

Světelný mikroskop - základní pracovní nástroj

Tři cíle mikroskopie:

- zvětšit obraz
- rozlišit detaily v obraze
- popsat detaily viditelné okem nebo kamerou

Jednoduchý mikroskop

jedna čočka nebo jeden systém čoček
(lupa)



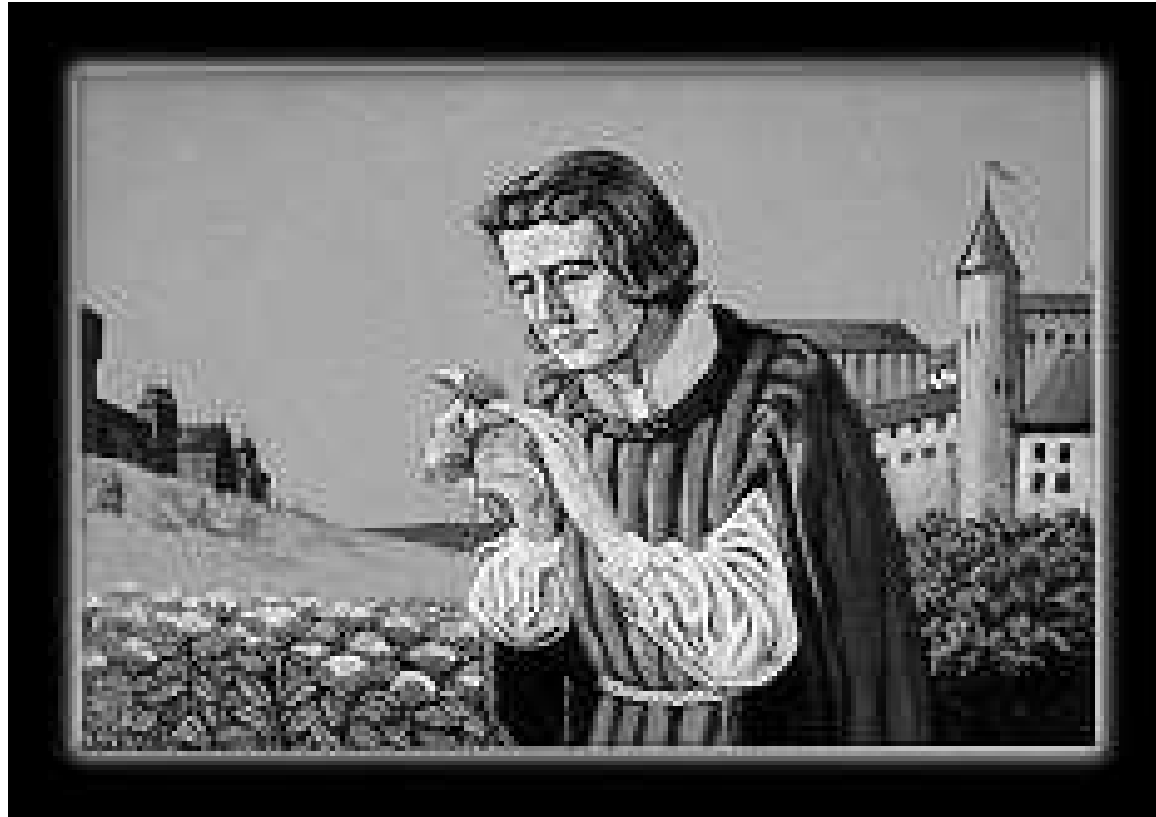
Složený mikroskop

více čoček nebo více systémů čoček



Světelná mikroskopie a kontrastní metody

Historie světelného mikroskopu

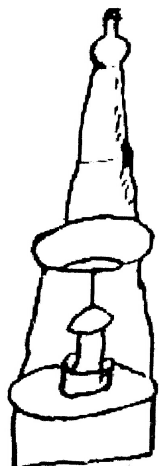
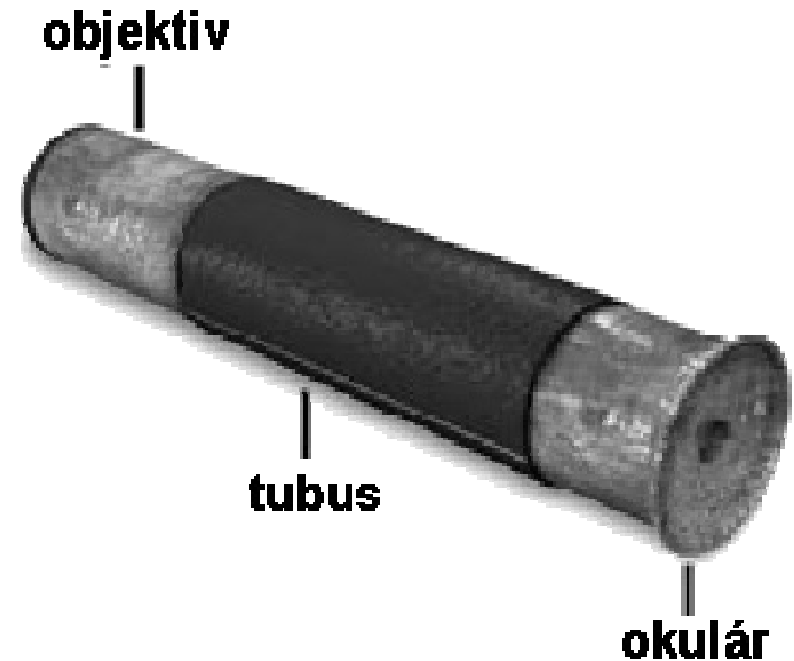


Odjakživa chtěli lidé vidět věci mnohem menší, než mohli vnímat pouhým okem

Hans a Zacharias Janssenovi



Zacharias Janssen
(1580-1638)



1625 - nejstarší známá kresba mikroskopu

První složený mikroskop (kolem 1595)

zvětšoval 3x při zatažení tubusu a více než 10x při max. roztažení, měřil 1,2 m

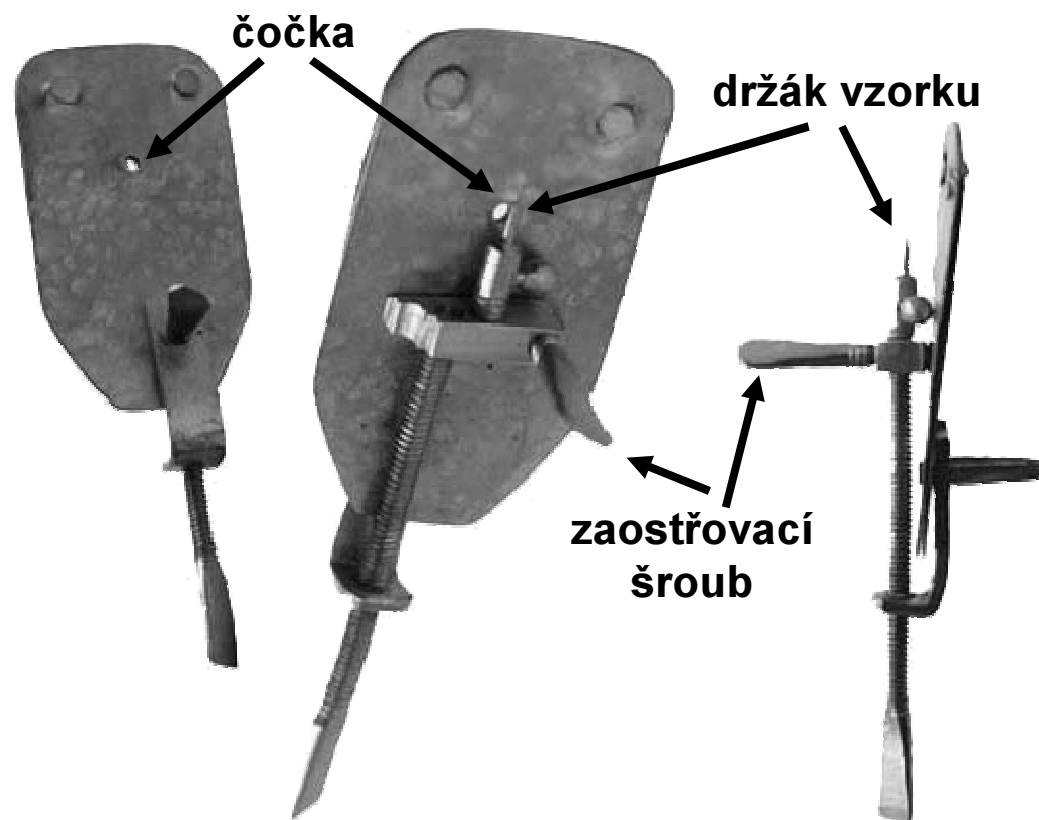
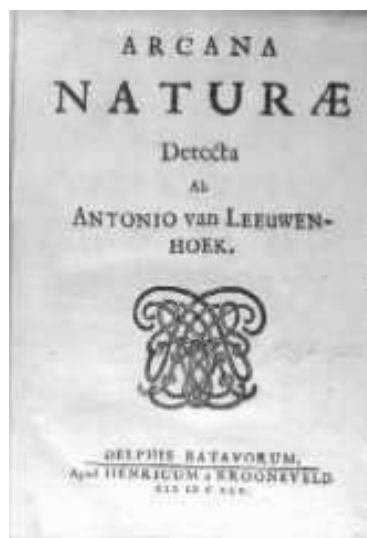


Antony van Leeuwenhoek

(1632 - 1723)

Jednoduchý mikroskop(1660)

