

Fázový kontrast

Hana Cempírková, Ph.D.

Význam fázového kontrastu

- **objekty amplitudové** = barevné nebo nabarvené – větší nebo menší měrou absorbují světlo = mění amplitudu procházejícího vlnění
- **objekty fázové** = od svého okolí se liší jen malou změnou indexu lomu = nemění amplitudu vlnění, ale posunují jeho fázi
- lidské oko není citlivé na posun fáze

- fázový kontrast přeměňuje fázové posuny vlnění na změnu amplitudy a umožňuje tak pozorování **živých nebarvených objektů**

Fritz Zernike – holandský fyzik nositel Nobelovy ceny za fyziku v roce 1953

- Formuloval zásady fázového kontrastu
- 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.



1888 – 1966

Souprava pro fázový kontrast

fázové objektivy
s fázovou deskou
Phz

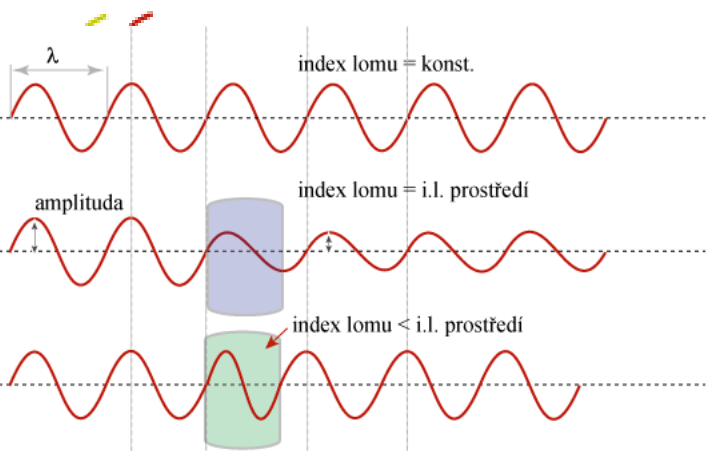
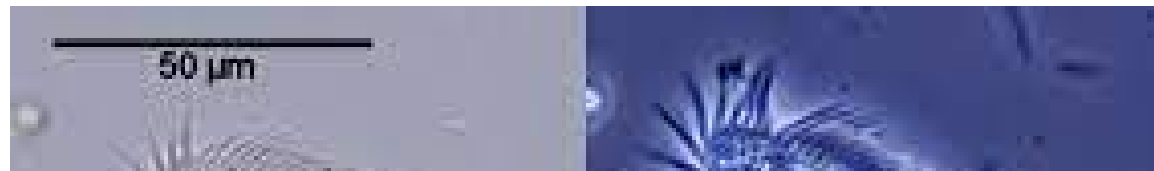
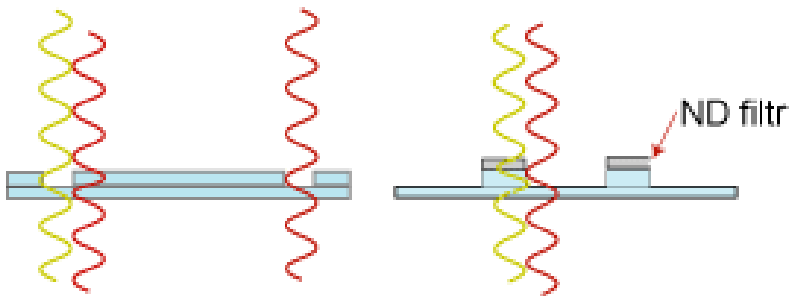


