

1. Analýza obrazu

1.3 Čo prezradí svetlo o bunkách?

FLUORESCENČNÉ ZOBRAZOVANIE V BIOLÓGII

Sú veci, ktoré bežne nevidíme. Ale sú aj spôsoby, ako ich zviditeľniť.

Úloha 1:

Nakreslite na čierny papier kvet alebo napíšte názov ľubovoľnej rastliny perom s neviditeľným atramentom.

Nápis sa dá prečítať len ak ho osvetlíte UV svetlom na zatienenom mieste.

Vezmite ručné UV svetlo, hárok čierneho papiera preložte na polovicu a otočte ho tak, aby ste odclonili svetlo z okna. Ešte lepšie slúži škatuľa, ktorej vnútro vysteliete čiernym papierom. Osvetlite zatienený nápis či kresbu, aby sa dal rozoznať.



Obr. 1: Nápis sa objaví v UV svetle.

Poznámka

Dbajte na bezpečnosť!

Aj keď bežne predávané UV baterky svietia v oblasti UV-A, nevyžarujú svetlo nebezpečnej vlnovej dĺžky. UV-A svetlá sa používajú aj na diskotékach (tzv. black light).

Nebezpečná vlnová dĺžka je 100 - 315 nm, UV-B a UV-C.

Používajte **svietidlá emitujúce v oblasti 390-400 nm.**

Niektoré lacné výrobky môžu vyžarovať veľa svetla aj vo viditeľnej oblasti, čo môže byť v prípade niektorých pozorovaní rušivé.

Effekt môže byť slabší aj v triede s veľkými oknami, alebo keď je slnečný deň. Odporúčame zatemniť okná.

Pozor na zrak, nesviette do očí, môžete ich poškodiť. UV svetlo použite len na nevyhnutný čas.

Nezabudnite svetlo hneď po použití vypnúť.

Otázka 1:

Ako je možné, že nápis, ktorý pri dennom svetle nevidíme, osvetlený ultrafialovým svetlom žiari?

Ide o jav **fluorescencie**, keď objekt pohltí (absorbuje) časť energie ÚV žiarenia a zvyšnú časť vyžiari (emituje) ako viditeľné svetlo s vyššou vlnovou dĺžkou. Farba vyžarovaného svetla závisí od jeho vlnovej dĺžky. ÚV žiarenie má vlnovú dĺžku 100 - 400 nm, viditeľné svetlo 400 – 700 nm.

Čo fluoreskuje?

Fluoreskujú niektoré chemické látky. Sú to najmä tie, ktorých molekula má konjugované benzénové jadrá alebo iné cyklické časti molekúl s konjugovanými dvojíťmi väzbami. Mnoho takých látok sa tvorí v živých organizmoch. Ich časti, v ktorých sa tieto látky tvoria alebo ukladajú, pri osvetlení svetlom účinnej vlnovej dĺžky fluoreskujú. V tomto prípade hovoríme o **autofluorescencii**.

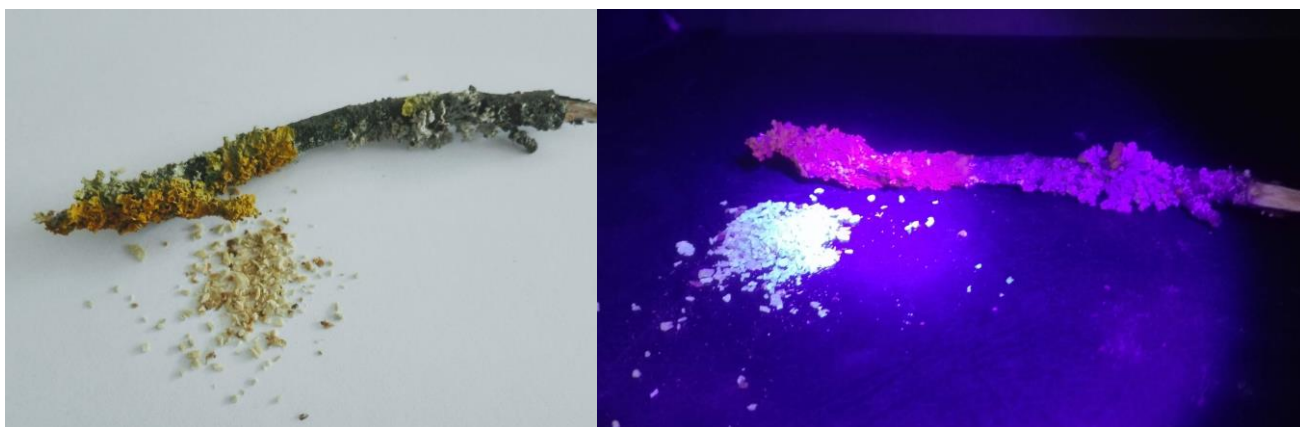
Otázka 2:

