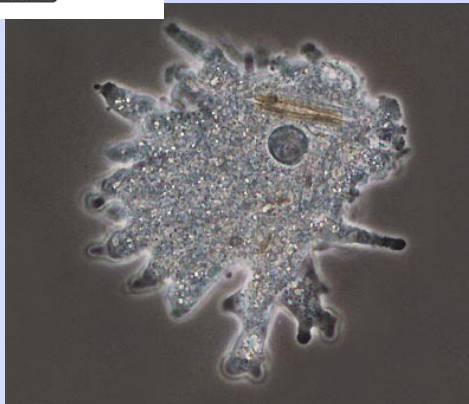
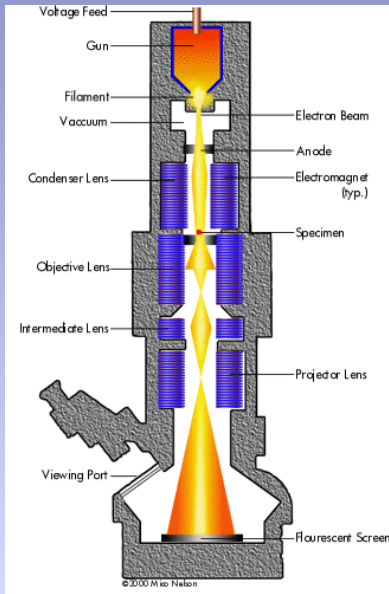


Přednášky z lékařské biofyziky

Biofyzikální ústav Lékařské fakulty
Masarykovy univerzity, Brno



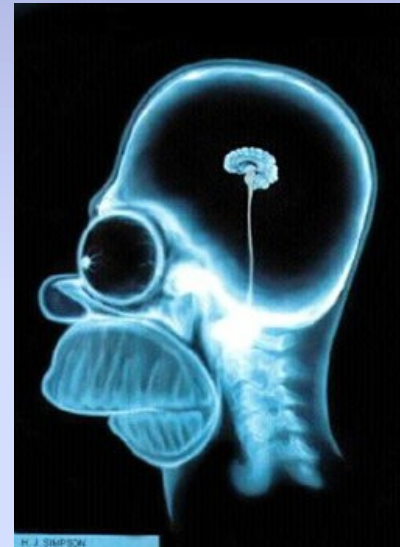
Mikroskopie

Obsah přednášky

- Složený mikroskop a jeho varianty
 - Fyzikální principy mikroskopie
 - Fázový kontrast
 - Fluorescenční mikroskop
- Optické skenovací mikroskopy
 - Laserový konfokální skenovací mikroskop
 - Mikroskopie v blízkém optickém poli
- Elektronová mikroskopie
 - Transmisní elektronový mikroskop
 - Skenovací elektronový mikroskop
 - Skenovací tunelový mikroskop
- Mikroskopy založené na jiných fyzikálních principech
 - ATM - Atomic force microscopy
 - Akustická mikroskopie

Předpokládané znalosti

- Základy geometrické a vlnové optiky

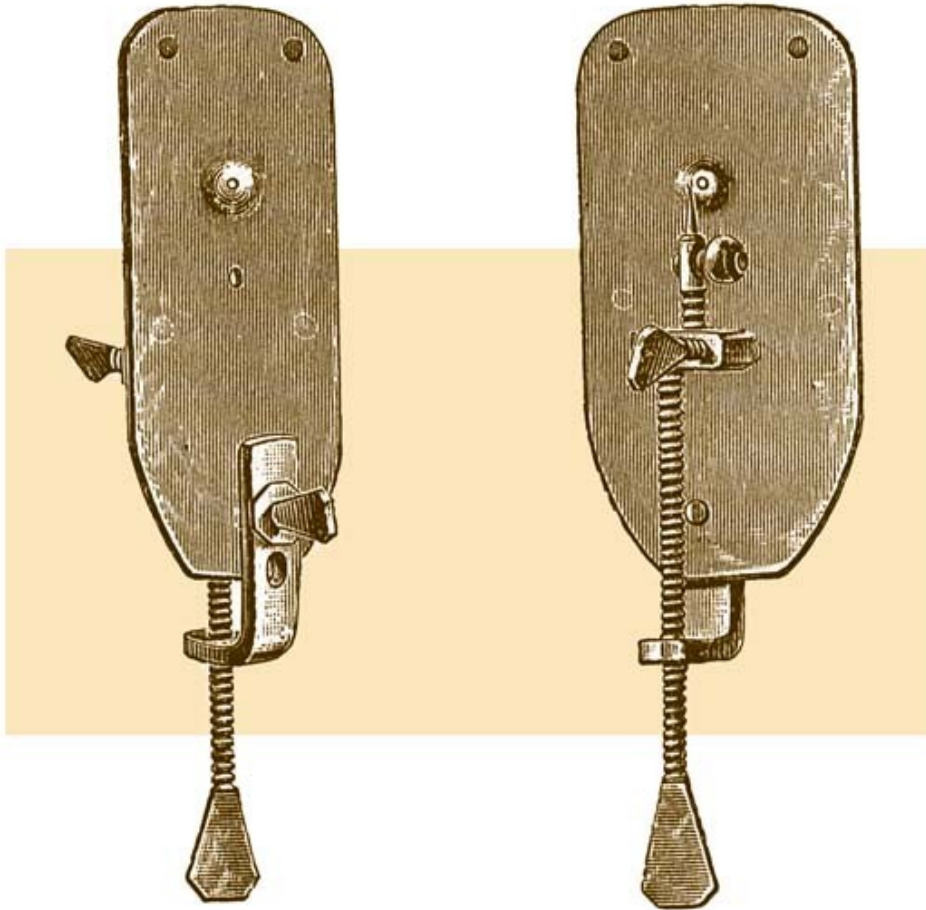


Složený mikroskop a jeho varianty

Fyzikální principy mikroskopie

- Prostorové rozlišení lidského oka ze vzdálenosti 25 cm je přibližně 14 čar na mm.
- Lupa může toto rozlišení podstatně zvýšit (pro velké rozlišení potřebujeme velký průměr čočky a krátkou ohniskovou vzdálenost). Lupa však nemá dostatečně velké rozlišení pro studium mikrostruktury živé hmoty.
- První mikroskop byl vyroben v Nizozemsku na konci 16. století. Anthony van Leuwenhoek (1632-1723) zdokonalil jeho konstrukci po roce 1650 (rozlišení může být kolem 2000 čar na mm).
- Sestrojení elektronového mikroskopu (ve 30. letech 20. století) bylo dalším milníkem mikroskopie. Rozlišení se zlepšilo přibližně 1000x oproti dosavadním mikroskopům, takže bylo možno spatřit velké molekuly. Dnes můžeme rozlišit dokonce jednotlivé atomy.
- V zásadě můžeme použít jakékoliv vlnění pro zobrazení mikroskopických objektů. Jedinou podmínkou je, aby vlnová délka byla kratší než rozměry pozorovaného objektu.

První použitelný mikroskop (17. století)

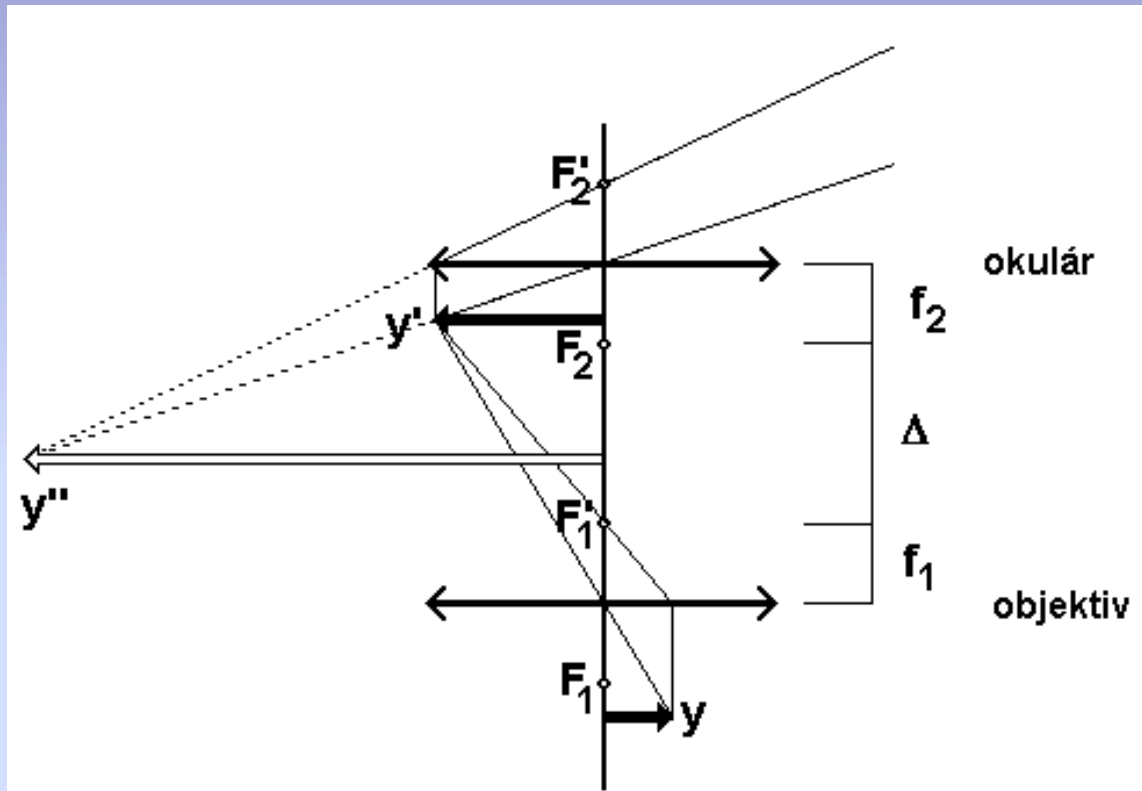


www.arsmachina.com/images/loeuwenhoek_thmb.jpg

Schéma mikroskopu a vlastnosti jeho optického systému

- Hlavní části: dvě soustavy čoček - objektiv a okulár. (Obě se chovají jako spojné čočky).
- Z hlediska kvality obrazu je nejdůležitější částí mikroskopu **objektiv**, který vytváří skutečný, zvětšený a převrácený obraz. Pozorovaný objekt musí být umístěn mezi ohnisko a dvojnásobek ohniskové vzdálenosti objektivu (objektiv lze považovat za spojnou čočku s velmi krátkou ohniskovou vzdáleností – pro zajištění vysokého rozlišení).
- Mechanická část spojující objektiv s okulárem se nazývá **tubus**. Obraz vytvořený objektivem (umístěný hned za předmětové ohnisko okuláru) je pozorován **okulárem** jako jednoduchou lupou. Výsledkem je velmi zvětšený, převrácený a neskutečný obraz.
- **Kondensor** je optickým systémem soustřeďujícím světlo na pozorovaný objekt, zajišťuje jeho dokonalé osvětlení.

Optické schéma a zvětšení mikroskopu



F – ohniska, f – ohniskové vzdálenosti, y – předmět, y' – skutečný obraz předmětu tvořený objektivem, y'' – neskutečný obraz viděný v okuláru, Δ – optický interval mikroskopu.

$$M = M_{ob} \cdot M_{ep} = \frac{\Delta \cdot d}{f_{ep} \cdot f_{ob}}$$

d – konvenční zraková vzdálenost (0,25 m), Δ – optický interval mikroskopu, f_{ob} a f_{ep} jsou ohniskové vzdálenosti objektivu a okuláru.