pomocný mikroskop
pro centrování
clony a fázové desky

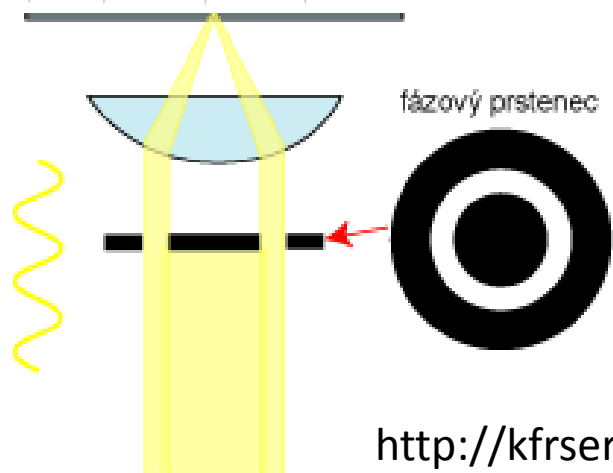
fázový kondenzor s prstencovými clonami

pozitivní fázový kontrast

negativní fázový kontrast



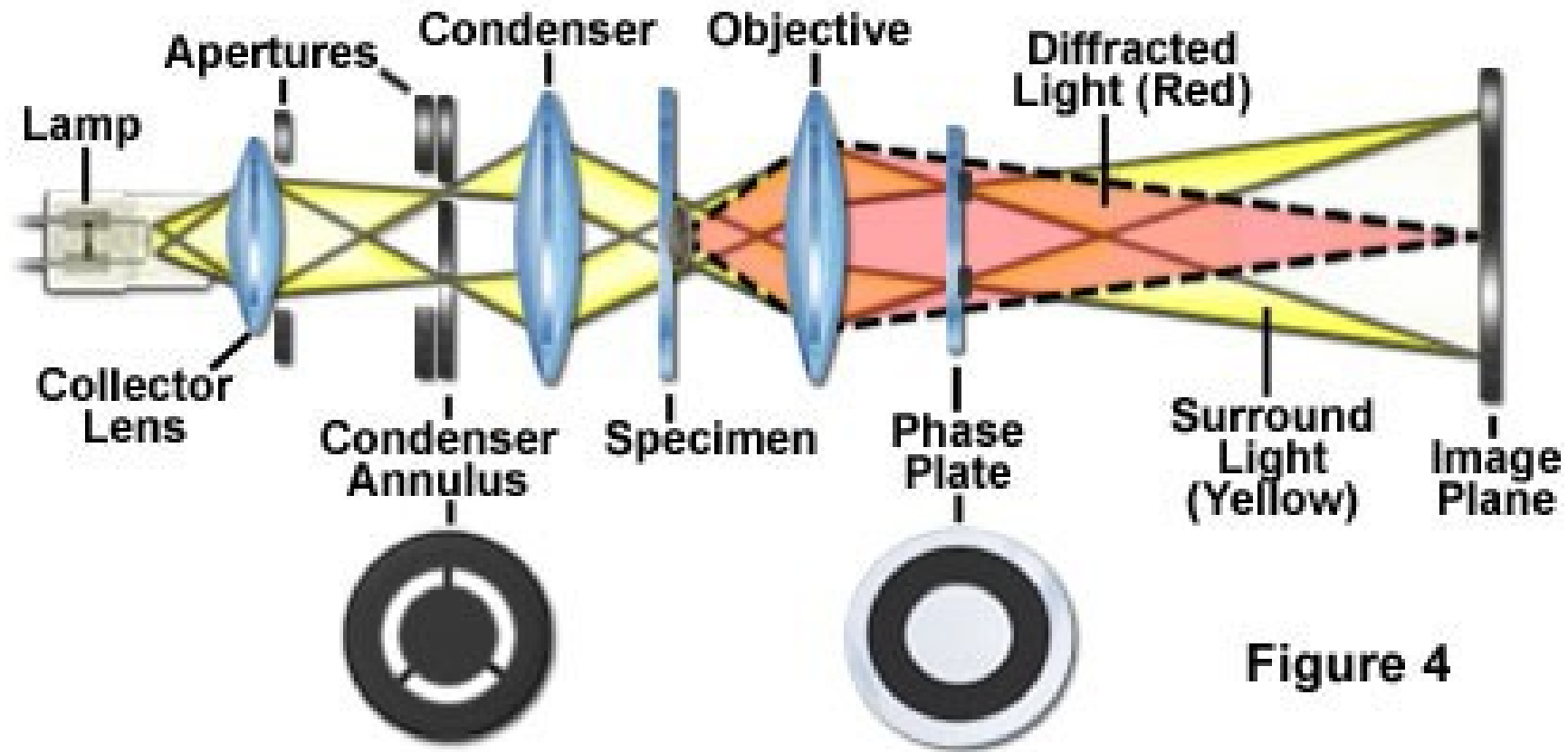
- při průchodu homogenním prostředím nedochází ke změně parametrů procházejícího světla - fáze i amplituda se nemění
- při průchodu objektem, neliší se indexem lomu, dochází k absorpci světla a změně jeho amplitudy (v porovnání s prvním případem), která se projeví změnou v intenzitě (jasu). Obvyklejší je, že průchod světla objektem provází i změna fáze.
- objekt je transparentní, nedochází k absorpci světla (změně v amplitudě a jasu), ale rozdíl v indexu lomu způsobí posun fáze vlnění (srovnej podle svislých čar)



