

Inovace předmětu KBB/MIK

SVĚTELNÁ A ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Rozvoj a internacionalizace chemických
a biologických studijních programů na Univerzitě
Palackého v Olomouci

CZ.1.07/2.2.00/28.0066

Speciální mikroskopické metody

Metody pozorování zvyšující kontrast

Pozorování mikroskopem

Základní mikroskopická technika:

pozorování ve světlém poli

- světlo z kondenzoru prochází vzorkem a vstupuje do objektivu
- objekty vidíme díky tomu, že jsou schopny zeslabovat intenzitu procházejícího záření

Metoda je vhodná pro objekty buď zcela nepropustné, nebo aspoň barevné.

Důležitý parametr pozorování:

Kontrast

$$= \frac{\text{jas objektu} - \text{jas pozadí}}{\text{jas pozadí}}$$

**Pozorování buněčných struktur za živa bez barvení
– malý kontrast**

Zvýšení kontrastu barvením

zpravidla vyžaduje usmrcení (fixace) objektu

→ možnost vzniku artefaktů

Pozorovací metody a techniky zvyšující kontrast

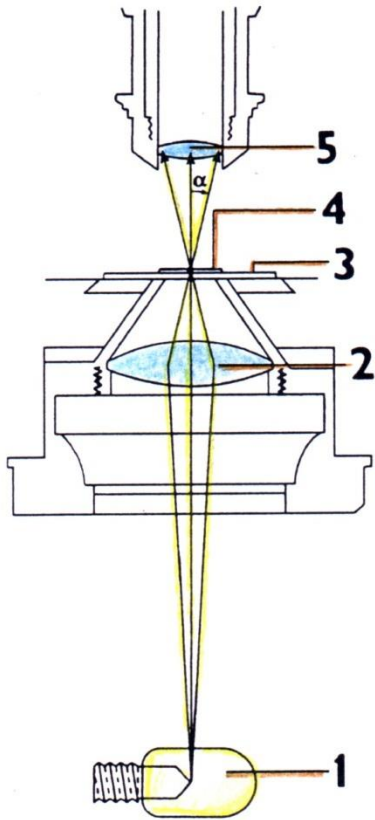
- umožňují pozorování buněčných struktur a pochodů v nich "*in vivo*"
- **temné pole** neboli **zástin** (využití ohybu světelných paprsků)
- **fázový kontrast** (zvýšení kontrastu pomocí fázových destiček)
- **polarizační mikroskopie** (polarizace světla)
- **kombinace různých fyzikálních principů**
(Nomarského diferenciální interferenční kontrast, Hoffmanův modulační kontrast)
- **holografická mikroskopie**
- **využití různých zdrojů vlnové délky** (mikroskop infračervený, fluorescenční, rentgenový, laserový)

Temné pole (zástin)

■ Princip:

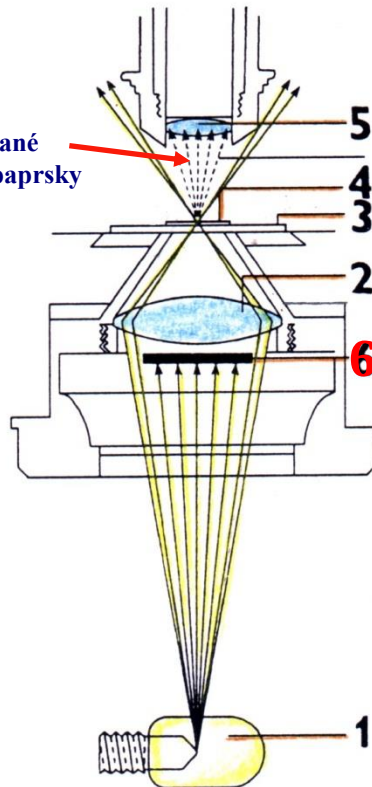
- primární záření (nedifraktované) nevstupuje do objektivu
- pozorovaný objekt je osvětlen pouze šikmo dopadajícími světelnými paprsky, které se od něj odrážejí, lámou a ohýbají se na něm - difraktované záření

Temné pole - schéma



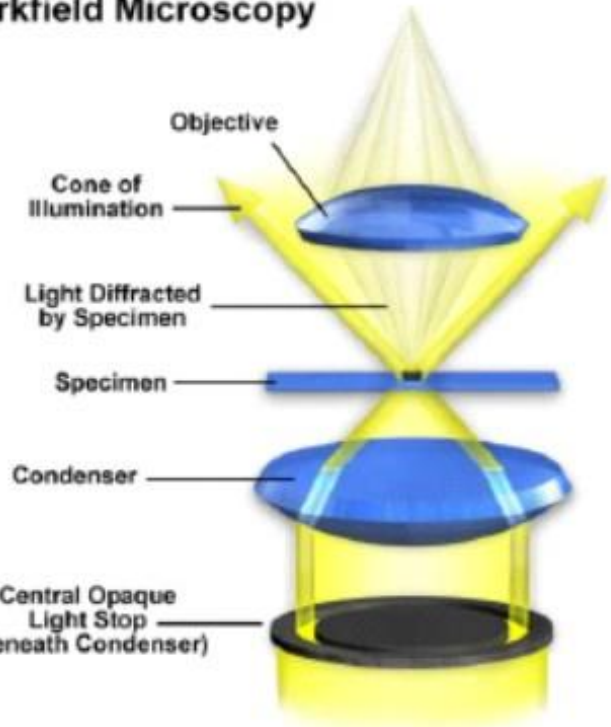
Procházející světlo

difraktované
světelné paprsky



Zástin

Darkfield Microscopy

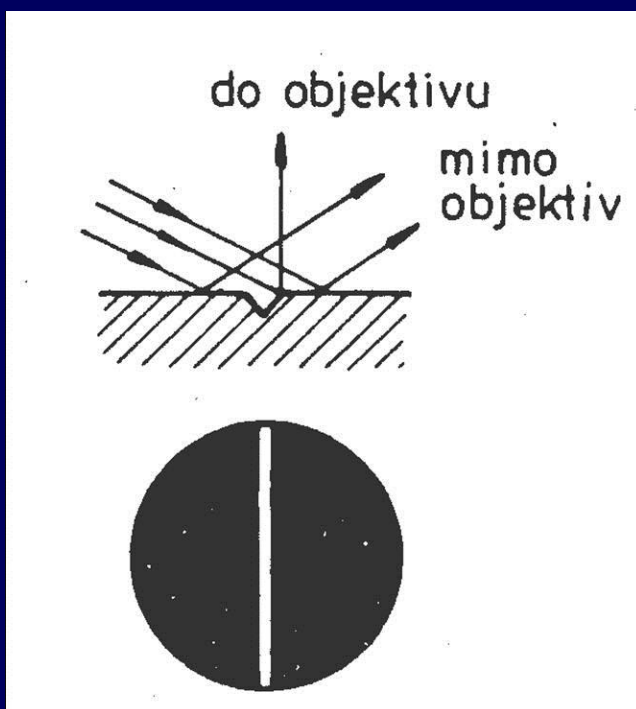


Davidson and Abramowitz

- 1 - světelný zdroj
- 2 – kondenzor (speciální kondenzor pro zástin – kardioid)
- 3 - podložní sklo
- 4 - preparát
- 5 - objektiv
- 6 - centrální neprůhledná clona pod kondenzorem

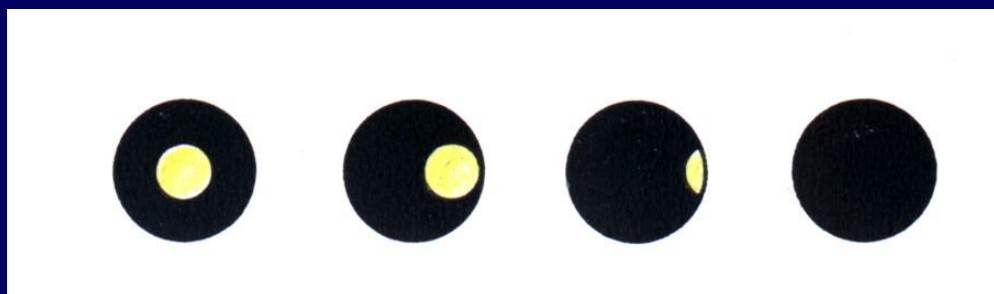
■ **Výsledek:**

Objekt se jeví jako zářící na temném pozadí.

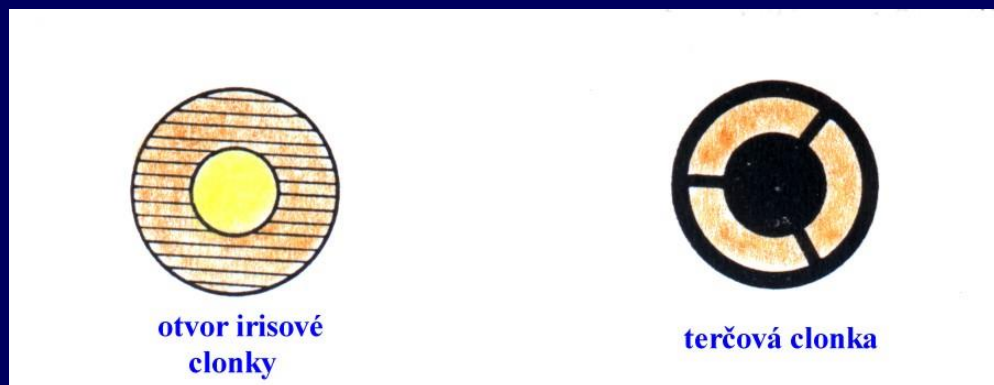


Vzhled rýhy v temném poli

Nejjednodušší úprava zástinu



**posunutí
kondenzoru
do strany**



**zhotovení
terčové clonky
na kondenzor**

■ Předpoklady pro pozorování v temném poli:

silný světelný tok (zvýšíme intenzitu světla a odstraníme šedé filtry)

čisté médium v preparátu

tenká podložní skla

vhodný objektiv (lépe o menší NA)

použití imerze na kondenzoru

■ Využití:

- pozorování i velmi drobných částic
nebo organismů (mitochondrie, centrioly,
lyzozómy, peroxizómy, protozoa a bakterie, drobní
živočichové, krystalky, písek ...)

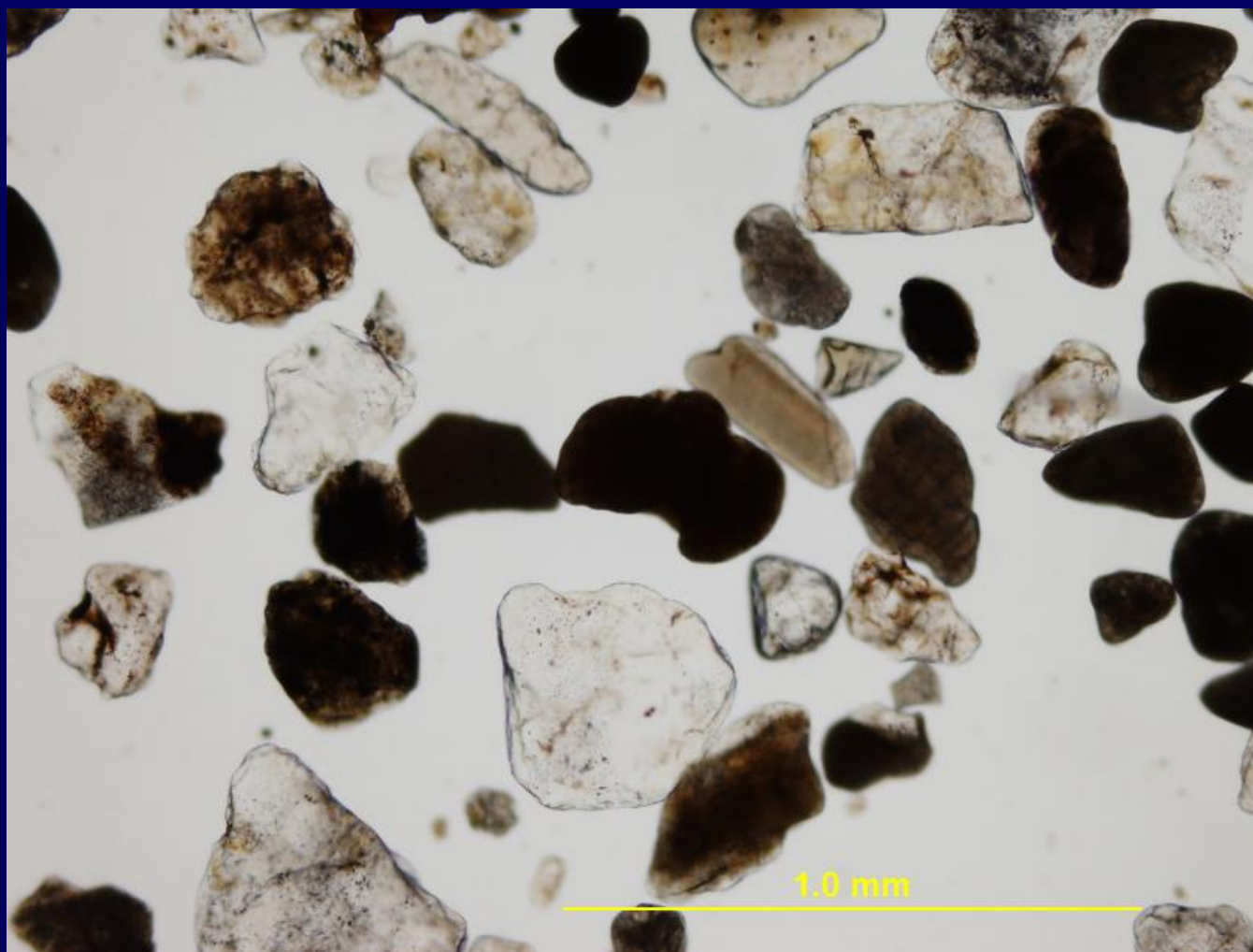


Buchanka (*Cyclops*)
a perloočky (*Daphnia*)

