

Mikroskopické techniky

MUDr. Jana Tůmová

OKB FN Brno

Historie mikroskopu

- 1590 – otec+syn **Jansenovi** (holand. brusiči skla, diamantů), 1610 G.Galilei
- 1670 – A.van **Leeuwenhoek** (holand. obchodník s textilem, amatér-otec mikrobiologie, krevní b.)
- 1665 – angl.fyzik **R.Hooke**, složený mikroskop
- L.Pasteur (kvasinky), R.Koch (tbc,cholera)
- 1847 – C.Zeiss, 1.výrobce
- 1873 – něm.fyzik **E.Abbe**, teorie opt.přístrojů
- 1931 – něm.fyzik **E.Ruska**, elektronový mikroskop (1986 NC)

Mikroskopie

- Rozlišovací schopnost oka (0,2 mm)
- Světelná mikroskopie (0,2 μm)
lupa, světelný mikroskop
- Elektronová mikroskopie (1-0,2 nm)
TEM, SEM, (AFM)

Paprsky (svět./el.) vystupují od předmětu do čočky, lámou se a vytvářejí zvětšený obraz.

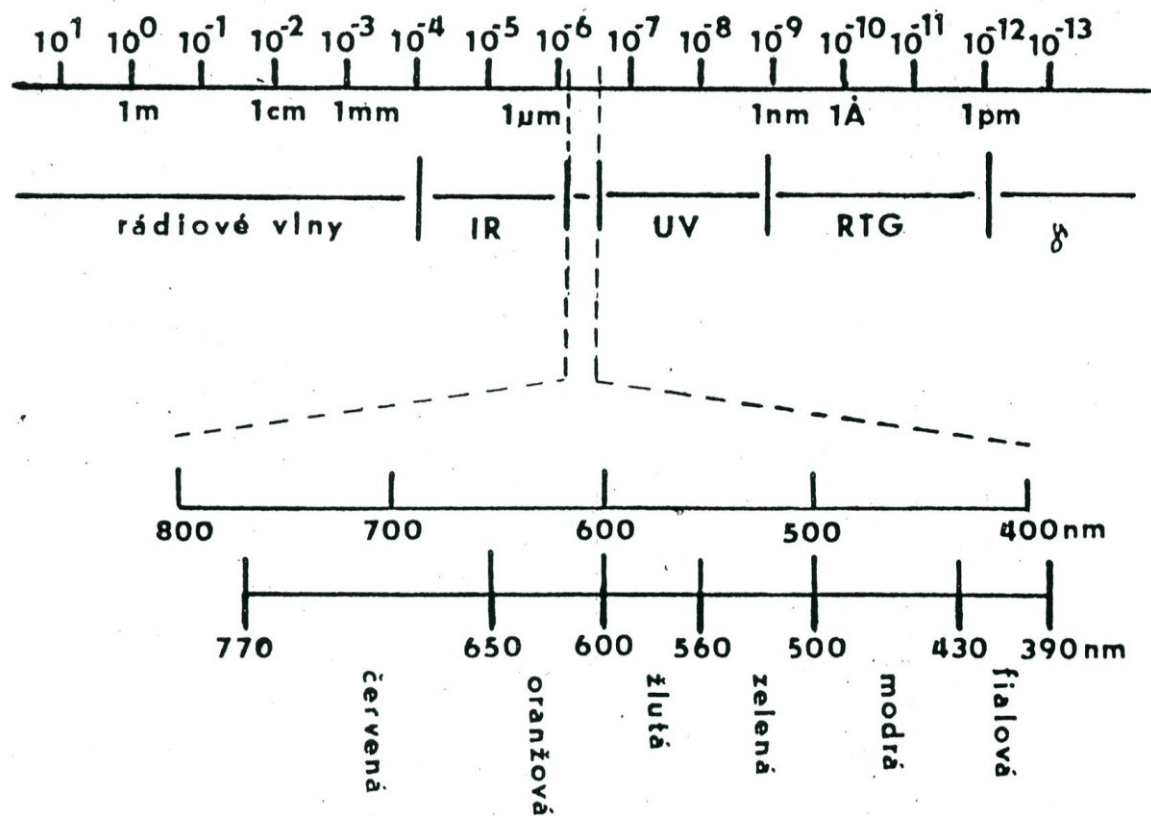
Optika

Světlo = úzká oblast elektromagnet. záření
viditelná okem (vlnění, 300tis.km/s)

Délka vln 380-780 nm (bílé/polychromat.světlo)
barva: 380nm fialová, 450nm modrá,
500nm zelená, 550nm žlutá, 600nm oranž.,
od 650nm červená

Vlny kratší - UV,RTG, γ , delší - IR,rádiové

Záření – vlnové délky



Obr. 1:

Rozsahy vlnových délek různých elektromagnetických záření a barev světla

Optika

- Amplituda (výška) vlny = intenzita světla
- Rozhraní 2 prostředí

Odraz:

úhel dopadu = úhlu odrazu, ve stejné rovině

Lom:

vychýlení ke kolmici dopadu (do prostředí hustšího)
od kolmice dopadu (do prostředí řidšího)

- Index lomu N (=opt. hustota prostředí):
vzduch 1,0 - voda 1,33 - sklo 1,46 – olej 1,5 –
diamant 2,42