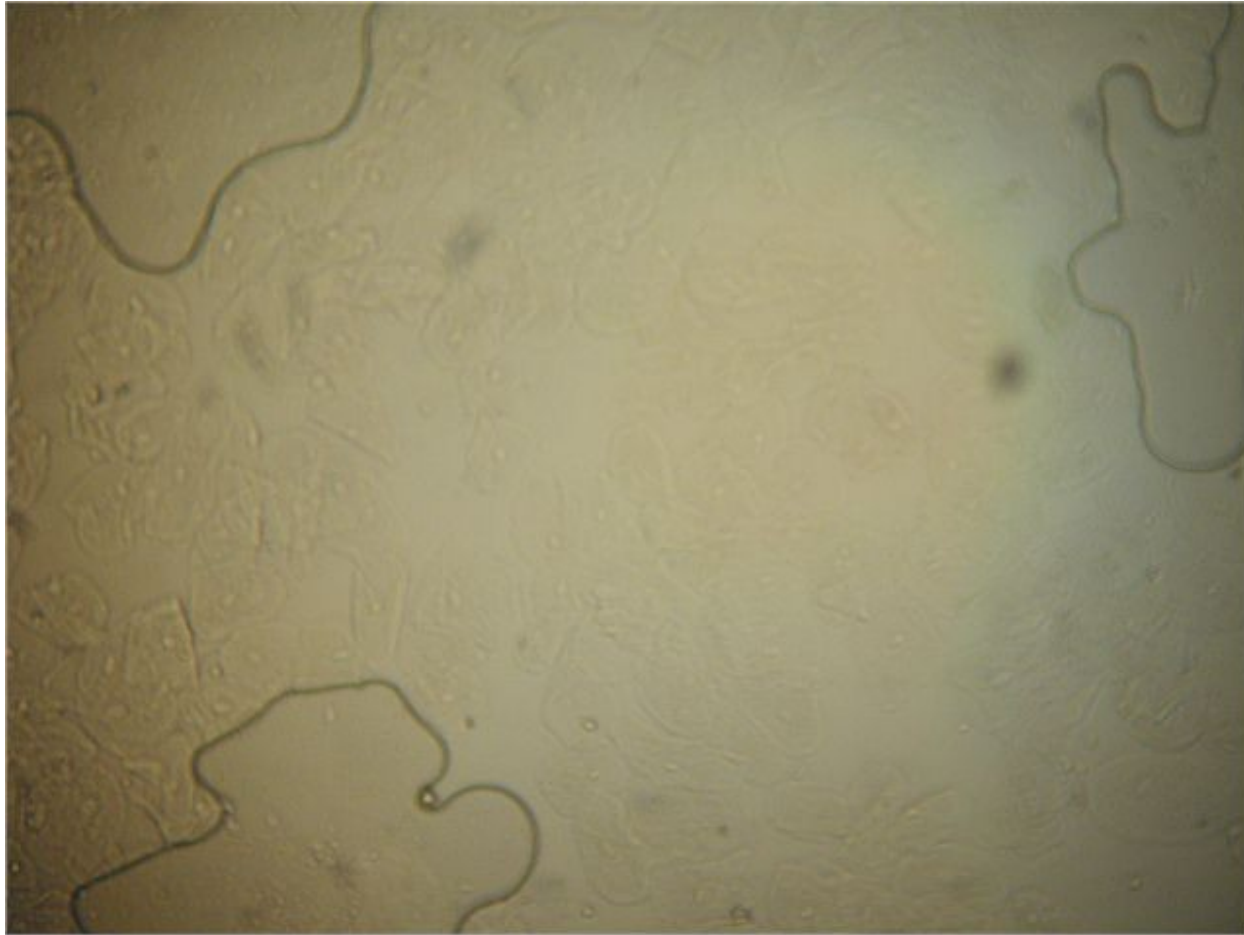
<http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/DIC/fk.htm>

