

Early microscope

Bi4170: Optické kontrastní a zobrazovací metody

2. Pozorování v zástinu Fázový kontrast

podzim 2015

Nízký nebo téměř žádný kontrast u biologických objektů

- Biologické objekty je obvykle obtížné pozorovat ve světelném mikroskopu kvůli nízkému nebo téměř žádnému kontrastu.
- Komponenty buňky a pletiva jsou většinou průhledné a bezbarvé, protože neobsahují látky (pigment) pohlcující světlo a vytvářející oblasti s různou světelnou intenzitou -
kontrast.

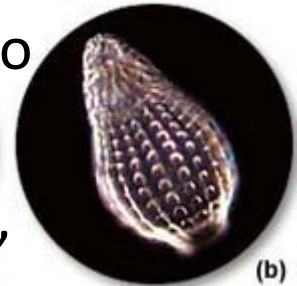
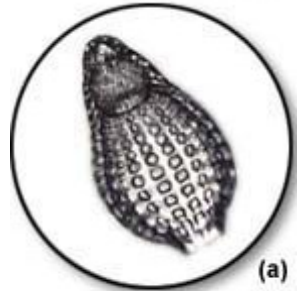
Využití rozdílů v indexu lomu

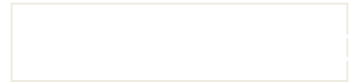
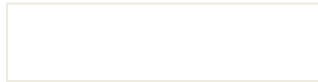
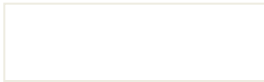
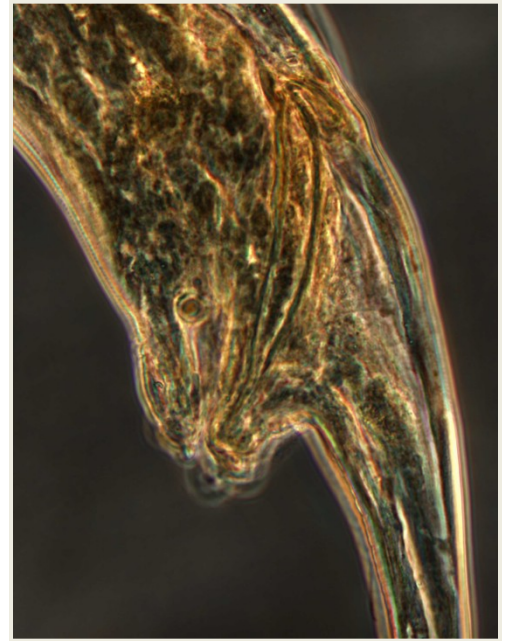
Kombinace

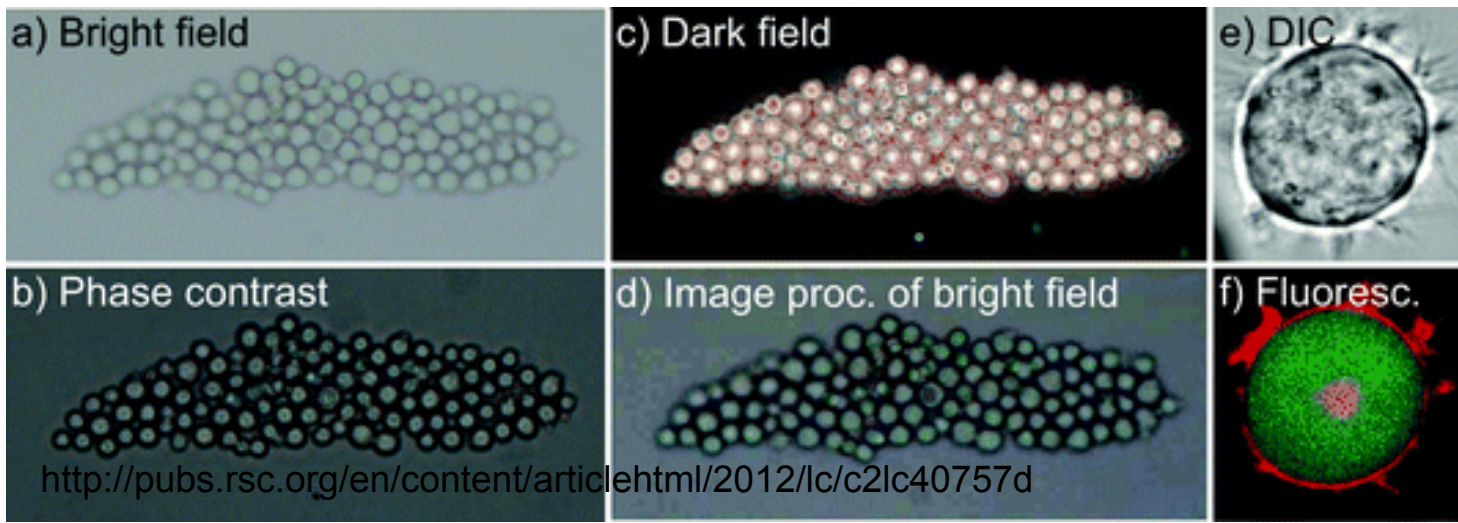
Barvení objektů

Metody zesilující kontrast obrazu

- **Přivření kondenzorové clony nebo snížení kondenzoru** (vede sice ke zvýšení kontrastu, zároveň se ale snižuje rozlišení a ostrost obrazu)
- **Mikroskopování v temném poli („darkfield microscopy“)** (Používá se pro zviditelnění nebarvených průhledných vzorků, které mají index lomu podobný jako okolní médium)
- **Polarizační mikroskopie** (umožňuje zviditelnit struktury, jejichž stavební materiál se vyznačuje dvojlomem)
- **Fázový kontrast**
- **Fluorescenční mikroskopie**
- **Diferenciální interferenční kontrast (DIC, Nomarského DIC)**
- **Konfokální mikroskopie**







Contrast-Enhancing Techniques in Optical Microscopy

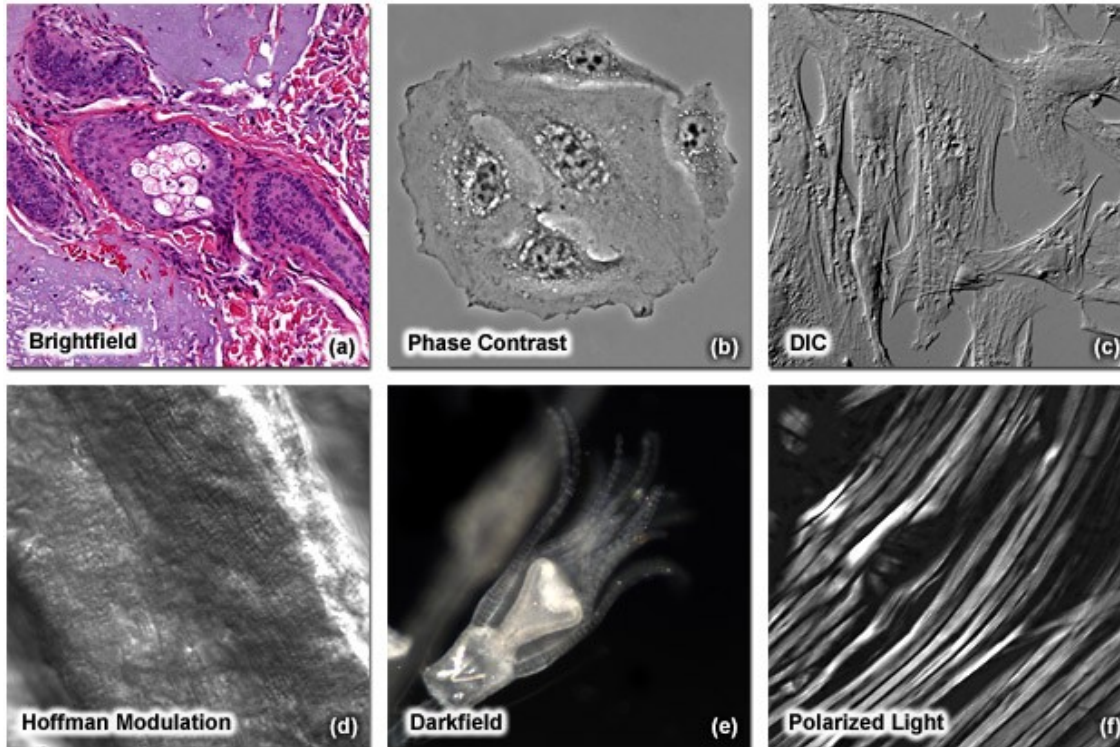
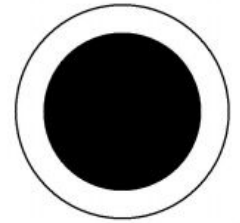


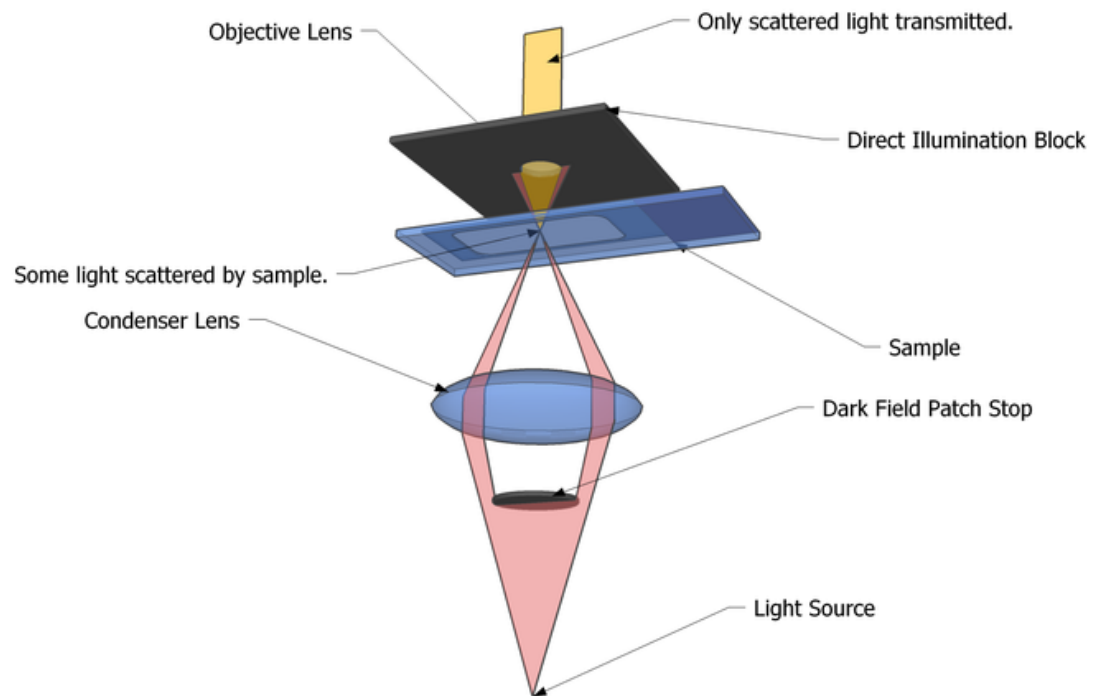
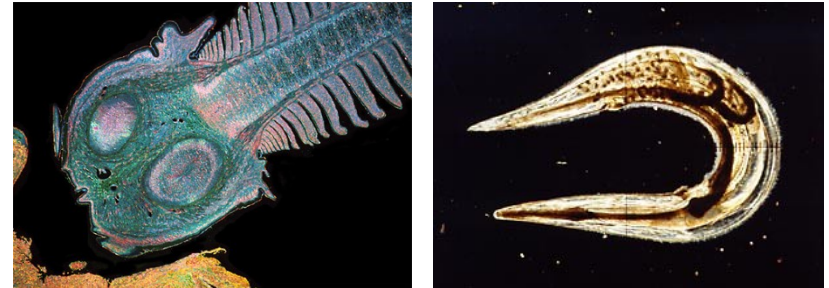
Figure 1