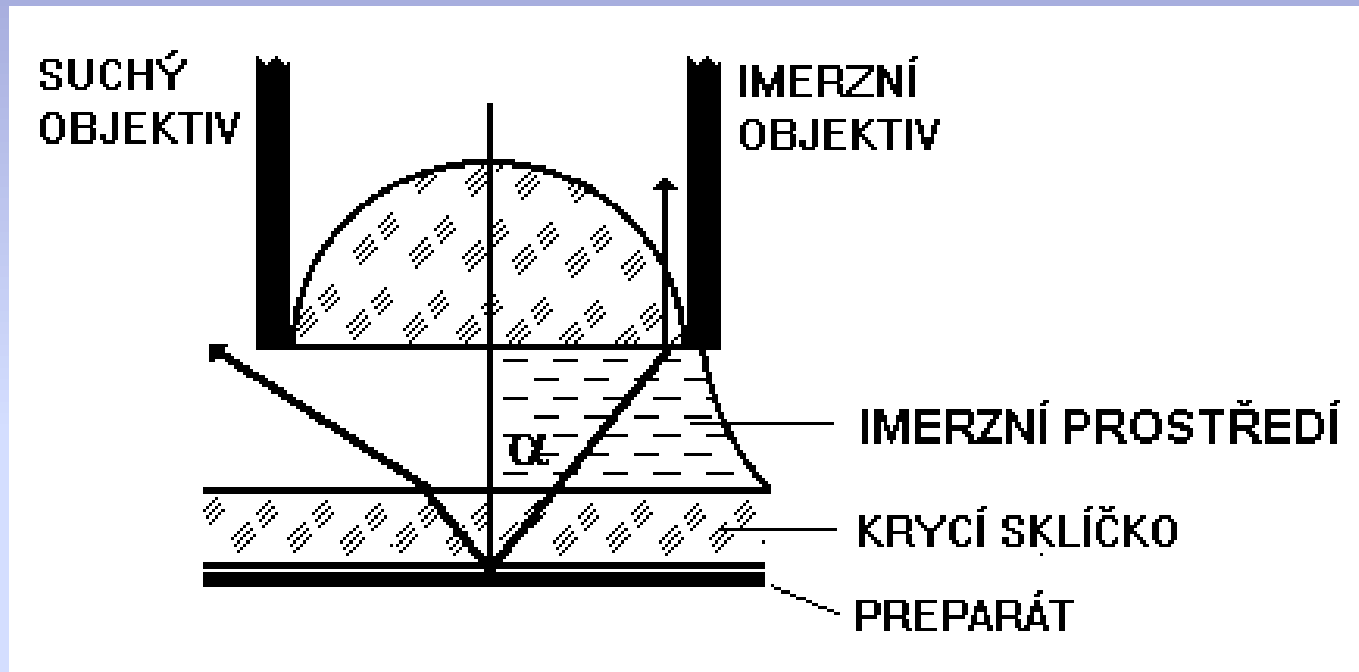
Objektivy mikroskopů



Specifikace objektivů

- **Numerická apertura** (NA, max. hodnota kolem 1,5) – Nejvýznamnější specifikace: určuje úhel, pod kterým může světlo vstupovat do objektivu (což určuje jas obrazu, čím je NA větší, tím je větší zorný úhel), mezní prostorové rozlišení (úměrné NA) a hloubku ostrosti (nepřímo úměrná NA^2).
- **Příčné zvětšení**
- **Korekce optických vad - Achro a Achromat** (achromatické), **Fl, Fluar, Fluor, Neofluar, Fluotar** (fluoritové čočky, lepší odstranění kulové a barevné vady), **Apo** (apochromatické, nejvyšší stupeň korekce kulové a barevné vady)
- **Tloušťka krycího sklíčka** (standardně 0,17 mm). Některé objektivy mají **korekční kroužek** pro kompenzaci odchylek od tohoto standardu.
- **Pracovní vzdálenost** – Vzdálenost mezi čelem čočky objektivu a krycím sklíčkem, je-li pozorovaný předmět v ohnisku. Zmenšuje se při rostoucím zvětšení. Novější objektivy mají na sobě údaj o pracovní vzdálenosti v mm.
- **Imersní prostředí** – Většina objektivů je konstruována pro zobrazení předmětů za předpokladu, že prostředím mezi objektivem a krycím sklíčkem je vzduch. Aby bylo dosaženo vyšší NA, jsou mnohé objektivy konstruovány tak, aby se mohl snížit rozdíl indexů lomu mezi krycím sklem a prostředím. Planapochromatické objektivy s vysokým rozlišením mohou dosáhnout hodnot NA až 1,40, jestliže je imersním prostředím speciální olej s indexem lomu 1,51. Někdy se jako medium používá i voda nebo glycerín.
- **Barevné kódy** – Výrobci mikroskopů označují svoje objektivy barevnými kódy aby se usnadnila identifikace zvětšení a požadavků na imersní prostředí.

Použití imersního prostředí



Účelem imersního media je zvýšení NA.

Levý paprsek opouštějící sklíčko se láme na jeho rozhraní se vzduchem od kolmice a nemůže se podílet na tvorbě obrazu. Pravý paprsek prochází do imersního prostředí (jež má index lomu podobný jako sklo), nemění svůj směr a podílí se na tvorbě obrazu.

Mez prostorové rozlišovací schopnosti mikroskopu

- Mezní rozlišovací schopnost je úměrná NA a nepřímo úměrná vlnové délce λ použitého světla (německý fyzik *Abbe*, 1840-1905).
- V některých učebnicích je uváděn výraz pro rozlišovací schopnost:

$$\delta = \lambda/NA$$

kde δ je vzdálenost dvou ještě rozlišitelných bodů ($NA = n \cdot \sin \alpha$, kde n je index lomu prostředí mezi objektivem a krycím sklíčkem a α je dříve zmiňovaný zorný úhel).

- Prostorové rozlišení roste se zvětšením. Kombinací silných spojných čoček bychom mohli sestavit mikroskop s téměř libovolným zvětšením, avšak místo toho zjišťujeme, že za určitou hranicí (hranice „užitečného zvětšení“) se rozlišení již nezvětšuje (jde o „prázdné“ zvětšení).
- Jestliže se zmenšuje apertura (otvor) kondenzoru, prostorové rozlišení se snižuje, avšak roste kontrast! Proto musíme při volbě apertury kondenzoru dbát o vyváženost prostorového rozlišení a kontrastu. Chceme-li jen snížit jas obrazu, je vhodnější ztlumit lampu než zmenšit aperturu kondenzoru, protože takto nedojde ke zhoršení rozlišovací schopnosti.

Hloubka ostrosti Z

- Jde o tloušťku objektu podél osy z, která se současně nachází v ohnisku. Důležité u silnějších vzorků.

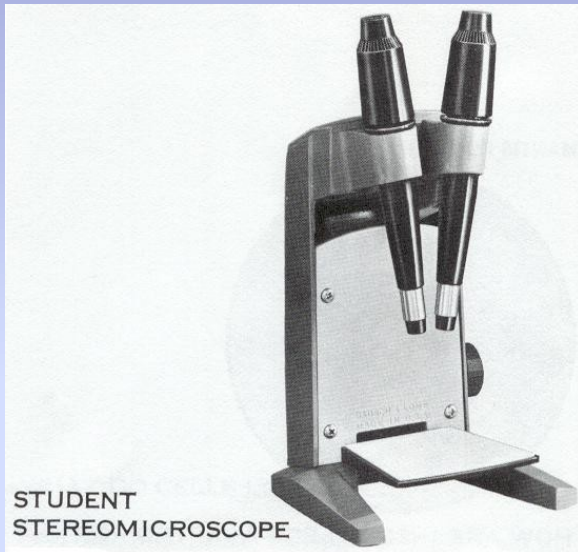
$$Z = \frac{n}{NA^2}$$

n je index lomu vzorku (resp. tekutiny obklopující mikroskopovaný objekt).

Speciální optické mikroskopy

- Pozorování ve **světlém** nebo **tmavém poli**
- **Stereomikroskop** (dva mikroskopy se samostatnými objektivy a okuláry, jejichž optické osy svírají úhel asi 15°) – stereoskopické vidění. V medicíně: **mikrochirurgie**. Obraz nesmí být převrácený. Operační pole je osvětleno optickými vlákny. Ohnisková délka objektivu se může plynule měnit - zoom – různé prostorové rozlišení.
- Moderní badatelské mikroskopy jsou vybaveny digitálními fotoaparáty pro **mikrofotografii** nebo **mikrokinematografii (video)**.
- Software pro zpracování obrazu: mění kontrast, jas, ostrost atd. Pokročilý software umožňuje kvantitativní analýzu obrazu, hledání typických tvarů atd.
- Většina druhů mikroskopů může být sestavena z různých objektivů, okulárů, kondenzorů a dodatečně vybavena různými speciálními optickými prvky. Je k dispozici různé příslušenství, např. mikromanipulátory pro umístování elektrod do buněk, separování organel atd.

Stereomikroskop



- The **OPMI® Vario/NC 33** surgical microscope

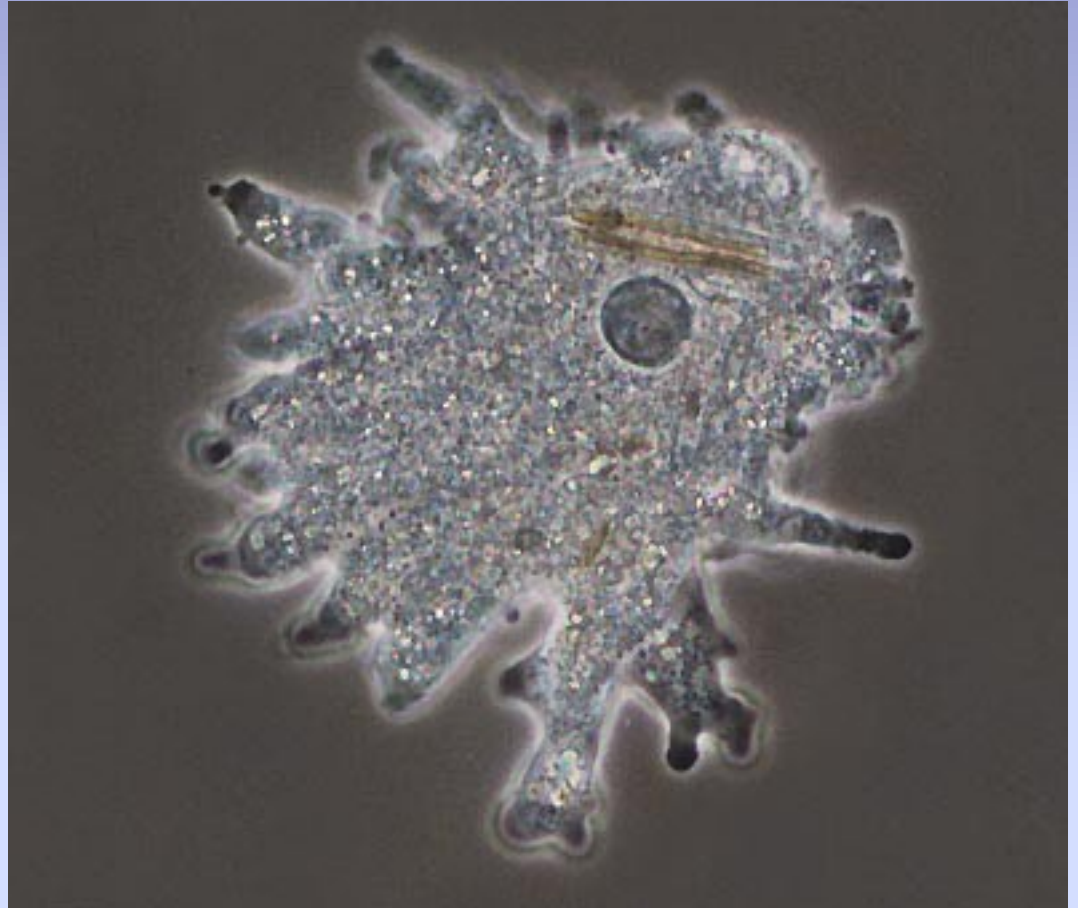
Mikroskop s fázovým kontrastem

Tato technika vytváří kontrastní obrazy např. živých buněk, jejichž struktury mají podobný útlum (jsou rovnoměrně průsvitné a proto málo kontrastní v mikroskopu zobrazujícím rozdíly v amplitudě procházejícího světla), avšak lehce se liší svým indexem lomu (v důsledku čehož dochází k fázovým posunům). *Fázově kontrastní technika mění rozdíly ve fázi v rozdíly v amplitudě.* Živé buňky mohou být zkoumány ve svém přirozeném stavu, tj. bez fixace a barvení. **Princip:** Do přední ohniskové roviny kondenzoru je přidána clona se štěrbinou ve tvaru mezikruží, kterou pak prochází světlo. Když světlo prochází vzorkem, paprsky jsou odchylovány z původního směru. V obrazové ohniskové rovině objektivu se nachází **fázová destička**, opět ve tvaru mezikruží, jež posouvá fázi o $+\pi/2$ nebo $-\pi/2$, tj. o čtvrtinu vlnové délky. Tato destička propouští paprsky, které nezměnily svůj směr na fázových objektech. Ostatní paprsky destičku minou a jejich fáze se nezmění. Obraz se vytváří interferencí fázově posunutých a neposunutých paprsků. Fázové objekty pak vypadají jako tmavé nebo světlé vůči svému okolí (pozitivní nebo negativní kontrast).



Mikroskop s fázovým kontrastem

Mnohé bezbarvé biologické objekty (obtížně pozorovatelné v běžném mikroskopu) jsou fázovými objekty. Barviva je mohou zviditelnit, jsou však často pro buňky jedovatá. Fázově kontrastní mikroskopy umožňují pozorovat takovéto objekty bez barvení.