Schéma fázového kontrastu podle Zernikeho

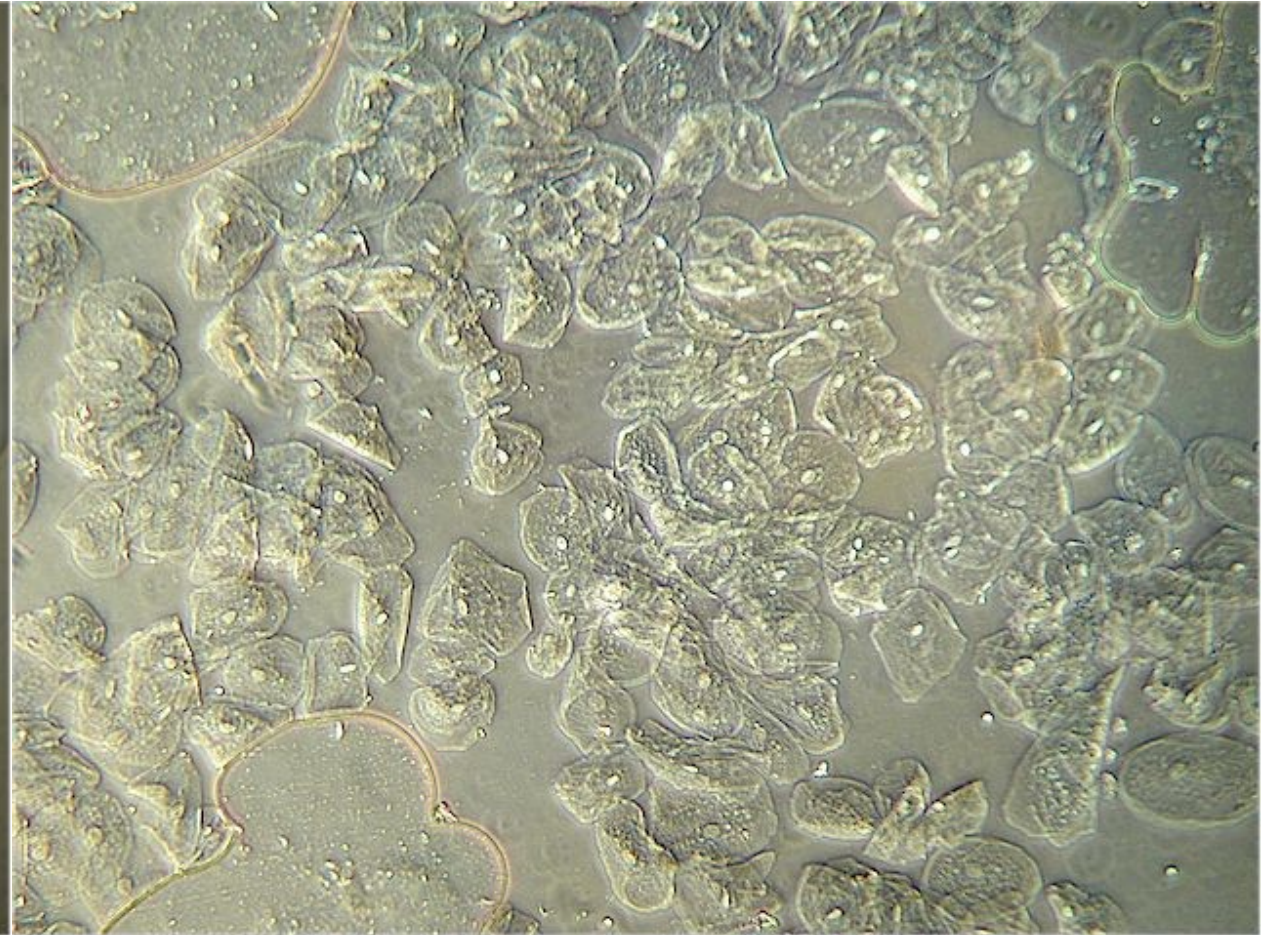
Phase Contrast Microscope Optical Train



Srovnání obrazu preparátu epiteliálních buněk sliznice



v procházejícím světle



ve fázovém kontrastu

Srovnání obrazu projasněného semene

Capsella bursa-pastoris

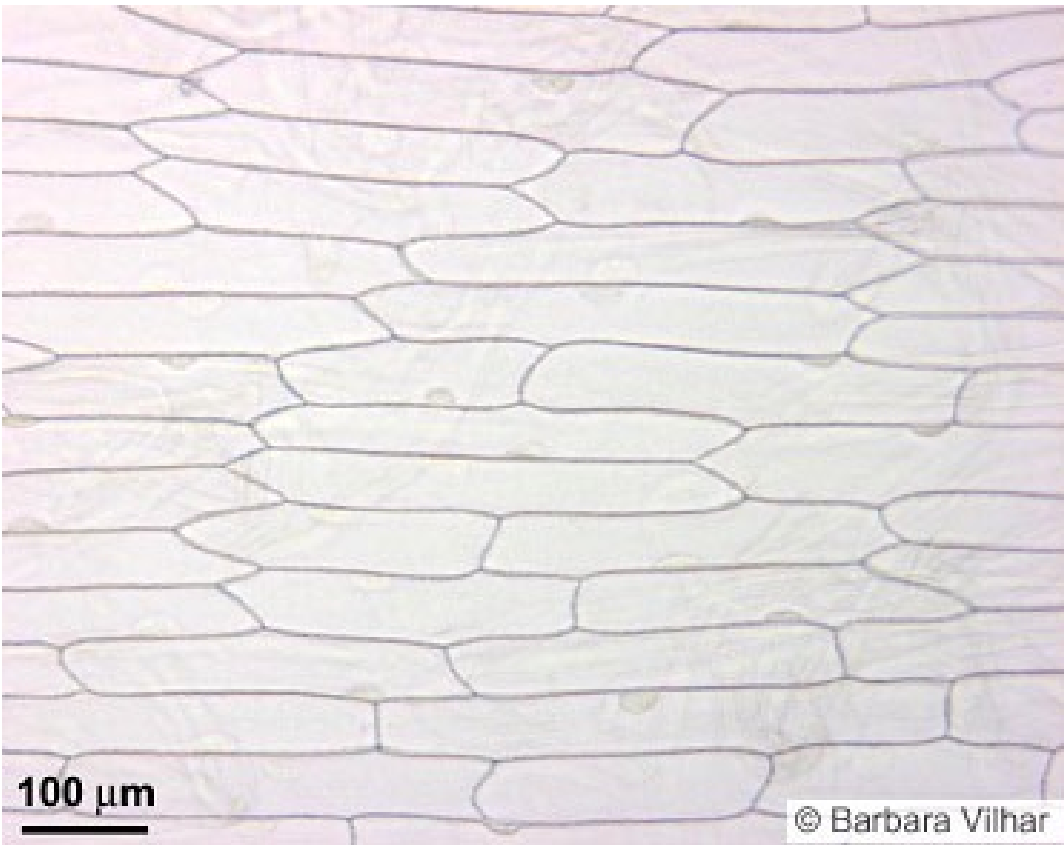


při šikmém osvětlení

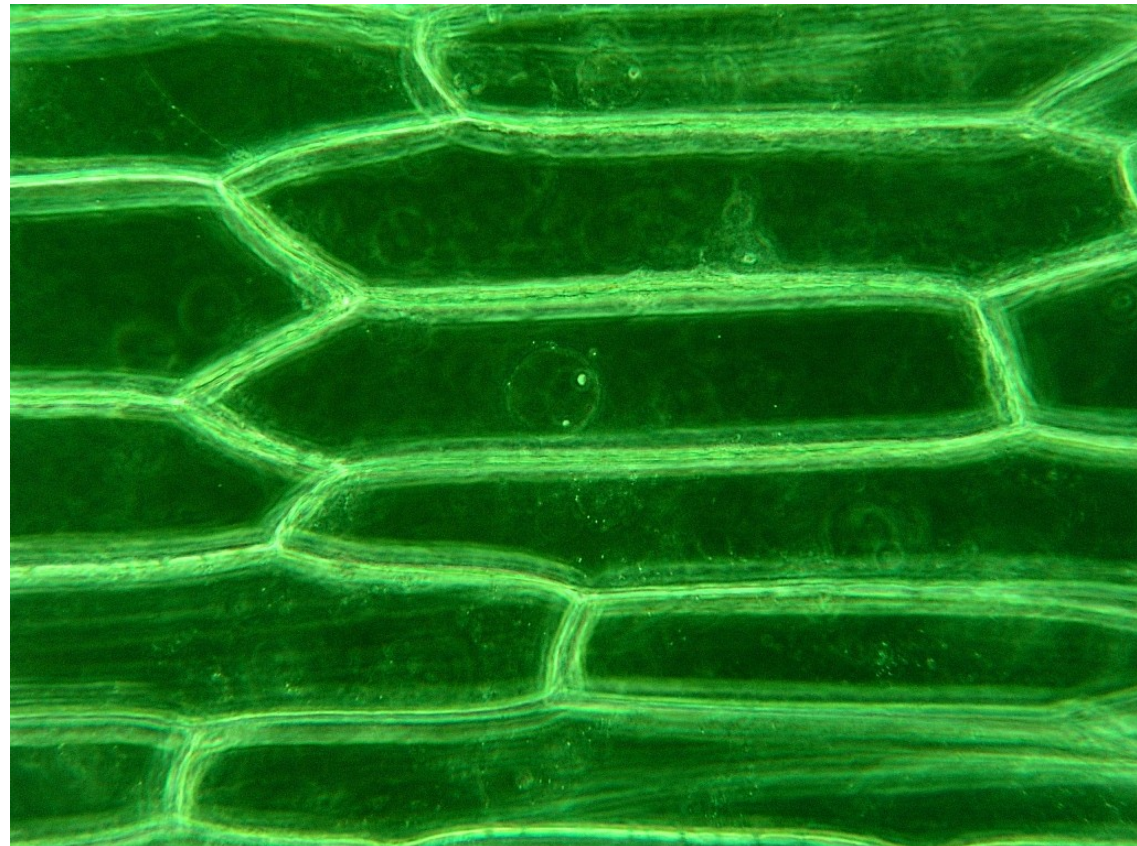


ve fázovém kontrastu

Srovnání obrazu epidermis cibule



v procházejícím světle



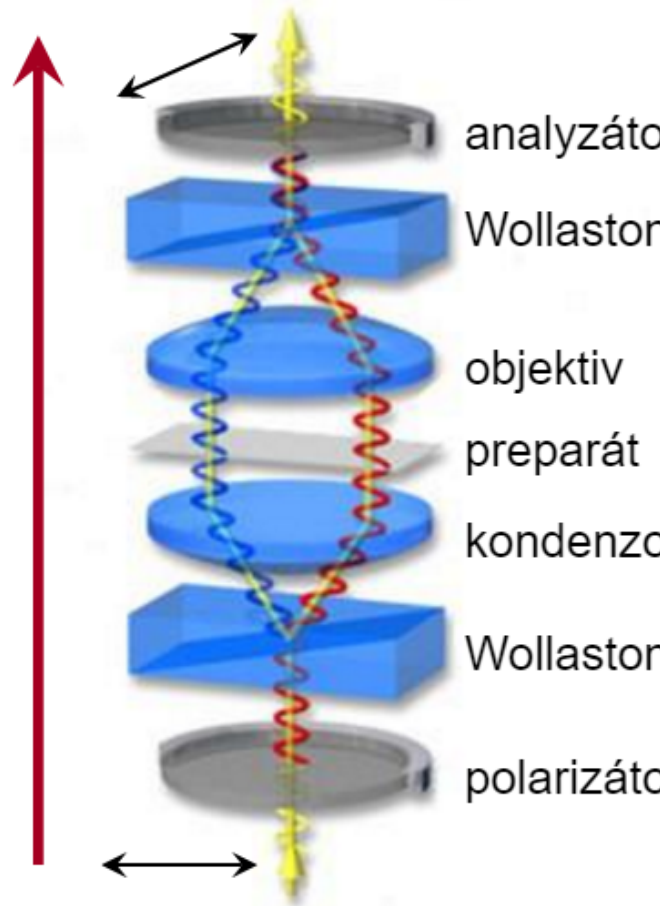
ve fázovém kontrastu

Diferenciální Interferenční Contrast

kolem 1950, Georges Nomarski