<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/contrast.html>

Darkfield: Temné pole



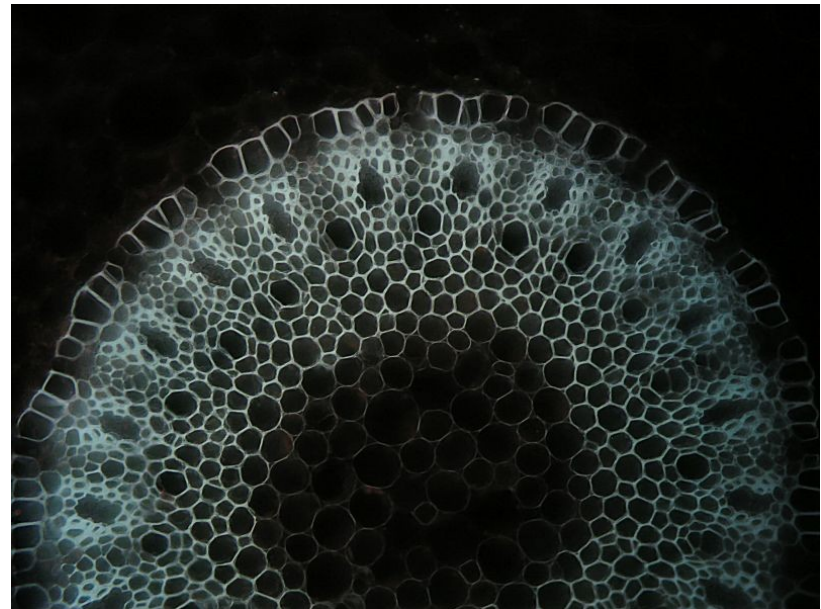
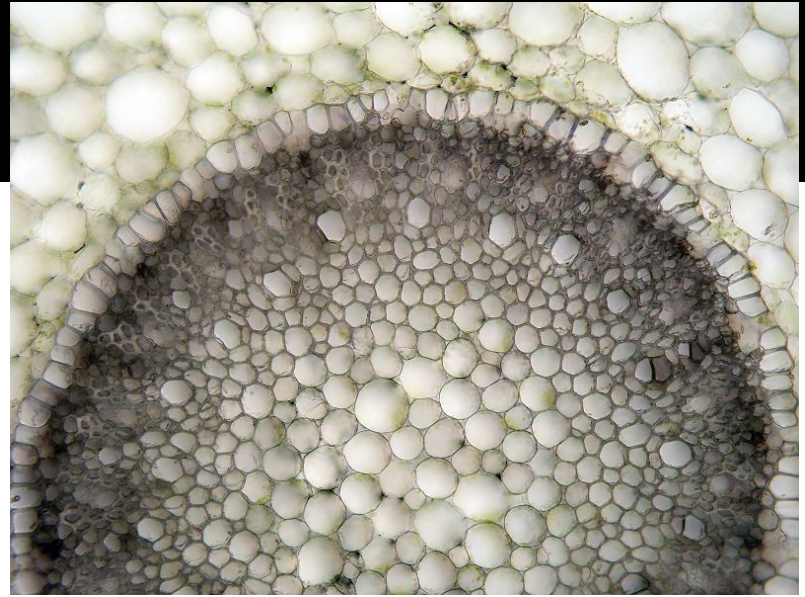
- výhodou darkfield je, že vidíte detaily, které nejsou normálně vidě protože se od i odráží světlo
- do držáku filtrů kondenzoru se umístí neprůhledná c.....



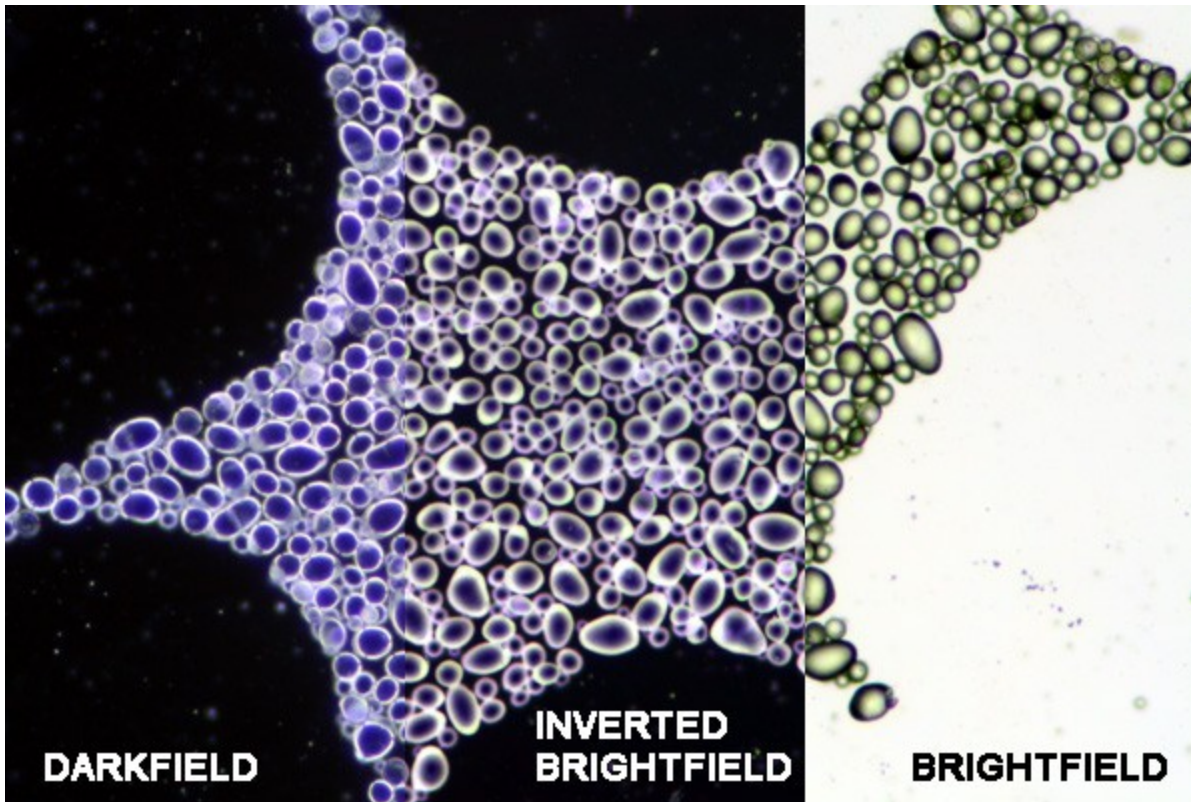
Darkfield microscopy

- Pozorování v zástině

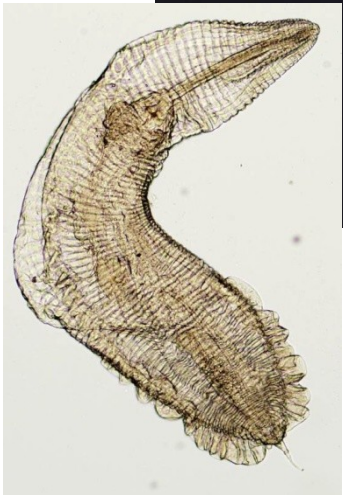
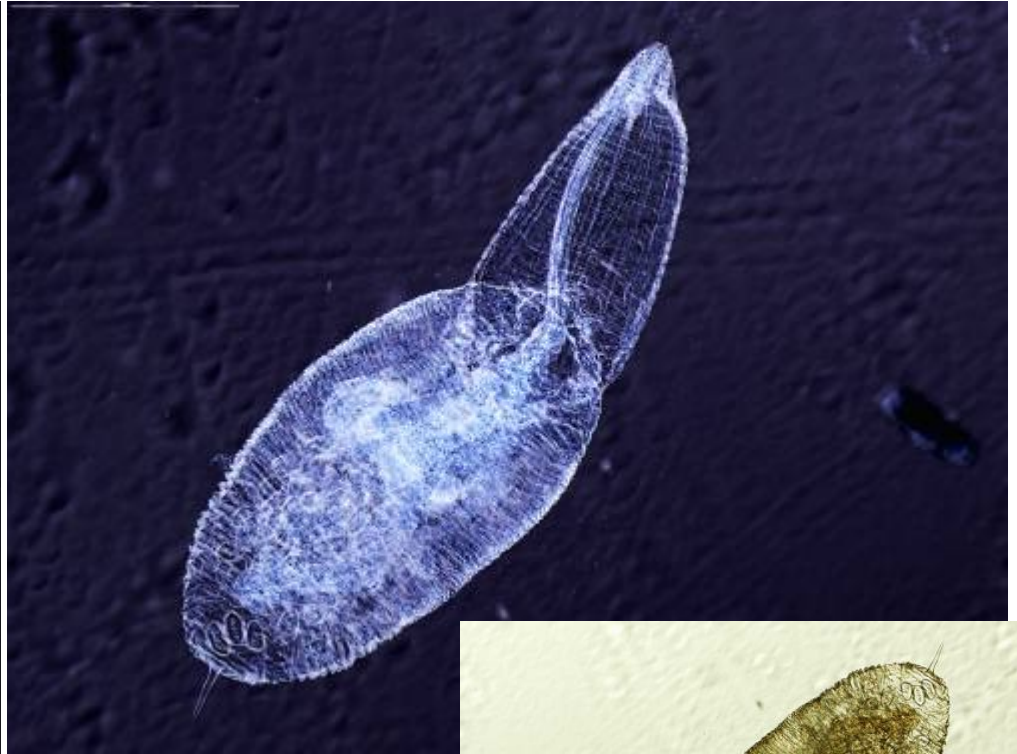
- Jednoduchá technika pro zobrazení průhledných vzorků, které nejsou barveny
- Lepší/ jasnější viditelnost
- Lze použít na stereo mikroskopech nebo i na biologických mikroskopech s vysokým rozlišením
- Vhodné pro pozorování drobných objektů: prvoci, houbové spory, pylová zrna, bakterie, rostlinná pletiva



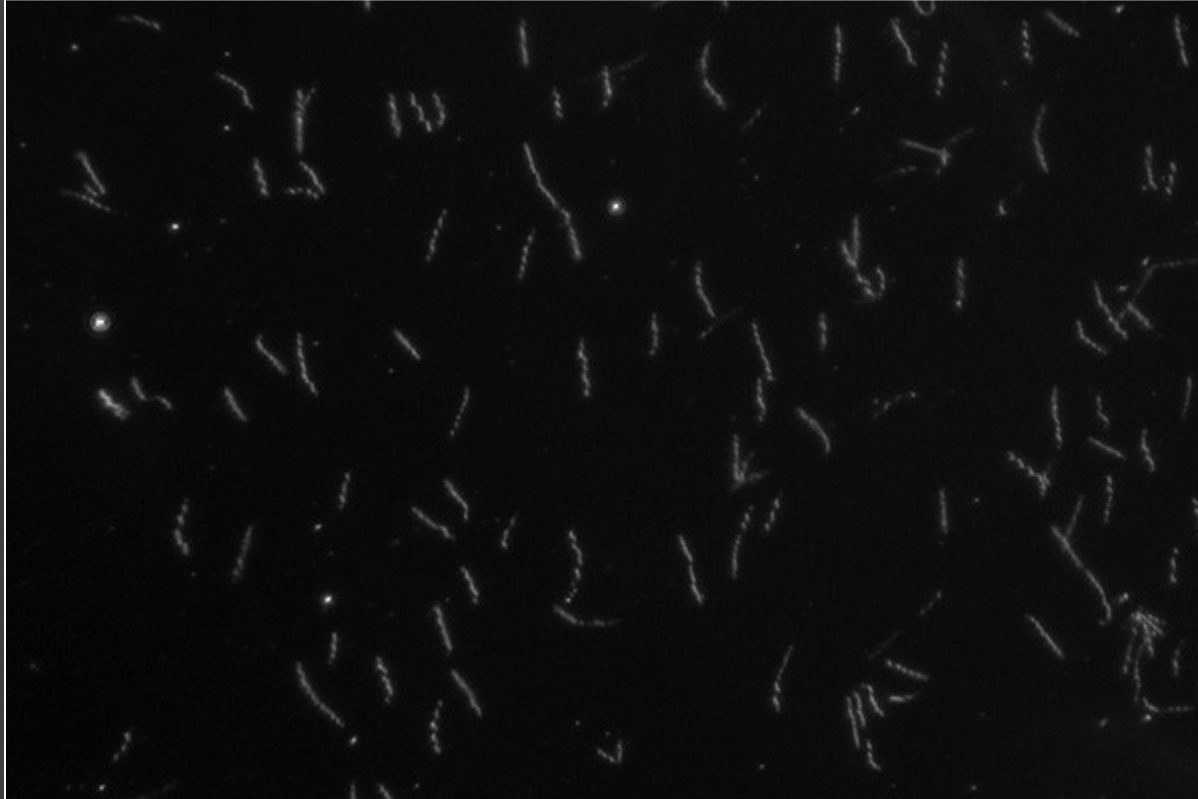
Srovnání zástinu, invertovaného obrazu a světlého pole