Optika

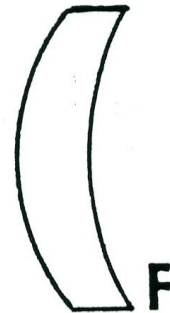
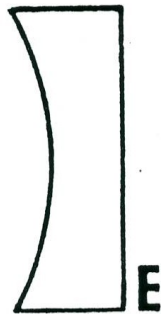
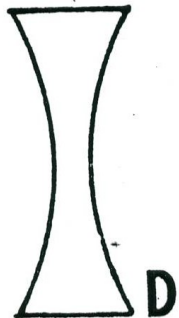
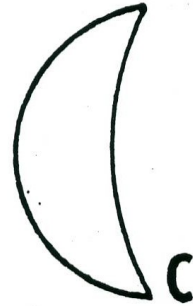
- Disperze (rozklad)

závislost indexu lomu na vlnové délce
bílé světlo se hranolem rozloží dle vln.
délky na jednotlivé barvy (duha)

- Interference (skládání)

rozdělení a násled. spojení 2 světelných toků
dle synchronizace je fáze vlnění stejná n.
posunutá a intenzita +vyšší nebo -nižší

Čočky



Typy čoček: A - C - spojky, D - F - rozptylky.

A = dvojvypuklá (bikonvexní), B = ploskovypuklá (plankonvexní),

C = dutovypuklá (konkávkonvexní), D = dvojdutá (bikonkávni),

E = ploskodutá (plankonkávni), F = vypuklodutá (konvexkonkávni).

Optická tělesa průhledná

Čočky

tvary: vypuklý/konvexní, spojky- svazek sbíhavý
vydutý/konkávní, rozptylky- sv.rozbíhavý
opt. střed O s osou, hl.rovina (kolmá na osu)
ohnisko F přední-obrazové, F' zadní-předmět.

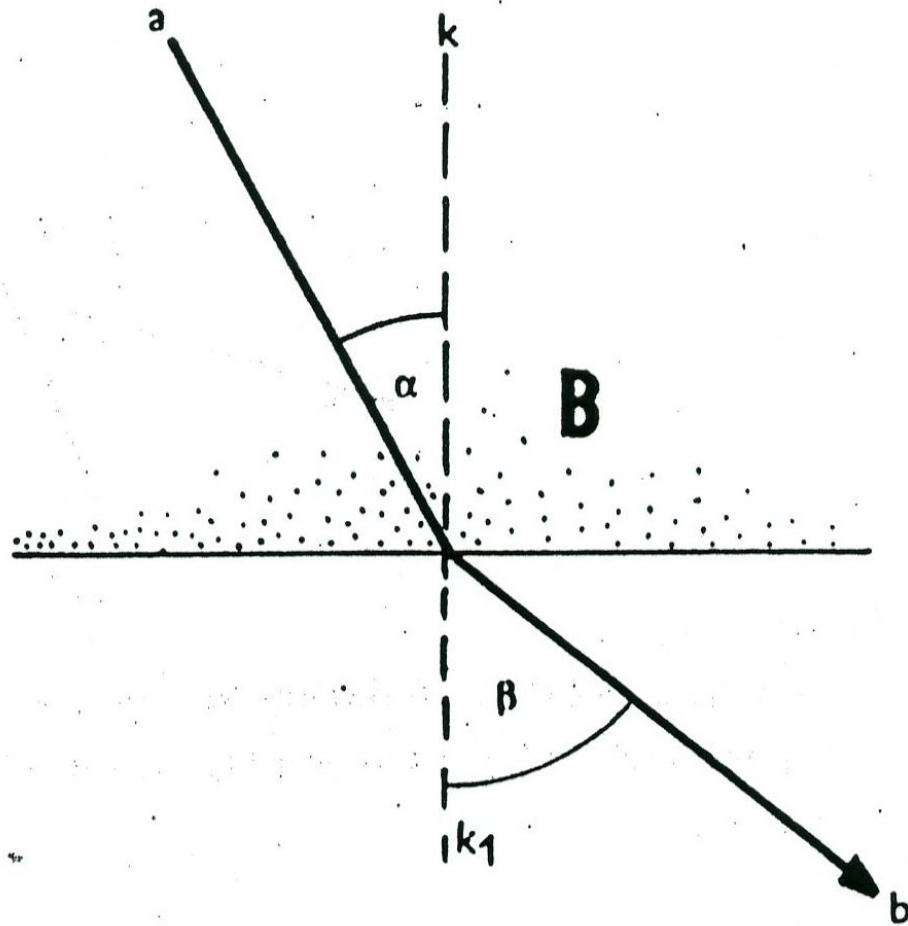
Hranoly

broušené pod různými úhly- změna chodu paprsků
nikoly z island. vápence k polarizaci paprsků

