

Téma 04: Princip a nastavené fázového kontrastu

Historie

Zásady fázového kontrastu zformuloval holandský fyzik Frits Zernike (1888 – 1966). Poprvé je publikoval v roce 1935. Podle jeho patentu byl v roce 1941 vyroben prototyp ve firmě Zeiss Jena. Od roku 1945 se toto zařízení začalo sériově vyrábět a získalo si mnoho uživatelů. Léta 1948 – 1955 byla obdobím největšího rozkvětu aplikací fázově – kontrastní mikroskopie, především v biologii. V roce 1953 získal Frits Zernike za fázový kontrast Nobelovu cenu v oblasti fyziky.

Obecný princip fázového kontrastu

Většina mikroskopů v biologii umožňuje pozorování pouze takových objektů, které mají určitý kontrast a větší nebo menší měrou absorbují světlo. Tyto objekty vlastně mění amplitudu procházejícího vlnění a jsou tedy nazývány objekty amplitudové.

V přírodě však existuje mnoho objektů, které vzhledem ke svému okolí nejeví změnu absorpce světla, protože se od svého okolí liší jen malou změnou indexu lomu. Takovéto objekty jsou označovány jako objekty fázové, protože posunují pouze fázi světelné vlny. V běžném mikroskopu v procházejícím světle nejsou takové objekty dobře pozorovatelné, protože lidské oko není citlivé na změnu fáze vlnění. Fázové objekty můžeme tedy pozorovat buď tak, že je s použitím různých metod obarvíme – a převedeme tak na objekty amplitudové, což ale vyžaduje usmrcení buněk (a je možný vznik artefaktů) nebo pro pozorování živých buněk použijeme zařízení pro vizualizaci fázového kontrastu.

Zařízení fázového kontrastu slouží obecně k tomu, že přeměňuje **fázové změny vlnění** vzniklé po průchodu fázovým objektem **na změny intenzity světla**. Obraz objektu v obrazovém ohnisku objektivu vzniká interferencí vlnění přímého, které jakoby procházelo preparátem beze změny, a vlnění difrakčního posunutého na fázovém objektu. Vzniklý obraz je nepozorovatelný, protože rozdíly v indexu lomu předmětu a okolí jsou velmi malé. Vlnění přímé a difrakční lze oddělit, což je velmi významné, protože to umožňuje modulovat amplitudu a fázi světla přímého bez ovlivnění světla difrakčního a naopak. Provádí se to tak, že se do obrazového ohniska objektivu umísťuje tzv. **fázová deska** (ve tvaru prstence), která posunuje fázi přímého světla a výsledkem interference obou druhů vlnění pak vzniká kontrastní obraz fázového objektu. Nejvýraznější fázový kontrast vzniká, pokud je fázový rozdíl obou vlnění roven $\frac{1}{4}$ **vlnové délky**.

V praxi se rozlišuje **fázový kontrast pozitivní**, kdy fázová deska v objektivu posunuje fázi přímého vlnění vzhledem k vlnění difrakčnímu $o + 90^\circ$ ($o + 1/4\lambda$) a **fázový kontrast negativní**, kdy fázová deska v objektivu posunuje fázi přímého vlnění vzhledem k vlnění difrakčnímu $o - 90^\circ$ ($o - 1/4\lambda$).

Stavba typického fázově kontrastního mikroskopu

Nejčastěji užívaná varianta = typ Zernike. Od běžného mikroskopu se liší především tím, že v ohniskové rovině kondenzoru se nachází **clona s prstencovitou štěrbínou** a v ohniskové rovině objektivu **fázová deska s fázovým prstencem**. Obraz otvoru prstencovité clony kondenzorové se tvoří po přechodu světla přes kondenzor a objektiv na fázovém prstenci fázové desky. Fázový prstenec musí pokrývat zcela obraz štěrbiny. K tomuto přesnému nastavení se používá centračních šroubů, kterými posunujeme destičku s prstencovitou štěrbínou. Ke kontrole tohoto centrování se používá tzv. **pomocný mikroskop**.