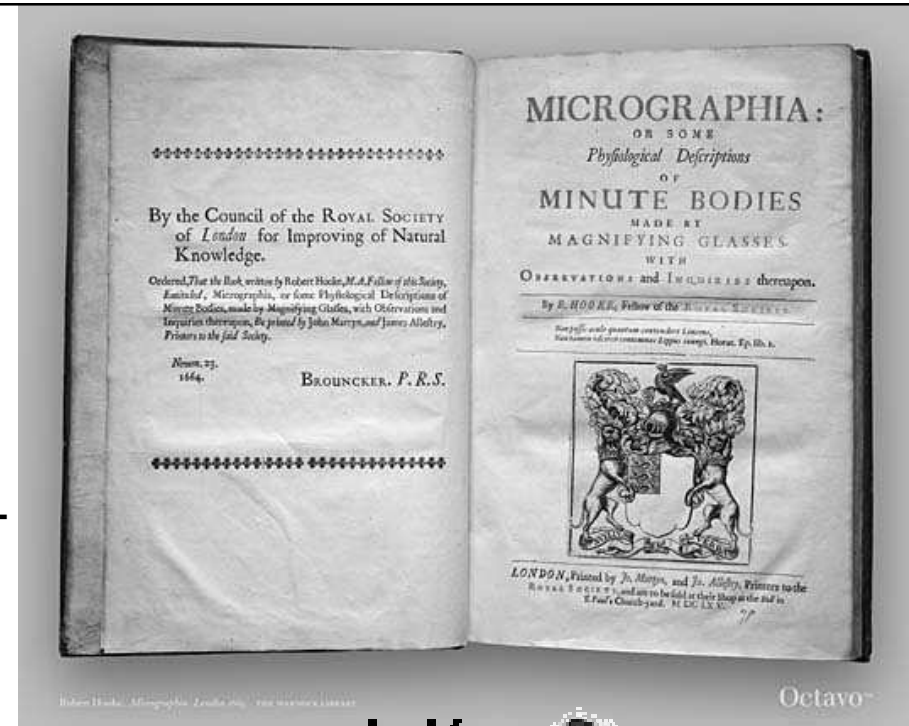
Konvexní skleněná čočka byla připevněna do kovového držáku a byla zaostřována pomocí šroubu.



Robert Hook

1665 složený mikroskop

kniha Micrographia,
sledování tenkých řezů korkem -
pojem buňka



Robert Hooke
(1635-1703)



Mikroskopy 17. století

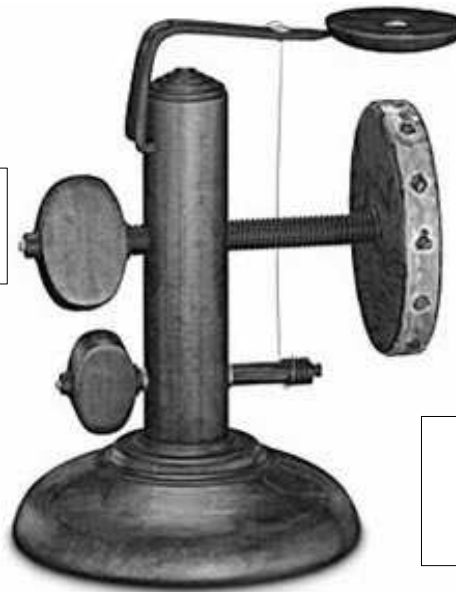


Galileo Galilei
po roku 1600



Itálie

Guiseppe
Campani,
1662



Jednoduchý Italský
mikroskop, 1686



Anglie

John
Yarwell,
1680

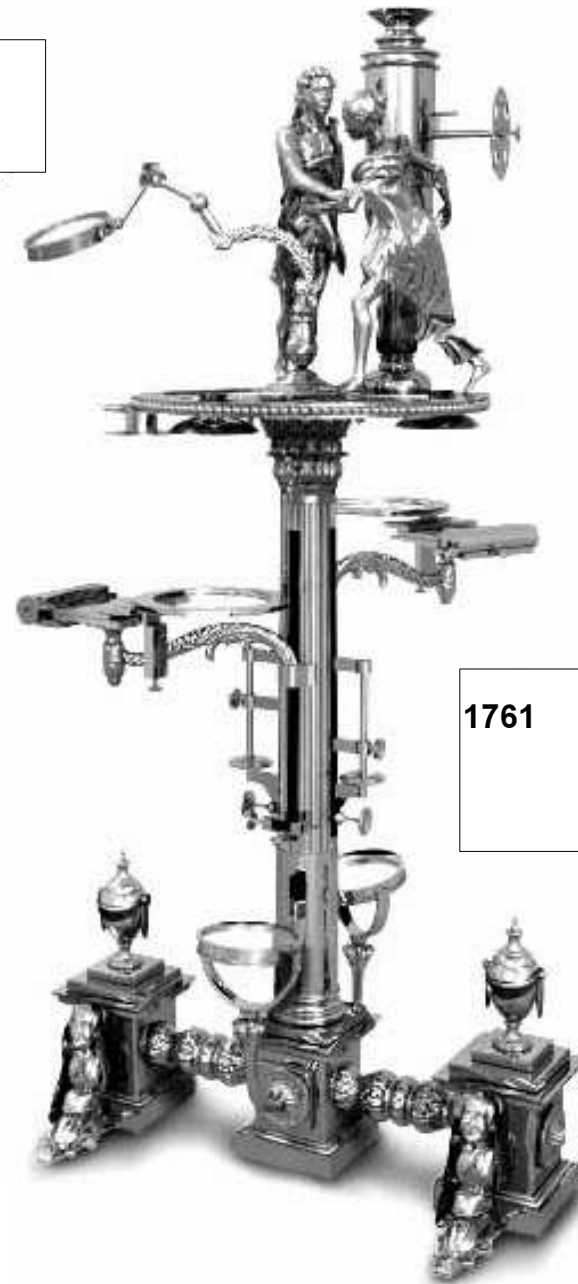
Mikroskopy 18. století



1700



1730



1761

Mikroskopy 19. století



Mikroskopy 20.století

Nikon 1900



Olympus 1998



Leitz 1910



Lupa

Skládá se z jedné čočky
nebo z jediného systému
čoček

Olympus CX31

Složení mikroskopu

1. Část mechanická: stativ, noha stativu, tubus, revolverový měnič objektivů, stolek, makrošroub, mikrošroub
2. Část osvětlovací: zdroj světla, zrcátko, polní clona, kondenzor, irisová clona, objímka filtru
3. Část optická: objektivy, okuláry



1. Část mechanická

Stativ

Noha stativu

Tubus - spojuje okulár a objektiv

Mechanická (optická) délka tubusu - vzdálenost mezi horním a dolním koncem tubusu, mění se vzájemným posunem dvou na sebe nasunutých částí, dána výrobcem (160 - 170 mm) a je nutno ji dodržovat - objektivy a okuláry konstrukčně přizpůsobeny

- nekonečná délka tubusu (vkládání modulů), ∞

- monokulární přímý, šikmý, binokulární, trinokulární

Revolverový měnič objektivů

Stolek - pohyblivý; s křížovým vodičem preparátu, který se ovládá dvěma šrouby

Makrošroub - pro hrubé ostření

Mikrošroub - pro jemné doostřování

2. Část osvětlovací

Pozorujeme ve světle procházejícím (světlo prochází pozorovaným objektem) a méně často dopadajícím (světlo dopadá shora na povrch objektu)

Zdroj světla - lampa v noze stativu s kolektorovou čočkou (fixně seřízená), kolektor spolu se **zrcátkem** soustřeďuje světlo do kondenzoru

Polní clona - používá se při malém zvětšení, viz práce s mikroskopem

Kondenzor - skládá se ze 2-3 spojených čoček (spojek), nasazených do objímky pod stolkem mikroskopu; *soustřeďuje paprsky pro dokonalé osvětlení zorného pole*

Numerická apertura kondenzoru má odpovídat numerické apertuře objektivu (70-80%). (Numerickou aperturu kondenzoru určuje irisová (aperturní) clona - viz práce s mikroskopem)

Irisová clona - reguluje množství světla přicházejícího do mikroskopu; zasazena do spodního okraje pouzdra kondenzoru

Objímka filtru - používá se matný nebo modrý filtr

3. Část optická - čočky

Zabezpečuje vhodnou kombinací čoček (kromě vytváření obrazu) také v různé míře odstraňování hlavních optických vad čoček

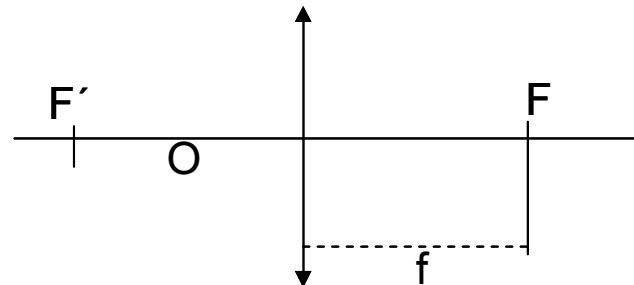
ČOČKY

Průhledné těleso omezené vypuklými (konvexními) a vydutými (konkávními) plochami

Z funkčního hlediska rozlišujeme: **spojky** a **rozptylky**

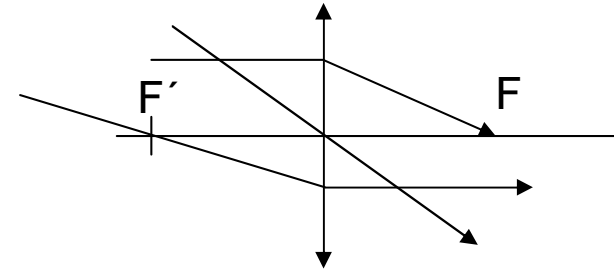
Optická osa (prochází středem čočky - O) a 2 ohniska (**obrazové** F - vzniká v něm obraz; **předmětové** F' - na straně předmětu)

Středem čočky proložíme hlavní rovinu a vzdálenost ohniska od hlavní roviny se nazývá **ohniskovou vzdáleností** (f)



3. Část optická - čočky

Geometrické zobrazování spojnou čočkou (viz obr.) - paprsek rovnoběžný s optickou osou se na povrchu čočky láme do F ; paprsek procházející středem čočky se neláme; paprsek procházející F' se láme rovnoběžně s optickou osou



Zobrazování předmětu mikroskopem: preparát umístěn mezi dvojnásobnou ohniskovou vzdálenost a ohnisko objektivu - skutečný, zvětšený, převrácený obraz

Hlavní vady čoček:

Vada barevná (chromatická) - způsobená různým lomem světla o různé vlnové délce
odstranění pomocí soustavy dalších čoček (achromáty)

Vada kulová (sférická) - vzniká tím, že paprsky rovnoběžné s osou se lámou různě podle jejich vzdálenosti od středu čočky

Vada astigmatická - paprsky dopadající na čočku ze strany se neprotnou v jednom bodě

Vyklenutí zorného pole - paprsky dopadající na čočku šikmo mají jiné ohnisko než rovnoběžné paprsky přímé; nelze zaostřit na celé zorné pole

3. Část optická - objektiv

Vytváří zvětšený převrácený a skutečný obraz předmětu
Čím je kratší ohnisková vzdálenost objektivu, tím je větší zvětšení.