Invertovaný obraz

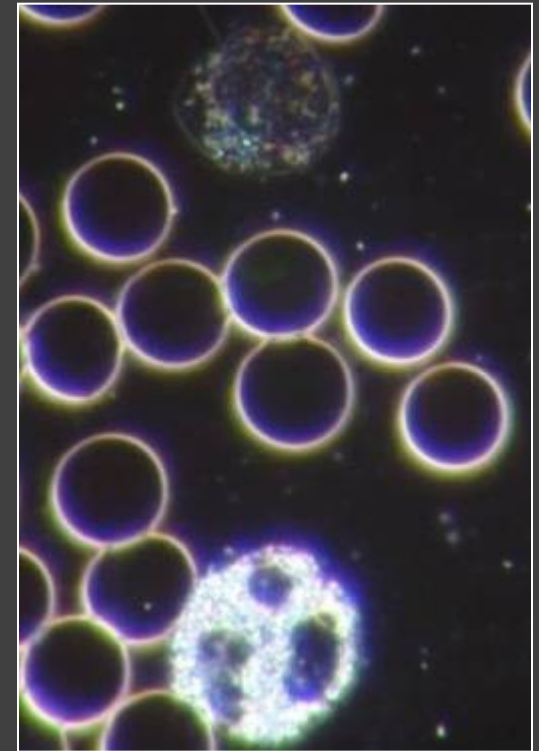


spirochéty lymeské boreliózy, *Borrelia burgdorferi*
objektiv 20 a revolverový kondenzor s dark-field clonou



- http://media.wiley.com/mrw_images/cp/cpmc/articles/mc02a01/image_n/nmc02a0109.jpg

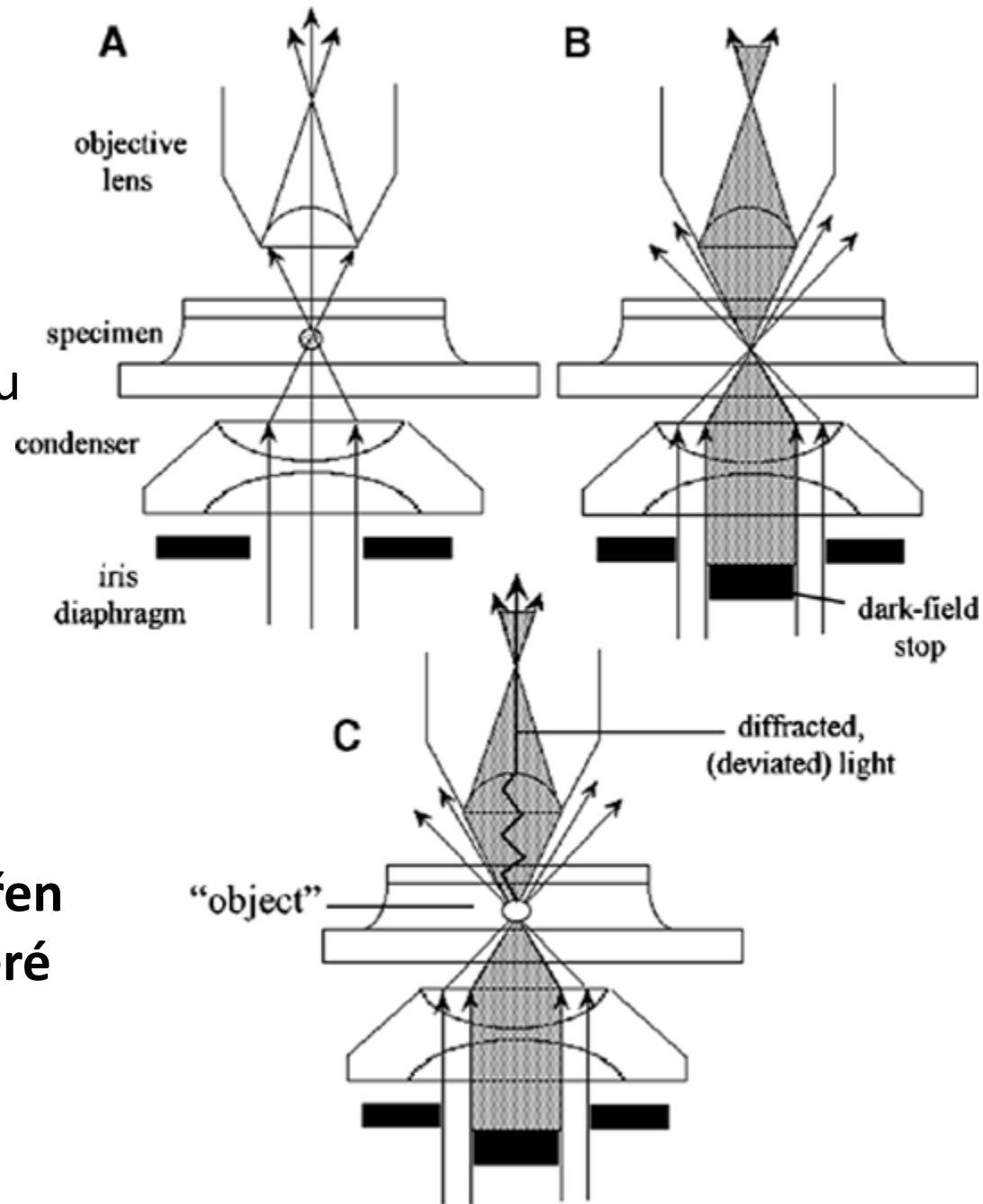
krev



- <http://www.darkfieldliveblood.com/uploads/6/0/5/1/6051367/2278486.jpg?1310441218>

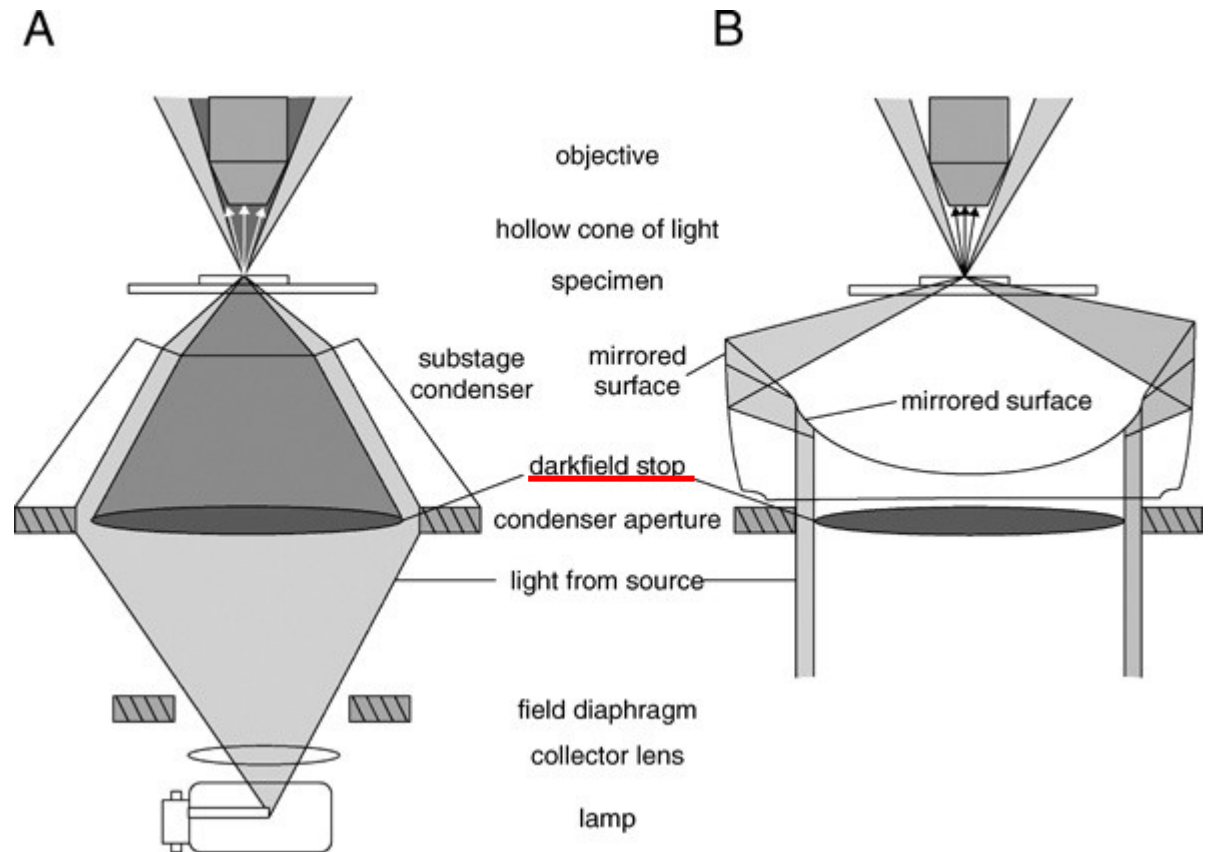
Princip

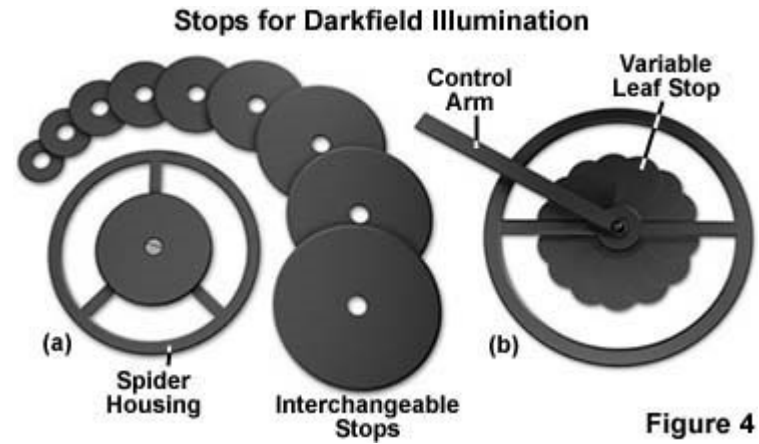
- Do středu zdroje světla je umístěna neprůhledná kruhová **překážka**.
- Světlo se dostává ke vzorku ze strany a tím zvyšuje kontrast.
- **Přímá cesta světla je blokována**, pouze šikmé světelné paprsky mohou dosáhnout vzorku
- **Kontrastní obraz je vytvořen rozptýlenými paprsky, které prošly čočkou**
- Výsledný obraz se zdá být téměř podsvícený.



Tvorba temného pole pomocí:

- A) multifukčního kondenzoru vybaveným dark-field clonou
- B) kardioidního kondenzoru (cardioid condenser)





- <http://www.olympusmicro.com/primer/java/darkfield/abbe/index.html>



„domácí“ dark field

- Mikroskopie temného pole lze snadno dosáhnout umístěním mince mezi zdroj světla a kondenzor.

Nastavení: Aby mince pracovala správně, musíte vycentrovat minci tak, že světlo přichází zpoza jejích okrajů rovnoměrně ze všech stran. Pohybem kondenzoru nahoru a dolů se upraví obraz tak, aby vzorek nebyl ani ve tmě ani ve světle. Vzorek by měl být vidět tak, aby příliš nezářil.