Čo si myslíte, ktoré živé organizmy v našom prostredí tvoria fluoreskujúce látky?

Nie každý rastlinný materiál obsahuje fluoreskujúce látky. Skúste niektoré otestovať.

Farba po osvetlení ultrafialovým svetlom sa často zmení, inokedy len rozjasní. Veľa živých objektov však zostáva v UV svetle tmavých.

Vyberte si a otestujte niekoľko z pripravených prírodnín.



Obr. 2: V ultrafialovom svetle emituje žltý lišajník diskovník múrový, ktorým je obrastený konárik, cyklámenovo-ružové svetlo. Naľavo mu konkuruje iný lišajník, ktorý nejaví fluorescenciu. Rozsypaná zelená káva žiari bledomodro. Jav sa naplno rozvinie asi po minúte osvitú, potom flurescencia postupne vyhasína.

Úloha 2:

Dajú sa živé bunky, ktoré nejavia fluorescenciu, zafarbiť aby svietili?

Uskutočnite nasledujúce pozorovanie. Vyberte zo zväzňovača pinzetou vnútro a dajte ho do kadičky s vodou. Vo vode sa rozpustí fluoreskujúca látka. Zasviette na roztok UV svetlom.

Navrhnite pokus nafarbenie pletív rastlín, ktoré nefluoreskujú. Pokus uskutočnite.

Kým čakáte na výsledok, experimentujte s fluorescenciou biologických objektov vplyvom UV svetla.

Námety na pozorovanie fluorescence rôznych farieb:

- Povarte vo vode bez soli kúsok čerstvej kukurice na varenie, stačí spoločne pre celú triedu. Vodu zlejte, ochladte a rozdeľte skupinám v malých sklenených kadičkách.
- Otestujte vodu v ktorej varíte iba zrná kukurice (môžu byť aj mrazené).
- Vylúhujte vo vode kôru z vetvičiek jaseňa.
- Povarte krátko vo vode zelené listy. Hodí sa špenát alebo hociktorá divo rastúca rastlina. Rozdrvte v tretej miske s liehom (75 %) a scedte.
- Povarte listy čerstvej mäty a scedte.
- Na staršom chlebe rozpoznáte, kde sa začínajú množiť plesne.
- Rozpoznáte začínajúcu hnilobu na ovocí, ktorú spôsobuje plesň sivá (*Bothrytis cinerea*), nie všetky mikroskopické huby fluoreskujú.

Súčasný biologický výskum sa nezaobíde bez mikroskopov, ktoré využívajú jav fluorescence.

Úloha 3:

Pozorne sleduj film. Poznačte si, ktoré životné deje buniek si postrehol z fluorescenčných videozáznamov. Zapište, čo sa deje s rozličnými bunkami na zázname:

<https://www.youtube.com/watch?v=XDcf6P9Fpvw>

Farbenie rôznych štruktúr bunky vhodnými fluorescenčnými proteínmi ich pomáha lepšie vizuálne odlíšiť. Ktoré štruktúry sú dobre viditeľné na nasledujúcom zázname?

<https://www.youtube.com/watch?v=Dzt4b0EQGww>

Fluorescenčný mikroskop sa podobá na optický mikroskop, má však ďalší zdroj svetla, ktorý generuje UV žiarenie. UV svetlo prechádza cez excitačné filtre. Od ich konkrétnej kombinácie závisí, ktorá vlnová dĺžka žiarenia sa dostane k preparátu. Musí to byť tá, ktorá vyvolá fluorescenciu skúmaného objektu. Dôležitý je aj bariérový filter, ktorý odfiltruje škodlivé zložky UV svetla, aby sa nedostali k pozorovateľovi.

