

Zoologická mikrotechnika



Mgr. Mária Seifertová, Ph.D.

Bezpečnost práce:

ochranný oděv, dlouhé vlasy do gumičky, **přezůvky !!!**

•**Zákaz vstupu osob s příznaky virového infekčního onemocnění** (dušnost, horečka, suchý kašel, náhlá ztráta chuti a čichu) do budov fakulty.

•**Dezinfekce**

Co potřebujete na **zápočet**?

✓ **Test**

✓ **Protokoly**

✓ **Preparáty (min. 9)**

Protokol č. 1

Nativní preparát, vitální barvení

- definovat pojmy nativní preparát a vitální barvení
- postup přípravy preparátu
- obrázek nálevníka rodu *Paramecium* (kreslíme ve cvičení) – popsat jednotlivé struktury a orgány
- závěr (popsat slovně vlastní pozorování)

Protokol č. 2

Pitva švába

Trávicí soustava švába:

- nakreslit podle preparátů
- popsat jednotlivé části a jejich funkce

Přehled mikroorganismů vyskytujících se v TS švába

1. hlístice rodu *Thelastoma*

- nakreslit a popsat (obrázek velký alespoň na půl strany A4)

2. prvoky rodu *Gregarina*

- nakreslit a popsat - **syzygie** (obrázek velký alespoň na půl strany A4)

Trvalé preparáty

Nákres - kreslení preparátů pomocí kreslicího ramena - podle typu preparátu doplnit postup přípravy

Suché preparáty

Uzavírací media s vodou nemísitelná

- popsat postupy a zásady přípravy preparátů do glycerolu, glycerin-želatiny a media Liquido-Faure

Uzavírací média s vodou mísitelná

- popsat postupy a zásady přípravy preparátů do kanadského balzámu

Doporučená literatura

- Knoz, Jan - Opravilová, Věra. ***Základy mikroskopické techniky***. 1. vyd. Brno : Masarykova univerzita, 1992. 195 s. ISBN 80-210-0473-8.
- Murphy, Douglas B. ***Fundamentals of light microscopy and electronic imaging***. New York : Wiley-Liss, 2001. xii, 368 s. ISBN 0-471-25391-.
- Handbook of biological confocal microscopy***. Edited by James B. Pawley. 3rd ed. New York : Springer, 2006. xxviii, 98. ISBN 0-387-25921-X.
- Jaromír Plášek: **Nové metody optické mikroskopie**. Skriptum Fyzikálního ústavu Univerzity Karlovy
- Matis, Dušan a kolektiv: ***Mikroskopická technika***. Skriptum PŘF Univerzity Komenského, 1993

+ internet (výrobci mikroskopů)

Světelný mikroskop

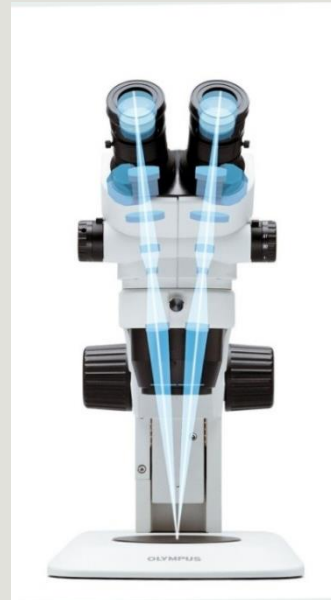
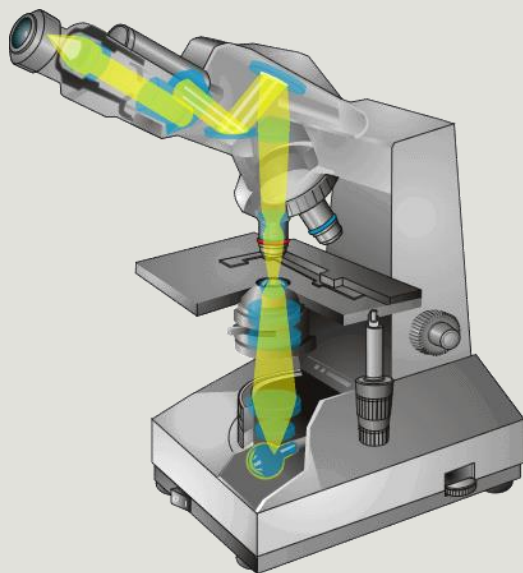
základní pracovní nástroj

Účel mikroskopu:

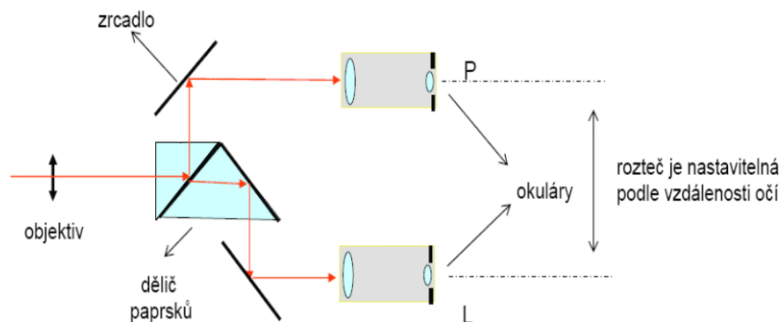
- *zvětšení*
- *rozlišení detailů*
- *kontrast*



Jaký je rozdíl mezi binokulárním světelným mikroskopem a stereomikroskopem?

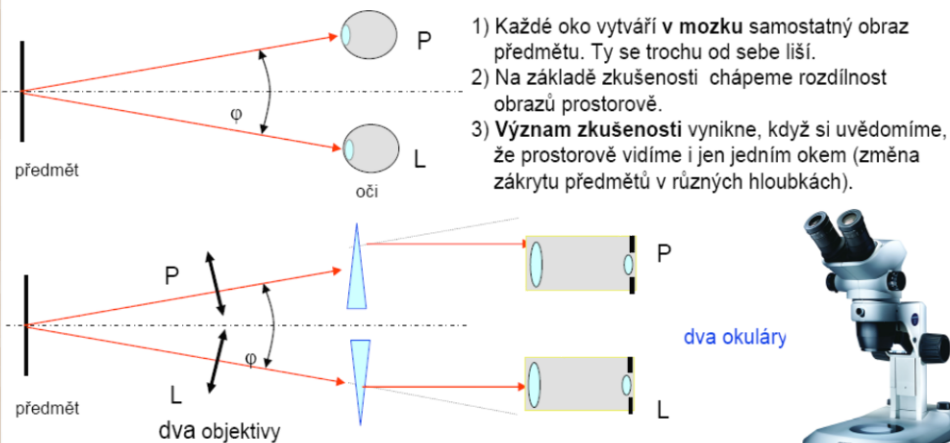


Binokulární mikroskop



- 1) Binokulární mikroskop **není** stereo mikroskop.
- 2) Každé oko pozoruje svým okulárem meziobraz preparátu. Pozorování oběma očima je méně únavné než jedním okem.
- 3) Současnou **ostrost obou** dílčích obrazů je třeba postupně doladit jednotlivými okuláry.

Stereomikroskop



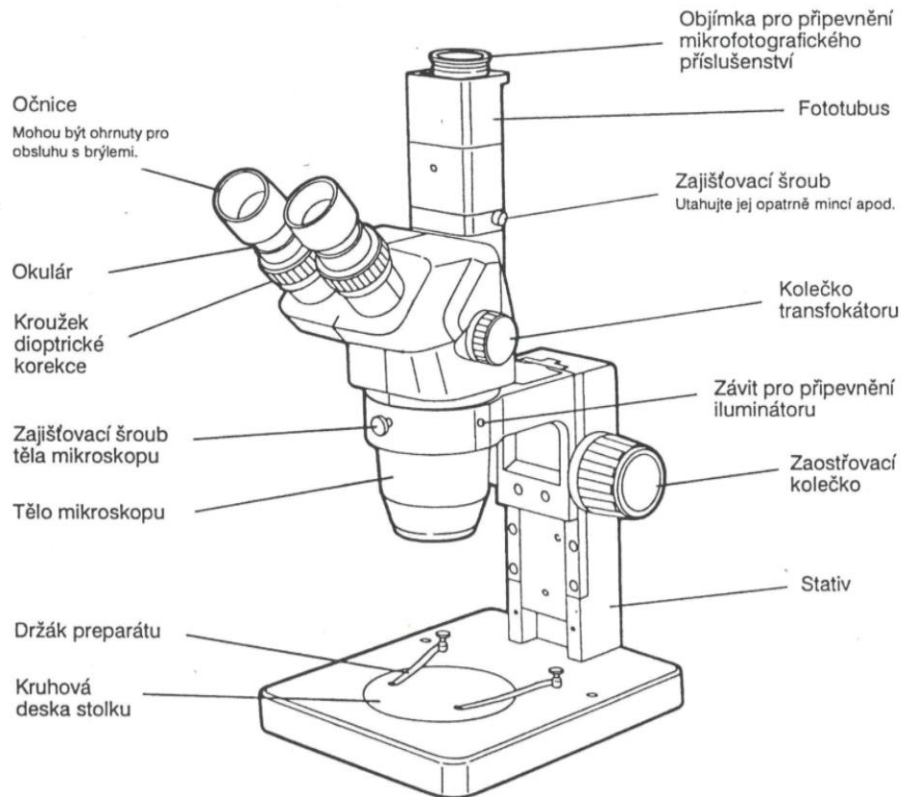
- 1) Každé oko vytváří v **mozku** samostatný obraz předmětu. Ty se trochu od sebe liší.
- 2) Na základě zkušenosti chápeme rozdílnost obrazů prostorově.
- 3) **Význam zkušenosti** vynikne, když si uvědomíme, že prostorově vidíme i jen jedním okem (změna zákrytu předmětu v různých hloubkách).

- 1) Stereomikroskop se skládá ze dvou samostatných mikroskopů, jeden pro levé a druhý pro pravé oko.
- 2) Čím větší je úhel φ , tím výraznější je stereovjem.