„domácí“ dark field

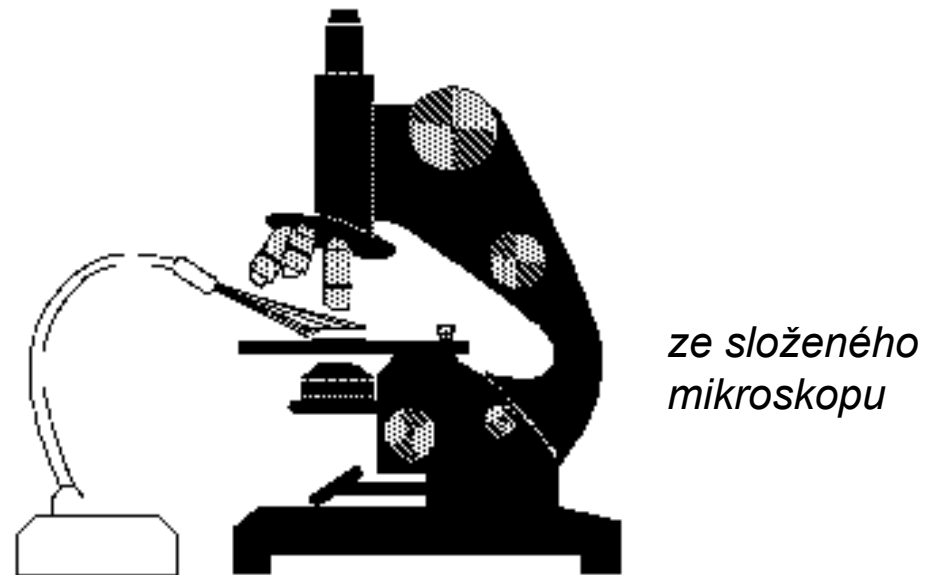
- Neprůhledný terč lze vyrobit také z černého papíru, kartonu, plastu (nebo použít malé mince)
- Nalepený na sklo nebo plexisklo jej umístít do nosiče clon pod kondenzorem. Velikost neprůhledného terče je pro každý objektiv jiná
- (postup výroby clony je na www.olympusmicro.com/primer/techniques/darkfield.html)

Approximate Field Stop Diameter Size

Magnification	Numerical Aperture	Stop Size (mm)
1X	0.03	25-30
2x	0.05	8-11
4X	0.10	8-14
10x	0.25	16-18
20X	0.40	18-20
20x	0.65	20-22
40X	0.65	22-24

„Domácí“ dark field do zvětšení 100x

- Vzorek umístit tak, aby nebyl zespoda ozařován žádným světlem
- Vypnout všechna zabudovaná světla
- Zamířit světlo o vysoké intenzitě shora nebo ze strany



„domácí“ dark field

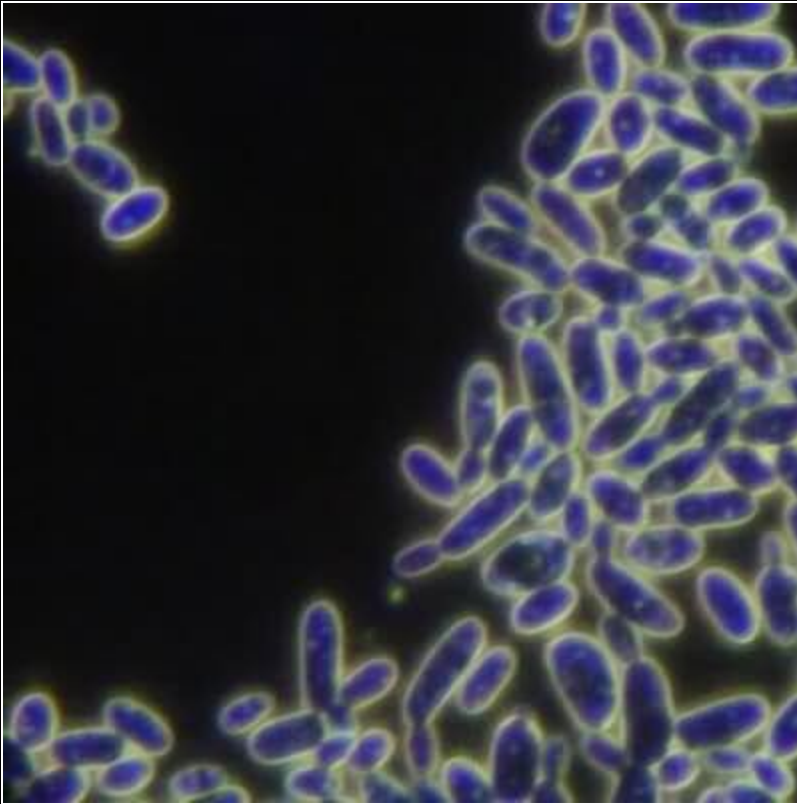
Focení v Dark Field:

- Klasické nastavení fotokamery je navrženo na normální světelné podmínky. Bohužel ty jsou příliš světlé na fotografování temného pole.
- *Doporučení:* snížit na automatu kompenzaci expozice na -2.



Obr. bez použití kompenzace expozice. Pozadí se jeví příliš světlé.

Kvasnice



- http://www.pmbio.icbm.de/mikrobiologischer-garten/pics/hefe_darkfield.jpg

Mořský mnohoštětinatec, 40x



- http://www.scienceprojectlab.com/image-files/csp_001_polichetae.jpg

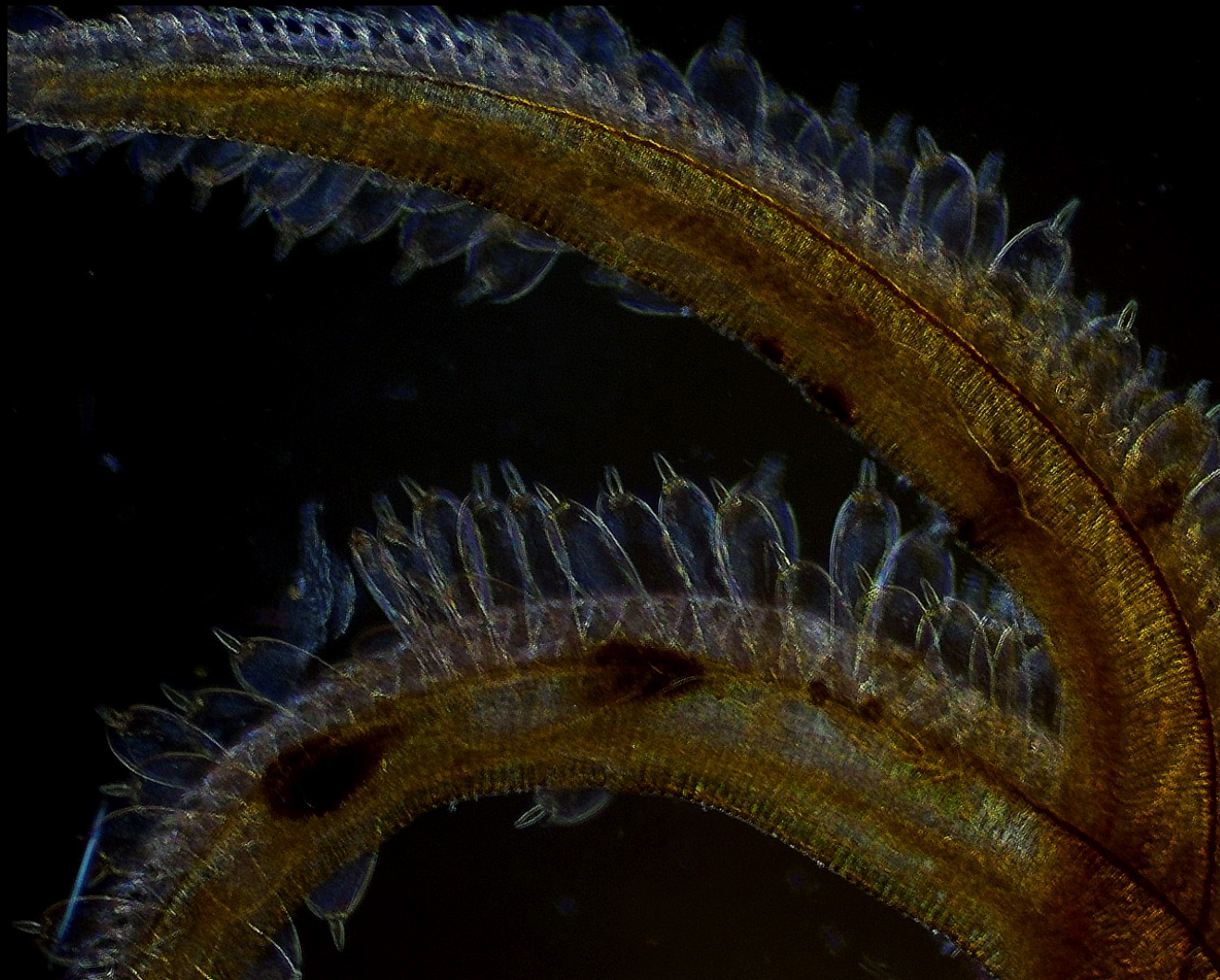
plankton



© Clemens Wirth

- http://i.dailymail.co.uk/i/pix/2012/04/10/article-2127311-12866E8D000005DC-501_964x568.jpg

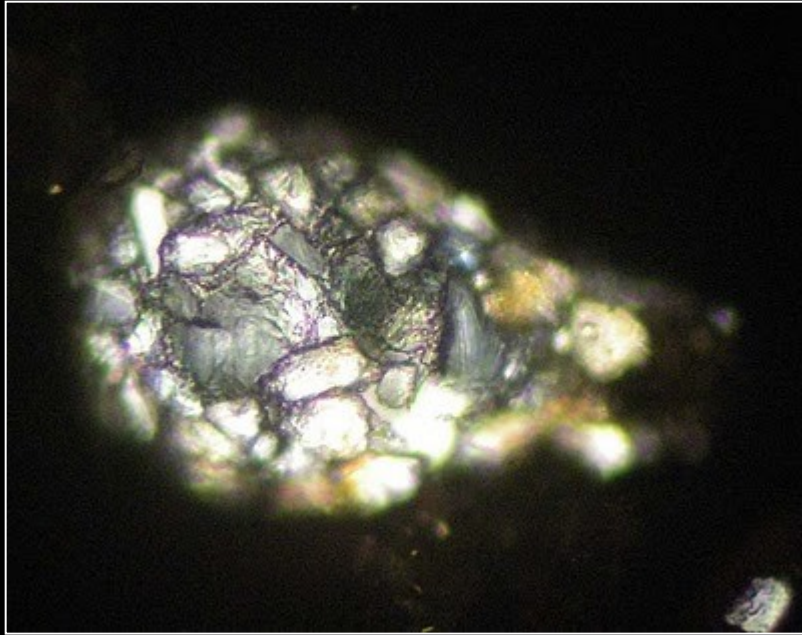
Motýlí sosák
20x



- <http://www.clemson.edu/cafls/jhif/flowchart/files/darkfield.jpg>

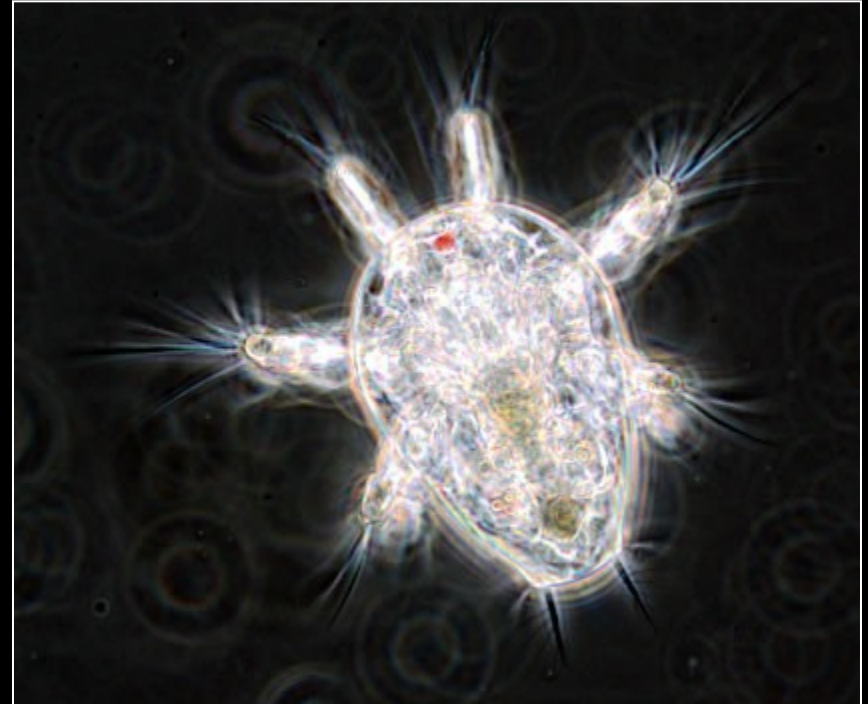
Diffugia (rozlitka)

