

# Mikroskopické techniky – seminář

**Josef Jaroš**

Ústav histologie a embryologie  
Lékařská fakulta, Masarykova univerzita

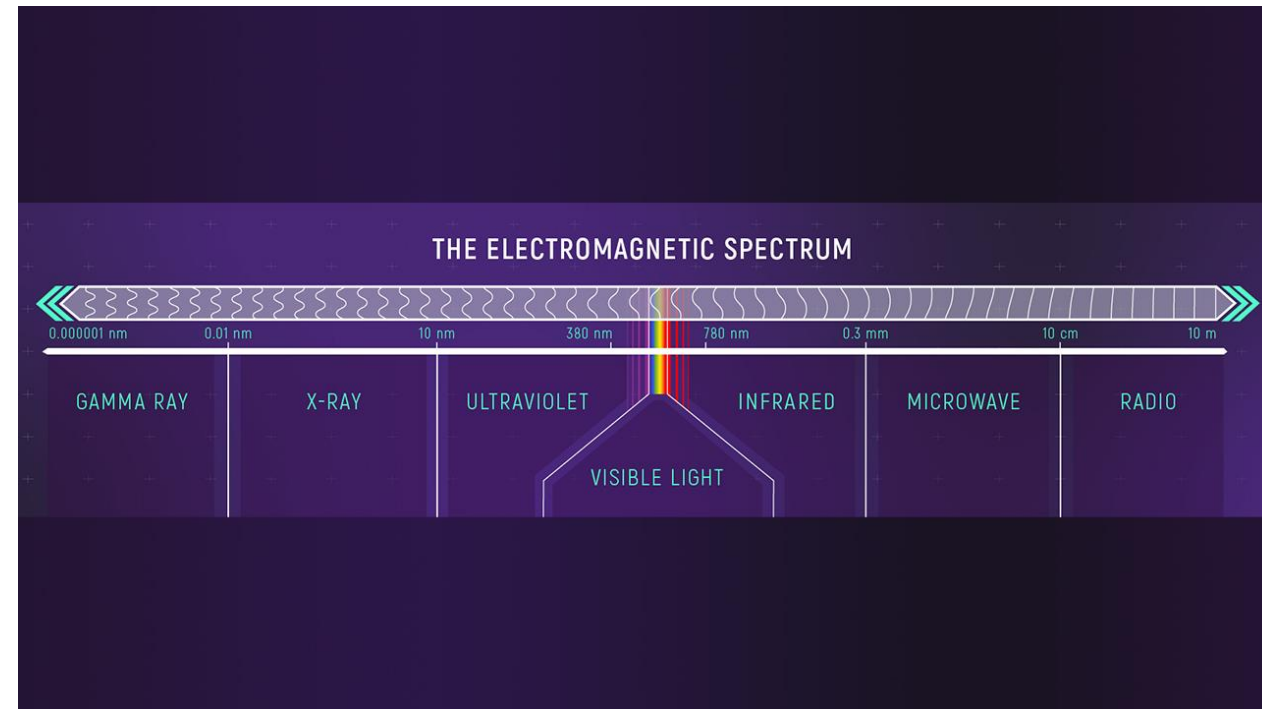
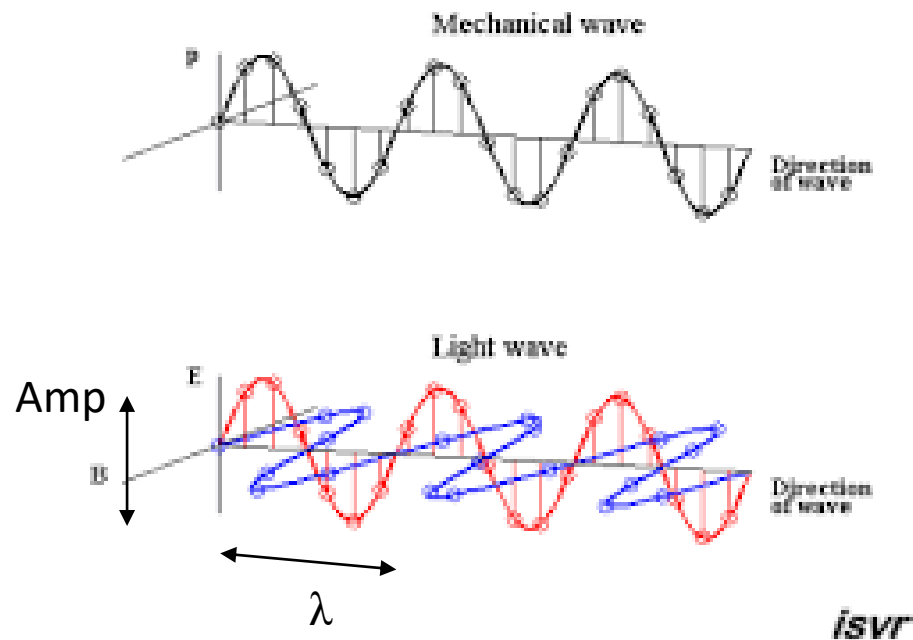
# Osnova předmětu

- Úvod do mikroskopie - vlastnosti světla, základní principy mikroskopie, typy mikroskopů
- Kontrastní mikroskopie - temné pole, fázový kontrast, HMC, polarizační mikroskopie, DIC
- Fluorescenční mikroskopie - fluorochromy, epifluorescence, konfokální mikroskopie
- Příprava vzorků a histologické zpracování - odběr, fixace, barvení, IHC
- Elektronová mikroskopie - SEM, TEM, 3D, zpracování vzorků
- Holografická mikroskopie
- Mikroskopie v embryologii - exkurze Reprofit
- Pokročilé zobrazovací metody - dvoufotonová, superrozlišení, korelační mikroskopie
- Zpracování obrazu, analýza dat
- Laboratoř - barvení, mikroskopie

Závěrem předmětu bude písemný test.

# Světlo, vlny

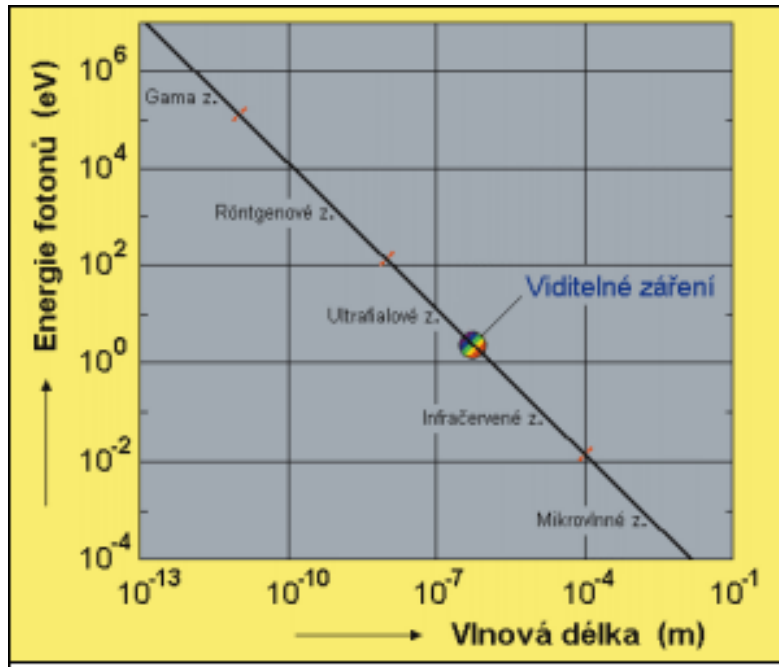
- Do 19. století se bralo světlo jako elektromagnetické vlnění
- A. Einstein objevil a popsal také jeho částicovou povahu



## Vlna světla charakterizována

(zejména pro optiku)

- Amplituda
- Vlnová délka
- Frekvence

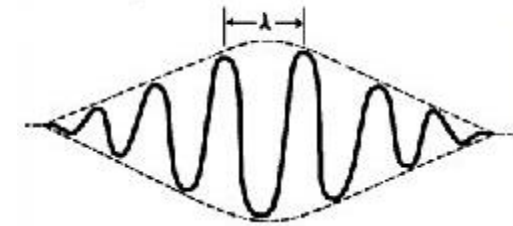


## Jako částice je charakterizována

(zejména pro kvantové jevy)

- energii, hmotností, elektrickým nábojem, spinem, ...

