

Obsah

Předmluva	5
<i>Kapitola 1: ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP — PRINCIP A MEZE POUŽITÍ</i>	
1.1 Princip elektronového mikroskopu	17
1.2 Osvětlovací systém elektronového mikroskopu	22
1.2.1 Elektronová tryska	23
1.2.1.1 Úhlová apertura	24
1.2.1.2 Emisní proud vztažený na prostorový úhel	24
1.2.1.3 Směrová proudová hustota	24
1.2.1.4 Průměr křížště	25
1.2.1.5 Proudová hustota v křížšti	25
1.2.1.6 Elektronové trysky různého typu a jejich vlastnosti	25
1.2.1.7 Zvláštní elektronové trysky	29
1.2.1.8 Katoda elektronové trysky	31
1.2.1.9 Měření důležitých vlastností elektronové trysky	32
1.2.1.10 Důležité poznatky o provozu elektronové trysky	34
1.2.2 Kondenzor	35
1.2.3 Dvojitý kondenzor	37
1.2.4 Měření důležitých vlastností osvětlovací soustavy	38
1.3 Zobrazovací soustava elektronového mikroskopu	39
1.3.1 Dvoustupňová soustava	39
1.3.2 Třístupňová soustava	40
1.3.3 Objektiv	42
1.3.3.1 Teoretická rozlišovací schopnost objektivu	43
1.3.3.2 Úhlová apertura objektivu	45
1.3.3.3 Chromatická vada	46
1.3.3.4 Osový astigmatismus	47
1.3.3.5 Hloubka ostrosti a přesnost zaostření	49
1.3.4 Pomocný projektiv	50
1.3.4.1 Zkreslení	50
1.3.4.2 Chromatická vada	52
1.3.4.3 Osový astigmatismus	53
1.3.5 Hlavní projektiv	53
1.3.5.1 Zkreslení	54
1.3.5.2 Chromatická vada	55

1.3.6 Pozorování a fotografování obrazu	55
1.3.6.1 Pozorování obrazu	56
1.3.6.2 Fotografování obrazu	58
Literatura	59

Kapitola 2: OBJEKT A OBRAZ

2.1 Kontrast	60
2.1.1 Pružný a nepružný rozptyl elektronů	60
2.1.2 Kontrast rozlehlejších objektů	62
2.1.2.1 Intenzita obrazu	63
2.1.2.2 Vliv preparátu a provozních podmínek na kontrast obrazu	64
2.1.2.2.1 Měření intenzit a kontrastu	70
2.1.2.2.1.1 Charakteristická křivka	71
2.1.2.2.1.2 Určení propustnosti fólie	74
2.1.2.2.1.3 Určení celkového rozptylového průřezu	76
2.1.2.2.1.4 Měření tloušťky fólií, ultratenkých řezů apod.	77
2.1.2.2.1.5 Obecné pokyny pro měření kontrastu	80
2.1.2.2.2 Nepružný rozptyl a kontrast	81
2.1.2.2.3 Urychlovací napětí a kontrast	82
2.1.3 Fázový kontrast	84
2.1.4 Ohybové a interferenční jevy	86
2.1.4.1 Fresnelovy ohybové jevy	86
2.1.4.2 Braggovy reflexe a zdánlivé struktury	87
2.1.4.3 Mikrodifrakce	92
2.1.4.4 Temné pole	95
2.2 Působení elektronů na objekt	98
2.2.1 Oteplení preparátu	98
2.2.2 Ionizační účinek elektronů	101
2.2.3 Znečišťování preparátu	104
2.3 Metody difrakce	105
2.3.1 Difrakce bez použití čoček	106
2.3.2 Difrakce s použitím fokusační čočky	108
2.3.3 Difrakce s vysokou rozlišovací schopností	110
2.3.4 Selekční difrakce	111
2.3.4.1 Pravidla pro pořízení difrakčního diagramu	111
2.3.4.2 Nepřesnosti přiřazení difrakčního diagramu	113
2.3.4.3 Rozlišovací schopnost při selekční difrakci	115
2.3.5 Cejchování přístroje	117
2.4 Stereoskopické snímky	123
2.4.1 Princip a základní vztahy	123
2.4.2 Pravidla pořizování stereoskopických snímků	126
2.4.3 Měření stereoskopických snímků	128
Literatura	131