Stereomikroskop (preparační mikroskop)

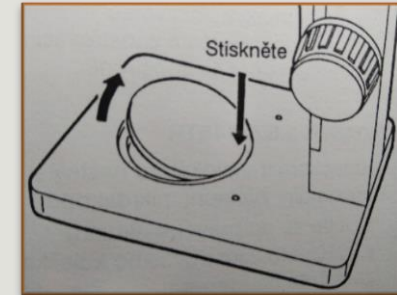
1. Popis mikroskopu

Mikroskop s fototubusem



2. Nastavení stereomikroskopu

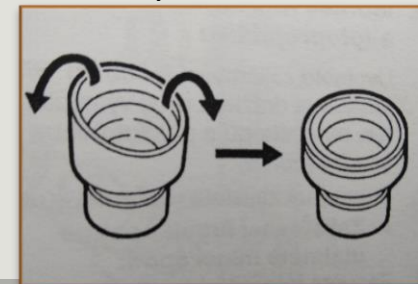
- *Kruhová deska stolku*



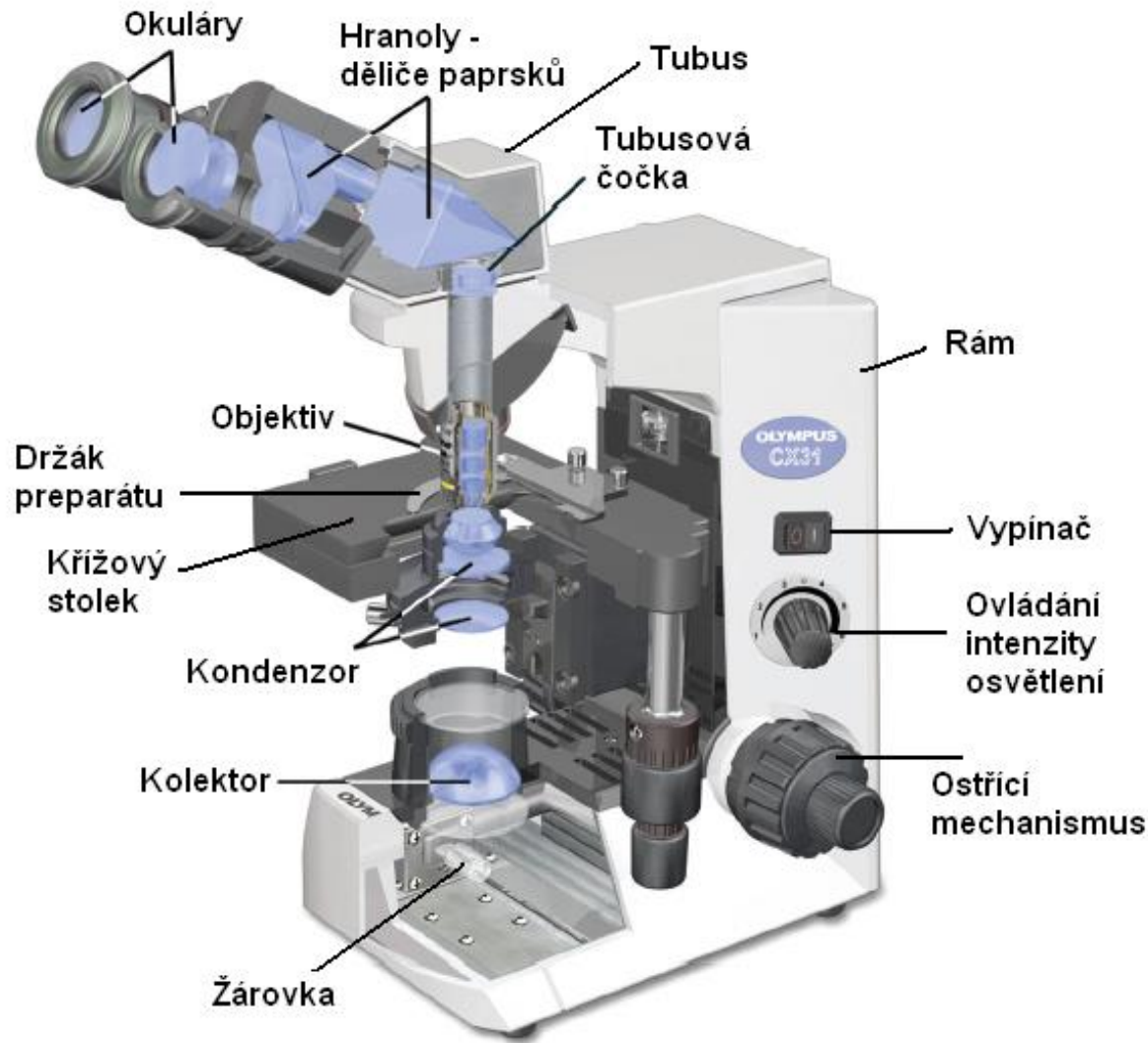
- *Dioptrická korekce*



- *Nastavení vzdálenosti okuláru*
- *Očnice - pozorování s brýlemi*



Složení mikroskopu CX 31 (světelný mikroskop)



ČÁST MECHANICKÁ:

stativ, tubus, revolverový měnič objektivů, stolek, makrošroub, mikrošroub, vypínač, ovládání intenzity světla

ČÁST OSVĚTLOVACÍ:

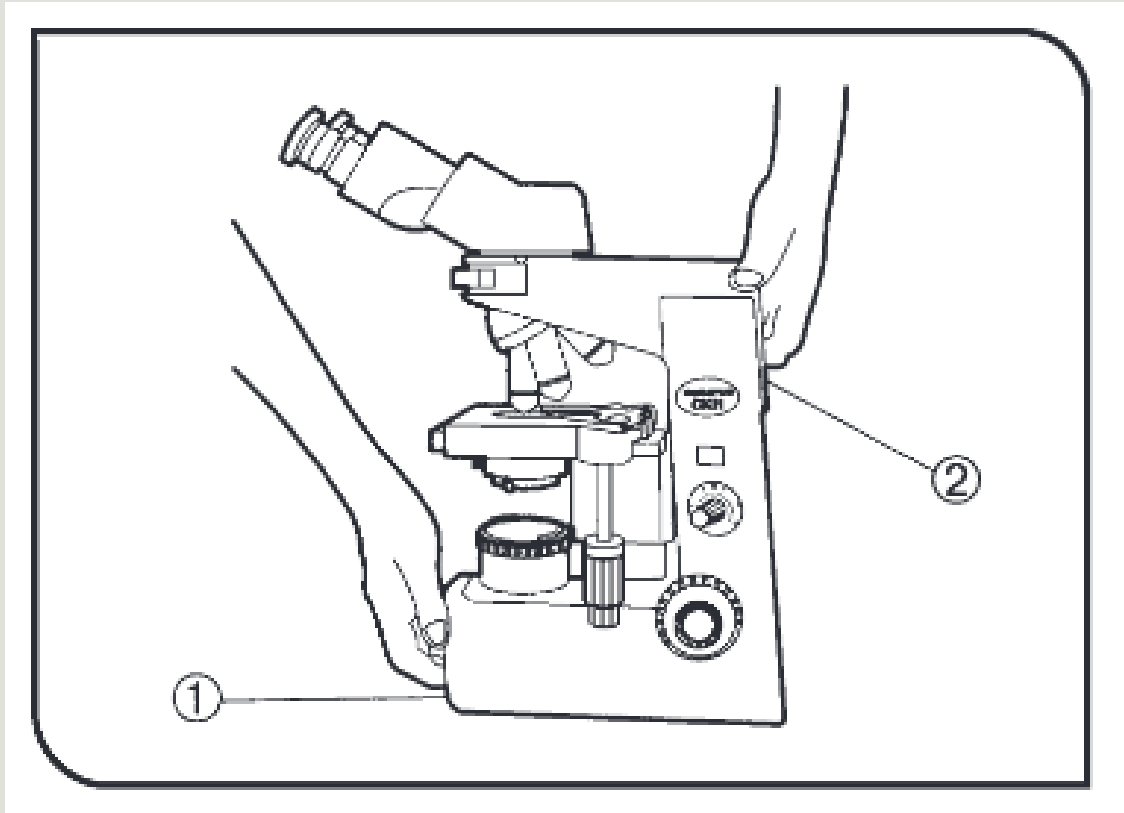
zdroj světla, zrcátko, polní clona, kondenzor, aperturní clona

ČÁST OPTICKÁ:

objektivy, okuláry

Používání světelného binokulárního mikroskopu

Příprava mikroskopu k použití

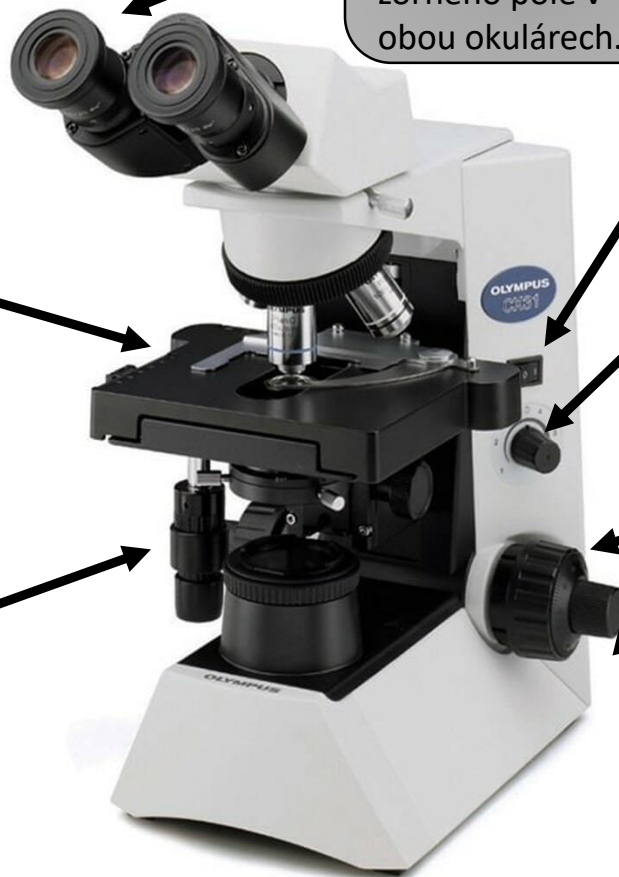


Při **přenášení** uchopte mikroskop opatrně jednou rukou **zespodu za stativ (1)** a druhou rukou jej přidržujte za **úchyt (2) v rameni**.