Znázornění fotonu



$$E = hf. = hc/\lambda$$

$h$  - Planckova konstanta

$6,6 \times 10^{-34}$  J.s

$f$  - frekvence

$c$  - rychlost světla

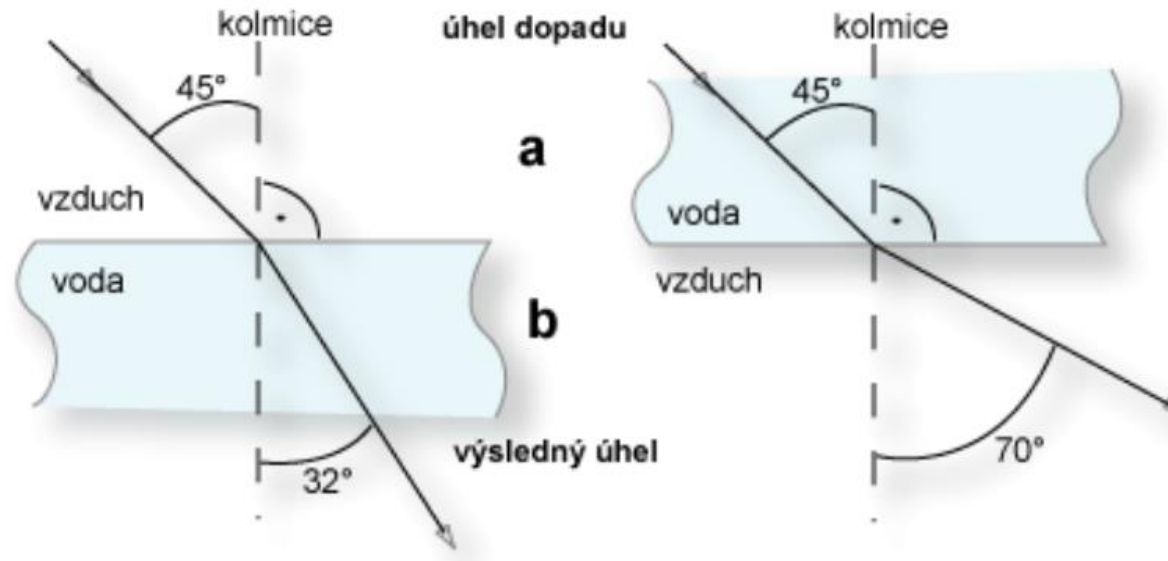
$\lambda$  - vlnová délka

Energie světla závisí na nejen počtu fotonů, ale také na jeho vlnové délce (frekvenci vlnění)

Jako příklady částicových projevů elektromagnetického záření lze uvést fotoelektrický jev interakce dopadajících fotonů s volnými elektrony uvnitř materiálu (polovodičů) – Za objasnění dostal A.Einstein Nobelovu cenu.

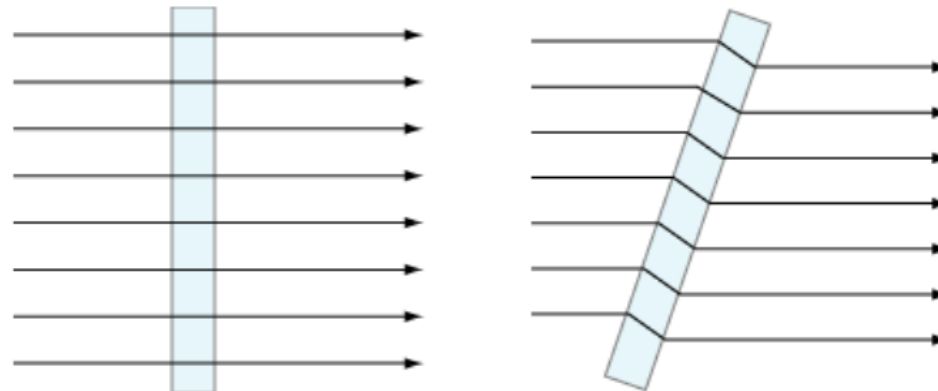
# Refrakce

- Lom světla

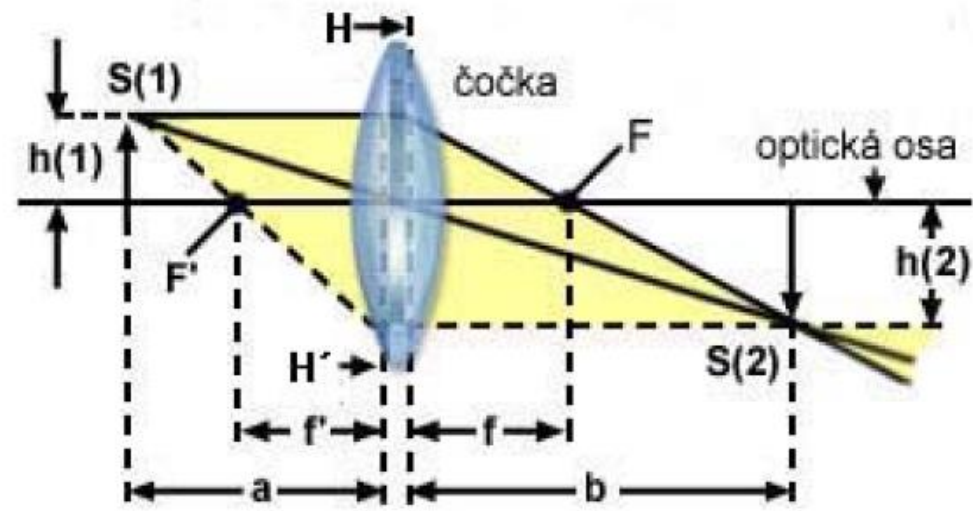


## index lomu

vzduch	1,0003
voda	1,333
křemenné sklo	1,520
olovnaté sklo	1,656
diamant	2,4217
imerzní olej	1,515
glycerol	1,473



## zobrazení spojnou čočkou



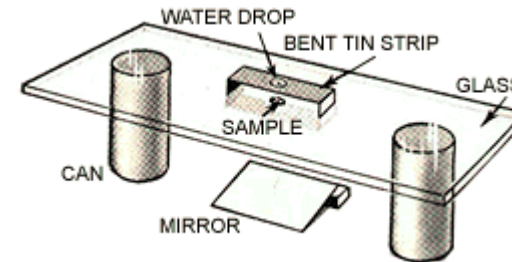
- $F'$  ohnisko předmětového prostoru
- $F$  ohnisko obrazového prostoru
- $f'$  ohnisková vzdálenost předmětového prostoru od hlavní roviny

# Historie mikroskopie

- 1. čočka – kapka vody

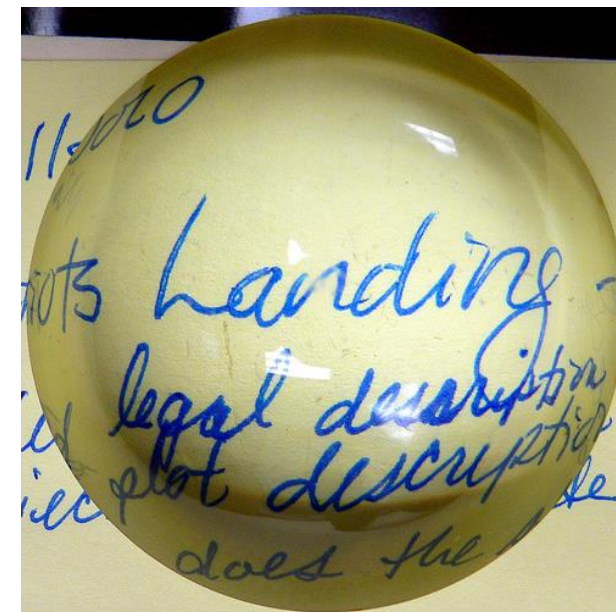


Malá kapka vody má stejnou funkci jako sférické čočky a umožňuje dosáhnout velkého zvětšení pozorovaného objektu



## Starověk (3. stol. př. n. l.)

- Počátky optiky – zrcadla z mědi a bronzu
- První teorie o původu světla a vidění
- řeční filozofové-Pythagoras, Démokritos, Platón; studium lomu světla (Eukleidos, Ptolemaios)
- Řekové: skleněné koule naplněné vodou
- Plinius – skleněné čočky





