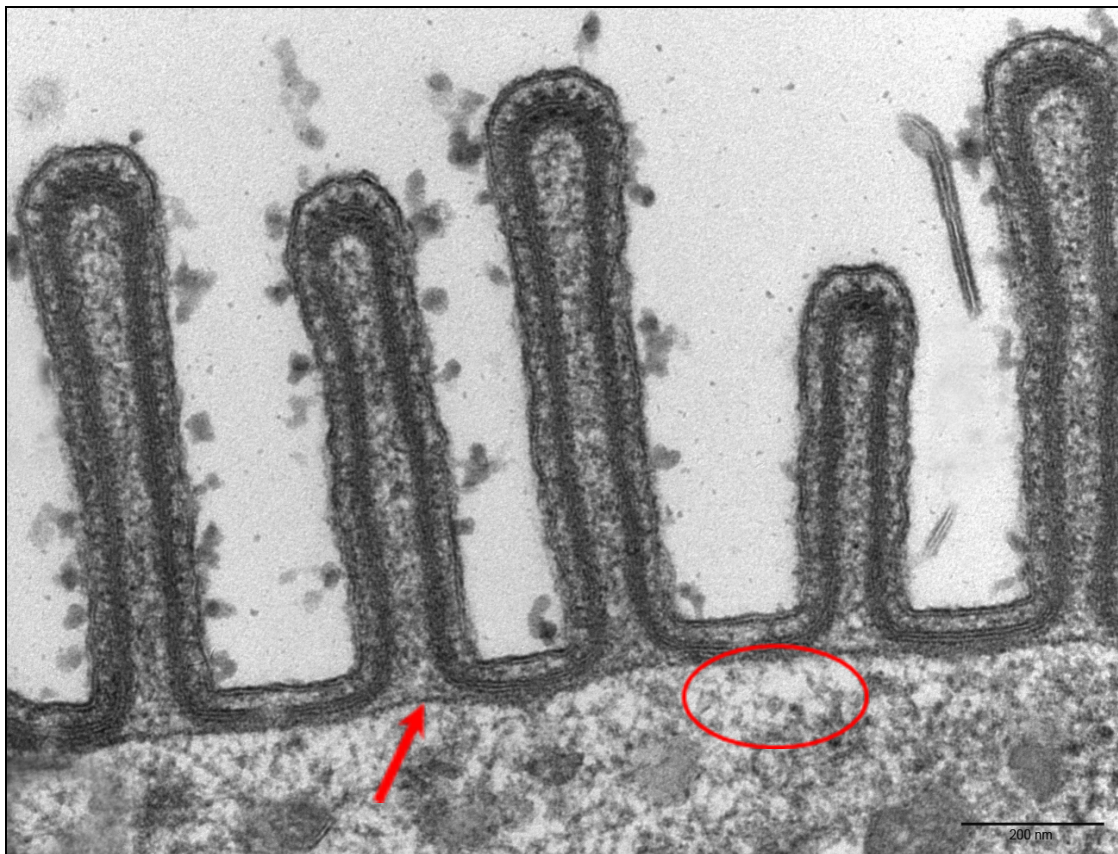


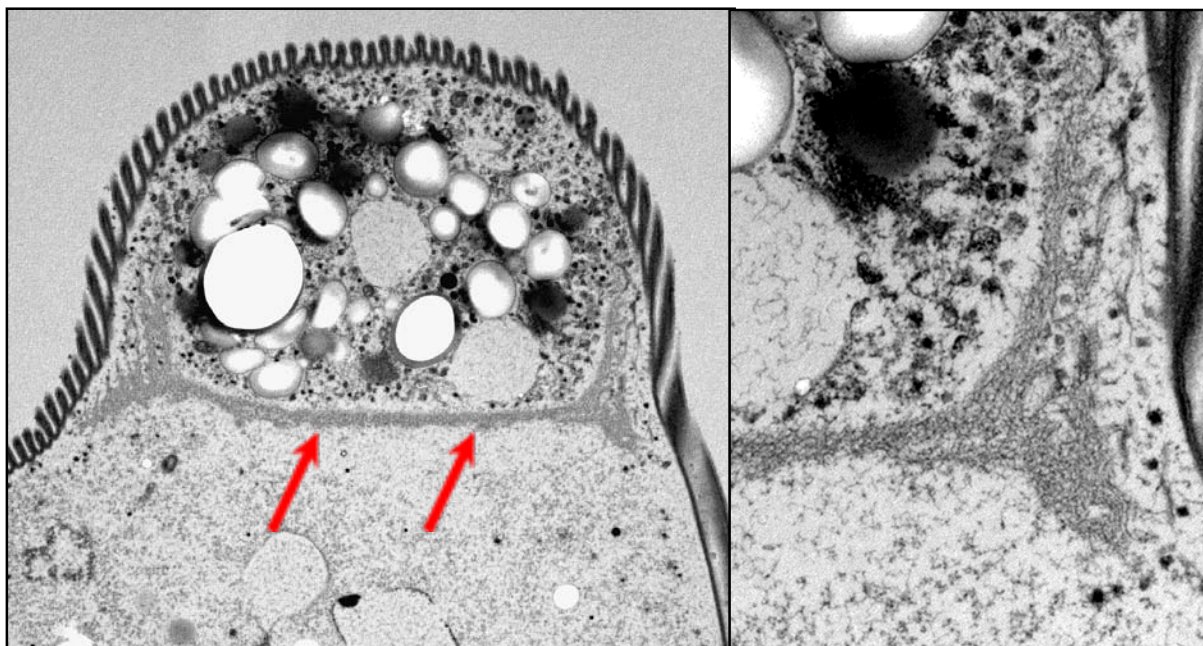
Příprava vzorků pro transmisní elektronový mikroskop

| | |
|--|------------------------------------|
| 2,5% GTA v 0,2M pufru (čerstvý!!!) | nejméně 4 hod |
| vypírací roztok (stejný pufr co byl použit pro fixáž)..... | 3 x 15 min |
| pufr (fosfátový) + 2% roztok OsO ₄ 1:1 | 2 hod |
| vypírací roztok | 3 x 15 min |
| 30% aceton | 15 min |
| 50% aceton | 15 min |
| 70% aceton | 15 min (možnost přerušit přes noc) |
| 80% aceton | 15 min |
| 90% aceton | 15 min |
| 95% aceton | 15 min |
| 100% aceton | 15 min |
| pryskyřice + aceton 1:2 | 1 hod |
| pryskyřice + aceton 1:1 | 1 hod |
| pryskyřice + aceton 2:1 | 1 hod |
| čistá pryskyřice (exikátor) | 24 hod |
| zalévat do formiček a dát do termostatu | 24 hod |

Materiál krájet na poloténkové řezy pomocí ultramikrotomu a dále na ultraténkové řezy. Poloténkové řezy barvit na sklíčku pomocí toluidinové modře. Ultraténkové řezy kontrastovat na síťkách pomocí uranylacetátu a lead citrátu. Velmi malé vzorky nebo suspence zalévat před a nebo těsně po fixaci do 2% agaru. Agar nejdříve zahřát asi na 100°C a nechat vychladnout na 62°C. Zalévat při 62°C, potom krájet na malé kousky a zpracovávat dle standardních postupů.



Obr. 1. Membránový komplex povrchového epicytu u *Gregarina garnhami*, interní lamina (šipka) a pórovité struktury. Transmisní elektronová mikroskopie.



