Tematický celek Rostlinná buňka, mikroskopování, aplikovaná genetika

Cíl laboratorní práce

Cílem je seznámit studenty s novými metodami v mikroskopování, s principem fluorescence. Studenti si vyzkouší práci na fluorescenčním mikroskopu. Ověří si schopnost některých látek posouvat vlnovou délku záření. Některé z těchto látek patří mezi autofluorochromy. Plníme očekávané výstupy ŠVP oblasti Člověk a příroda: žáci pochopí stavbu, funkci a životní projevy eukaryotních buněk, vysvětlí význam diferenciace a specializace buněk pro mnohobuněčné organismy, analyzují možnosti využití znalostí z oblastí genetiky v běžném životě. V tomto laboratorním cvičení můžeme uplatnit mezipředmětové vztahy s fyzikou v tématu Optika.

Konkrétní úkoly

1. Připravte a pozorujte vhodné preparáty (viz pomůcky a postup) v mikroskopu bez fluorescence
2. Připravte a pozorujte tyto preparáty s autofluoreskujícími objekty v mikroskopu s fluorescencí
3. Vyberte jeden z preparátů, zakreslete oba obrazy a srovnejte viditelnost struktur
4. Připravte preparát s bukálním stěrem barvený akridinovou oranží
5. Pokud jsou k dispozici, pozorujte připravené fluorescenční preparáty

Časová náročnost:

90 minut, je nutno domluvit zapůjčení fluorescenčního mikroskopu na Přf UK Praha na adrese http://www.prirodovedci.cz , žákům připravit materiál, žáci vypracují zápis z laboratorní práce (do PL)

Potřebné pomůcky:

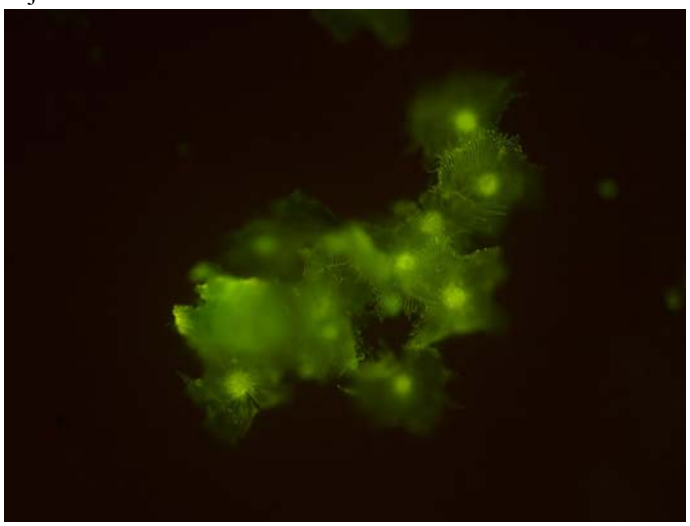
- mikroskop, fluorescenční mikroskop, mikroskopovací pomůcky
- listy či stonky, pyl rostlin, zelené řasy, fototrofní krásnoočka, vlasy, chlupy, hmyz
- párátka na bukální stěr, líh, akridinová oranž, střička s vodou
- fluorescenčně označené preparáty