Kapitola 3: OPTIMÁLNÍ PROVOZ ELEKTRONOVÉHO MIKROSKOPU

3.1 Seřízení elektronového mikroskopu	137
3.1.1 Podmínky správného seřízení	137

3.1.2 Seřizovací postup	138
3.1.2.1 Uvedení do chodu	138
3.1.2.2 Seřízení do optické osy	138
3.1.2.2.1 Osvětlovací soustava	138
3.1.2.2.2 Zobrazovací soustava	141
3.2 Podmínky dosažení vysoké rozlišovací schopnosti	143
3.2.1 Fresnelovy ohybové jevy	143
3.2.2 Nestabilita napájecích zdrojů	145
3.2.3 Osový astigmatismus objektivu	146
3.2.3.1 Korekce osového astigmatismu	147
3.2.3.2 Korekční postup	148
3.2.4 Mechanická stabilita optické soustavy	150
3.2.5 Teplotní posuv	151
3.2.6 Elektrická pole nábojů na nečistotách	153
3.2.7 Magnetická střídavá pole	155
3.2.8 Přehled závad	157
3.3 Určení zvětšení	157
3.3.1 Určení dílčích zvětšení	158
3.3.2 Určení zvětšení testovacím objektem	158
3.3.2.1 Otisk difrakční mřížky	158
3.3.2.2 Polystyrenový latex	159
3.3.2.3 Zobrazení krystalové mřížky	159
3.3.3 Měření posuvu objektu	159
3.3.4 Určení zkreslení	160
3.4 Práce s vysokou rozlišovací schopností	161
3.4.1 Clona objektivu	162
3.4.2 Zaostrění	163
3.4.3 Fotografování	165
3.4.3.1 Fotografický materiál	165
3.4.3.2 Volba zvětšení	168
3.4.3.3 Vakuové vlastnosti fotografických materiálů	169
3.5 Určení rozlišovací schopnosti	169
Literatura	172

Kapitola 4: PODLOŽNÍ FÓLIE

4.1 Nosné sítky	174
4.2 Kolódiové fólie	175
4.3 Formvarové fólie	176
4.4 Uhlíkové fólie	178
4.4.1 Příprava uhlíkových elektrod	179
4.4.2 Odpařování uhlíku	179
4.4.3 Příprava uhlíkových podložních fólií	181
4.4.3.1 Uhlíkové fólie připravené napařením uhlíku na sklo nebo slídu	181
4.4.3.2 Uhlíkové fólie připravené napařením uhlíku na fólii z některé vhodné plastické hmoty	181
4.4.3.3 Uhlíkové fólie připravené napařením uhlíku na hladinu glycerinu.	182
4.4.4 Způsoby vymývání podložních fólií z plastických hmot, na něž byla napařena vrstva uhlíku	182

4.4.4.1 Průtokové vymývání	183
4.4.4.2 Ponořování sítěk do vhodného rozpouštědla	184
4.4.4.3 Vymývání na filtračním papíře	184
4.5 Fólie z kysličníku křemičitého (SiO_2) nebo monoxydu křemíku (SiO)	185
4.6 Beryliové fólie	186
4.7 Fólie s otvory	187
4.7.1 Formvarové fólie s otvory	187
4.7.2 Kolódiové fólie s otvory připravené na vodní hladině	187
4.7.3 Kolódiové fólie s otvory připravené na sklíčku	188
4.7.4 Uhlíkové fólie s otvory	189
Literatura	189