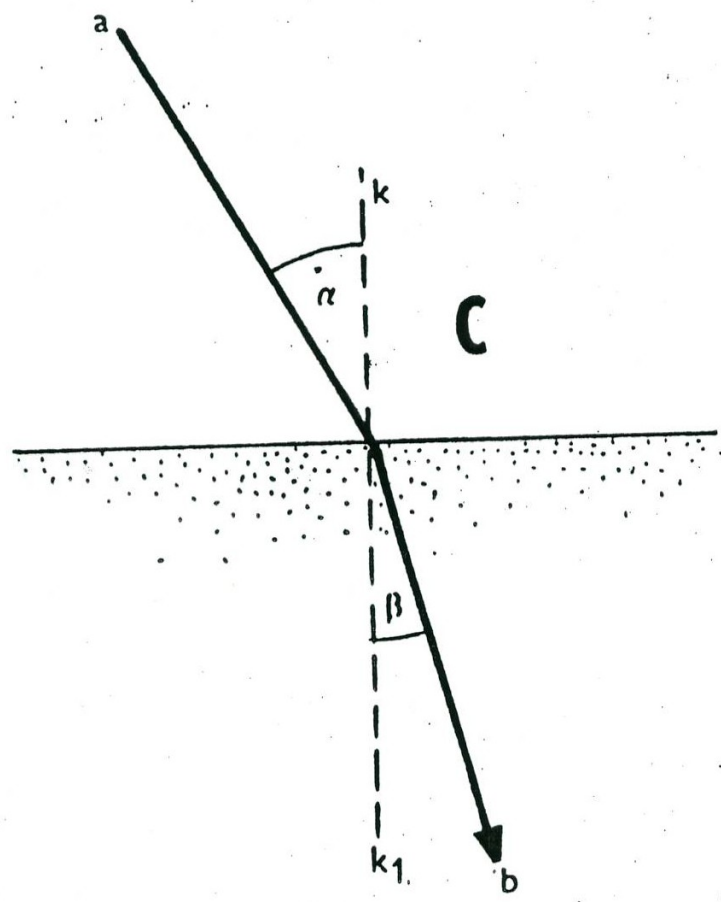
Čočky

- Vytvoření obrazu spojkou pomocí 3 paprsků:
rovnoběžný s osou – lom do ohniska
hlavní (středem č.) – neláme se
v předmět.ohnisku – lom rovnoběžně s osou
- Druh obrazu dle polohy předmětu
skutečný (za čočkou, lze pozorovat okem/na filmu)
 zmenšený a převrácený... předmět $>2F$
 zvětšený a převrácený... předmět do $2F$
neskutečný (před čočkou, lze pozorovat jen okem)
 zvětšený a přímý... předmět $<F$

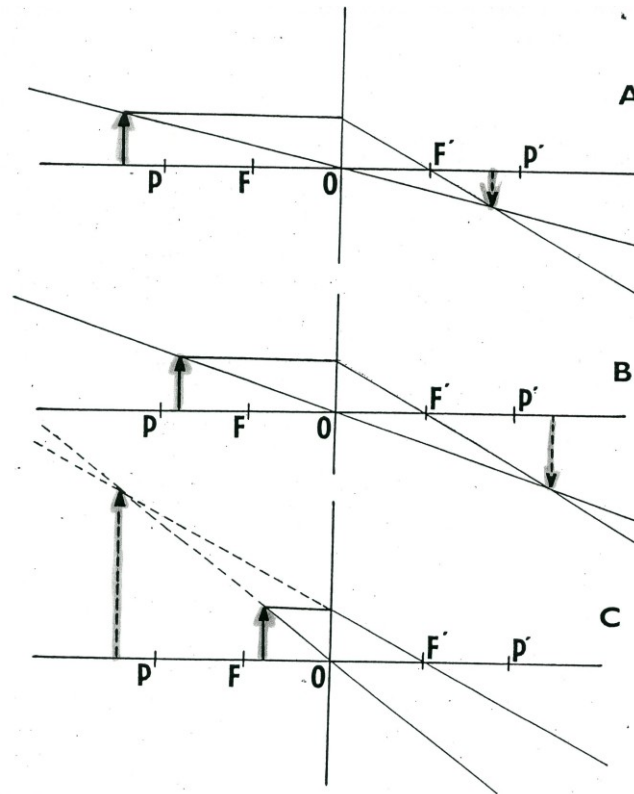
Čočky– lom



Čočky - lom



Čočky - obraz



Obr. 10:

Geometrie zobrazování spojnou čočkou při umístění předmětu do polohy před dvojnásobnou ohniskovou vzdáleností (A), mezi ohnisko a dvojnásobnou ohniskovou vzdáleností (B), mezi střed čočky a ohnisko (C); F = předmětové ohnisko, F' = obrazové ohnisko, O = optický střed čočky, P, P' = body ležící ve dvojnásobné ohniskové vzdálenosti, šipka znázorněná plnou čarou = zobrazovaný předmět, šipka znázorněná přerušovanou čarou = obraz předmětu.
Text viz str. 10.