Příprava a postup

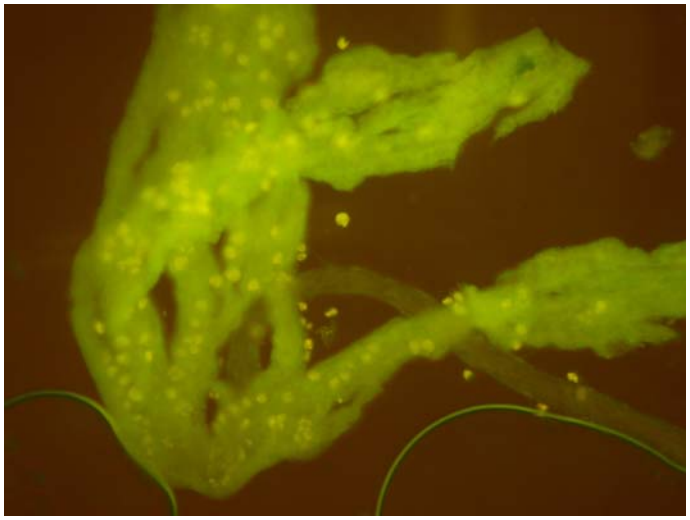
Připravte si dopředu, s dostatečným časovým předstihem, školení nutné pro možnost zapůjčení fluorescenčního mikroskopu na Přírodovědecké fakultě v Praze. Po té je možno domluvit si na školu týdenní zapůjčení fluorescenčního mikroskopu.
Mikroskop je transmisní typ fluorescenčního mikroskopu, je jednodušší, než v současnosti více oblíbený, epifluorescenční typ, kde prochází světlo opakovaně objektivem. Fluorescenční mikroskop je druhem optického mikroskopu, který využívá posunu vlnové délky mezi dopadajícím světlem a emitovaným světlem. U mikroskopu excitační světlo dopadá na preparát a emisní světlo se odráží do objektivu.
Excitační filtr propouští z barevného spektra pouze část potřebnou pro excitaci fluorescence, v našem případě modrou. Bariérový filtr propouští pouze emisní část spektra a zabraňuje průchodu excitačnímu světlu, které by jinak vše přesvětlilo. Látky se schopností posunout vlnovou délku záření nazýváme fluorochromy. Mezi autofluorochromy, tedy látky s přirozenou fluorescencí patří např. chlorofyl, chitin nebo kreatin. Některé fluorochromy se používají ke značení struktur, se kterými se váží např. akridinová oranž barví DNA zeleně a RNA červeně. Často se používá přenesený gen medúzy pohárovky, GFP značkující různé struktury, na základě přenesení genu do plazmidu bakterie, která je např. rezistentní na určité antibiotikum, exprese genu pro rezistenci a současně genu odpovídajícího za bílkovinu se schopností typické zářivě zelené fluorescence, umožní identifikaci buněk s rezistencí na dané antibiotikum. Jiným využitím může být navázání GFP (green fluorescence protein)
na protilátky, které se specificky váží na povrchové struktury buněk, na antigeny např. na MHC II, takto lze sledovat makrofágy či jiné imunitní bky nebo rakovinné bky (např. HeLa bky, linie odvozená z buněk karcinomu děložního čípku).
Upozorníme žáky na správný postup tvorby vodních i suchých preparátů, aby neměli příliš mohutný kus, aby jej opatrně rozvolnili či udělali, co nejtenčí řezy. Zopakujeme správnou práci s mikroskopem, pozorování nejprve nejmenším zvětšením

atd. Pozorované organismy žáci nezakreslí všechny, pouze vybrané preparáty pro srovnání mezi běžným mikroskopem a fluorescencí, případně dle možností můžete vytvořit i fotografie.

Nejenže studenty seznámíte s novou metodou, ale můžete jim předvést, že „Věda je krásná“, jak byla nedávno pojmenovaná i výstava fotografií pořádaná Universitou Karlovou v Karolinu. A proto přikládám ilustračně několik fotografií, mnoho dalších najdete na internetu.



Trichomy hlošiny úzkolisté (vlastní zdroj)



Lišejník: houbová vlákna, jasně zářící řasa (vlastní zdroj)

POUŽITÉ ZDROJE:

[1] Fluorescenční mikroskopie. *www.natur.cuni.cz* [online]. [cit. 2012-01-20]. Dostupné z: http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/fluorescencni.html

[2] Přednáška pro pedagogy SŠ k zapůjčení fluorescence. Přírodovědecká fakulta UK, 2010. Přednáška.

[3] Úvodní přednáška fluorescence. Přírodovědecká fakulta UK, 2011. Přednáška.