Kapitola 5: STÍNOVÁNÍ

5.1 Pokovovací aparatura	190
5.1.1 Požadavky na pokovovací aparaturu	190
5.1.2 Vypařovadla a nanášení materiálu pro vypařování	191
5.1.2.1 Vypařování práškového materiálu z vlásenky	192
5.1.2.2 Současné vypařování materiálu ve formě prášku s uhlíkem	192
5.2 Materiály používané pro stínování a otisky	193
5.2.1 Platina a její slitiny	196
5.2.1.1 Vypařování platiny	196
5.2.1.2 Současné vypařování platiny a uhlíku	196
5.2.1.2.1 Současné vypařování platiny a uhlíku ze sintrovaných elektrod	197
5.2.1.2.2 Současné vypařování platiny a uhlíku z ovinutých elektrod	197
5.2.1.2.3 Současné vypařování platiny a uhlíku s použitím duté uhlíkové elektrody	198
5.2.1.2.4 Současné vypařování platiny a uhlíku z prohlubeniny v uhlíkové tyčince	199
5.2.2 Wolfram a kysličník wolframový	199
5.2.2.1 Vypařování wolframu	199
5.2.2.2 Vypařování kysličníku wolframového	200
5.2.3 Uran a kysličník uranu	201
5.2.4 Zlato a jeho slitiny	201
5.2.5 Paládium	202
5.2.6 Chrom	202
5.2.7 Ostatní materiály	203
5.3 Tloušťka napařené vrstvy a kontrast	203
5.3.1 Vznik kontrastu a potřebná tloušťka napařené vrstvy	203
5.3.2 Výpočet tloušťky napařené vrstvy	205
5.3.3 Činitelé ovlivňující tloušťku napařené vrstvy	207
5.3.4 Určení výšky stínovaných objektů	208
5.3.5 Nepříznivé vlivy při stínování	209
5.4 Vypařování materiálu bombardováním elektrony	211
5.5 Určení tloušťky napařené vrstvy	212
Literatura	213

Kapitola 6: PŘÍPRAVA POVRCHŮ

6.1 Lomové plochy	215
6.2 Povrchy připravené štěpením	216
6.3 Povrchy připravené broušením a leštěním	216
6.3.1 Broušení	216
6.3.2 Mechanické leštění	217
6.3.3 Elektrolytické leštění	217
6.3.3.1 Elektrolytické leštění ocelí	218
6.3.3.2 Elektrolytické leštění hliníku a jeho slitin	219
6.3.3.3 Elektrolytické leštění mědi a barevných kovů	219
6.4 Leptání povrchů kovů	220
Literatura	223

Kapitola 7: PŘÍPRAVA KOVŮ K PŘÍMÉMU POZOROVÁNÍ V ELEKTRONOVÉM MIKROSKOPU

7.1 Metody využívající růstu krystalů	225
7.1.1 Vakuové napařování	225
7.1.1.1 Monokrystalické filmy	225
7.1.1.1.1 Kovové filmy kondenzované na slídě	226
7.1.1.1.2 Kovové filmy kondenzované na chloridu sodném	227
7.1.1.2 Příprava slitinových filmů	227
7.1.2 Příprava tenkých kovových krystalů z roztoků	228
7.1.3 Elektrolytické katodické povlaky	228
7.1.4 Příprava fólií z roztaveného kovu povrchovým napětím	228
7.2 Metody využívající deformace kovů	229
7.2.1 Redukce tloušťky válcováním za studena	229
7.2.2 Tenké řezy získané ultramikrotomem	229
7.3 Rozpouštěcí metody	230
7.3.1 Zeslabování materiálu bombardováním těžkými ionty	230
7.3.2 Zeslabování kovů chemickým leštěním	231
7.3.3 Příprava kovových fólií elektrolytickým leštěním	231
7.3.3.1 Bollmannova metoda	233
7.3.3.2 „Okénková“ metoda	235
7.3.4 Elektrolytický zeslabovací přístroj	240
7.3.5 Elektrolyty používané při leštění kovových fólií	241
Literatura	242

Kapitola 8: OTISKY

8.1 Jednostupňové otisky	248
8.1.1 Negativní jednostupňové otisky	248
8.1.1.1 Kolódiové a formvarové negativní jednostupňové otisky	249
8.1.1.2 Kysličníkové negativní jednostupňové otisky	252
8.1.2 Pozitivní jednostupňové otisky	255
8.1.2.1 Uhlíkové pozitivní jednostupňové otisky	255
8.1.2.1.1 Metalografické aplikace	255
8.1.2.1.2 Biologické a ostatní aplikace	259
8.1.2.2 Křemíkové a kovové pozitivní jednostupňové otisky	263
8.1.2.3 Pozitivní jednostupňové otisky z kysličníků křemíku	263