Zvětšení objektivu - je vyznačeno (10x, 20x, 30x); dá se vypočítat z ohniskové vzdálenosti podle vzorce

$$Z = 250 / f \quad 250\text{mm je tzv. normální zraková délka}$$

Numerická apertura (A) - vyjadřuje vztah mezi otvorovým úhlem (úhel, který svírají dva nejkrajnější paprsky, které se ještě dostanou do otvoru objektivu) a lomivostí prostředí

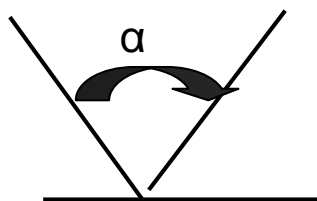
objektiv

$$A = N * \sin \alpha/2$$

α - otvorový úhel

N - index lomu prostředí mezi
objektivem a preparátem

preparát



3. Část optická - objektiv

Čím je větší numerická apertura,

- tím je vyšší **rozlišovací schopnost objektivu** (schopnost rozlišit dva vedle sebe ležící body jako samostatné).

- tím menší **hloubková ostrost** (schopnost současně ostře zobrazit větší nebo menší počet rovinných vrstev předmětu).

Světelnost objektivu je přímo úměrná A^2

Krycí sklíčko $N=1,51$, vzdušné prostředí $N=1$ → 2 úhly (menší ve skle, větší ve vzduchu), pod nímž vstupují paprsky do objektivu → do objektivu se dostane menší množství paprsků (použití imerzního oleje $N=1,5$)

Pozorovací (pracovní) vzdálenost - vzdálenost čelní čočky objektivu od krycího skla preparátu

Velikost zorného pole - větší, čím menší zvětšení objektiv má (čím větší f , tím větší zorné pole)

Světelnost objektivu - intenzita osvětlení zorného pole, závislá na numerické apertuře (viz výše)

3. Část optická - objektiv

Typy objektivů

Achromáty - jednoduché, složené ze 2 až 6 čoček; je u nich korigovaná chromatická vada, a to pro žlutou až zelenou oblast spektra

Apochromáty - korekce barevné vady pro tři základní barvy spektra, vyšší numerická apertura a lepší rozlišení detailů

Planachromáty - barevně korigovány jako achromáty a korigováno i vyklenutí zorného pole (mikrofotografie)

Planapochromáty - zcela odstraněno vyklenutí zorného pole i chromatická vada, patří k nejlepším a nejdražším objektivům

Fluoritové objektivy - z fluoritového skla (vynikající optické vlastnosti), dobře propouští UV záření, vhodné pro fluorescenci ale i pro pozorování ve světlém poli

3. Část optická - objektiv

Suché objektivy- mezi objektivem a krycím sklem vzduch

Imerzní objektivy - imerzní olej
- vodní imerze

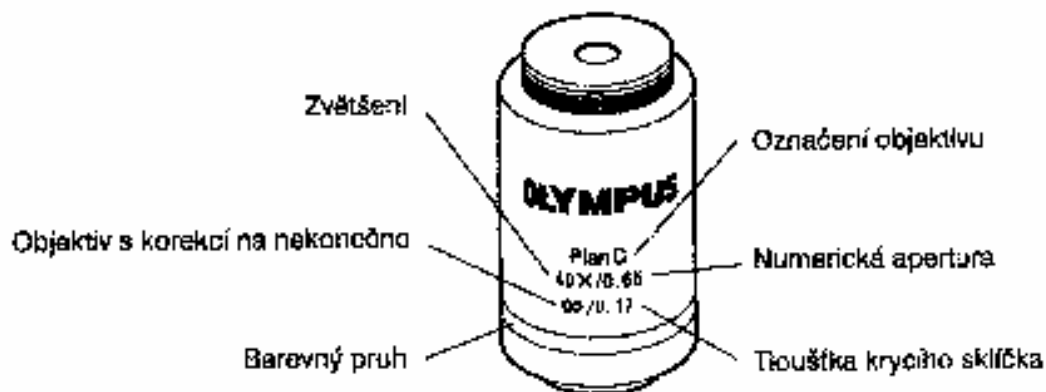
Objektivy pro práci bez krycího skla - NCG (no cover glass)-hematologie

Objektivy s korekcí na tloušťku krycího skla - korekční prstenec

Objektivy s irisovou clonou - omezení světelného toku objektivem, vliv na hloubku ostrosti

Odpružené objektivy - zamezení mechanickému doteku čočky

Objektivy pro s ontrast, DIC



Barevné označení objektivů - červená, žlutá, zelená, světle modrá,
tmavě modrá, černá

3. Část optická - okulár

Zvětšuje obraz vytvořený objektivem.

Zvětšení okuláru je prázdné - nezobrazuje více detailů, než bylo zobrazeno objektivem

Typy okulárů

Huygensův okulár H - skládá se ze 2 čoček, v kombinaci se slabými objektivy (achromáty)

Ortoskopické okuláry O - nezkracují zorné pole, v kombinaci s objektivy achromatickými a planachromatickými

Kompenzační okuláry K - kompenzují chromatickou vadu objektivů, jsou určeny pro práci s apochromáty

Periplanatické okuláry P - kompenzují chromatické vady a částečně i vyklenutí zorného pole, v kombinaci s planachromatickými objektivy

Brill okuláry - umožňují pozorování a kompenzaci pro dioptrické oko, dioptrická korekce, manžety

Širokouhlé okuláry - průměr zorného pole až 25 mm

Projektivy - okulár používaný při mikrofotografii

Postup práce s mikroskopem 1

1. Mikroskop přenášíme oběma rukama (kapotáž), manipulujeme pouze pomocí vroubkovaných částí
2. Zapneme mikroskop, vložíme preparát
3. Nastavíme vzdálenost okulárů a provedeme dioptrickou korekci (okulár bez dioptru zaostříme na objekt mikrošroubem, zavřeme oko; okulár s dioptrou doostříme podle svého oka).
Použití manžet: při pozorování s brýlemi ponechte manžety ohrnuté, nikdy manžety neodstraňovat z hygienických důvodů !!!!!!!
4. Nastavíme slabší objektiv a makrošroubem přiblížíme k preparátu.
Doostříme mikrošroubem.

Postup práce s mikroskopem 2

5. Centrování polní clony dle Köhlera: mějte objektiv o zvětšení 10x a zaostřete na preparát.

- uzavřete téměř polní clonu
- otáčejte kolečkem nastavení výšky kondenzoru, dokud v zorném poli zřetelně neuvídíte obraz polní clony
- otáčením centrovacích šroubů kondenzoru přesuňte obraz otvoru polní clony doprostřed zorného pole
- správné vycentrování clony ověříte otevřením clony tak, aby se okraje obrazu jejího otvoru dotýkaly okrajů zorného pole
- pře dalším pozorováním otevřete polní clonu tak, aby obraz jejího obvodu byl opsán zornému poli

6. Zaostřený obraz prohlížíme nejprve při malém zvětšení, detaily při větším zvětšení.

7. U mikroskopu Olympus CX31 není nutné při výměně objektivů upravovat intenzitu spodního osvětlení posunem

kondenzoru. Nastavíme správnou aperturní clonu (podle čísla na objektivu, hodnota na stupnici by měla odpovídat 80% numerické apertury objektivu).

Potřeby pro mikroskopování

Krycí skla - různá tloušťka (0,08; 0,11; 0,13; 0,17; 0,20 mm)

- velikost (mm) a tvar

Podložní skla - různá tloušťka (1; 1,2 mm) velikost (26 x 70 mm)

- zabroušené hrany, matované

Preparační soustavy - pinzeta, skalpel, nůžky, preparační jehly, štětec,
pipeta

Laboratorní sklo - Petriho miska, hodinové sklo, kádinka atd.