Z = 50x

Plášek J., Vesmír 83

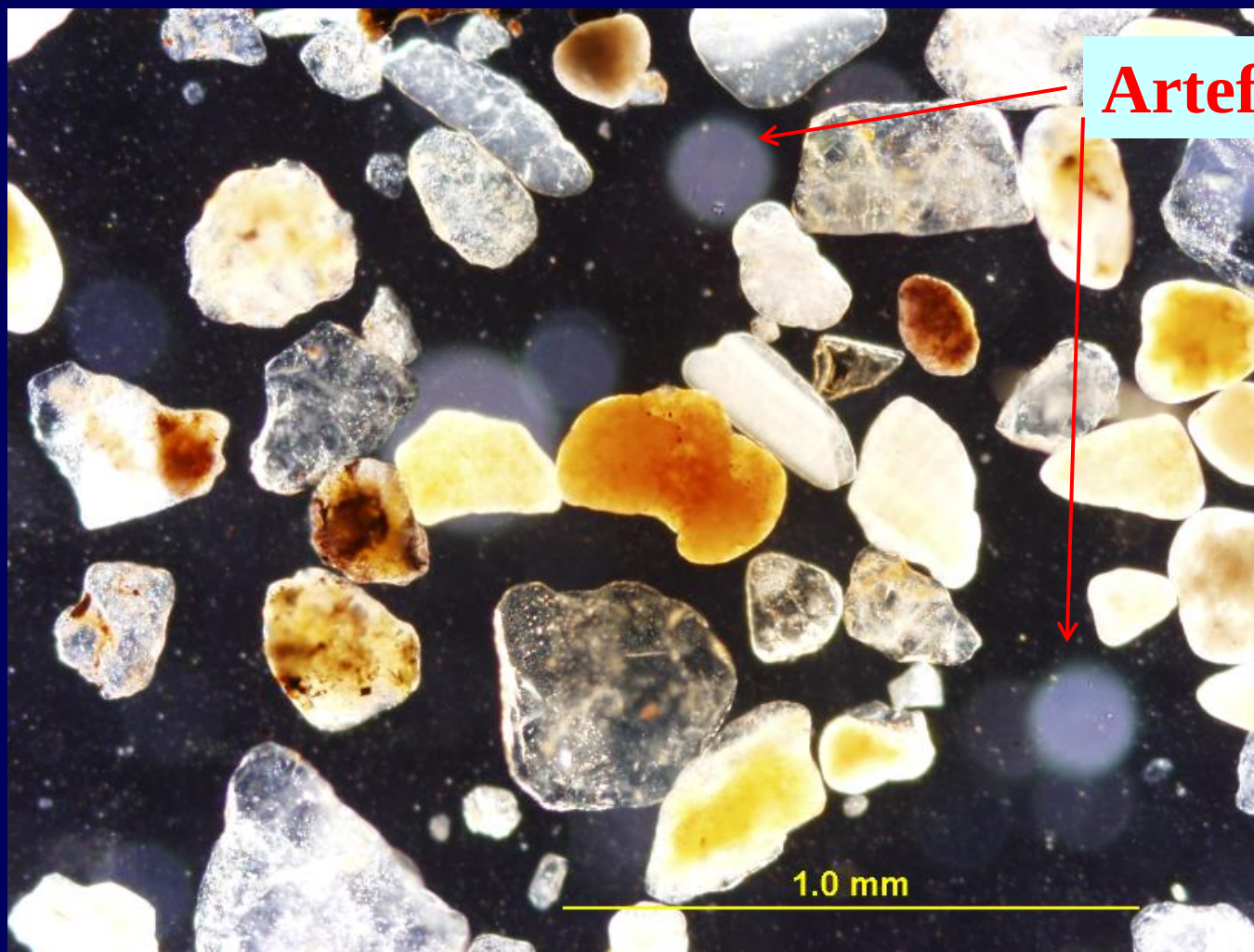
Písek z pláže Puerto Mogan (Gran Canaria) – původ Sahara



Z = 40x

Světlé pole. Foto Pavla Válová, 2015

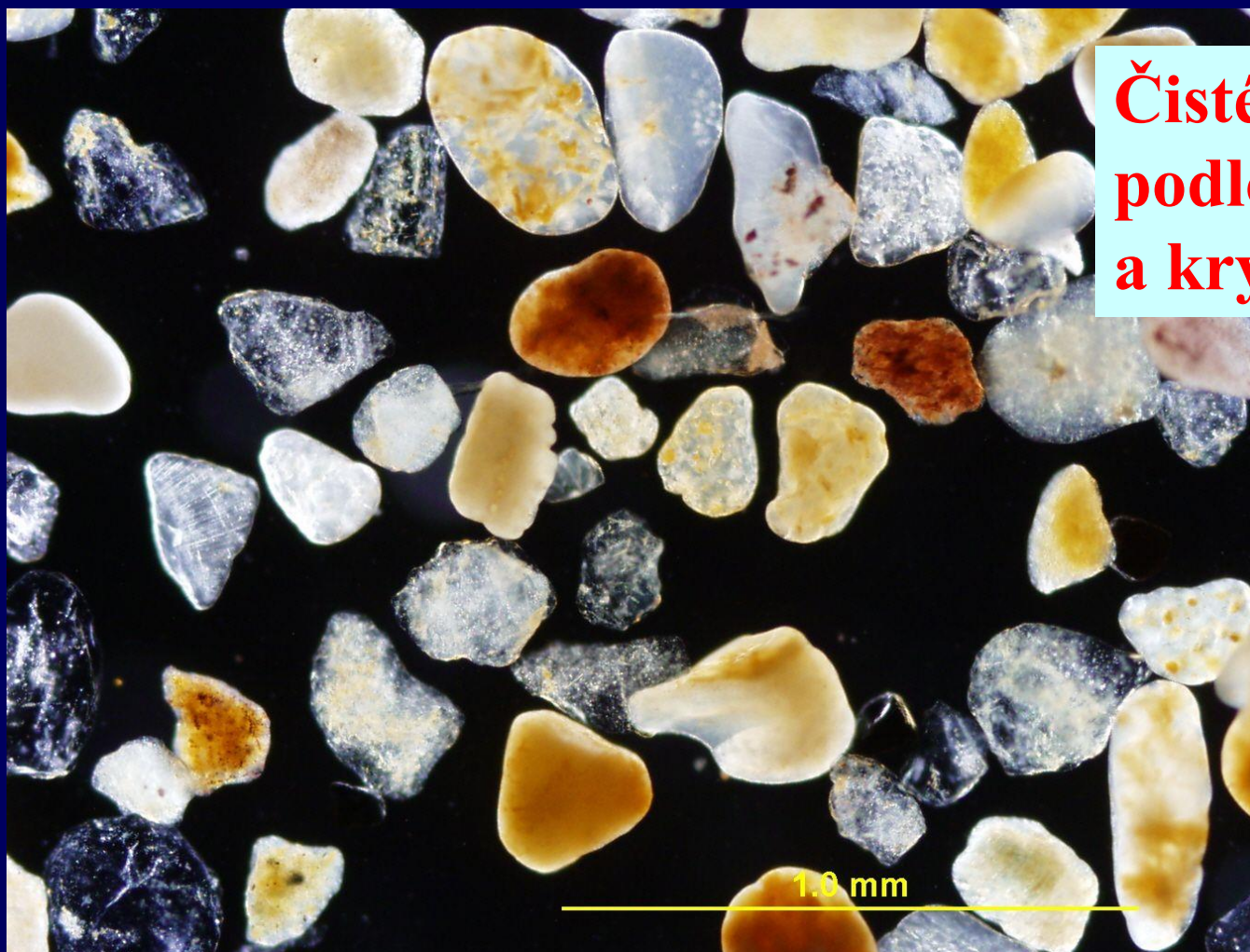
Písek z pláže Puerto Mogan (Gran Canaria) – původ Sahara



Z = 40x

Temné pole (zástin). Foto Pavla Válová, 2015.

Písek z pláže Puerto Mogan (Gran Canaria) – původ Sahara

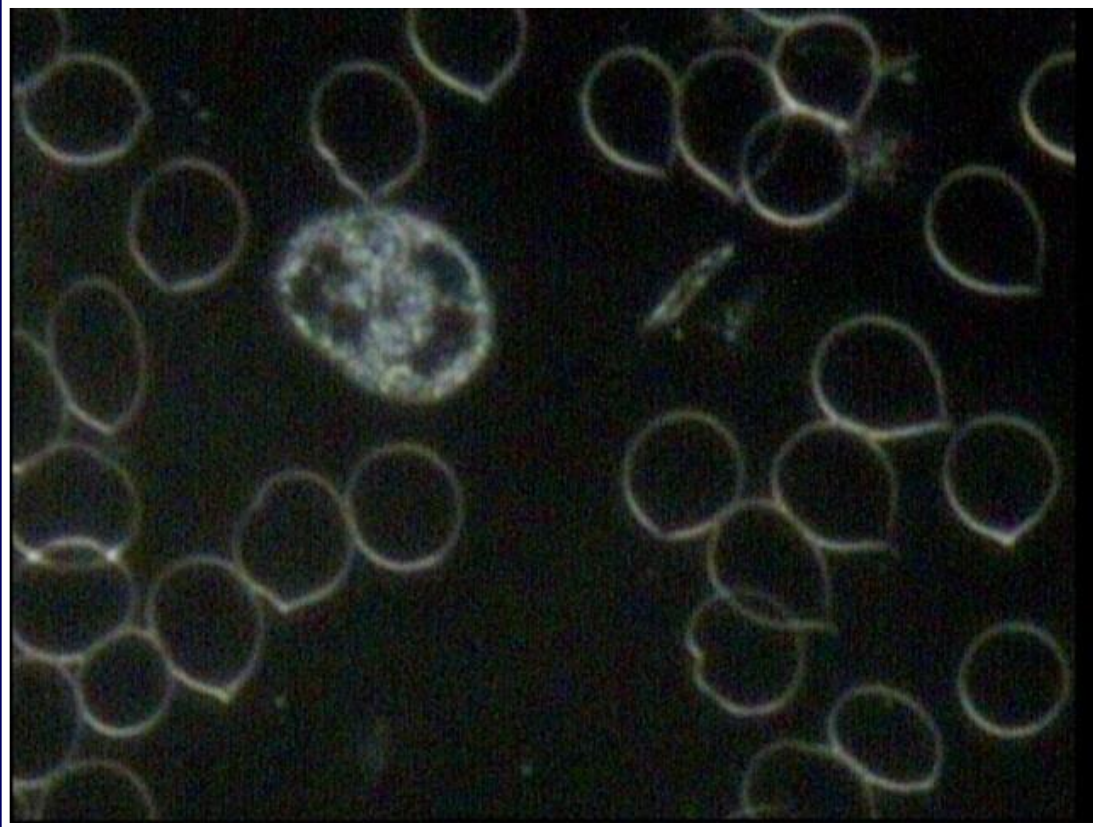


Čisté
podložní
a krycí sklo

Z = 40x

Temné pole (zástin). Foto Pavla Válová, 2015.

Červené krvinky v temném poli (zástinu)



Velká svítící buňka uprostřed je bílá krvinka. Prázdné kroužky jsou červené krvinky; jsou patrné deformace ve formě kapky nebo citrónu (vazba bílkovin na povrch)

Obr.:

<http://www.lecivacesta.cz/news/vysetreni-zive-kapky-krve-v-temnem-poli-mikroskopu/>

<http://www.zdravivkrvi.cz/popis-metody>

<http://www.irisdiagnostika.eu/kombinovane-vysetreni-unikat-v-cr.html>

<http://www.darkfield.cz/metoda-darkfield-microscopy>

Fázový kontrast

- Slouží k zvyšování kontrastu nebarvených preparátů



Objev:

1935

holandský fyzik

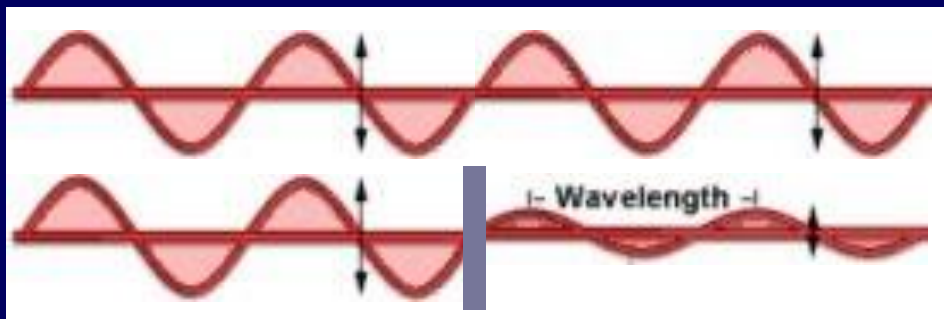
Frits Zernike [cerník]

(1888-1966)

1953 Nobelova cena za fyziku

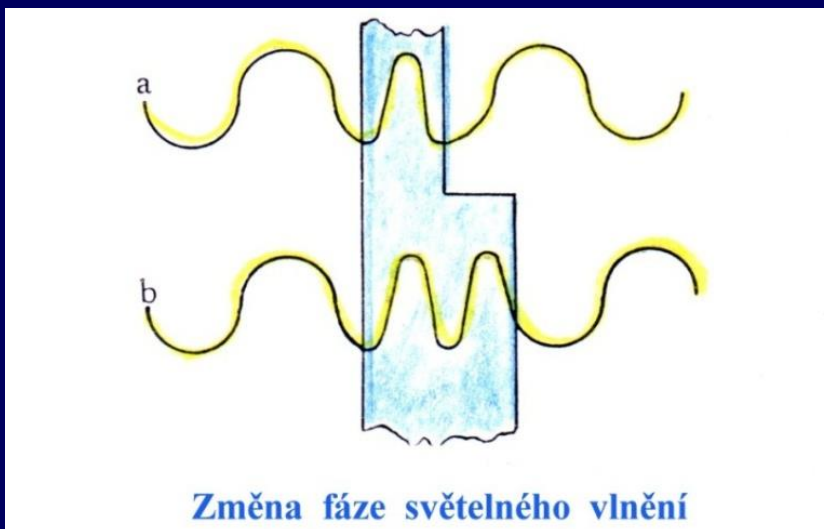
**Zbarvené preparáty - pohlcují část jimi procházejícího světla
(→ absorpční obraz)**