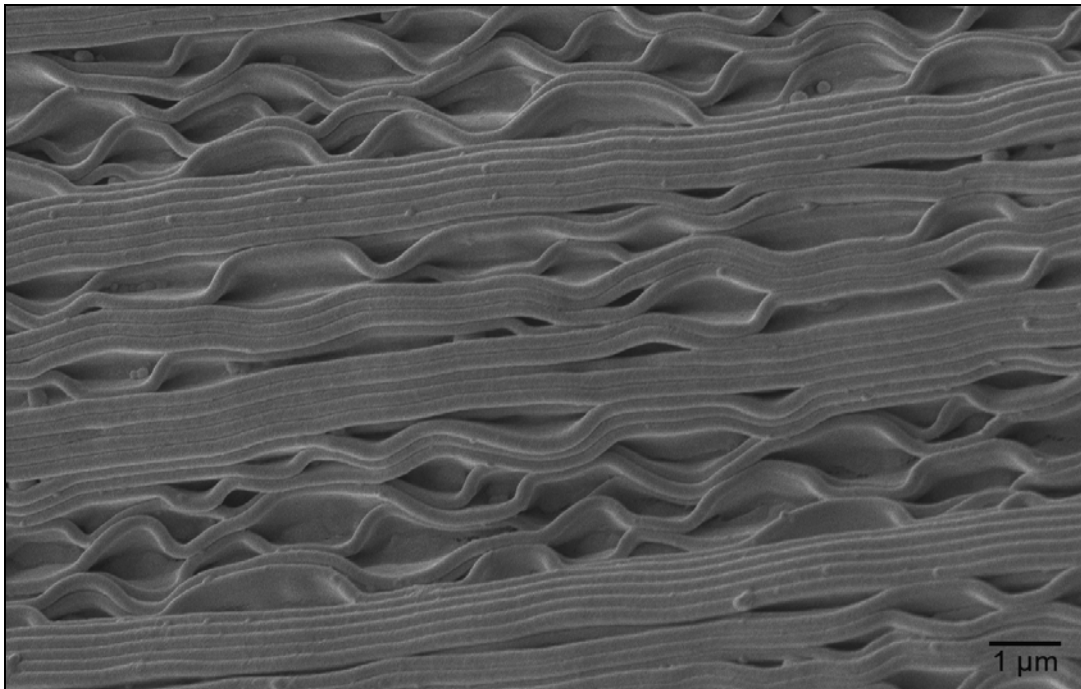
Obr. 2. Oblast protomeritu u *Gregarina polymorpha*. Viditelný je membránový komplex povrchového epicytu a septum (šipky) oddělující protomerit od deutomeritu. Transmisní elektronová mikroskopie.