Čočky

Vady čoček

- Chromatická (barevná) – různý lom dle vln.délky světla, vada polohy a velikosti
- Sférická (kulová) – různý lom s křivostí č., body= překrývající se kruhy, nezřetelné
- Astigmatická – paprsky dopad. šikmo se neprotínají, tvoří 2 linie
- Vyklenutí – přímka z boku= oblouk, nelze dobře zaostřit

Lupy

- Nejjednodušší optická zařízení
- 1 nebo více čoček (spojky i rozptylky)
- Zvětšují zorný úhel
- Obraz: neskutečný zvětšený a přímý
- Zvětšení 5 – 12x (spec. až 30x)

Mikroskop - konstrukce

- 2 optické části (několik čoček) na společné ose
- Objektiv – hlavní, tvoří obraz předmětu skutečný zvětšený a převrácený
čelní čočka, pouzdro se závitem (revolver.měníč)
- Okulár – lupa
zvětšuje obraz bez dalších detailů 5-25x
vhodně koriguje optické vady čoček objektivu
zvětšení= objektiv x okulár (max.1500-2000x)

Mikroskop - konstrukce

Objektivy – vlastnosti

- Ohnisková vzdálenost: 1,5(silné) - 20mm(slabé)
- Zvětšení= $250/\text{ohnisk.vzdál.}$ (max.150x)
- Světelnost – určuje otvorový úhel a index lomu prostředí: sklíčko-vzduch n. lépe imerze (voda, olej)
- Numerická apertura= vztah mezi otvor. úhlem a lomivostí, čím je vyšší, tím lepší rozliš. schopnost (0,9 vzduch, 1,5 olej)
- Penetrační (hloubková) ostrost= zobrazení počtu rovinných vrstev preparátu, nutnost proostřování

Mikroskop - konstrukce

- Osvětlení – žárovka, kondenzor (čočky k soustředění paprsků), clony (irisová), ev. zrcátko

