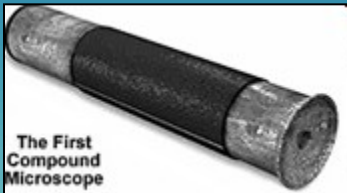


Mikroskopické techniky

„The role of the infinitely small in nature is infinitely large“

Louis Pasteur



Janssenovi Z 9 x,
~1595



Replika mikroskopu
Antony van Leeuwenhoeka
Z 50 – 275 x
17.století



"Objekt, který má reálně 1 milimetr, by měl při zvětšení tímto mikroskopem 700 metrů,"

Ústav molekulární genetiky AV ČR
elektronový mikroskop Tecnai T20

Buňka

minimální jednotka strukturní, funkční a reprodukční

- **Vývoj buněčné teorie**

rozvoj mikroskopie (17. století až současnost)

Jan Evangelista Purkyně (1787 –1869) mezi prvními na světě přisoudil buňkám jejich stěžejní význam pro život

Matthias.J. Schleiden (1804-81) a Theodor Schwann (1810-82)

1839 buněčná teorie: Vývoj živé přírody se opírá o růst a tvoření buněk, buňky rostlin a živočichů se shodují tvarem a funkcí. Buňka je základní, stavební a funkční jednotkou živých organismů.

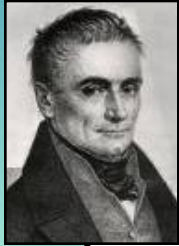
Rudolf Virchow (1821-1902)

„nové buňky vznikají jen dělením z již existujících“

L. Pasteur (1822-85)

fermentace, popřel teorii spontánního tvoření buněk

rozvoj biochemie 1.pol.20.stol **1953** struktura DNA (Watson, Crick, Franklinová)



J.E.Purkyně

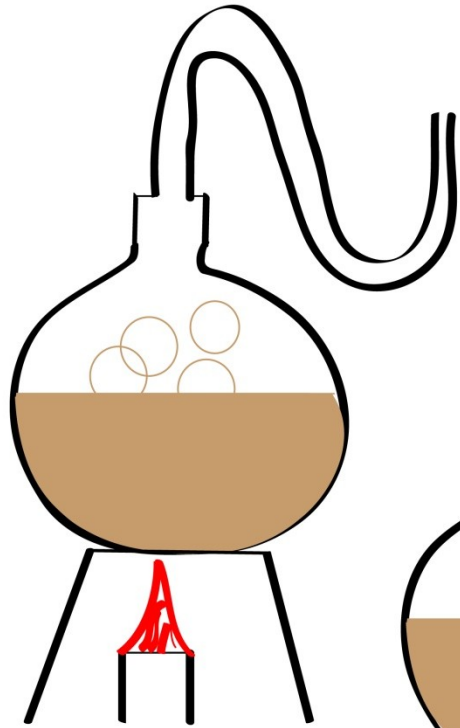


Louis Pasteur

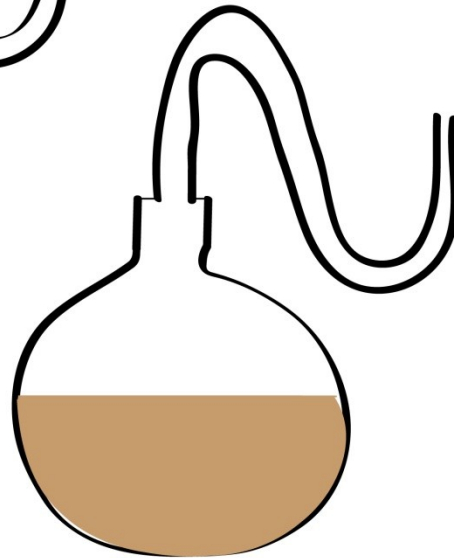


R.Virchow

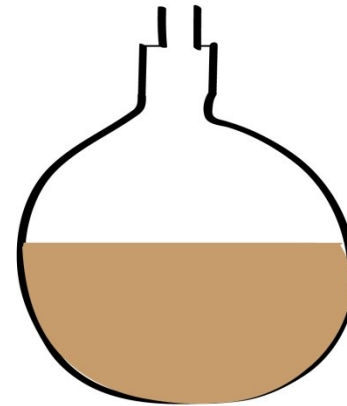
Pasteur's Test of Spontaneous Generation



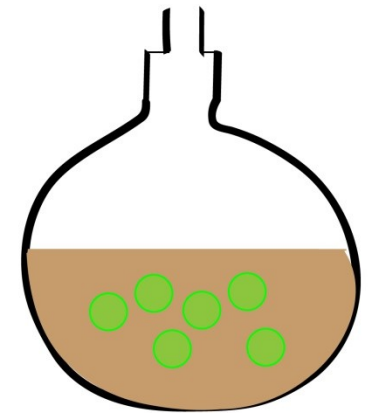
Broth is Boiled



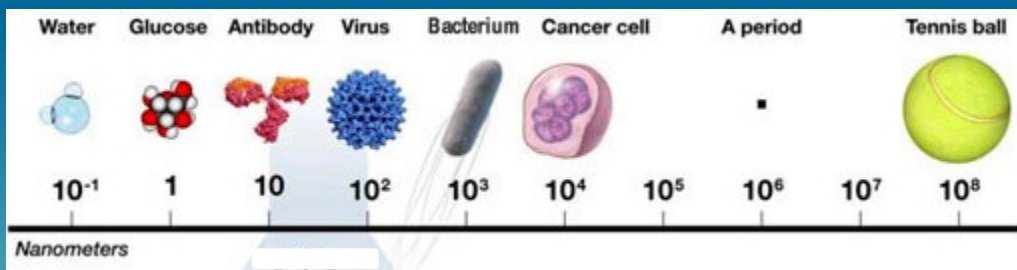
Broth Remains Free of Microorganisms



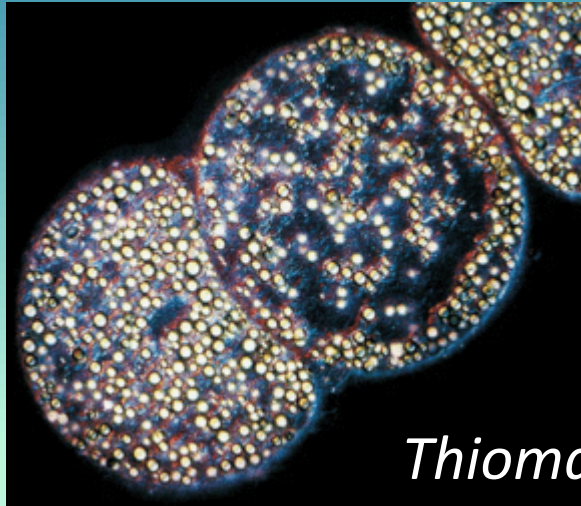
Curved Neck is Removed



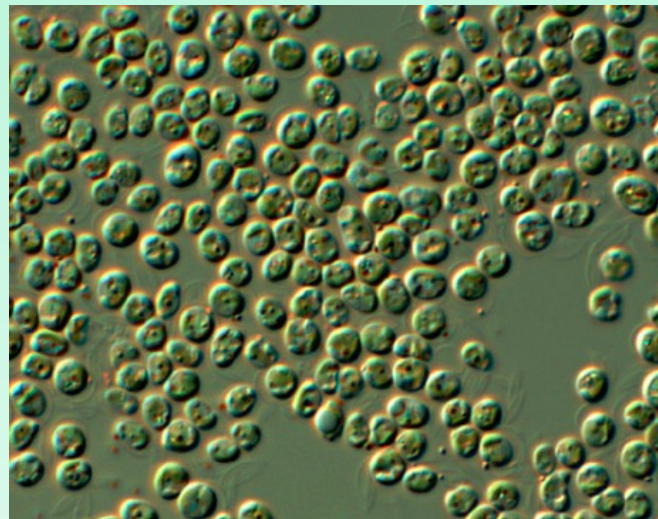
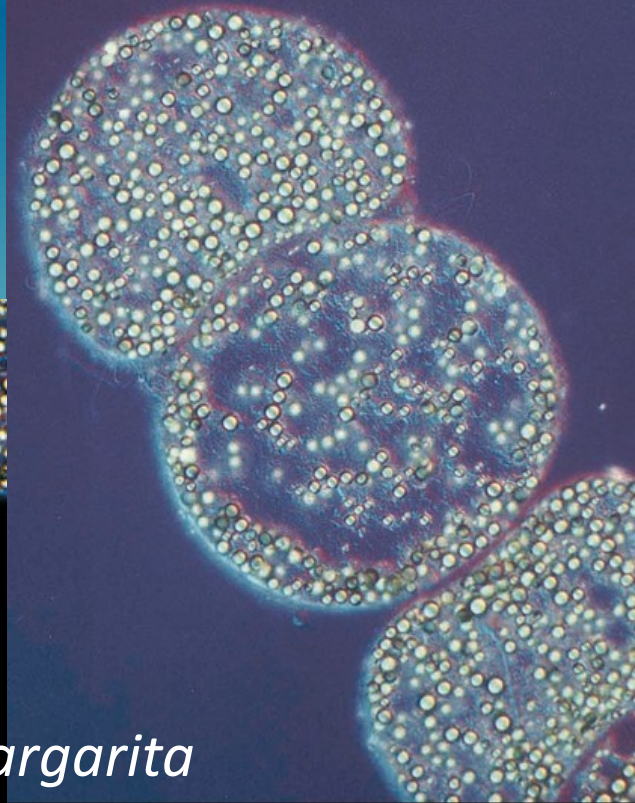
Microorganisms Grow in Broth



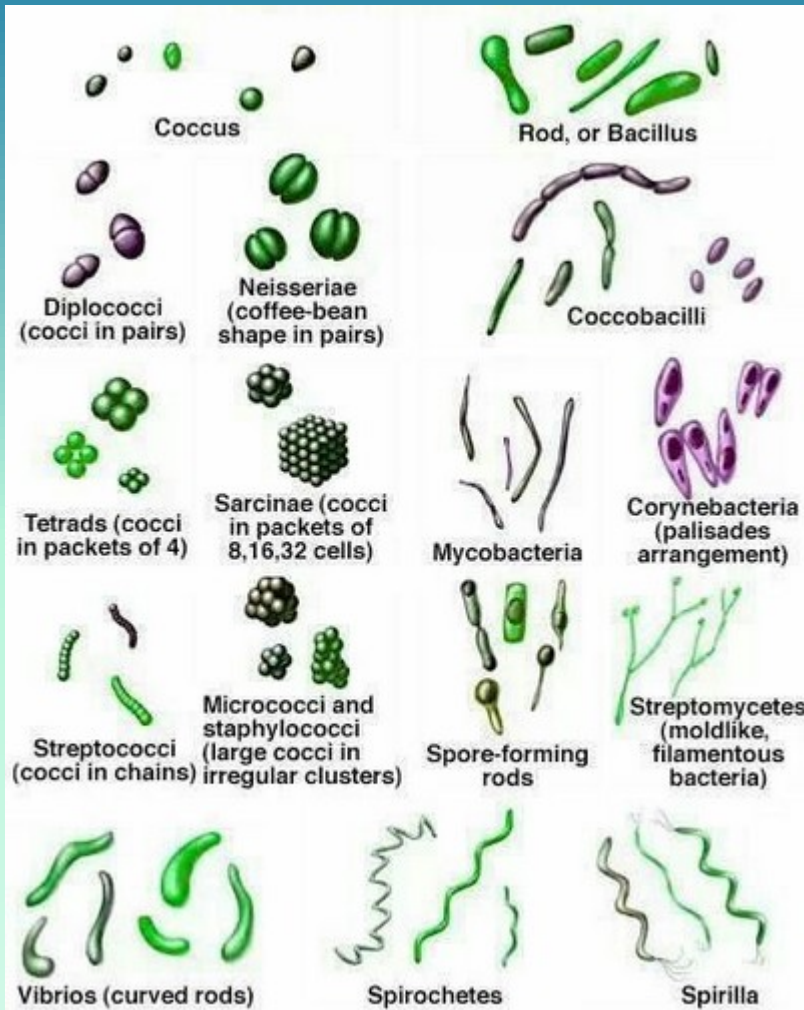
Mycoplasma

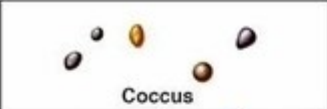






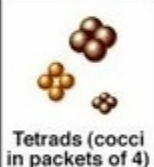




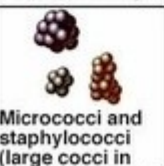

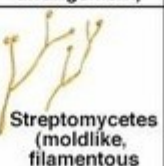


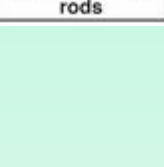
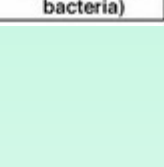


Thiomargarita



Nanochlorum



 Coccus	 Rod, or Bacillus	 Curved forms: Spirillum/Spirochete	
 Diplococci (cocci in pairs)	 Neisseriae (coffee-bean shape in pairs)	 Coccobacilli	 Vibrios (curved rods)
 Tetrads (cocci in packets of 4)	 Sarcinae (cocci in packets of 8,16,32 cells)	 Mycobacteria	 Corynebacteria (palisades arrangement)
 Streptococci (cocci in chains)	 Micrococci and staphylococci (large cocci in irregular clusters)	 Spore-forming rods	 Streptomyces (moldlike, filamentous bacteria)
 Spirilla	 Spirilla	 Spirilla	 Spirilla

Mikroskopie



Lidské oko má rozlišovací schopnost 0,1 mm.