# 1590 Hans a Zacharias Janssenovi

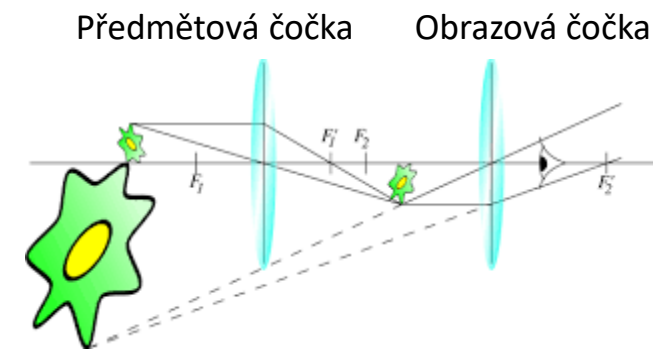
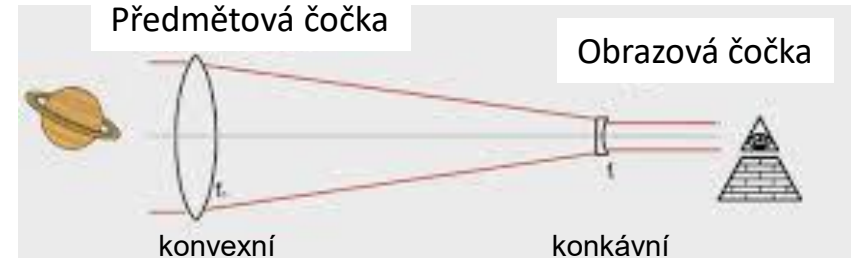
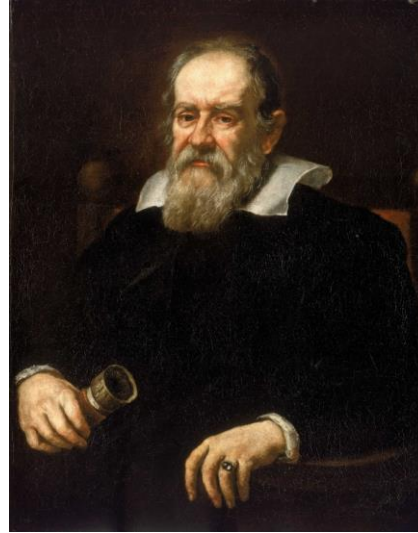
- Holandský výrobce brýlí Hans Janssen se svým synem jsou uváděni jako první výrobce mikroskopu složeného z více čoček
- Byl tvořen ze dvou tubusů, které při zasunutí poskytovaly zvětšení 3x a po roztažení 9x



# 1580 Galileo Galilei

Galileo konstruuje mikroskop z čočky a rozptylky a nazývá jej *occholino – muší oko*

Slovo **mikroskop** zavedl dle teleskopu Giovanni Faber z Bambergu (1574-1629)



# Antony van Leeuwenhoek z Leydenu (1632-1723)

## Jednoduchý mikroskop - 1 čočka

- obchodník se sukrem
- Zpočátku amatérský brusič čoček
- Za život prý vyrobil **500** mikroskopů s 1 silně zvětšující čočkou
- Rozlišovací schopnost jeho čoček byla lepší než tehdejší složené mikroskopy
- Jako první viděl jednobuněčné organismy
- objevitelem mikroorganismů, krevních buněk, spermií, svalových vláken a dalších mikroskopických útvarů a je nazýván „otcem mikrobiologie“.



Zvětšení 270x

Bakterie v dešťové vodě a slinách nazýval „Animalcules“

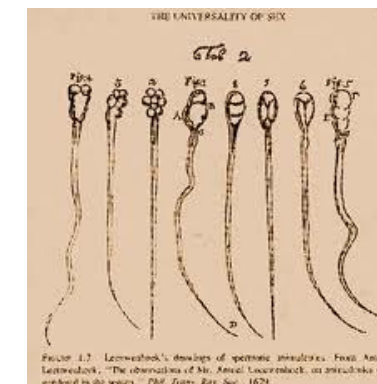
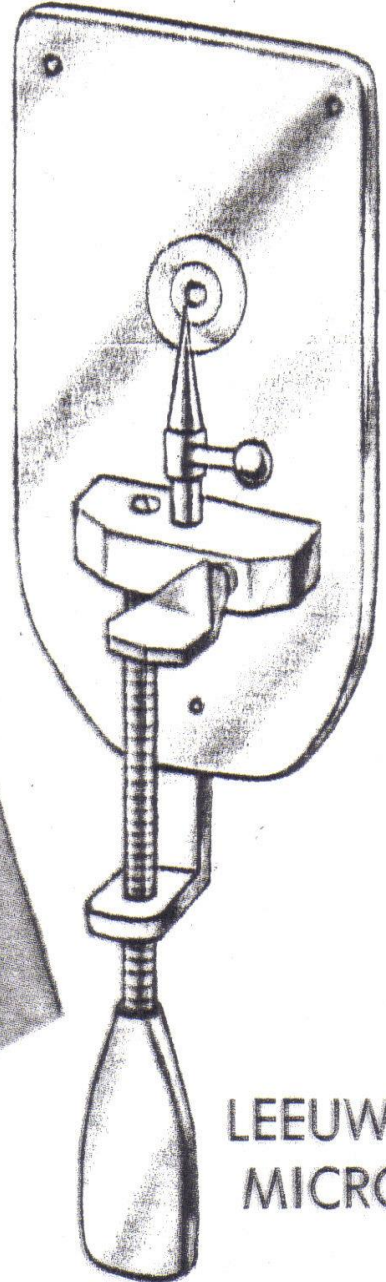
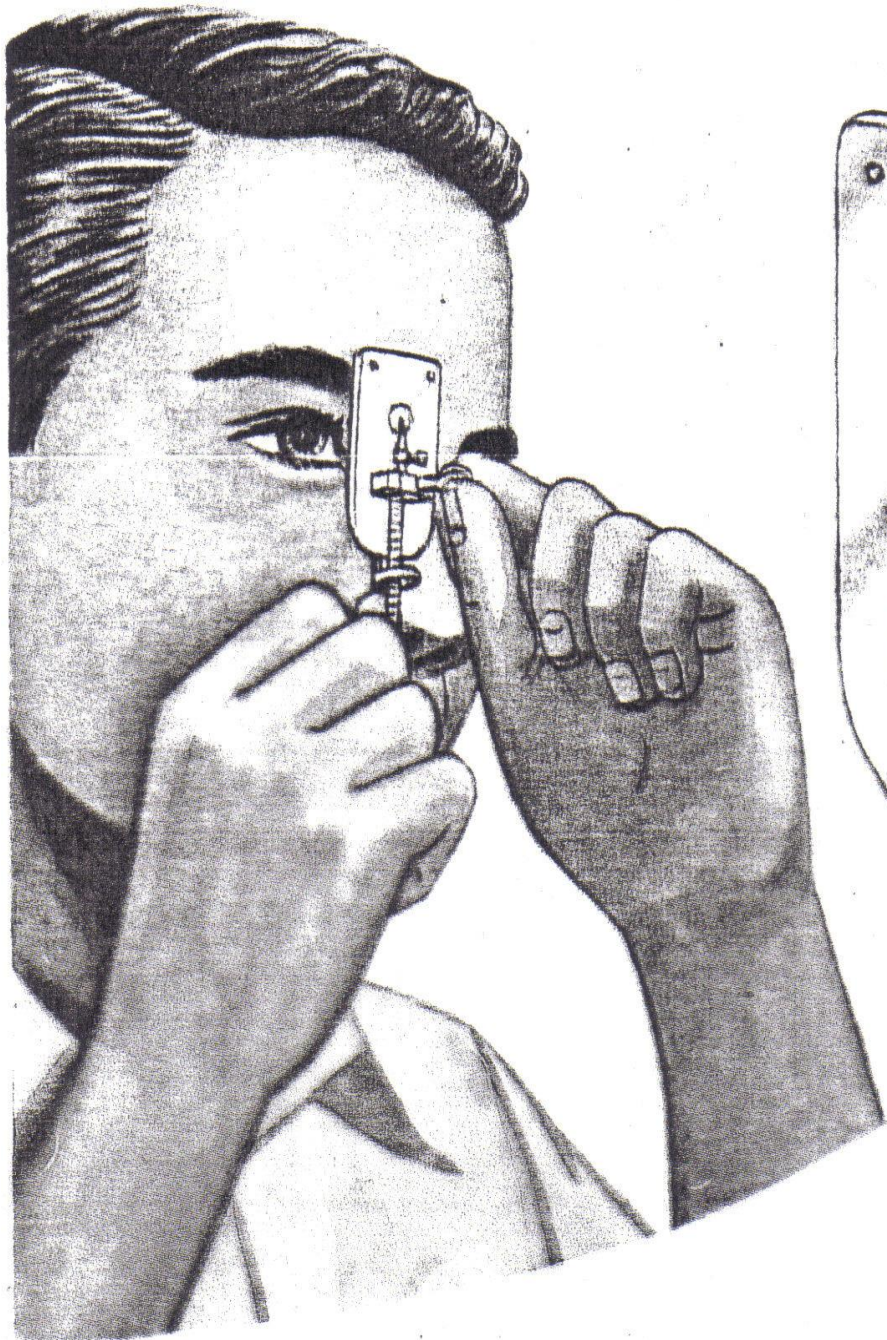
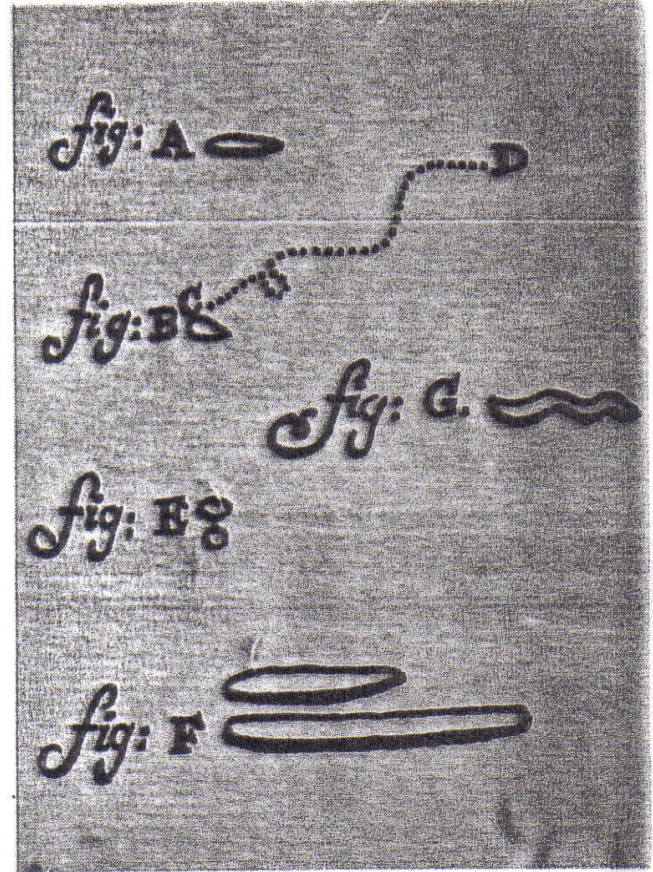