– mění se amplituda vln, fáze nezměněna

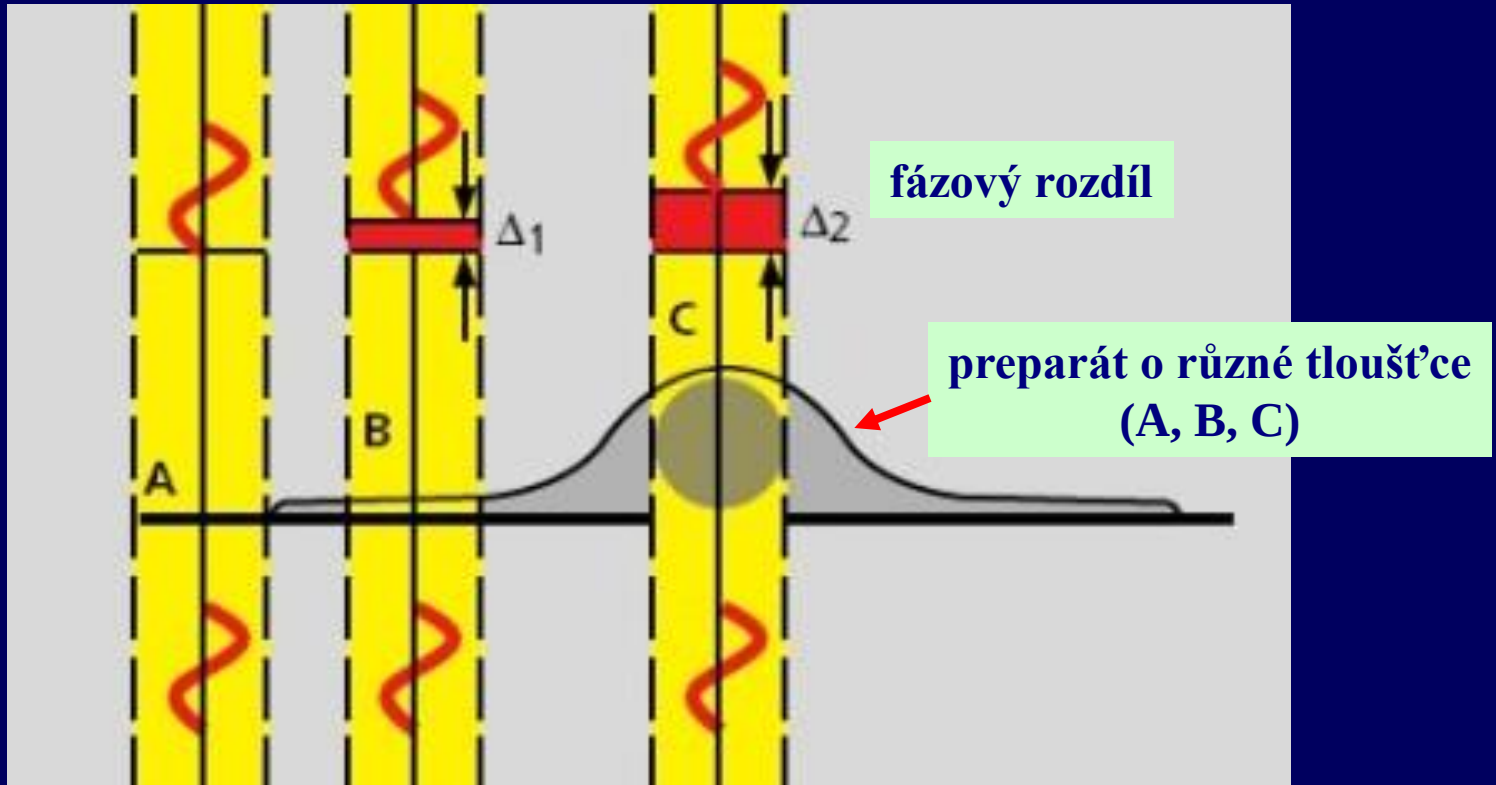


Nezbarvené preparáty (např. živé buňky) – pro světlo téměř všude prostupné, kvůli různé optické hustotě lámou nestejně světlo (→ obraz refrakční)

– amplituda nezměněna, fáze posunuta

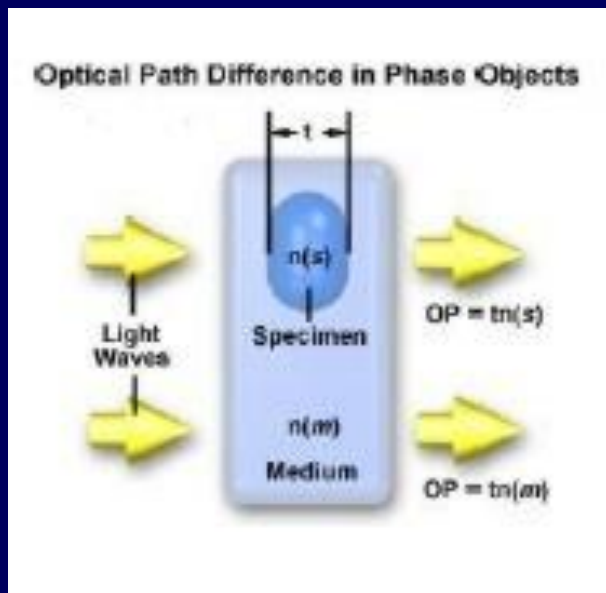


Fázový posun vlnové délky světla průchodem preparátu o různé tloušťce

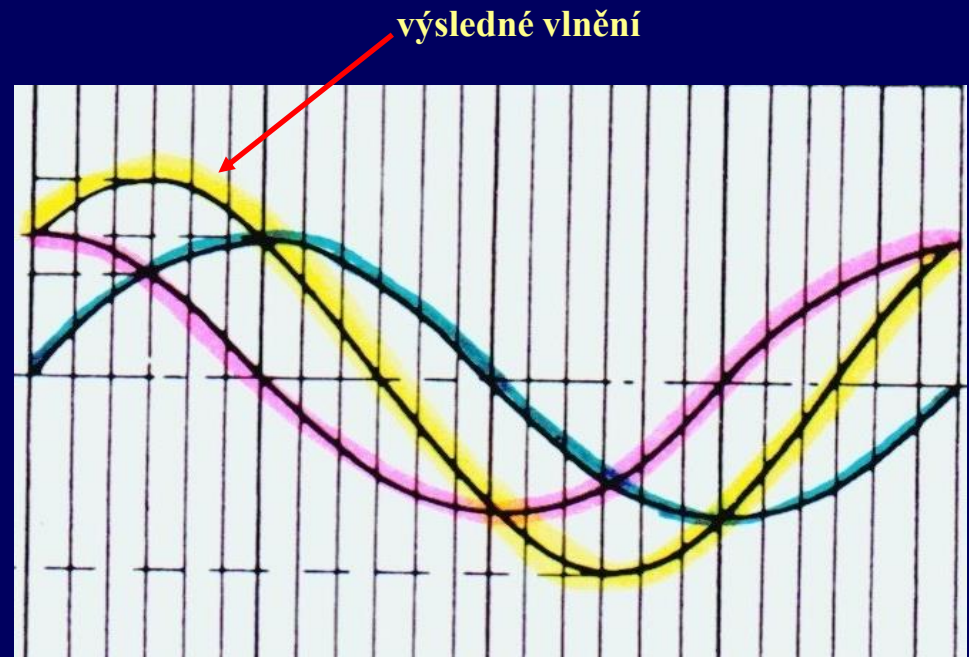


Příručka Zeiss: <http://www.usask.ca/biology/scopes/MicroscopyBasics.pdf>

- **Princip fázového kontrastu:**
převádí pro nás neviditelné fázové rozdíly na rozdíly amplitudové, které rozeznáváme



Davidson and Abramowitz



Konstruktivní interference
s dráhovým posuvem $\lambda/4$

■ Zařízení:

- fázové kondenzory

řada kondenzorových fázových clon na otočné desce; pro každý objektiv zvláštní prstencovitá clona

- fázové objektivy označené Ph, PC, DL, DM

(fázová clona neboli maska – přímo na zadní čočce objektivu v podobě prstencovité jemné mřížky)

- žlutozelený filtr (využívání monochromatického světla, $\lambda = 550 \text{ nm}$)

- pomocný mikroskop (vizír; vkládá se na místo okuláru)

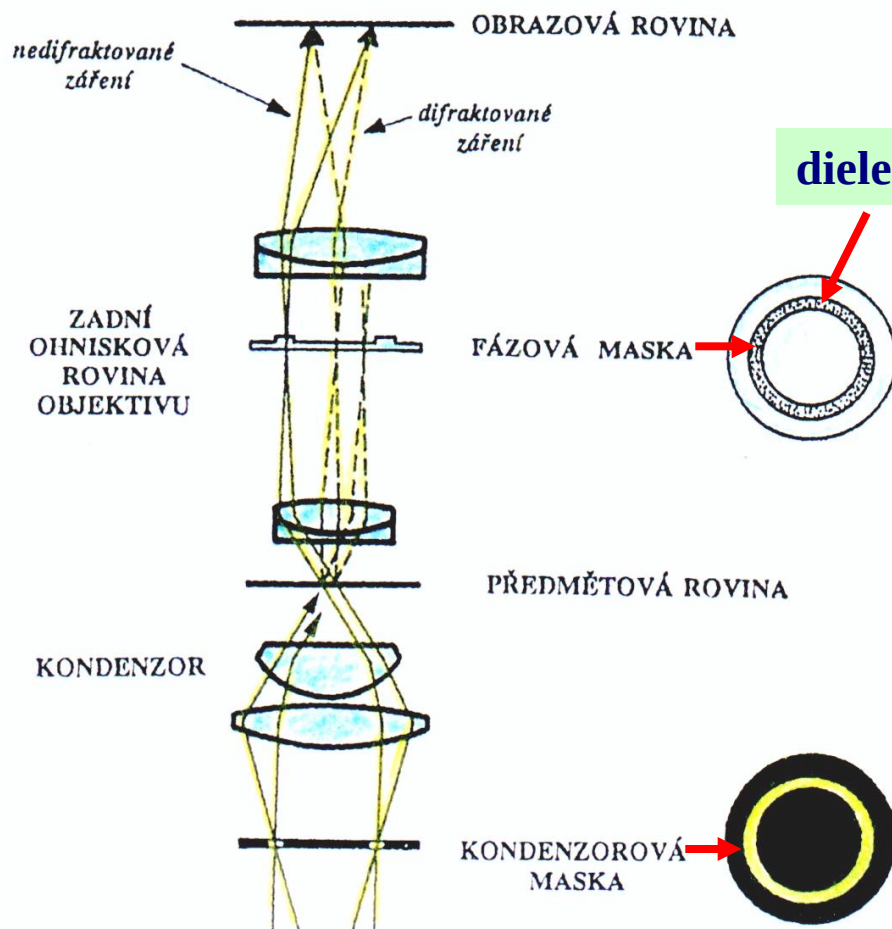
- středící klíče (seřizování fázových clon v kondenzoru a objektivu)

- **fázová clona v objektivu (tvar mezikruží)**
 - **zajišťuje posun fáze světla obrazu světelného zdroje (přímého, nedifraktovaného záření) oproti fázi světla difraktovaného záření o jednu čtvrtinu délky vlny ($\lambda/4$);**

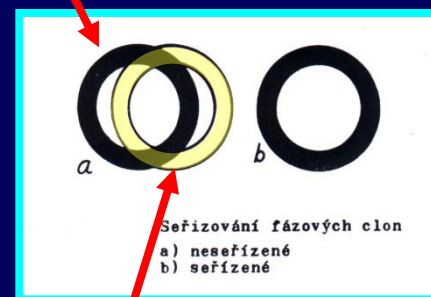
Vrstva na fázové destičce je nejčastěji tvořena dielektrikem (zajišťuje požadovaný fázový posuv o $\frac{1}{4}$ vlnové délky); na dielektriku je nanesena kovová vrstva k dosažení potřebné amplitudové propustnosti.

- **Kombinace kondenzorové a fázové clony**
 - **interference paprsků** →
 - **kontrastní obraz**
 - (rozlišovací schopnost až 100 nm)**

Fázový kontrast - schéma

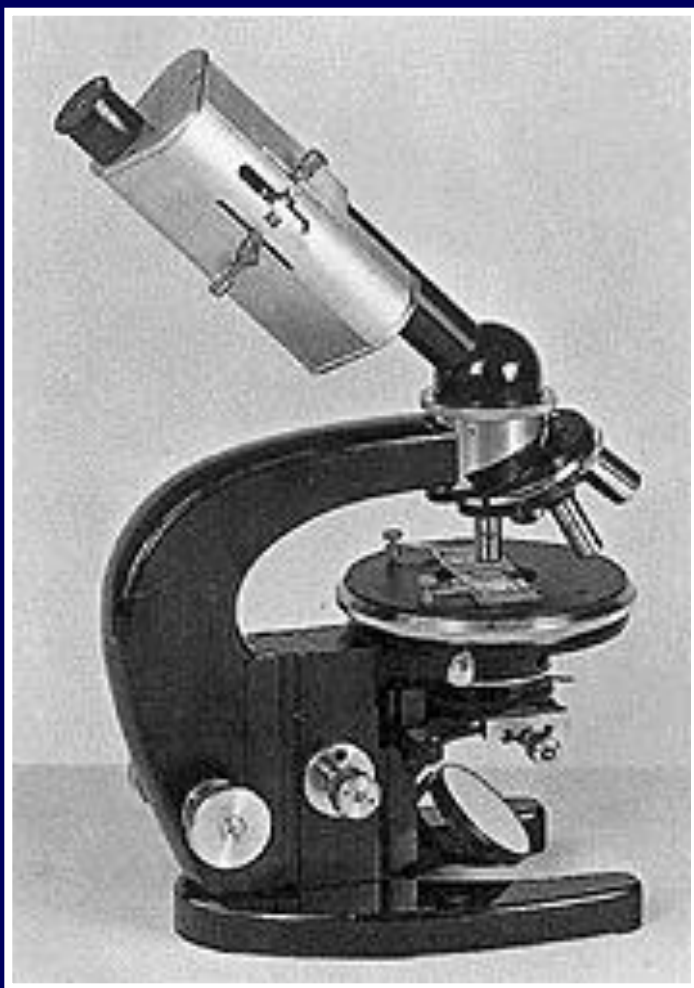


fázová maska



kondenzorová maska

Podle J. Pláška, Vesmír 11.