*Špatné uchopení (např. za stolek, tubus, atd.) může mikroskop poškodit!

Používání světelného binokulárního mikroskopu

Postup při pozorování ve světelném poli



1. Zapněte hlavní vypínač.

2. Otáčením kolečka nastavení **intenzity osvětlení** nastavíme požadovanou intenzitu světla.
*Když mikroskop po spuštění nesvítí, může být intenzita světla stáhnuta na nule!

3. Umístíme preparátu na stolek.

4. Otáčením kolečka **posuvu** v ose Y a X posouváme preparát v svislém směru nebo ve vodorovném směru do světelné dráhy.

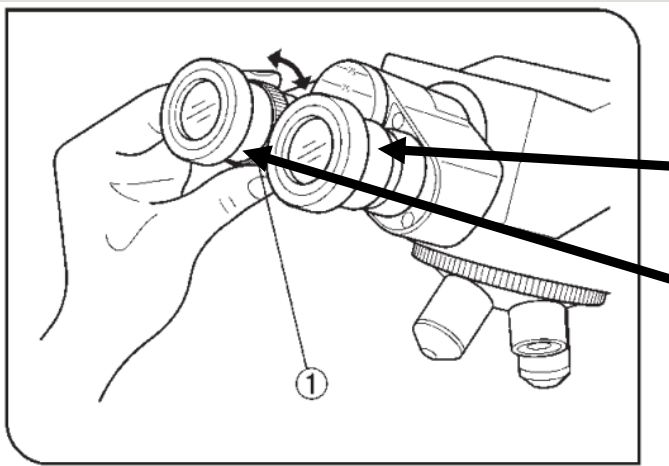
6. Nastavte **vzdálenost okuláru** podle svých očí pro dosažení shodného zorného pole v obou okulárech.

5. Zaostríme. Otáčejte kolečkem makroposuvu (**makrošroub**) ve směru pohybu hodinových ručiček, dokud se objektiv (4x, 10x) nepřiblíží co nejvíce k preparátu. Pozorujte preparát v okulárech a otáčením kolečka makroposuvu v opačném směru posouvejte stolek směrem dolů. Po hrubém zaostrění na preparát doostřete otáčením kolečka mikroposuvu (**mikrošroub**).

Používání světelného binokulárního mikroskopu

Postup při pozorování ve světelném poli

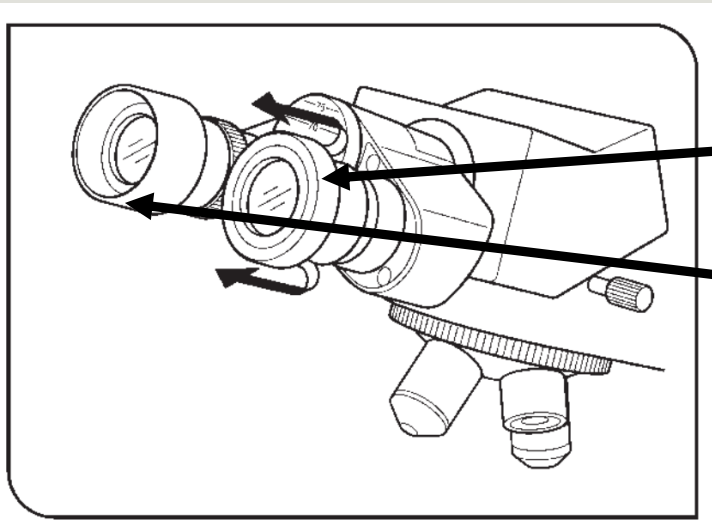
Nastavení dioptrické korekce:



Dioptrickou korekcí se přizpůsobuje zobrazení v okulárech stavu zraku pozorovatele tak, aby obraz byl ostrý pro obě oči.

1. Dívejte se **pravým okem do pravého okuláru** a otáčením **kolečky makroposuvu** a **mikroposuvu zaostřete** na preparát.
2. Dívejte se **levým okem do levého okuláru** a otáčejte pouze **kroužkem dioptrické korekce (1)** dokud nezaostříte preparát.

Použití očnic:



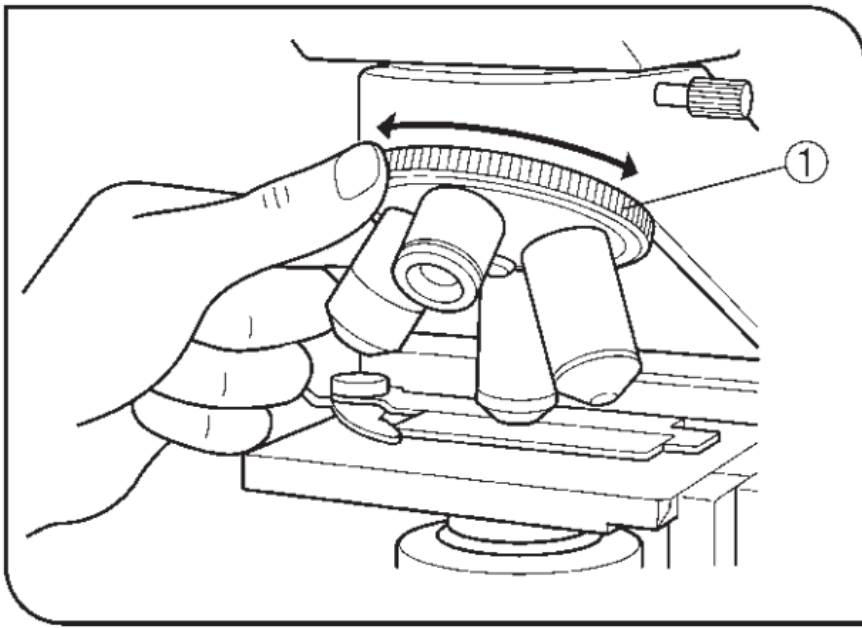
Pozorování s brýlemi - ponechejte **očnice v normální, ohrnuté poloze**. Očnice chrání brýle před poškrábáním.

Pozorování bez brýlí - **odhrňte očnice** ve směru šipek, aby bránily pronikání vnějšího světla mezi očima a okuláry.

Používání světelného binokulárního mikroskopu

Postup při pozorování ve světelném poli

Přepínání objektivů:

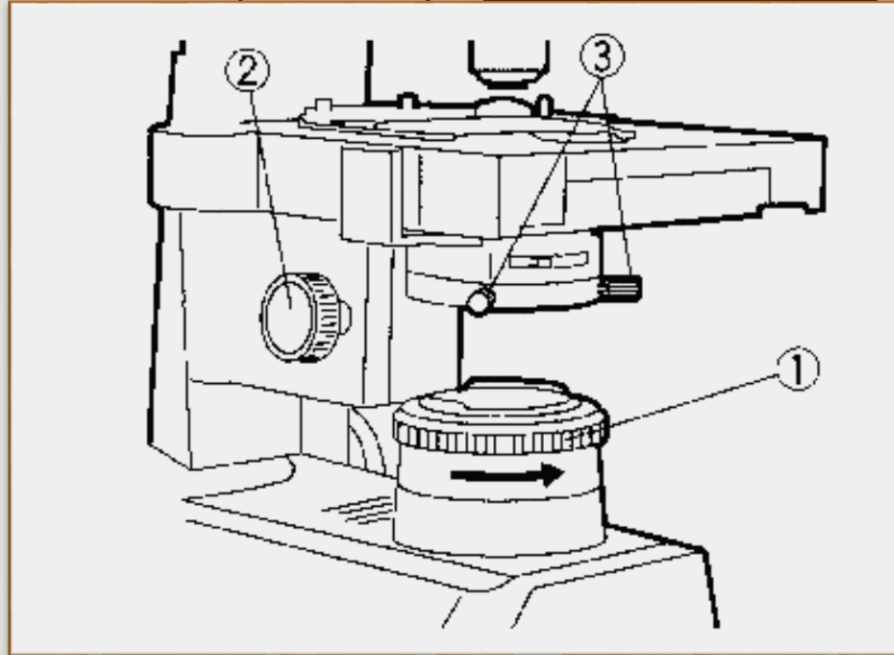


Uchopte **revolverový nosič objektivů (1)** a otáčejte jím, dokud nebude objektiv, který chcete použít, přesně nad preparátem.

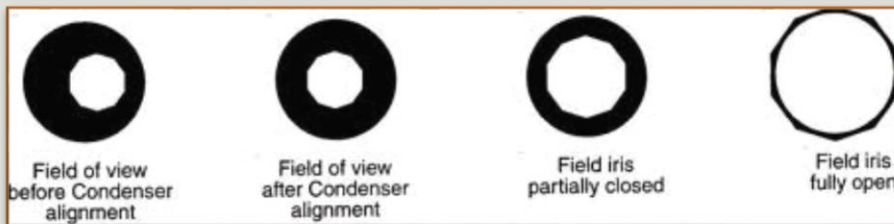
Používání světelného binokulárního mikroskopu

Postup při pozorování ve světelném poli

Centrování polní clony - Köhlerovo osvětlení



1. Umístíme preparát a zaostříme s objektivem 10x
2. Uzavřeme polní clonu (1)
3. Kondenzor snižujeme nebo zvyšujeme tak dlouho, až je **obraz svítícího pole ostře ohraničený** (2)
4. Polní clonu otevřeme tak, aby se **dotýkala okrajů zorného pole**.
5. **Obraz svítícího pole posuneme centrovacími šrouby** (3) kondenzoru **do středu** zorného pole
6. Má-li kondenzor stupnici numerické apertury, nastavíme na ní hodnotu přibližně $\frac{3}{4}$ numerické apertury objektivu.