Pro mikroskopii lze využít jakékoli vlnění s vlnovou délkou kratší než jsou rozměry objektu.



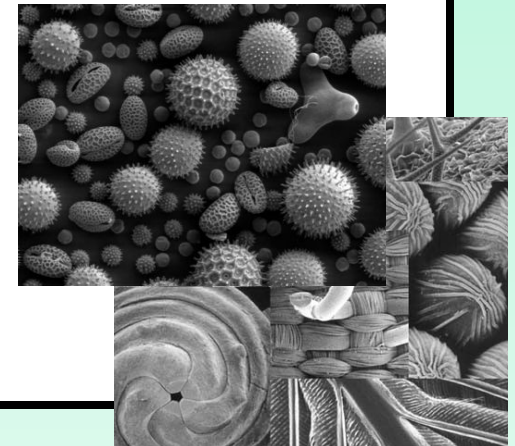
- **Pojmy a schémata mikroskopie**
- **A) Optická** - zobrazení struktur lišících se vzájemně absorbcí viditelného světla

1) Varianty optického mikroskopu

2) Speciální optické mikroskopy

zobrazení struktur lišících se vzájemně
např. absorbcí UV i IR světla

- **B) Elektronová**
- **C) Akustická**



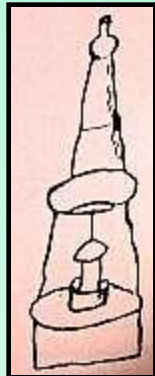
Historie mikroskopie



Tubulární mikroskop
Bratři Janssenové, 1595



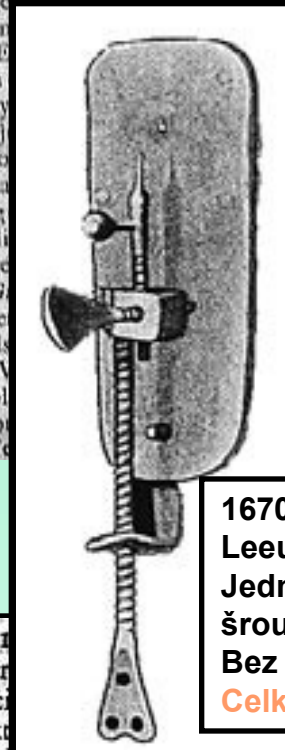
Robert Hook 1665
Již olejová lampa



Nejstarší nákres
složeného
mikroskopu,
Isaac Beekman,
Middelburg, 1625

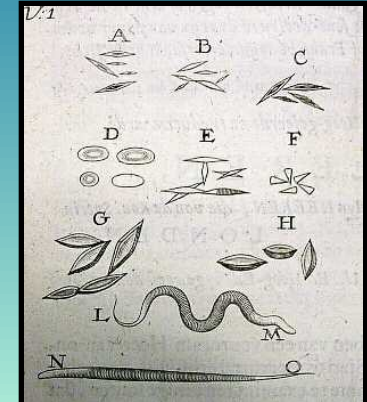


1595 - Zachariáš a Jan Janssenovi - 1. mikroskop



1670 Antony van
Leeuwenhoek
Jednoduché, zaostřovací
šroub, držák.
Bez světel.

Celkem 419 mikroskopů



Antony van Leeuwenhoek



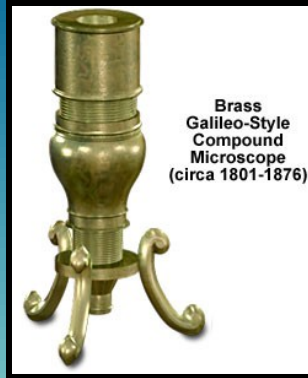
John Yarwell
Compound
Monocular
Microscope
(circa late 1600s)



Cuff's Microscope
(circa mid 1700s)



John Marshall
Compound
English
Microscope
(circa 1720)



Brass
Galileo-Style
Compound
Microscope
(circa 1801-1876)



Early Ross
Compound Microscope
(circa 1831)



Oberhauser's
Drum
Microscope
(circa 1850)



Spencer
Compound
Binocular
Microscope
(circa 1932)



Carl Zeiss 1886
Složený monokulární mikroskop
Van Leeuwenhoekovy „Listy“



„Carl Zeiss“
binokulární mikroskop (design 2002)

Kterou mikroskopickou techniku použít?

- Její dostupnost
- Záleží na mikroskopované struktuře
- Tolerance k artefaktům

Př: EM – tři hlavní skupinky preparátů

mesozomy, filamenta, nukleoid

- dehydratace + barvení – ovlivňují morfologii
struktur

- kryoelektronová mikroskopie – pozorování
hydratovaných zmražených buněk

Optická (světelná) mikroskopie

Max. zvětšení 1500 X, max. rozlišení 200 nm

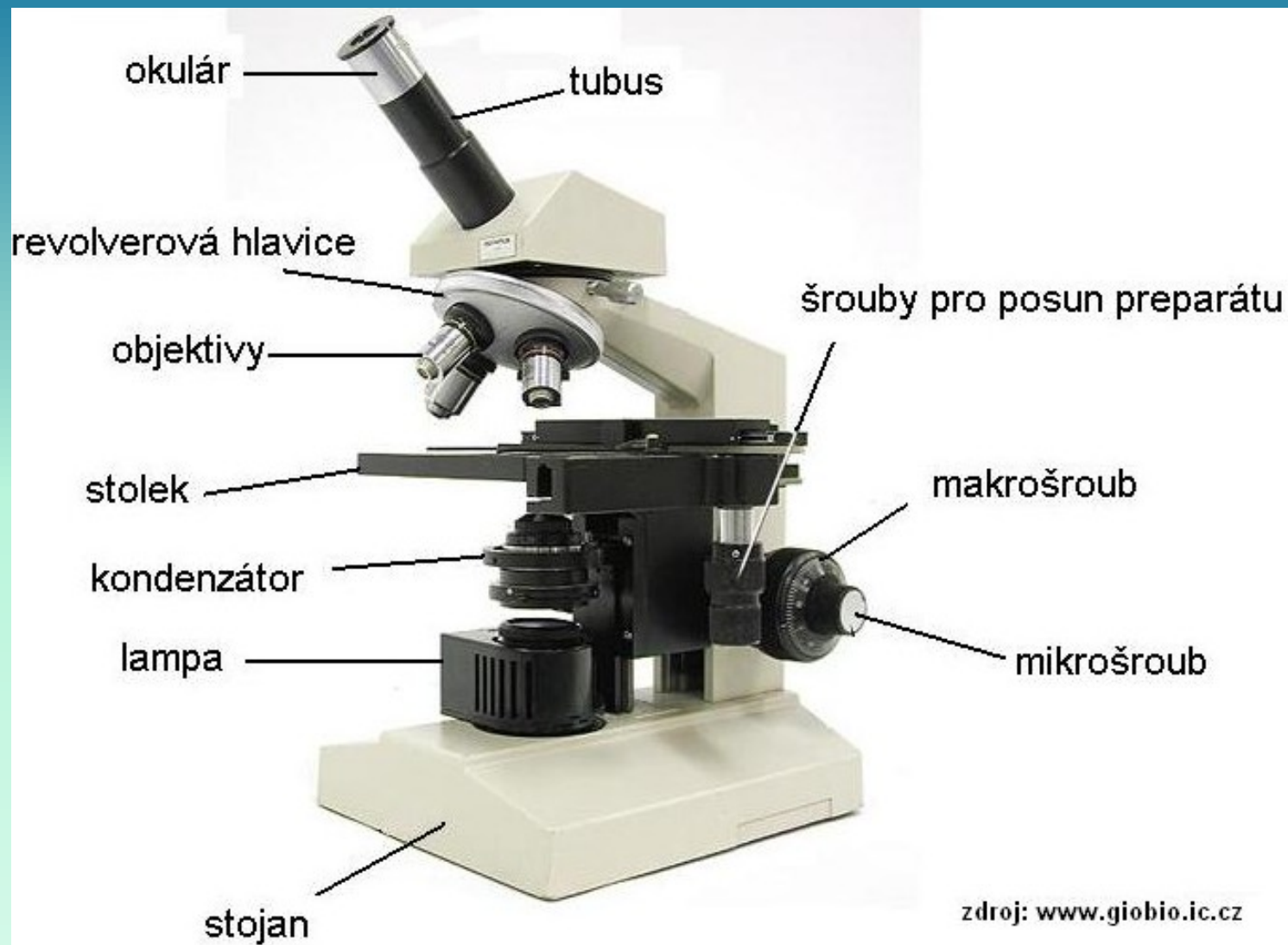
Stavba světelného mikroskopu

- - mechanické součásti - stativ, noha, tubus, revolverový měnič objektivů, stolek, makro- a mikrošroub
- - optika mikroskopu (objektiv a okulár) – kombinace čoček, korekce vad
- - osvětlovací zařízení - světlo prochází objektem
 - zdroj světla: lampa v noze s kolektorovou čočkou
 - kondenzor – ze 2-3 spojených čoček
 - soustřeďuje světelné paprsky na objekt



Základem mikroskopu jsou čočky, které tvoří **objektiv** a **okulár**. Okuláry a objektivy jsou často výměnné.

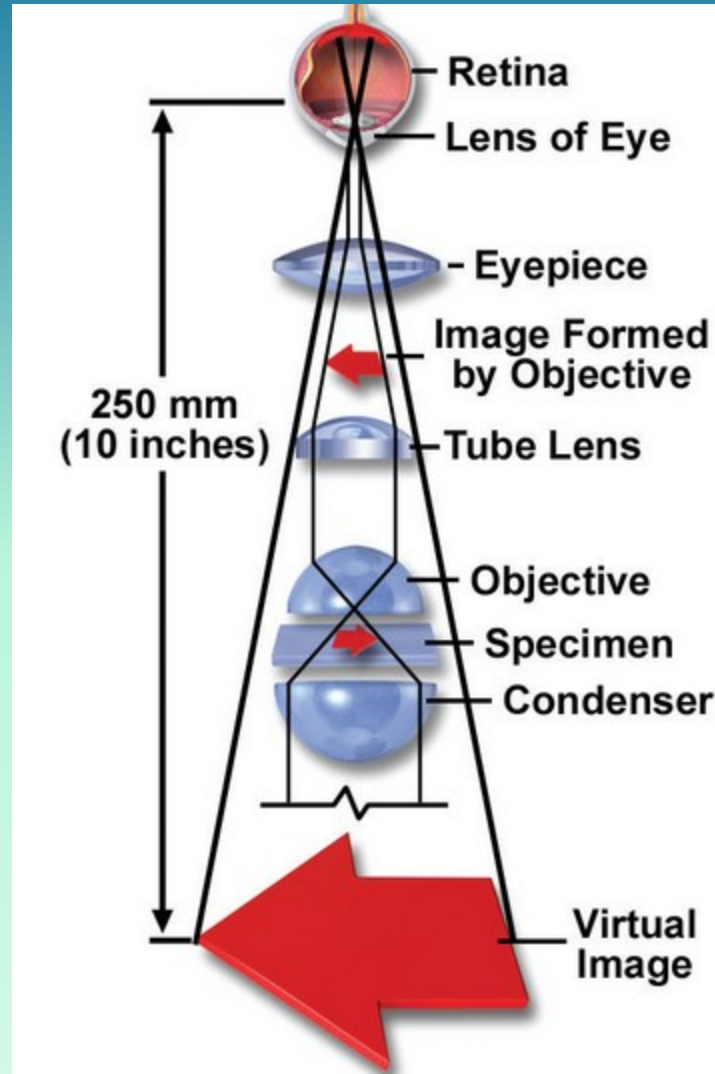
Vzniká neskutečný, zvětšený a převrácený obraz.



Optika mikroskopu

Objektiv - je spojná soustava čoček umístěná blíže pozorovanému předmětu. Objektiv má malou ohniskovou vzdálenost (1,5–20 mm). Předmět umístěný těsně před ohnisko objektivu (F_1) je zobrazen objektivem do vzdálenosti, která je větší než dvojnásobná ohnisková vzdálenost objektivu. Tento obraz předmětu je převrácený, skutečný a zvětšený. Obraz může být zvětšen až 150×.

Okulár - nachází se blíže oku. Je to spojná soustava čoček, která je nastavena tak, aby sloužila jako lupa. Obraz vytvořený objektivem je promítán mezi okulár a jeho ohnisko (F_2). Soustava čoček tento obraz zvětšuje (až 20×). Ohnisková vzdálenost je 10–50 mm. Nezvětšuje již rozlišovací schopnost mikroskopu. Konečný obraz předmětu je zvětšený, neskutečný a převrácený.



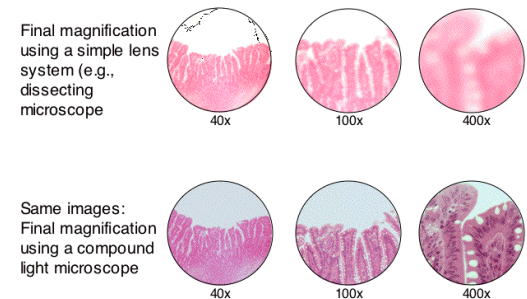
Vzniká neskutečný, zvětšený a převrácený obraz.