Amoebozoa - měňavkovci » kmen Tubulinea - lalokonozí »
řád Arcellinida - krytenky

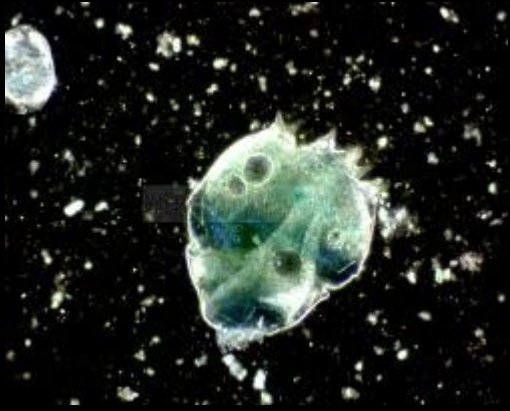


- http://4.bp.blogspot.com/_Ne3bhx2j74s/S4LmgY_a4kl/AAAAAAAAACCE/phf4GfiADo0/s400/diffugia3IMGP2191_edited-1.jpg

Copepoda (klanonožci) - larva

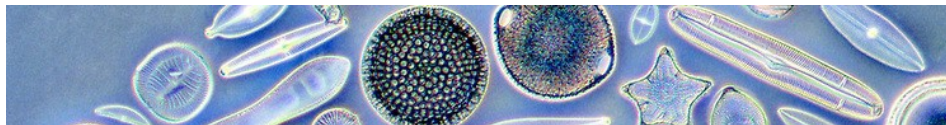


- <http://blogs.answersingenesis.org/blogs/creation-museum/files/2011/12/december5.jpg>

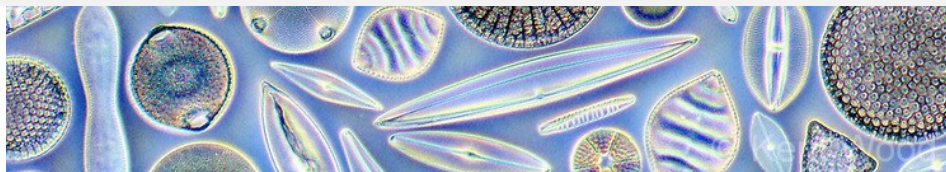


Fázový kontrast

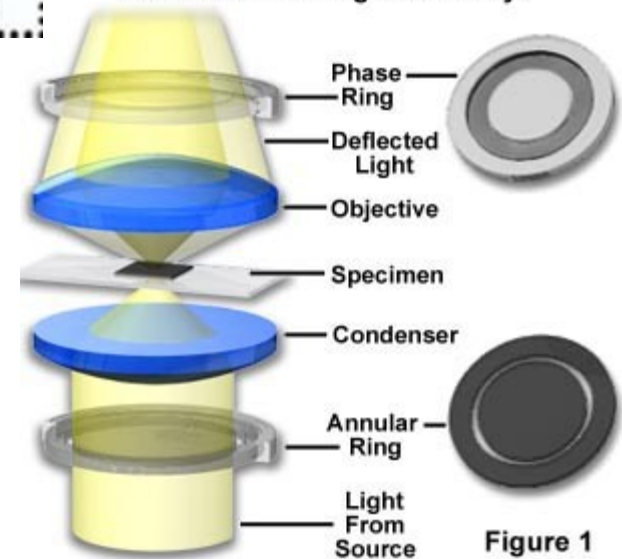
- **Frits Zernike** (1888 – 1966)
- nizozemský fyzik; 1935
- **1953 Nobelova cena** za fyziku za vypracování metody fázového kontrastu a za konstrukci fázově kontrastního mikroskopu.



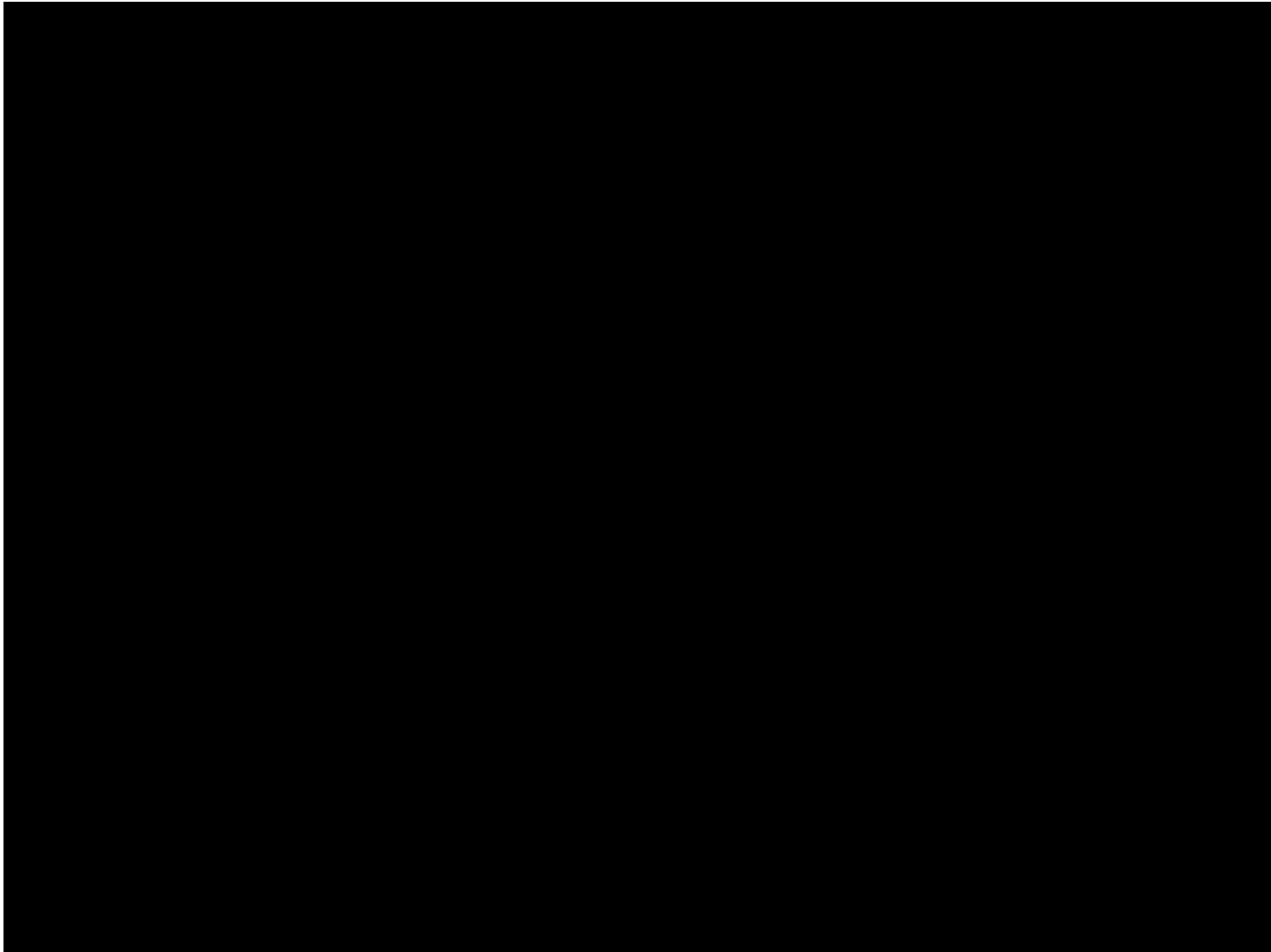
Podstatou je převedení rozdílů v posunu fáze světla procházejícího různými částmi objektu, které nevidíme, na rozdíly v intenzitě světla, kterou můžeme pozorovat.



Phase Contrast Light Pathways



- 1948 – 1955 obdobím největšího rozkvětu aplikací fázově – kontrastní mikroskopie

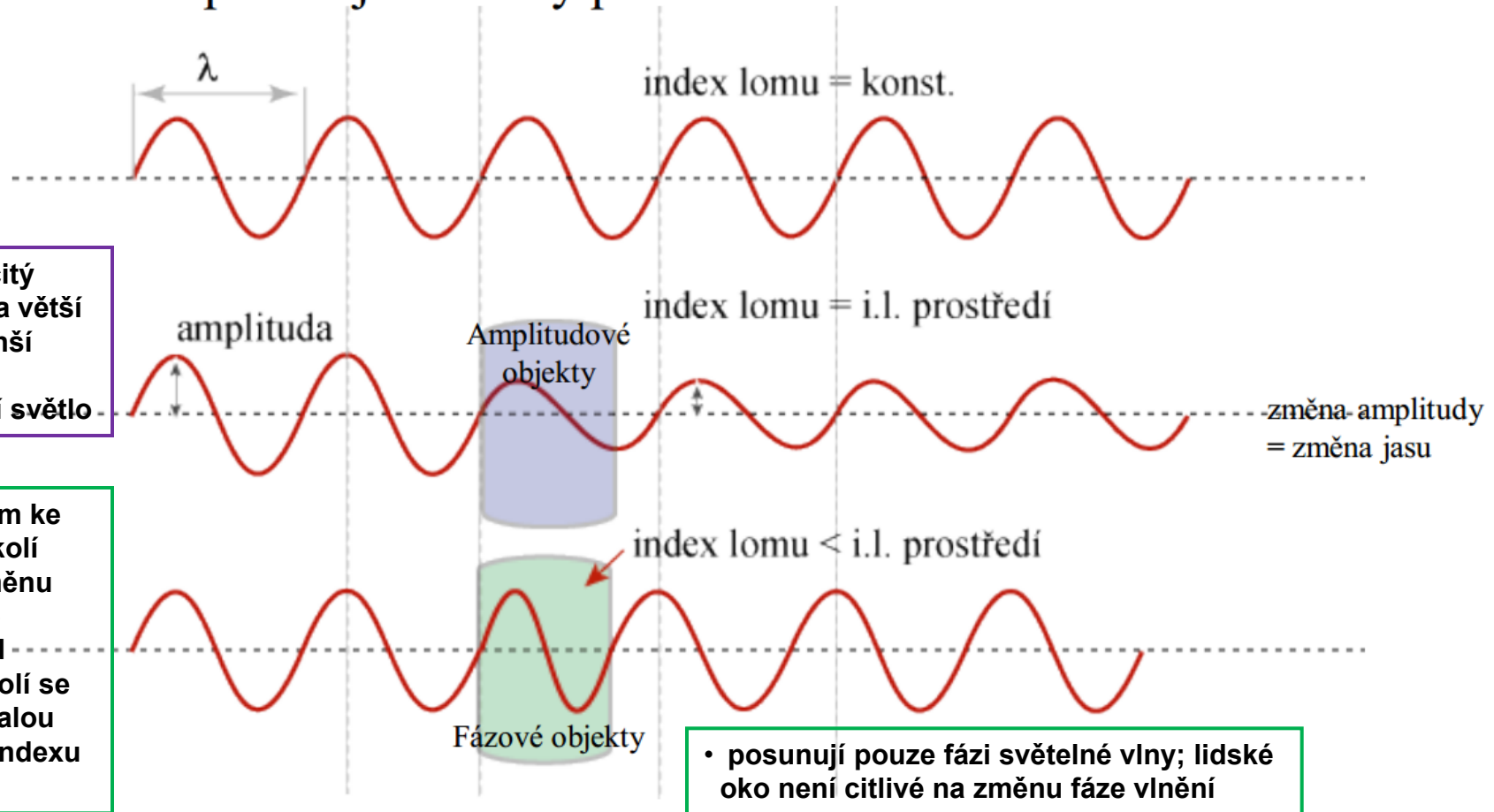


_Zernike_demonstrates_the_Phase_Contrast_microscope_that_earned_...HD_Stock

Proč fázový kontrast?

