto při použití modrého světla dostaneme nejnižší hodnotu jmenovatele, tedy nejlepší možnou rozlišovací schopnost.**

(5) Některé biologické objekty jsou přirozeně barevné a v mikroskopu je lze díky tomu snadno pozorovat (např. list mechu měříku s chloroplasty, pokožka červené cibule s vakuolami apod.). Řada objektů je však nebarevná (např. protista, savčí buňky apod.), a tedy hůře viditelná. Takové objekty můžeme nabarvit nebo jejich kontrast zvýšit některou z technik speciální světelné mikroskopie. Doplňte následující tabulku, která srovnává dvě z těchto technik dostupných na školních mikroskopech.

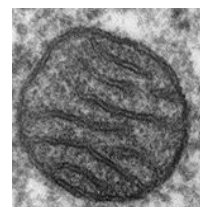
Technika	Typický obraz (napoví vám obrázek)	Princip
Temné pole 	<b>tmavé/černé pozadí, vysoký kontrast ostře vystouplých okrajů pozorovaných objektů</b>	<b>nepřímý osvit – zastínění střední části světelného kužele → do objektivu vstupuje pouze světlo rozptýlené preparátem (je ho málo)</b>
Fázový kontrast 	<b>tmavší/šedé pozadí, kontrastní kontury, výrazný haló efekt kolem pozorovaných objektů</b>	<b>fázový posun světelných vln ne/procházejících pozorovaným objektem a jejich interference → převedení změny fáze na změnu amplitudy (intenzity) světla</b>

(6) V biologii je hojně využívána i pokročilá technika světelné mikroskopie, která pracuje s interferencí paprsků polarizovaného světla, jež procházejí pozorovaným objektem. Jde o techniku, která objektům propůjčuje plastický reliéf, vzniká dojem „3D efektu“ (viz obrázek, sinice *Chroococcus* sp.). Jak se tato technika jmenuje?

**Nomarského / diferenciální interferenční kontrast (NIC, DIC)**



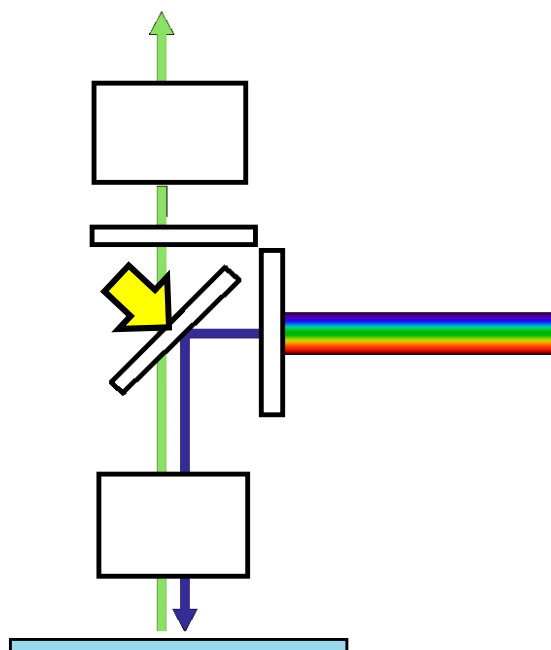
(7) V 1. polovině 20. století spatřily světlo světa elektronové mikroskopy: nejprve transmisní (1931), poté skenovací (1942). Především ty prvně jmenované posunuly možnosti biologů při studiu vnitřní struktury buněk (na obrázku mitochondrie pozorovaná transmisním elektronovým mikroskopem). Popište, v čem spočívají hlavní rozdíly mezi světelným a elektronovým mikroskopem (zaměřte se především na princip vzniku obrazu a možnosti zvětšení).



**Světelný mikroskop: obraz vytváří proud fotonů, použití skleněných čoček, mez rozlišení asi 0,2 μm (prakticky v řádu jednotek mikrometru). Elektronový mikroskop: obraz vytváří proud elektronů, elektromagnetické čočky, mez rozlišení asi 0,2 nm (prakticky v řádu jednotek nanometru).**

(8) Většina buněčných biologů si dnes neumí představit experimentální práci bez fluorescenčního mikroskopu. Jeho významnou součástí je tzv. dichroické zrcátko. Označte dichroické zrcátko ve schématu fluorescenčního mikroskopu (vpravo) a s využitím obrázku popište jeho funkci.

**Dichroické zrcátko odráží excitační záření (v obrázku modře) do pozorovaného objektu a do okulárů či kamery pak propouští pouze záření emitované (v obrázku zeleně).**



(9) Moderní mikroskopie nabízí celou řadu technik, z nichž každá se hodí pro trochu jiné účely. Představte si, že chcete pozorovat objekty/struktury uvedené v následující tabulce. Doplňte, jakou mikroskopickou techniku využijete a krátce zdůvodněte.

Pozorovaný objekt/struktura	Použitá technika a zdůvodnění
Struktury na povrchu krovek tesaříka	<b>skenovací elektronová mikroskopie – elektronový svazek rasstruje povrch pozorovaného objektu a odhaluje jeho jemnou strukturu</b>
Nativní preparát živých trypanosom	<b>fázový kontrast – trypanosomy jsou malá nekontrastní protista, při pozorování v běžném procházejícím světle nejsou bez velkého zclonění téměř patrné</b>
Trvalý preparát blechy	<b>běžná mikroskopie v procházejícím světle, blecha je přirozeně barevný, tedy dobře kontrastní objekt</b>
Vnitřní stavba chloroplastu rozsivky	<b>transmisní elektronová mikroskopie – vhodná pro studium buněčné ultrastruktury (zobrazení membrán apod.)</b>
Buňky exprimující GFP	<b>fluorescenční mikroskopie – sledování fluorescenčního proteinu (excitace fluoroforu a detekce emitovaného záření)</b>