8.2	Dvoustupňové otisky	264
8.2.1	První stupeň (negativní otisk)	264
8.2.1.1	Želatina, polyvinylalkohol	264
8.2.1.2	Kolódium, formvar, metylmetakrylát	266
8.2.1.3	Polystyren (termoplast)	268
8.2.1.4	Methylmetakrylát (polymerizát)	269
8.2.1.5	Napařená silná vrstva kovu	270
8.2.2	Druhý stupeň (pozitivní otisk)	271
8.2.2.1	Uhlík	271
8.2.2.2	Kysličníky křemíku	272
8.3	Některé zvláštní postupy	272
8.3.1	Jednostupňové otisky připravené současným, resp. postupným vypařením uhlíku a platiny	272
8.3.2	Otisky zmražených preparátů	273
8.3.3	Nepravé otisky („decoration replicas“)	275
8.3.4	Otisky pro odrazovou elektronovou mikroskopii	275
8.3.5	Otisky zvolené oblasti studovaného vzorku	276
8.4	Stínování otisků	278
8.5	Otisky a dosažitelné rozlišení	281
	Literatura	285

Kapitola 9: DISPERZNÍ SYSTÉMY

Úvod

9.1	Anorganické dispezní systémy	287
9.1.1	Zachycování částic rozptýlených v plynném prostředí na vhodné nosiče bez použití podložní fólie	288
9.1.1.1	Zachycování částic rozptýlených v plynném prostředí přímo na sítky nebo na jehličkovité krystaly kysličníku měďnatého vytvořené na sítkách	288
9.1.1.1.1	Vhodné sítky	288
9.1.1.1.2	Zachycování částic	289
9.1.1.1.3	Pozorování v elektronovém mikroskopu	290
9.1.1.2	Zachycování částic rozptýlených v plynném prostředí na jemná vlákna umístěná na sítkách	291
9.1.1.2.1	Příprava suspenze vhodných vláken ve vodě nebo ve zředěném roztoku kolódia v octanu amylnatém.	291
9.1.1.2.2	Nanesení suspenze vláken na sítky	291
9.1.2	Nanášení částic rozptýlených v plynném prostředí na podložní fólie.	292
9.1.2.1	Nanášení částic rozptýlených v plynném prostředí na suchou podložní fólii	293
9.1.2.1.1	Volná sedimentace	293
9.1.2.1.2	Použití elektrostatického pole k urychlení sedimentace	293
9.1.2.1.3	Urychlení sedimentace teplotním gradientem	294
9.1.2.2	Nanášení částic rozptýlených v plynném prostředí na nezaschlou podložní fólii	295
9.1.3	Nanášení částic rozptýlených v kapalném prostředí na podložní fólii	296
9.1.3.1	Nanášení částic rozptýlených v kapalném prostředí na podložní fólii ve formě jedné větší kapky	296
9.1.3.1.1	Příprava suspenze	297

9.1.3.1.1.1	Volba vhodného disperzního prostředí	297
9.1.3.1.1.2	Čištění rozpouštědla	297
9.1.3.1.1.3	Dispergace	297
9.1.3.1.1.4	Zabránění opětne agregaci částic v připravené suspenzi	298
9.1.3.1.1.5	Příprava koncentrační škály suspenzí	298
9.1.3.1.2	Nanášení suspenze na podložní fólii	299
9.1.3.1.2.1	Nanášení suspenze na podložní fólii pomocí injekční stříkačky, mikropipety a kapiláry	299
9.1.3.1.2.2	Nanášení suspenze na podložní fólii pomocí očka z platinového drátu	299
9.1.3.1.3	Zabránění agregaci částic v suspenzi po nakápnutí na podložní fólii	299
9.1.3.1.4	Zaschnutí kapky na podložní fólii	300
9.1.3.1.4.1	Zaschnutí celého objemu kapky	300
9.1.3.1.4.2	Částečné odsátí kapky ihned po nakápnutí	300
9.1.3.1.5	Úprava fólií pro nakapávání vodných suspenzí	300
9.1.3.1.5.1	V prostoru nasyceném vodními parami	301
9.1.3.1.5.2	Roztokem metylénové modři	301
9.1.3.1.5.3	Cetyltrimethylamoniumchloridem	301
9.1.3.1.5.4	Bílkovinou	301
9.1.3.1.6	Odstraňování krystalů vytvořených na fólii po zaschnutí kapky suspenze obsahující rozpuštěné soli	302
9.1.3.1.6.1	Opakovaným vyplachováním	302
9.1.3.1.6.2	Dialýzou podložní fólií	302
9.1.3.2	Nanášení částic rozptýlených v kapalném prostředí na podložní fólii ve formě značného počtu malých kapek	303
9.1.3.2.1	Rozptýlení kapalného vzorku na jemné kapky pomocí rozprašovače	303
9.1.3.2.2	Rozptýlení kapalného vzorku na jemné kapky pomocí ultrazvukového generátoru	305
9.1.4	Rozptylování anorganických částic přímo v podložní fólii z plastické hmoty	305
9.1.4.1	Rozptýlení částic přímo v roztoku plastické hmoty	305
9.1.4.2	Nanesení částic na sklo a přelití roztokem plastické hmoty	306
9.1.5	Zhotovování ultratenkých řezů částicemi anorganického původu	307
9.2	Organické disperzní systémy	307
9.2.1	Příprava organických disperzí	307
9.2.1.1	Vhodné způsoby přípravy bakteriových kultur pro účely elektronové mikroskopie	307
9.2.1.1.1	Bakteriové kultury pěstované v tekuté živné půdě	308
9.2.1.1.2	Bakteriové kultury pěstované na pevné živné půdě	308
9.2.1.1.3	Bakteriové kultury pěstované na polopropustné fólii plovoucí na tekuté živné půdě	308
9.2.1.2	Příprava virových preparátů pro elektronový mikroskop	309
9.2.1.3	Koloidní roztoky makromolekul	310
9.2.2	Způsoby nanášení organických disperzí na podložní fólie	311
9.2.2.1	Nanášení organických disperzí na podložní fólii ve formě jedné větší kapky	311
9.2.2.2	Nanášení organických disperzí na podložní fólii ve formě velkého množství jemných kapek	313

