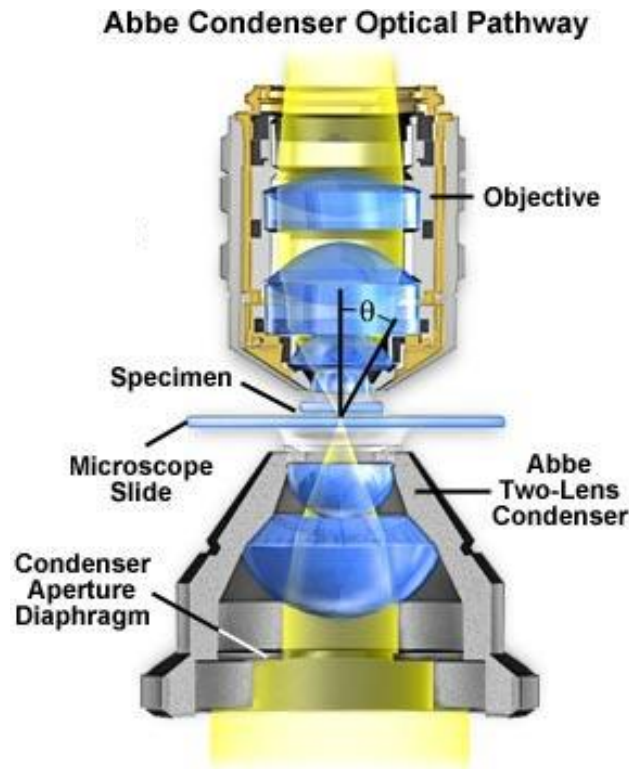


Zobrazovací metody ve světelné mikroskopii

Světlé pole

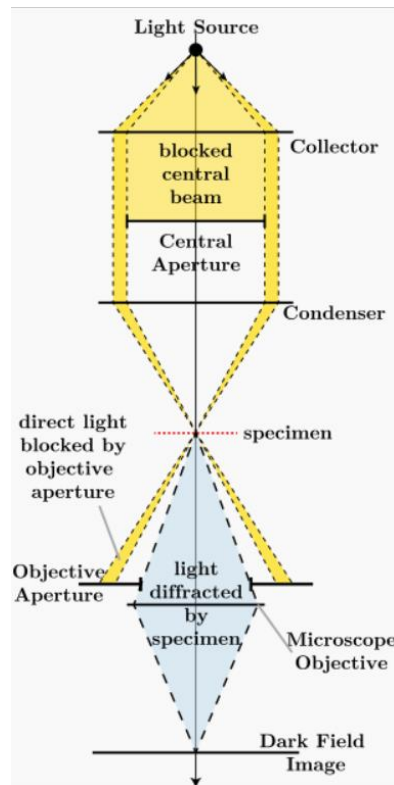
- nejjednodušší a nestarší technika osvětlení ve SM
- světelný kužel prochází (v *procházejícím světle*) nebo se odráží (v *odraženém světle*) a vstupuje do objektivu
- v imerzní metodě se mezi krycí sklíčko (nebo vzorek) a objektiv, případně mezi kondenzor a preparát, dává imerzní kapalina
- nevýhoda: u biologických vzorků nižší kontrast – použití barvicích technik



Zobrazovací metody ve světelné mikroskopii

Temné pole

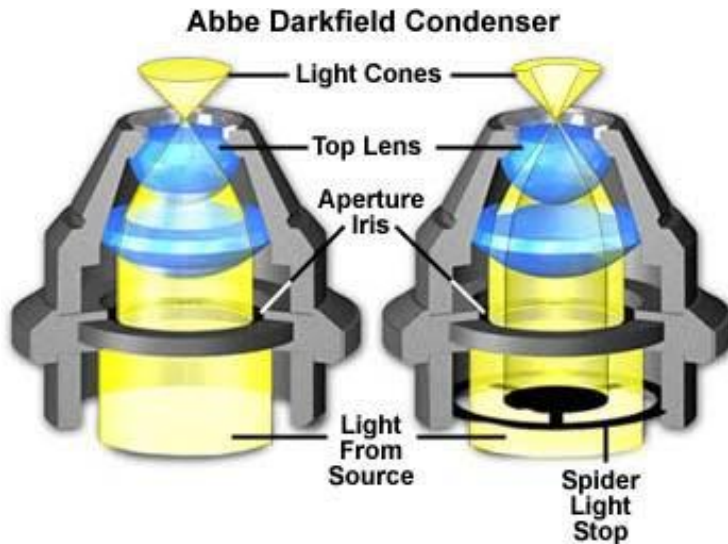
- osvětlovací soustava je upravena tak, že paprsky osvětlující preparát nevstupují do objektivu
- objektivem prochází pouze paprsky lomené, odražené, difraktované nebo rozptýlené
- je vyloučeno 0-té ohybové maximum a na vytvoření obrazu se podílí boční ohybová maxima
- vhodné pro pozorování silně rozptylujících vzorků