mikroskop - 1959 Carl Zeiss

zvětšený obraz vzorku se jeví jako
šikmo osvětlený trojrozměrný objekt



analyzátor

Wollastonův hranol

objektiv

preparát

kondenzor

Wollastonův hranol

polarizátor

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

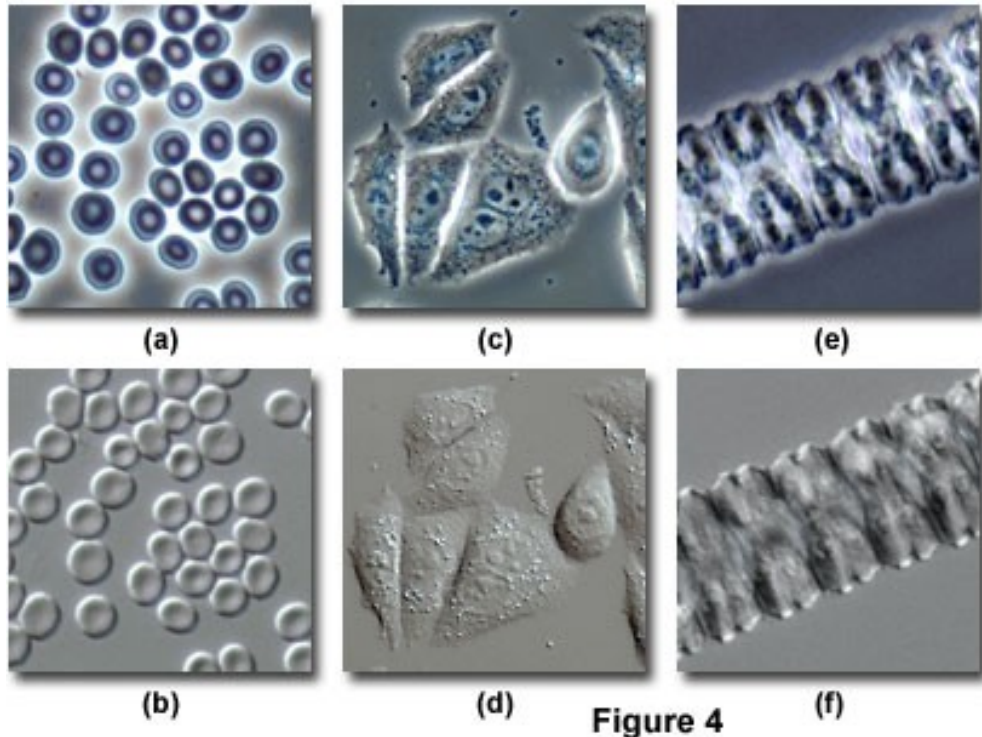
vzniknou dva identické obrazy objektu,
které jsou vůči sobě laterálně posunuty
různá tloušťka preparátu = fázové rozdíly

rozdělení polarizovaného světla na
dvě složky

lineární polarizace světla

„Halo“ efekt

Halos in Phase Contrast and DIC Microscopy

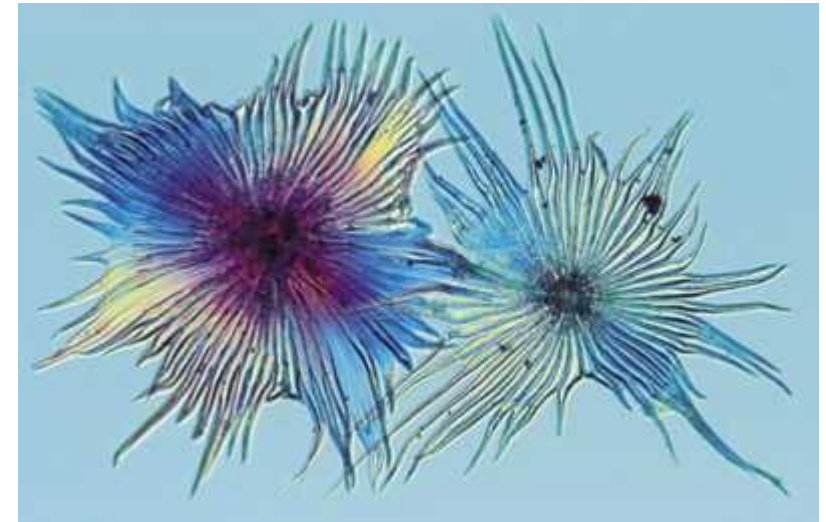