9.2.2.3	Nanášení disperzí částic organického původu ve formě velkého množství jemných kapek na čerstvě štípnutý povrch slídy	314
9.2.2.4	Usazování částic organických disperzí přímo na fólie působením gravitačního pole	315
9.2.2.5	Zvláštní postupy pro kultury bakterií	315
9.2.2.5.1	Snímání vzorků pěstovaných na pevné živné půdě	316
9.2.2.5.2	Příprava elektronově mikroskopických preparátů kultur pěstovaných v tekuté živné půdě	317
9.2.3	Způsoby potlačení artefaktů působených vysycháním disperzního média	318
9.2.3.1	Metoda kritického bodu	318
9.2.3.2	Metoda mrazové sublimace	319
9.2.3.3	Metoda povrchových filmů	320
9.2.4	Negativní barvení	321
9.2.4.1	Postup pro částice velikosti virů	322
9.2.4.2	Postup pro makromolekulární částice	323
9.3	Metody kvantitativního hodnocení disperzních systémů	324
9.3.1	Statistické hodnocení elektronově mikroskopických snímků disperzních systémů	324
9.3.2	Stanovení absolutní koncentrace částic	326
Literatura		328

Kapitola 10: FIXACE BIOLOGICKÝCH OBJEKTŮ A TECHNIKA ULTRATENKÝCH ŘEZŮ

10.1	Fixace	330
10.1.1	Fixační roztoky	331
10.1.1.1	Fixační roztok s kyselinou osmičelou podle Paladeho	331
10.1.1.2	Fixační roztok podle Zetterquista	332
10.1.1.3	Fixační roztok podle Caulfielda	332
10.1.1.4	Chrom-osmiový fixační roztok podle Daltona	333
10.1.1.5	Fixační roztok pro mikroorganismy s OsO ₄ podle Kellenbergera	333
10.1.1.6	Fixační roztok s manganistanem draselným podle Lufta	334
10.1.1.7	Fixační roztok formalinový	334
10.1.1.8	Mrazová substituce	334
10.1.1.9	Mrazová sublimace	335
10.1.2	Poznámky k fixačním roztokům s kyselinou osmičelou	335
10.1.3	Zásady správné fixace	336
10.1.3.1	Fixace suspenzí biologických objektů	337
10.1.3.2	Fixace tkání	337
10.2	Odvodňování	338
10.2.1	Příprava bezvodého alkoholu	339
10.2.2	Dehydratace acetonu	339
10.2.3	Provedení dehydratace alkoholem	340
10.3	Převádění, zalévání, polymerizace	340
10.3.1	Zalévací média ve vodě nerozpustná	342
10.3.1.1	Metakryláty	342
10.3.1.1.1	Čištění monomeru	342
10.3.1.1.2	Destabilizace MMA a BMA	343
10.3.1.1.3	Zalévací postup	343
10.3.1.1.4	Omezení polymeračních defektů uranylovými solemi	344