Krabice na preparáty

Slohy na preparáty

Kontrastní metody

kvalita zobrazení biologických objektů závisí na

1. dostatečném zvětšení obrazu

(maximální užitečné zvětšení =

numerická apertura objektivu x 1000)

2. rozlišovací schopnosti mikroskopu (numerická
apertura objektivu a kondenzoru, kvalita
osvětlení preparátu - Koehlerovo osvětlení)

3. kontrastu obrazu (cytologická a histologická
barviva, **optické metody**)

- **Fázový kontrast**
- **Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC)**
- **Hoffmanův modulační kontrast (HMC)**
- **Dotův infračervený gradientový kontrast (DGC)**
- **Fluorescence**
- **Konfokální laserová skanovací mikroskopie**

Metoda fázového kontrastu

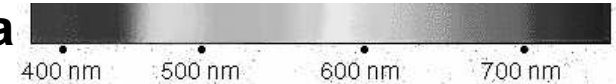
Frits Zernike, 1934

Nobelova cena

Zeiss, Jena

amplituda - intenzita světla

vlnová délka - barva



fázový posun - neviditelný pro lidské oko

Nebarvené objekty

různá optická hustota

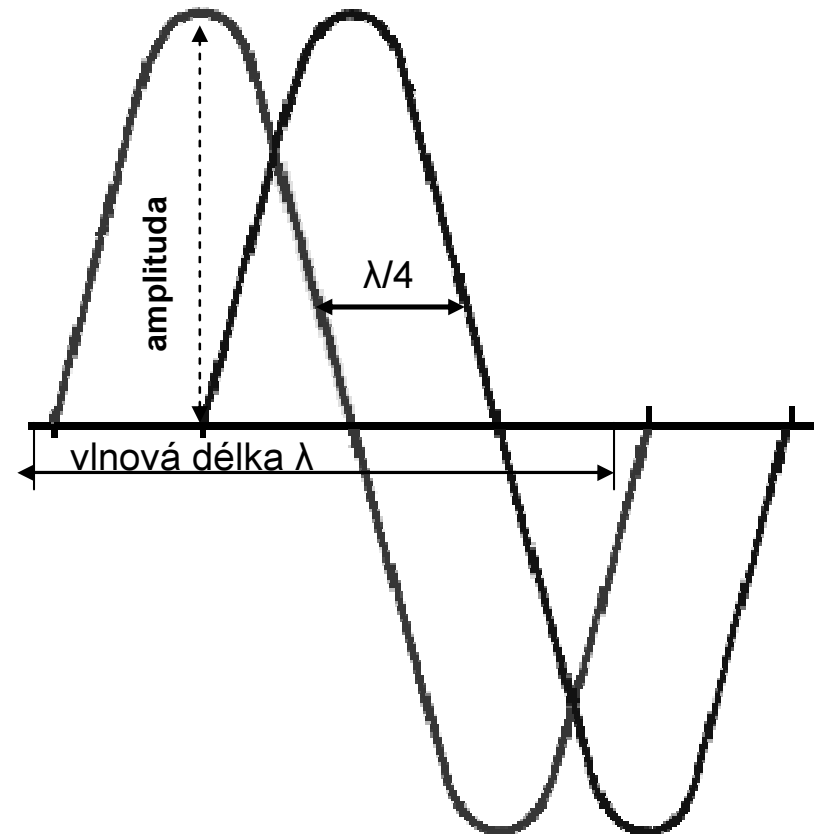
změna fáze

ZAŘÍZENÍ PRO FÁZOVÝ KONTRAST

změna fáze vlnění na změnu amplitudy

=

viditelné pro člověka



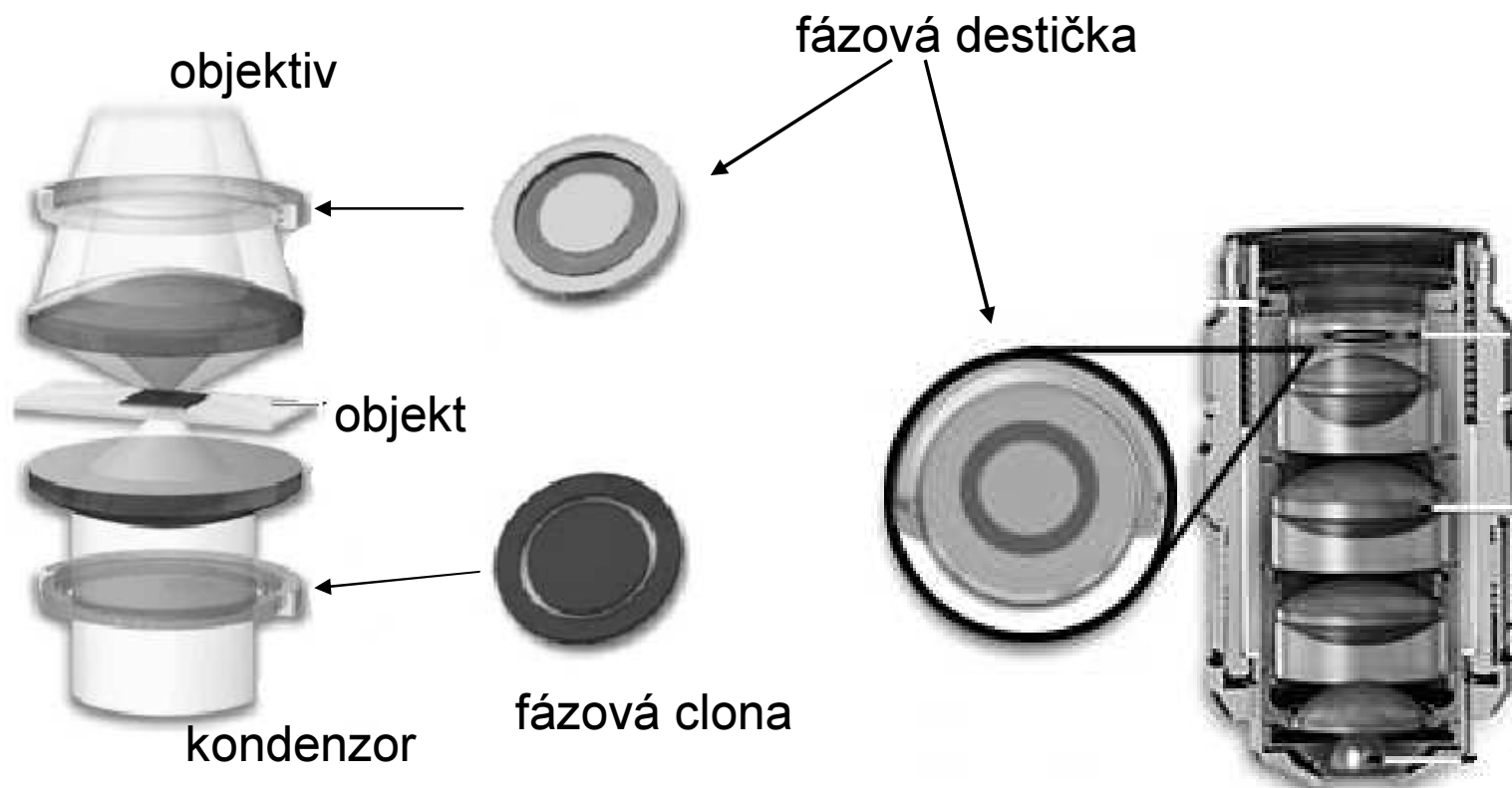
Objektivy pro fázový kontrast - fázový prsteneček

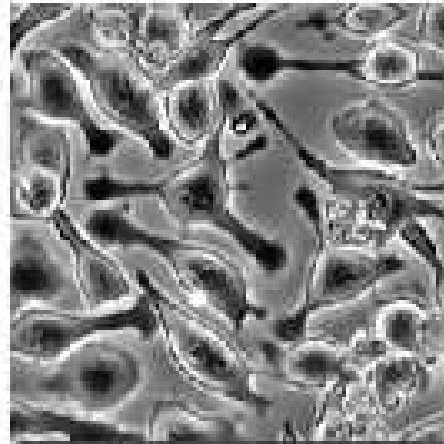
(převádí neviditelné fázové rozdíly na rozdíly amplitudové)

Kondenzor - aperturní kroužek pro různé zvětšení

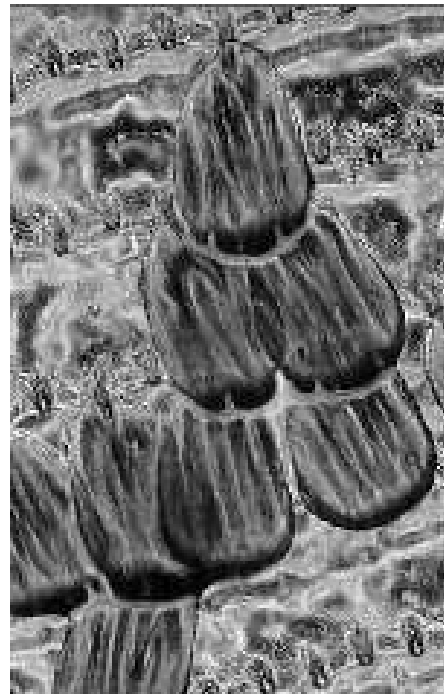
Centrovací dalekohled - seřízení fázových prstenců