Pojmy mikroskopie

Celkové zvětšení Z

- kolikrát je obraz sledovaného objektu větší než objekt
- je dáno součinem zvětšení objektivu a okuláru
- omezeno **rozlišovací mezí**

“Empty” Magnification



BioEd Online

Rozlišení - jak daleko musí být od sebe dva body, aby nesplynuly v jeden

Rozlišovací mez - teorie výpočtu vychází z interference prošlých paprsků (E.K. Abbe)

$$\delta = \lambda / n \cdot \sin \alpha$$

Numerická
apertura

- λ vlnová délka použitého světla
 - čím vyšší, tím vyšší rozlišení
- n index lomu prostředí mezi
čelem objektivu a sklíčkem
- αúhel mezi optickou osou

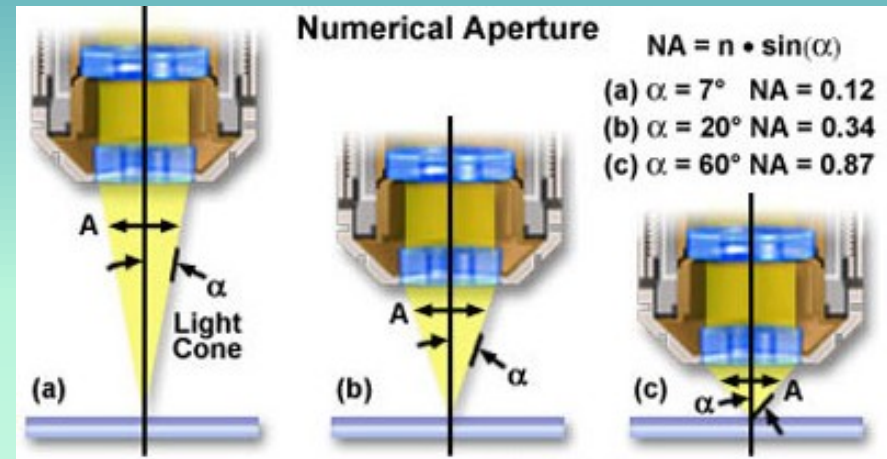
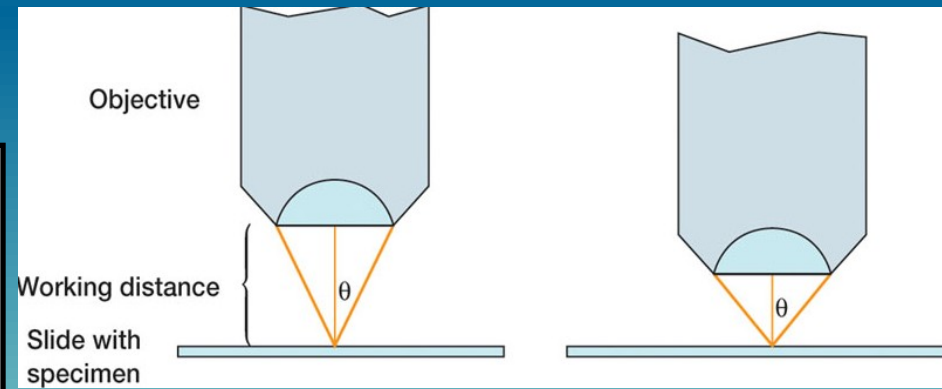


mikroskopu a kuželem paprsků vstupujících z preparátu do objektivu

- **Numerická apertura objektivu**
(NA)
 $n \cdot \sin \alpha$

= součin úhlu dopadu paprsků od objektu do objektivu a indexu lomu

- čím je vyšší, tím vyšší je rozlišovací schopnost objektivu, ale nižší hloubková ostrost



- **Pracovní vzdálenost**

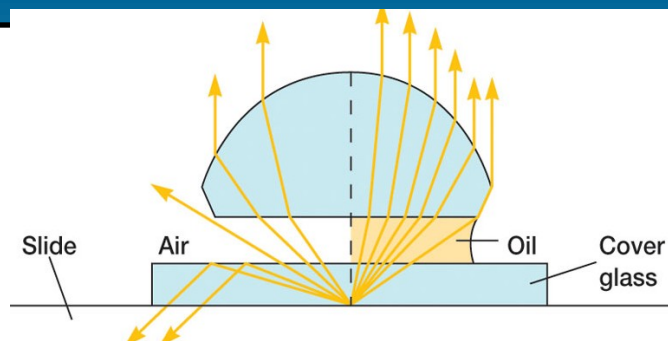
- od povrchu čočky objektivu po krycí sklo

- **Kontrast**

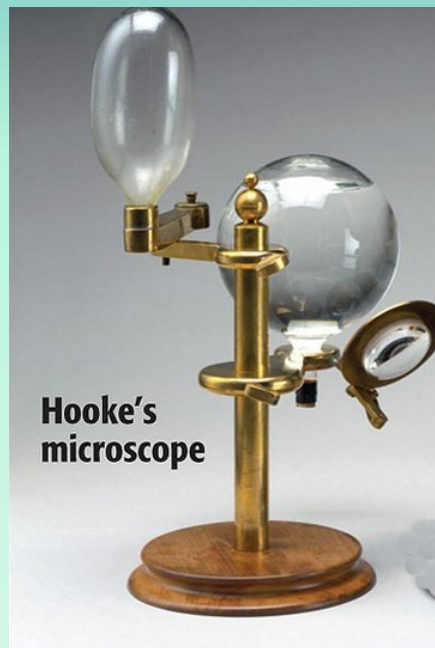
- rozdíl ve vizualizaci objekt / pozadí

Suchý objektiv:

Paprsek vystupující z preparátu pod úhlem α se na rozhraní mezi krycím sklíčkem a vzduchem láme od kolmice a nemůže se již podílet na tvorbě obrazu.



Rozlišovací mez

$$\delta = \lambda / n \cdot \sin \alpha$$


R. Hook - po 1.olejová lampa
Kapalina zvyšuje účinek
světla

menší index lomu
menší numerická apertura
vyšší rozlišovací mez

$n = 1$

NA = max 1

Pro žlutozelené světlo:

$\lambda = 550 \text{ nm}$

NA = 0,95

Rozlišovací mez = $0,6 \mu \text{ m}$

Imerzní objektiv:

Paprsek přecházející ze skla do imerzního prostředí svůj směr nemění a může se podílet na tvorbě obrazu.

Imerzní prostředí - kapalina o stejném n jako krycí sklíčko. Často cedrový olej ($n = 1,52$). Imerze umožňuje korigovat některé opt. vady mikroskopu.

větší index lomu
vyšší úhel α
vyšší numerická apertura
nižší rozlišovací mez

NA = 1,2 – 1,4

Pro žlutozelené světlo:
Rozlišovací mez $0,4 \mu \text{ m}$

Optické vady (aberrace) objektivů:

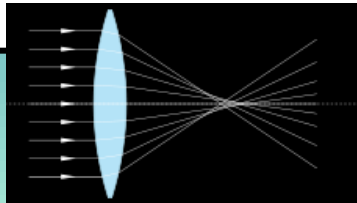
- Otvorová vada (kulová, sférická)

Čočky objektivu nejsou tenké:

různý lom paprsků od optické osy

Bodový předmět zobrazen jako

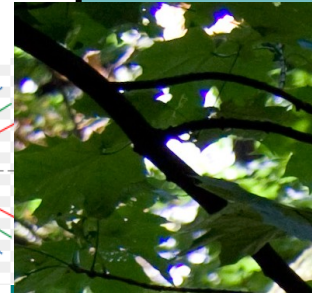
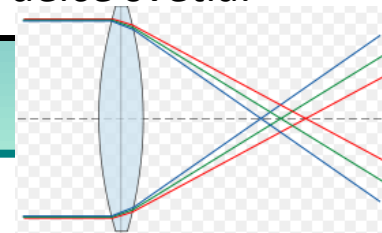
úsečka



- Barevná vada (chromatická)

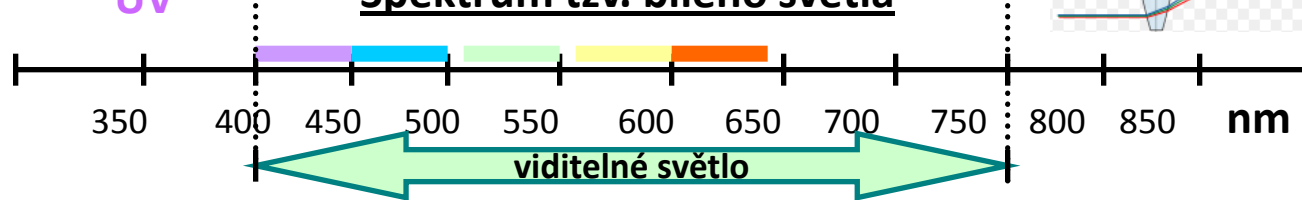
Je způsobena optickou disperzí (závislost indexu lomu na vlnové délce světla).

Bodový předmět zobrazován na různá místa optické osy v závislosti na vlnové délce světla.



UV

Spektrum tzv. bílého světla



Korekce vad

Kombinacemi vhodných spojných či rozptylných čoček z různých materiálů o různém n.

Rozlišení objektivů dle stupně korekce vad:

Achromáty – barevná vada korigována pro 2 barvy světla (červené a modrozelené), otvorová pro žluté

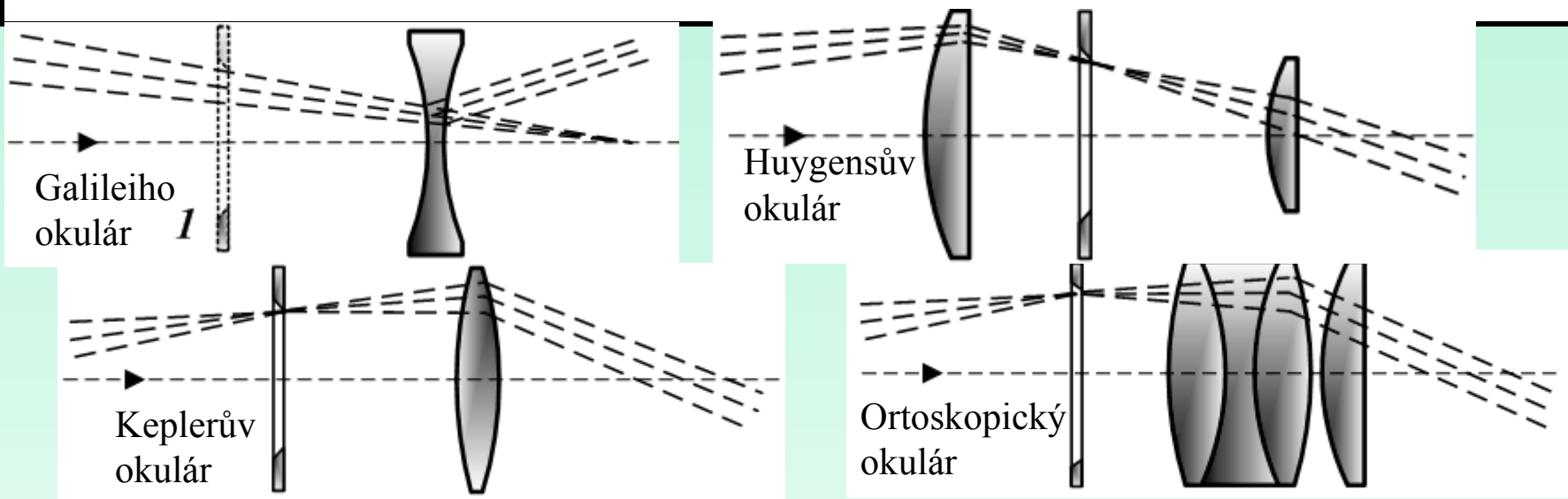
Semiapochromáty – barevná vada korigována pro 2 barvy blíže oběma koncům viditelného světla

Apochromáty – barevná: nejméně pro 3 barvy, otvorová pro 2. Nejdokonalejší objektivy pro bílé světlo

Planachromáty a planapochromáty – korigované i zklenutí zorného pole. Význam pro mikrofotografii.