FIGURE 1.7. Leeuwenhoek's drawings of spermatozoa. From: Antoni Leeuwenhoek, "The observations of Mr. Antoni Leeuwenhoek, on animalcules contained in the waters," *Phil. Trans. Roy. Soc.*, 1679.





Leeuwenhoek's Bacteria



LEEUWENHOEK  
MICROSCOPE



# Robert Hooke 1670

## Složený mikroskop – 2 a více čoček

1665 sepsal traktát *Micrographia*

(o mikroskopickém pozorování rostlinných tkání  
a struktury minerálů)

Pozorováním tenkých řezů korku definoval pojem  
cell - buňka



„Cell“ - „Buňka“

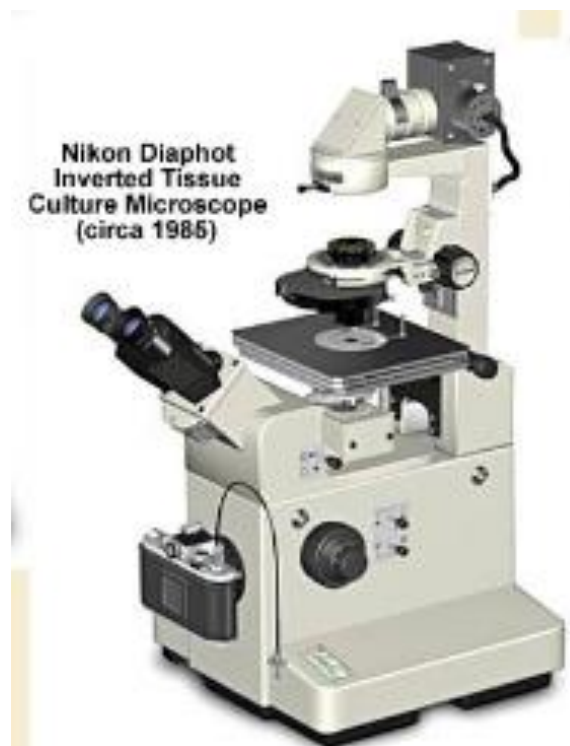
# Mikroskopy 20. století



**Nikon's First  
Microscope**  
(circa early 1900s)



**Zeiss  
Laboratory  
Microscope**  
(circa 1930)

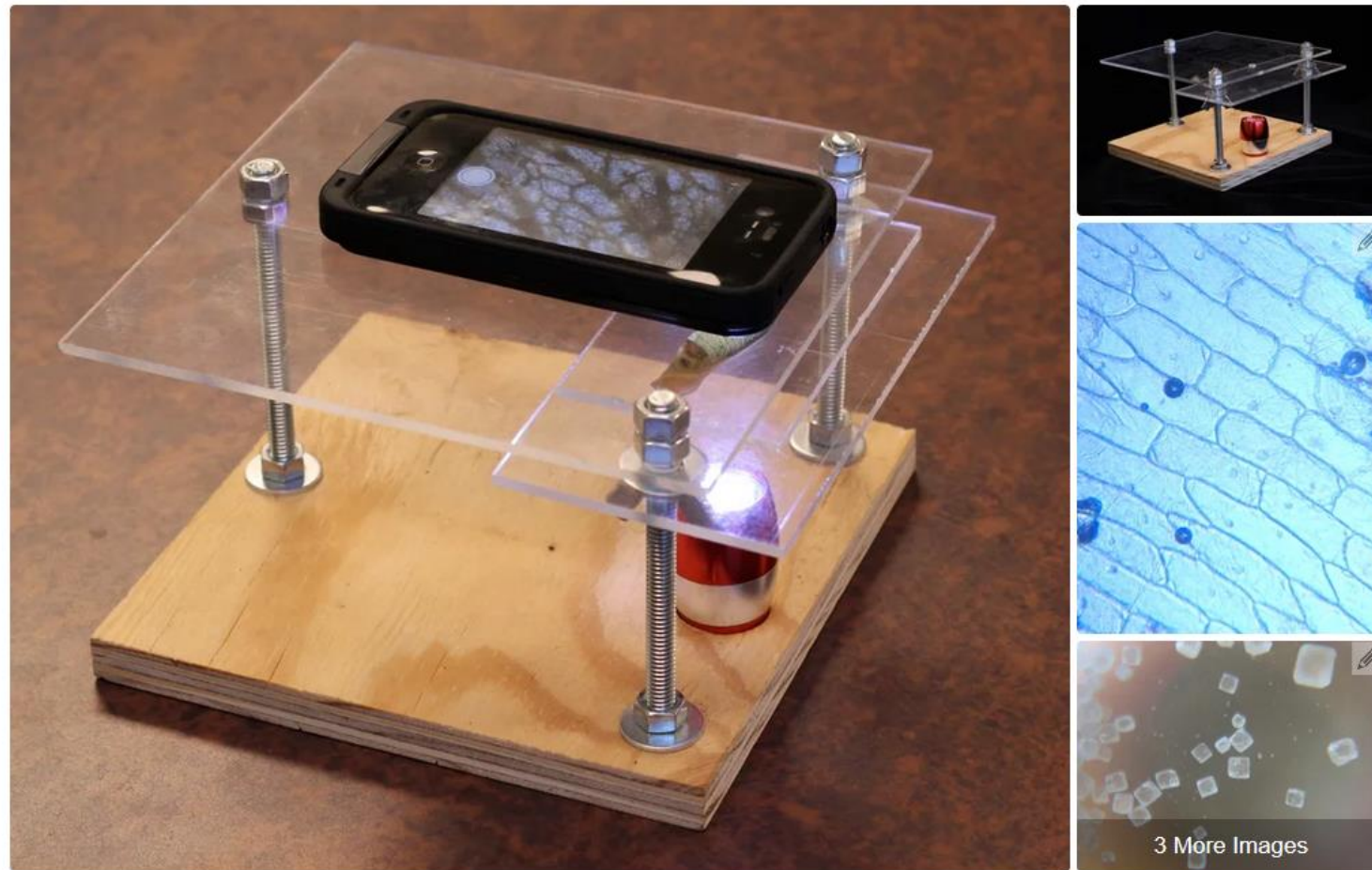


**Nikon Diaphot  
Inverted Tissue  
Culture Microscope**  
(circa 1985)



**The Olympus  
Provis AX-70**  
(circa 1998)

# Konverze chytrého telefonu na mikroskop



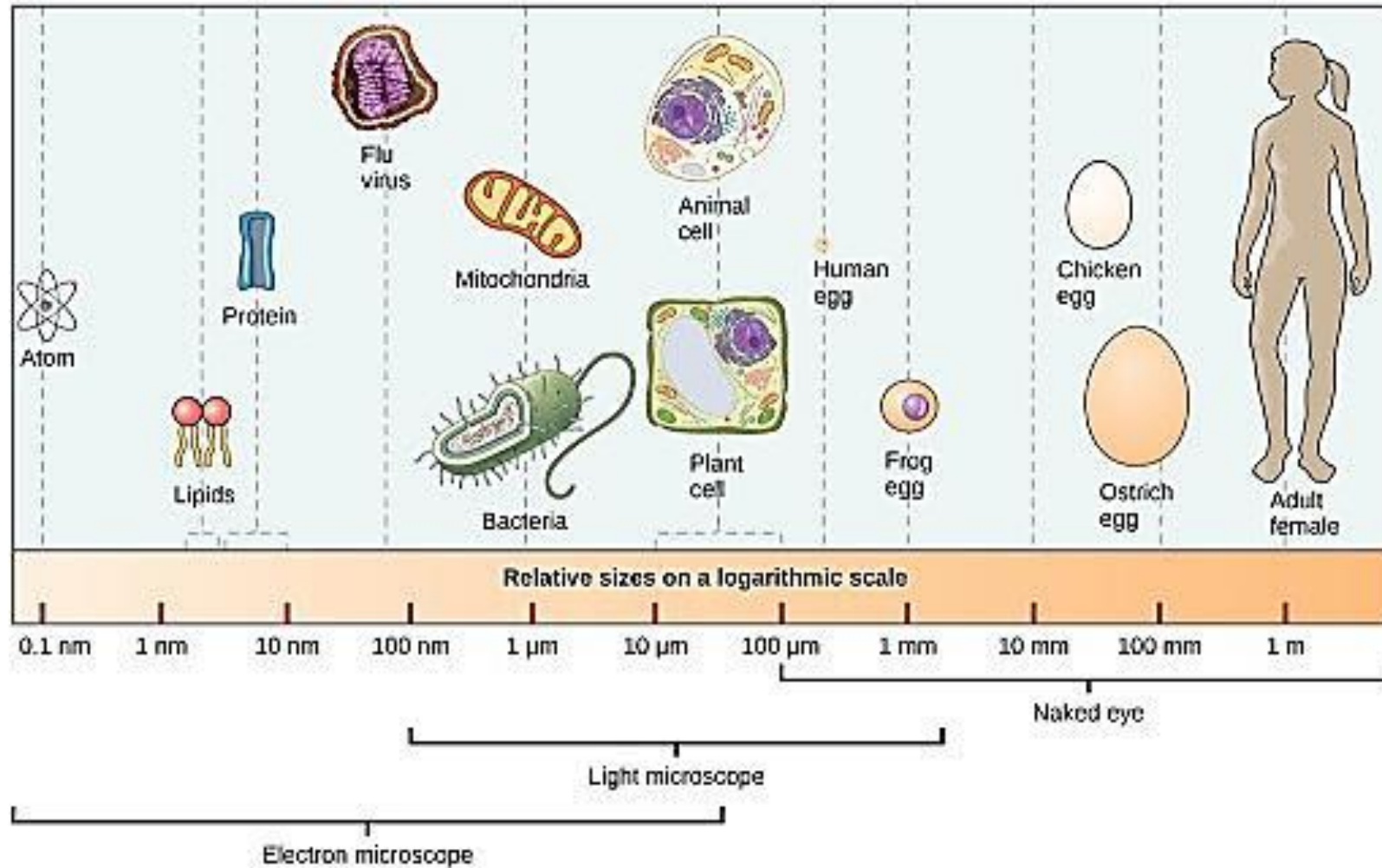
<https://www.instructables.com/10-Smartphone-to-digital-microscope-conversion/>

# Vývoj dalších typů mikroskopů

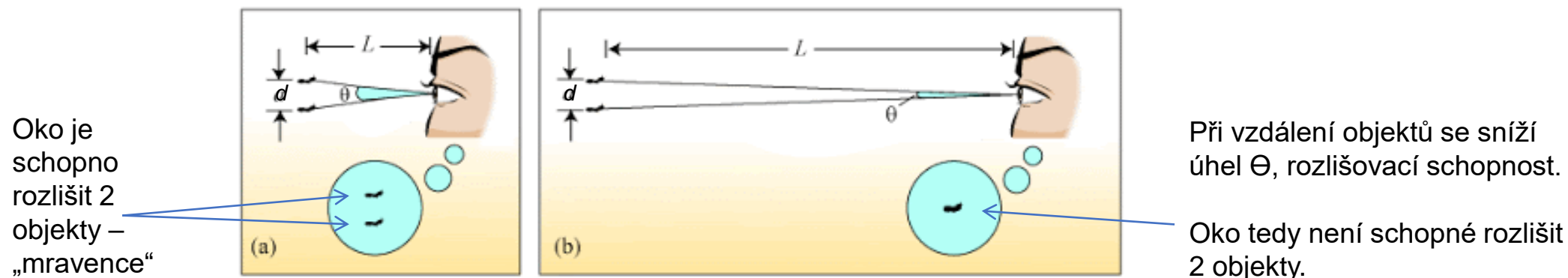
- Ultramikroskop