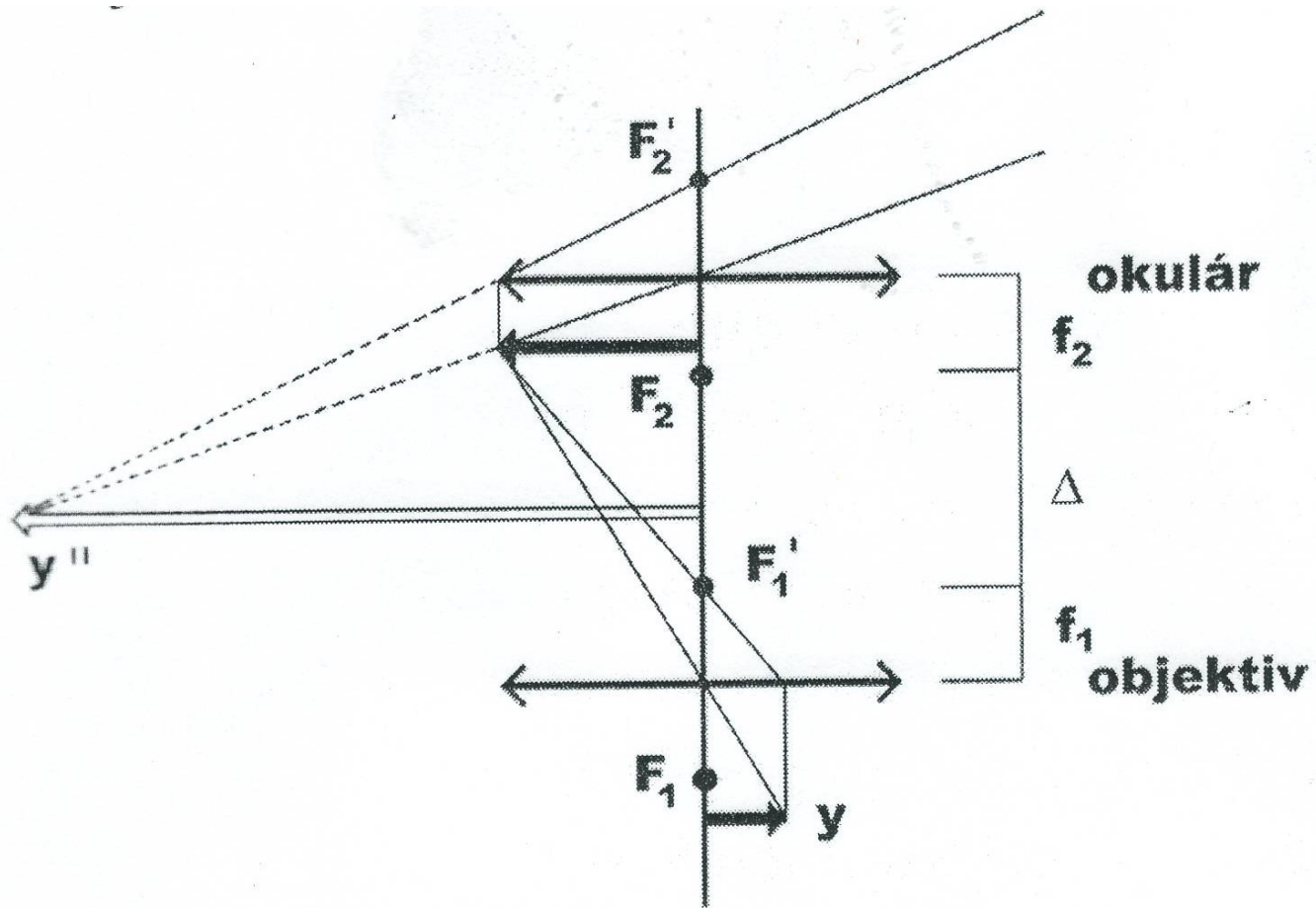
- Mechanické části

stativ

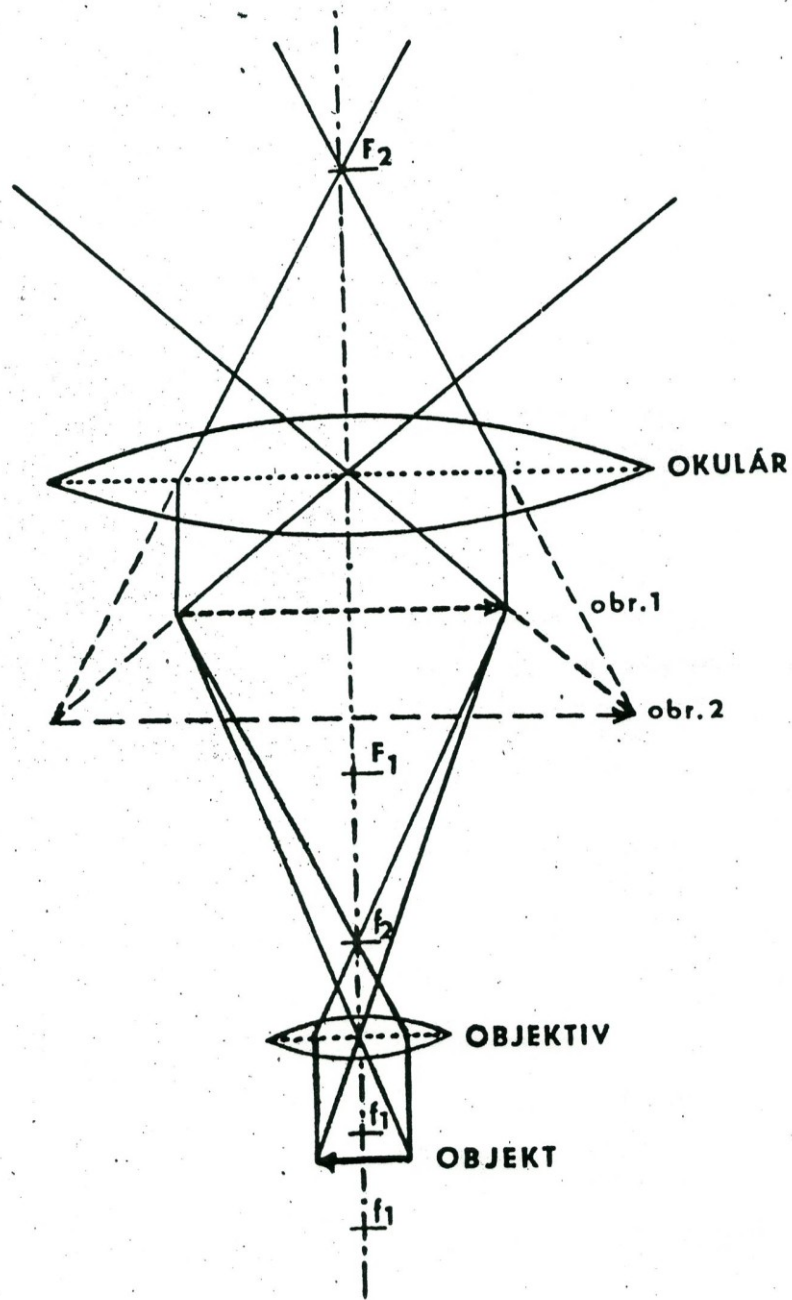
tubus – spojuje objektiv (dole) a okulár, posun pomocí makro- a mikrometr. šroubu

větš. binokulární (2 okuláry) s oční korekcí

stolek s otvorem a 2 pružinkami n. křížovým vodičem preparátu



Obr. 16:
 Geometrie zobrazování
 předmětů ve složeném
 mikroskopu při použití
 ortoskopického
 okuláru:
 obr. 1 = zvětšený,
 převrácený a skutečný
 obraz vytvořený ob-
 jektivem,
 obr. 2 = zvětšený
 neskutečný obraz
 pozorovaný okulárem
 jako lupou.
 Text viz str. 15.



Obr. 18:

Součásti monokulárního mikroskopu:

optická část -

obj = objektiv

oč = oční čočka okuláru

ok = plášť okuláru

s = sběrná čočka okuláru

mechanická část -

k = šrouby k ovládní křížového
posunu stolku

ma = ovládní makrometrického posuvu

mi = ovládní mikrometrického posuvu

n = nosič tubusu

p = podstavec stativu

pc = posuv kondensoru

st = pracovní stůl mikroskopu

osvětlovací část -

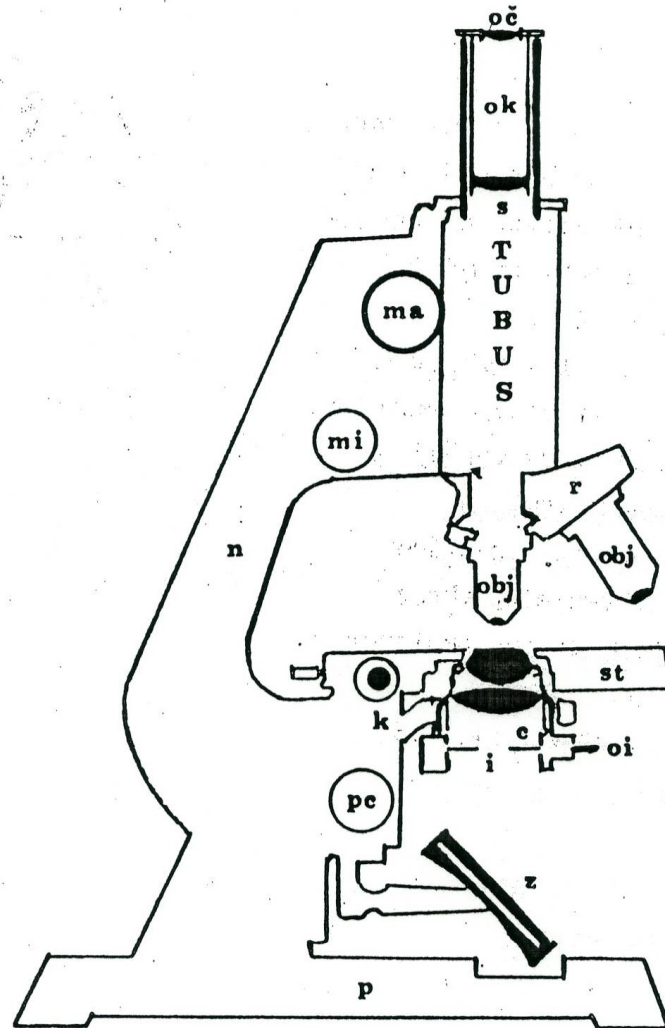
c = kondenzor

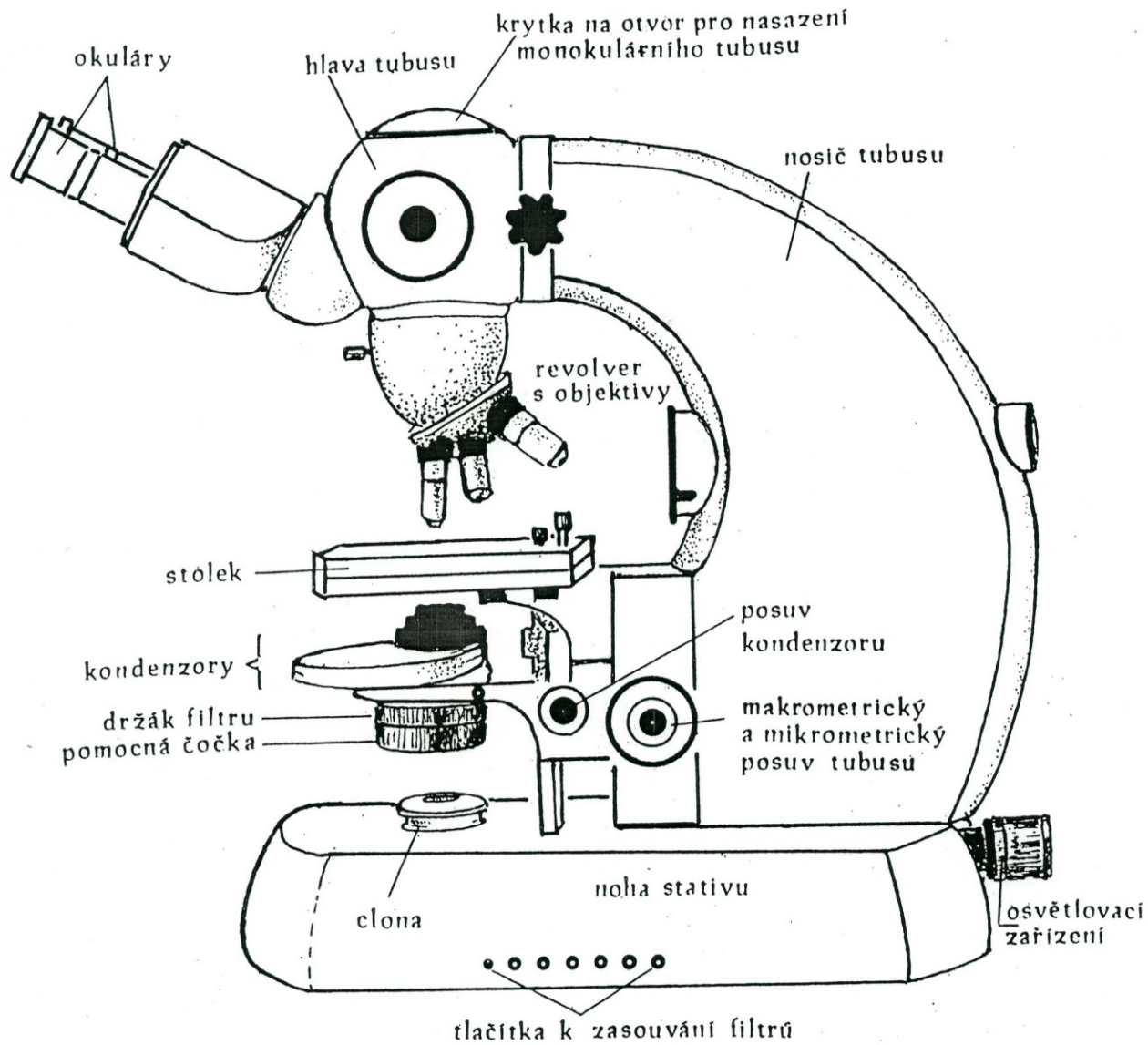
i = irisová clona

oi = ovládní irisové clony

z = zrcátko

Text viz str. 15.





