

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Téma: Fluorescence

Úkol:

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 srovnajte viditelnost struktur
4. Připravte preparát s bukální stěrem barvený akridinovou oranží
5. Pokud jsou k dispozici, pozorujte připravené fluorescenční preparáty

Teorie:

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. Tento transmisní typ mikroskopu je jednodušší, v současnosti je více oblíbený epifluorescenční typ, kde je prochází světlo opakovaně objektivem.

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 nebo kreatin. Některé fluorochromy se používají ke značení struktur, se kterými se váží např. akridinová oranž barví DNA zeleně a RNA červeně nebo se používá přenesený gen medúzy pohárovky GFP (green fluorescence protein) značující různé struktury např. makrofágy nebo buňky rezistentní na určité antibiotikum.

Pomůcky:

mikroskop, fluorescenční mikroskop, mikroskopovací pomůcky, listy či stonky, pyl rostlin, vlasy, chlupy, hmyz, párátko na bukální stěr, líh, akridinová oranž, stříčka s vodou, fluorescenčně označené preparáty.

Postup:

Úkol č. 1: Z materiálu, který je k dispozici připravte vodní preparáty a pozorujte je pod mikroskopem. Vhodné jsou řezy stonků nebo listů, pozorování pylu, zelené řasy, fototrofní krásnoočka. Vlasy nebo chlupy různých živočichů je možné pozorovat jako suché preparáty. Můžete pozorovat také preparáty s hmyzem.

Úkol č. 2: Tytéž preparáty pozorujte pod fluorescenčním mikroskopem

Úkol č. 3: Jeden z preparátů si vyberte a pro srovnání zakreslete oba obrazy. Popište pozorované struktury

Úkol č. 4:

1. Setřete epiteliální buňky sliznice v ústní dutině pomocí párátko
2. Resuspendujte buňky ve fyziologickém roztoku či slinách
3. Rozetřete po podložním sklíčku a nechte zaschnout
4. Deset minut nechte zafixovat denaturovaným lihmem
5. K obarvení použijte akridinovou oranž, kterou nechte stékat k recyklaci (z misky vracíme do zkušavky)
6. Jemně omyjeme vodou, překryjeme sklíčkem a pozorujeme

Úkol č. 5: Pozorujte připravené značené preparáty, u fluorescence se vystřídejte, запиšte, co jste pozorovali.