Zobrazovací metody ve světelné mikroskopii

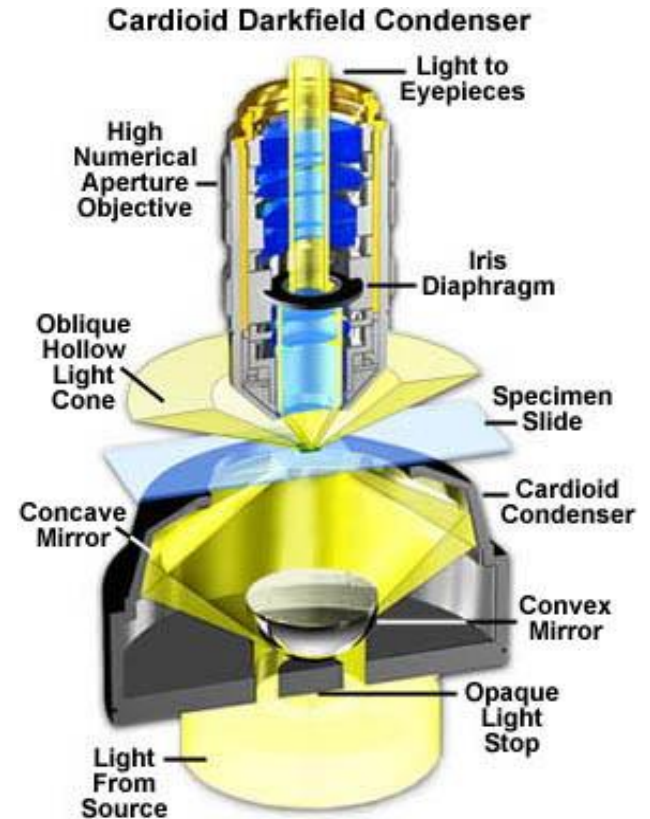
Temné pole – realizace kondenzorů pro osvětlení

Abbeův kondenzor se clonou

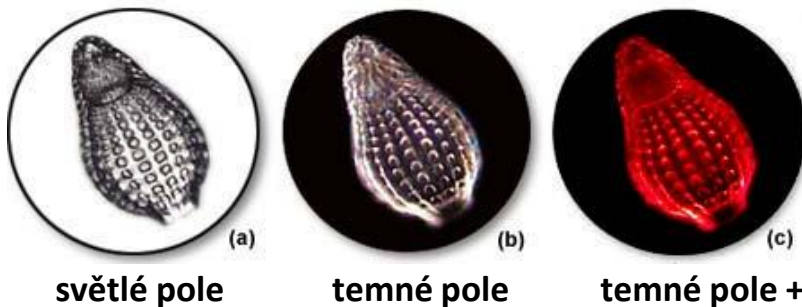


Kardioidní kondenzor s polokulovým vypuklým zrcadlem

- **clonka v objektivu (iris diaphragm)** snižuje numerickou aperturu objektivu $\Rightarrow$ světelný kužel vycházející ze vzorku nevstupuje do okuláru (např. při blízké vzd. vzorku od objektivu)



Obraz preparátu v temném poli - mřížovec s křemičitou schránkou



Fázový kontrast (Fritz Zernike)



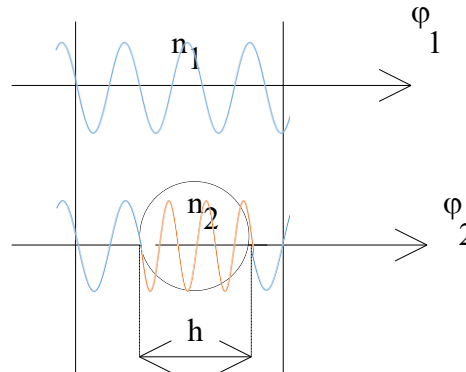
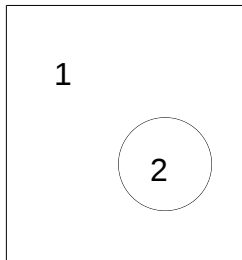
- Fritz Zernike (1888-1966) sestrojil první fázový mikroskop v roce 1930 (Univerzita v Groningenu, Nizozemí)
- v roce 1956 získal Nobelovu cenu za fyziku