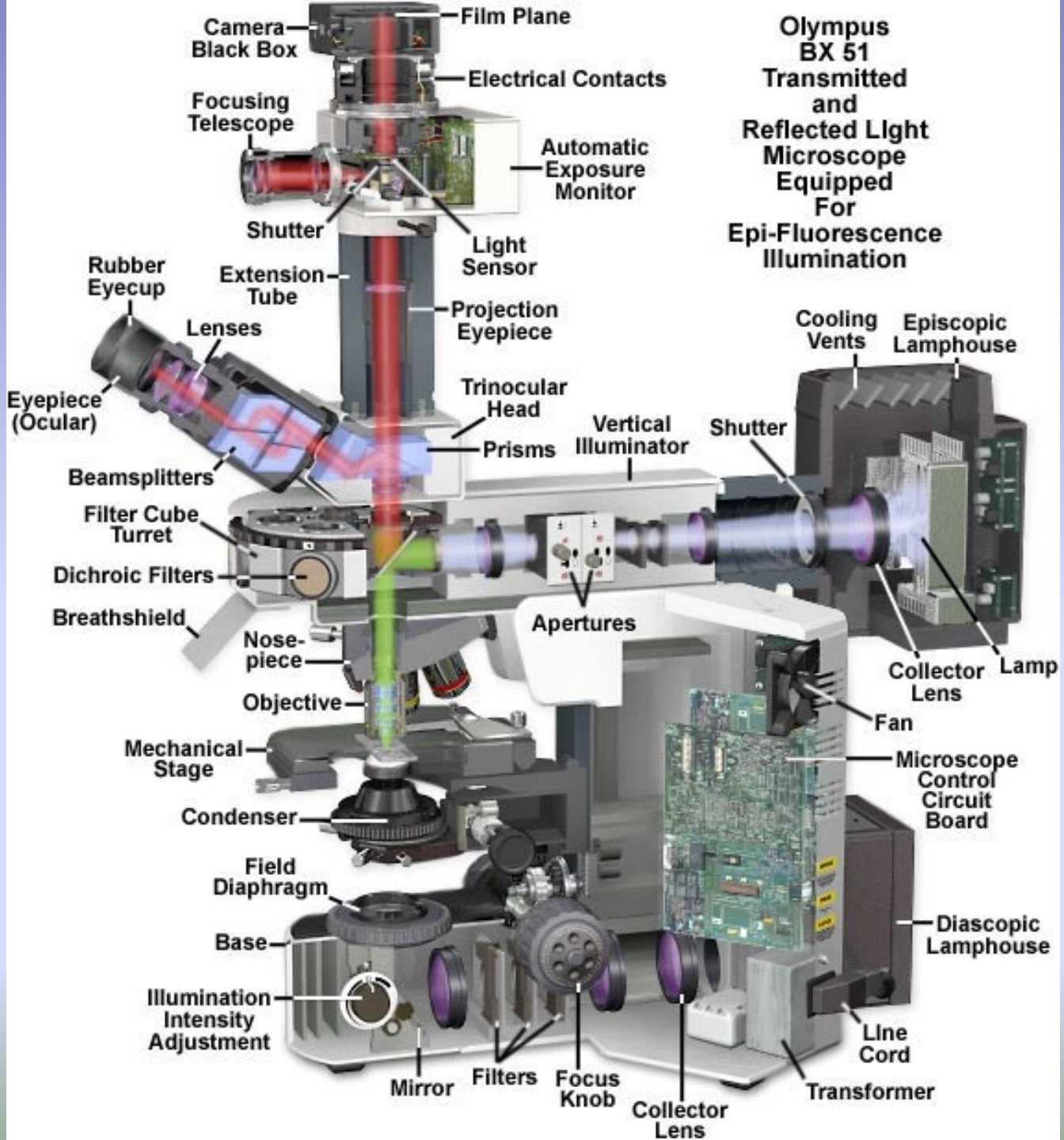
Améba ve fázovém kontrastu, $Z = 250x$
(www.durr.demon.co.uk/colour.html.)

Fluorescenční mikroskop

- **Fluorescenční mikroskopie** je založena na schopnosti některých látek emitovat viditelné světlo po ozáření světlem o kratší vlnové délce (UV záření nebo fialové světlo).
- Optika kondenzoru musí být přizpůsobena UV záření, které však může k preparátu přicházet též objektivem (horní osvětlení). Zbývající části mikroskopu jsou stejné jako u běžných mikroskopů. Nutná je ochrana očí před UV zářením.
- Fluorescenci vykazuje např. tryptofan či jiné sloučeniny s aromatickým kruhem či heterocyklem. Ve většině případů se však ke vzorkům přidávají **fluorescenční barviva** specificky interagující s různými buněčnými strukturami. Často je barvivo (fluorochrom, fluorescenční sonda) vázáno na **protilátku** specifickou pro některou bílkovinu. Tato imunofluorescenční metoda může selektivně zviditelnit např. cytoskelet, chromatin či různé membránové bílkoviny.

FM

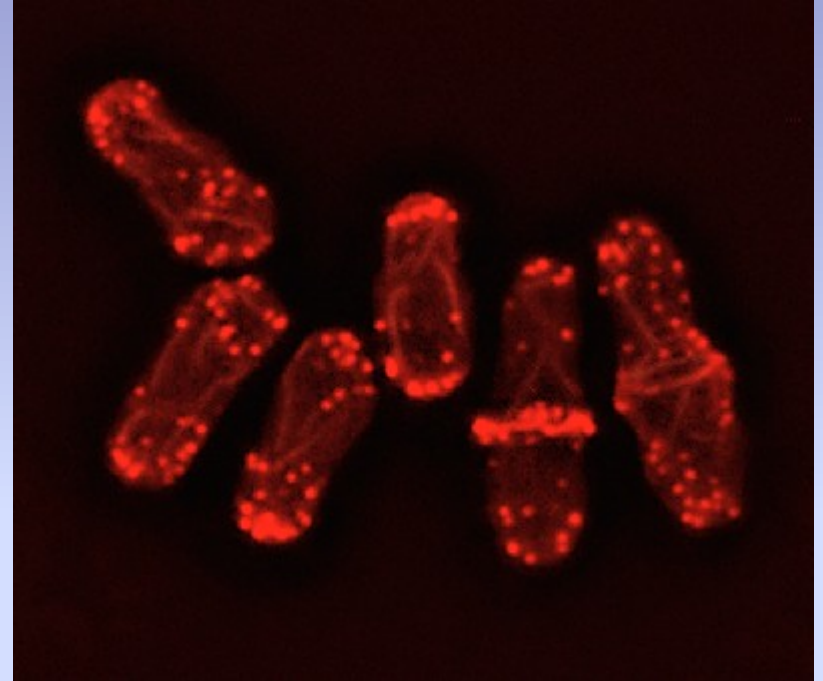
Olympus BX 51 Transmitted and Reflected Light Microscope Equipped For Epi-Fluorescence Illumination



Fluorescenční mikroskop



Viriony v infikované buňce -
<http://usa.hamamatsu.com/sys-biomedical/slc2400/slc-smpl.htm>

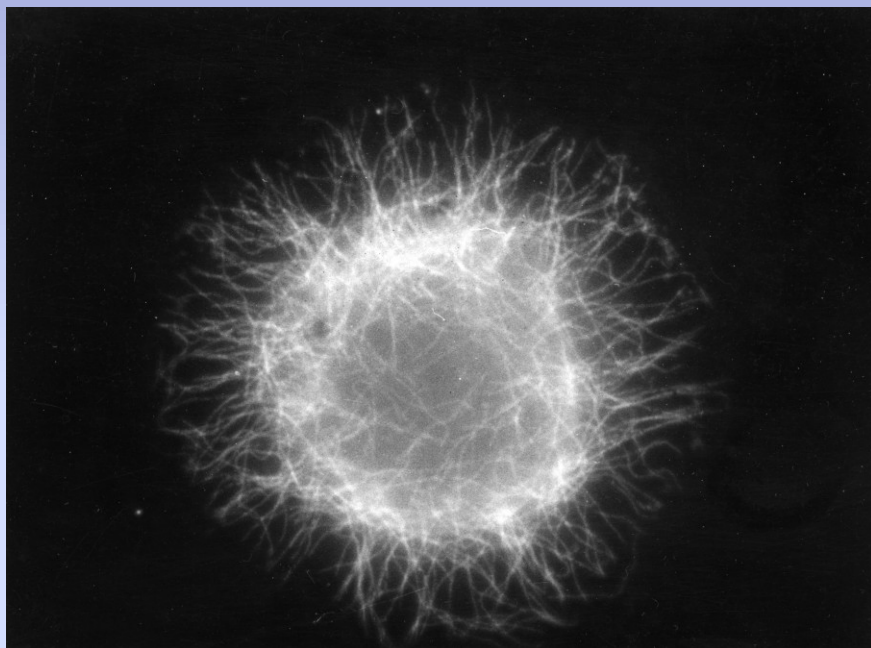


Aktinová vlákna kvasinek zviditelněná
fluorescenční mikroskopií – barveno
rhodaminem-phalloidinem

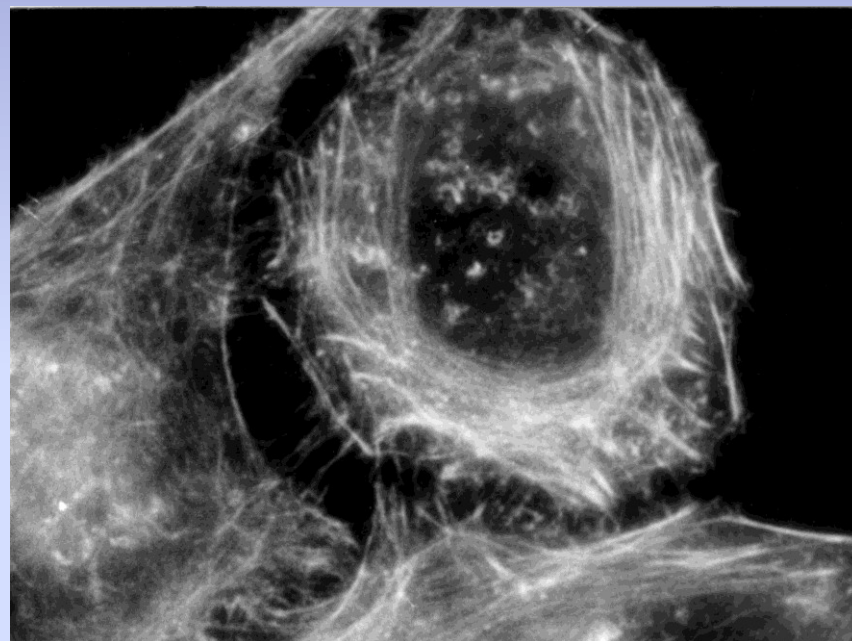
[www.paulgyoung.com/.../
fission_yeast_actin_cytoskeleton.htm](http://www.paulgyoung.com/.../fission_yeast_actin_cytoskeleton.htm).