  - částice menší než vln. délka světla (1903 - Richard Zsigmondy)
- Fázový kontrast
  - bezbarvý a průhledný materiál (1930 - Frits Zernike)
- Elektronový mikroskop
  - 10 mil x (1934 Ernst Rask)
- Skenovací tunelový mikroskop
  - Atomy... (1981 Binnig& Rohrer)
- Super-rezoluční mikroskopy
  - 2010
- Chemiskopy
  - 2017



# Srovnání velikostí



# Rozlišovací schopnost lidského oka



$$\theta = 1'$$

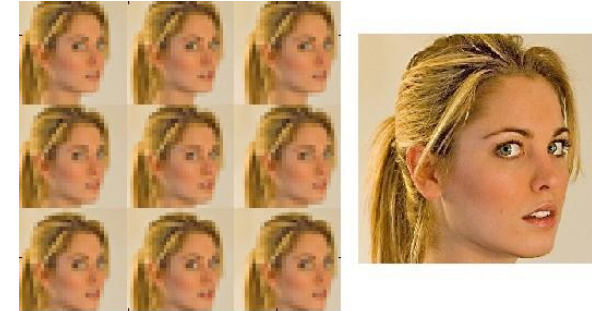
Lidské oko	0,2 mm
Světelný mikroskop	0,2 $\mu\text{m}$
Skenovací elektronový mikroskop	2,5 nm
Transmisní elektronový mikroskop	1 nm

V praxi jedna úhlová minuta  $\Theta$  znamená, že budeme-li za ideálních světelných podmínek sledovat předmět z běžné čtecí vzdálenosti (20 cm), budou nám splývat všechny body bližší než cca  $1/6$  mm, tedy 0,166667mm.

# Mikroskop musí poskytnout

## Rozlišení

Schopnost přenést informaci o jemných detailech ze vzorku do obrazu



## Kontrast

Rozdíly v obrazu mezi hlavním prvkem a pozadím



## Zvětšení

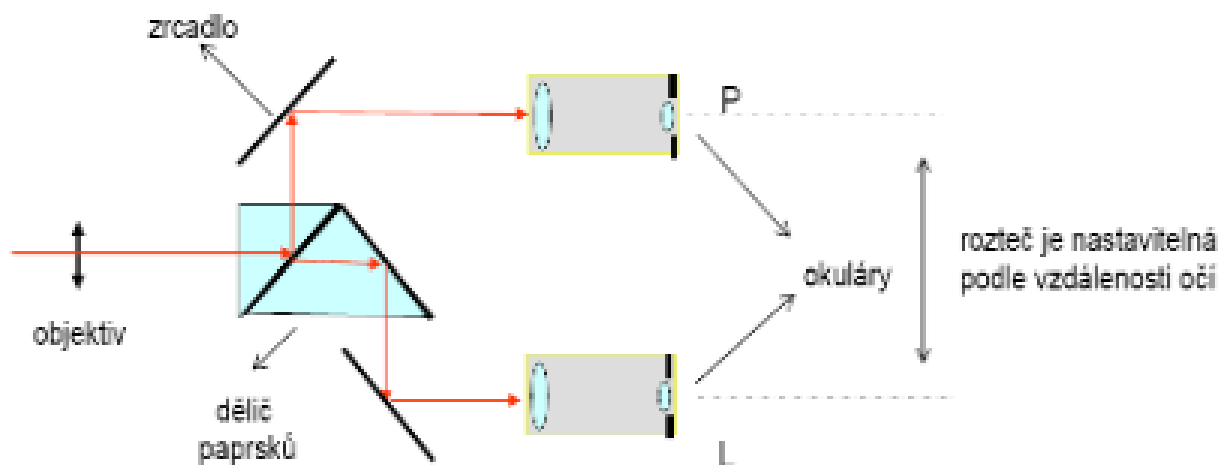
Vytvořit obraz dostatečné velikosti, aby byly okem rozeznatelné podrobnosti.