Příprava vzorků pro skanovací elektronový mikroskop

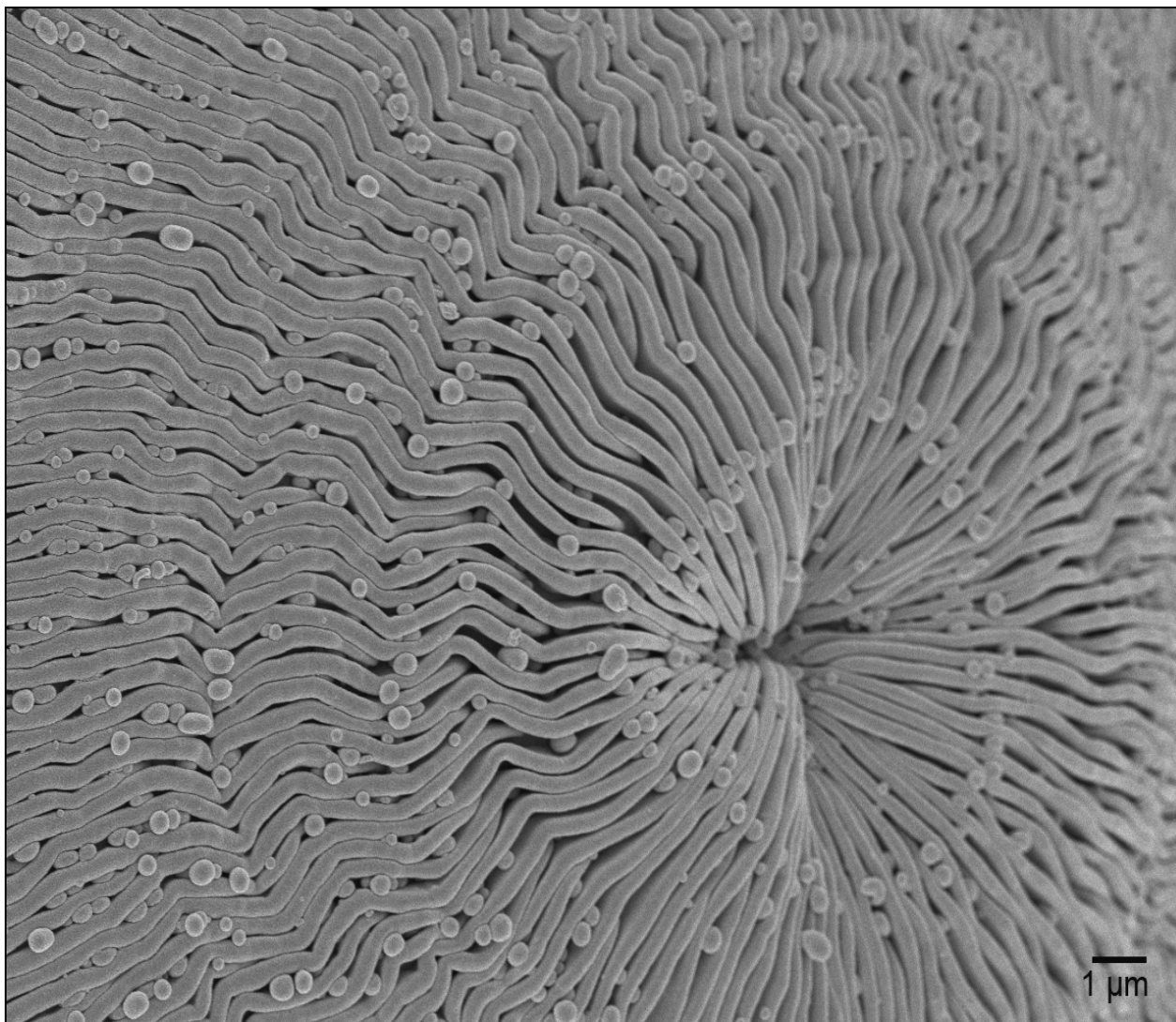
Parazitovanou tkáň nakrájet na malé kousky a ponořit do fixáže. Buněčné suspenze nakapat na kousky nalámaných z poly-L-lysinových sklíček (cca 6 mm²). Nechat buňky sednout a adherovat, pak celé sklíčka ponořit do fixáže.

| | |
|--|------------------------------------|
| 2,5-3 % GTA v 0,2M pufru (čerstvý!!!) | přes noc |
| vypírací roztok (stejný pufr co byl použit pro fixáž, pH 7.0)..... | 3 x15 min |
| pufr (fosfátový) + 2% roztok OsO ₄ 1:1 | 2 hod |
| vypírací roztok (stejný pufr co byl použit pro fixáž, pH 7.0)..... | 3 x15 min |
| 30% aceton | 15 min |
| 50% aceton | 15 min |
| 70% aceton | 15 min (možnost přerušit přes noc) |
| 80% aceton | 15 min |
| 90% aceton | 15 min |
| 95% aceton | 15 min |
| 100% aceton | 15 min |