Obr. 19:
 Příklad moderního binokulárního badatelského mikroskopu se zabudovaným osvětlovacím zařízením v noze stativu
 Text viz str. 15.

Typy mikroskopů

- Běžný – metoda světlého pole v procházejícím světle (rovnoběžně s osou)
- Zástinový – metoda temného pole, paprsky šikmé, odrážejí se od preparátu
- Stereomikr.(preparační) – 2 mikroskopy s osami v ostrém úhlu, každý z jiné strany, hranoly obracejí obraz na přímý, plastický
- Diskuzní n. srovnávací- pro 2 osoby

Typy mikroskopů

- Fázový kontrast – na fázové destičce v obrazové rovině objektivu se ohybem paprsku vyvolá změna fáze
použití: zvýraznění detailů (obrysů) nativních preparátů
- Polarizační – kombinace s polarimetrem, přidány 2 polarizační nikoly (polarizátor u světelného zdroje, analyzátor za objektivem), otočný stolek s preparátem, 2-lomné struktury střídavě září a zhasínají
použití: mineralogie
- Fluorescenční (luminiscenční) – látky po absorpci UV-záření vydávají barevné viditelné záření, přírodní n. po navázání fluorochromů
použití: imunocytochemie

Typy mikroskopů

- Ultrafialový – vyšší rozliš. schopnost UV světla, optika křemenná, záznam foto
- Infračervený – snadněji proniká silnými preparáty, záznam foto
- Elektronový – místo světla (fotonů) tok elektronů ve vakuu, místo optických čoček elektromagnetické, vliv magnet. pole působí jako lom- dráha elektronů po spirále, zvětšení 1mil.x

TEM (transmisní)- elektrony přímo prostupují tenkým řezem (nm) a jsou detekovány (vnitřní struktury, atomy)

REM,SEM (rastr,scan)- povrch vzorku rastrován svazkem elektronů, detekce uvolněných sekund. elektronů

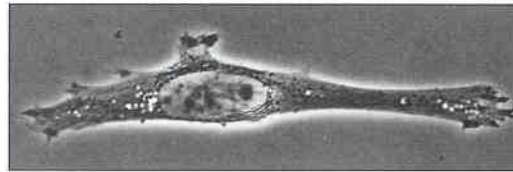
Mikroskopické preparáty

- Nativní – fyziologické médium přirozené (sérum, moč, likvor) n. umělé (fyziolog.roztok)
- Vitální barvení – b. bazická (metyl.modř), kyselá (trypanová modř), ostatní (Sudan)
- Trvalé preparáty
fixace: fyzikální (teplo), chemická (formol.páry, kys.octová, formalin, etanol)
zpracování: uzavírací média, nátěry, řezy
barvení (selektivní zvýraznění): dle Grama, May-Grünwalda a Giemsy, Pappenheima

Nativní preparáty



(A)



(B)



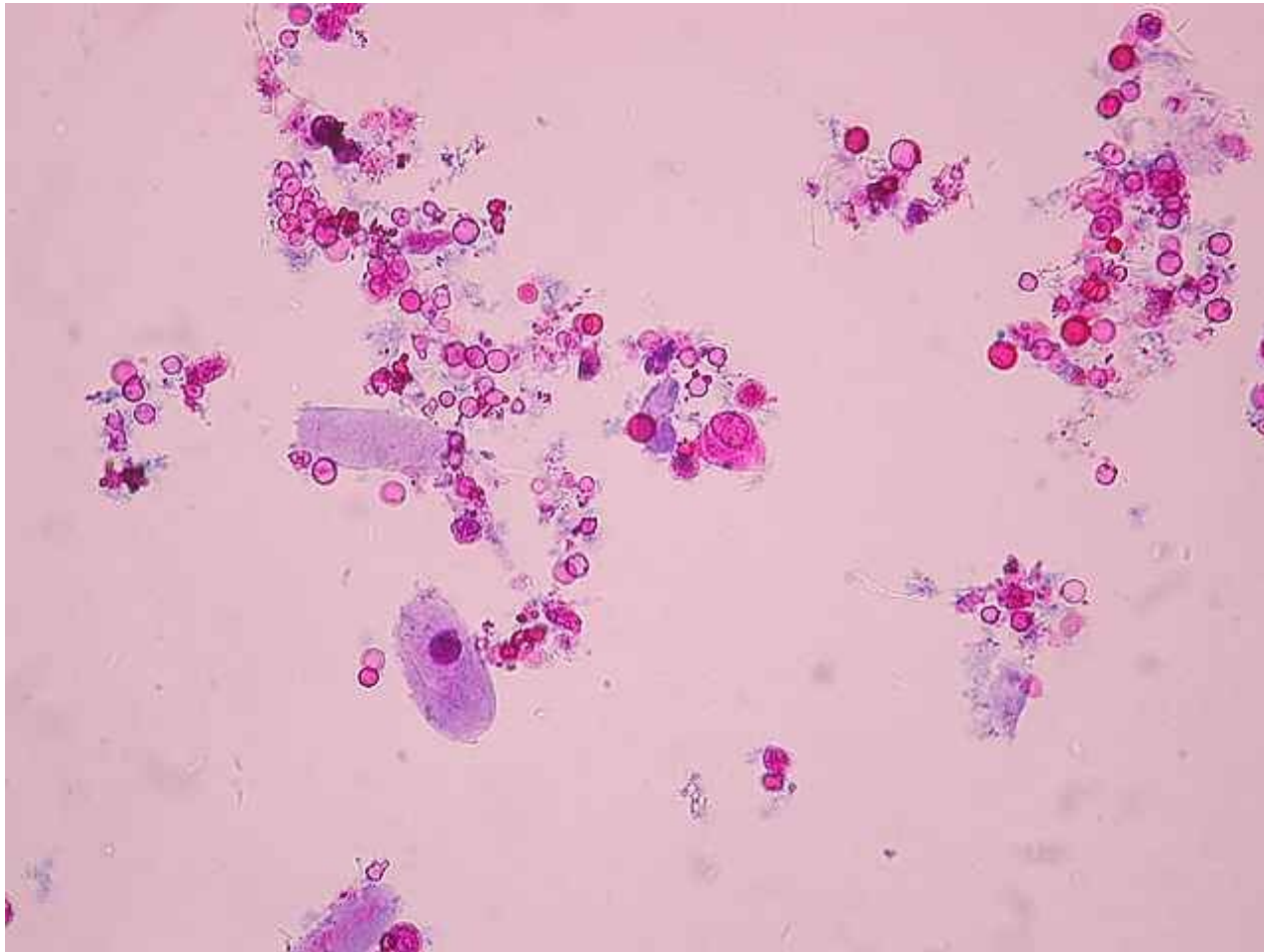
(C)