Fluorescenční mikroskop

Cytoskelet zviditelněný imunofluorescenční metodou



Mikrotubuly HeLa
buněk



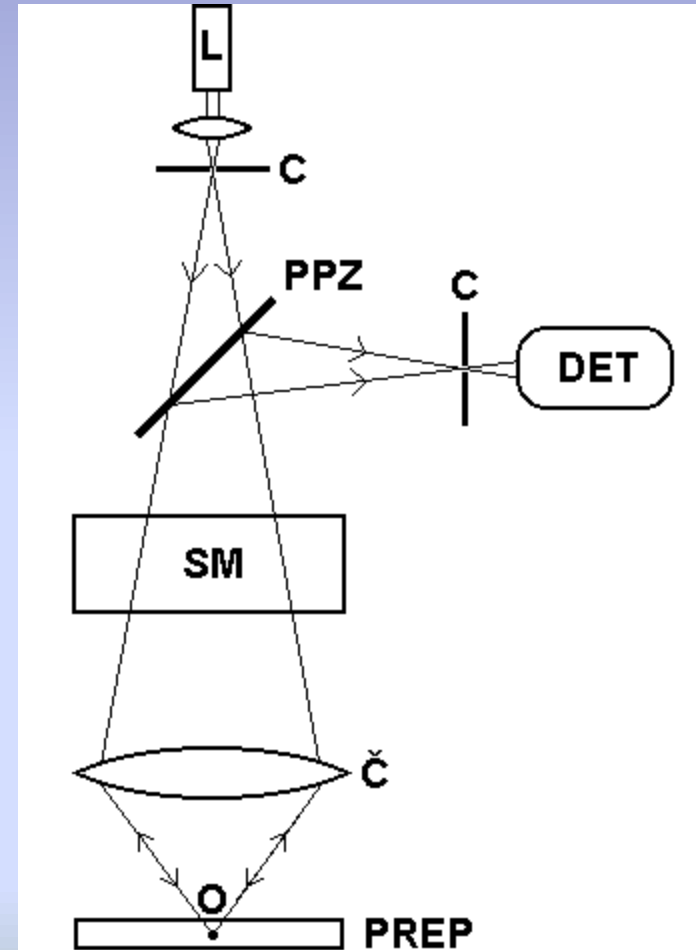
Mikrofilamenta HeLa
buněk

Optické skenovací mikroskopy

Konfokální laserový skenovací mikroskop

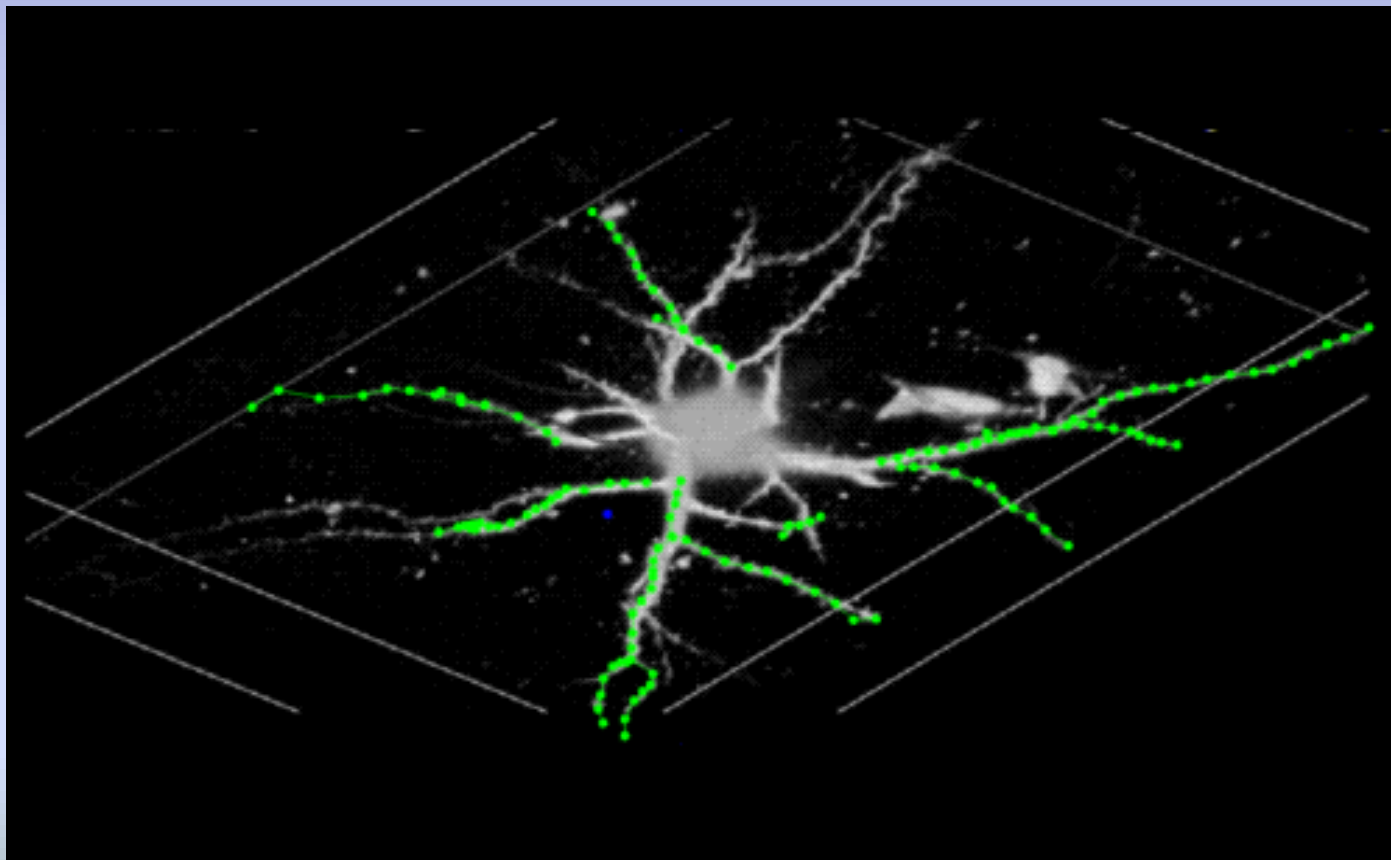
- L - laser, C – clony s malými kruhovými otvory, PPZ – polopropustné zrcadlo, DET – detektor světla (fotonásobič), SM – skenovací mechanismus, Č – čočka objektivu (projektivu), O – bodový předmět, PREP – preparát (řez).

- Pouze paprsky odražené od bodových struktur v ohnisku mohou projít přes clonu C před detektorem. Ostatní paprsky (rozptýlené) jsou zastaveny clonou. Tyto paprsky by u běžného mikroskopu zhoršovaly kvalitu obrazu, protože snižují kontrast. Pomocí tohoto mikroskopu můžeme zkoumat poměrně silné nativní řezy. Skenovací mechanismus je systém rotujících zrcadel, která mohou s ohniskem pohybovat v hustých rovnoběžných liniích.



Konfokální laserový skenovací mikroskop

V praxi se používá imuno značení pro specifikaci pozorovaných struktur, zvýraznění chromozomů, membránových receptorů.



3D obraz neuronu, fluorescence - <http://www.cs.ubc.ca/nest/magic/neuron.html>

Konfokální mikroskop

- Live Cell Imaging- sledování růstu buněčných kultur v reálném čase v průtokové komůrce
- Sledování přímých účinků chemických nebo fyzikálních faktorů na buněčné kultury.
- Vývoj: + souběžné použití spektrofotometru jako součást mikroskopu, náhrada běžného laseru za „bílý laser“ tj. laser s plynule laditelnými vlnovými délkami v rozmezí 470-670 nm, určené k spektrofotometrii (Leica).
 - + Ramanův spektrometr- bezkontaktní, nedestruktivní chemická analýza materiálu; (viz přednáška o přístrojových metodách molekulární biofyziky)

Optické skenovací mikroskopy

Skenovací mikroskopie v blízkém optickém poli

(near field optical scanning microscopy - NFOSM)

NFOSM = NSOM = SNOM

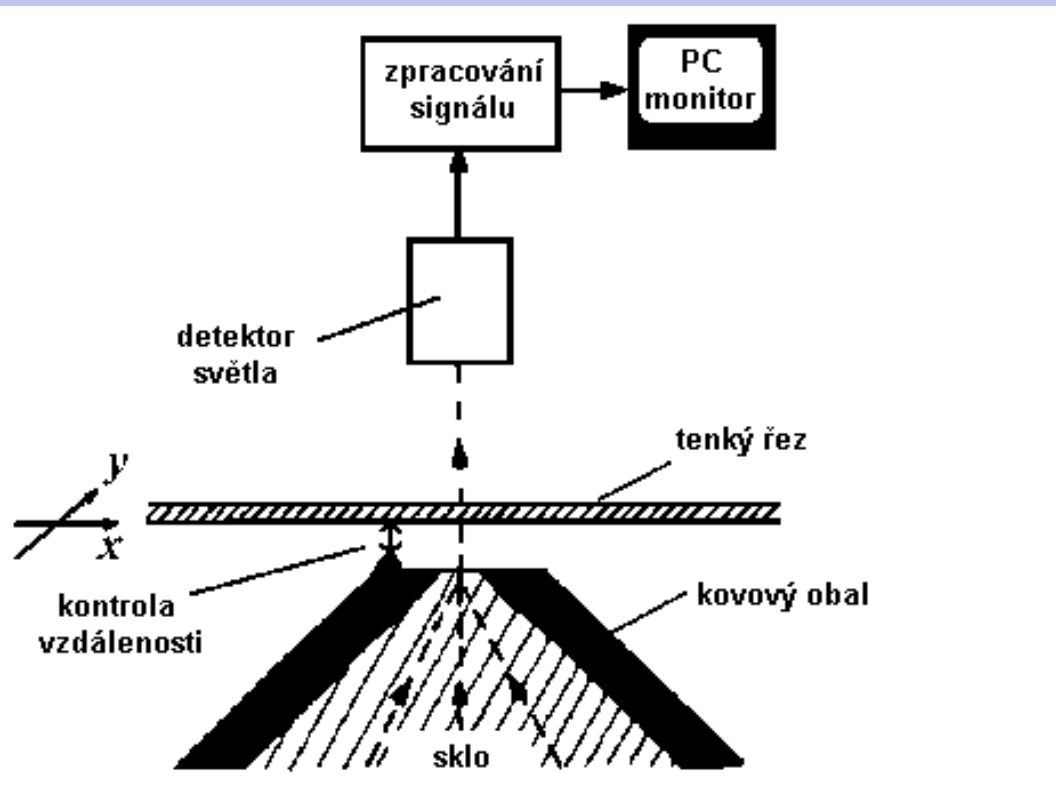
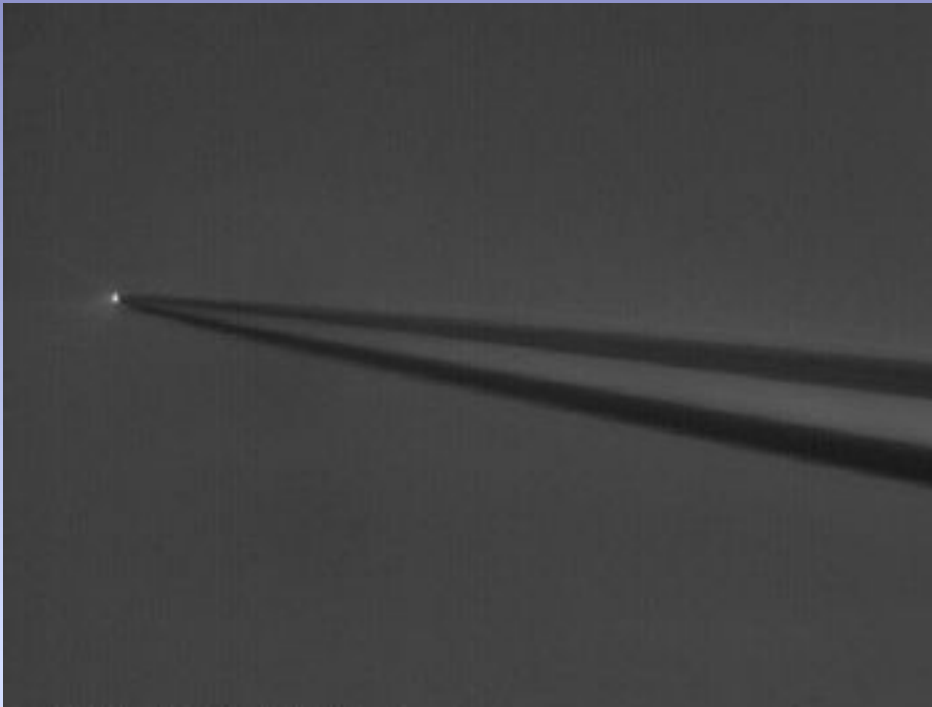
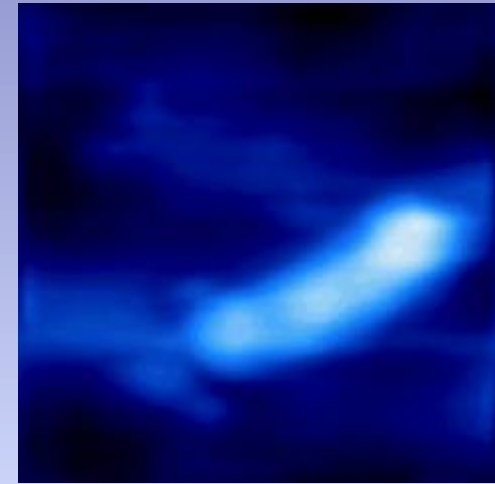


Schéma mikroskopu pro pozorování v blízkém optickém poli. Úzký svazek světla argonového laseru prochází velmi malým otvorem (\varnothing 5 – 10 nm) v kovem pokrytém skleněném hrotu. Tenký řez se pohybuje nad otvorem v konstantní vzdálenosti. Podle Rontó a Tarjána (1994).



Světlo procházející osvětlovacím hrotem přístroje pro skenovací mikroskopii v blízkém optickém poli pozorované v normálním optickém mikroskopu

<http://physics.nist.gov/Divisions/Div844/facilities/nsom/nsom.html>



Plasmidová DNA (10 kb)

•http://www.snom.omicron.de/examples/twinsnom/x-tsnom_12.html

Elektronová mikroskopie

- „Klasické“ elektronové mikroskopy (EM) používají pro zobrazení svazky urychlených elektronů. Elektrony mají vlnovou délku tzv. **de Broglieových hmotnostních vln**. Připomeňme si následující vztahy:

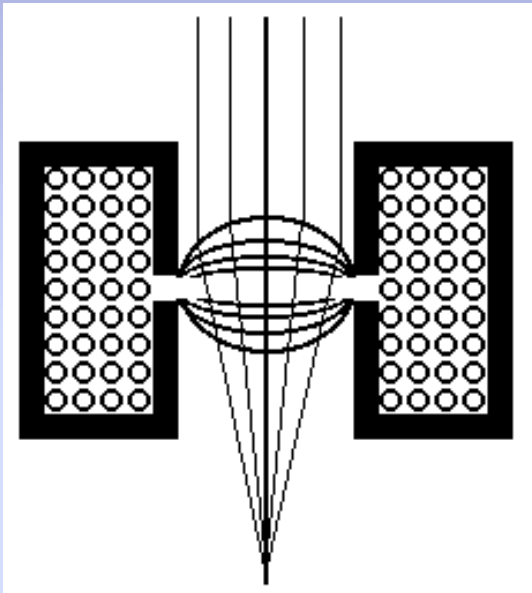
$$\lambda = \frac{h}{m \cdot v}$$

$$e \cdot U = \frac{1}{2} m \cdot v^2$$

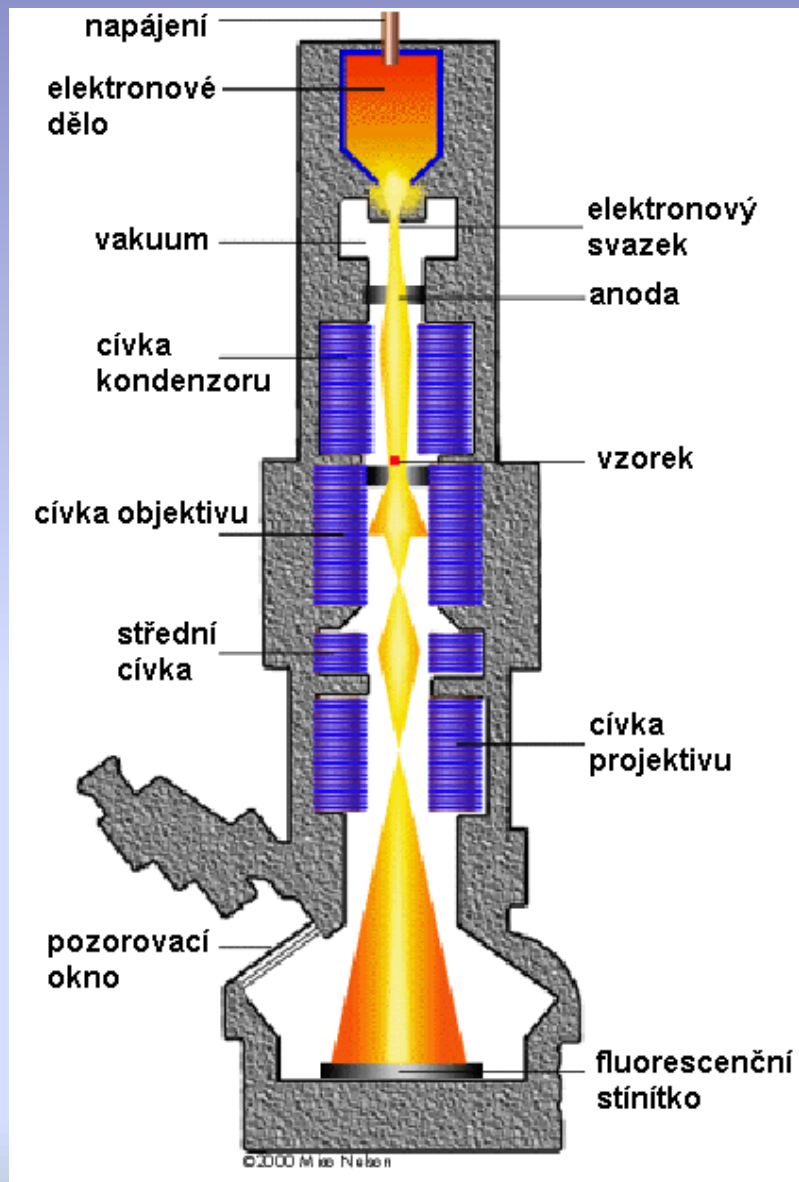
λ je vlnová délka, h Planckova konstanta, m relativistická hmotnost elektronu, v jeho rychlost, e – jeho elektrický náboj a U je urychlovací napětí. Je-li velikost pozorovaných objektů srovnatelná s λ , dochází k difrakci a vytvoření obrazu je znemožněno. Elektron s energií 1,5 eV má vlnovou délku 1 nm. Pomocí urychlených elektronů dosahujeme zhruba 10^5 -krát kratších λ . Viz $\delta = \lambda/n \cdot \sin \alpha$. Velké optické vady systému však způsobují, že numerická apertura je velmi malá - řádově 10^{-2} . Prostorové rozlišení EM je v praxi na úrovni několika desetin nm.

Elektronová mikroskopie

Magnetická čočka



Příčný řez cívkou, která je magneticky stíněna pancéřováním. Elektronový svazek je fokusován v místě, kde je pancéřování přerušeno. Magnetická čočka působí na elektrony jako spojka na světlo.



TEM – transmisní elektronový mikroskop

according to:

<http://www.vetref.net/emscope/theorysch.html>

Transmisní elektronový mikroskop



Brookhaven TEM

Zvětšení 50 000 000x, rozlišení 0,1 nm,

Lze provádět simultánně chemickou analýzu vzorku pomocí rentgenové spektrometrie (pouze některé prvky)

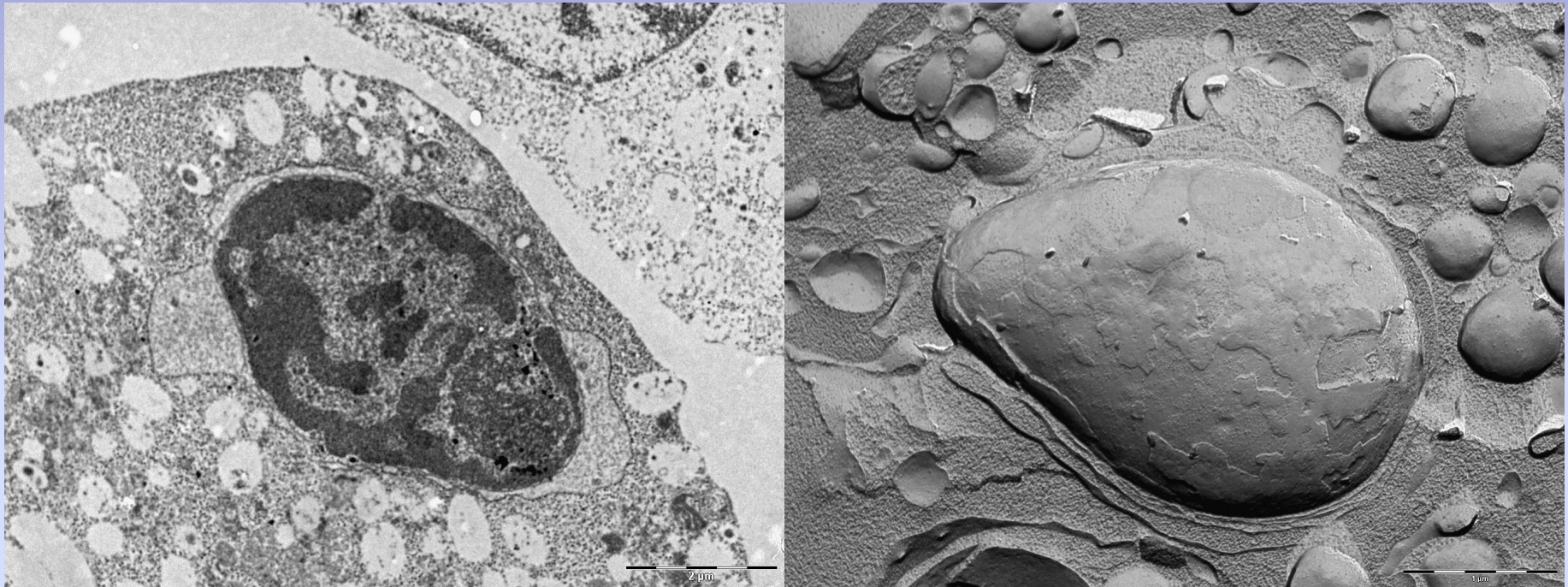
TEM – příprava a barvení řezů

- Potřeba velmi tenkých řezů (50-300 nm) a umístování řezů do vakua vyžaduje speciální metody přípravy.
- Nativní (vlhké) řezy mohou být pozorovány pouze nejmodernějšími tzv. environmentálními EM, v nichž jsou řezy umístěny do prostředí s relativně vysokým tlakem a za použití nízkého urychlovacího napětí.
- Biologické materiály musí být připraveny pomocí chemické fixace a impregnovány různými látkami (epoxidové pryskyřice) před rozřezáním.
- Aby se zvýšil rozptyl elektronů na vzorku, používají se soli nebo oxidy těžkých kovů (osmium, wolfram, uran), tzv. kontrastování membránových struktur.

TEM – příprava a barvení řezů

- **Kryofixace** = snaha o nahrazení pomalé chemické fixace rychlejší fixací mrazem
- Prudké zmrazení nativního vzorku v komoře pod vysokým tlakem (MPa) a při teplotě kolem $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Nevýhoda: při manipulaci se vzorkem nutno použít chlazené přístroje ($-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$), TEM je chlazen tekutým dusíkem
- **Metoda freeze-etching:** kovové repliky povrchů membránových struktur buněk
- Vzorek rozlámaný ve vysokém vakuu (10^{-5} Pa) a při teplotě $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na odhalené struktury je napařena vrstva těžkého kovu (Pt, Ta) pod úhlem (45°), tím se vystínují vyvýšené struktury, a pod úhlem 90° je přidána vrstva C, který struktury fixuje na místě
- Celková síla vrstvy je kolem 25 nm
- Biologický materiál musí být chemicky odstraněn

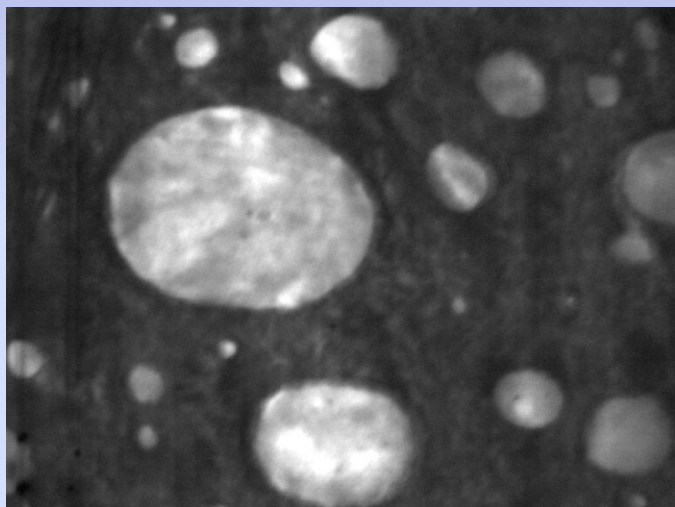
TEM- rozdíl řez x replika



Buňky HL-60, fragment jádra, morfologické změny v průběhu apoptózy.
Levý snímek- ultratenký řez, kontrastování OsO_4 .
Pravý snímek- replika, napařená vrstva Pt a C.
Snímky z TEM MORGAGNI 268 D (Philips), snímané na CCD kameru.

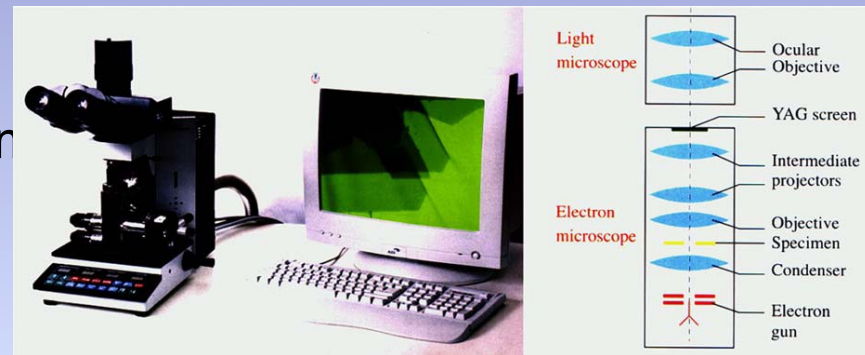
TEM pracující při nízkém urychlovacím napětí LV-STEM vers. LV-TEM

- Relativně silnější ultratenké řezy: 30-40 nm pro biologický materiál,
- Není nutno kontrastovat těžkými kovy
- Rozlišovací schopnost LV-STEM 1-2 nm

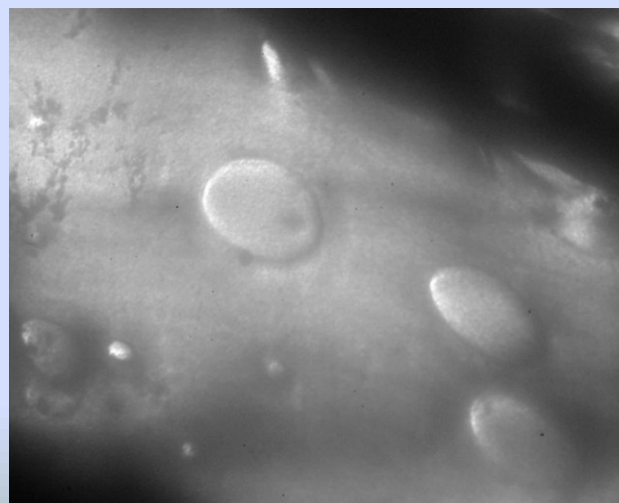


Snímek z LV-STEM, krystaly polypropylenu,
šířka rámečku 9,7 μm , urychlovací napětí 25 kV.