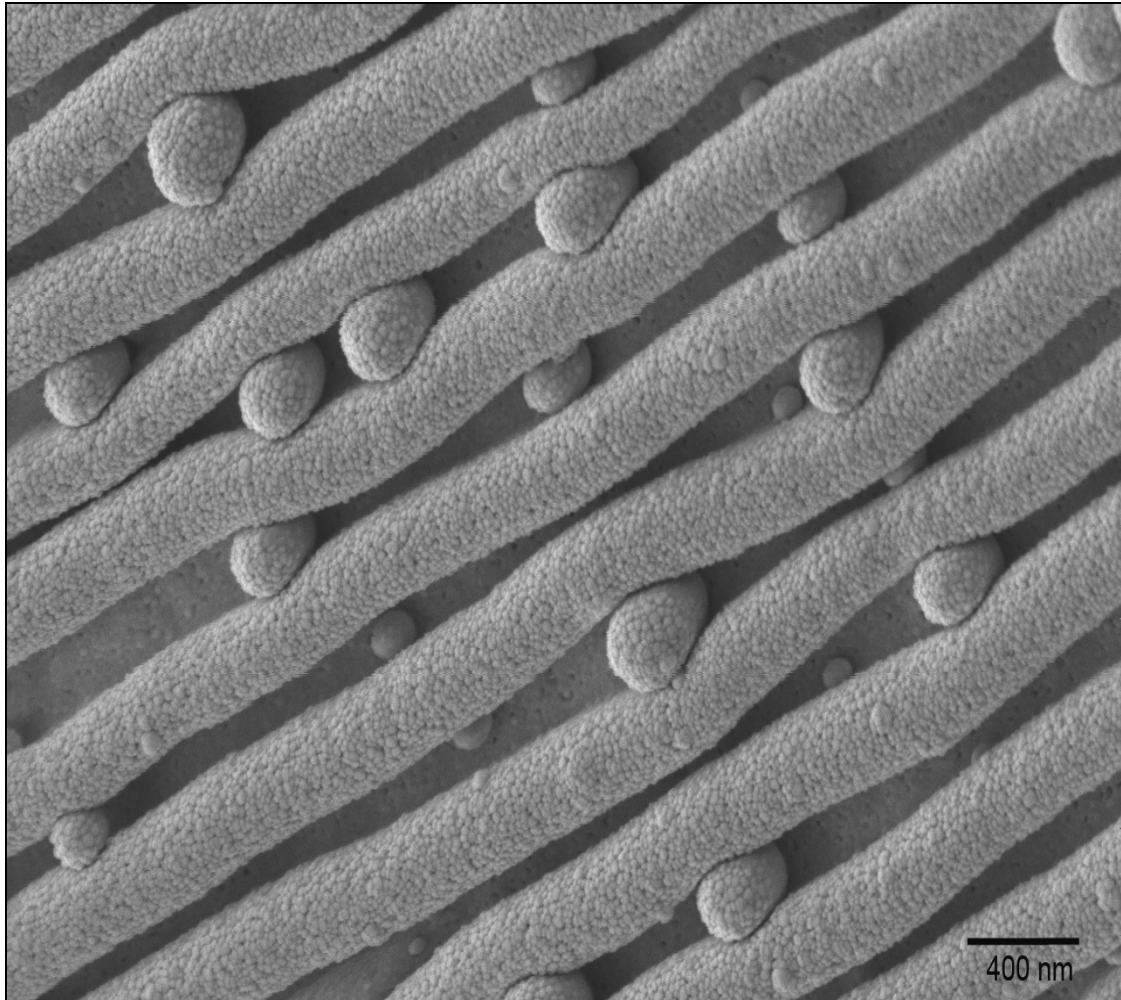
Vzorky vysušit při kritickém bodě použitím CO₂ a pokovit.