Fázový kontrast

- metoda slouží ke zvýraznění kontrastu malých fázových objektů, u nichž detaily se absorpcí neliší od okolí, ale způsobují změnu fáze
- změnu amplitudy vidíme, **změnu fáze ne** $\Rightarrow$ metoda fázového kontrastu převádí **rozdíly fází** na **rozdíly intenzit**

Odvození

- uvažujme v preparátu malý bezbarvý objekt 2, který je v médiu 1
- fáze paprsků procházejících objektem a prostředím je odlišná díky různému indexu lomu



Vlnění v bodě x v prostředí n_1 : $y_1 = A_1 \cdot \sin \frac{2\pi x}{\lambda_1} = A_1 \cdot \sin \frac{2\pi x}{\lambda_0} \cdot n_1$, $\lambda_1 = \frac{\lambda_0}{n_1}$

Vlnění v bodě x v prostředí n_2 : $y_2 = A_2 \cdot \sin \frac{2\pi h}{\lambda_2} = A_2 \cdot \sin \frac{2\pi h}{\lambda_0} \cdot n_2$

Fázový rozdíl (pro $x = h$):

$$\Delta\varphi = \varphi_2 - \varphi_1 = \frac{2\pi}{\lambda_0} h(n_2 - n_1)$$

Fázový kontrast

Vlnění v rovině obrazu:

$$y_1 = A_1 \cdot \sin \frac{2\pi x}{\lambda_1} = A_1 \cdot \sin \omega t$$

$$y_2 = A_2 \cdot \sin(\omega t + \Delta\varphi)$$

Vlnu y_2 prošlou fázovým objektem lze upravit:

$$y_2 = A_2 \cdot \sin(\omega t + \Delta\varphi) = \underbrace{A_2 \cdot \cos \Delta\varphi}_{a_1} \cdot \sin \omega t + \underbrace{A_2 \cdot \sin \Delta\varphi}_{a_2} \cdot \cos \omega t =$$

$$= a_1 \cdot \sin \omega t + a_2 \cdot \cos \omega t = a_1 \cdot \sin \omega t + a_2 \cdot \sin \left(\omega t + \frac{\pi}{2} \right)$$

Pro malý fázový objekt platí: $\Delta\varphi \rightarrow 0$, $a_1 \cong A_2$, $a_2 \rightarrow 0$

$$y_2 = \underbrace{A_2 \cdot \sin \omega t}_{v_1} + \underbrace{a_2 \cdot \sin \left(\omega t + \frac{\pi}{2} \right)}_{v_2}$$

Vlnu y_2 si lze představit jako vlnu složenou z vlny v_1 a vlny v_2

- vlna v_2 je vůči v_1 relativně velmi malá a je posunutá o $\pi/2$
- z fyzikálního hlediska lze říci, že v_1 prochází **přímo** vzorkem **bez změny fáze** a v_2 je **rozptýlená vlna s posunutou fází**

Fázový kontrast

- v obrazové rovině jsou intenzity vln dány časovou střední hodnotou kvadrátu okamžité amplitudy:

$$I_1 = B \cdot \frac{1}{T} \int_0^T A_1^2 \cdot \sin^2 \omega t \, dt = \frac{A_1^2}{2} B$$

$$I_2 = B \cdot \frac{1}{T} \int_0^T A_2^2 \cdot \sin^2(\omega t \pm \Delta\varphi) \, dt = \frac{A_2^2}{2} B$$

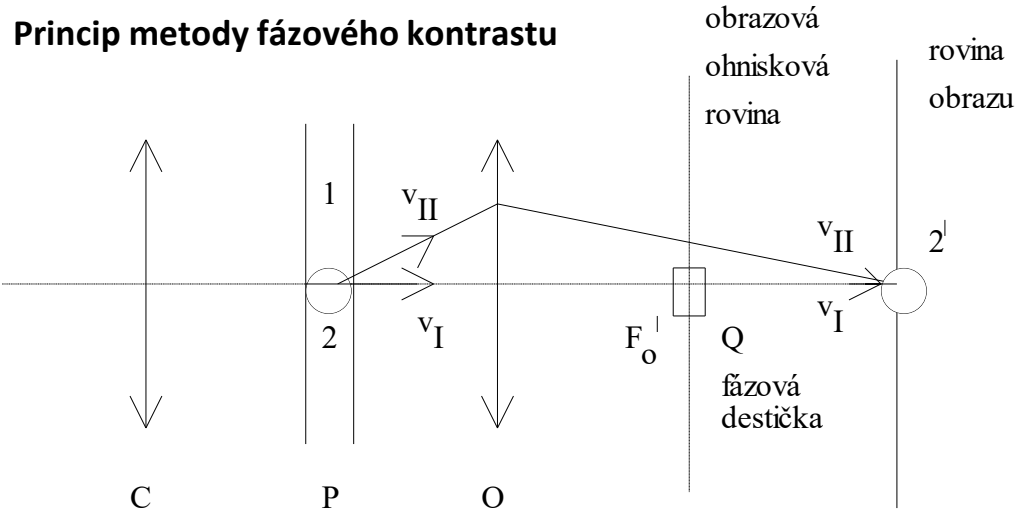
- B - konstanta
- pro fázový objekt platí, že nedochází ke změně amplitudy: $A_1 = A_2 \Rightarrow I_1 = I_2$
- pro kontrast platí: $K_{(2-1)} = \frac{I_2 - I_1}{I_2 + I_1} = 0 \Rightarrow$ objekt není v obrazu rozeznatelný