Nastavujeme do optimální polohy:

- *clonu osvětlovacího systému*
- *clonu kondenzoru*
- *polohu kondenzoru*

*Výsledkem Köhlerova nastavení je rovnoměrné a maximální osvětlení preparátu, ležícího v předmětové rovině. Současně by měla být dosažena nejlepší kombinace mezi rozlišovací schopností a kontrastem.

Světelný binokulární mikroskop

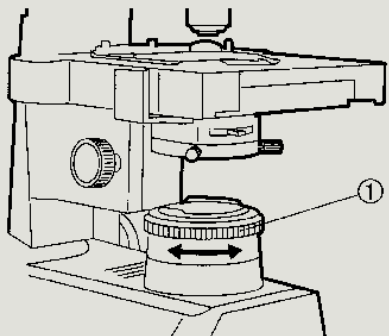
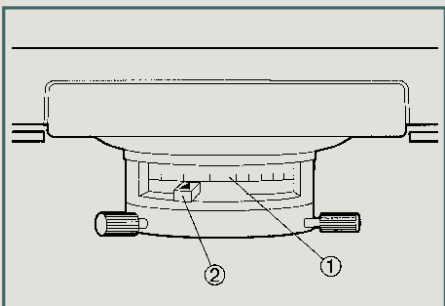
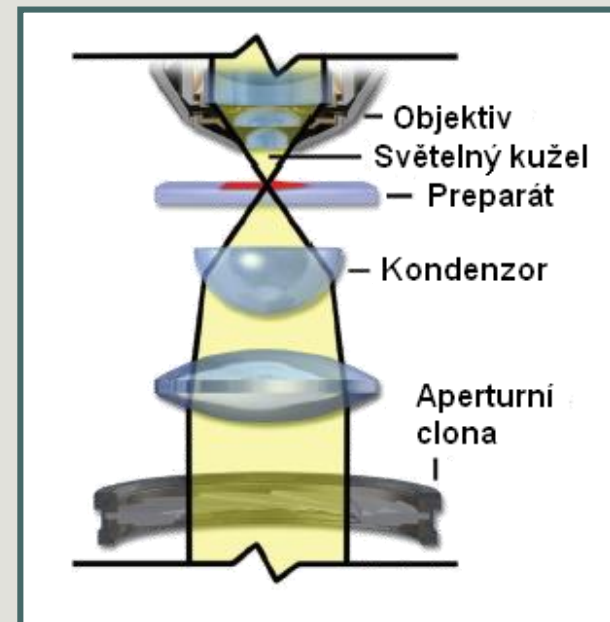
1. Osvětlovací část



Kondenzor soustřeďuje světlo ze světelného zdroje do kužele, který:
1. *rovnoměrně osvětluje preparát*
2. *odpovídá numerické apertuře objektivu*

Aperturní clona (kondenzorová, irisová) - umístěna před vlastní soustavu kondenzorových čoček a vymezuje šířku proudu světla, který prochází kondenzorovými čočkami.
(1) stupnice, podle které se nastavuje numerická apertura kondenzoru
N.A. kondenzoru = 80% N.A. objektivu

Polní clona – vymezuje maximální velikost zorného pole, používá se při malém zvětšení (objektiv 4x), viz práce s mikroskopem



Světelný binokulární mikroskop

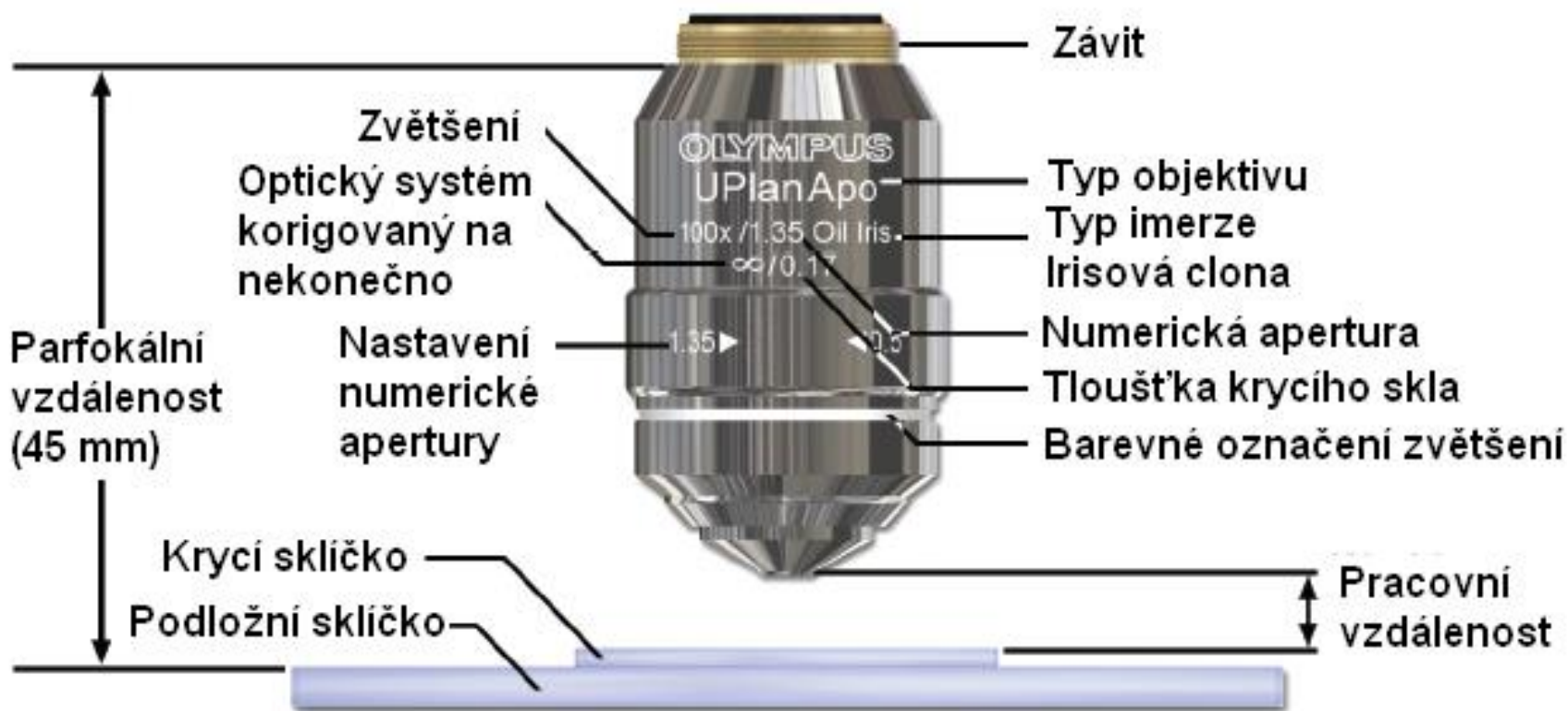
2. Optická část

2.1. Objektivy

Vytváří zvětšený převrácený a skutečný obraz předmětu.

Čím je kratší ohnisková vzdálenost objektivu, tím je větší zvětšení.

Údaje vyznačené na objektivu:



Světelný binokulární mikroskop

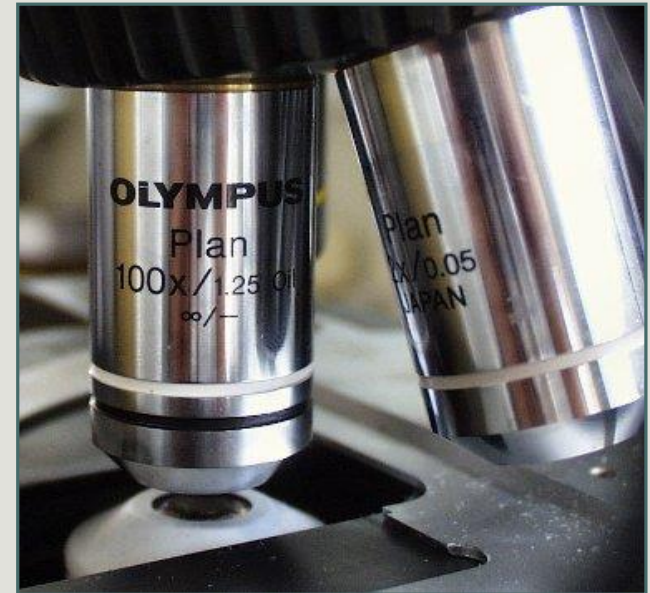
2. Optická část

2.1. Objektivy

Barevné značení objektivů



4X červená; 10X žlutá; 10X zelená; 40X modrá, 100X bílá



Imerzní objektivy - druhý barevný pruh - typ imerze (černý - olej, bílá - voda, okrová - glycerol)

Světelný binokulární mikroskop

2. Optická část

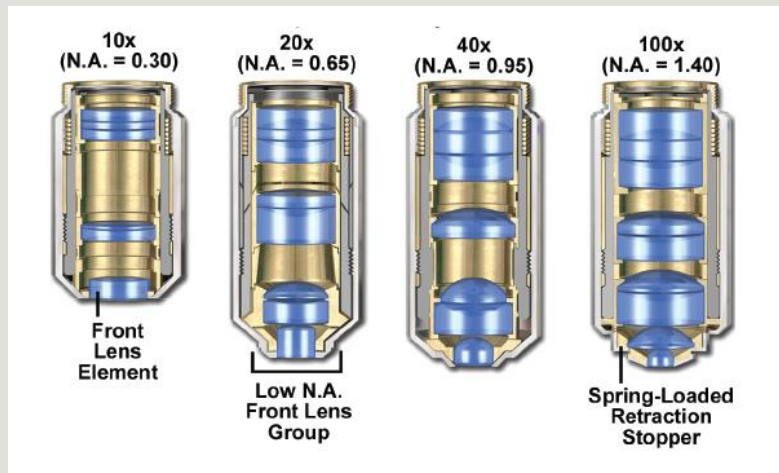
2.1. Objektivy

Numerická apertura objektivu

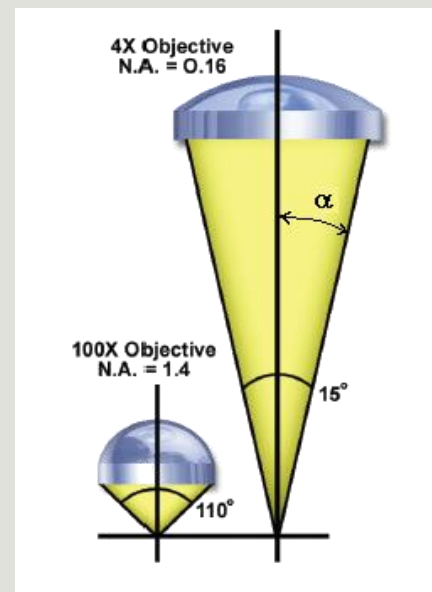
Numerická apertura (N.A.) = $n \times \sin \alpha$

N.A. ≥ 1 nelze dosáhnout bez imerze!!!