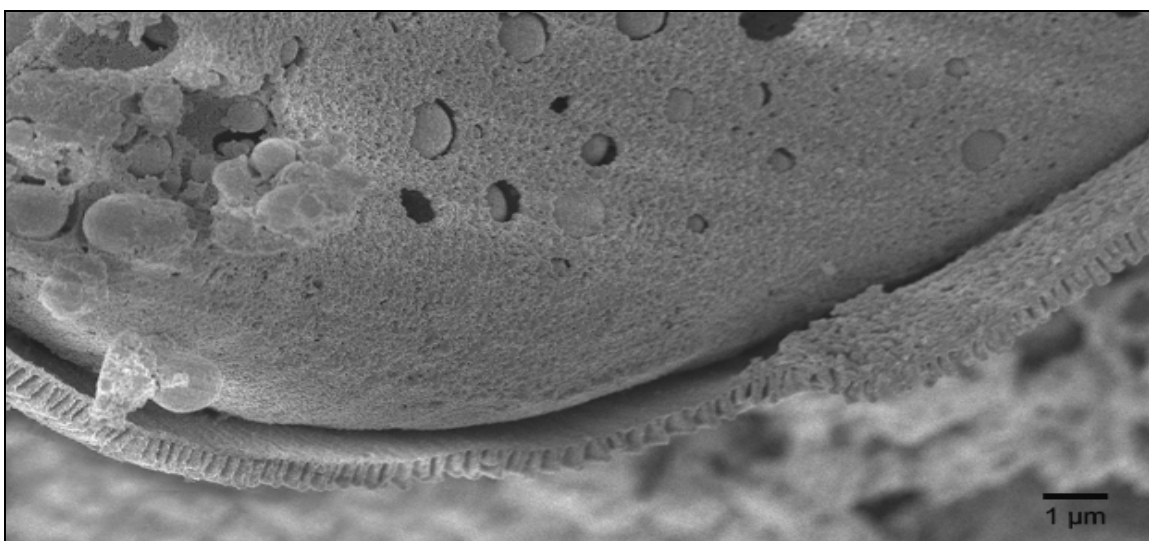
Obr. 3. Zvlnění záhybů epicytu na povrchu deutomeritu v důsledku pohybu buňky u *Gregarina garnhami*. Skenovací elektronová mikroskopie.



Obr. 4. Povrchové epicytární záhyby apikální části protomeritu na místě po zatažení epimeritu u gamonta *Gregarina garnhami*. Skenovací elektronová mikroskopie.



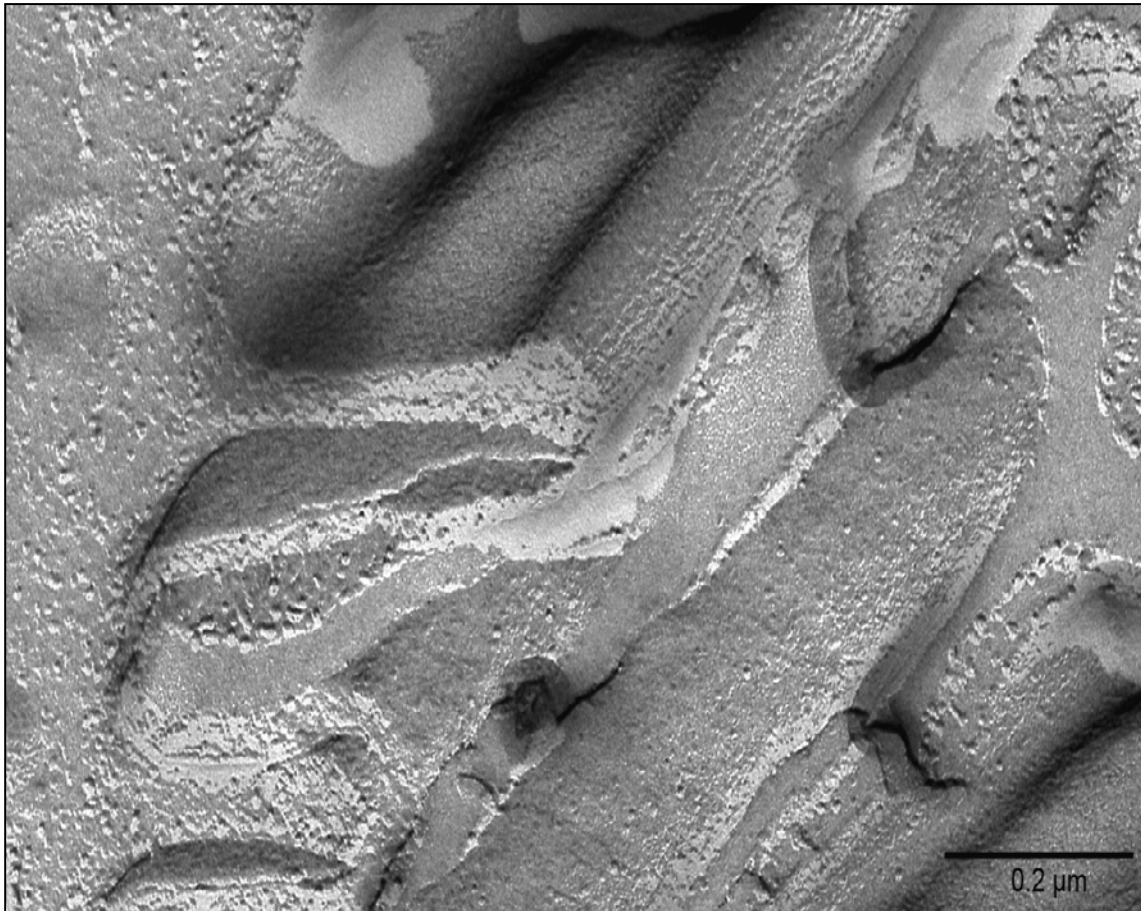
Obr. 5. Povrchový epicyt u *Gregarina garnhami*. Viditelné jsou kapky mukosubstance mezi záhyby epicytu. Skenovací elektronová mikroskopie.