50 μm

TŘI DRUHY SVĚTELNÉ MIKROSKOPIE

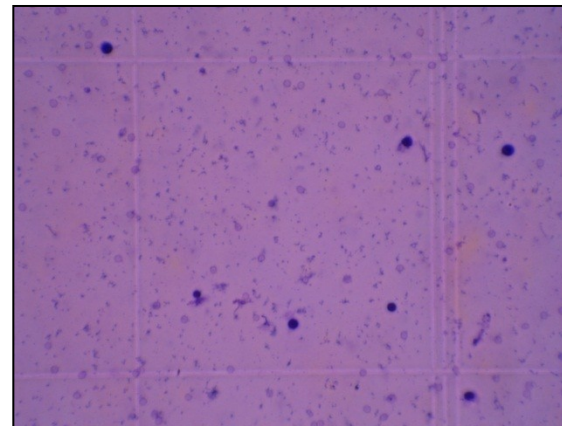
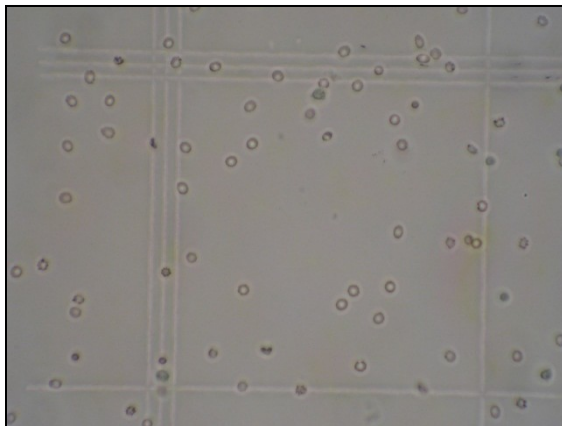
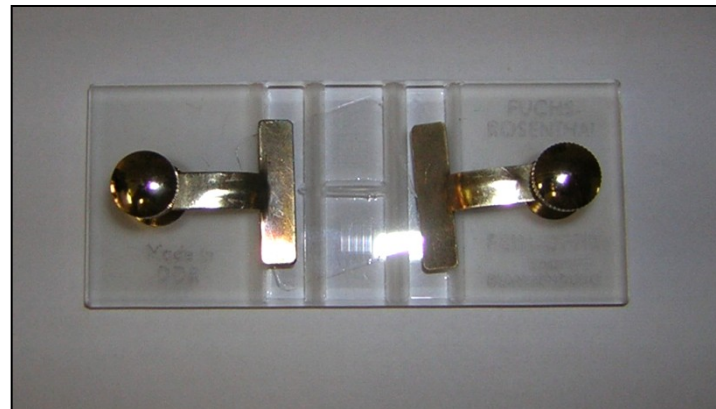
Tři obrázky téže neobarvené živočišné buňky v tkáňové kultuře. (A) Pozorování v prostém jasném poli. Daleko více struktur lze pozorovat při použití komplexního optického systému, jakým je například fázový kontrast (B) a diferenciální interferenční mikroskopie (C). Tyto systémy využívají rozdílů v dráze, kterou světlo urazí při průchodu objekty o různém indexu lomu. Všechny tři fotografie lze získat na téže mikroskopu pouhou výměnou optických komponent.

Barvení vitální - moč



Nativní p.+ vitální barvení - likvor

- Fuchs Rosenthalova komůrka (objem 3 μ l)
- málo spolehlivá diferenciacce jaderných elementů



Trvalý preparát – likvor