**Jeden z prvních
fázových mikroskopů**



**Polytenní chromozómy
v buňce slinné žlázy pozorované
fázovým kontrastem**

Pozitivní vs. negativní fázový kontrast

Pozitivní fázový kontrast

– fázová maska **posunuje fázi nedifraktovaného** záření o $\frac{1}{4}$ vlnové délky dopředu

- interference těchto paprsků s paprsky zpožděnými průchodem silnějšími objekty → destruktivní interference

→ **tlustší části objektu tmavé, tenčí světlé**

Houba *Rhizopus stolonifer*

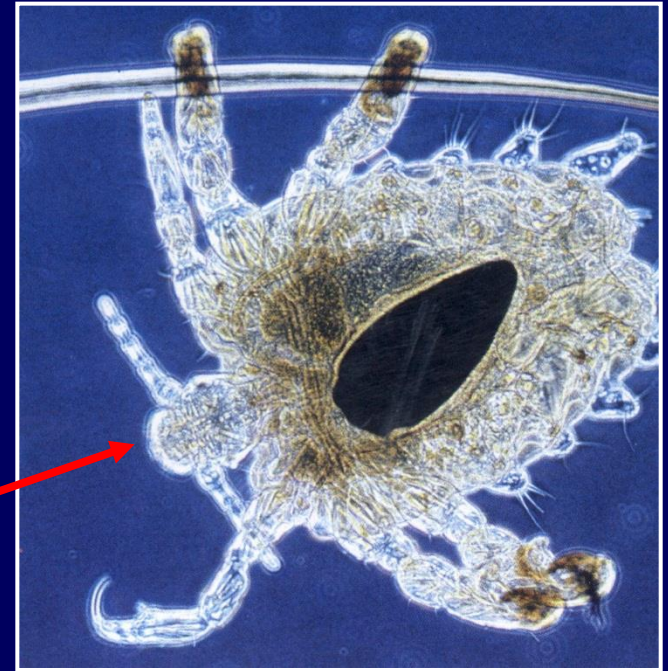


$Z = 200\times$

Negativní fázový kontrast

- fázová maska **zpožďuje** fázi **nedifraktovaného** záření o $\frac{1}{4}$ vlnové délky
 - interference těchto paprsků s paprsky zpožděnými průchodem silnějšími objekty → **konstruktivní interference**
- **tlustší části objektu světlé, tenčí tmavší**

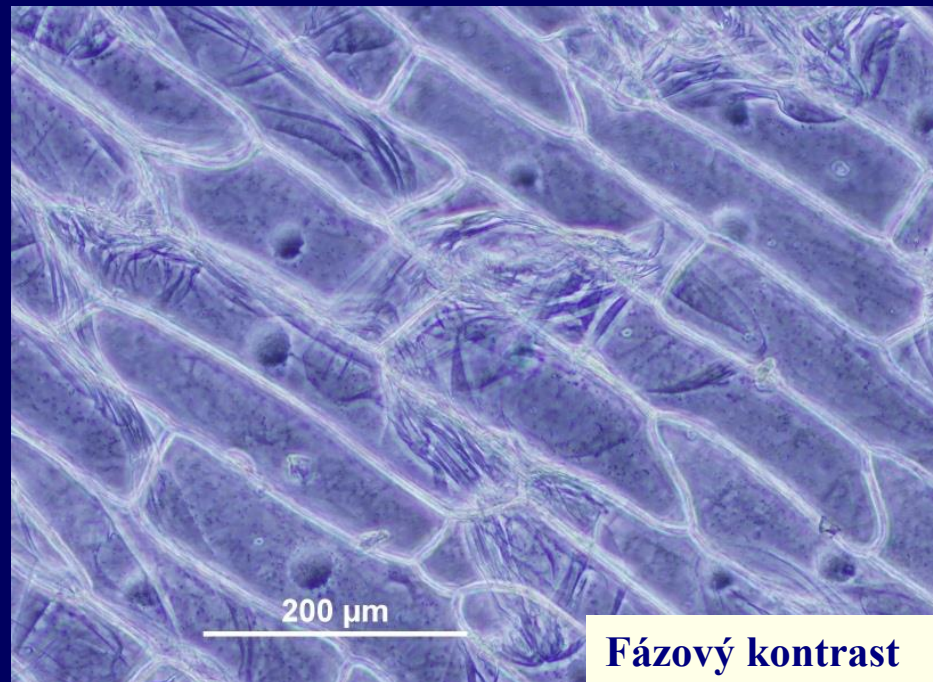
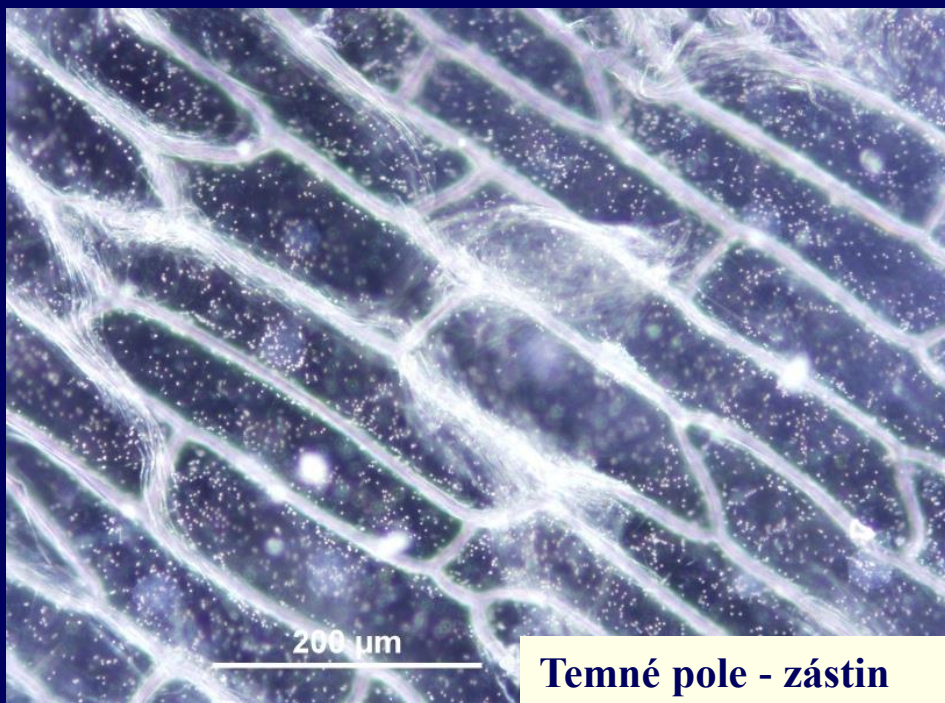
Veš muňka (*Pthirus pubis*) s vajíčkem



Z = 58x

Plášek J., Vesmír 11

Buňky vnitřní epidermis cibule (viz cvičení)



Z = 100x (10 obj.)

Fázový kontrast

■ Využití:

- pozorování **nativních** (nezbarvených) preparátů
(jádro, jadérko, chromozómy, vakuoly, mikroorganismy, exsudáty, exkrety aj.)
- při studiu buněčných a tkáňových kultur ***in vivo***
(mitóza, cytoplazmatické vřeténko aj.)
- **dodatečné zvýšení kontrastu** u nezbarvených nebo slabě zbarvených tkáňových řezů a roztěrů **trvalých** preparátů
- **videozáznam** (filmový záznam) pochodů v živých buňkách
- **rychlé diagnostické metody** v mikrobiologii a parazitologii

Fázový kontrast

■ Nevýhoda:

- existence „halo“ efektu

(= jasně zářící rozhraní mezi objektem a okolním prostředím vznikající v důsledku lomu světla na strukturách s velkým indexem lomu)

Anoptrální (apodizovaný) mikroskop

- fázová clona nahrazena prstencem s velmi malou propustností pro světlo (saze)

- odstranění halo efektu

(sledování vnitřních struktur buněk s velkým indexem lomu
- kvasinky, spory, vajíčka)

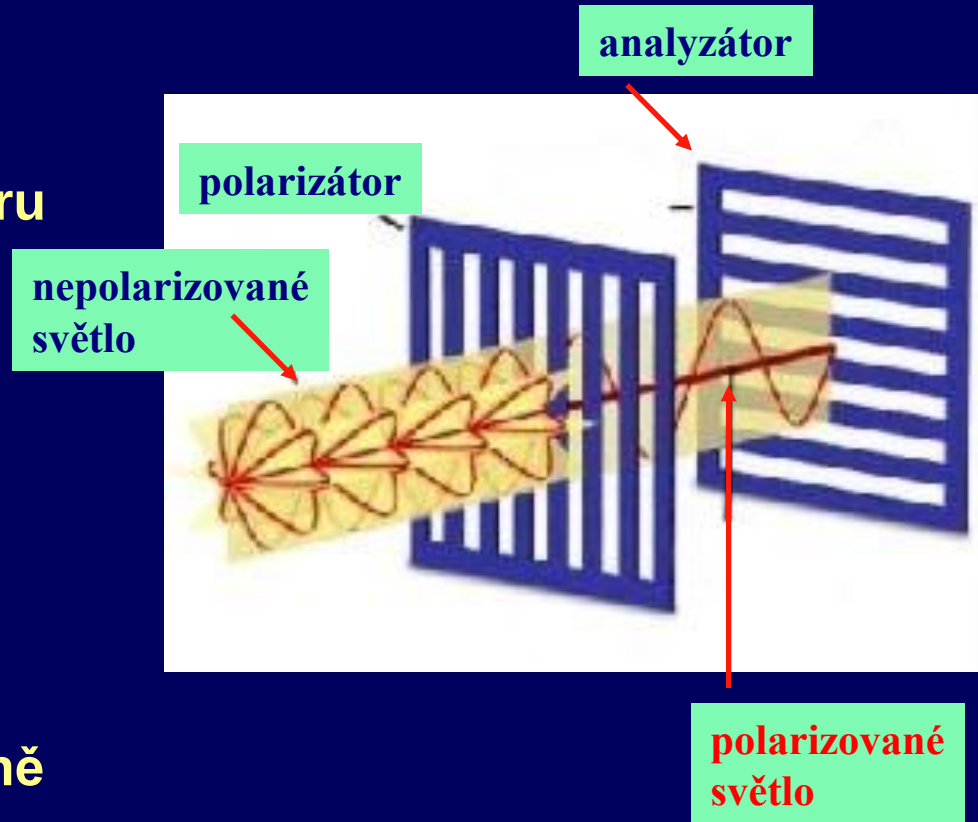
Polarizační mikroskopie

Světelný paprsek

- kmitá rovnoměrně na všechny strany ve směru kolmém na osu šíření

Polarizované světlo

- kmitá jen v jedné rovině



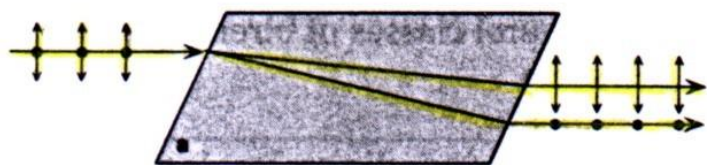
Polarizátor – zařízení k polarizaci světla

Analyzátor – zařízení k rozlišení polarizovaného světla

Možnosti vzniku polarizovaného světla:

- odrazem
- lomem
- absorpcí světla (v polaroidu)
- dvojlomem (hranoly)

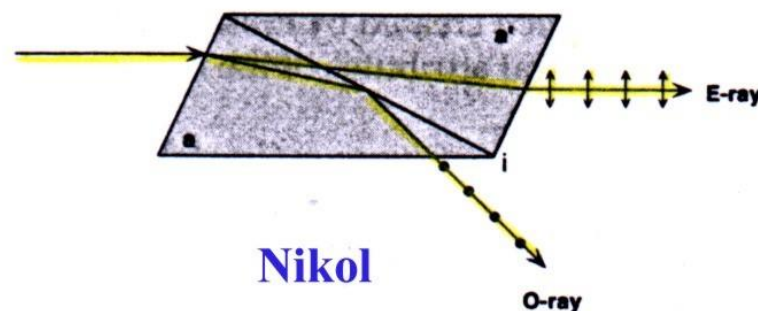
Polarizace světla hranoly



Dvojitá refrakce

anizotropický krystal

E-ray
O-ray



Nikol

(krystalový polarizátor)

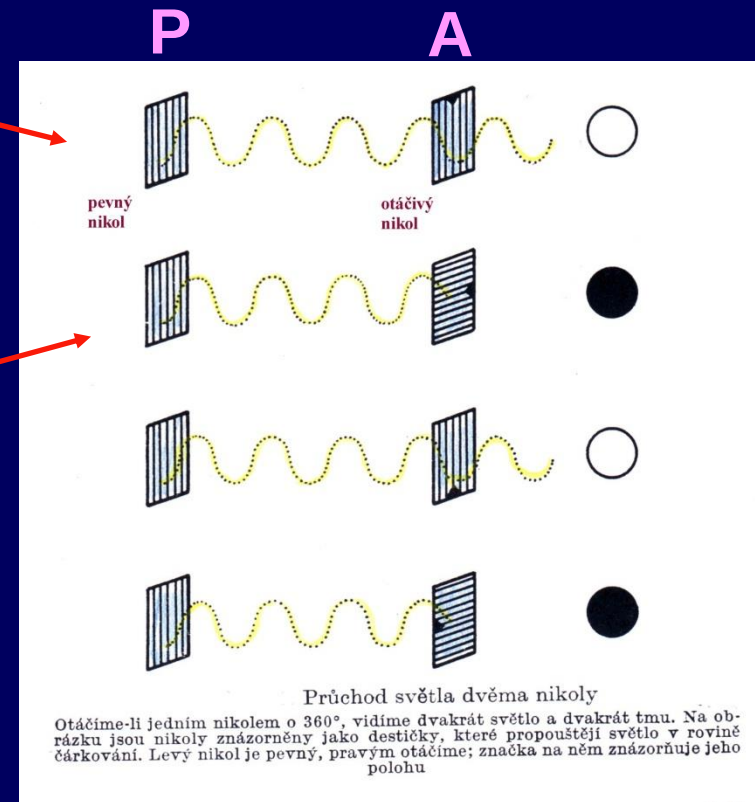
E-ray = paprsek mimořádný
O-ray = paprsek řádný

Pozorování v polarizačním mikroskopu

- do toku světelných paprsků jsou vloženy dva hranoly – nikoly, před kondenzorem **polarizátor (P)** a za objektivem **analyzátor (A)**

Vzájemná poloha polarizátoru a analyzátoru

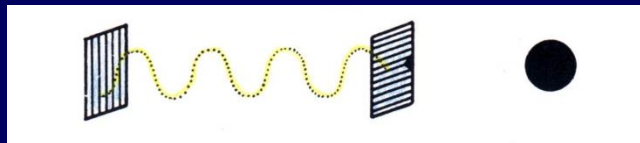
- roviny polarizace obou filtrů k sobě **rovnoběžné**
polarizované světlo normálně prochází, zorné pole mikroskopu **světlé**
- roviny polarizace na sebe **kolmé** (zkřížené)
světlo analyzátozem neprojde, zorné pole je **tmavé**



Vzájemné mechanické natáčení nikolů → efekt polarizace světla

Záleží na **indexu lomu** pozorovaných struktur.