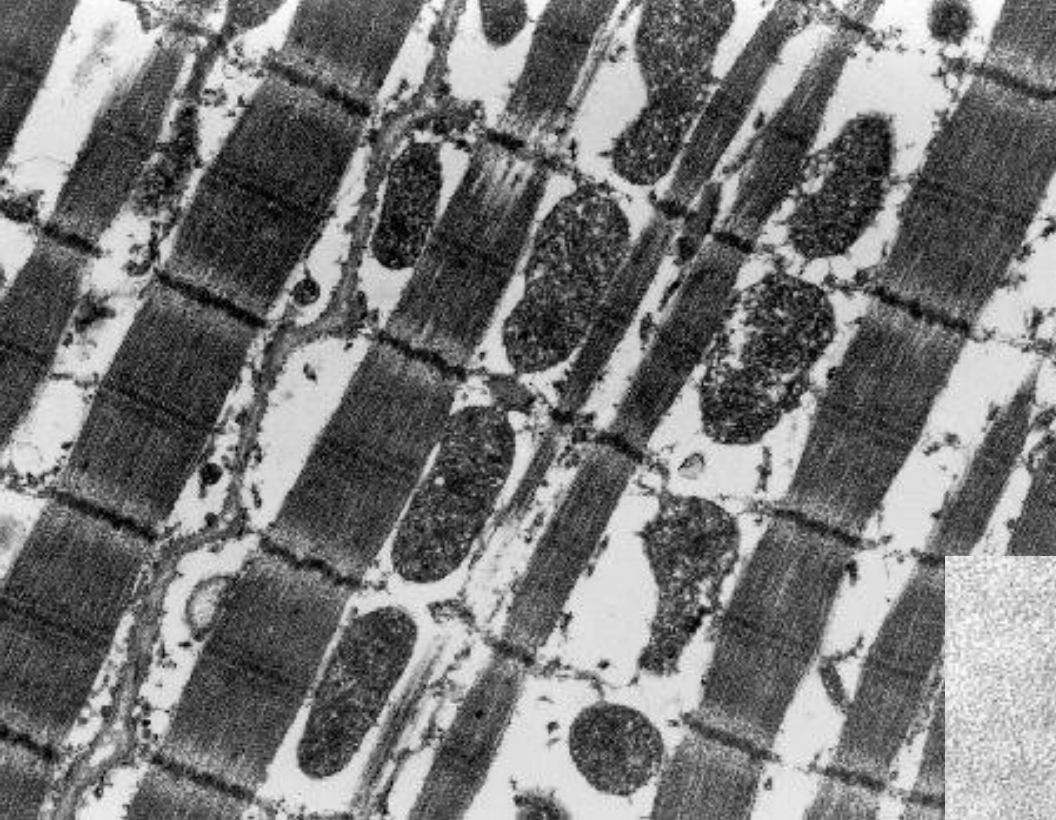
Převzato z Lednický at all., Polymer 41, 2000.



LV-EM vyvinutý firmou Delong Instruments



Snímek z LV-TEM, krystaly polypropylenu,
šířka rámečku 6,3 μm , urychlovací napětí 5 kV.

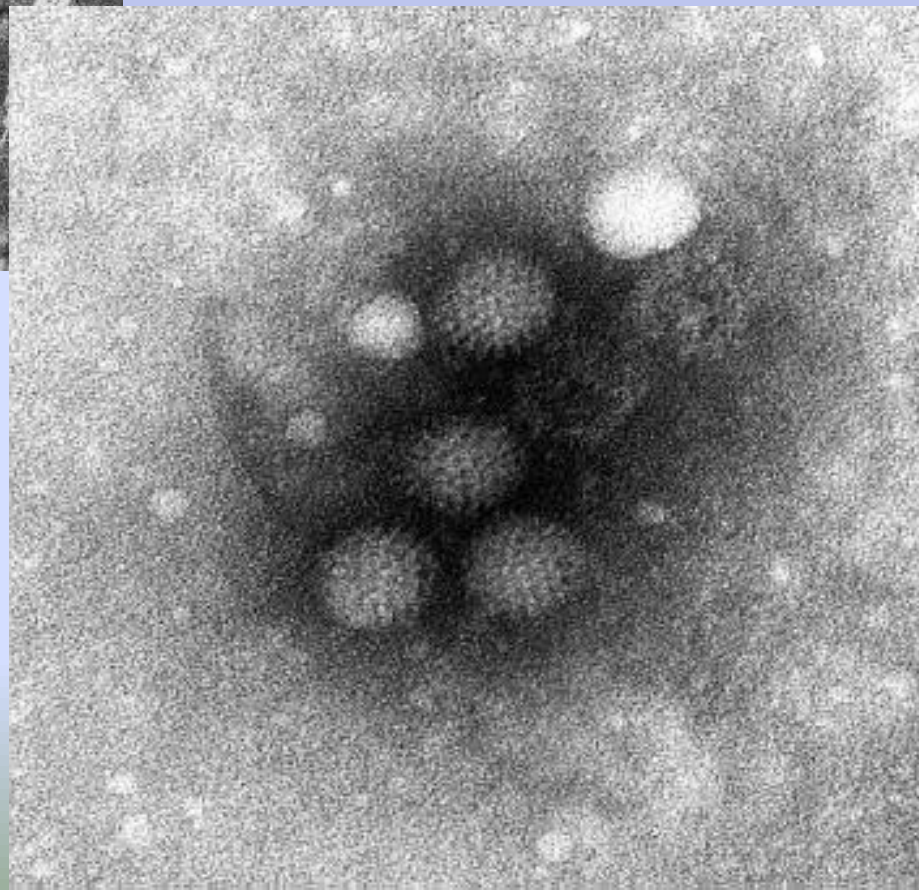


TEM -

<http://www.ualberta.ca/~mingchen/tem.htm>

Buňky břišního svalu ↑

Corona virus, negativní barvení →



Elektronová mikroskopie

Skenovací elektronová mikroskopie

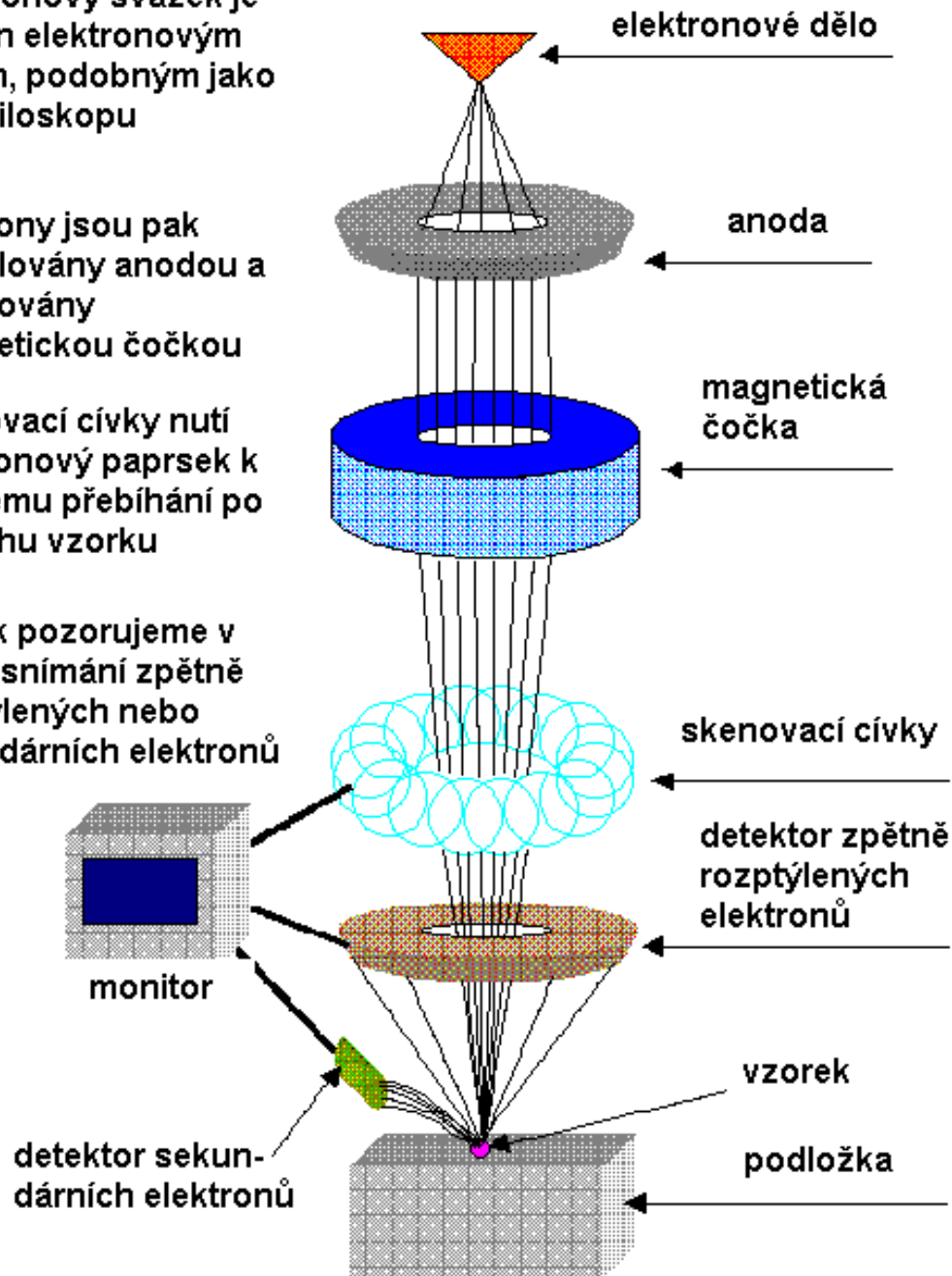


elektronový svazek je tvořen elektronovým dělem, podobným jako v osciloskopu

elektrony jsou pak urychlovány anodou a fokusovány magnetickou čočkou

skenovací cívky nutí elektronový paprsek k rychlému přebíhání po povrchu vzorku

vzorek pozorujeme v módu snímání zpětně rozptýlených nebo sekundárních elektronů



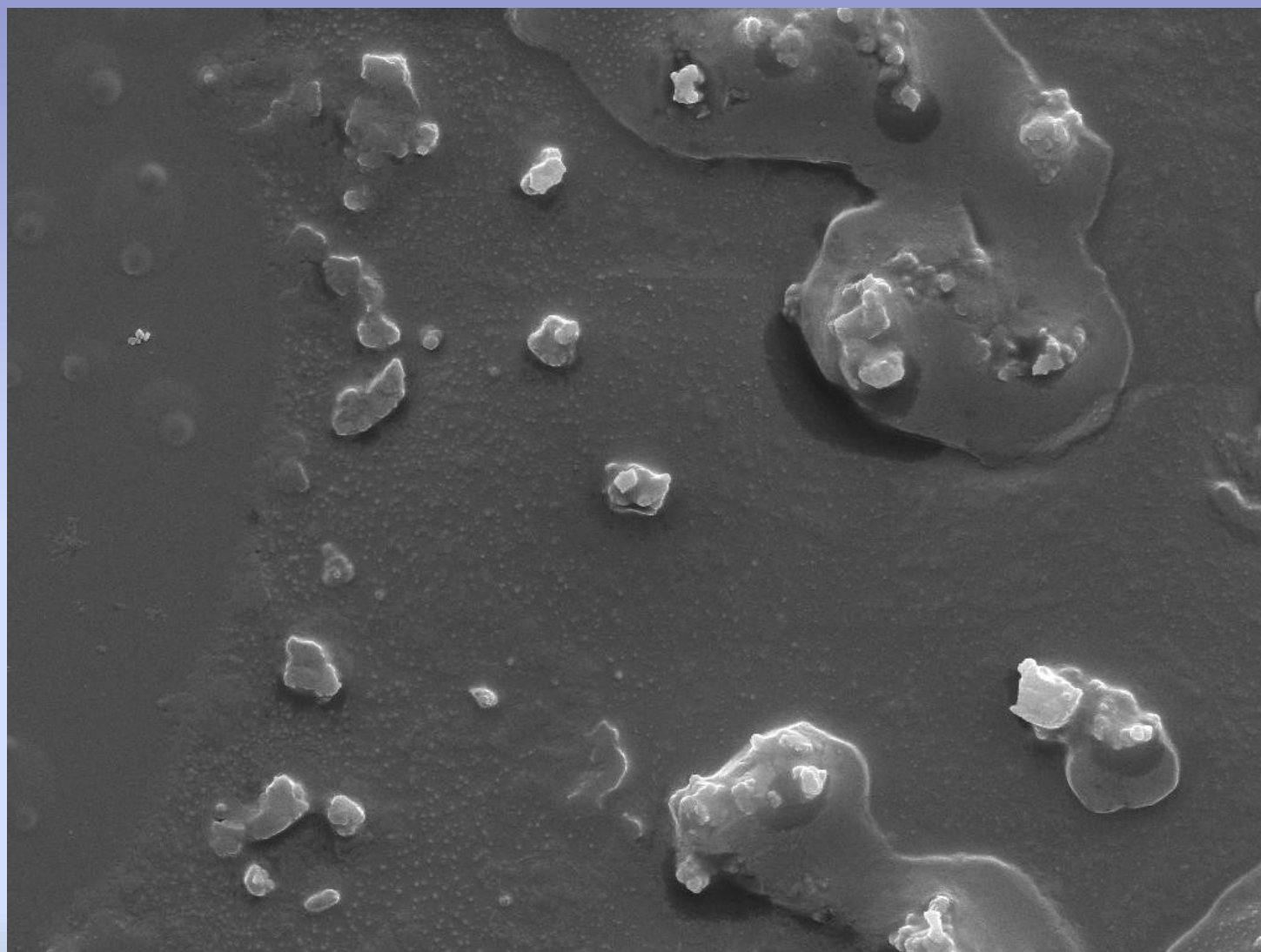
SEM

According to:
<http://www.rpi.edu/dept/materials/COURSES/NANO/shaw/BigSEM.gif>

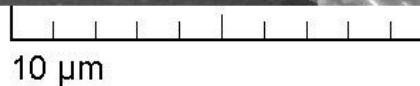
SEM- příprava vzorků

- Biologické vzorky i materiály je nutné vysušit v kritickém bodě v CO₂ atmosféře
- Nevodivý materiál je nutné pokrýt vrstvou kovu (Au, C, Ag) „naprášením“ kovu
- Mikroskopy s nízkým urychlovacím napětím - přednosti: méně artefaktů, menší poškození vzorků, menší nebo žádná vrstva kovu (MIRA firmy TESCAN)
- Možnost studia chemického složení vzorku rentgenovou spektrometrií (struktury větší než 200nm)
- Vývoj mikroskopů umožňujících současné skenování povrchu materiálu a řezání materiálu