Se zvětšením roste numerická apertura objektivu.



n....index lomu prostředí (mezi objektivem a preparátem)
 αúhel mezi středním a okrajovým paprskem světla vstupujícího do objektivu



*Numerická apertura je číselná hodnota. S rostoucí numerickou aperturou roste i rozlišovací schopnost objektivu.

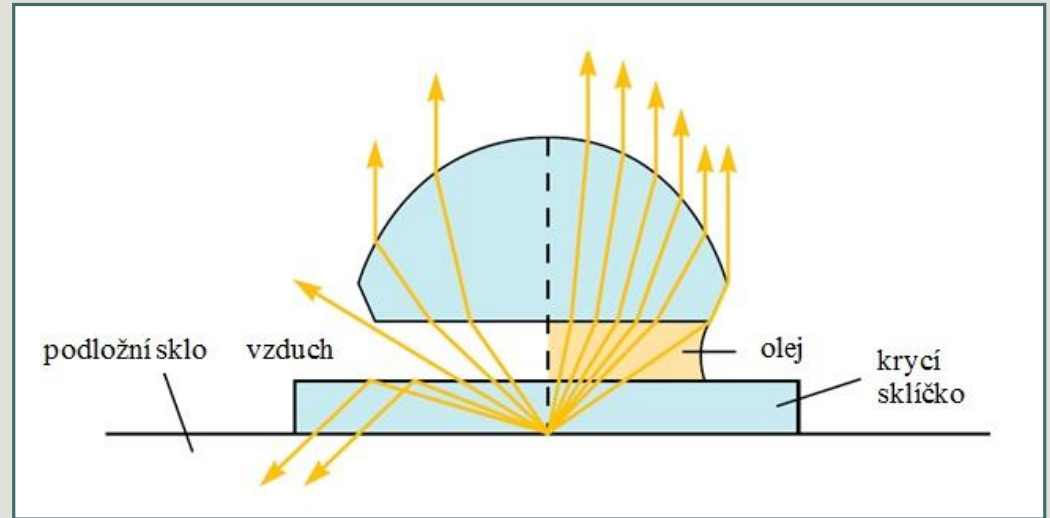
Světelný binokulární mikroskop

2. Optická část

2.1. Objektivy

Význam použití imerze

Přidáním imerzního oleje, který má vyšší index lomu než vzduch, mezi preparát a objektiv se předchází ztrátám světla, které se láme na rozhraní preparát/prostředí. Do objektivu pak dopadne větší množství paprsků.



Place one small drop of immersion oil on the spot of light.

Slowly rotate the 100X objective into alignment while checking to make sure it does not strike the slide.

If you were properly focused under the 40X objective, the 100X will rotate into place without striking the slide.

Světelný binokulární mikroskop

2. Optická část

2.1. Okuláry

Pro optimalizaci výsledků je potřeba vybírat okuláry odpovídající použitým objektivům (jejich typu a korekci vad).

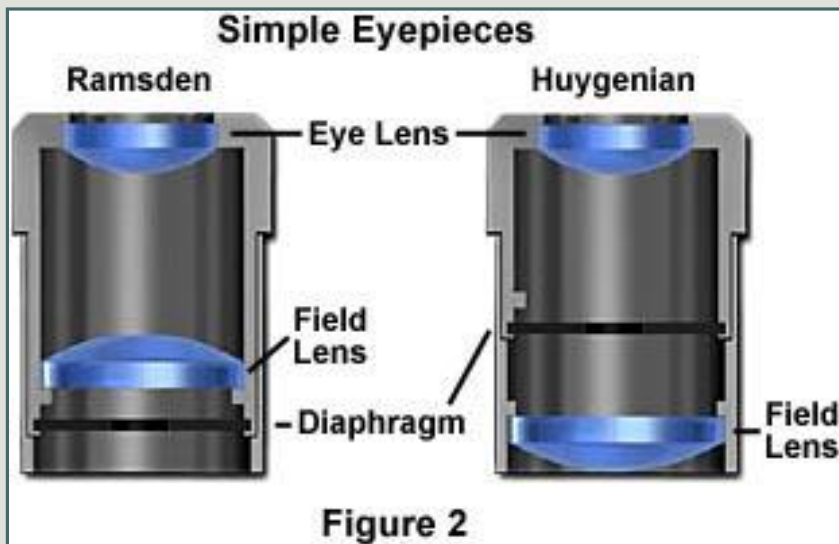
Zvětšuje obraz vytvořený objektivem.

***Zvětšení okuláru je prázdné – nezobrazuje více detailů, než bylo zobrazeno objektivem!**

Podle uspořádání čoček a pevné clony se okuláry dělí na:

negativní (Huygensovy)

pozitivní (Ramsdenovy) - umožňuje snadnou montáž měřítka – pozor na prach!



Světelný binokulární mikroskop

Zvětšení mikroskopu

Zvětšení obrazu mikroskopem je dáno zvětšením okulárů a zvětšením objektivu.

Užitečné zvětšení mikroskopu:

- Minimální – numerická apertura objektivu x 500
- Maximální – numerická apertura objektivu x 1000
- Maximální užitečné zvětšení mikroskopu je však určeno i rozlišovací schopností objektivu. Za podmínek, kdy je minimální vzdálenost dvou rozlišitelných bodů srovnatelná s rozlišovací schopností lidského oka, obraz se nezlepší ani při použití silně zvětšujících okulárů, kdy dostaneme jen rozměrnější obraz bez nových detailů.

Celkové zvětšení $\leq 1000 \times \text{N.A. objektivu}$

Příklad 1:

Objektiv 40 ×, N.A. = 0,65

Okuláry 15 × $40 \times 15 = 600 \leq 650$ O.K.

Příklad 2:

Objektiv 100 ×, N.A. = 1,3

Okuláry 15 × $100 \times 15 = 1500 > 1300$ ✗

Okuláry 12,5 × $100 \times 12,5 = 1250 \leq 1300$ O.K.

Pozor na další zvětšení při přenosu digitálního obrazu na monitor!

Světelný binokulární mikroskop

Kvalita zobrazení biologických objektů závisí na:

1. dostatečném zvětšení obrazu (pozor na **maximální užitečné zvětšení = numerická apertura objektivu x 1000**)
2. rozlišovací schopnosti mikroskopu (závisí na numerické apertuře objektivu a kondenzoru a kvalitě osvětlení preparátu , tj. optimálním nastavení **Köhlerova osvětlení**)
3. **kontrastu obrazu**, který lze efektivně zvýšit pomocí:
 - cytologických a histologických barviv
 - optických metod, které převádějí rozdíly v indexu lomu různě tlustých částí objektů na jasový kontrast obrazu

Světelný binokulární mikroskop

Kontrastní metody

Slouží k zvýšení kontrastu obrazu tak, aby byl dobře pozorovatelný.

Nejpoužívanější metody:

Temné pole (DF)

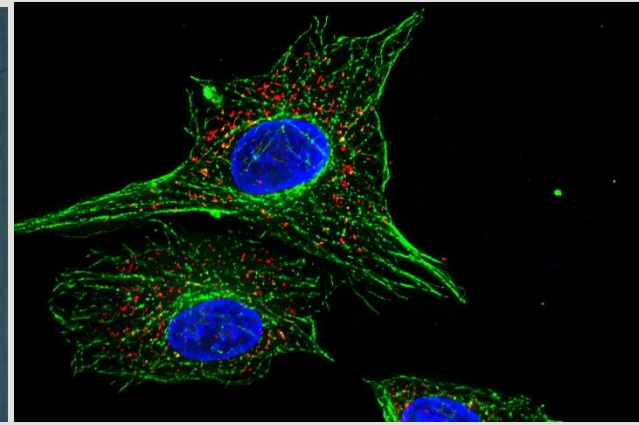
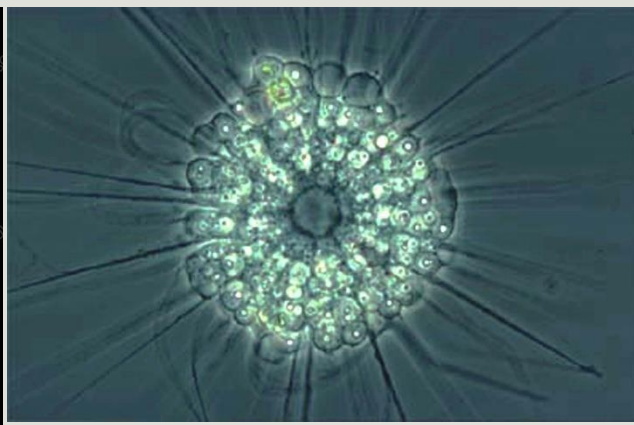
Fázový kontrast (PH1, PH2, PH3)