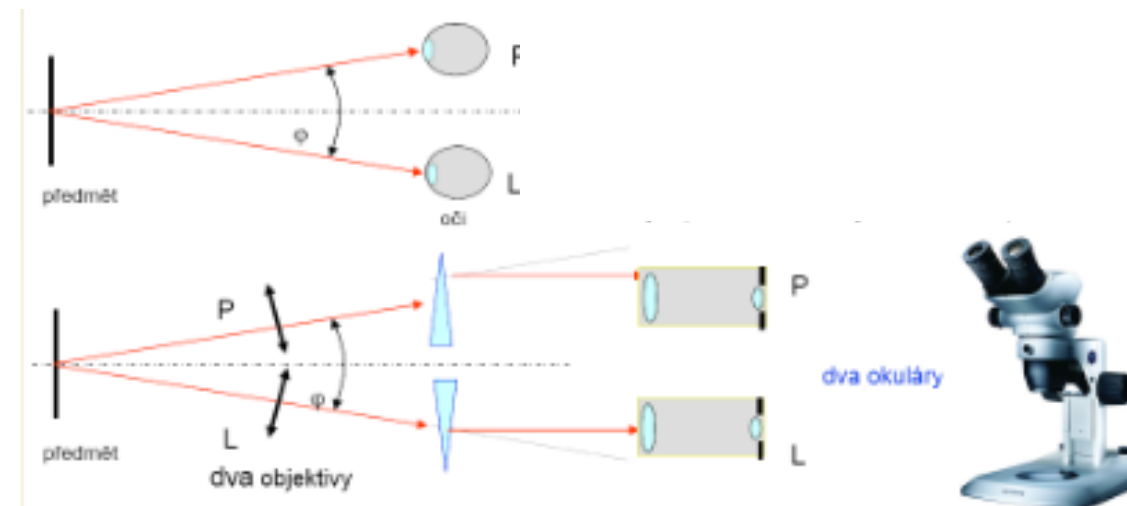
Early microscope

# Binokulární mikroskop vs stereomikroskop

## Binokulární mikroskop



## Stereomikroskop



- Pozorování oběma očima je méně únavné
- Každé oko pozoruje svým okulárem meziobraz objektu
- Tedy binokulární mikroskop **není** stereomikroskop

Stereomikroskop má dvě samostatné optické dráhy – pro pravé a levé oko zvlášť. Toto uspořádání poskytuje prostorové vidění, trojrozměrný pohled a přímý obraz. Čím je větší úhel  $\phi$  tím je výraznější stereovjem

# Části mikroskopu

## ČÁST OPTICKÁ:

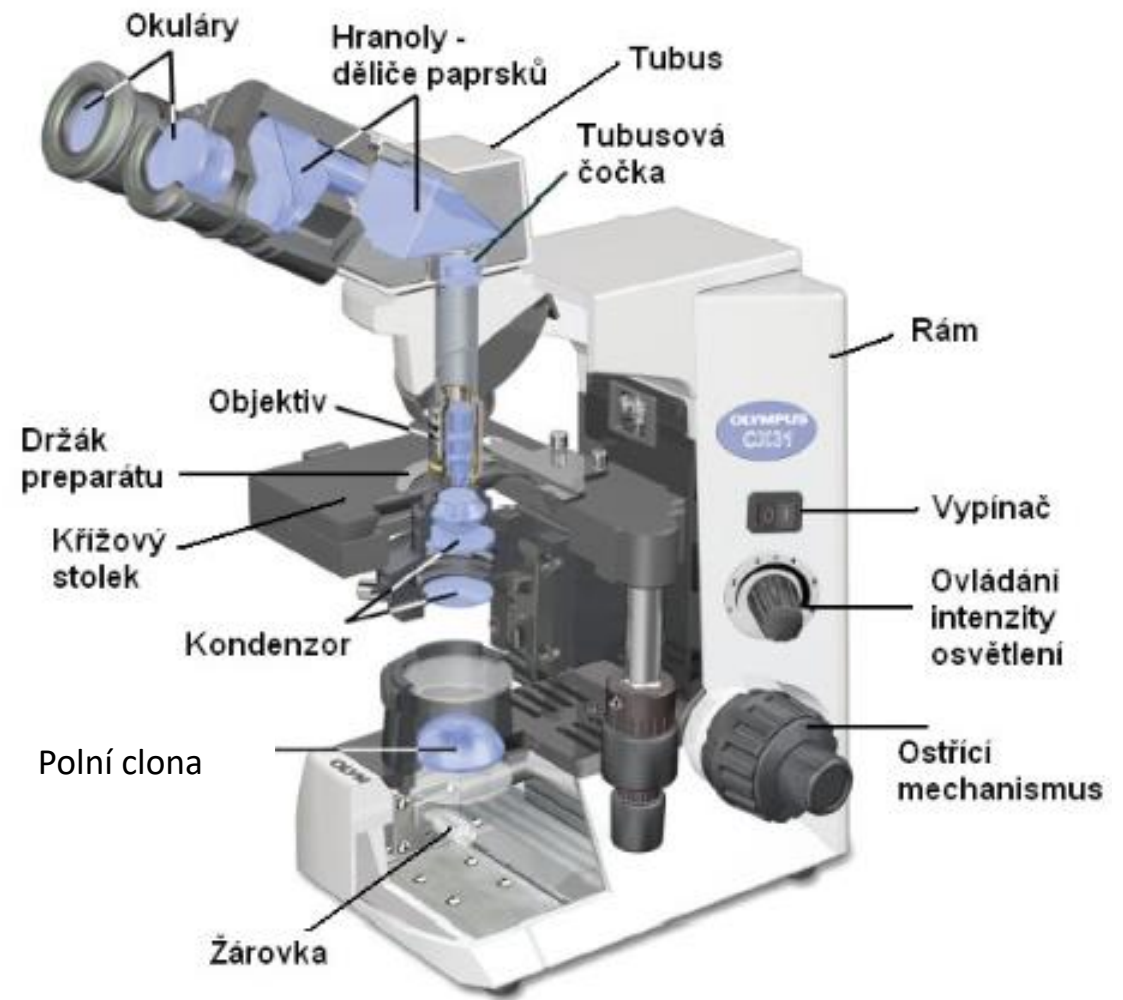
- **objektivy, okuláry**

## ČÁST OSVĚTLOVACÍ:

- **zdroj světla, polní clona**
- **kondenzor, aperturní clona**

## ČÁST MECHANICKÁ:

- **rám, tubus,**
- **revolverový měnič objektivů,**
- **stolek, makrošroub, mikrošroub,**
- **vypínač, ovládání intenzity světla**



- **Clona polní – v blízkosti zdroje světla (žárovky)**

Polní clonou se reguluje osvětlená oblast v zorném poli. Při uzavřené polní cloně je osvětlena jen malá část zorného pole okolo středu, vždy je nutné polní clonu otevřít tak, aby bylo osvětleno celé zorné pole.

- **Clona aperturní součást kondenzoru**

Aperturní clonou se reguluje velikost prostorového úhlu kužele světla, které osvětluje pozorovaný preparát, což ovlivňuje vlastnosti mikroskopického obrazu, které určují jeho kvalitu: kontrast, hloubku ostrosti a rozlišení podrobností. Ideální je takové nastavení aperturní clony, kdy aktuální numerická apertura odpovídá apertuře objektivu.