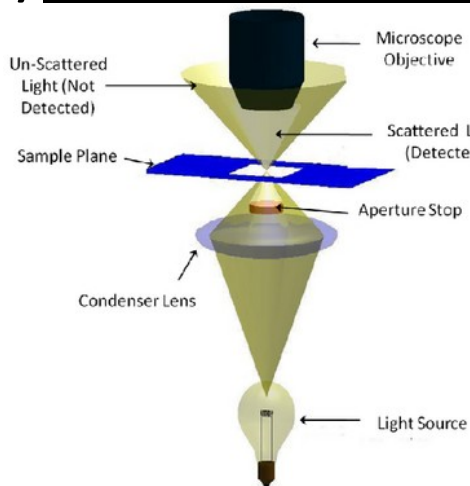
Okuláry – typy dle účelu mikroskopie

- **Huygensův**
- **Ortoskopické** – nezkreslují zorné pole, přesně stejné zvětšení v celém zorném poli. Zejména k měřicím účelům.
- **Kompenzační** – kompenzují zbytkové chromatické vady.
- **Periplanatické** – odstraňují astigmatickou vadu silněji zvětšujících objektivů.
- **Brillovy** – dioptrické
- **Širokoúhlé** – průměr zorného pole až 2,5 cm
- **Projektivy** - mikrofotografie



Varianty optického mikroskopu

- 1) Mikroskopie v temném poli – pro zvýšení kontrastu

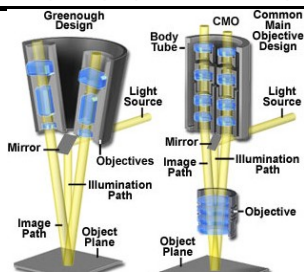


- preparát silný pro průchod paprsků

- pozorování v **odražených paprscích**

- upravený kondenzor osvětluje preparát zespodu (čočka uprostřed zacloněná) – objekt svítí

- 2) Stereomikroskopie – 2 mikroskopy se samostatnými

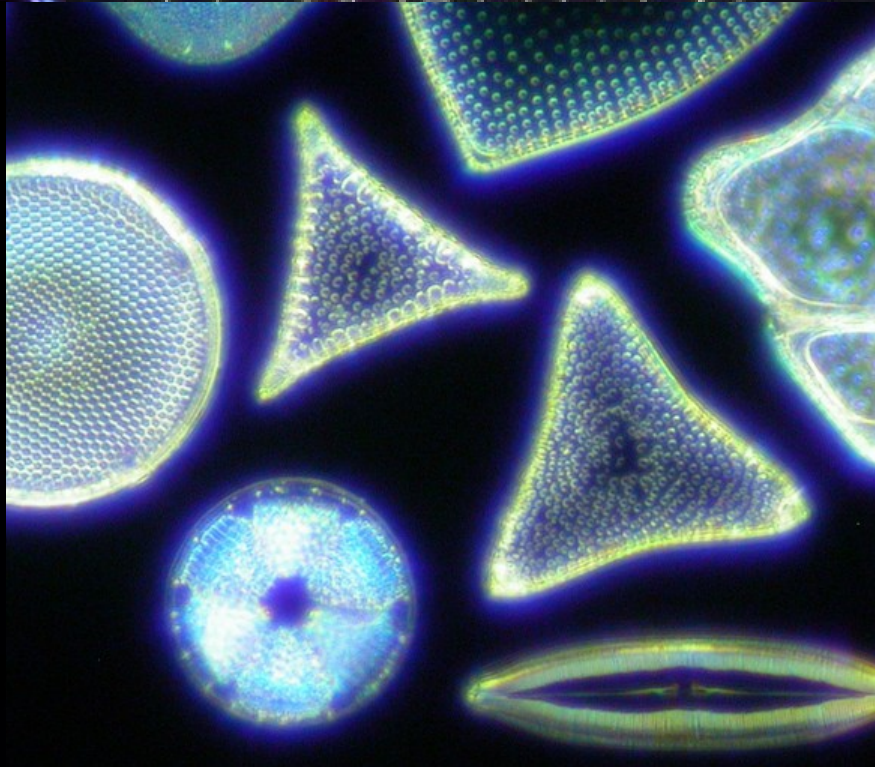
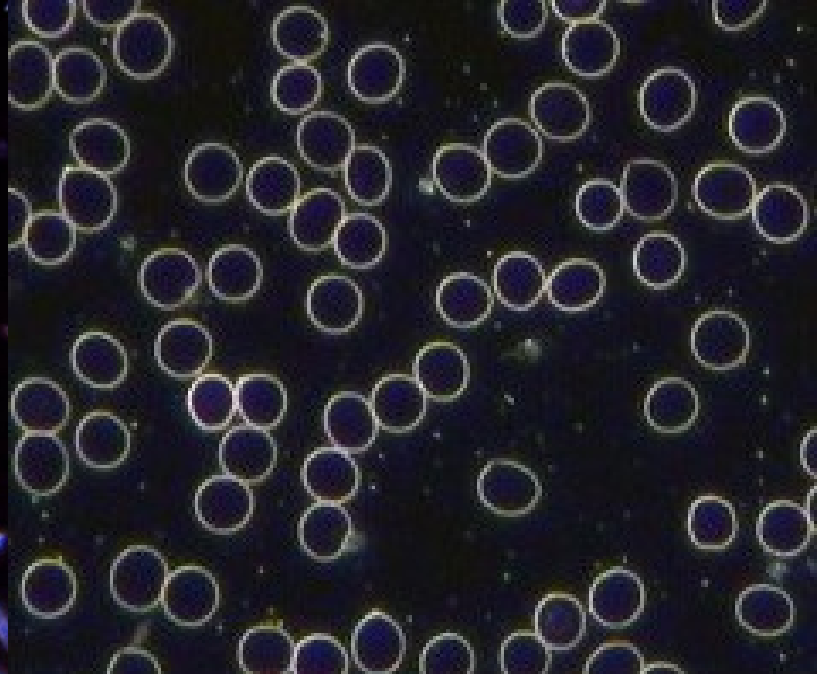
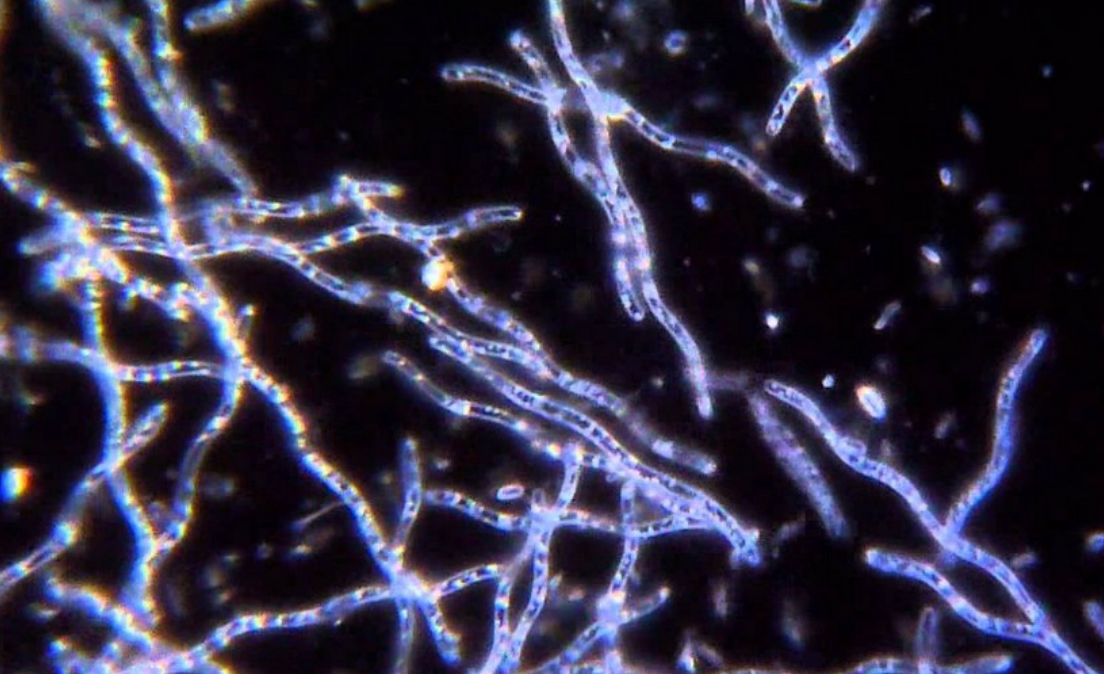


objektivy a okuláry - jejich optické osy svírají určitý úhel

- plynulá změna zvětšení bez zaostření

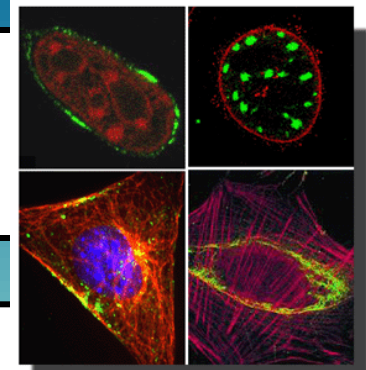
(operační mikroskopy)

- 3) Mikroskopy pro mikrofotografování, pro pořizování videozáznamu s digitálními kamerami, projekční mikroskopy, mikroskopy s mikromanipulátory



Speciální optické mikroskopy

zobrazení struktur lišících se vzájemně absorbcí např. UV, IR světla



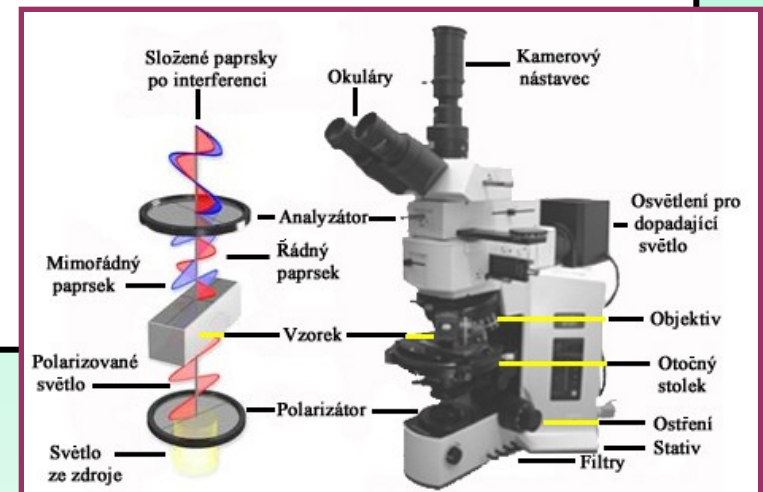
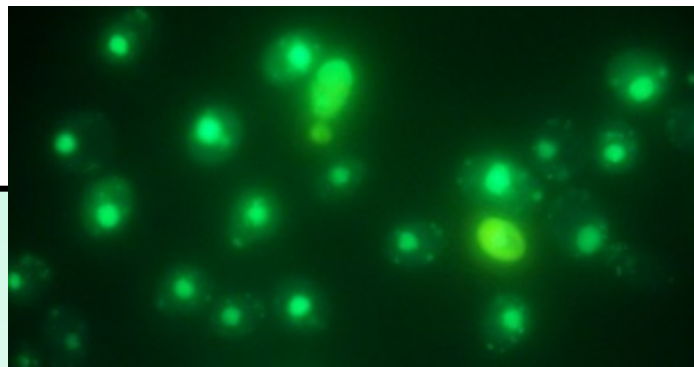
- fázově kontrastní mikroskop

1953 – Nobelova cena za objev – Frits Zernike (1888 – 1966)

- interferenční mikroskop
 - diferenční interferenční kontrast dle Nomarského (DIC)



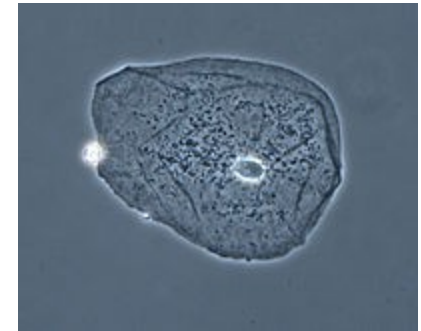
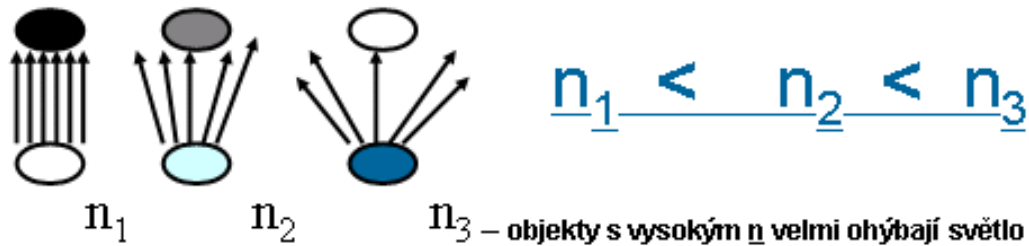
- UV mikroskopie
- fluorescenční mikroskop



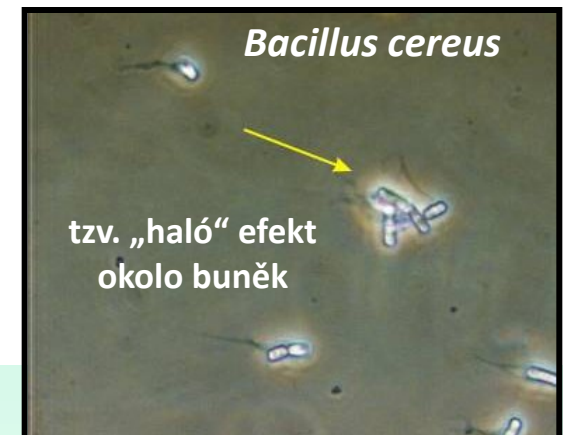
Fázový kontrast

- Klasický světelný mikroskop:
 - **detaily objektů** nejsou rozeznány vzhledem k **malému kontrastu** mezi strukturami s podobnou propustností světla