Při zkřížených polohách filtrů:

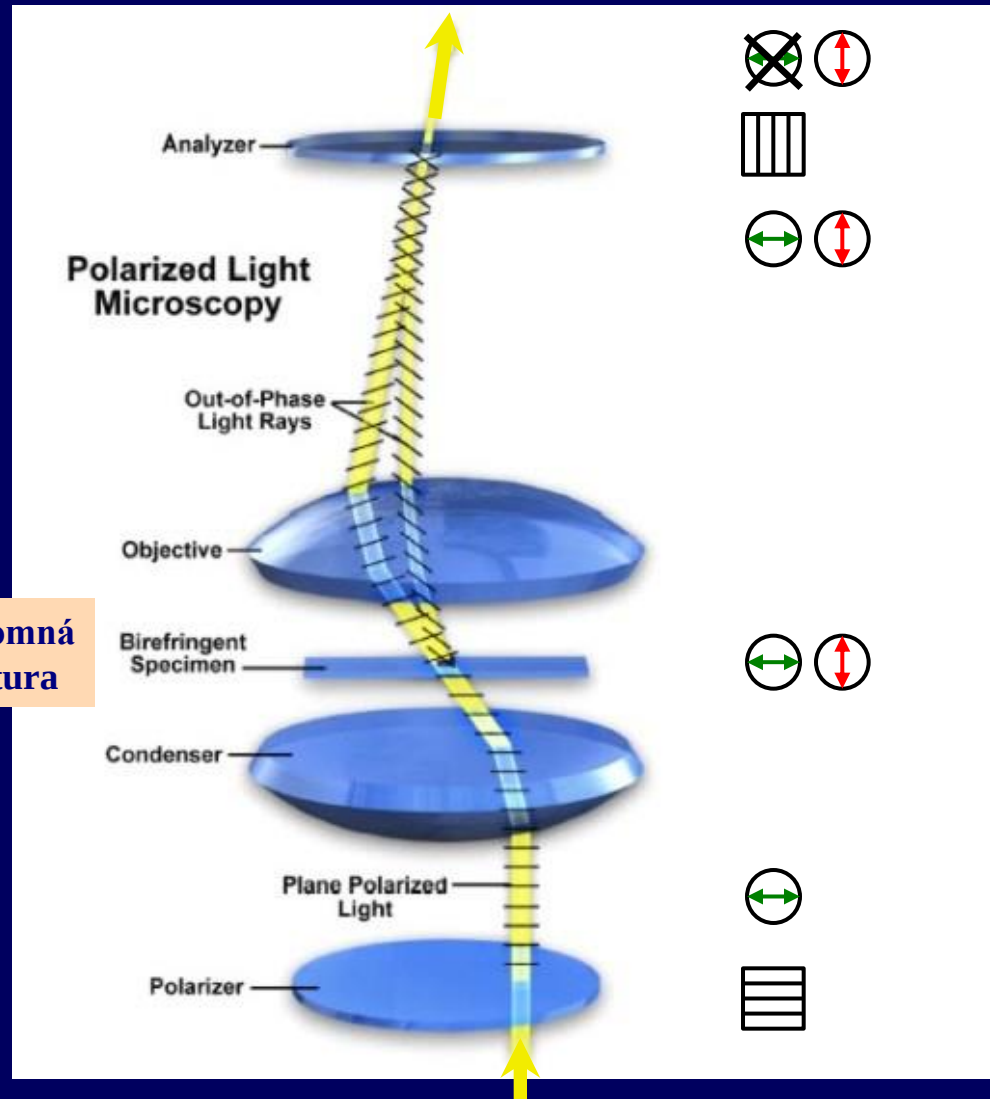


- **izotropní (jednolomné)** - zůstávají při křížených filtrech tmavé
- **anizotropní (dvojlomné)** - stáčí rovinu polarizovaného světla → jeví se světlé

Polarizační mikroskop - schéma

pozorujeme
mimořádné
paprsky (E-ray)

dvojlomná
struktura



■ Předpoklady:

- **zatemněná místnost, silný zdroj světla**

(do oka pozorovatele se dostává jen $\frac{1}{4}$ světla)

■ Využití:

- **pozorování určitých buněčných struktur vykazujících jednolom nebo dvojlom**

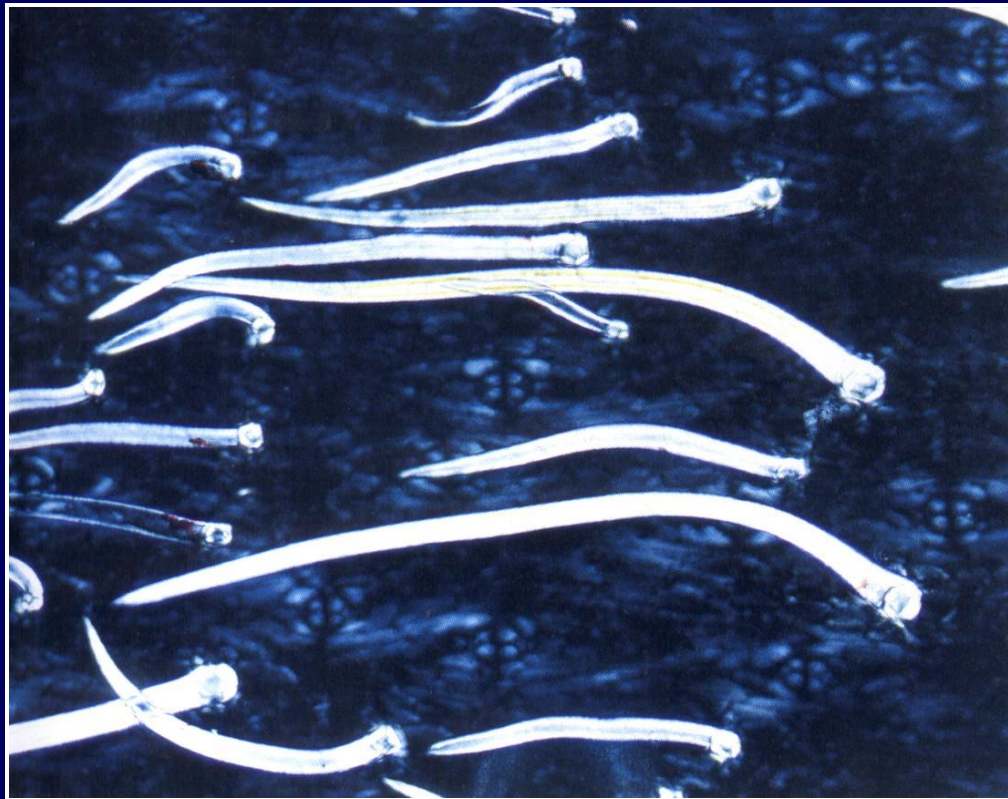
(např. buněčná stěna rostlinných buněk, jaderná membrána, dělicí vřeténko, škrobová zrna, fibrilární struktury kolagenu a elastinu, kontraktilní myofibrily žíhané svaloviny, tonofibrily, krystalické inkluze)

→ **získání představy o orientaci základních strukturálních složek buněčné cytoplazmy**

Hlavní využití: v metalografii a krystalografii (geologii)

Polarizační mikroskopie - příklady

Trichomy chrastavce (*Knautia* sp.)

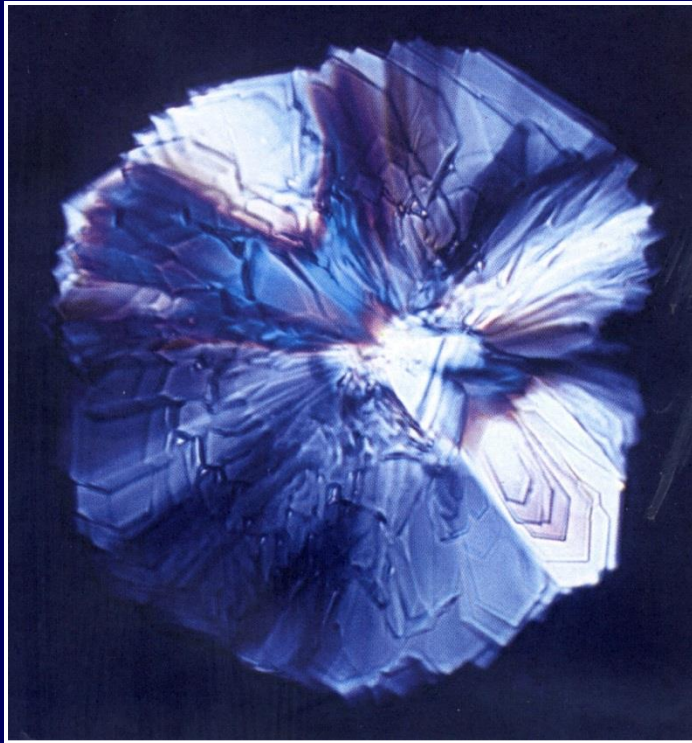


Z = 130x

Plášek J., Vesmír 83

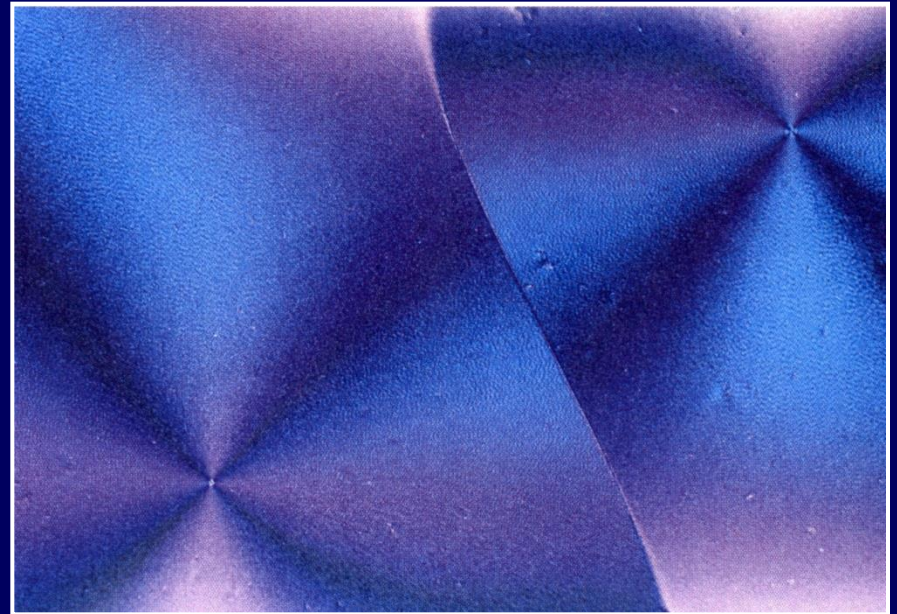
Polarizační mikroskopie - příklady

- krystal cukru



$Z = 570\times$

- krystal kyseliny askorbové



$Z = 140\times$

Využití polarizačních filtrů nebo polarizační vrstvy na čočkách ve fotografii



Redukce odlesků, ostřejší vidění ...

Interferenční mikroskopie

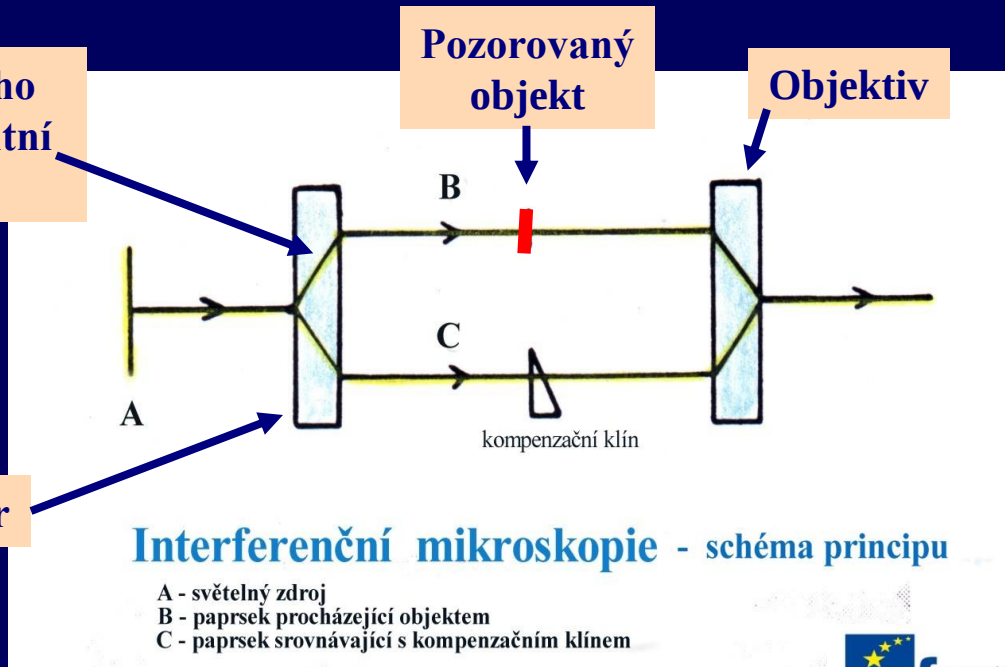
Princip:

- rozklad a znovuspojení polarizovaných světelných paprsků procházejících objektem a nezávisle na objektu

→ interference těchto paprsků

Vznik polarizovaného světla - dva koherentní paprsky

Polarizátor



Světlo, vycházející z osvětlovací soustavy mikroskopu, je rozděleno do **dvou koherentních svazků** paprsků. Po průchodu **preparátem a objektivem** se oba svazky opět spojí do jediného. Projdou-li paprsky preparátem (fázovým objektem) vznikne mezi oběma svazky rozdíl fáze, způsobený strukturou fázového objektu. Následkem toho nastane ve spojeném svazku **interference světelných vln**, která obecně způsobí **změny v amplitudě vlnění**.

Tak vzniknou kontrasty optické hustoty, což se projeví zviditelněním fázového objektu (který byl původně průhledný).

Při interferenční mikroskopii vzniká vlnový (fázový) rozdíl:

- paprsky procházející opticky hustším prostředím (např. buněčnou stěnou) se opožďují za paprsky procházejícími prostředím s menší optickou hustotou (např. cytoplazmou, vodou)
- při použití monochromatického světla
 - světlé a tmavé interferenční pruhy
- při použití celého spektra
 - různě barevné pruhy vlivem interference různých λ

■ Využití:

- kontrastní barevné až plastické pozorování živých tkání
- kvantitativní měření, tzv. **mikrointerferometrie**
 - stanovení obsahu vody ve tkáni
 - měření tloušťky mikroskopických objektů
 - měření indexu lomu buněčných složek aj.

Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC)

1955 - polský fyzik a teoretický optik

George Nomarski

■ Princip:

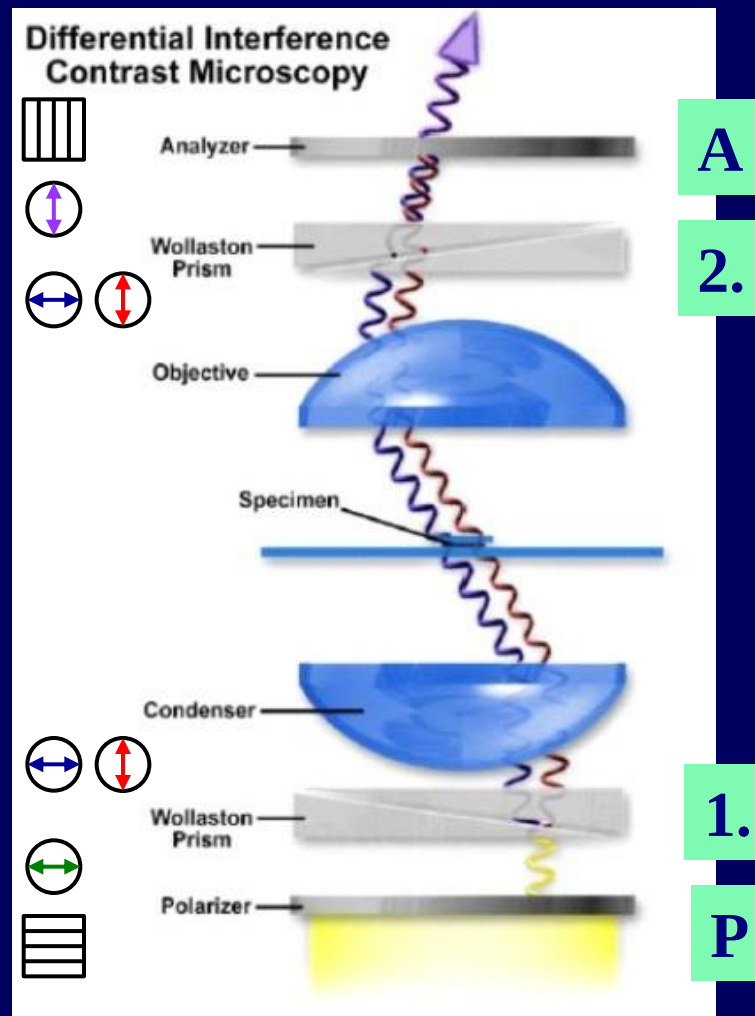
Kombinace polarizace světla
ve dvou polarizačních hranolech
s fázovým posunem vznikajících
ve dvou dvojlomných hranolových děličích
tzv. Wollastonova typu



Chod paprsků:

- před vstupem do kondenzoru je světlo lineárně polarizováno prvním hranolem – polarizátorem (viz P)
- prochází prvním hranolovým děličem (Wollastonův hranol - viz 1.)
- dále jde přes kondenzor do preparátu a následně do objektivu
- projde druhým dělícím Wollastonovým hranolem (viz 2.) těsně za zadní ohniskovou rovinou objektivu
- a následně přes analyzátor (A) nacházejícím se před okulárem

(polarizátor P je orientován kolmo na analyzátor A)



Davidson and Abramowitz

Wolastonovy hranoly:

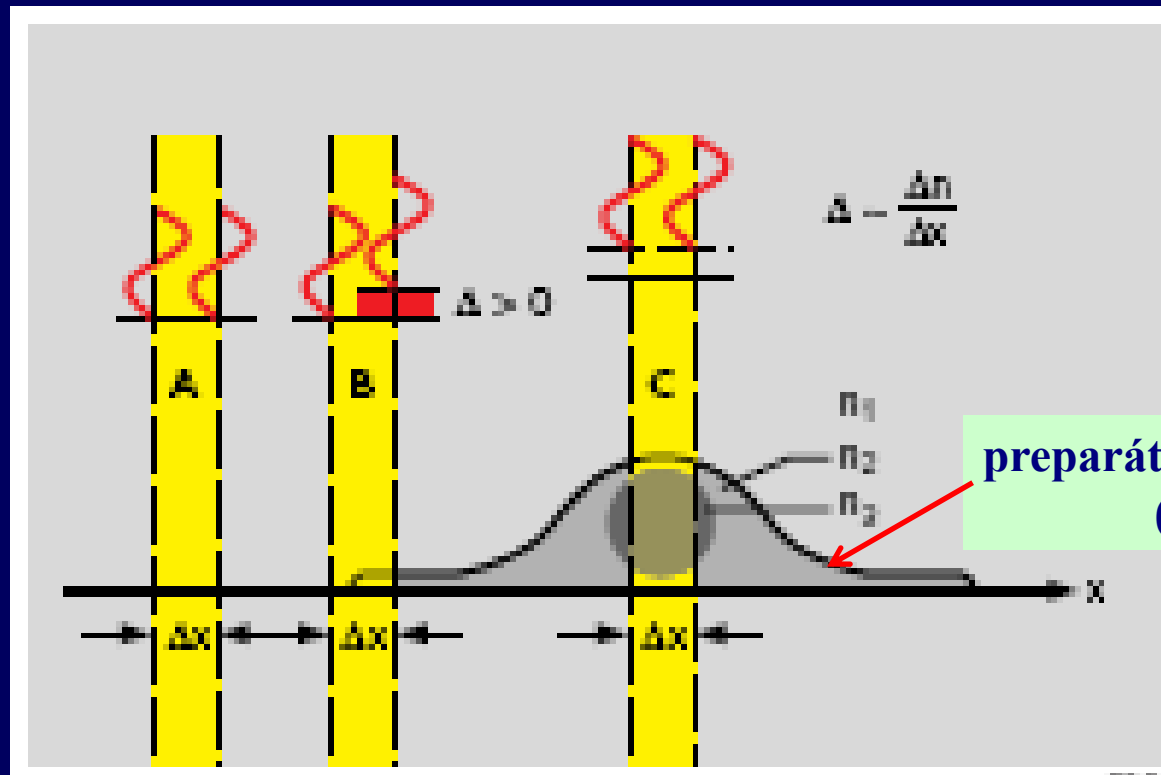
1. **W. hranol** dělí původně lineárně polarizované světlo na dvě vzájemně kolmo polarizované složky (paprsek řádný a mimořádný) vystupující z něj různým směrem a jen nepatrně od sebe vzdálené. Obě složky pak procházejí preparátem trochu jiným místem (a tedy je každé z nich jinak pohlcováno nebo lámáno) a v zadní ohniskové rovině objektivu vznikne zvětšený rozdvojený obraz předmětu, protože při průchodu obou paprsků objektem došlo k velmi malému (řádově jen desetiny μm !) posunu obrazu - tento posun však může být v důsledku různé tloušťky částí preparátu různý, což je způsobeno různými fázovými rozdíly mezi řádnými a mimořádnými paprsky. Těsně za zadní ohniskovou rovinou objektivu je umístěn 2. **W. hranol** (tzv. kompenzační), který tyto mírně posunuté světelné toky složí do jediného, čímž může dojít k interakci v podobě interference.

Analyzátor (A) – vytvoří podmínky pro vzájemnou interferenci vzájemně posunutých obrazů

→ zviditelnění (ve formě různé intenzity světla) případných fázových posunů vznikajících průchodem různě hustého prostředí v pozorovaném objektu (buňce)

Schema podle J. Pláška

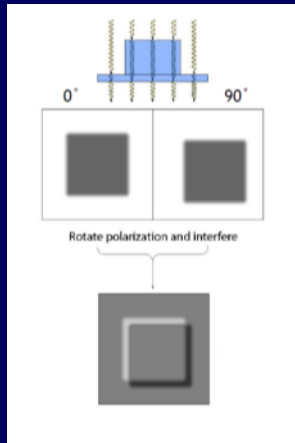
Vznik fázových rozdílů rozděleného polarizovaného světla po průchodu objektem o různé optické tloušťce



preparát o různé tloušťce
(A, B, C)

Příručka Zeiss: <http://www.usask.ca/biology/scopes/MicroscopyBasics.pdf>

■ Výsledek:



- zvětšený obraz vzorku se jeví jako šikmo osvětlený trojrozměrný objekt → **optický reliéf**
(u biologických objektů se zpravidla shoduje s reálným prostorovým reliéfem)

Pozor! objekty nelze proměřovat (→ chybné výsledky)

[http://microscopy.duke.edu/
learn/WLC1.pdf/](http://microscopy.duke.edu/learn/WLC1.pdf/)

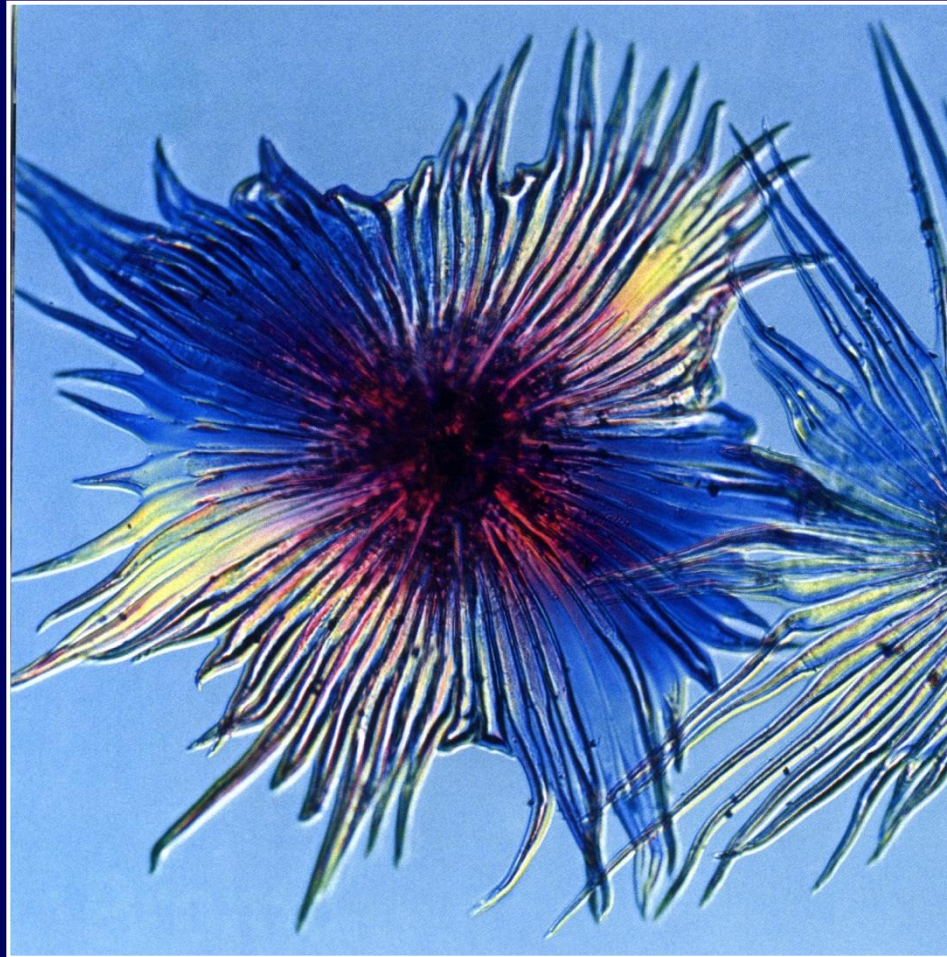
■ Výhoda:

- nevzniká halo efekt typický pro fázový kontrast
- vhodná metoda pro pozorování silných, nebarvených preparátů (tlustších než 5 μm)

x Nevýhoda: - nefunguje při pozorování přes plast (plastové Petriho misky)
- malá hloubka ostrosti

Nomarského interferenční diferenciální kontrast

Plošný trichom hlošiny (*Eleagnus* sp.)

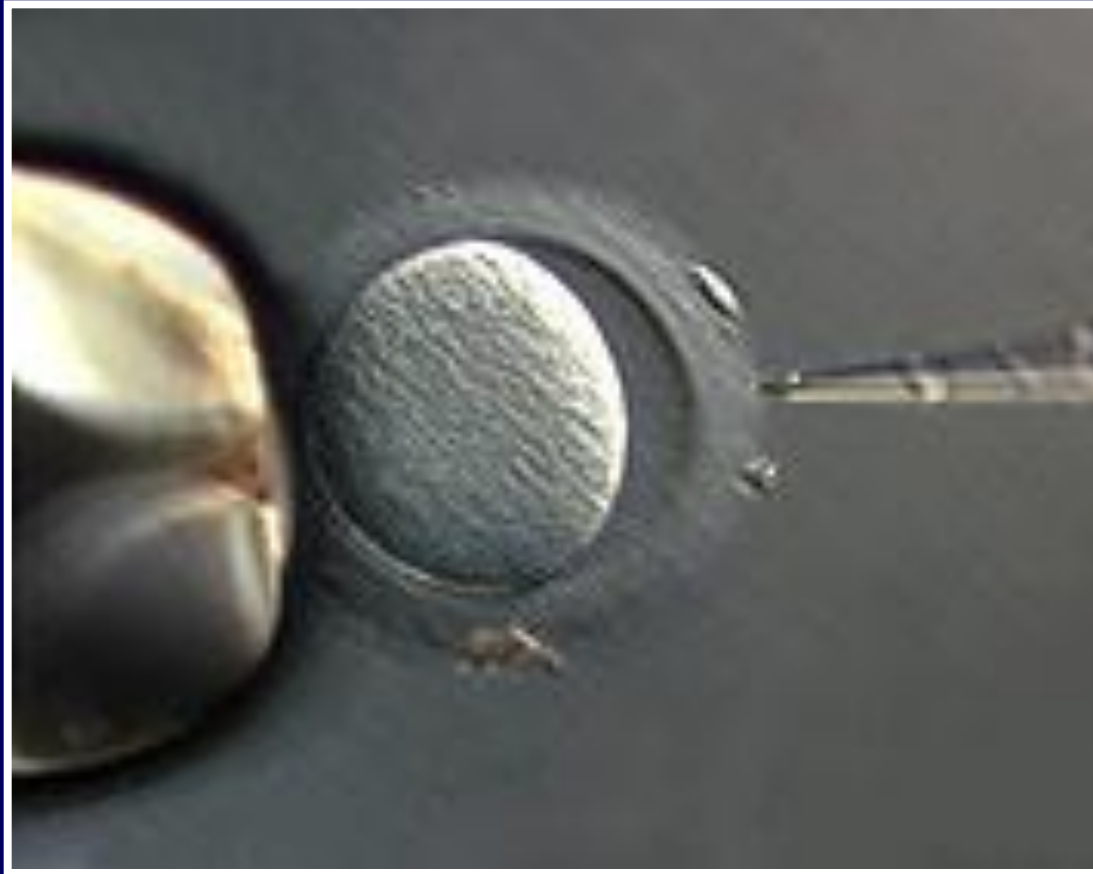


Z = 360x

Plášek J., Vesmír 83

Nomarského interferenční diferenciální kontrast

Umělé oplodňování (mikromanipulace)



Nomarského interferenční diferenciální kontrast

- krystaly št'avelanu vápenatého



Z = 140x

Plášek J., Reischig J., Vesmír 11

Srovnání různých metod pozorování

Buchanka
(*Cyclops*)

Z = 50x

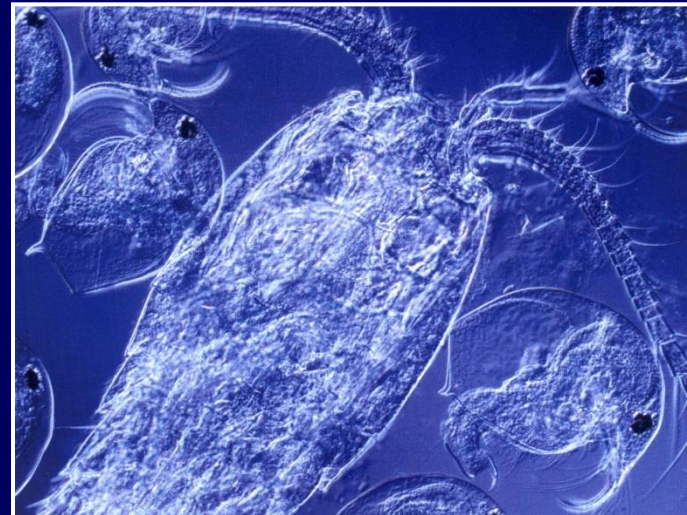
Procházející světlo



Temné pole



DIC



Hoffmanův modulační kontrast (HMC)