- Je nezbytné nastavit správné otevření clon pro tzv. Kohlerovo osvětlení

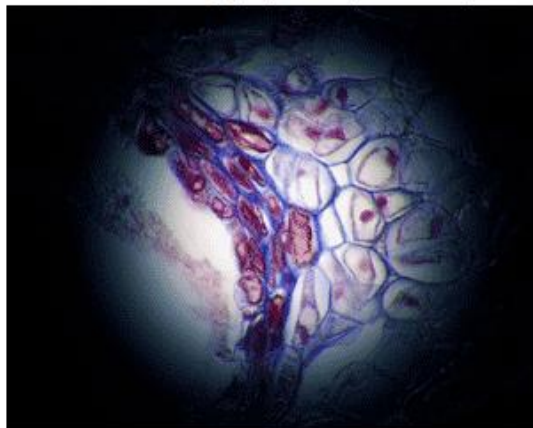


# Postup pro nastavení mikroskopu

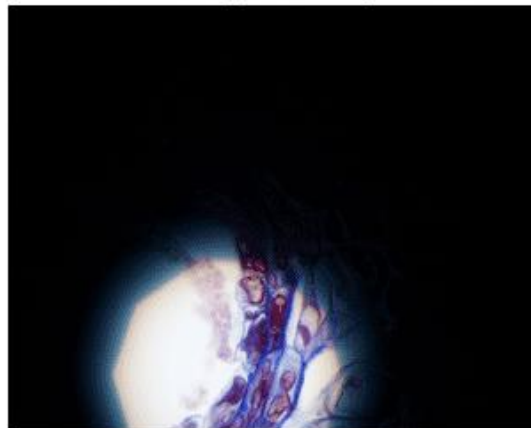
## Kohlerovo osvětlení

1. otevřít polní a aperturní clonu
2. vložit preparát a zaostřit ho při zvětšení 10x a více
3. zavřít polní clonu
4. zaostřit polní clonu pohybem kondenzoru (nahoru/dolů) tak, aby byly její hrany ostré zároveň s preparátem
5. Vycentrovat polní clonu horizontálním pohybem kondenzoru
6. otevřít polní clonu, aby právě zmizela za obzorem zorného pole
7. nastavit aperturní clonu tak, aby odpovídala max. hodnotě numerické apertury (NA) objektivu a nastavení respektovalo charakter preparátu. Postupným uzavíráním aperturní clony se zvyšuje hloubka ostroty a zvyšuje kontrast, postupně však vystupují i různé nečistoty nebo nežádoucí vrstvy buněk. Obvykle bývá dosaženo nejlepších výsledků při hodnotě nastavení aperturní clony na 70 až 80 % numerické apertury použitého objektivu.

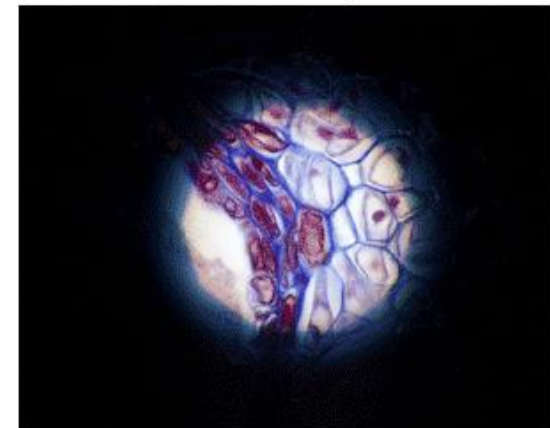
- zaostřený preparát s přivřenou polní clonou...



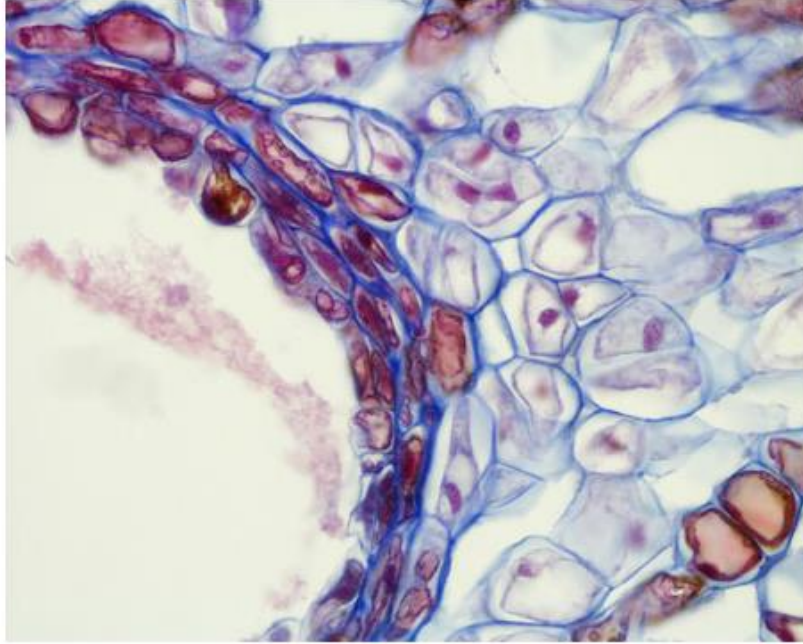
- polní clona po zaostření...