SEM – MIRA, krystalky určené k RTG analýze

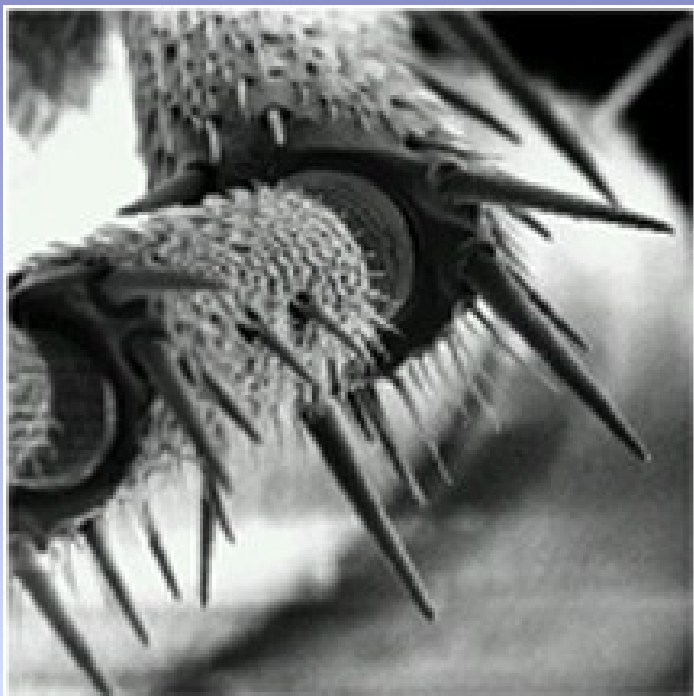


SEM MAG: 8.76 kx WD: 6.2296 mm
View field: 34.42 μm Det: SE Det
Date(m/d/y): 05/16/08 supervisor



MIRA\ TESCAN
Digital Microscopy Imaging



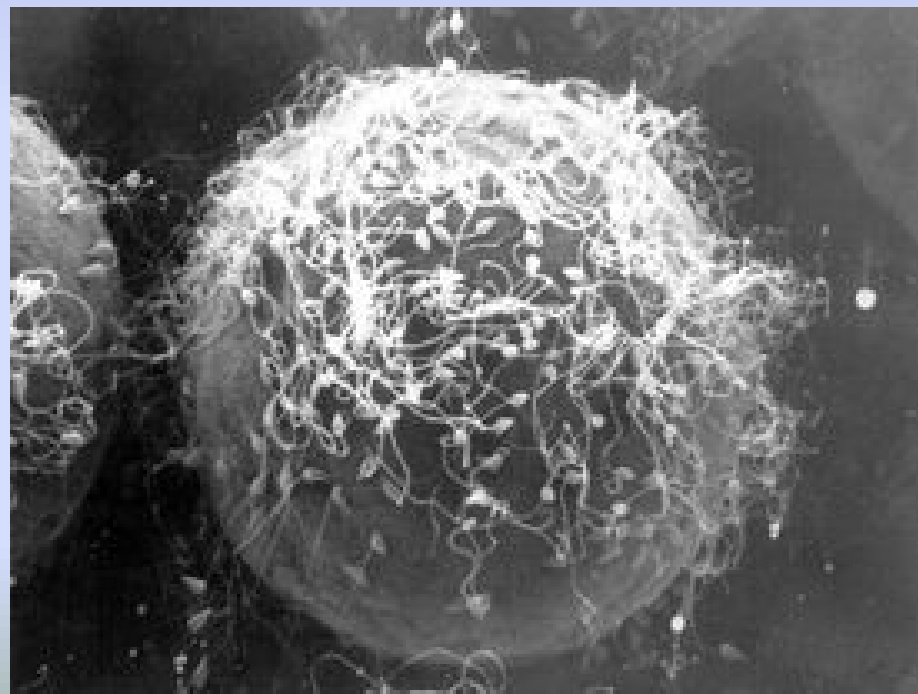


- Detail nohy mravence v SEM

<http://www.wtn.org/ss/story.phtml?storyId=33&type=EdOutreach>

- Vajíčka ježovky obklopená spermii, SEM 3000x zvětšeno

<http://www.stanford.edu/dept/news/report/news/august9/sperm-89.html>

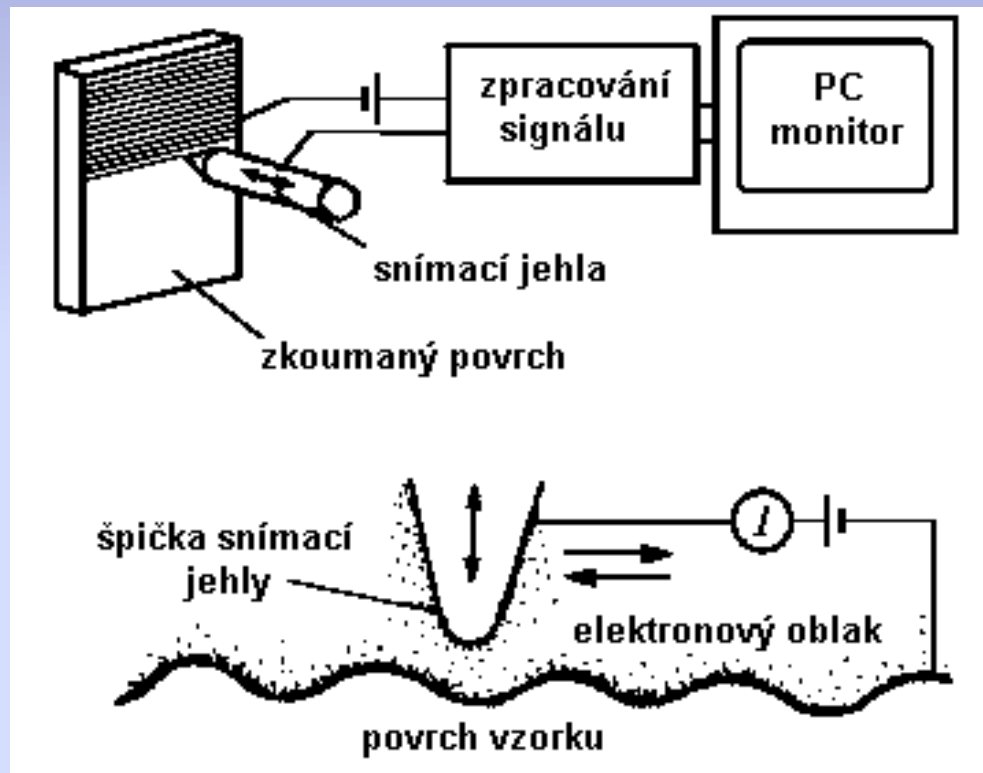


Elektronová mikroskopie

Skenovací tunelový mikroskop (STM)

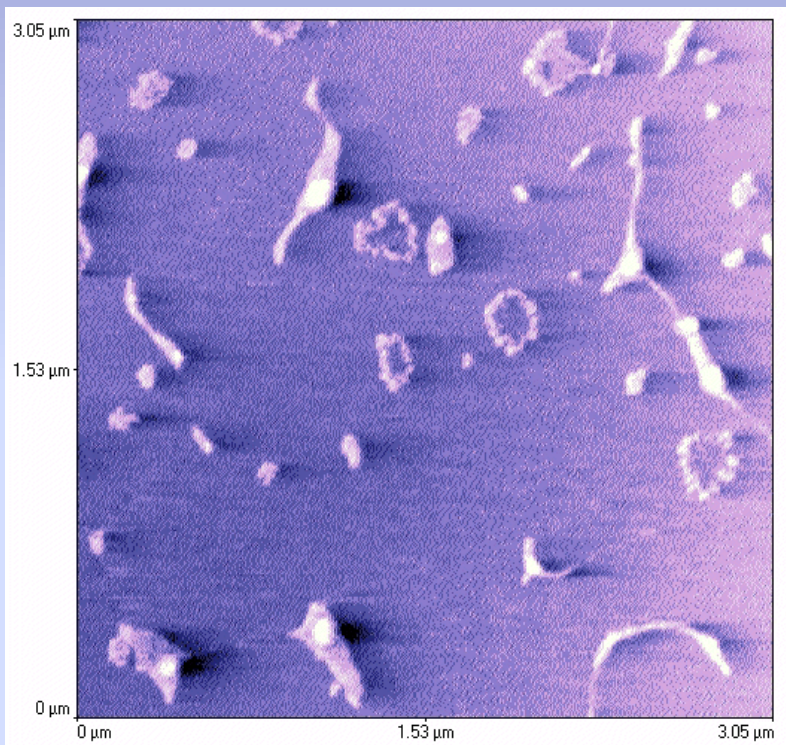
Schéma skenovacího tunelového elektronového mikroskopu (STM). Dole detail kovové detekční jehly. Kladně nabitá jehla kopíruje povrch vzorku.

Podle Rontó a Tarjána (1994).