Nejdůležitější součástí fázového mikroskopu je **fázová deska v objektivu**. Tato deska se vyrábí napařováním ve vakuu – buď na skleněnou desku nebo přímo na čočku objektivu. Spodní vrstva prstence je dielektrická látka (např. MgF_2) a je pokrytá vrstvičkou kovu (Cr nebo Al). Dielektrická vrstva slouží k posunu fáze světla, kovová vrstva pro oslabení intenzity přímého světla. **Pomocný mikroskop** je tvořen jednoduchým objektivem a posuvným Ramsdenovým okulárem. **Monochromatický filtr (zelený)** není vždy nutný, většina zařízení pracuje i v bílém světle. Fázové posuny jsou však optimalizované pro vlnovou délku 546 nm. Použití zeleného filtru zlepšuje kontrast a obecně jakost fázově kontrastního obrazu.

Popis fázového kontrastu KFZ (PZO Warszawa)

Fázová deska objektivu obsahuje **dva prstence**. Vnitřní je pro pozitivní a vnější pro negativní fázový kontrast. Pod 2 **štěrbínami kondenzorových clon** jsou **dva polaroidy** (prstencovitý a kroužkový), polarizující procházející světlo ve směrech na sebe kolmých. Při pohybu **polarizátorem** umístěným pod kondenzorem lze „zhasnout“ nebo „rozsvítit“ jeden nebo druhý otvor clony a tím přecházet od pozitivního k negativnímu fázovému kontrastu.

Materiál pro přípravu mikroskopického preparátu může být rozmanitý: epidermis cibule *Allium cepa* L., krycí trichomy *Saintpaulia ionantha* Wendl., projasněná semena *Capsella bursa-pastoris* L., apod. Vhodné jsou jednovrstevné preparáty.

Postup nastavení fázového kontrastu na mikroskopu Biolar

1. **Zcentrujeme žárovku** podle Köhlerova principu (zaostření a orientace vlákna).
2. **Vyměníme kondenzor K51** za fázový kondenzor K3PhZ s otočným diskem se clonami a polarizátorem. Při upevňování kondenzoru dáваме pozor, aby zadní centrační šroub vlevo nenarážel do šroubu posunujícího kondenzor.
3. Zaostříme na preparát a okraj clony a **zcentrujeme fázový kondenzor** bez zařazené fázové clony (na disku je proti značce 0) pomocí předních centračních šroubů.
4. **Vyměníme objektiv** za objektiv fázový s fázovou deskou se dvěma prstenci (označeno bílým pruhem a symbolem PhZ) a opět zaostříme na preparát.
5. Na disku fázového kondenzoru **nastavíme patričnou clonu** podle velikosti zvětšení fázového objektivu.
6. Vyjmeme okulár a místo něj do tubusu **vložíme pomocný mikroskop**. Vysunutím okuláru pomocného mikroskopu zaostříme na fázové prstence objektivu (hnědé kruhy) a na obraz štěrby clony fázového kondenzoru (světlé kruhy)
7. Pomocí zadních centračních šroubů **centrujeme clonu** v kondenzoru k fázovým prstencům objektivu, aby došlo k úplnému zákrytu obrazu štěrby fázovými prstenci.
8. Pomocný mikroskop nahradíme okulárem, vložíme zelený filtr a **pozorujeme obraz** preparátu ve fázovém kontrastu.
9. Do protokolu **zaznamenáme rozdíly** ve vzhledu téhož preparátu pozorovaného v procházejícím světle a ve fázovém kontrastu.

Literatura:

Pluta M. (1982): **Mikroskopia optyczna**. - PWN Warszawa.

stránky kurzu Biologická technika, Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta UK, Praha

<http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/DIC/fk.htm>