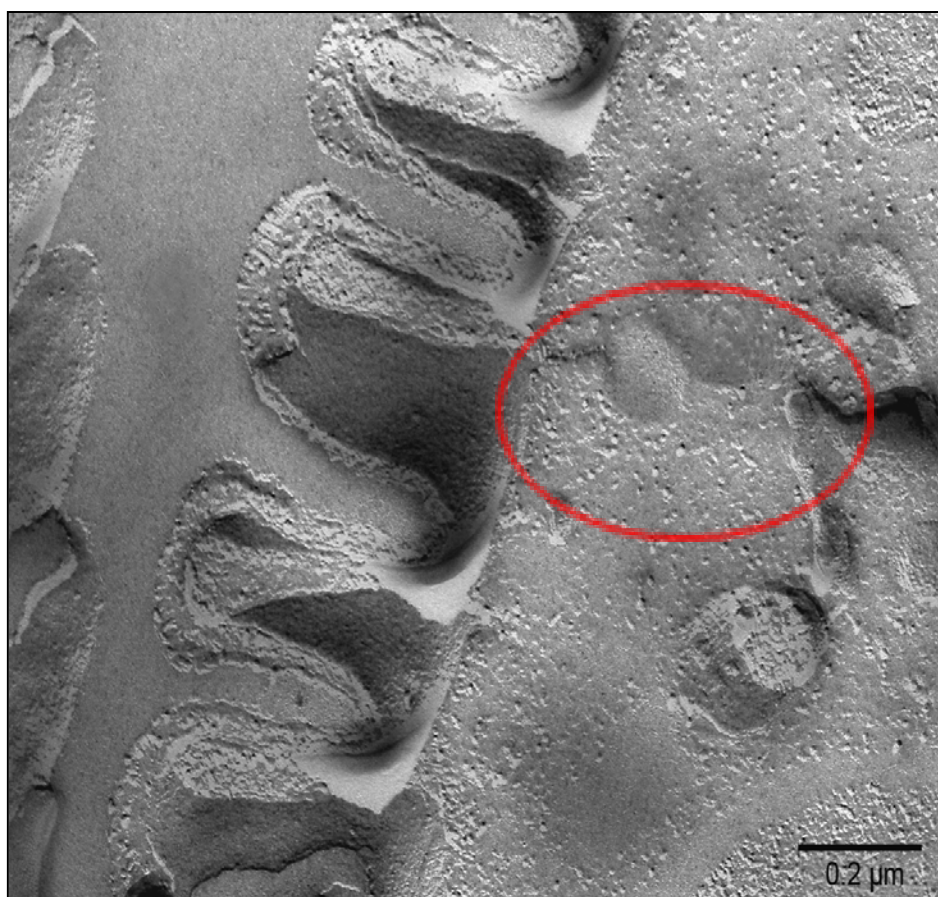
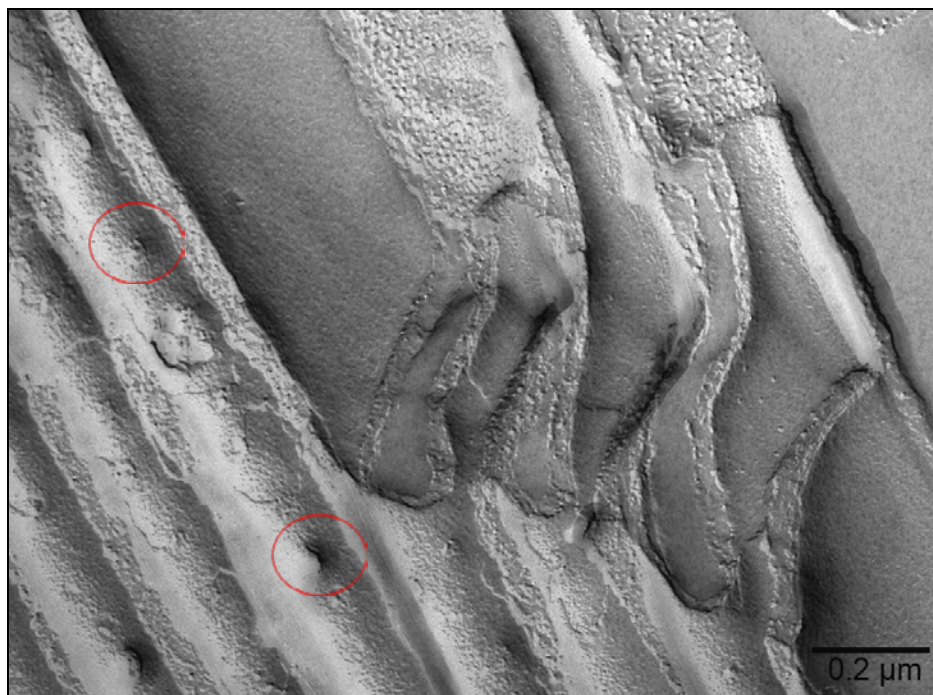
Obr. 6. Gamont *Gregarina polymorpha*. Povrchový epicyt je oddělen od buněčné cytoplasmy. Skenovací elektronová mikroskopie.

Mrazové lámání a hluboké mrazové leptání

Fixace vzorků v 2,5% GTA v 0,2M pufru s přidáním kryoprotektantu (glycerol). Rychlé zmražení vzorků v tekutém dusíku, lámání vzorku a tvorba repliky pomocí přístroje Balzer, odstranění biologického materiálu z repliky pomocí bělidla nebo kyseliny a destilované vody. Repliky namontovat na síťku a prohlížet v TEM.



Obr. 7. Povrchový epicyt u gamonta *Gregarina polymorpha*. Transmisní elektronová mikroskopie (metoda mrazového leptání)..



Obr. 8, 9. Povrchový epicyt u gamonta *Gregarina polymorpha*. Transmisní elektronová mikroskopie (metoda mrazového leptání). Pórovité struktury pozorovatelné mezi jednotlivými záhyby epicytu jsou spojeny s exkrecním váčkem, který pravděpodobně vylučuje mukus na povrch buňky.