Obrazová ohnisková rovina objektivu

- **Princip:**

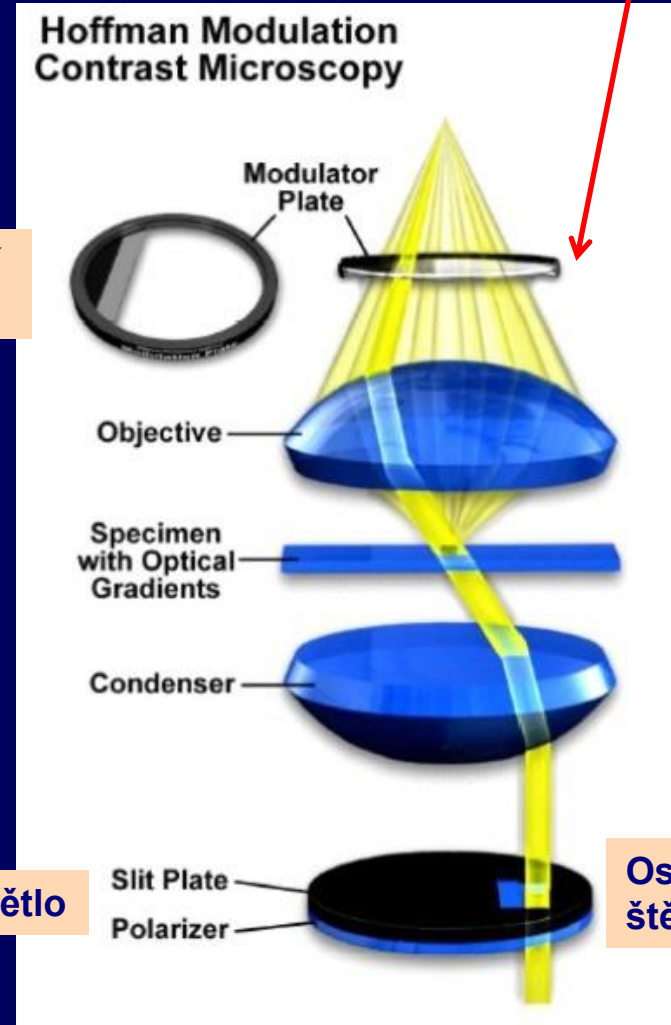
Zdokonalená verze šikmého osvětlení preparátu

Modulační destička

(obdélníková štěrbinová apertura v přední ohniskové rovině kondenzoru mimo optickou osu mikroskopu)

- **Výsledek se podobá pozorování v temném poli**

Polarizované světlo



Osvětlovací štěrba

- funkce modulační destičky

- **Modulační destička**

- maska, na které má vrstva ležící v místě obrazu kondenzorové štěrby 15% propustnost světla, na jedné straně od ní je absorbující plocha, která nepropouští světlo vůbec a na druhé straně je plocha pro světlo zcela propustná

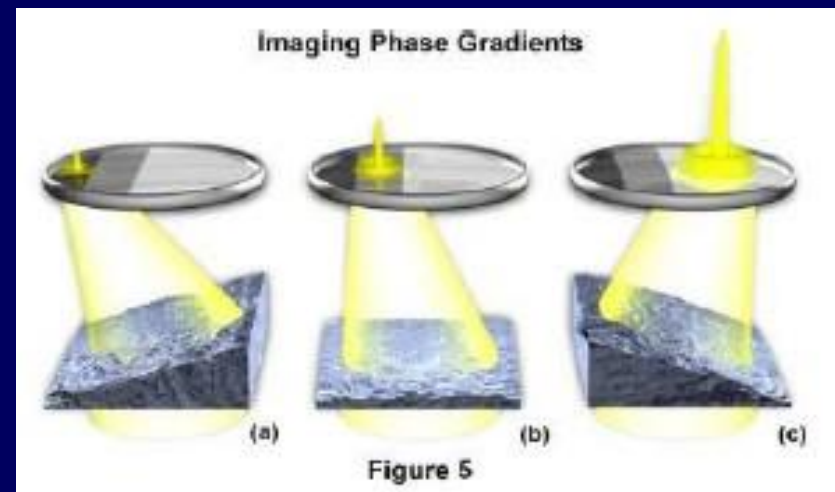
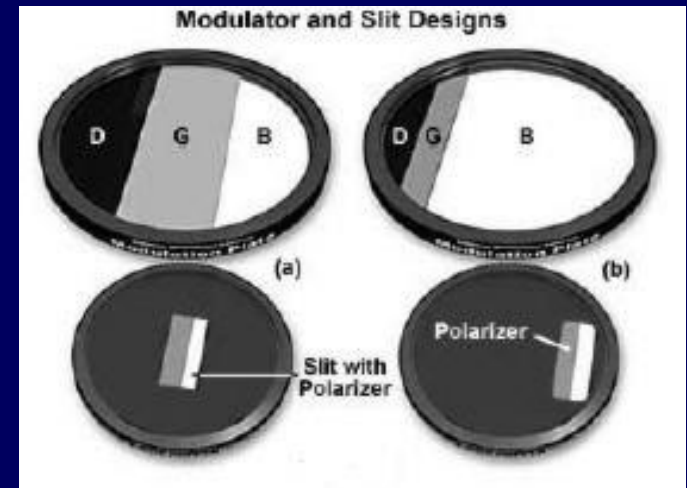


Figure 5

Davidson and Abramowitz

Funkce modulační destičky

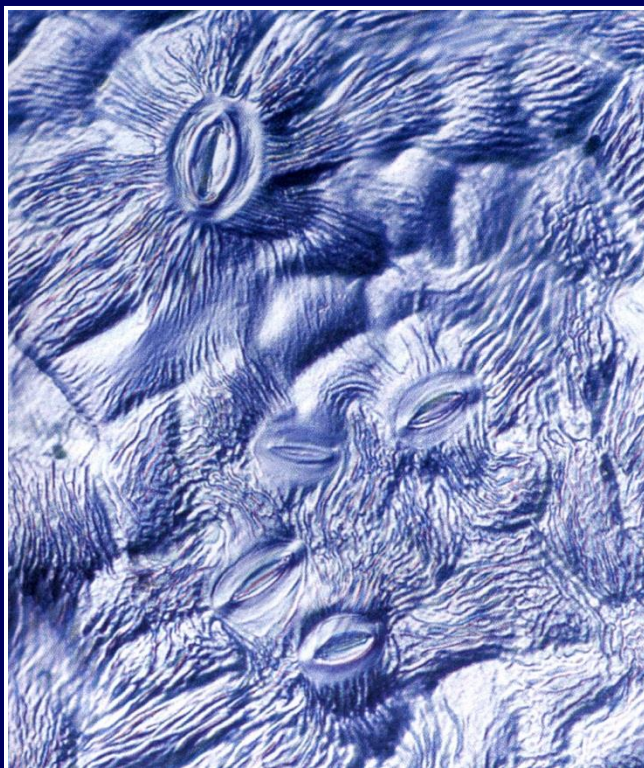
- záření ze štěrbiny zdroje, které prochází oblastí vzorku s gradientem optické tloušťky, se odchýlí od původního směru a obraz, který vytvoří v objektivu, bude posunutý vzhledem k zóně modulátoru s 15% absorbancí, takže dopadne na zcela absorbující nebo zcela propustnou plochu
- dojde ke ztemnění nebo zjasnění příslušného místa v mikroskopickém obraze

■ Výhody oproti DIC

- podobné zobrazení jako u DIC, ale levnější
- možnost pozorování objektů i na dvojlomných podložkách
(např. plastické nádoby na kultivaci buněk)

Hoffmanův modulační kontrast

**Mikroreliéfový preparát
listu lípy (*Tilia* sp.)**



Z = 600x

**Polytenní chromozómy
z larev pakomára (*Chironomus* sp.)**

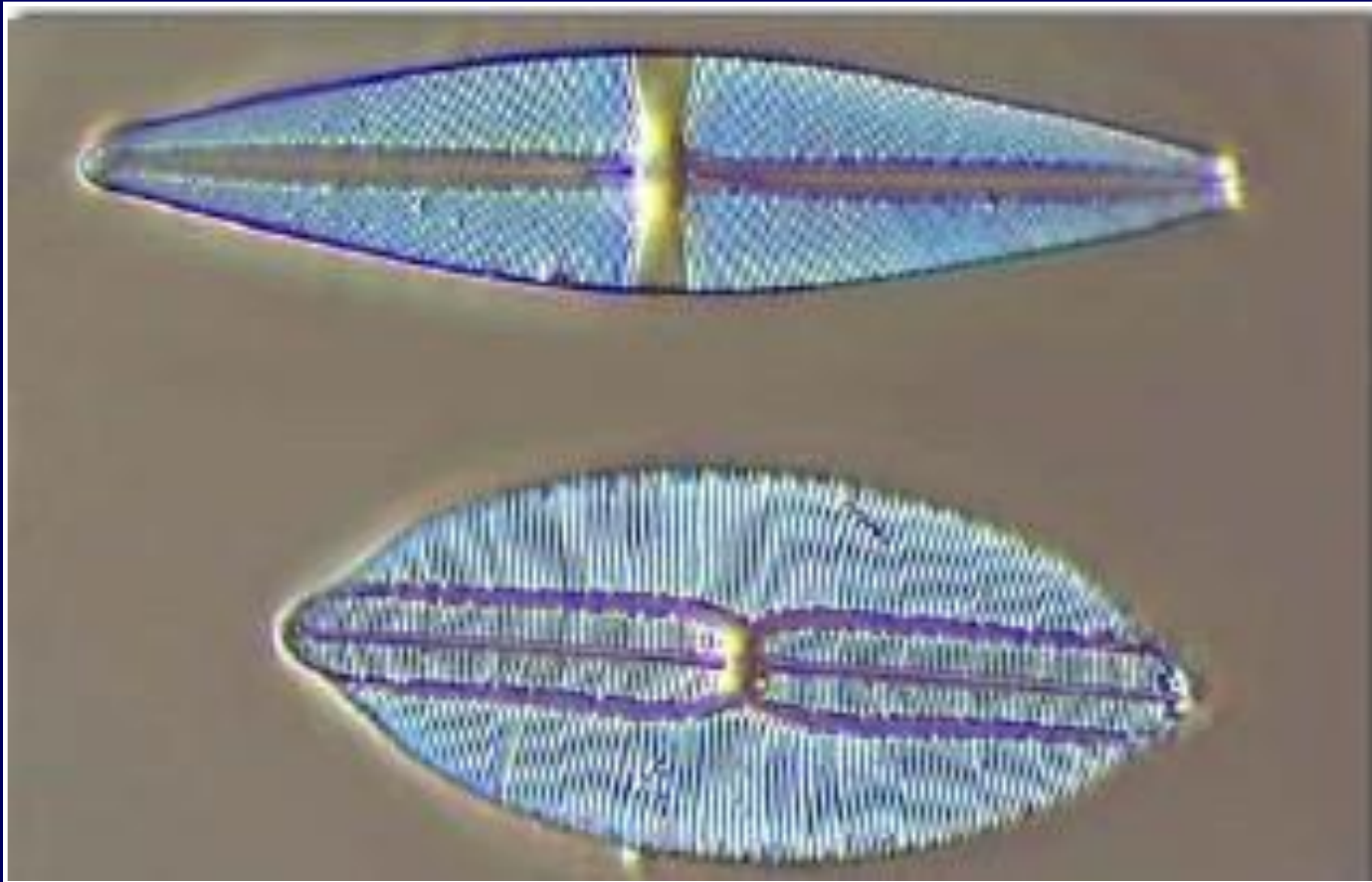


Z = 710x

Plášek J., Reischig J., Vesmír 11

Hoffmanův modulační kontrast

Rozsivky



Holografická mikroskopie

- umožňuje provést záznam vlnového pole modulovaného vyšetřovaným předmětem a poté provedení jeho rekonstrukce

Princip holografie*:

- vyšetřované vlnové pole necháme interferovat s nějakým známým vlnovým polem (referenčním polem)
- záznam interferenčního pole na detektor (fotografická deska, CCD senzor apod.)
- získání interferogramu (hologramu), který je trvalým záznamem vyšetřovaného vlnového pole

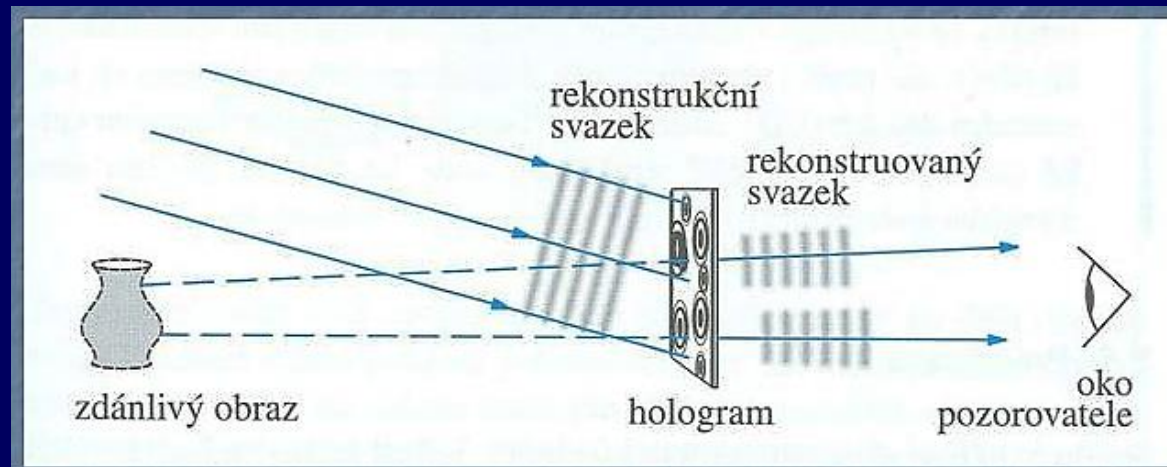
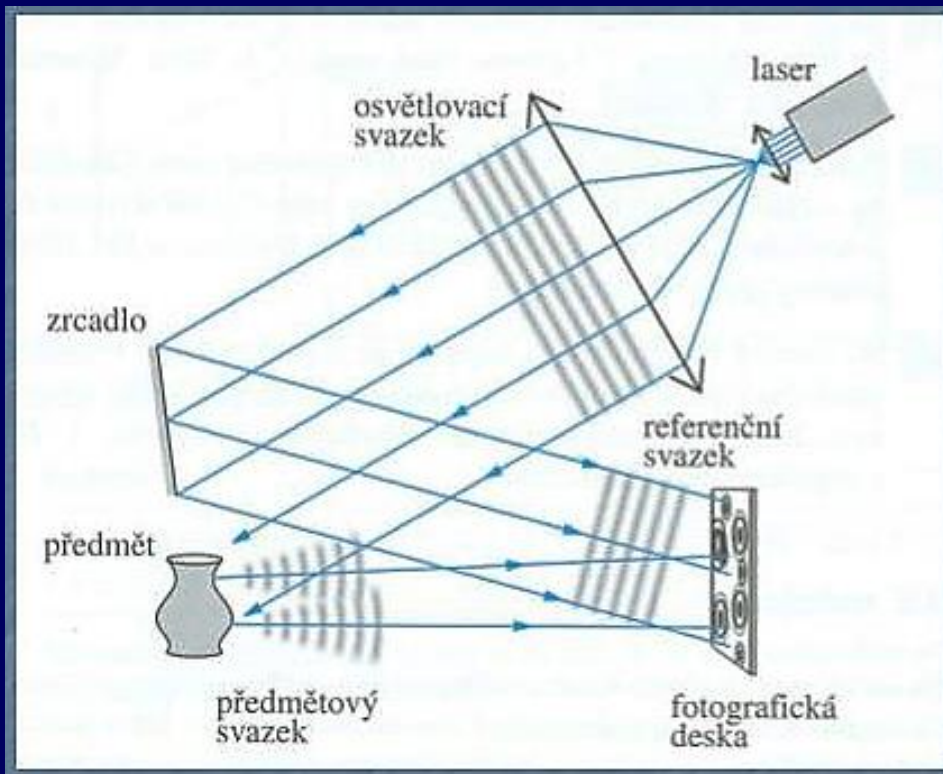
* 1947 - britský fyzik Dennis Gabor (NC 1971)

Z interferogramu pak můžeme vyšetřované pole kdykoliv zrekonstruovat, a to buď fyzicky, nebo digitálně. Při rekonstrukci se hologram osvětlí laserovým světlem pod stejným úhlem, pod nímž na fotografickou desku dopadal referenční svazek při zhotovování hologramu.