Zelený filtr- 540 nm





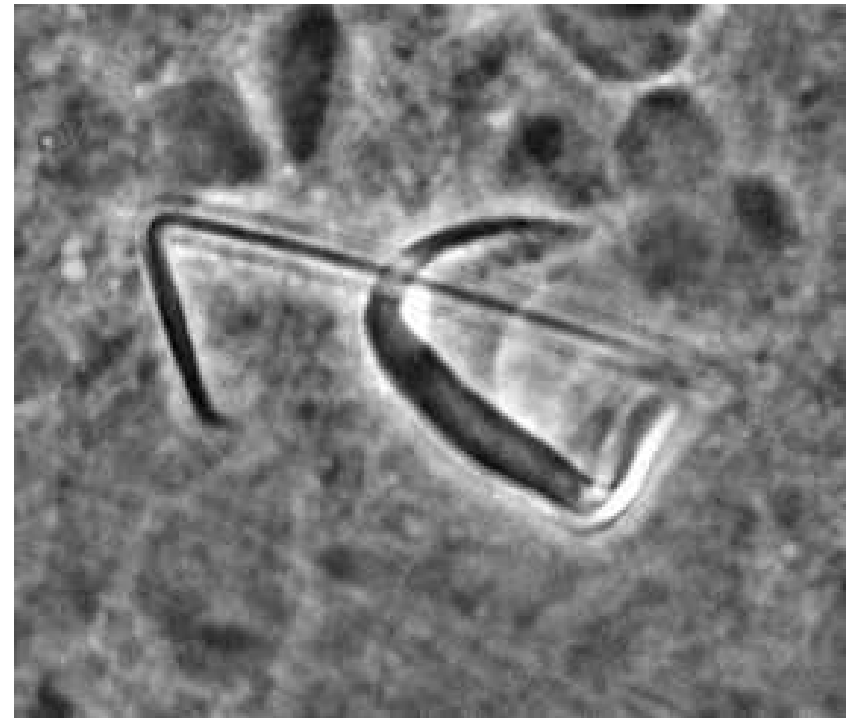
procházející světlo x fázový kontrast



křídlo motýla

Problém halace

apodizovaný fázový kontrast



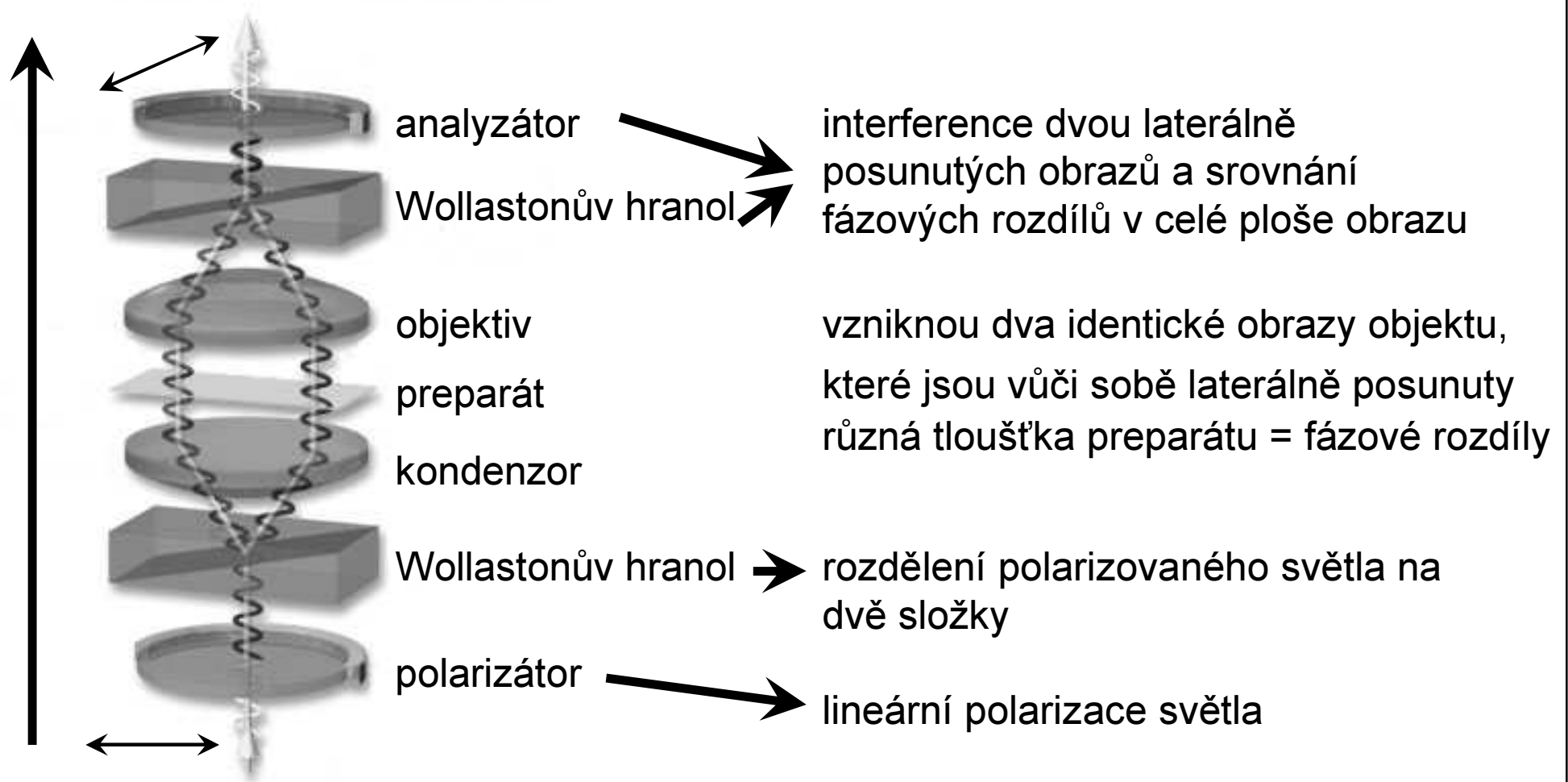
Malformovaný střední háček diplozoona

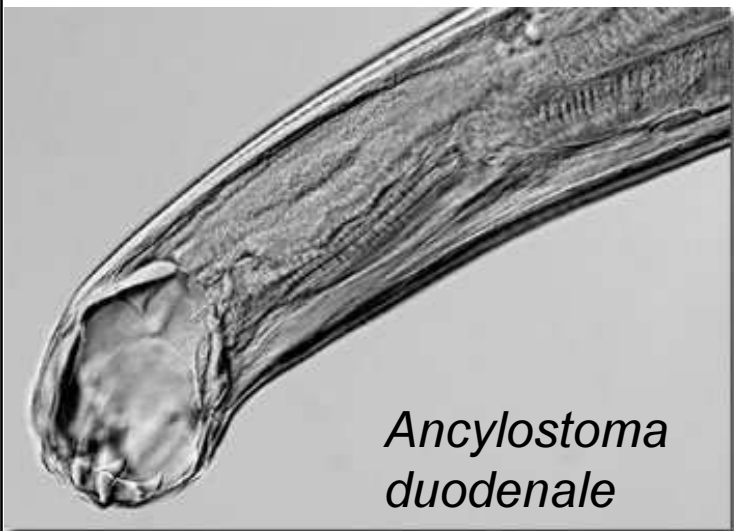
Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC)

- povrchová topologie objektu

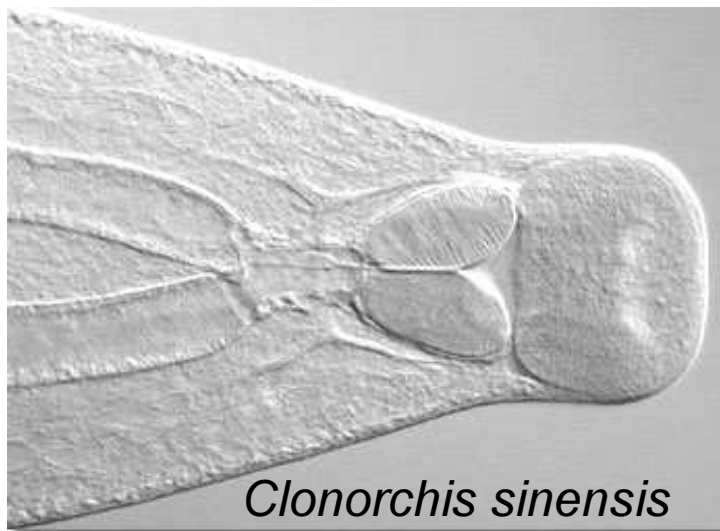
kolem 1950, Georges Nomarski
mikroskop - 1959 Carl Zeiss

zvětšený obraz vzorku se jeví jako
šikmo osvětlený trojrozměrný objekt





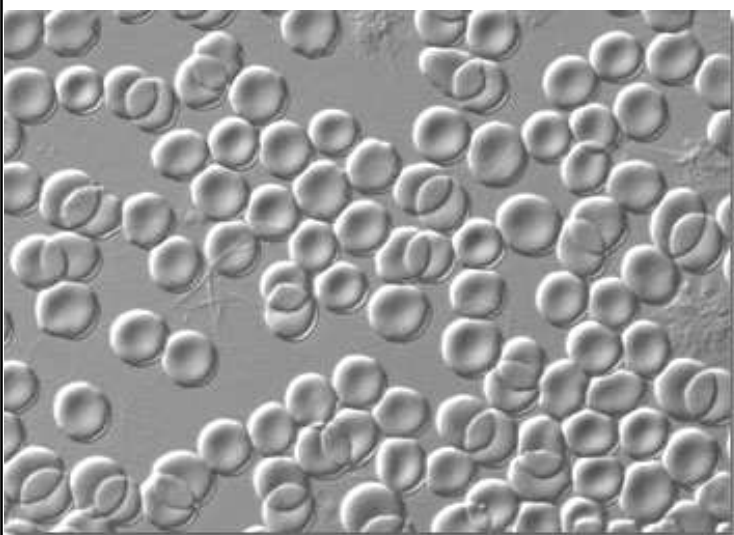
*Ancylostoma
duodenale*



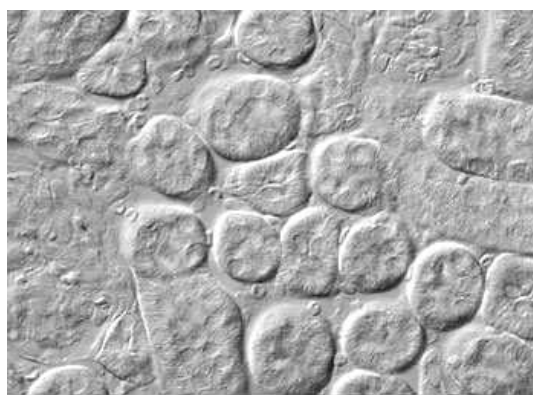
Clonorchis sinensis



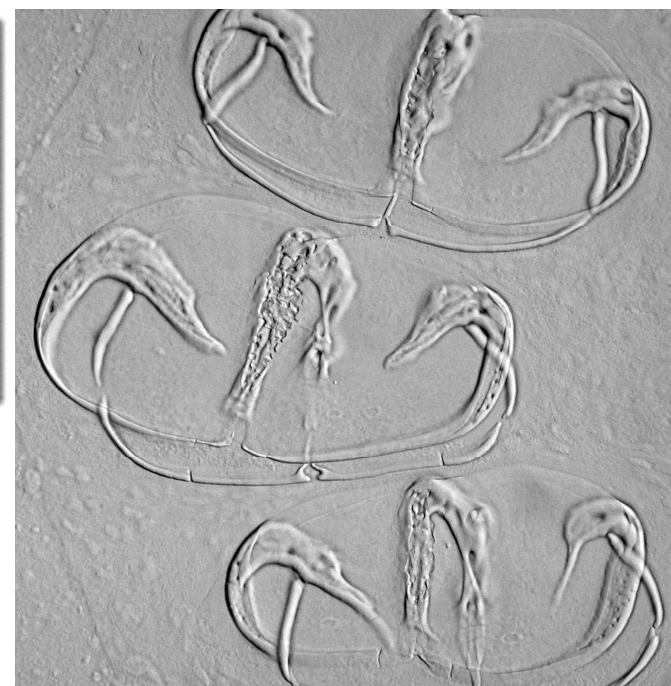
pylové zrno borovice



červené krvinky



řez ledvinou myši



přichytňové svorky diplozoona

Fluorescence, fluorescenční mikroskopie

Koehler 1910

První fluorescenční mikroskop s UV excitací - 1913

na jeho zkonstruování se podíleli Koehler, Reichert a Lehman

epifluorescence - pozorování v odraženém světle

diafluorescence - pozorování v procházejícím světle, která se v současné době téměř nepoužívá