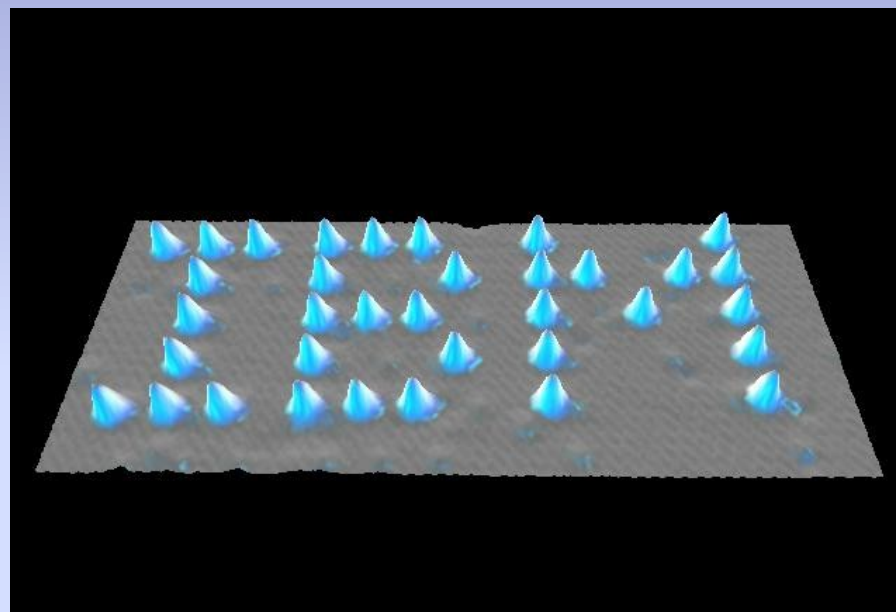
Elektronová mikroskopie

STM



Rozštěpené a nenarušené kruhy
plazmidové DNA

•<http://www.sci.port.ac.uk/spm/overfig5.htm>



Nápis IBM vytvořený z atomů
xenonu na niklové podložce

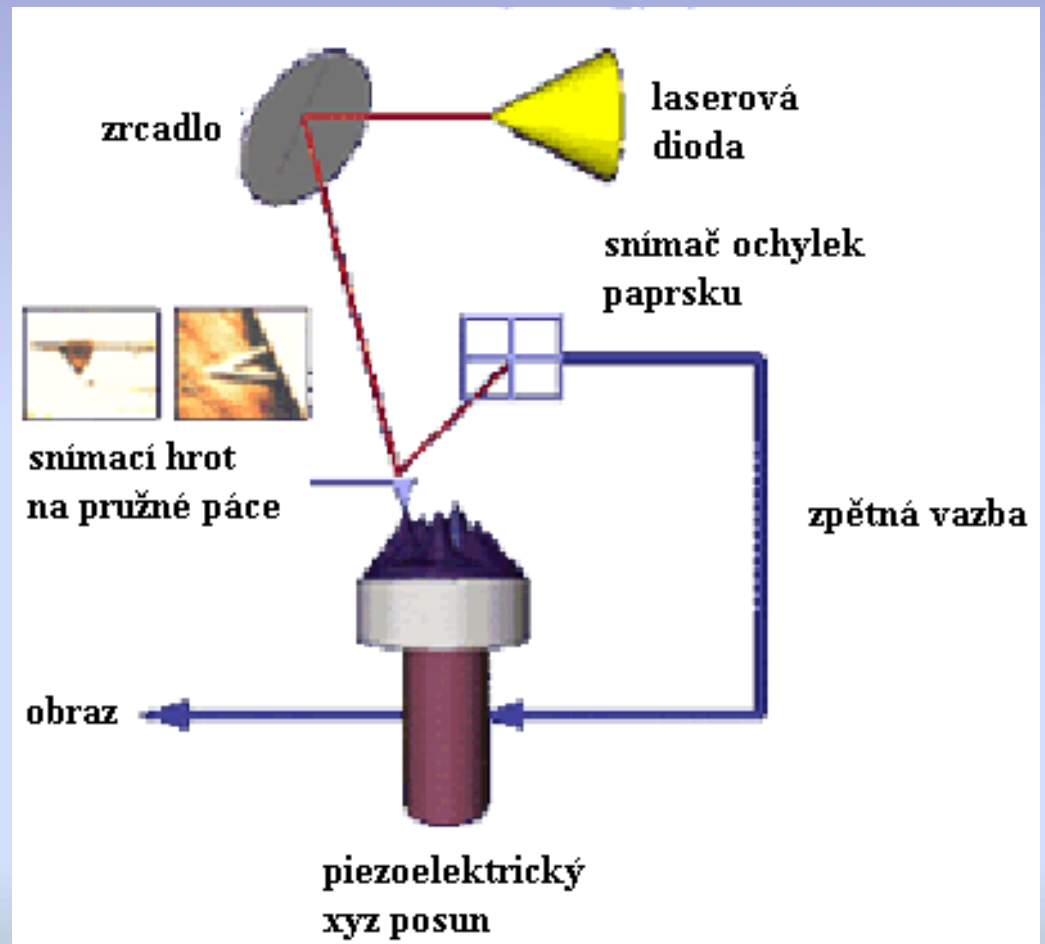
<http://www.almaden.ibm.com/vis/stm/images/stm10.jpg>

Mikroskopy založené na jiných fyzikálních principech

Atomic force microscopy

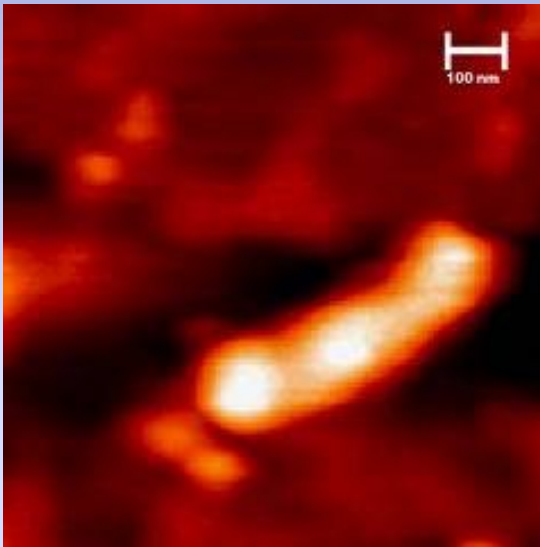
- AFM – Atomic force microscopy – jemný kovový hrot sleduje profil povrchu vzorku.

- <http://physchem.ox.ac.uk/~rgc/research/afm/afm1.htm>



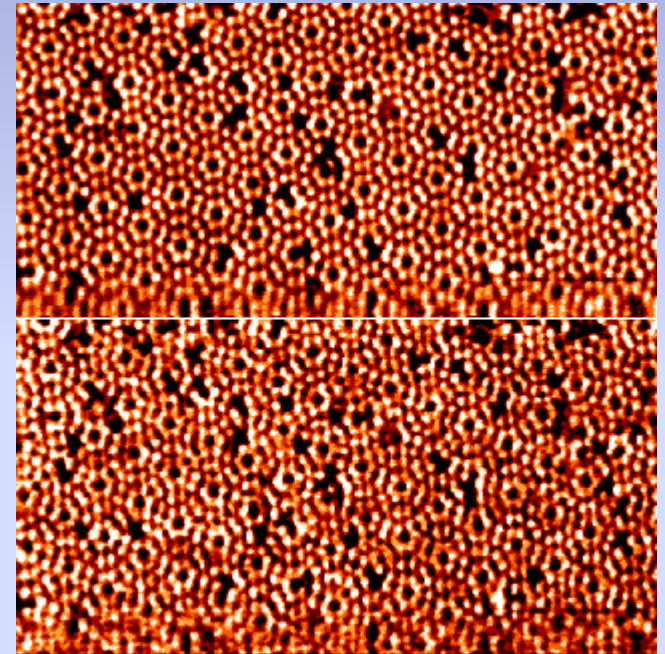
AFM

AFM – Atomic force microscopy



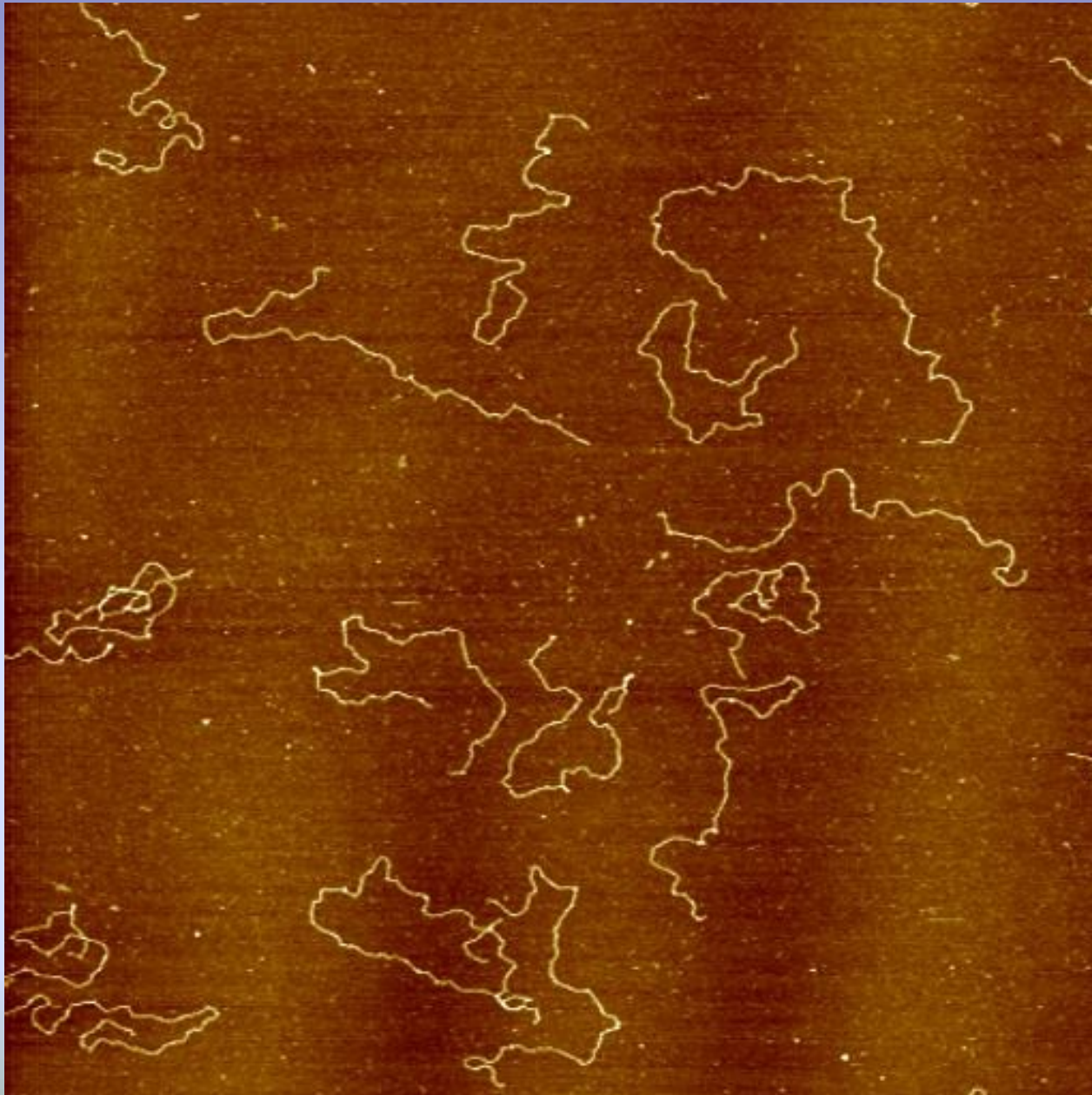
Plazmidová DNA – 10 kb

• http://www.snom.omicron.de/examples/twinsnom/x-tsnom_12.html



Krystalická struktura
křemíku – atomární rozlišení

• http://www.omicron-instruments.com/products/afm_stm/r_afmst6.html

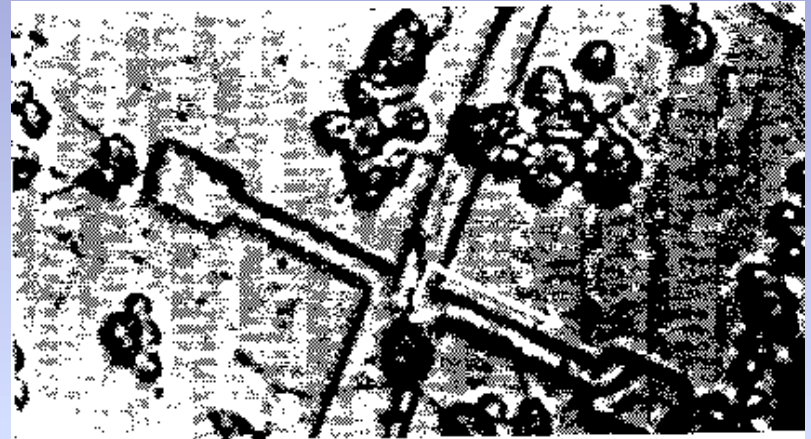
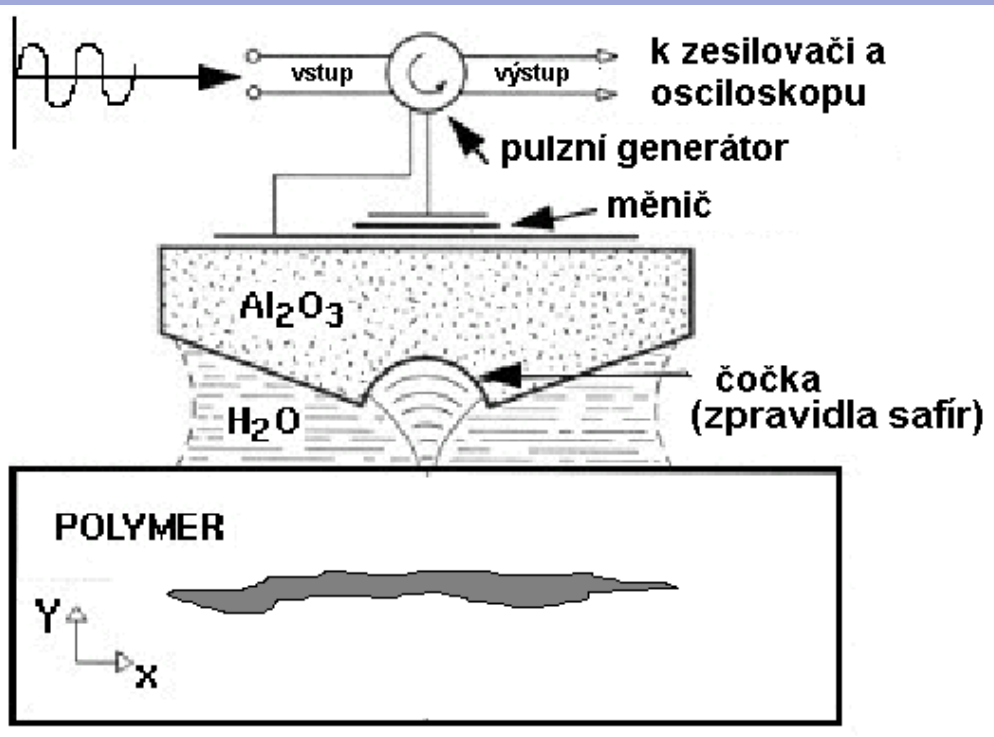


DNA
pozorovaná
pomocí
AFM

<http://spm.phy.bris.ac.uk/research/DNA/images/dna2.jpg>

Mikroskopy založené na jiných fyzikálních principech

Akustická mikroskopie



• podle:
http://www.sv.vt.edu/comp_sim/sam/full.gif

- Neurony rostoucí na plastové podložce
<http://transducers.stanford.edu/stl/Projects/ControlledPatt.htm>

Autoři:

Vojtěch Mornstein
Naděžda Vašková

Obsahová spolupráce:

Carmel J. Caruana

Grafika:

-

Poslední revize: září 2009