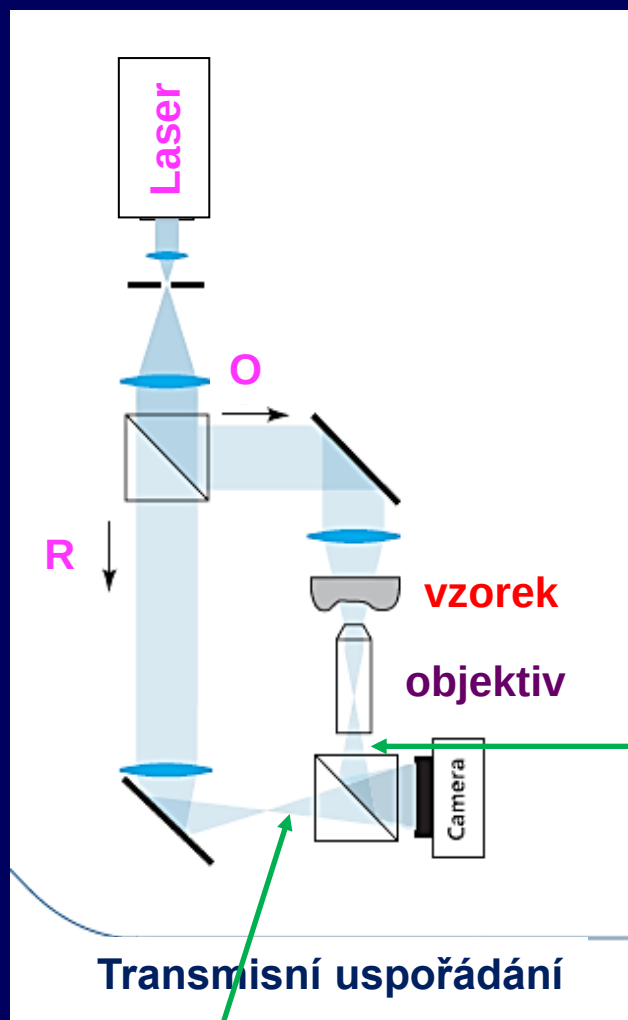
Takto zrekonstruované vlnové pole můžeme dále analyzovat a aplikovat na něj různé mikroskopické metody, jako např. fázový a interferenční kontrast, temné pole atd.

(i v době, kdy již vyšetřovaný předmět není k dispozici)

Princip tvorby holografického obrazu a jeho rekonstrukce



Chod paprsků v holografickém mikroskopu



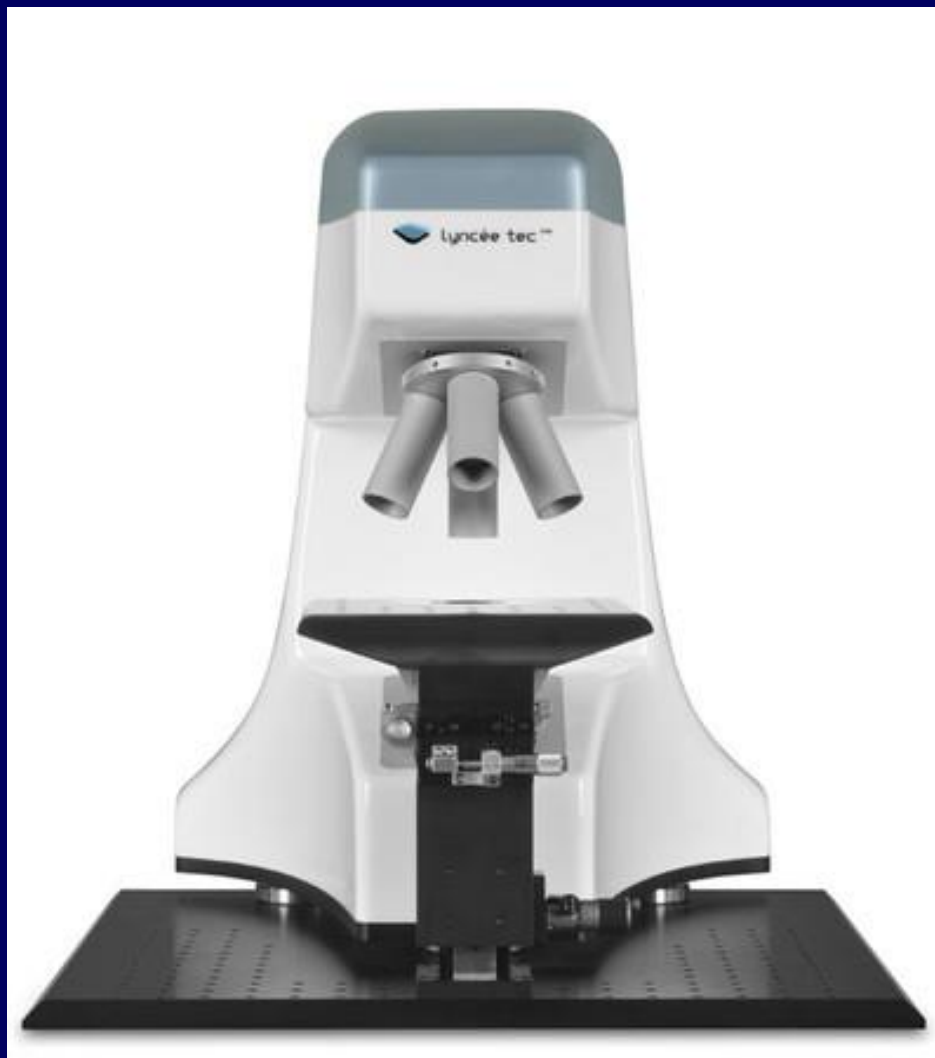
předmětový svazek

O: osvětlovací svazek

R: referenční svazek
(koherentní laserové světlo)

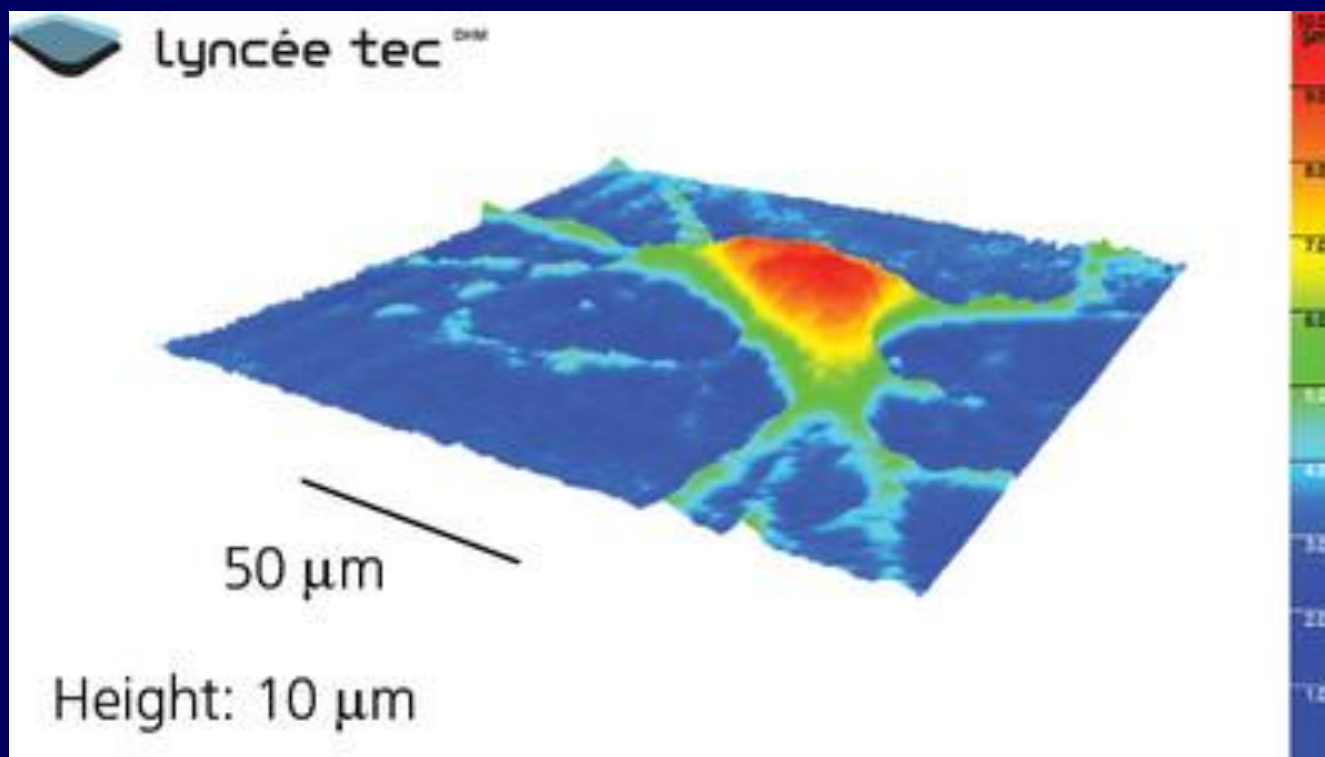
referenční svazek

Digitální holografický mikroskop firmy Lyncée Tec

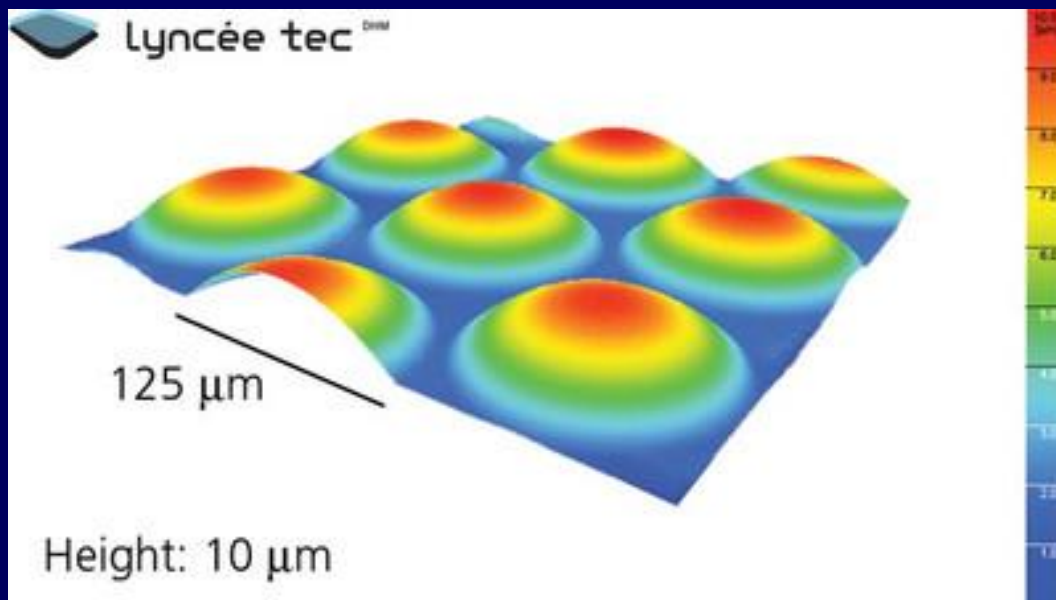


Ukázky obrázků pořízených mikroskopem DHM 1000, Lyncée tec.

Živý neuron - dlouhodobé pozorování změny morfologie neuronů vlivem stimulace atd.



Mikročočky vytvořené na Si waferu (substrátovém disku) *



<https://cs.wikipedia.org/wiki/Wafer#/media/File:Etchedwafer.jpg>

* Wafer (substrátový disk) je základní disk z polovodiče používaný jako substrát, na kterém se vytvářejí mikroobvody.

Infračervené světlo (IČ)

■ Princip:

Použití světla o delší vlnové délce snadněji pronikající hmotou

($\lambda \approx 750 - 1\,100\text{ nm}$; oko není citlivé na tyto vlnové délky)

Kvalitativní i kvantitativní měření

■ Předpoklady:

zdroj světla - wolframová žárovka

optika mikroskopu skleněná, často zrcadlová

registrace obrazu – speciální detektory nebo senzibilizovaná fotografická vrstva

■ Využití:

- **pozorování málo průhledných objektů**
(studium chitinových blan hmyzu, schránek korálů, rostlinných zdřevnatělých pletiv, vyvíjejících se vajíček, stříbrem impregnovaných nervových tkání aj.)
- **aplikace na objekty přirozeně červeně zbarvené**
- **pozorování objektů barvených barvivy zachycující IČ paprsky** (kryptocyanin, neocyanin)
- **vč. kvantitativního měření**

Literatura:

Základní články z časopisu Vesmír a Živa:

Jaromír Plášek, Josef Reischig: Kontrast v optické mikroskopii.
Vesmír 11, 638-642, 1995.

Jaromír Plášek: Proměny světelné mikroskopie ve 20. století.
Vesmír 83, 146- 153, 2004.

Bulantová, J., Macháček, T.: Kapesní průvodce světem mikroskopů.
Živa 6/2017, příloha CLXIV.

Bulantová, J., Macháček, T.: Sen o univerzálním mikroskopu.
Živa 6/2017, 297.

Další informace + virtuální obrázky:

<http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/techniques/index.html>

Polarizace:

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/polarizedlight/filters/index.html>