Polarizované světlo

Reliéfní kontrast

Diferenciální interferenční kontrast

Fluorescence

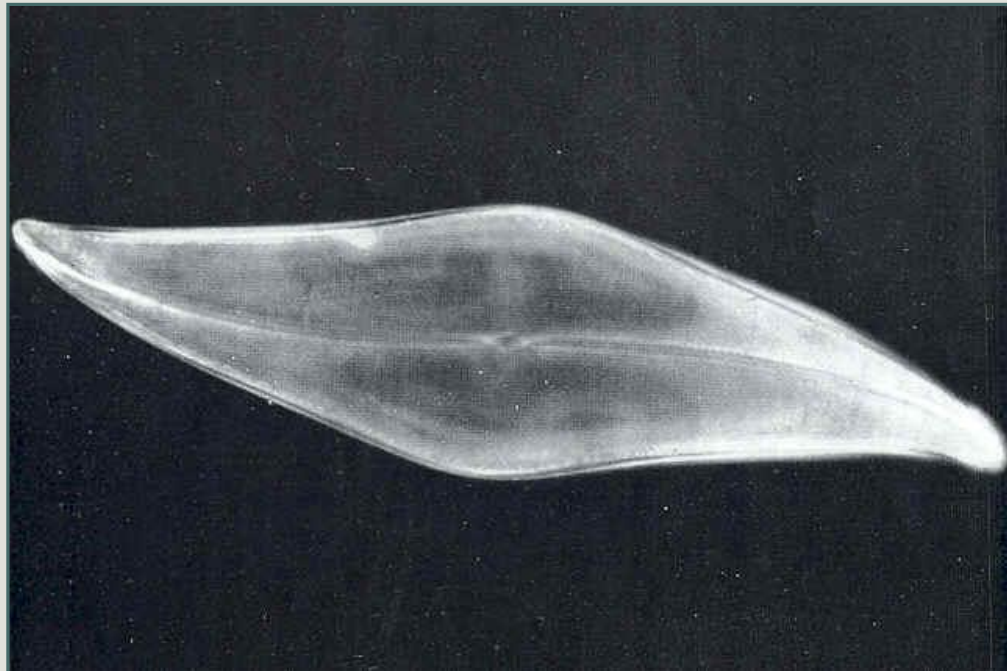
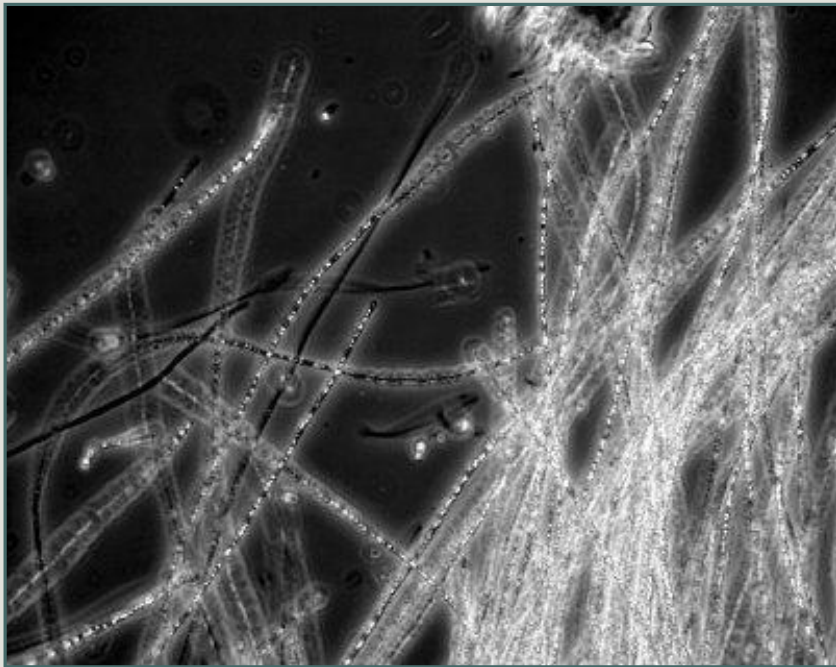


Světelný binokulární mikroskop

Kontrastní metody

Pozorování v temném poli – *Darkfield* (DF):

Metoda se používá pro pozorování drobných objektů a jejich povrchových struktur, např. prvků, houbových spor, pylových zrn, bakterií, ale i rostlinných pletiv aj.



Pleurosigma (Diatomaceae). Suchý preparát. Temné pole.

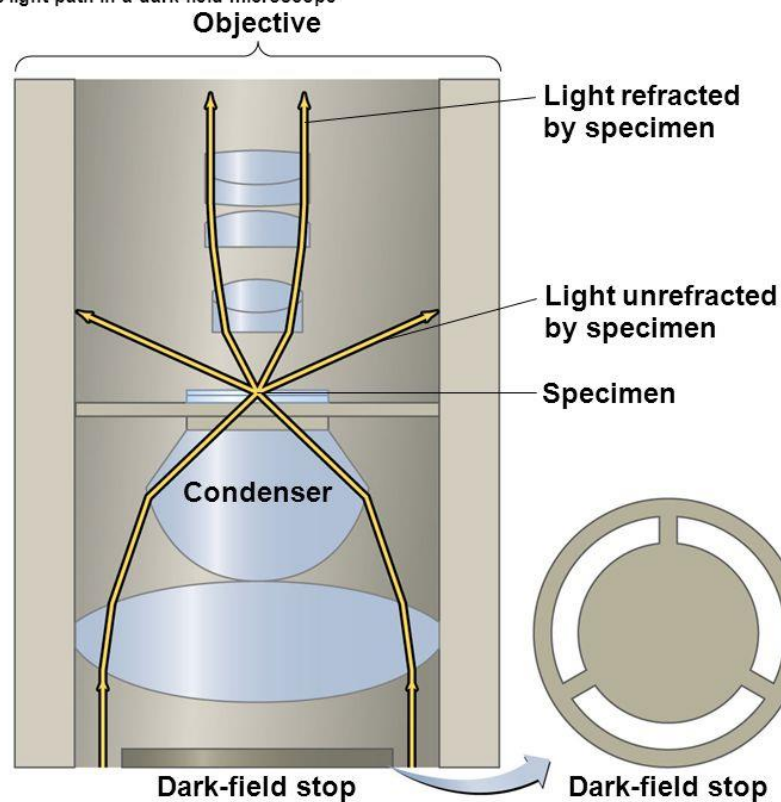
Světelný binokulární mikroskop

Kontrastní metody

Pozorování v temném poli – Darkfield (DF):

Podstata mikroskopie v temném poli neboli **zástinu** spočívá v tom, že do roviny objektu vstupují z kondenzoru pouze okrajové, velmi šikmé světelné paprsky, zatímco středové paprsky jsou pohlceny a při zobrazení se neuplatní. Objekt je tedy osvětlen jen ze stran, paprsky se od něj odrážejí a lámou. Do objektivu vstupují jen paprsky odražené od povrchu objektu a ten proto září v temném poli.

Figure 4.6 The light path in a dark-field microscope



© 2012 Pearson Education, Inc.