Jedním z typických artefaktů vznikajících při pozorování ve fázovém kontrastu je **"halo efekt"** ohraničující objekty. Tmavé objekty jsou v pozitivním fázovém kontrastu ohraničeny světlým "stínem" a naopak jasné objekty v negativním fázovém kontrastu mají "stín" tmavý. Tento efekt je výsledkem neúplného 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.



Grain of pollen from the lesser celandine (*Ranunculus ficaria*) which has produced a pollen tube. Kept in a 15% sugar solution for approximately 6 hours. Phase contrast. Field = 0.25 mm.

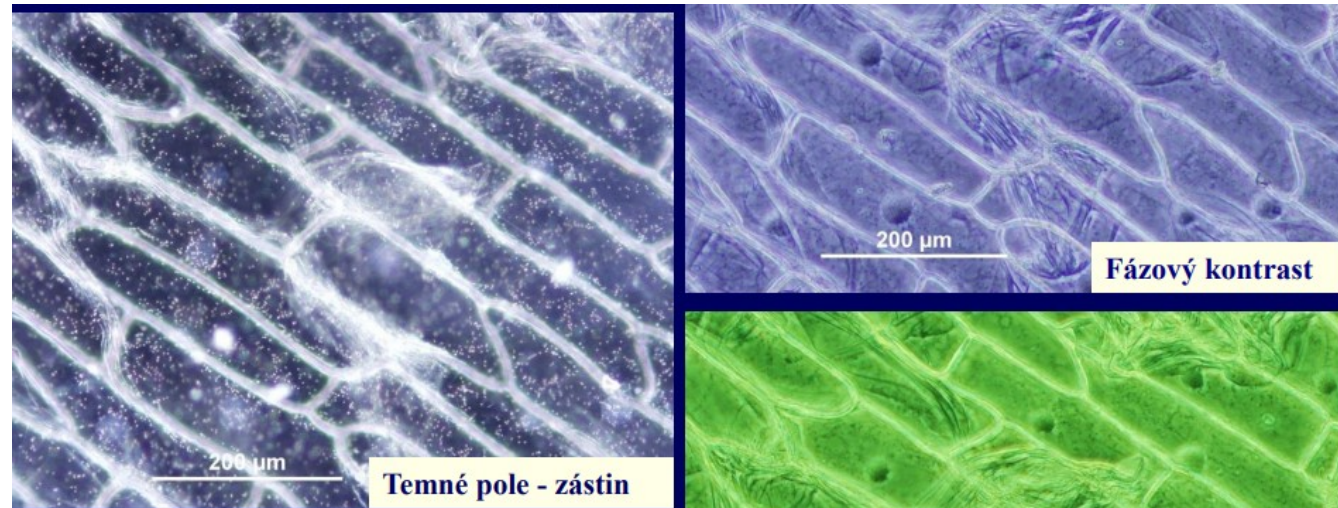
http://www.funsci.com/fun3_en/guide/guide4/micro4_en.htm