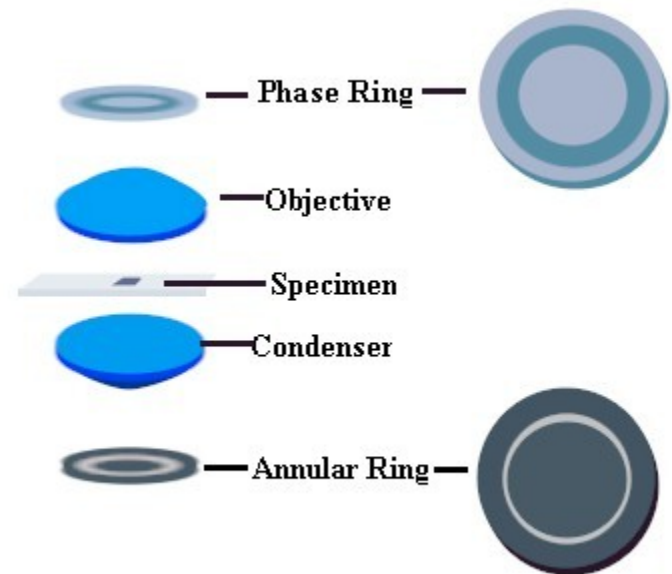
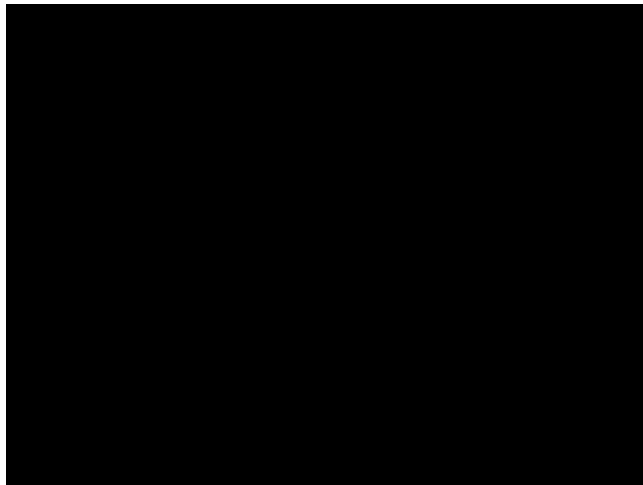
objekty:

- způsobující změnu amplitudy
- způsobující fázový posun



Pozorování fázových objektů

- obarvíme je – tj. převedeme na objekty amplitudové (vyžaduje usmrcení buněk a je možný vznik artefaktů)
- pro pozorování živých buněk použijeme zařízení pro fázový kontrast (transformaci fázové změny na změnu amplitudy)



v ohniskové rovině kondenzoru se nachází **prstencovitá clona** a v ohniskové rovině objektivu **fázová deska s fázovým prstencem**.

Princip fázového kontrastu

- přeměna fázové změny vlnění (vzniklé po průchodu fázovým objektem) na změny intenzity světla

C) v ohniskové rovině objektivu se nachází fázová deska s fázovým prstencem

posune fázi světla, které prošlo beze změny preparátem v místě bez objektu (osvětlení pozadí objektu) o $\frac{1}{4}$ vlnové délky

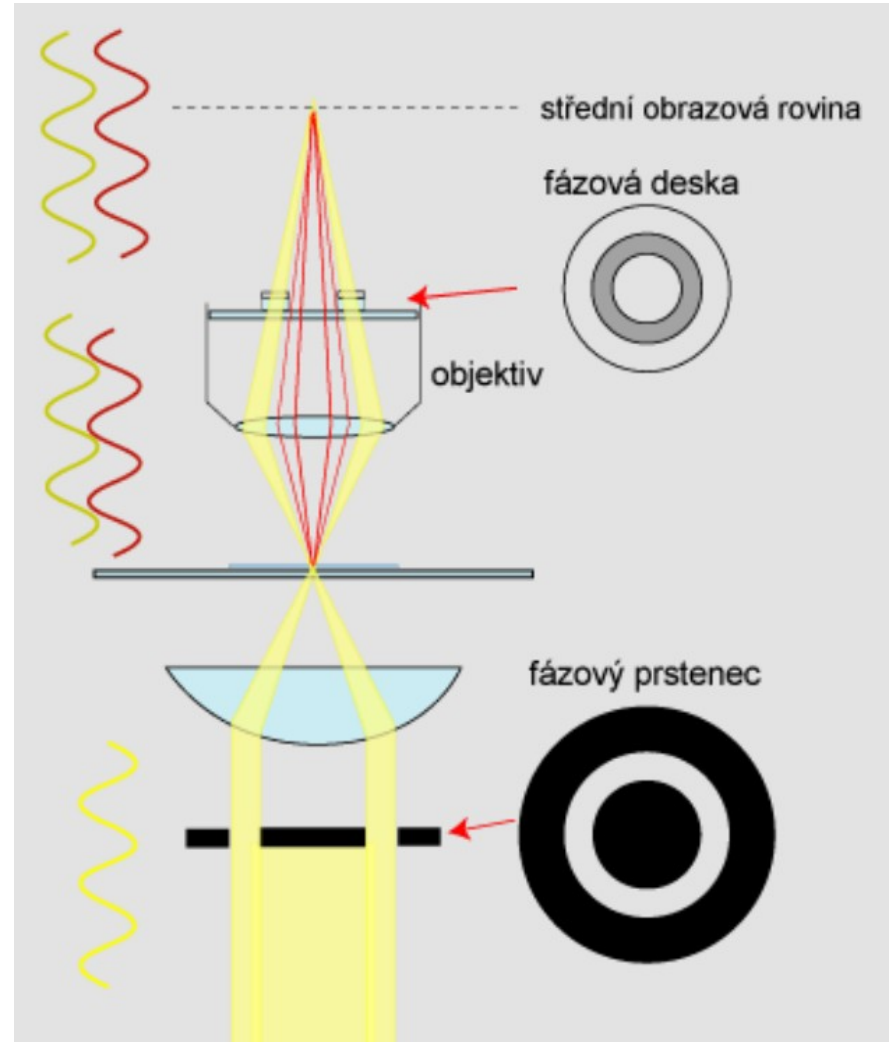
B) Dvě optické dráhy:

- 1) osvětlující objekt a beze změny procházející preparátem v místě bez objektu (na obrázku žlutá barva)
- 2) procházející objektem, jehož dráha a fáze je ovlivněna právě průchodem objektem

A) v ohniskové rovině kondenzoru se nachází prstencovitá clona

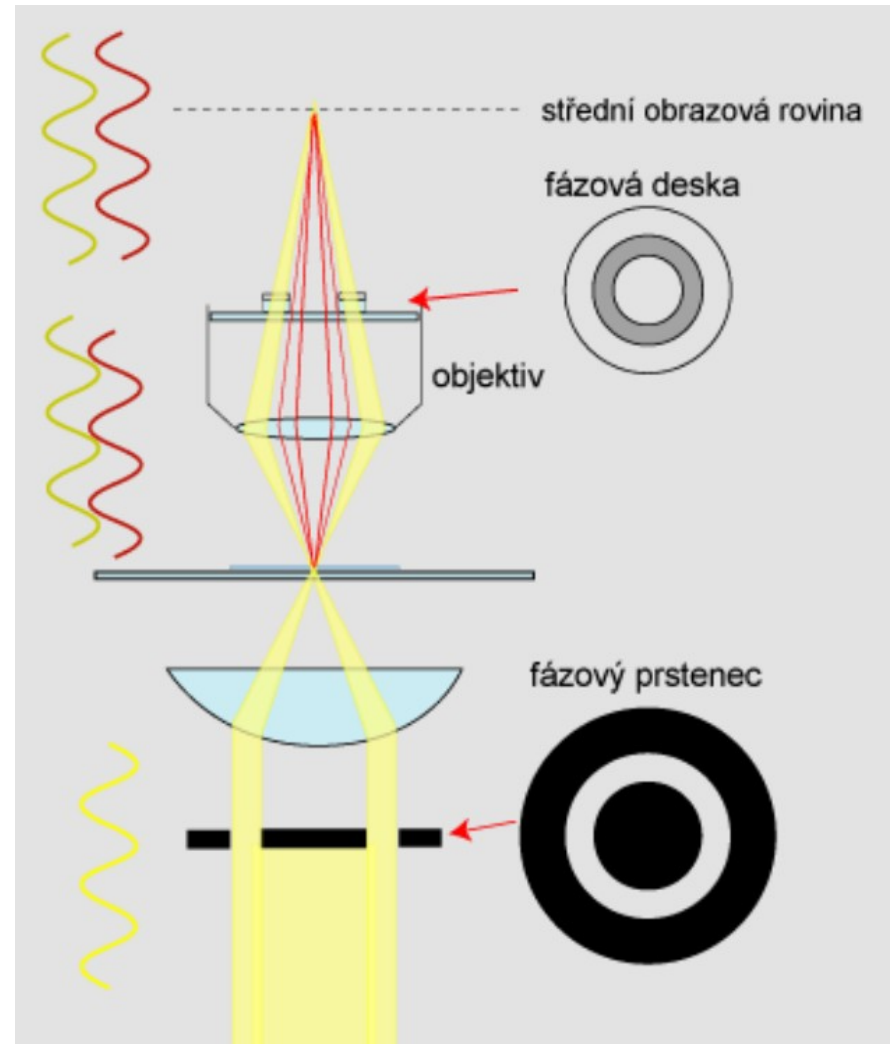
vynezuje dutý kužel světla dopadající na objekt

D) následuje interference paprsků těchto dvou optických drah ve střední obrazové rovině



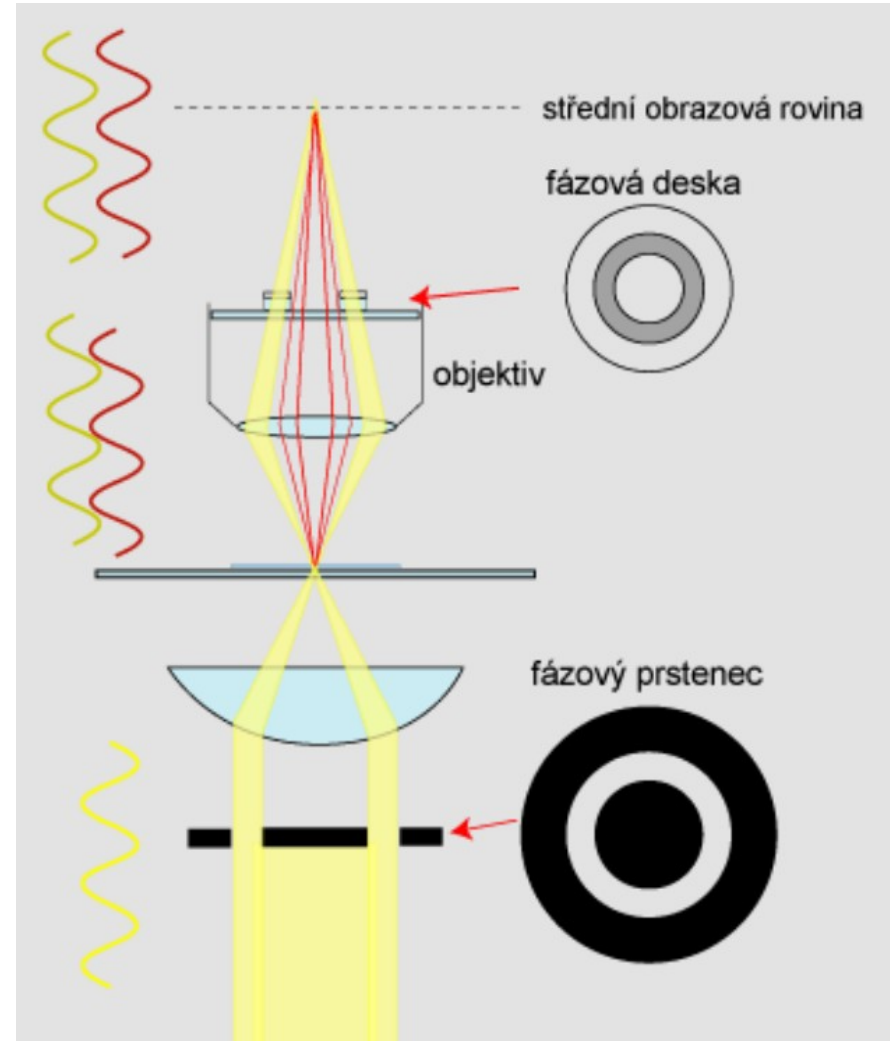
Oddělení přímého a difrakčního vlnění

- nejvýraznější fázový kontrast vzniká, pokud je fázový rozdíl obou vlnění roven $\frac{1}{4}$ vlnové délky