- Různé části prep. - různý index lomu a ohyb paprsků



možnost pozorování živých objektů v nativním stavu bez barvení



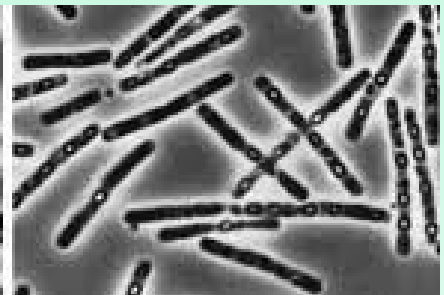
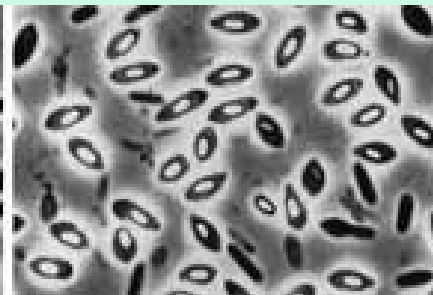
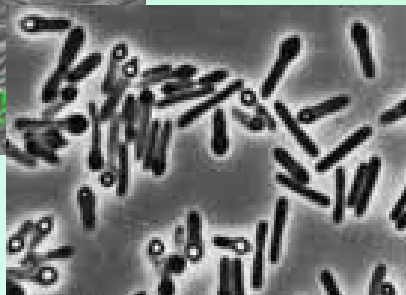
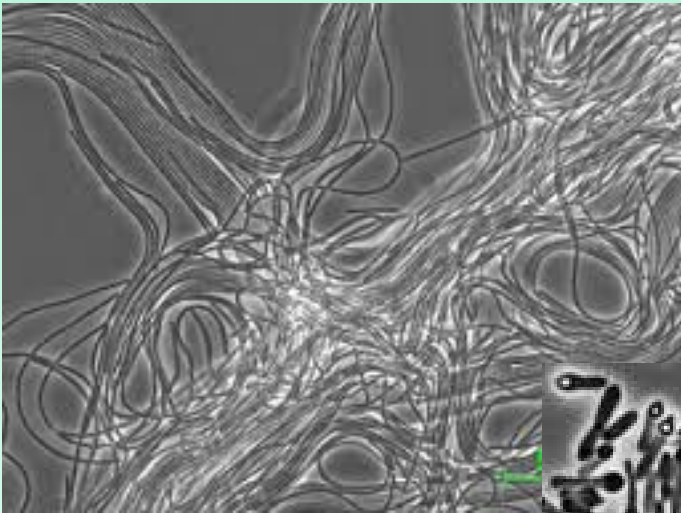
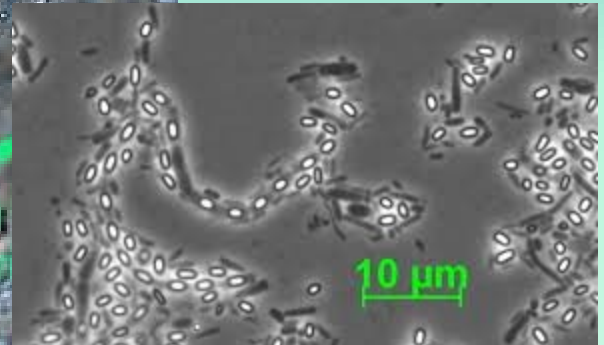
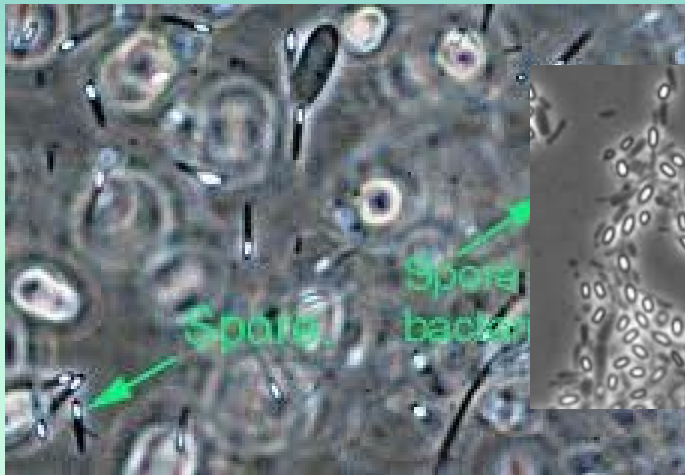
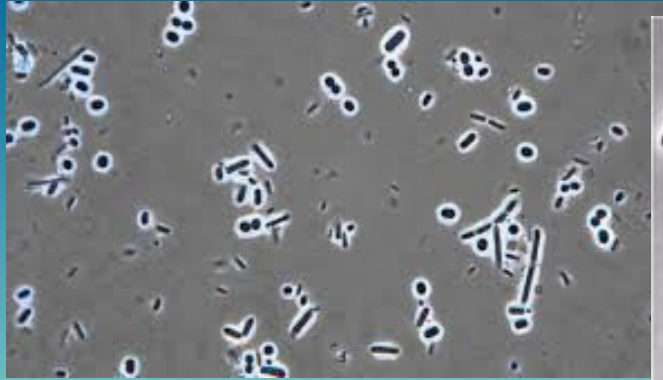
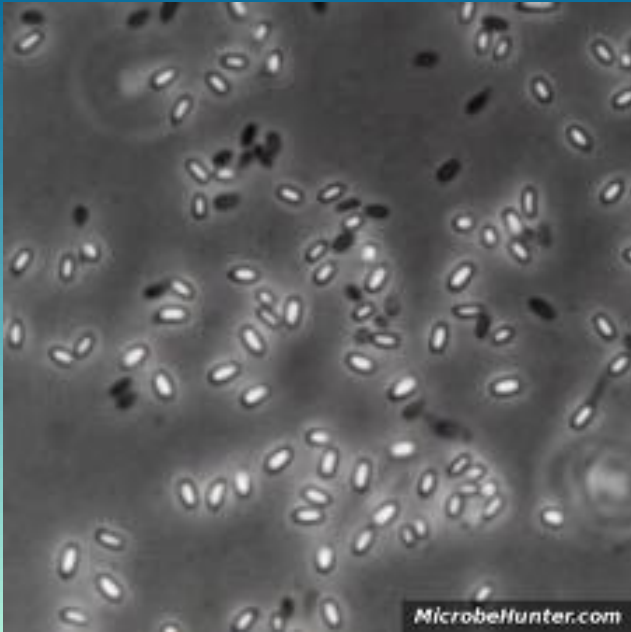
Světelný mikroskop - Fázový kontrast



- Pozorování nativního preparátu = živé buňky; rychle vysychá

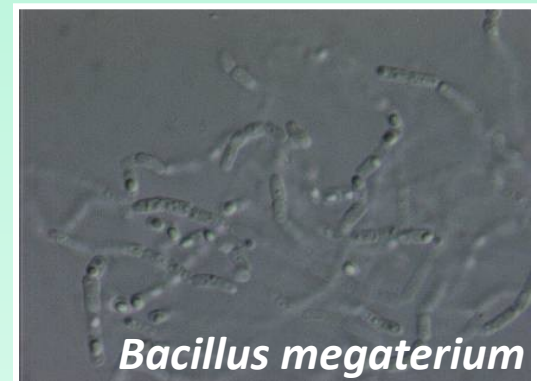
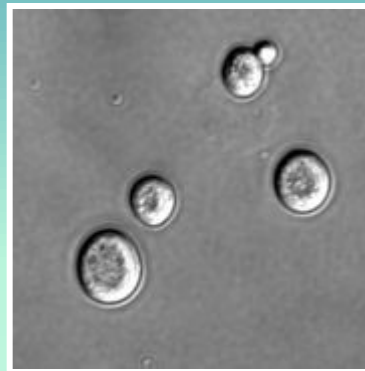
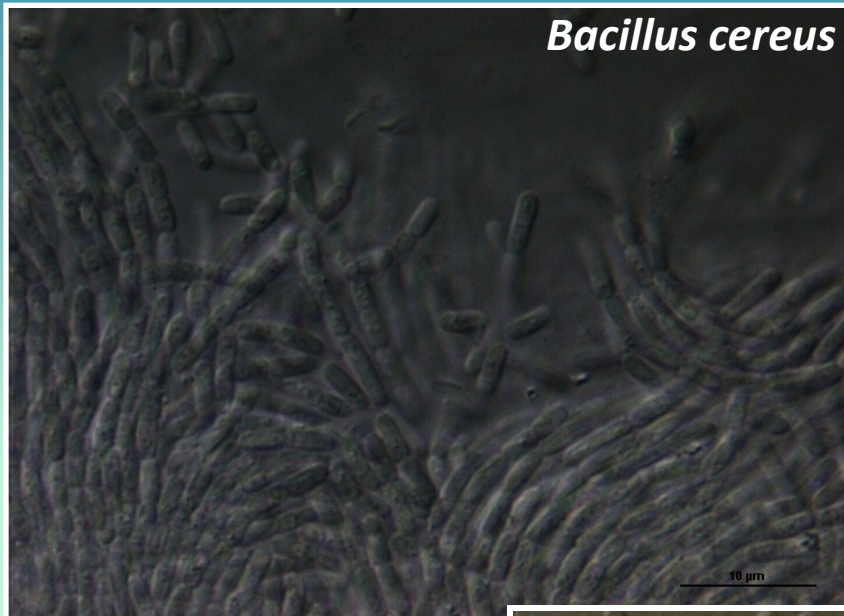


Max 1000x – 1500x

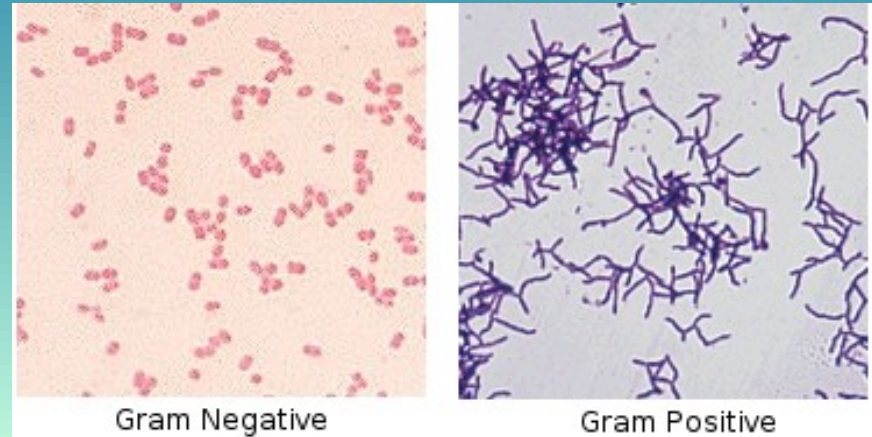
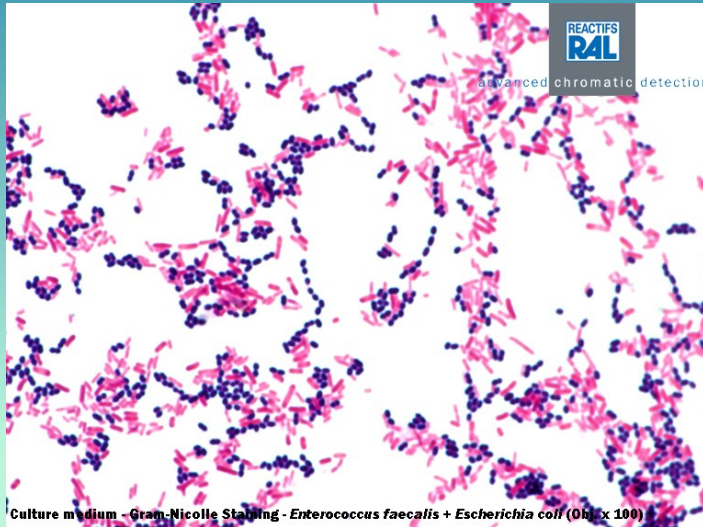


Interferenční mikroskop

Obraz: vzniká interferencí obou oddělených paprsků.



Světelný mikroskop - Jasně pole



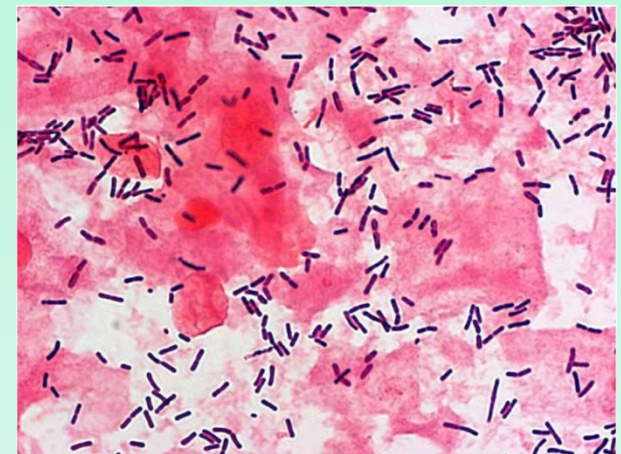
Čistá kultura G-

G+

Smíšená kultura G+/G-

Epiteliální buňka

- Pozorování barveného preparátu = mrtvé buňky; dlouhá životnost



Barvený stěr sliznice – buňky sliznice a buňky bakteriální

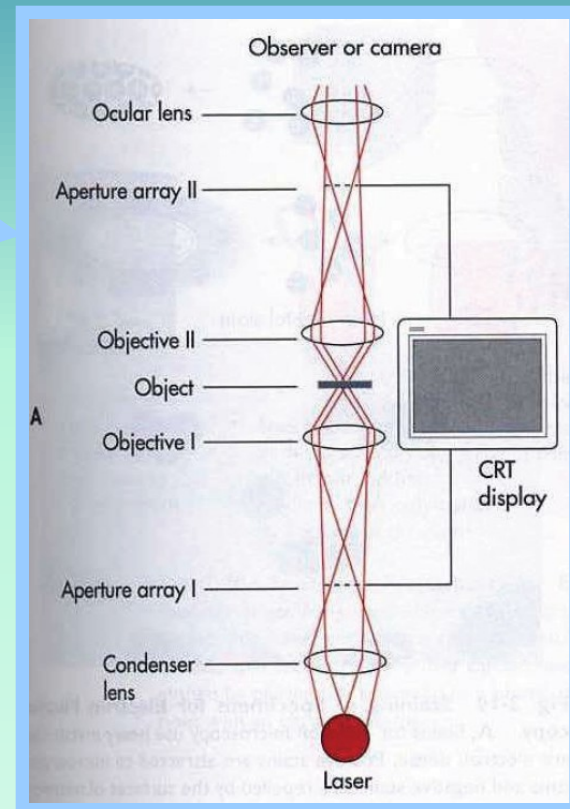
Max 1000x – 1500x

Doposud zmiňované optické mikroskopy (**optický + varianty a speciální mikroskopy**) **vytvářejí obraz okamžitě, jako spojitý celek.**

Optické mikroskopy **vytvářející obraz postupně, z jednotlivých bodů (pixelů)**
= nesou informaci z úzkého světelného paprsku:

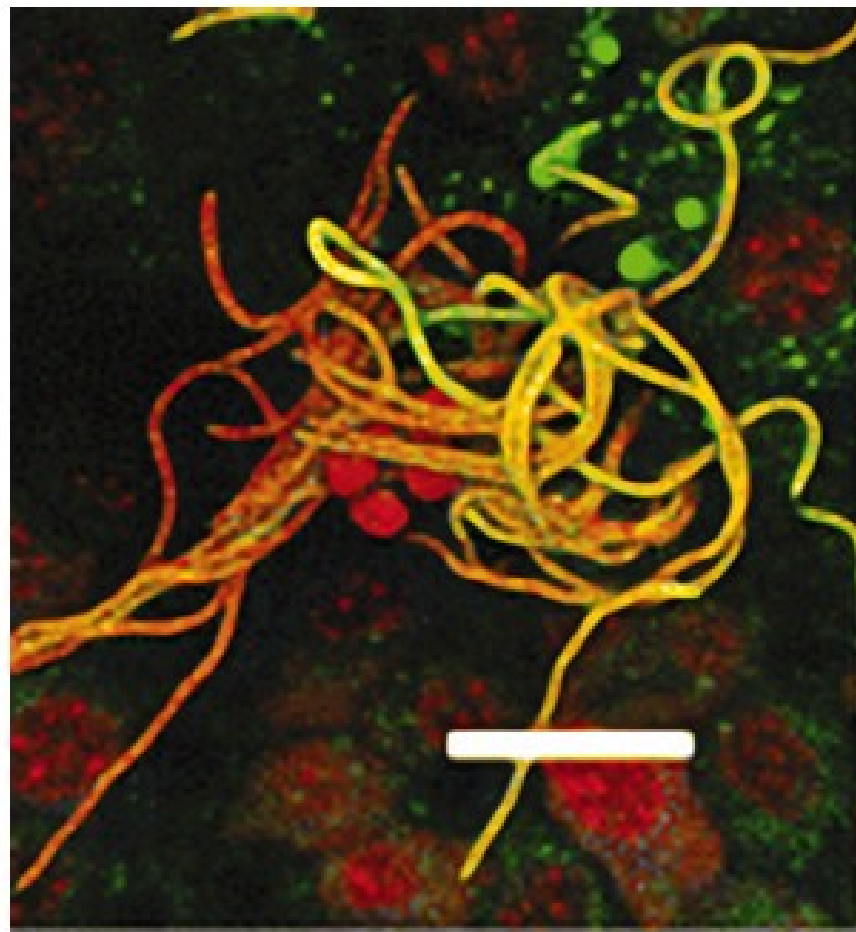
1. laserový řádkovací (rastrovací, skenovací) konfokální mikroskop

- Rušivé světlo z vrstev nad a pod rovinou ostrosti odstraněno z dráhy k detektoru zábranou s malým otvorem – **výsledek: perfektně ostrý obraz. Paprsek se po objektu posouvá a obraz jednotlivých bodů se skládá v PC. Posunem paprsku do jiné hloubky lze vytvořit optické řezy a skládat je do 3D obrazu.**
- Význam: možnost pozorování i relativně **silných preparátů**, včetně nativních.
- Konfokální mikroskop lze upravit i pro konfokální fluorescenční mikroskopii



Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection.

Justice SS¹, Hunstad DA, Seed PC, Hultgren SJ.



Filamentous *E. coli* on infected mouse bladder cells. The bacteria were stained with a red fluorescent nucleic acid dye (ToPro3) and examined under a laser scanning confocal fluorescent microscope. Scale bar: 30 μ m.

2. barevný řádkovací mikroskop „s letící stopou“

- místo mechanického řádkovacího systému používá jasnou bílou světelnou stopu, která přebíhá po řádcích na obrazovce osciloskopu.
- Výhody: výborné rozlišení, vysoký kontrast (úpravou jasu zdrojové světelné stopy v závislosti na absorbanci preparátu)

3. optická skenovací mikroskopie v blízkém poli NFOS

- velmi úzký světelný paprsek prochází po řádcích velmi tenkým preparátem a jsou měřeny **změny jeho intenzity**.
- Výhody: rozlišení **10 –100x vyšší** než u klasického světelného mikroskopu. Výhodou oproti elektronové mikroskopii (viz dále) je, že vzorek **nemusí být umístěn ve vakuu** ale lze jej pozorovat např. ve vodném prostředí.



Ernest Ruska

Německý vědec

nositel Nobelovy ceny (1986)

*za objev elektronového
mikroskopu (1931)*

Elektronová mikroskopie (EM)

- Zobrazení předmětů pomocí **urychlených elektronových svazků** – elektrony mají vlnovou délku de Broglieových hmotnost.vln
- Urychlením lze dosáhnout stotisíckrát kratších vlnových délek:
Rozlišovací schopnost pak ($\sigma = \lambda / n \cdot \sin \alpha$): velmi malá λ
- Vlivem velkých optických vad použitých čoček (**magnetické**)
poměrně **malá numerická apertura**

– řádově setiny.

Rozlišovací mez: desetiny nm (mlk)

Dělení EM dle způsobu zobrazování

transmisní

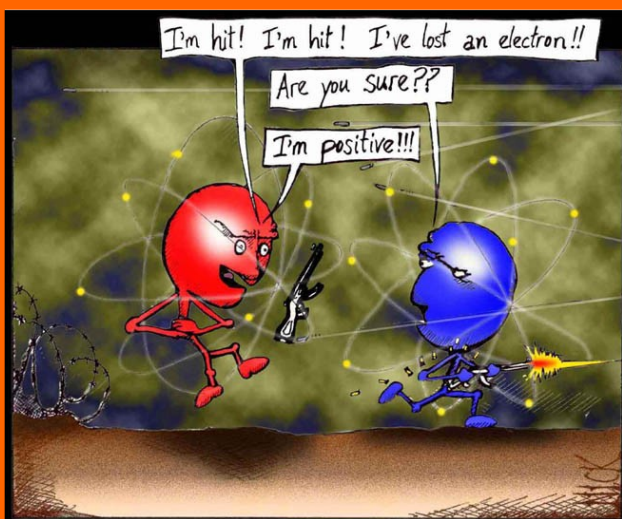
emisní

odrazové (v praxi málo používané)

řádovací (skenovací či rastrovací)

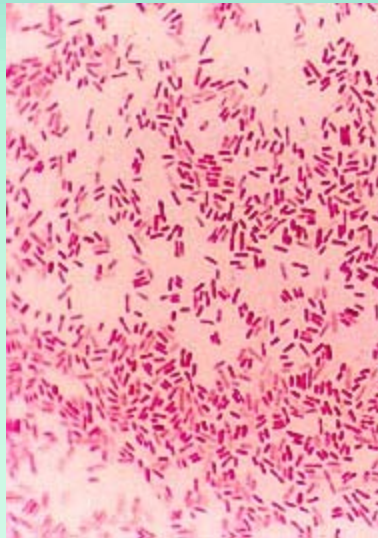
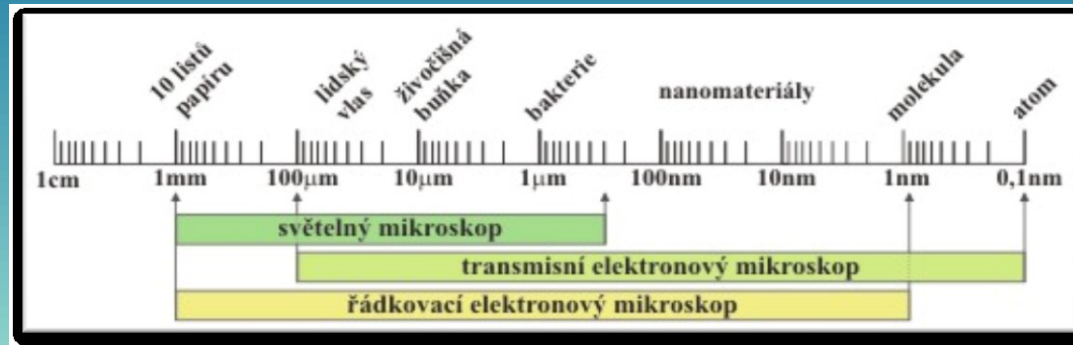


Elektronový mikroskop



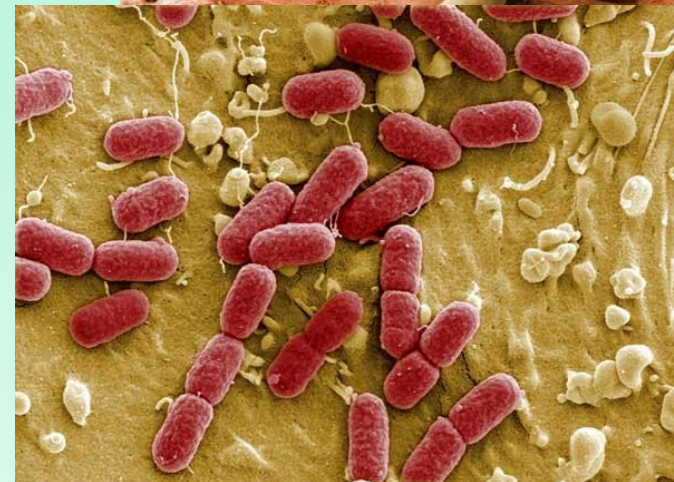
Another casualty in the War of the Atoms.

Mikroskopická pozorování bakteriálních buněk



**Světelný mikroskop
- Fázový kontrast**

ASM MicrobeLibrary.org ©Graham



**Světelný mikroskop
- Jasně pole**

Světelný mikroskop (1000x) vs. Elektronový (100 000x)

**Světelná
mikroskopie:
Jasné pole**



**Rastrovací
elektronová
mikroskopie**

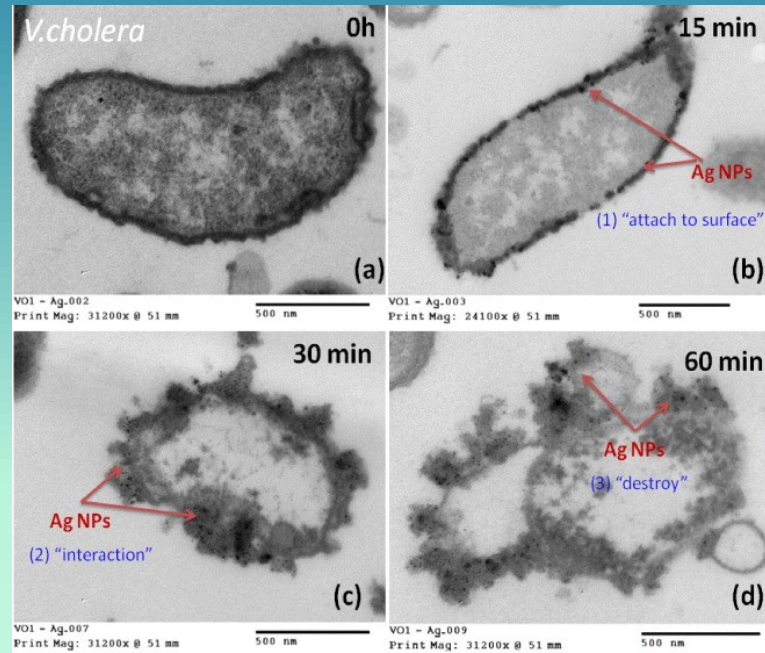


Transmisní elektronový mikroskop (TEM)



Pomocí TEM lze studovat vznik, vlastnosti a vzájemné působení jednotlivých poruch krystalové struktury vzorků.

Transmisní elektronový mikroskop (TEM)

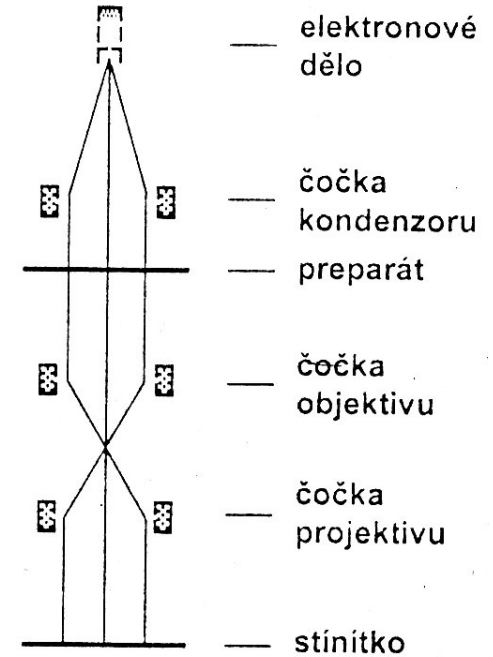


Metoda umožňuje pozorovat **detaily buňky a virových částic.**

Ke kontrastnímu znázornění zvýraznění struktur se používá **negativní barvení** solemi těžkých kovů, které **nepropuštějí elektrony** například **uranyl acetát, molybdenan amonný.**

Transmisní elektronový mikroskop (TEM)

- V biologické praxi:
Z 5 000 - 100 000
rozlišení: **desetiny nm** (větší molekuly)
- Struktura objektu: průchodem el.svazku
- Elektronový paprsek: ze žhaveného kovového vlákna
- Proti rozptylu elektronů: v tubusu EM **vysoké vakuum**
- Čočky vytvářeny obvykle rotačně symetrickým elmag. polem
- Konečný obraz pozorujeme nepřímo, projekcí na luminiscenční stínítko



Nevýhody: speciální postupy pro fixaci a barvení; vakuum; vysoký tlak, jako „barviva“: soli a oxidy těžkých kovů, nutno rozlišit artefakty vzniklé zpracováním preparátu.

Procházející elektrony se zachycují a obraz se zvětší a fotografuje.