10.3.1.1.5	Omezení polymeračních defektů polymerací v dusíkové atmosféře	344
10.3.1.1.6	Omezení polymeračních defektů zalitím do předpolymerovaných metakrylátů	344
10.3.1.2	Vestopal W	345
10.3.1.2.1	Zalévací postup	346
10.3.1.3	Araldit	346
10.3.1.3.1	Zalévací postup	347
10.3.2	Ve vodě rozpustné zalévací hmoty	348
10.3.2.1	Želatina	348
10.3.2.2	Aquon	349
10.3.2.2.1	Příprava Aquonu	349
10.3.2.2.2	Zalévací postup	349
10.3.2.3	Médium X 133/2.097	350
10.3.2.3.1	Odvodňovací a zalévací postup	350
10.3.2.4	Zalévání do glykolmetakrylátu (GMA)	351
10.3.2.4.1	Postup odvodnění a zalití do čistého GMA	351
10.3.2.4.2	Kombinovaná směs GMA	352
10.3.2.4.3	Odvodňovací a zalévací postup	352
10.3.3	Formy pro zalévání a polymeraci	353
10.3.3.1	Želatinové kapsle	353
10.3.3.2	Lodičky	353
10.3.3.3	Polymerace ve vrstvě	354
10.3.3.4	Zalévání suspenzí	354
10.3.3.5	Zalévání tenkých vrstev tkáňových kultur in situ	354
10.3.3.6	Uvolnění polymerů ze skla	355
10.3.3.7	Umístění formy při polymeraci tepelné a ultrafialovým světlem	355
10.3.3.8	Označení objektu	355
10.3.4	Některé závady, které mohou vzniknout při odvodňování, převádění, zalévání a polymeraci biologických objektů	356
10.4	Příprava ultratenkých řezů	357
10.4.1	Úvodní poznámka	357
10.4.2	Nože	359
10.4.2.1	Příprava skleněných nožů	359
10.4.2.2	Chyby při přípravě skleněných nožů	362
10.4.2.3	Kontrola jakosti břitů nože	363
10.4.2.4	Diamantové nože	364
10.4.2.5	Lodičky skleněných nožů	364
10.4.3	Příprava zalitých objektů	365
10.4.3.1	Orientace objektu	365
10.4.3.2	Tvary seříznutých objektů	366
10.4.3.3	Způsob seřezávání	366
10.4.3.4	Orientované předřezávání	367
10.4.4	Zhotovení řezů	367
10.4.4.1	Upnutí nože a objektu	367
10.4.4.2	Řezání	368
10.4.4.3	Natahování řezů	369
10.4.4.4	Kontrola síly řezu	369
10.4.5	Fixace řezů na sítky	370

10.4.5.1	Typy sítěk a podložních fólií	370
10.4.5.2	Zachycení řezu na sítku	370
10.4.5.3	Sériové řezy	371
10.4.6	Kontrola řezů a orientace v řezu	372
10.4.6.1	Kontrola řezů optickým mikroskopem	372
10.4.6.2	Srovnání ultratenkých řezů s řezy normálními	372
10.4.7	Zesílení ultratenkých řezů a jejich ochrana před účinkem bombardování elektrony v elektronovém mikroskopu	373
10.4.8	Některé vady ultratenkých řezů a jejich obvyklé příčiny	373
10.4.9	Časový rozvrh ultratenkých řezů	378
10.5	Kontrastování	378
10.5.1	Kontrastování mezi fixací a dehydratací	379
10.5.2	Kontrastování během dehydratace	379
10.5.3	Kontrastování řezů	379
10.6	Pozorování řezů v elektronovém mikroskopu	380
10.7	Speciální užití techniky ultratenkých řezů	381
10.7.1	Elektronová cytochemie	381
10.7.2	Detekce antigenu v buňkách pomocí protilátkového ferritinového komplexu	382
10.7.3	Elektronově mikroskopická autoradiografie	383
Literatura		383
Příloha		388
Věcný rejstřík		389
Autorský rejstřík		396