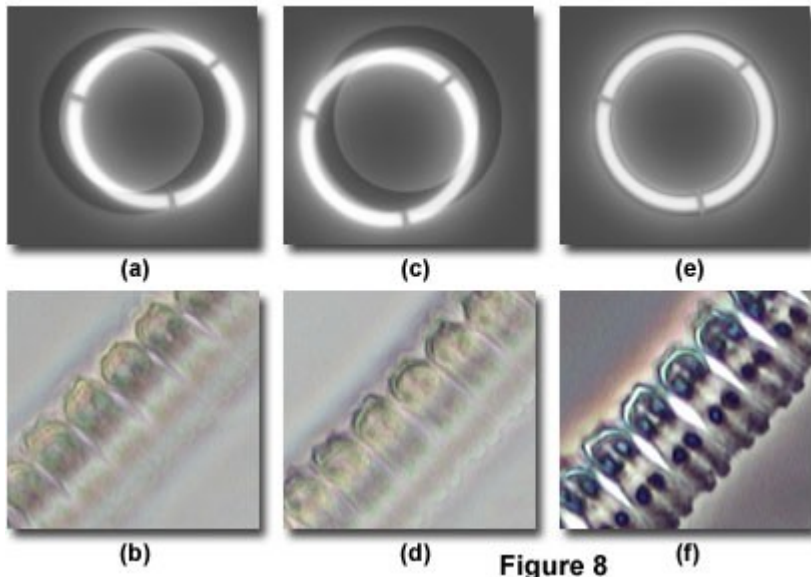
Princip fázového kontrastu

- Obraz otvoru prstencovité clony kondenzorové se tvoří po přechodu světla přes kondenzor a objektiv na fázovém prstenci fázové desky



- Fázový prsteneček musí pokrývat zcela obraz štěrbin.
- K přesnému nastavení se používá centračních šroubů, kterými posunujeme destičku s prstencovitou clonou (my osobně teď neděláme): **Seřízení – splynutí obrazu clonky s fázovou destičkou**
- <http://www.olympusmicro.com/primer/java/phasecontrast/phasemicroscope/index.html>

Phase Contrast Optical System Alignment



Phase Contrast Optical Components



- Vložené prstence jsou obvykle příslušné k objektivu.
- Pro fázový kontrast označeny: Ph1, Ph-2 atd., tyto údaje jsou též na fázových objektivěch.

Objective Apertures and Phase Contrast Optics

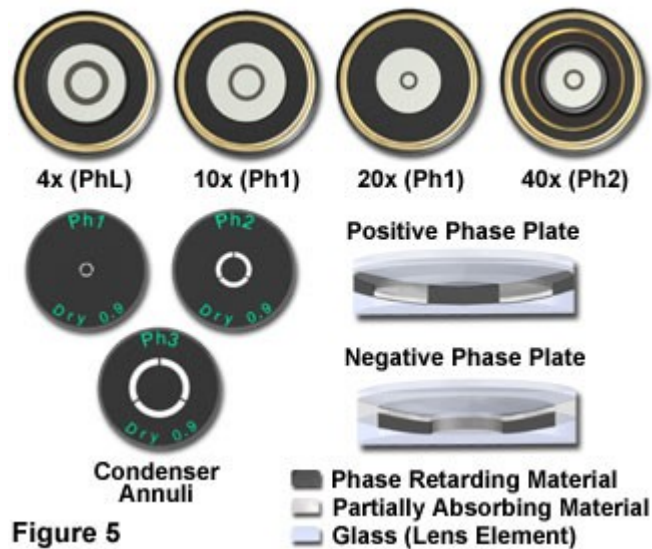


Figure 5



Phase Contrast Objective

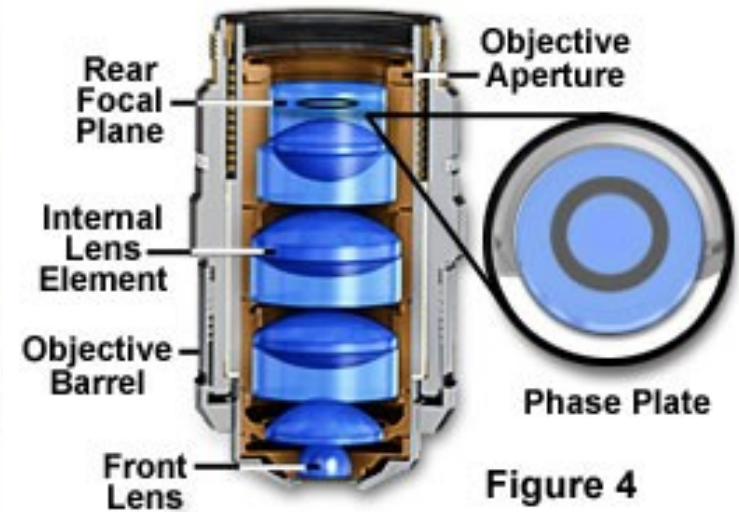


Figure 4

Universal Condenser Turret Configuration

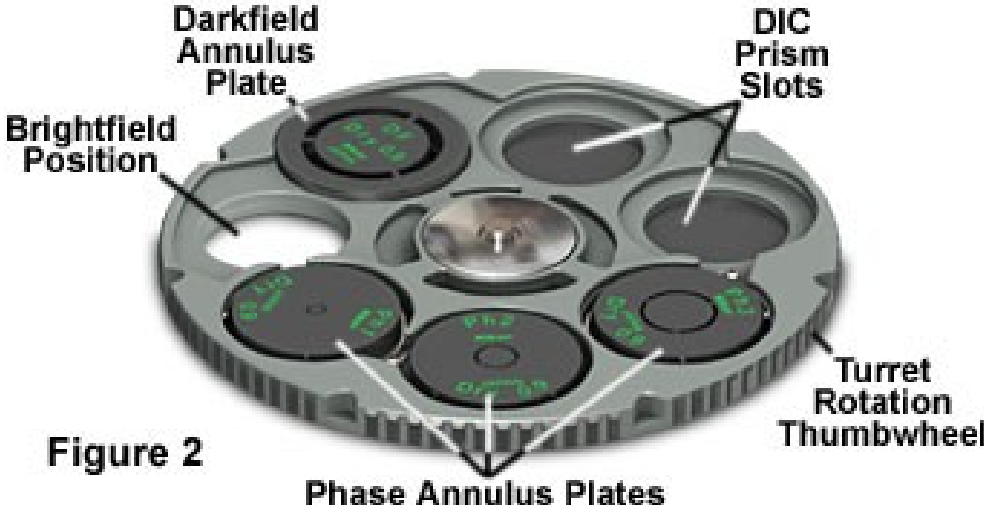


Figure 2

Phase Condenser Annulus Plate Alignment

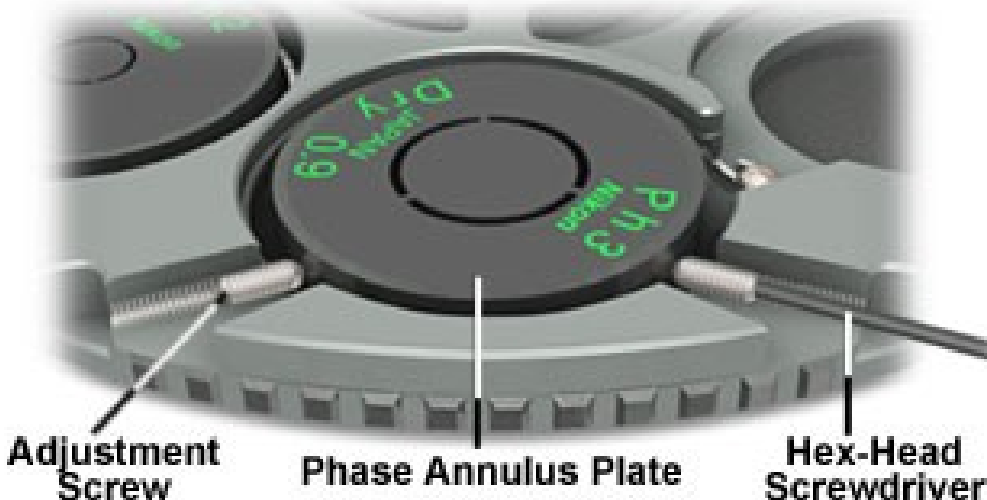


Figure 3

- Kolem objektu vzniká halo efekt



<http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/phase/gallery/images/pcmg2.jpg>

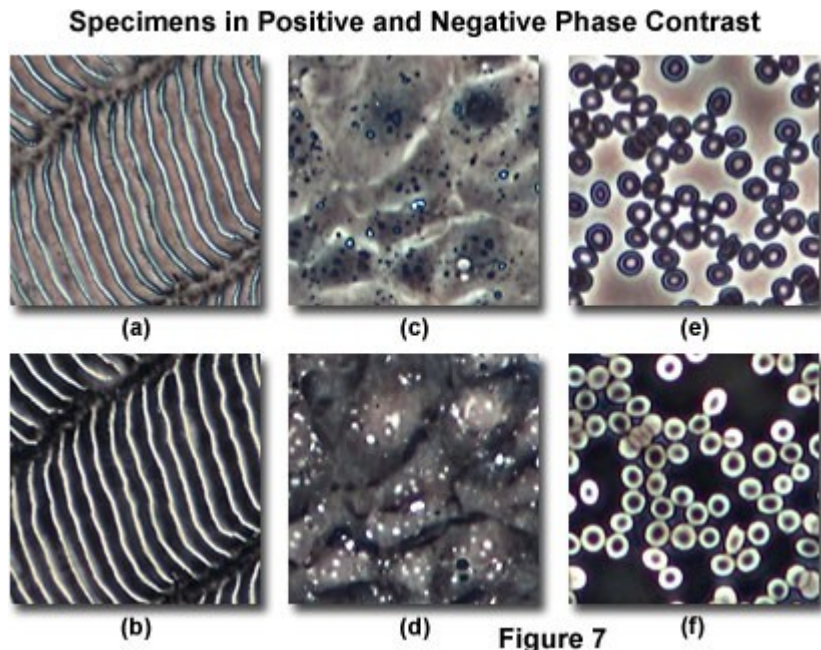


http://www.photomacrography.net/forum/userpix/435_Llyra_100x_PC_NH_1.jpg

Typy fázového kontrastu

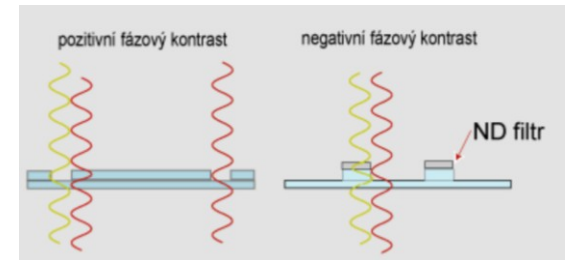
- **fázový kontrast pozitivní**

fázová deska v objektivu posunuje fázi přímého vlnění vzhledem k vlnění difrakčnímu o $+90^\circ$ ($o + 1/4\lambda$)

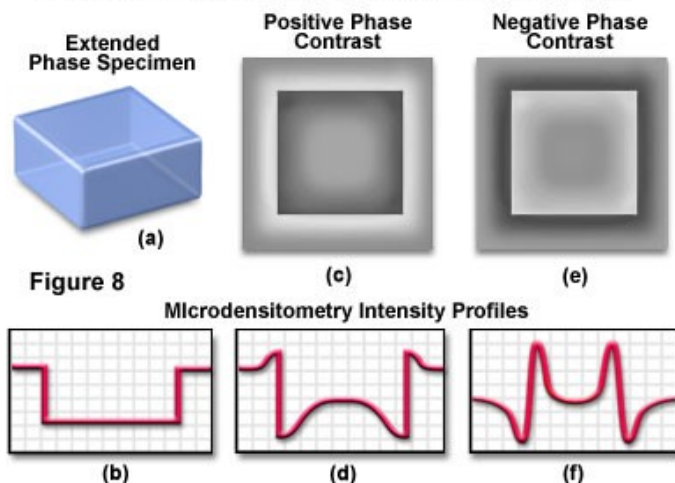


- **fázový kontrast negativní**

fázová deska v objektivu posunuje fázi přímého vlnění vzhledem k vlnění difrakčnímu o -90° ($o - 1/4\lambda$).