Universal Condenser Turret Configuration

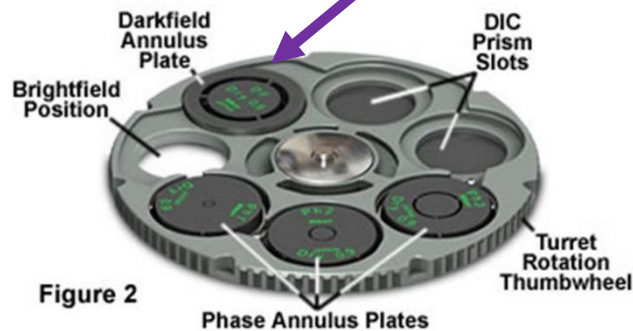


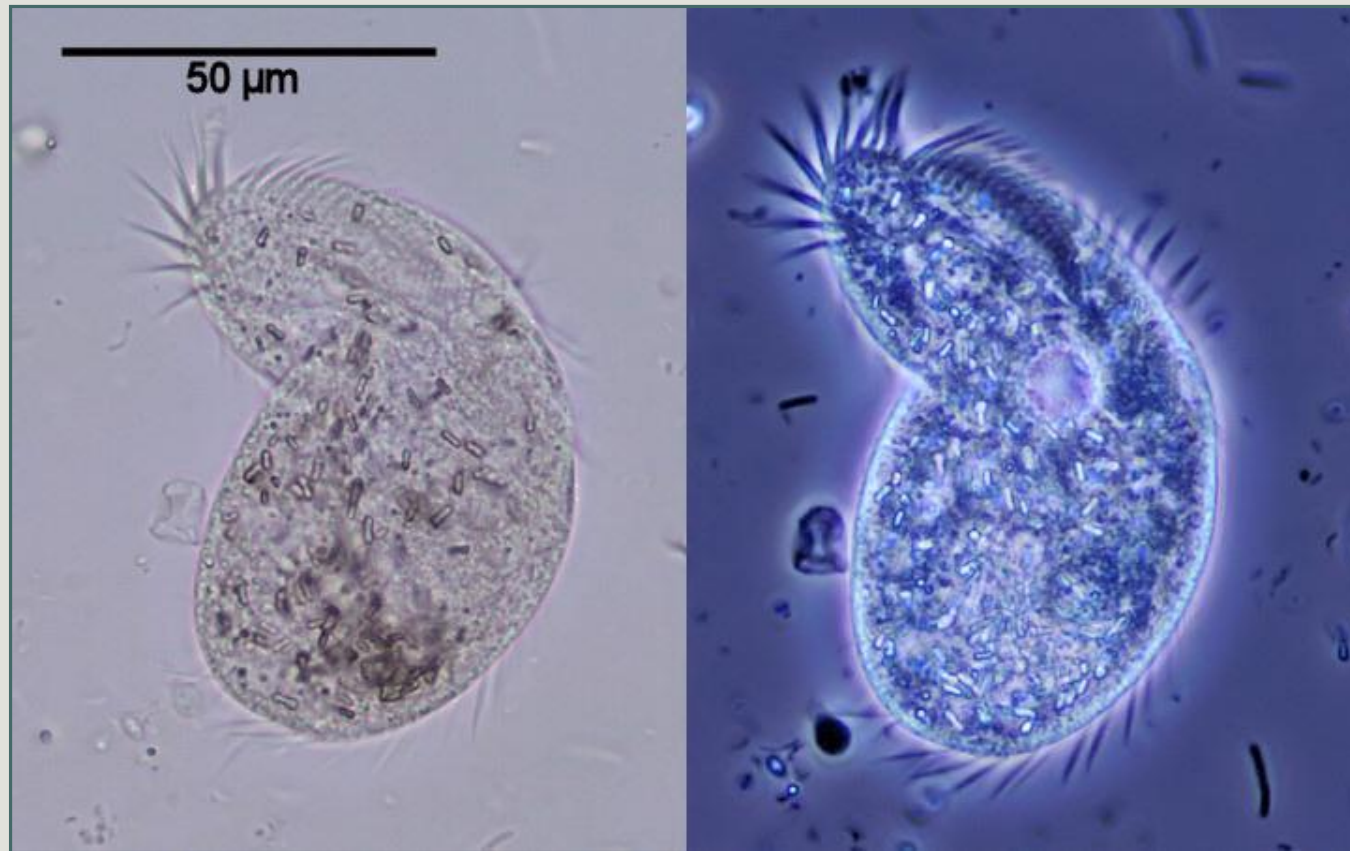
Figure 2

Světelný binokulární mikroskop

Kontrastní metody

Metoda fázového kontrastu – (PH):

Pozorování nativních nebo nebarevných preparátů - vystoupí i nejjemnější struktury v běžném světle téměř neviditelné (např. studium buněčných a tkáňových kultur).



Nálevník - Procházející světlo

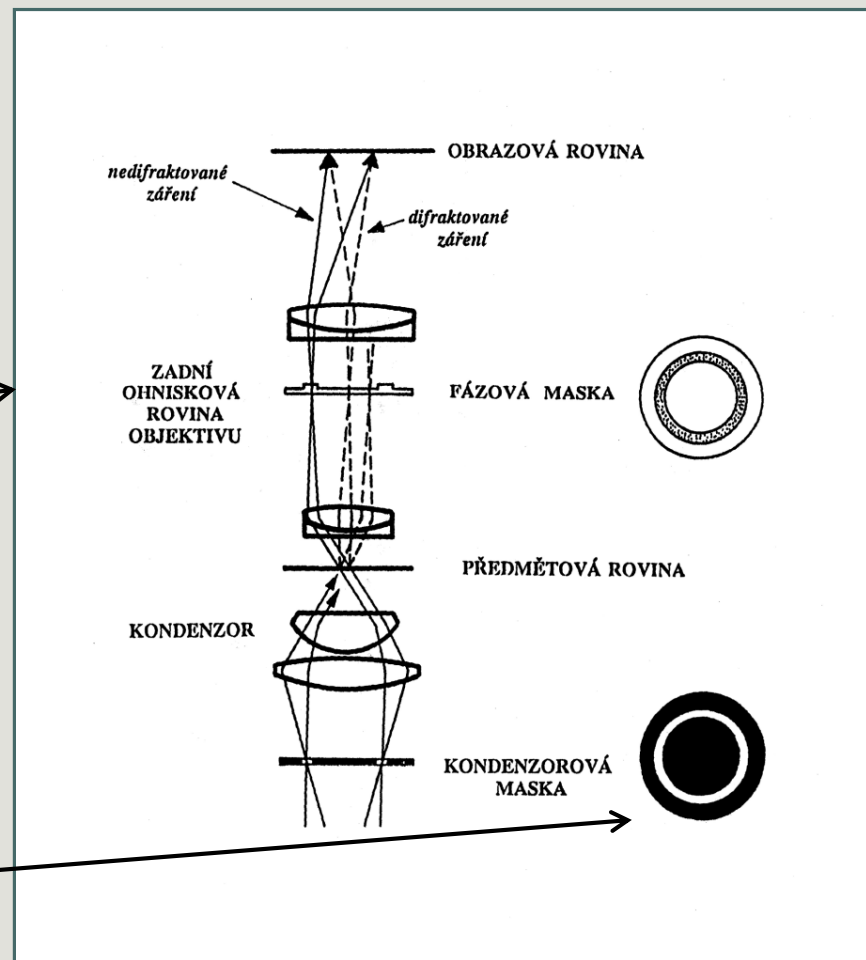
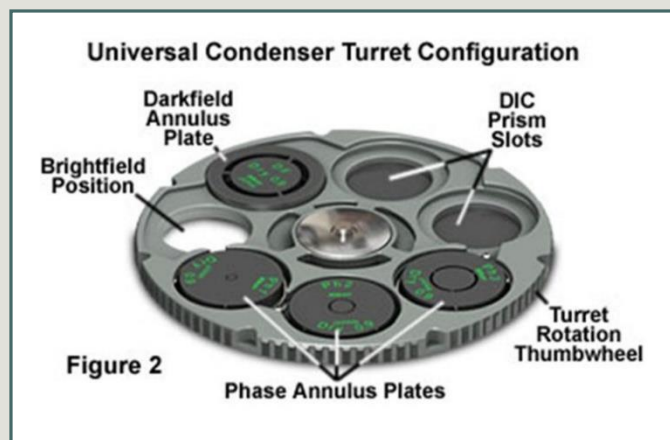
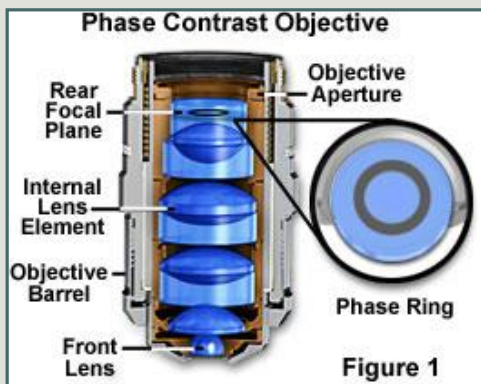
Nálevník - Fázový kontrast

Světelný binokulární mikroskop

Kontrastní metody

Metoda fázového kontrastu – (PH):

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



Světelný binokulární mikroskop

Kontrastní metody

Metoda fázového kontrastu – (PH):

V ohniskové rovině **kondenzoru** se nachází prstencovitá clona (**maska** s kruhovou šterbinou), kterou proniká světlo do objektu a **v objektivu**, v místě obrazu kondenzorové masky, je umístěna **fázová maska**. V místě šterbiny u kondenzorové masky je u masky fázové napařená polopropustná vrstva kovu, která mění fázi světla o **čtvrtinu vlnové délky**. Díky tomuto uspořádání prochází nedifraktované (neohnuté) záření ze zdroje (šterbiny kondenzorové masky) tou částí fázové masky, která mění fázi světla. Ostatní vlnění, které se na objektu ohnulo a nebo zlomilo, projde beze změny. Při interferenci vln v obrazové rovině se části objektu, které různým způsobem mění fázi světla projeví různou intenzitou světla.

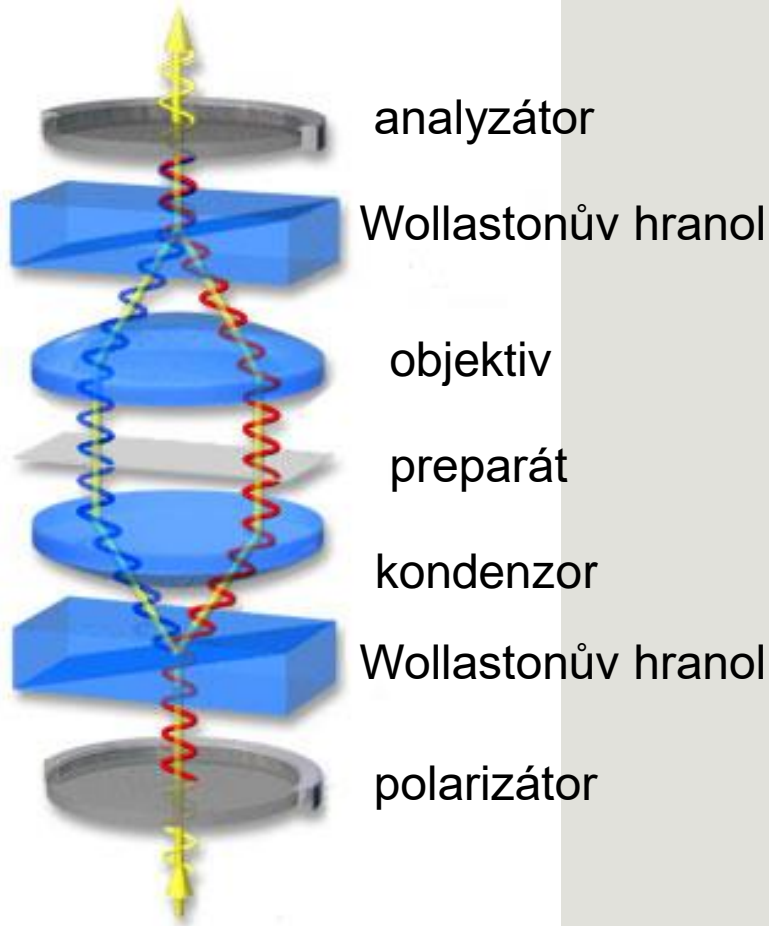
Jedním z typických artefaktů vznikajících při pozorování ve fázovém kontrastu je "**halo efekt**" ohraničující objekty. Tento efekt je výsledkem neúplného prostorového oddělení optických drah světla pozadí a světla procházejícího objektem. Část světla po průchodu objektem sdílí optickou dráhu se světlem pozadí i během průchodu fázovou deskou objektivu a dochází tak k posunu fáze odlišnému od ostatního světla procházejícího objektem. Výsledkem je právě vznik "halo" na hranicích objektu.



Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC)

kolem 1950, Georges Nomarski

mikroskop - 1959 Carl Zeiss



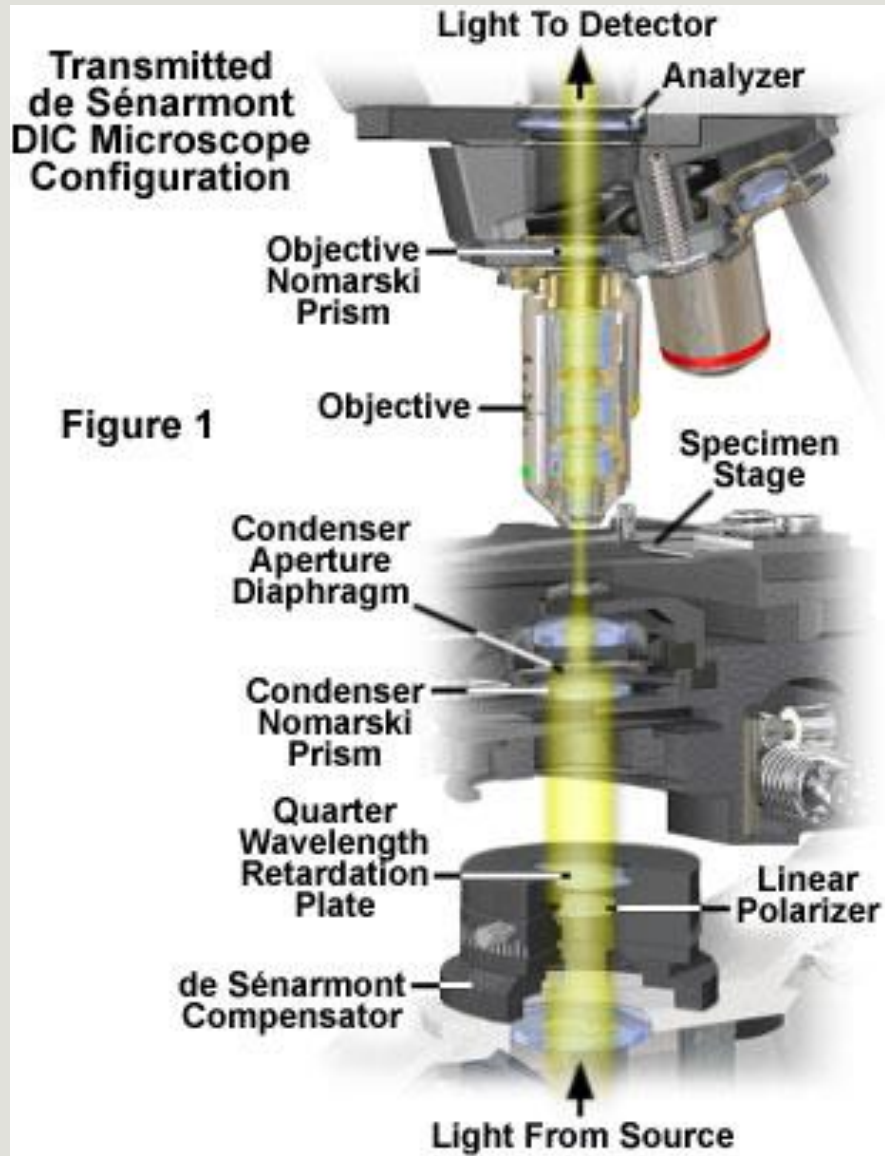
interference dvou laterálně posunutých obrazů a srovnání fázových rozdílů v celé ploše obrazu

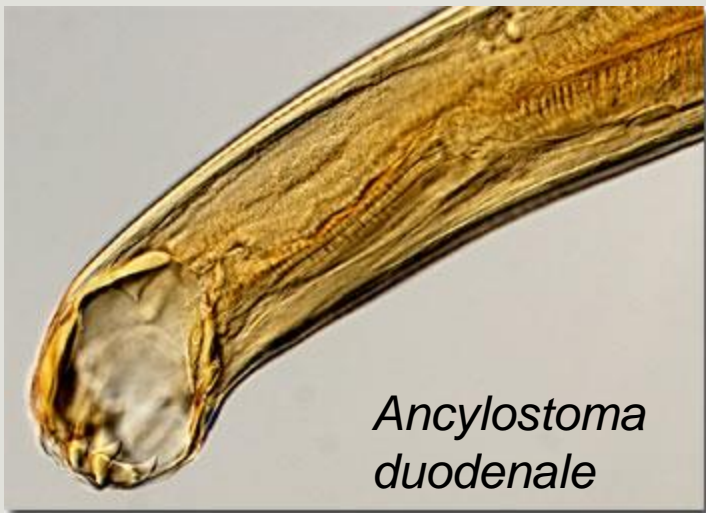
vzniknou dva identické obrazy objektu, které jsou vůči sobě laterálně posunuty různá tloušťka preparátu = fázové rozdíly

rozdělení polarizovaného světla na dvě složky

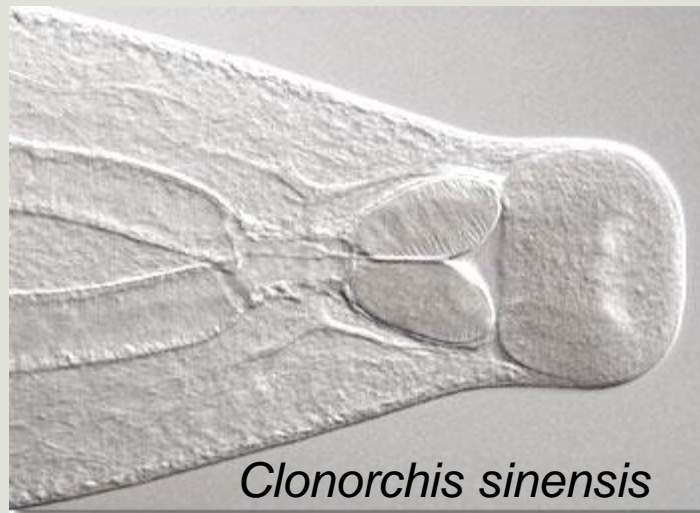
lineární polarizace světla

Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC)





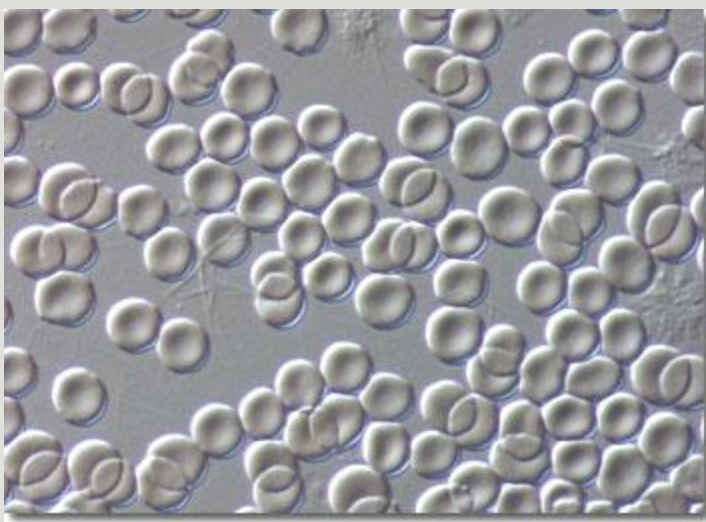
*Ancylostoma
duodenale*



Clonorchis sinensis



pylové zrno borovice



červené krvinky



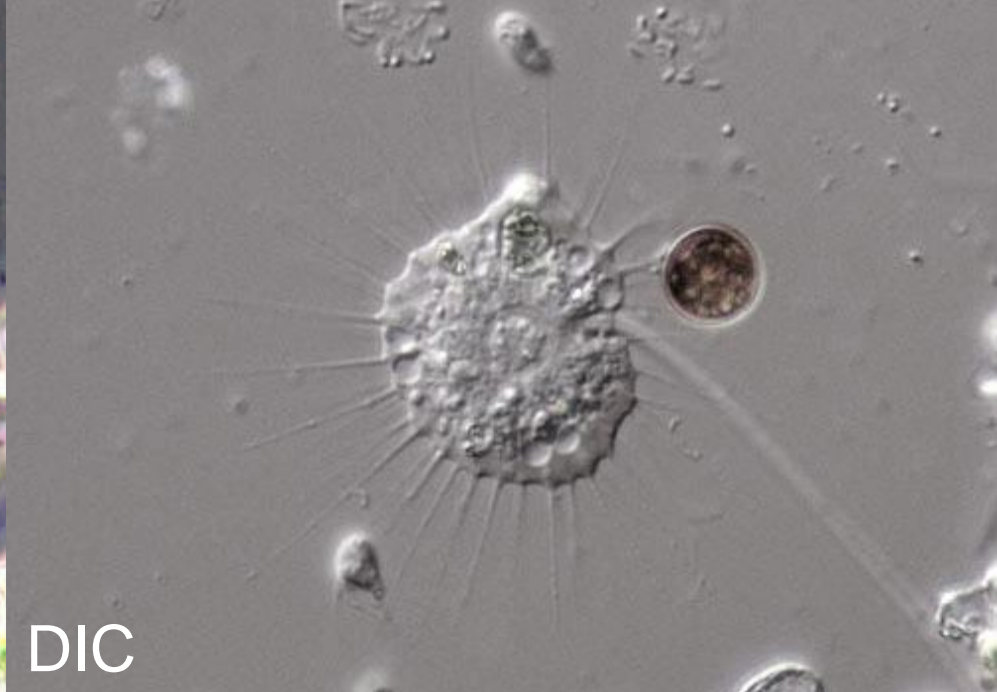
řez ledvinou myši



příchytné svorky diplozoona



Fázový kontrast



DIC



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