Metoda umožňuje pozorovat **detaily buňky a virových částic.**

Ke kontrastnímu znázornění zvýraznění struktur se používá **negativní barvení** solemi těžkých kovů,

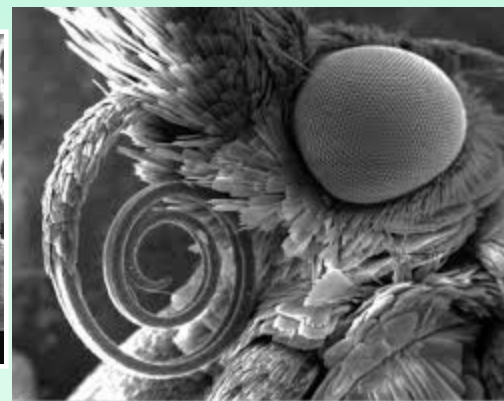
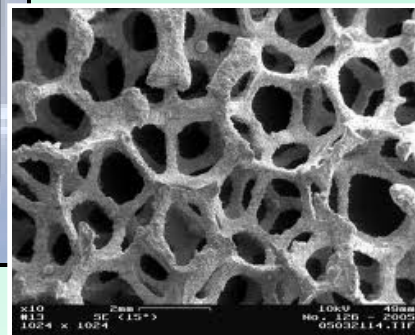
které **nepropuštějí elektrony** například **uranyl acetát, molybdenan amonný.**

Rastrovací elektronová mikroskopie

(skenovací, řádkovací, Scanning Electron Microscope - SEM)



Popularita SEM pramení z možnosti získat obrázky povrchů širokého spektra materiálů, které jsou navíc jednoduše interpretovatelné.



Rastrovací elektronová mikroskopie

(skenovací, řádkovací, Scanning Electron Microscope - SEM)

- velmi úzký **paprsek elektronů** je vychylovacím systémem nucen **přejíždět po povrchu preparátu** po řádcích
- Rozlišovací schopnost SEM o 1-2 řády menší než TEM, ale **možnost pozorování objektů s komplikovanou 3D strukturou** (signál totiž nese informaci o sklonu povrchu v místě dopadu svazku elektronů) **výsledkem je obraz s vysokou hloubkou ostrosti**

Nevýhody: pokovování povrchu preparátu, složitá fixace.
Problém rozlišení artefaktů vzniklých zpracováním preparátu

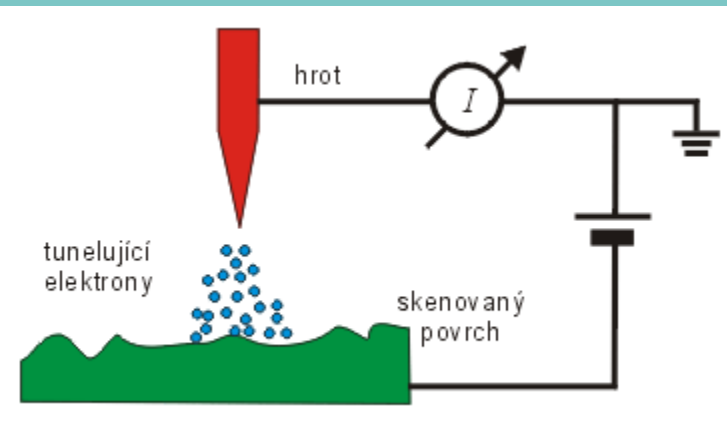
Rastrovací elektronová mikroskopie znázorňuje povrch objektu (bakterie, viru, leukocytu), tence potaženého paprskem iontů kovu, například platiny.

Protože se pokovuje pod ostrým úhlem, v místech, **kde se kovové ionty nedostanou vznikají stíny.** Výsledkem je plastický trojrozměrný obraz.

Skenovací tunelová elektronová mikroskopie

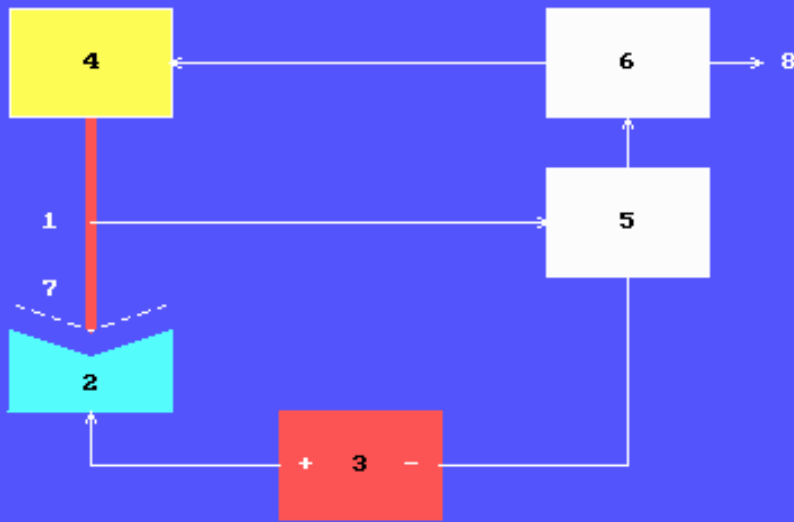
(scanning tunneling electron microscopy, STM)

- Nad povrchem preparátu se pohybuje velmi tenký kovový hrot, ke kterému „tunelují“ elektrony z povrchu preparátu (tunelový efekt – jev kvantové mechaniky, kdy částice pronikají oblastí, na překonání níž by dle zákonů klasické mechaniky neměli dostatek energie)
- Zobrazuje se elektronová hustota na povrchu preparátu s rozlišením na úrovni rozměrů atomů.
- Výhody: Vzorky nemusí být ve vakuu, ale např. i ve vodném prostředí.



Vynalezen v laboratořích IBM v Zürichu G. Binnigem a H. Rohrerem r.1980

ŘÁDKOVACÍ TUNELOVÝ MIKROSKOP

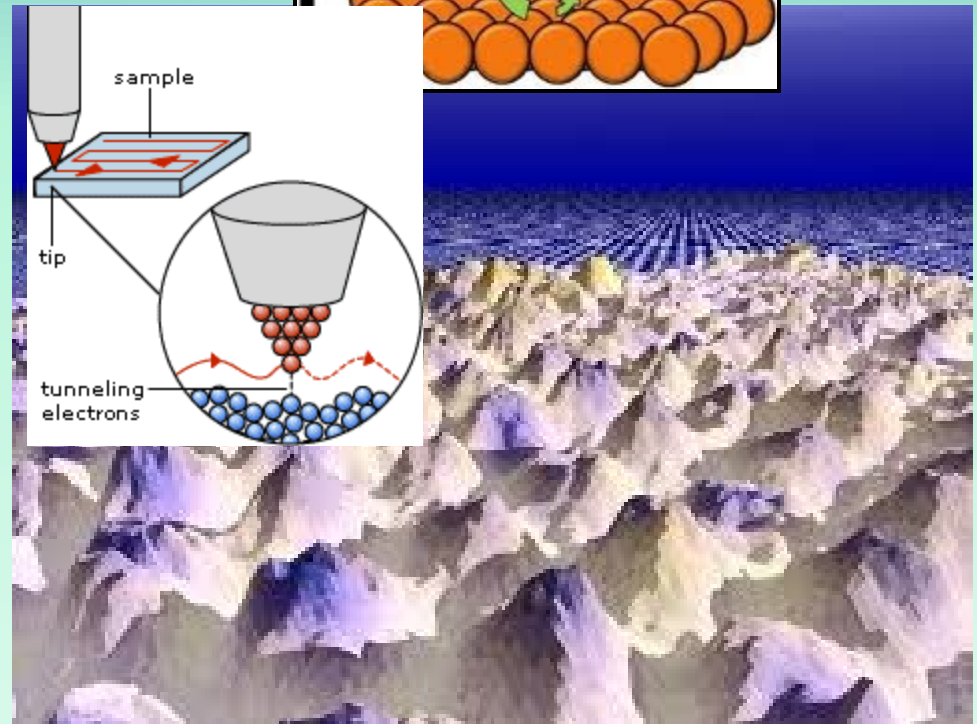
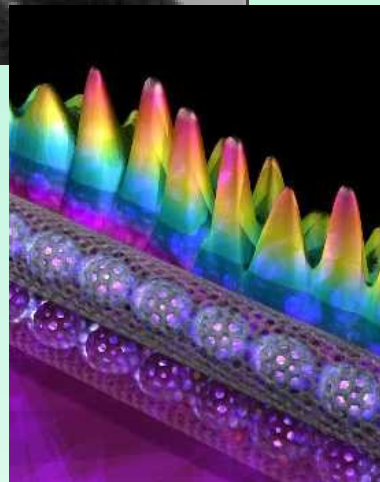
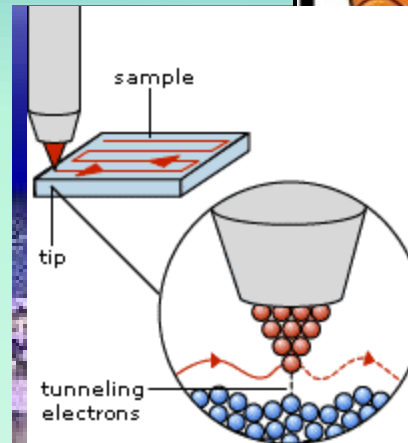
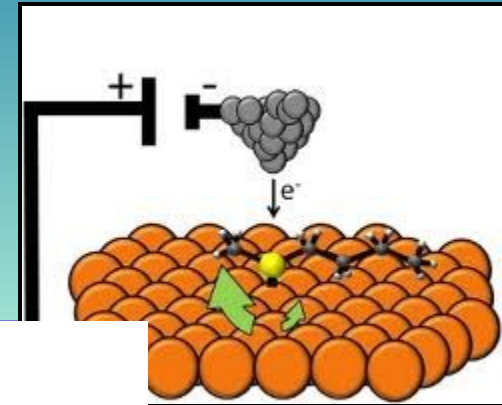
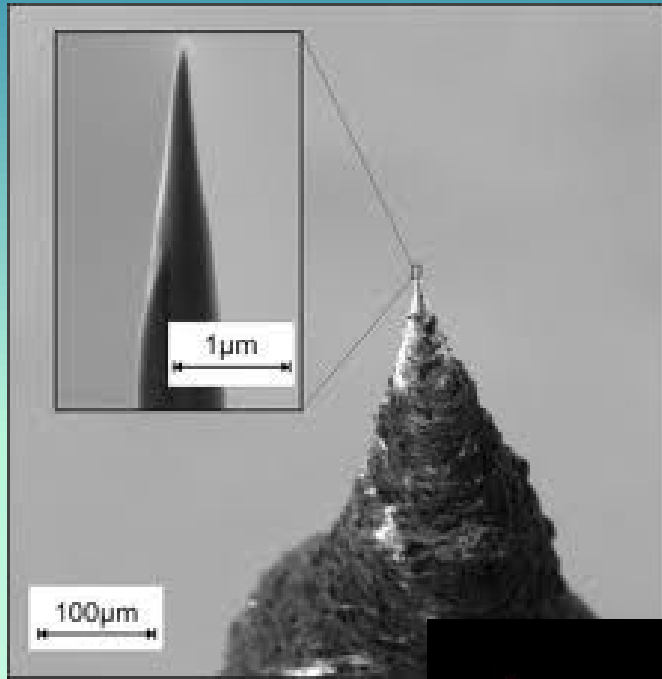


1) **jehla** s extrémně ostrým hrotem (pohybovat v řádcích - nanometry) 2) Na hrot je ze **zdroje** 3) přiloženo **elektrické napětí** vzhledem ke vzorku, jež může díky tunelovému efektu odsávat elektrony.
4) Výška hrotu nad vzorkem nastavována **piezoelektrickým systémem**