Shade-Off in Positive and Negative Phase Contrast



Ukázky fázového kontrastu

Onchocleidus similis

Onchocleidus dispar

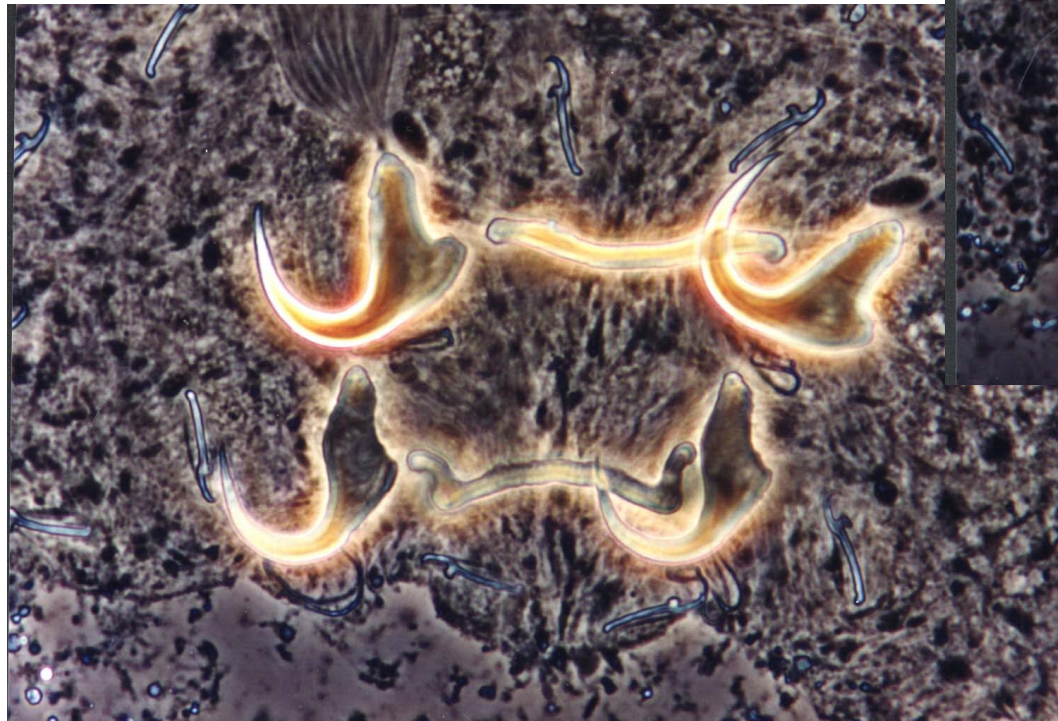


100x10

100x10

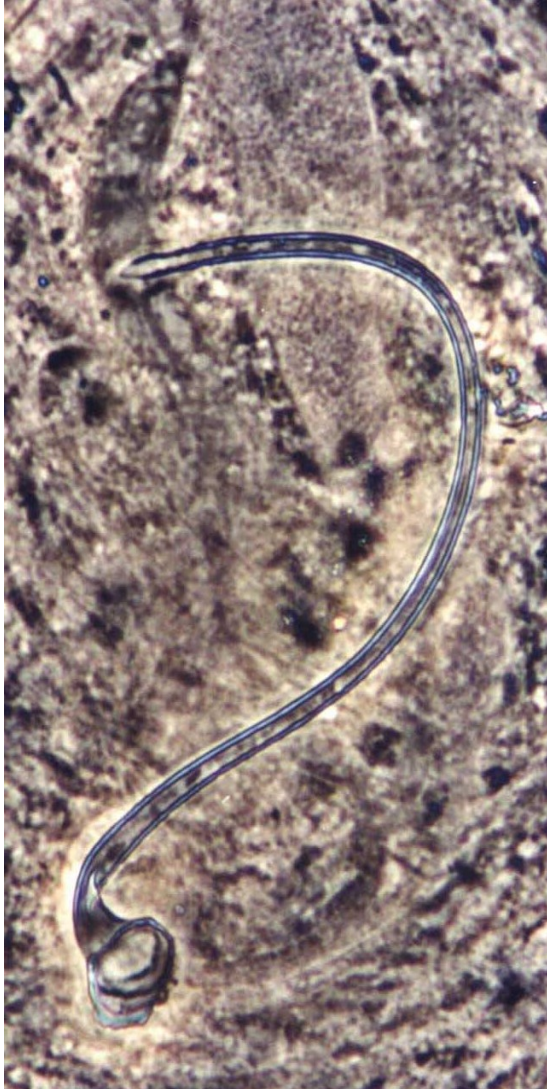
Ukázky fázového kontrastu

Thylacicleidus sp. 2

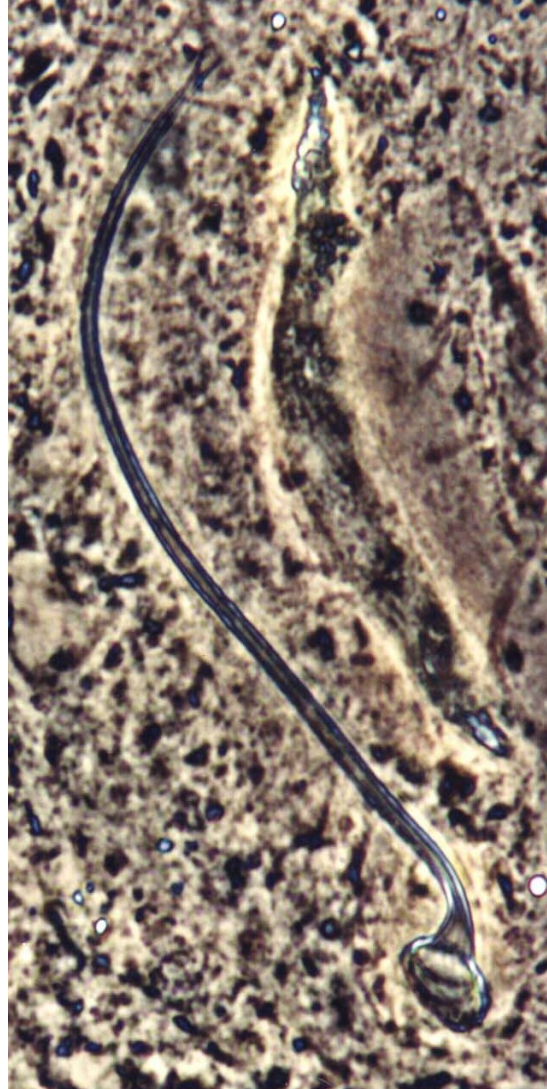


Thylacicleidus serendipitus

*Thylacicleidus
serendipitus*



*Thylacicleidus
sp. 1*

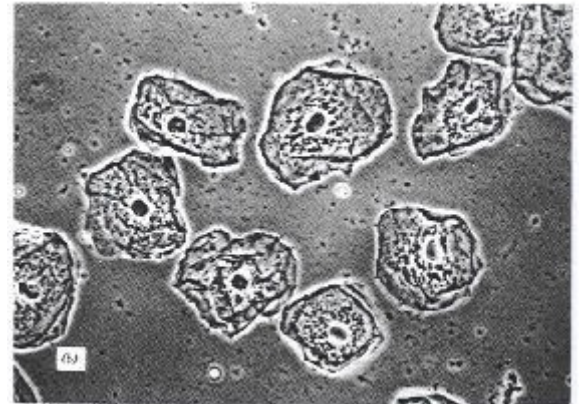
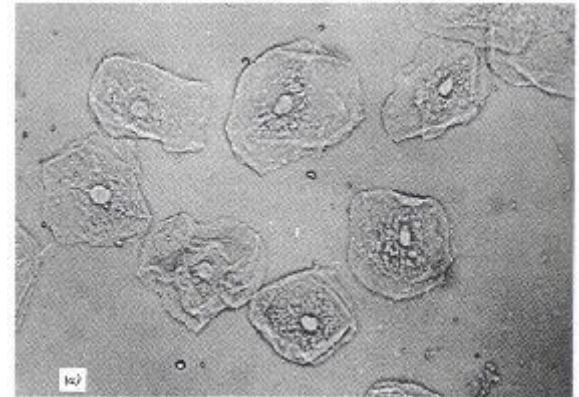
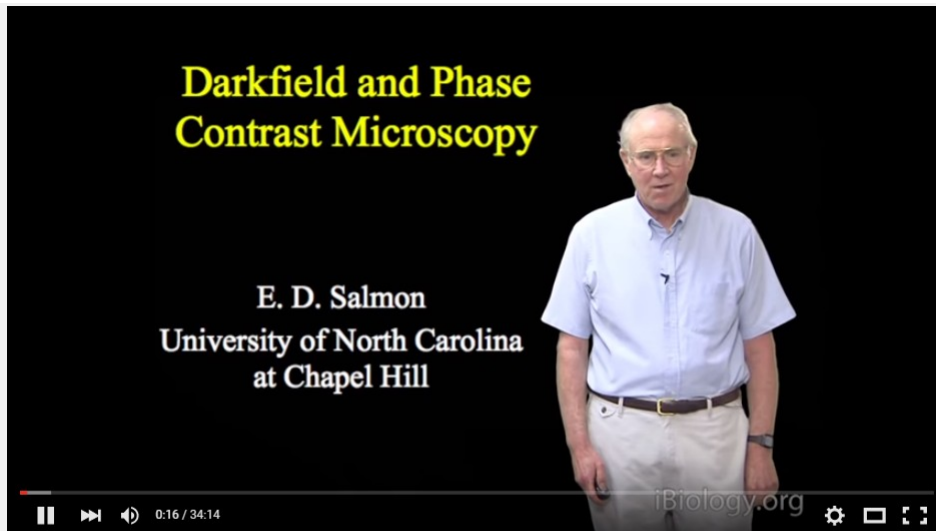


*Thylacicleidus
sp. 2*



- **Další info:**

- <https://www.youtube.com/watch?v=I4ZQm-CAgL8>



https://encrypted-tbn3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQ20z3ZU0iDsLa k6FYRn066GGCVLXU17g20o0fMSb5eOtgOBDe_

Microscopy: Darkfield and Phase Contrast Microscopy (Edward Salmon)



iBioEducation

Odebírat 5 690

11 324

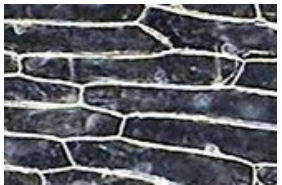
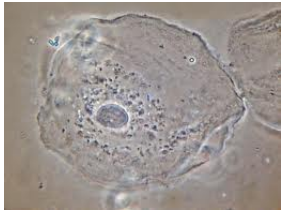
+ Přidat do Sdílet ... Další

23 0

úkoly

- Doplňte si protokol
- Pozorujte (a zdokumentujte) ve fázovém kontrastu a normálním světlém poli:

- Epitelovou buňku vnitřní strany tváře
- Epitel cibule
- Háčky monogeneí
- Kvasinky



http://www.wikiwand.com/en/Schizosaccharomyces_pombe