Oblasti použití fluorescenčních mikroskopů

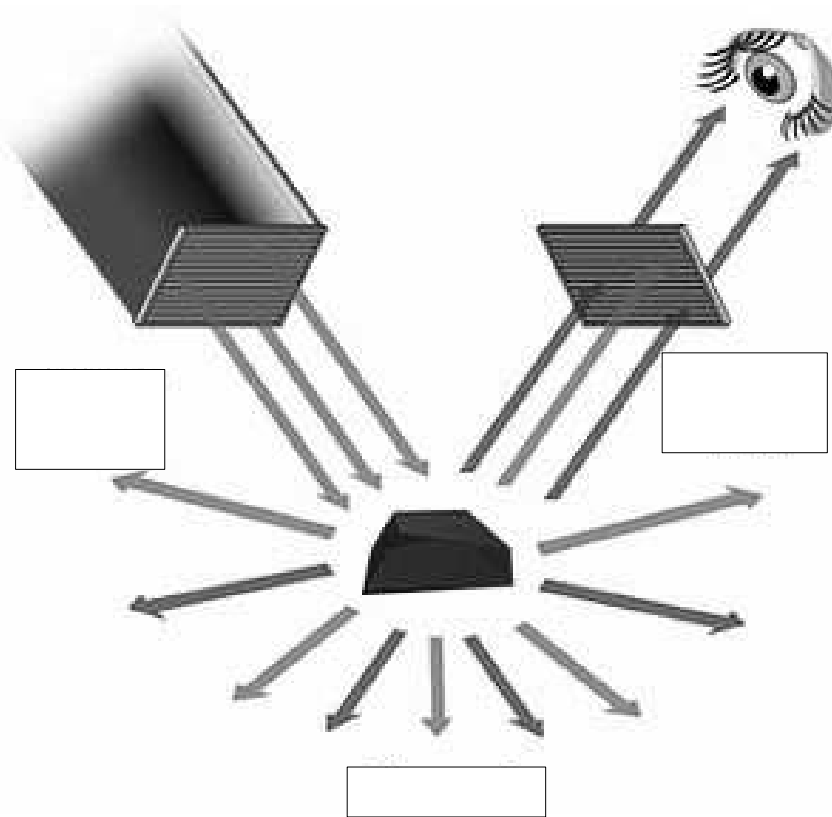
Biologie (zoologie, botanika, mikrobiologie)

Medicína (předepsané zkoušky, patologie, anatomie, neurologie, fyziologie, imunologie atd.)

Farmacie, chemický průmysl, biochemický průmysl

Výzkum a kontrola průmyslových aplikací

Fluorescence je jev, kdy látka absorbuje ultrafialové záření nebo viditelné světlo s krátkou vlnovou délkou a emituje viditelné světlo s delší vlnovou délkou než má světlo absorbované



Třístupňový proces :

1. fáze - excitace (buzení viditelného záření)
2. fáze - vlastní doba excitovaného stavu
(nevratná přeměna části energie v jiné druhy)
3. fáze - emise (vyzáření světla určité vlnové délky)

Energie excitovaného světla je větší než emitovaného ($E_{\text{ex}} > E_{\text{em}}$)

Vlnová délka excitovaného světla je menší než emitovaného ($\lambda_{\text{ex}} < \lambda_{\text{em}}$)

Spektrum tzv. bílého světla

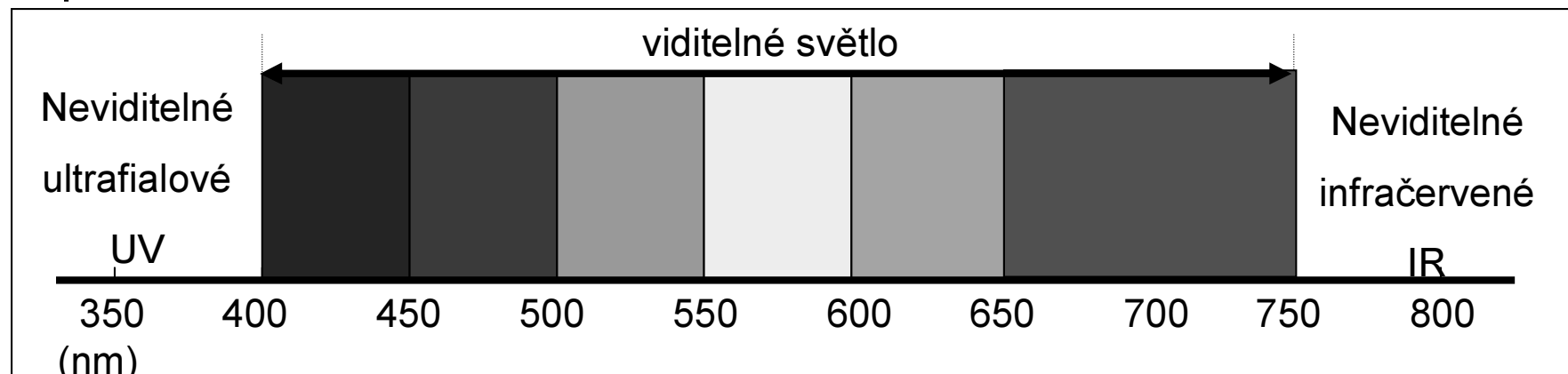
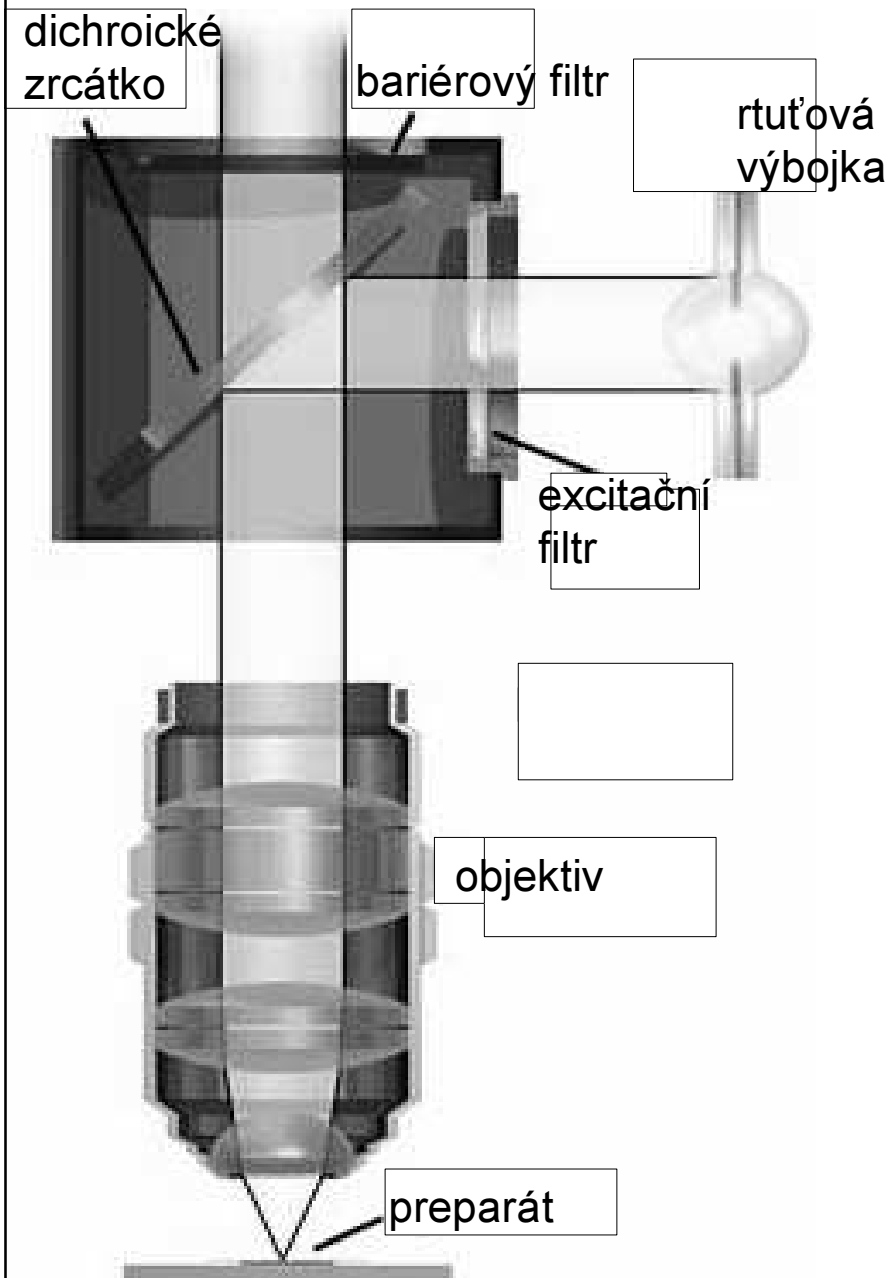
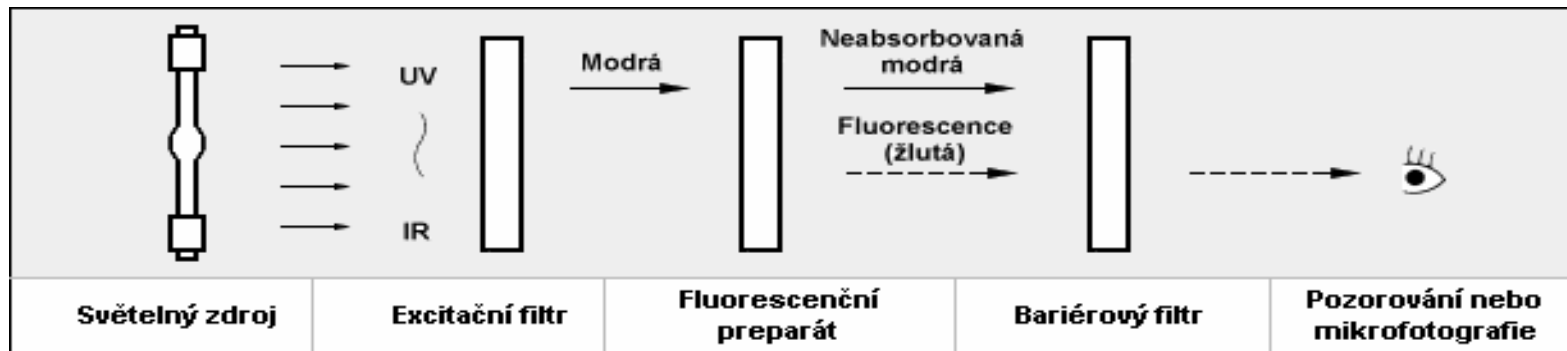