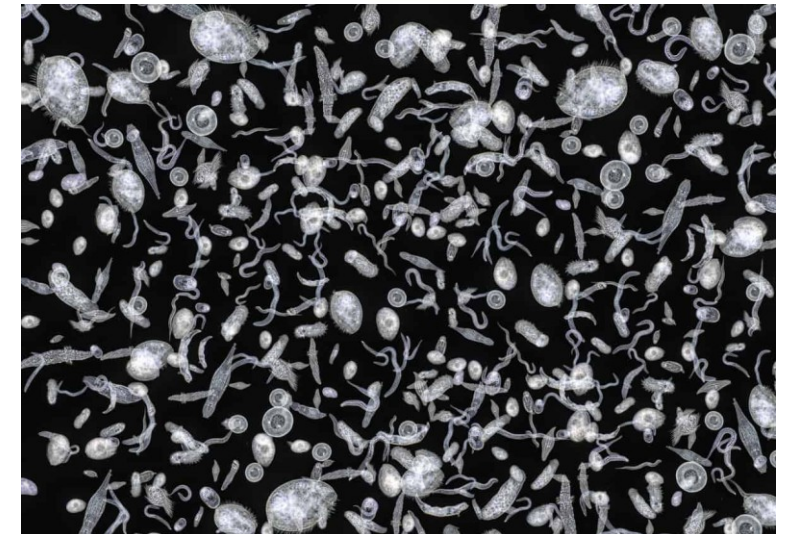
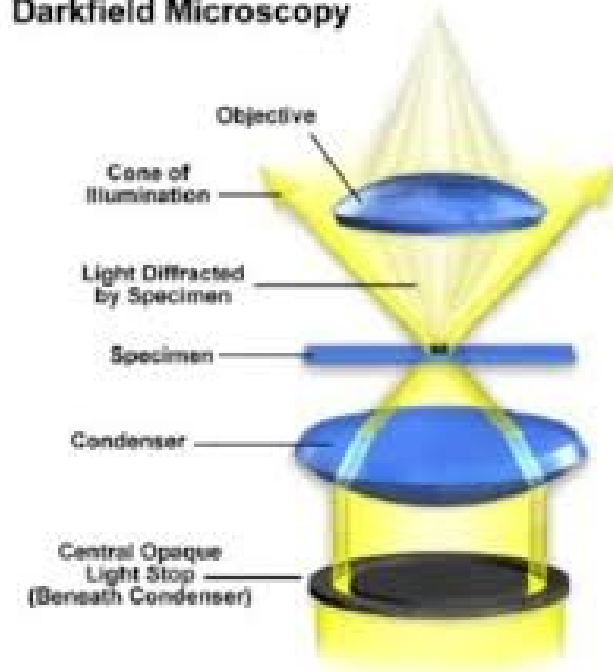
Štítkovité krycí trichomy hlošiny (*Elaeagnus* sp.), Nomarského diferenciální interferenční kontrast, zvětšení 360×