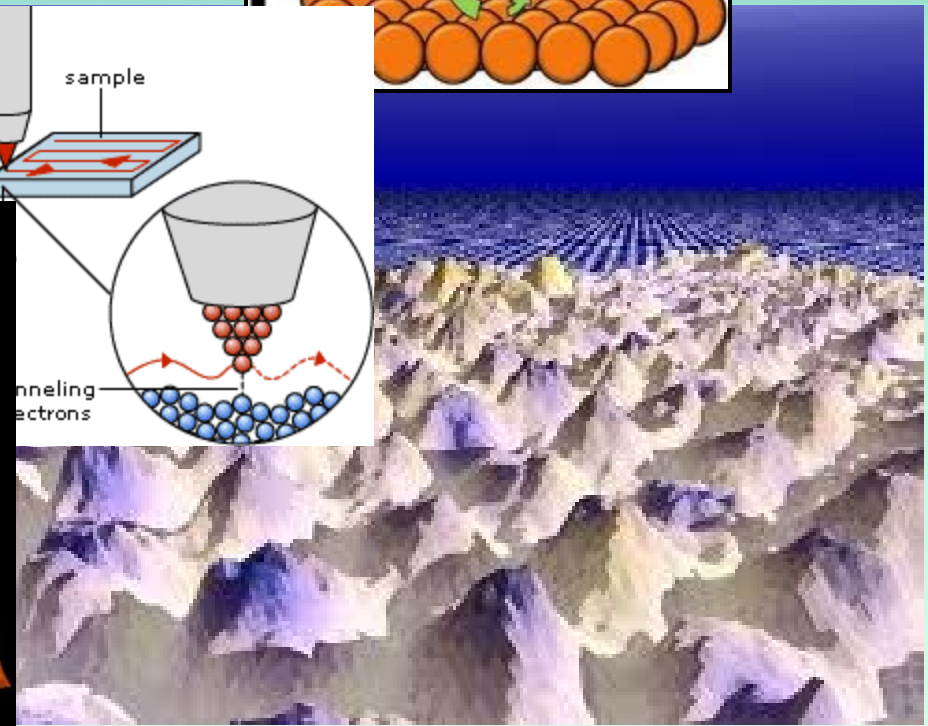
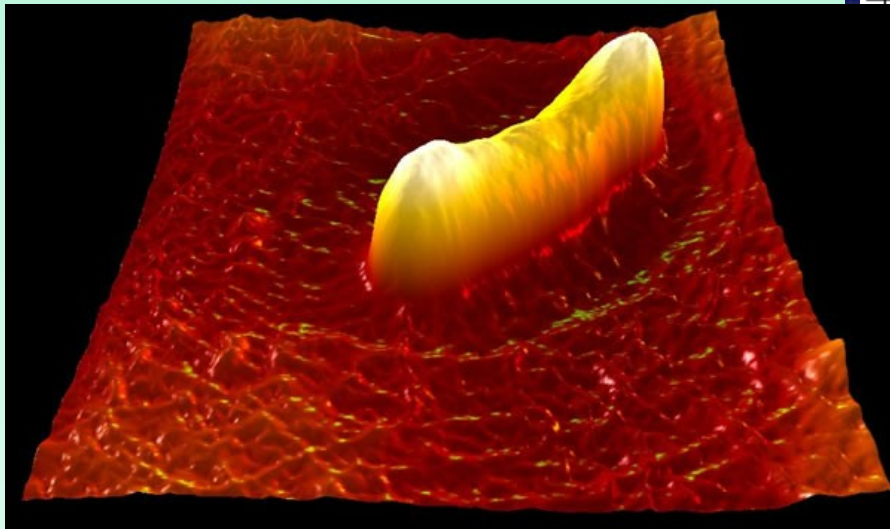
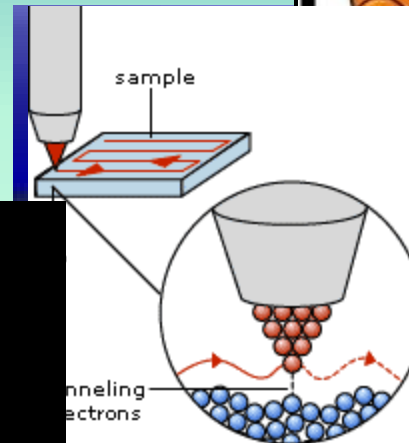
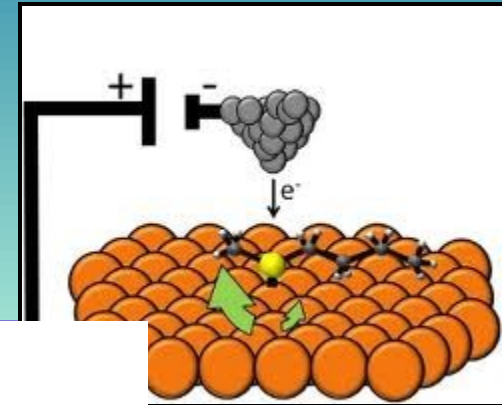
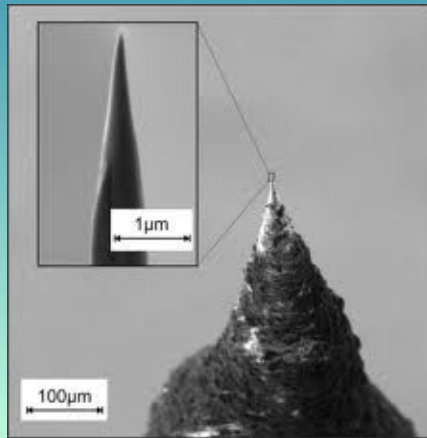
5) Proud snímaný jehlou měřen citlivým **měřidlem** 5) a je využit k tomu, aby se pomocí **regulátoru** 6) udržovala výška hrotu nad povrchem vzorku konstantní, jak je vyznačeno na obrázku čárkovanou křivkou 7) Hrot tak s extrémní přesností mapuje výškový profil vzorku. Další zpracování je pak záležitostí **počítače** 8).

Systém je schopen rozeznat jednotlivé atomy na povrchu vzorku.

Skenovací tunelová elektronová mikroskopie (scanning tunneling electron microscopy, STM)



Skenovací tunelová elektronová mikroskopie (scanning tunneling electron microscopy, STM)



Akustická mikroskopie

UFM – Mikroskopie ultrazvukových sil

akustický mikroskop – zařízení, které vysílá na vzorek řádkovacím způsobem ultrazvukový signál, odezvu převádí na elektrický signál a na monitoru prezentuje rekonstruovaný videoobraz

- Hyperzvuk proniká v kapalinách i pevném prostředí do hloubky jednotek až desítek mikrometrů.
- Pozorování preparátů **neprostupných pro elektrony** a viditelné světlo.
- Informace o mechanických vlastnostech prostředí.

Kam se podívat...



- **Kabinet elektronové mikroskopie –**
Technické muzeum Brno
- **AVČR – Ústav přístrojové techniky**
Muzeum oddělení Elektronové optiky

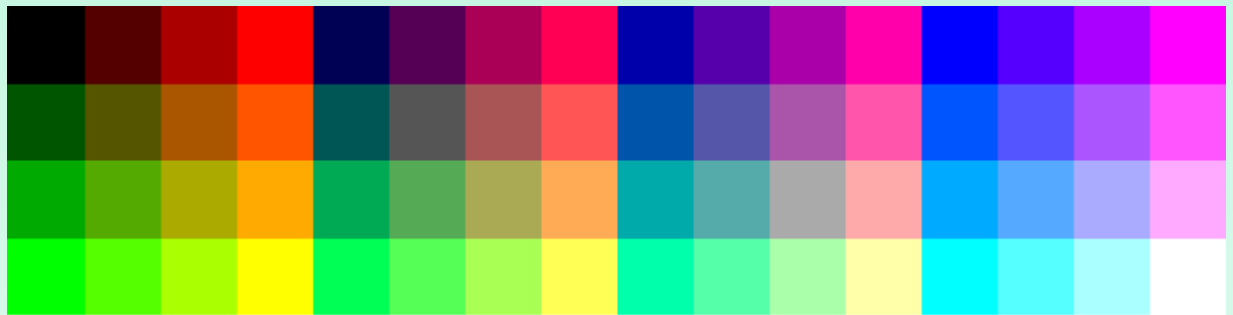
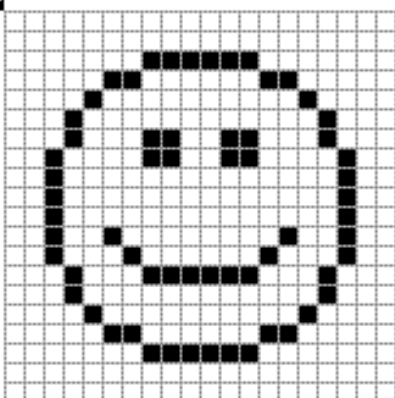
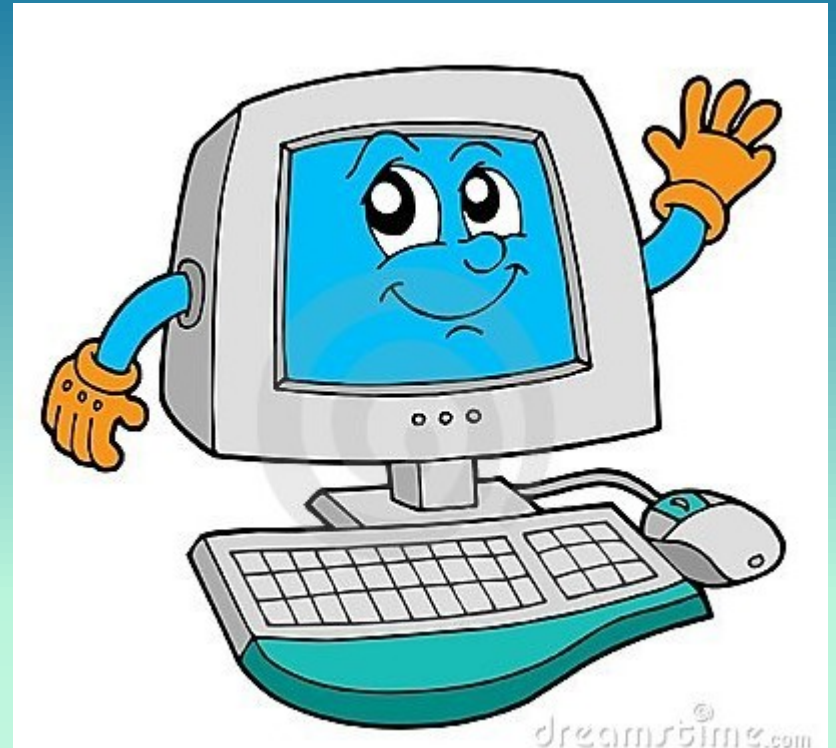


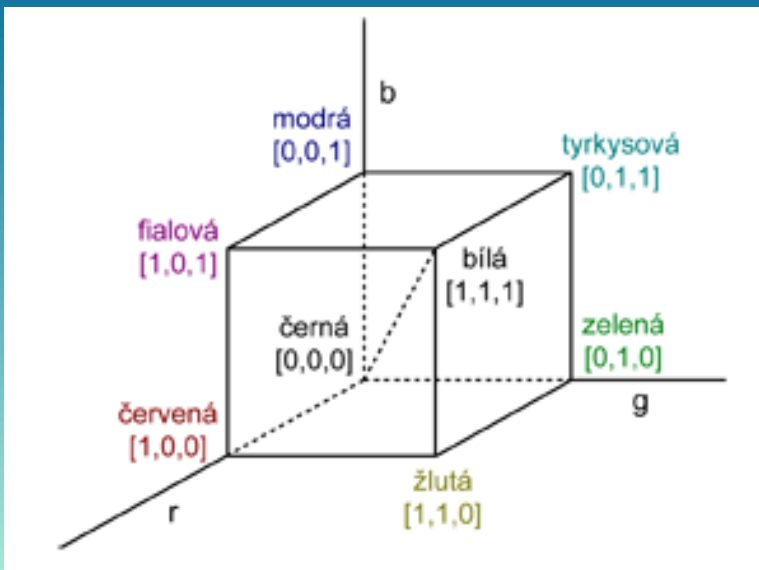
Obrazová dokumentace a zpracování obrazu

- Rozdělení obrazu
- Zařízení
- Komprese a formáty obrazu
- Programy - analýza obrazu (LUCIA, NIS)

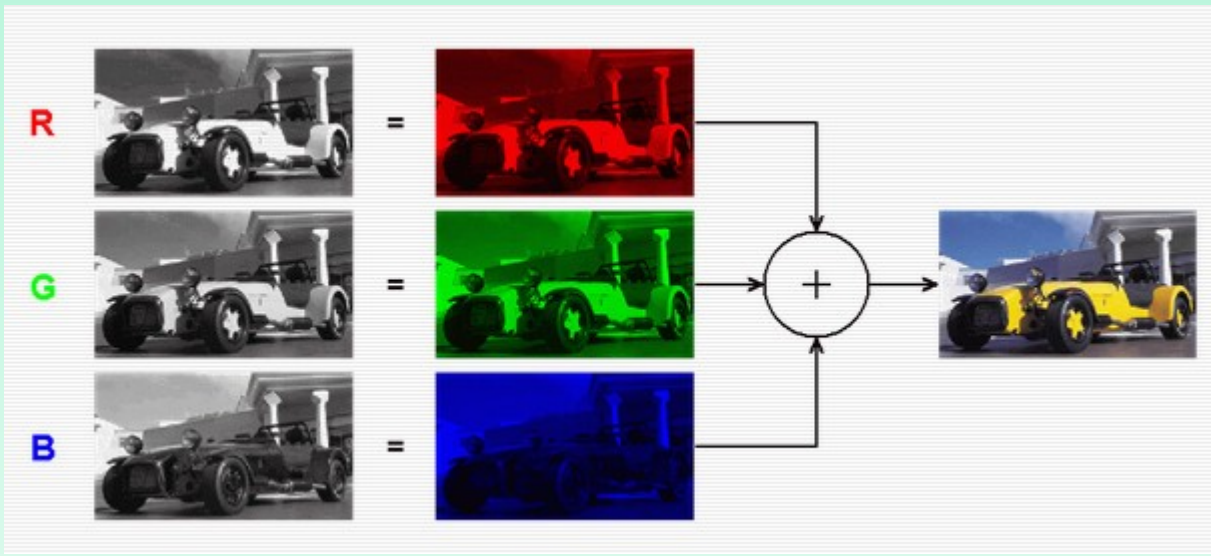


X





Fialová barva, která je získána součtem červené a modré barvy, je znázorněna bodem o souřadnicích [1, 0, 1]. Bílá barva, reprezentovaná vrcholem [1, 1, 1], je složena z barevných vektorů v červeném, zeleném a modrém vrcholu. Odstínům šedi odpovídají body na diagonále krychle spojující černý a bílý vrchol.



Zdroje:

- Campbell N.A. a kol. (2006): Biologie, Computer press, Brno
- Dušan Matis a kolektiv: Mikroskopická technika. Skriptum PřF Univerzity Komenského, 1993
- Jaromír Plášek: Nové metody optické mikroskopie. Skriptum Fyzikálního ústavu Univerzity Karlovy
- **Hrazdira.I., Mornstein V. (2001): Lékařská biofyzika a přístrojová technika, Neptun, Brno**
- Rosypal a kol. (1999): Úvod do molekulární biologie, Brno