Schéma prvků fluorescenčního mikroskopu

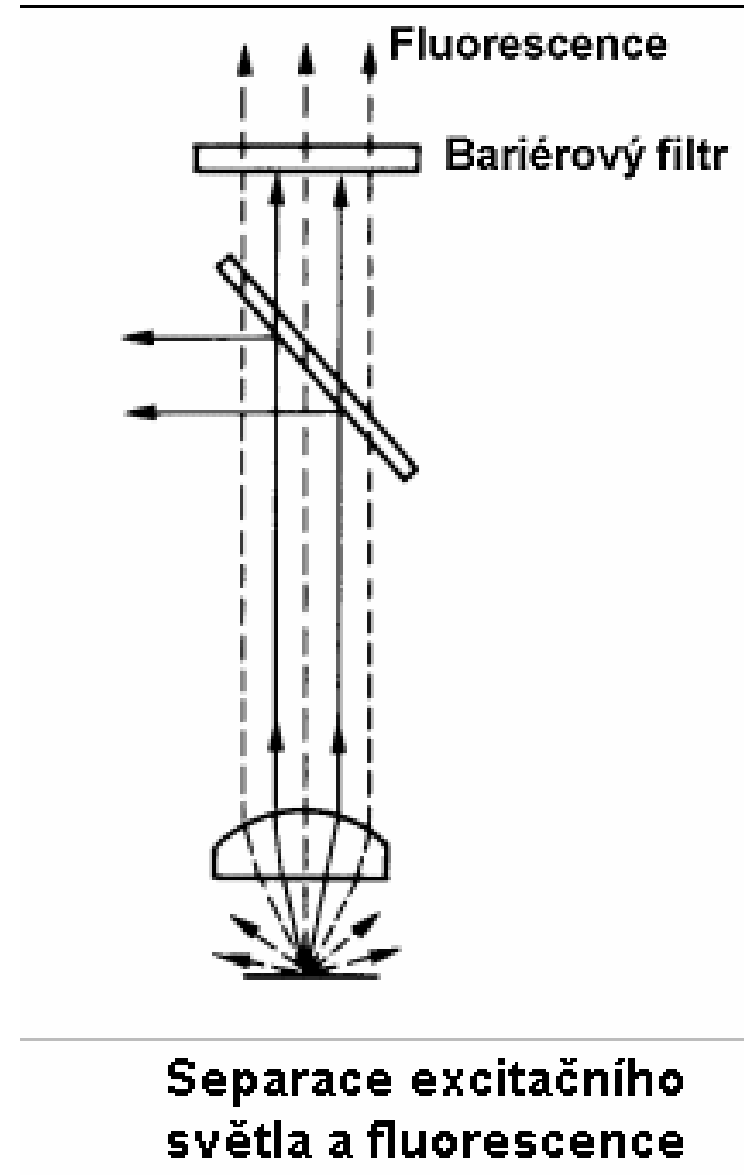
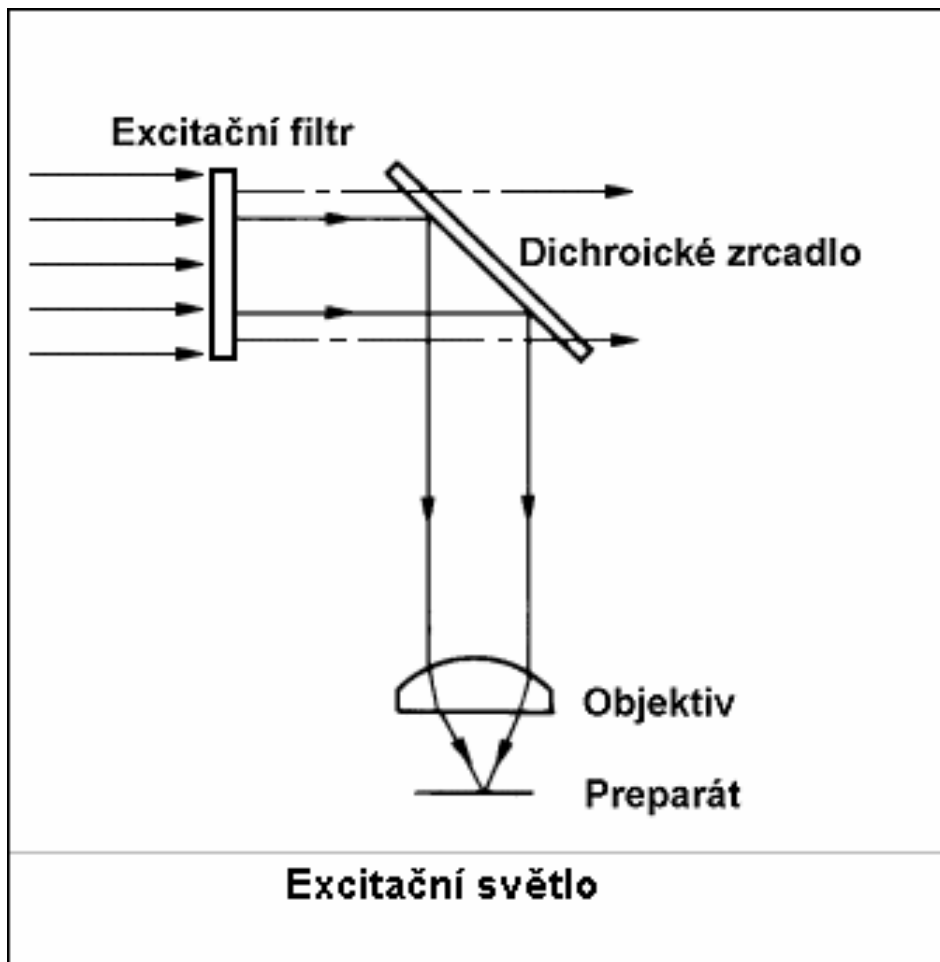