http://casopis.vesmir.cz/files/obr/nazev/2004_146_03.jpg/type/html

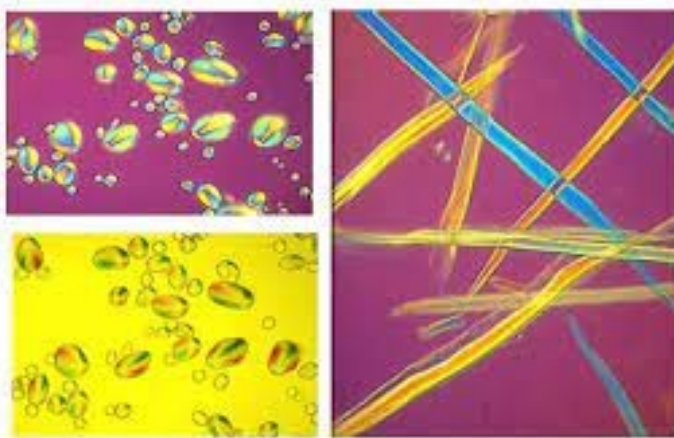
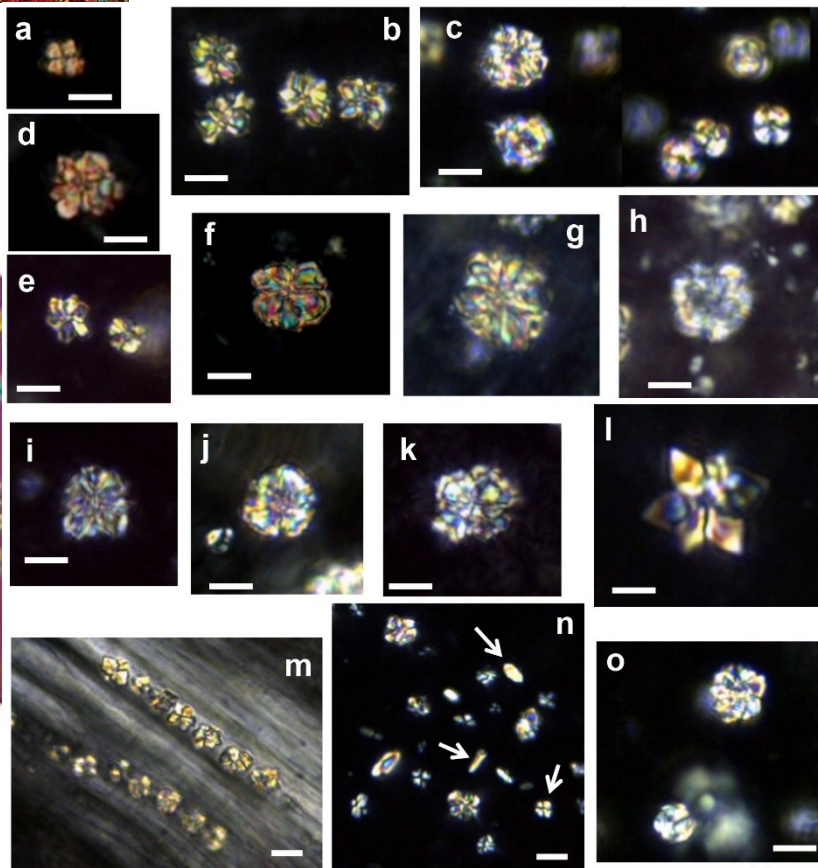
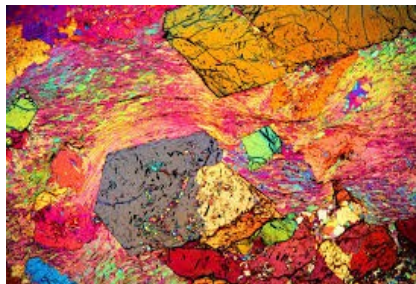
Dark field – temné pole



Darkfield Microscopy



Polarizační mikroskopie



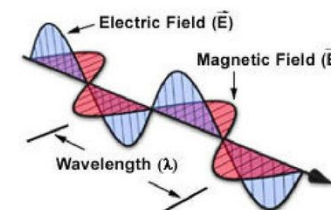
Obr.1

— 10 μm

ZÁKLADNÍ POJMY

POLARIZACE

Světlo jako elektro (**E**) magnetické (**B**) vlnění



Bílé světlo (Slunce, žárovka, ...) je *nepolarizované*

Polarizace světla

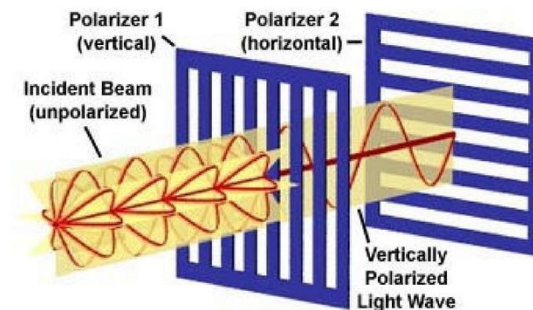


Figure 1

Zkřížené *polarizační filtry* (polarizátor, analyzátor) – *polarizační mikroskop*

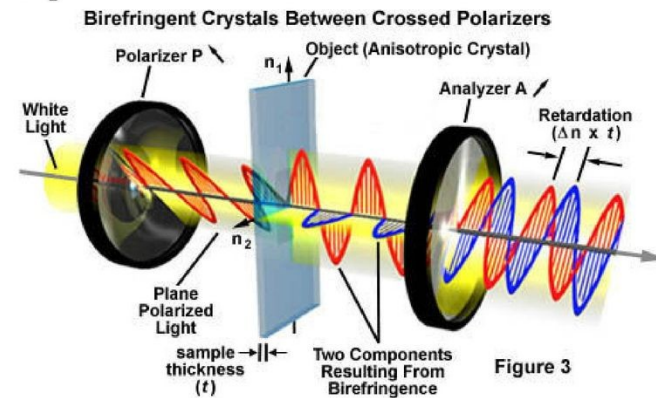


Figure 3

Úkoly

- Vytvořte mikroskopické preparáty z dodaného materiálu
- pozorujte 4 způsoby: světlé pole, fázový kontrast, temné pole a polarizační mikroskopie
- vytvořte fotodokumentaci a slovně okomentujte kvalitu pozorování a přínosy (nebo naopak nevýhody) jednotlivých mikroskopických technik na konkrétních preparátech
- v závěru shrňte poznatky získané pozorováním