Konfokálny mikroskop využíva tiež jav fluorescence, ale v porovnaní s fluorescenčným mikroskopom disponuje vysokou rozlišovacou schopnosťou. Zaostruje len v definovanej rovine preparátu, výkonný LASER osvetľuje bod po bode len túto rovinu. Následne pokračuje snímaním ďalších optických rovín. Skenovanie preparátu je automatizované a riadené počítačom. Počítač zo získaných dát zostaví výsledný obraz. Ten je veľmi ostrý a umožňuje presné merania

Porovnajte nasledujúce dva videozáznamy:

Črevička (*Paramecium*)

Fluorescenčný mikroskop - https://www.youtube.com/watch?v=Ug75k_ovQzg

Konfokálny mikroskop - <https://www.youtube.com/watch?v=nQasNwerV6c>

Otázka 3:

Aké možnosti poskytujú biológom mikroskopy založené na fluorescencii?

Uvažujte a zapisujte, aké informácie možno získať o živých bunkách prostredníctvom fluorescenčného a konfokálneho mikroskopu. Zdieľajte svoje nápady so spolužiakmi.

Výsledok pokusu z úlohy 2:

Ak už prešlo dostatok času, aby ste získali dôkaz, že biologický objekt (v našom prípade rastlina) sa dá zafarbiť fluorescenčnou látkou, osvetlite UV svetlom rastlinu, ktorú ste mali v roztoku farbiva (najprv stonku zľahka osušte papierovým obrúskom, umiestnite ju v tmavej škatuli).

Otázky:

Zafarbili sa pletivá rastliny fluoreskujúcou látkou rovnomerne?

Prečo?

Ako je možné túto skutočnosť využiť pri mikroskopickom pozorovaní pletív a tkanív?

Fluorescenčné farbivá sa označujú pojmom **fluorochromy**. Viazu sa len na určité štruktúry alebo molekuly v bunke, ktoré sa dajú potom mikroskopicky lokalizovať.

Spojte poznatky o meraní objektov s javom fluorescencie. Riešte úlohu 4/A alebo 4/B

Úloha 4/A:

Odmerajte dĺžku/plochu objektu ktorý fluoreskuje.

1. Pripravte na bielom papieri mierku, ktorá bude predstavovať 1 cm. Môže to byť papierové pravítko, milimetrový papier alebo ju narysujte.
2. Zhotovte fotografiu fluoreskujúceho objektu a mierky v tmavej škatuli (stačí tablet alebo smartfón, bez blesku!) Odporúčame oprieť lakte, aby fotka nebola rozmazaná. Uložte fotografiu na počítač (je jedno, či bezdrôtovo alebo cez kábel).
3. Otvorte fotografiu v programe Fiji.
4. Zistite veľkosť jednotky mierky na fotografii v pixeloch (označiť úsečkou, Analyze, measure).
5. Nastavte v časti Analyze, Set measurement zvolenú jednotku (cm alebo mm) a zodpovedajúci počet pixelov.
6. Nastavte úsečku na rozmer objektu, ktorý chcete odmerať a odmerajte ju (Analyze, measure).

Výsledok sa má zobraziť v jednotkách, ktoré ste zadali. Na vyzvanie učiteľa informujte ostatných čo ste odmerali, v akých jednotkách a koľko objekt meria.

Úloha 4/B:

Odmerajte na fotografii veľkosť plochy napadnutej hubou.

1. Otvorte fotografiu v programe Fiji.
2. Zistite veľkosť jednotky mierky na fotografii v pixeloch (označiť úsečkou, Analyze, measure).
3. Nastavte v časti Analyze, Set measurement zvolenú jednotku (cm alebo mm) a zodpovedajúci počet pixelov.
4. „Čarovnou paličkou“ vyznačte objekt (kurzor nastavte na jeho ľavý okraja kliknite).
5. Odmerajte vyznačenú plochu plochu (Analyze, measure).

Výsledok sa má zobraziť v jednotkách, ktoré ste zadali. Na vyzvanie učiteľa informujte ostatných čo ste odmerali, v akých jednotkách a koľko objekt meria.