1. Rtuťová výbojka
2. Excitační filtr
3. Dichroické zrcátko
4. Objektiv
5. Preparát
6. Bariérový filtr

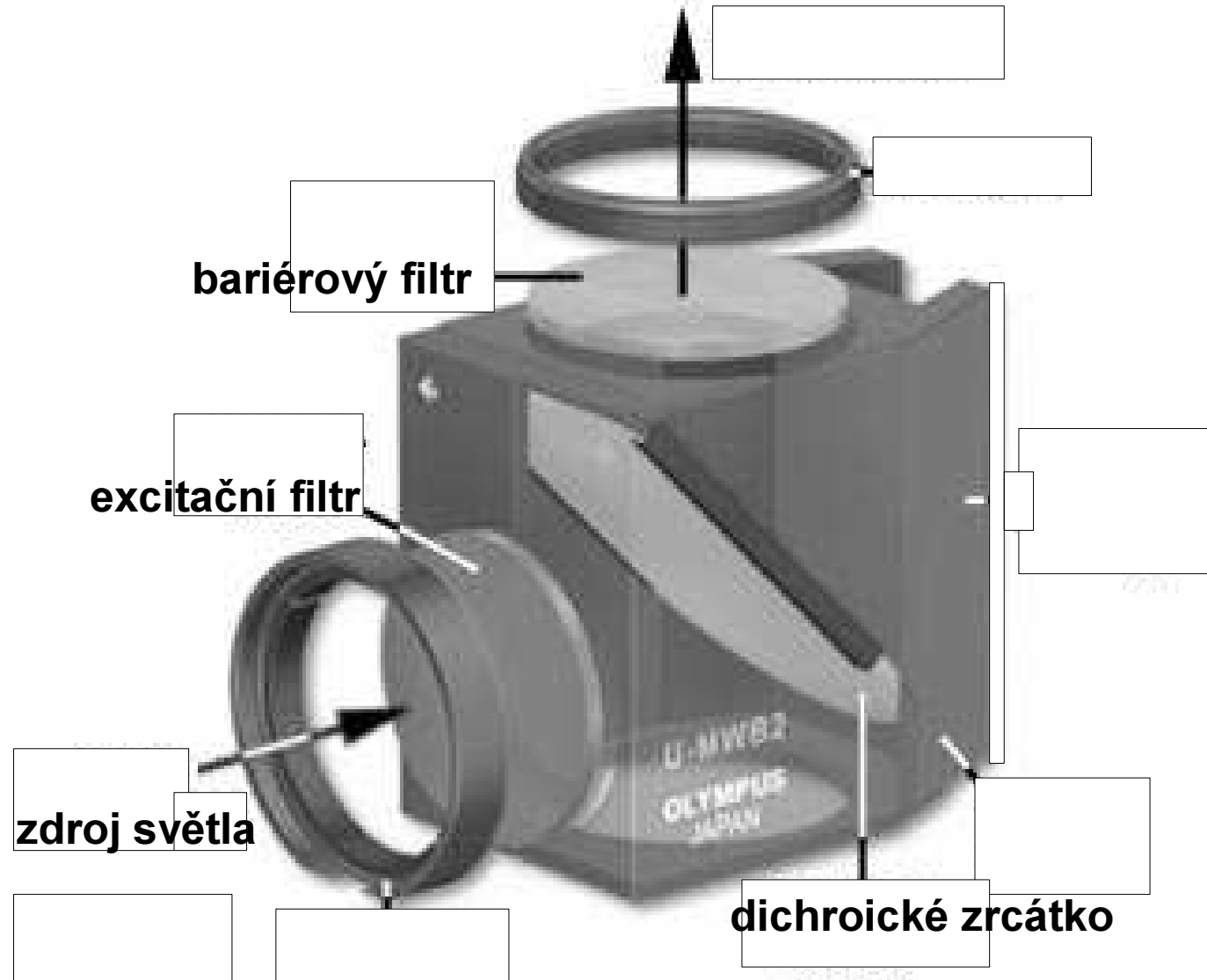


1. Světelný zdroj: světlo s různými vlnovými délkami od UV po IR
2. Excitační filtr: propouští pouze světlo, které je potřebné k fluorescenci vzorku, především s kratší vlnovou délkou, ostatní světlo pohlcuje
3. Fluorescenční preparát: Vzorky, které reagují na dopadající světlo fluorescencí (většinou po přidání barviva - fluorochromu)
4. Dichroické zrcátko: Odráží excitační světlo o určité vlnové délce směrem do vzorku a propouští ostatní vlnové délky, směrem od vzorku odráží nespotřebované excitační světlo a propouští fluorescenci
5. Bariérový filtr: Blokuje všechno excitační světlo, které nebylo použito a propouští pouze fluorescenční světlo. Navíc je možné z fluorescenčního spektra nechat projít pouze jeho část (černé pozadí obrazu)

Funkce dichroického zrcátka

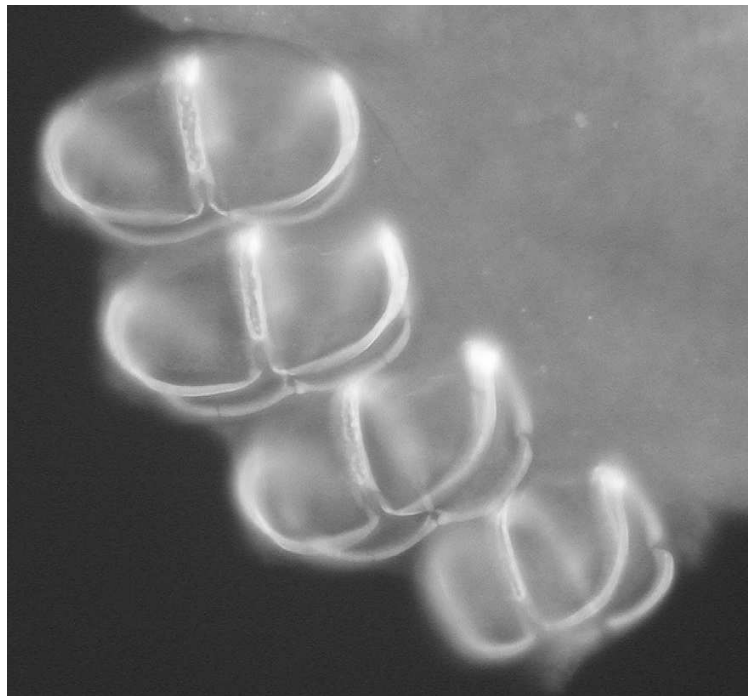


optická kostka

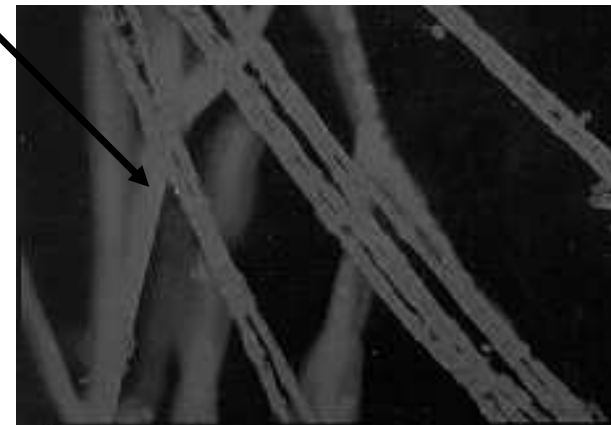
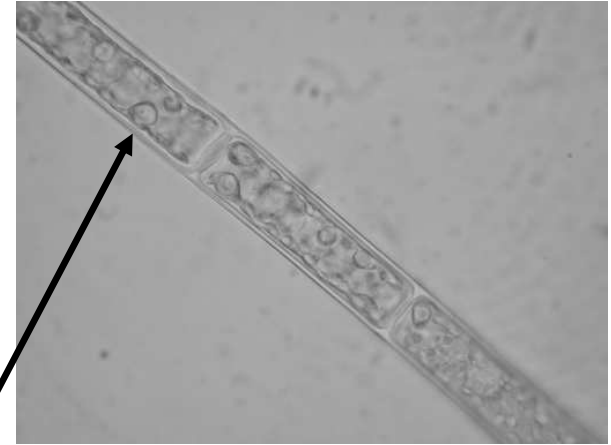


1. autofluorescence (bez použití barviva)

Celá řada látek fluoreskuje po ozáření UV světlem (některé tkáně, buňky a jejich integrální složky - pigmenty, chlorofyl).



chlorofyl

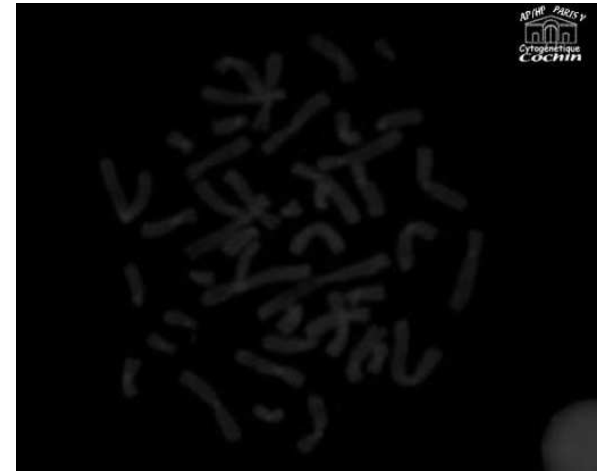


Přichytné svorky (skleroproteinové)
žaberního parazita kaprovitých ryb
Paradiplazoon homoion (Monogenea)

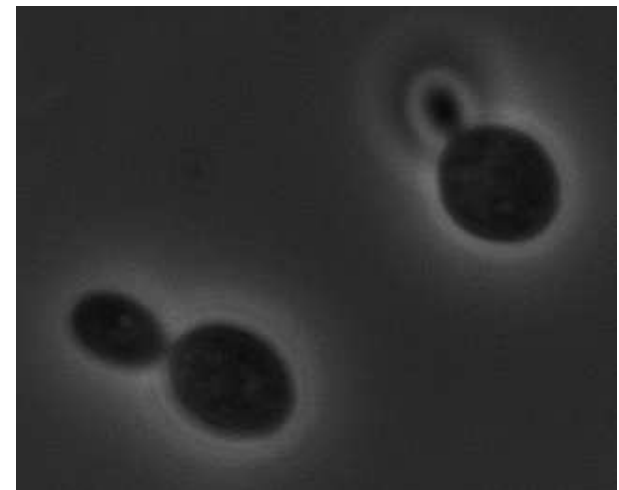
2. sekundární fluorescence (metoda chemického barvení)

Pozorování fluorescenčního světla generovaného fluorochromem (fluoreskující barvivo), kterým se obarví látka bez vlastní fluorescence (proteiny, uhlohydráty). Pokud se obarví pouze objekty, které chcete pozorovat, lze je pozorovat odděleně od tkáně a ostatních buněk.

Aplikace: vizualizace buněčných jader, chromozómů, cytoskeletu, buněčných stěn atd.



Chromozomy fluoreskující díky propidium jodidu



Barvení DAPI - jádra kvasinky
Saccharomyces cerevisiae

3. Fluorescenční barvení protilátek (imunofluorescence)

Molekuly protilátky, označené navázaným fluorochromem, se váží s molekulami specifických buněčných antigenů za vzniku komplexů (antigen+ protilátka + fluorochrom)

Vizualizace specifických antigenů, provázejících určité choroby, jejichž množství respektive přítomnost se studuje po reakci antigen/protilátka

Nové technologie

- mikroskop s videokamerou
- spojení počítače s mikroskopem
- digitalizace a analýza obrazu



DIGITÁLNÍ MIKROSKOP Olympus MIC-D

Místo klasického pozorování pomocí okulárů zobrazuje MIC-D na monitoru osobního počítače, který je s mikroskopem spojen USB kabelem. Protože se jedná o digitální obraz, jeho zpracování je velmi rychlé a snadné: uživatel jej může uložit, vymazat, upravit, vytisknout, umístit na web nebo poslat e-mailem.