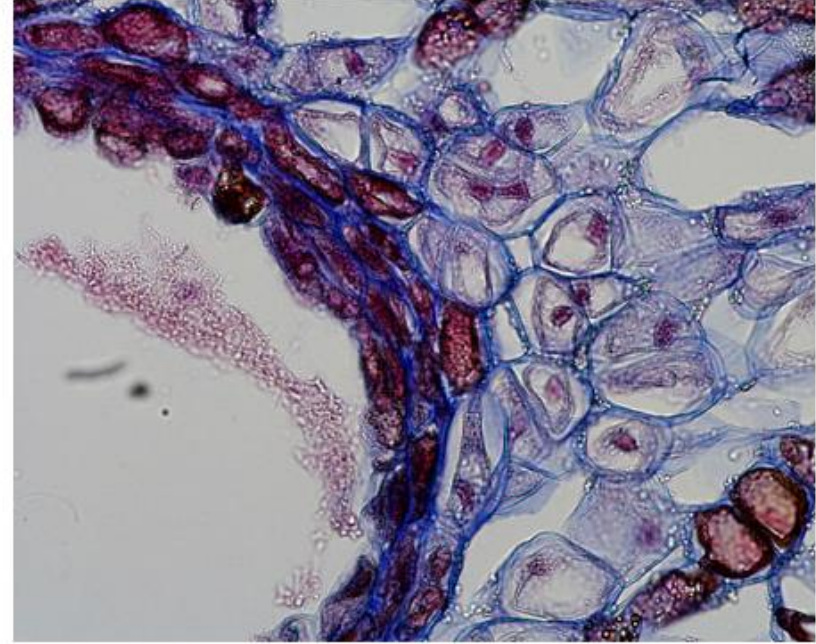
- .. a vycentrování



správné nastavení aperturní clony



příliš uzavřená aperturní clona





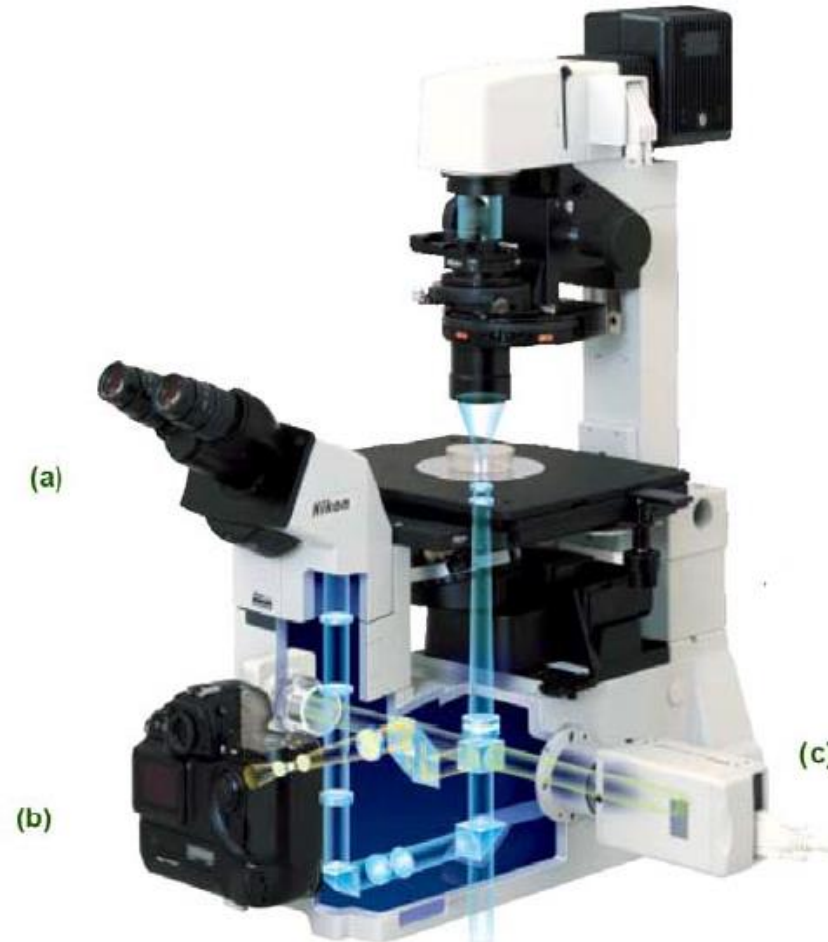
# Mikroskop přímý a inverzní

Velký inverzní mikroskop

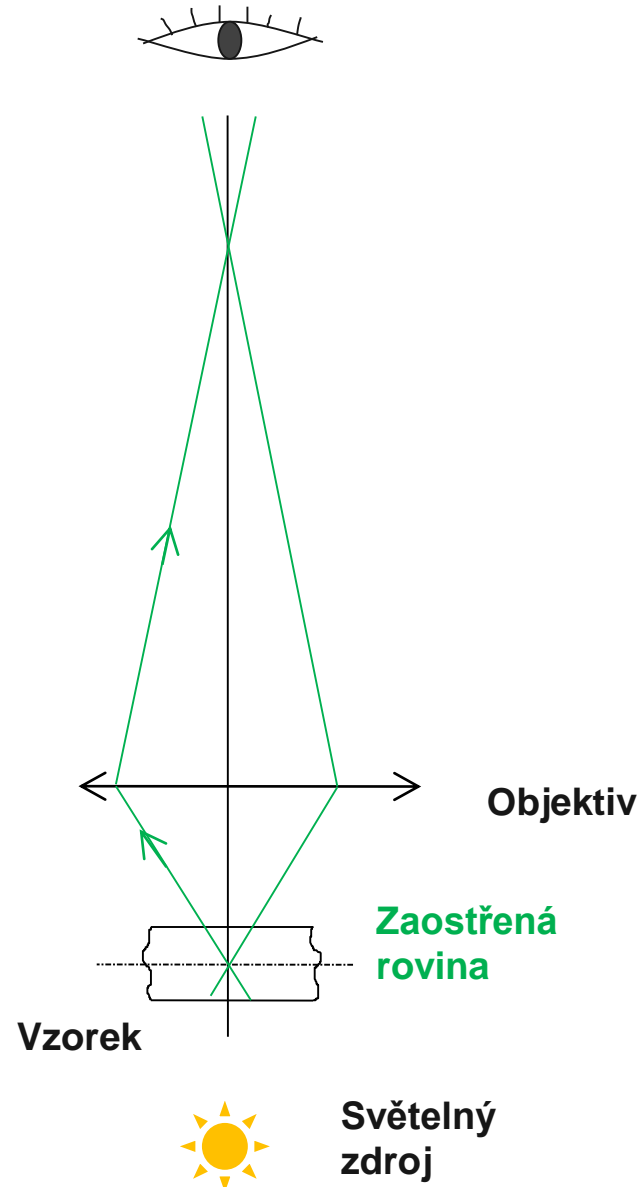
**NIKON ECLIPSE TE 2000**

V částečném řezu je zakreslen  
chod paprsků

- a) do binokulárního tubusu
- b) do fotografického tělesa  
(čelní vstup)
- c) do CCD kamery  
(boční vstup vpravo)



# Přímý mikroskop

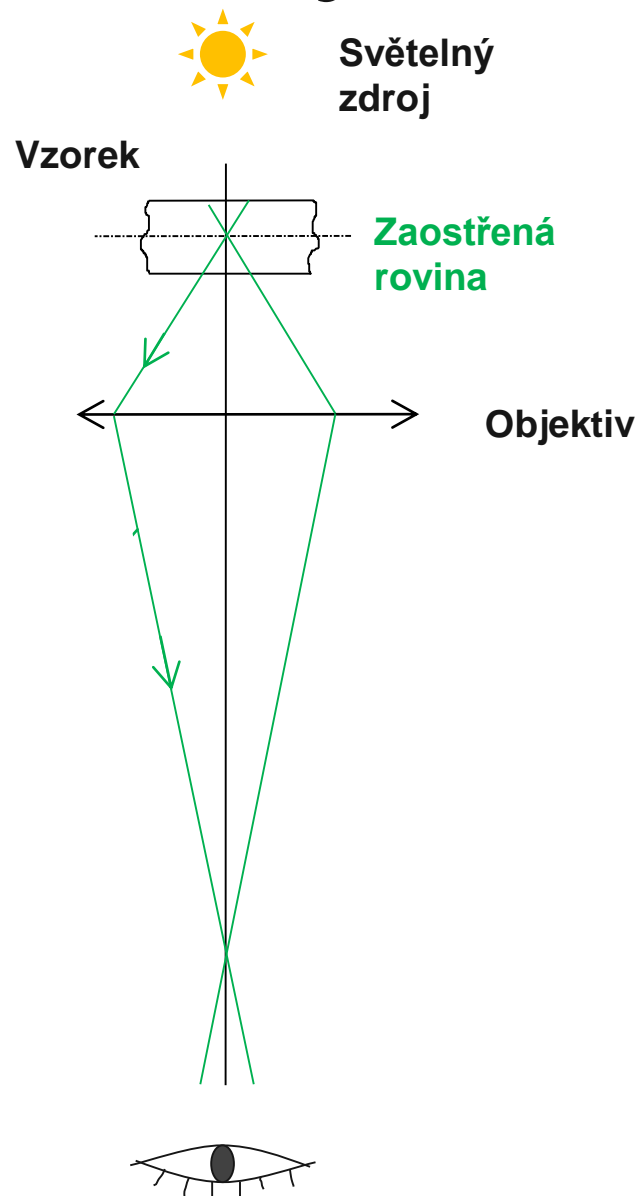


Světlo prochází vzorkem odspodu nahoru

Jednodušší konstrukce mikroskopu

Používá se pro fixované vzorky, sklíčka

# Invertovaný mikroskop

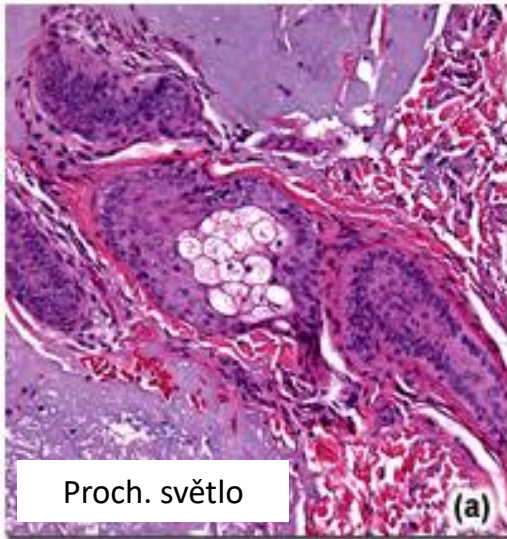


Pozorování vzorku zespodu

Používá se pro živé vzorky –  
buňky kultivované na Petriho  
misce v laboratoři

# Světelná mikroskopie

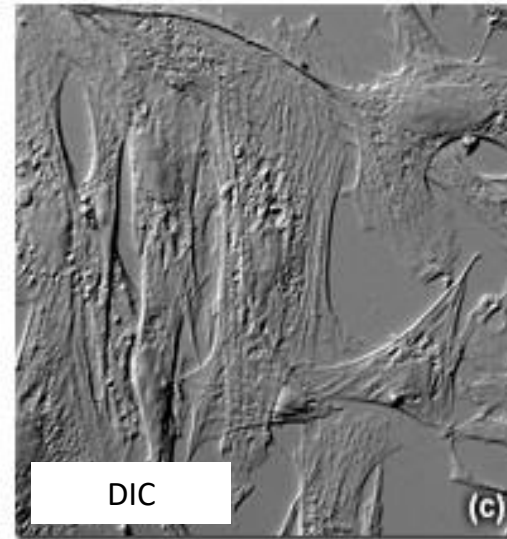
- Procházející světlo – tenký řez tkáně se jeví jako transparentní - nutno barvení vzorku, nebo kontrasty
- Fluorescence – epifluorescenční, konfokální, superrezoluce



Nízký kontrast  
Barvení vzorků



Zvýrazněné okraje,  
vnitřní struktura,  
organely  
Ne povrch



Struktura povrchu  
Plasticita  
Optické řezy  
Žádný halo efekt  
Sklo, ne plastic



Obojí – vnitřní struktura i povrch  
Sklo i plastic  
IVF oblíbené

Skrze mikroskop se nedíváte na vzorek..  
Pozorujete obraz vzorku!