Jak zobrazit fázový objekt s nenulovým kontrastem?

Fázový kontrast

- pro vlnu procházející fázovým objektem platí: $y_2 = \underbrace{A_2 \cdot \sin \omega t}_{\mathbf{v_1}} + \underbrace{a_2 \cdot \sin \left(\omega t + \frac{\pi}{2} \right)}_{\mathbf{v_2}}$



- v zadní ohniskové rovině jsou vlny $\mathbf{v_1}$ a $\mathbf{v_2}$ prostorově oddělené
- fázová destička umístěná do F'_0 zpozdí prošlou vlnu $\mathbf{v_1}$ o $\pi/2$ (čtvrtvlnová destička) nebo $3/2 \pi$
- konstrukce fázové destičky závisí na použitém materiálu

$$\Delta\varphi = \varphi_{destička} - \varphi_1 = \frac{2\pi}{\lambda_0} \cdot \text{tloušťka destičky} \cdot (n_{destička} - n_1) = \frac{\pi}{2}$$

Fázový kontrast

- při použití fázové destičky je prošlá vlna dodatečně zpožděna:

$$y_2 = \sin(\omega t + \Delta\varphi) = A_2 \cdot \cos \Delta\varphi \cdot \sin\left(\omega t + \frac{\pi}{2}\right) + A_2 \cdot \sin \Delta\varphi \cdot \sin\left(\omega t + \frac{\pi}{2}\right)$$

- pro intenzitu světla v obrazové rovině platí:

$$\begin{aligned} I_2 &= B \frac{1}{T} \int_0^T \left[A_2 \cdot \cos \Delta\varphi \cdot \sin\left(\omega t + \frac{\pi}{2}\right) + A_2 \cdot \sin \Delta\varphi \cdot \sin\left(\omega t + \frac{\pi}{2}\right) \right]^2 dt = \\ &= \frac{A_2^2}{2} B (1 \pm 2 \cos \Delta\varphi \cdot \sin \Delta\varphi) \end{aligned}$$

- pro kontrast s fázovou destičkou platí:

$$K_{(2-1)} = \frac{I_2 - I_1}{I_2 + I_1} = \frac{\frac{A^2}{2} B (1 \pm 2 \cos \Delta\varphi \cdot \sin \Delta\varphi) - \frac{A^2}{2} B}{\frac{A^2}{2} B (1 \pm 2 \cos \Delta\varphi \cdot \sin \Delta\varphi) + \frac{A^2}{2} B} = \boxed{\frac{\pm \cos \Delta\varphi \cdot \sin \Delta\varphi}{1 \pm \cos \Delta\varphi \cdot \sin \Delta\varphi}}$$

- kontrast K je nenulový
 - pro čtvrtvlnovou destičku je fázový objekt tmavší než okolí – pozitivní kontrast
 - pro tříčtvrtěvlnovou destičku je objekt světlejší než okolí – negativní kontrast

Metoda fázového kontrastu převádí **rozdíly fází** na **rozdíly intenzit**.

Fázový kontrast

- kontrast detailů lze zvýšit přidáním absorpční vrstvy k fázové destičce $\Rightarrow$ mimo fázový posun dochází také k **zeslabení intenzity** fázovou destičkou (parametr c)

$$\begin{aligned} I''_2 &= B \cdot \frac{1}{T} \int_0^T \left[c \cdot A_2 \cdot \cos \Delta\varphi \cdot \sin \left(\omega t + \frac{\pi}{2} \right) + A_2 \cdot \sin \Delta\varphi \cdot \sin \left(\omega t + \frac{\pi}{2} \right) \right]^2 dt = \\ &= \frac{A_2^2}{2} \cdot B (c^2 \cos^2 \Delta\varphi + \sin^2 \Delta\varphi \pm 2c \cos \Delta\varphi \cdot \sin \Delta\varphi) \end{aligned}$$

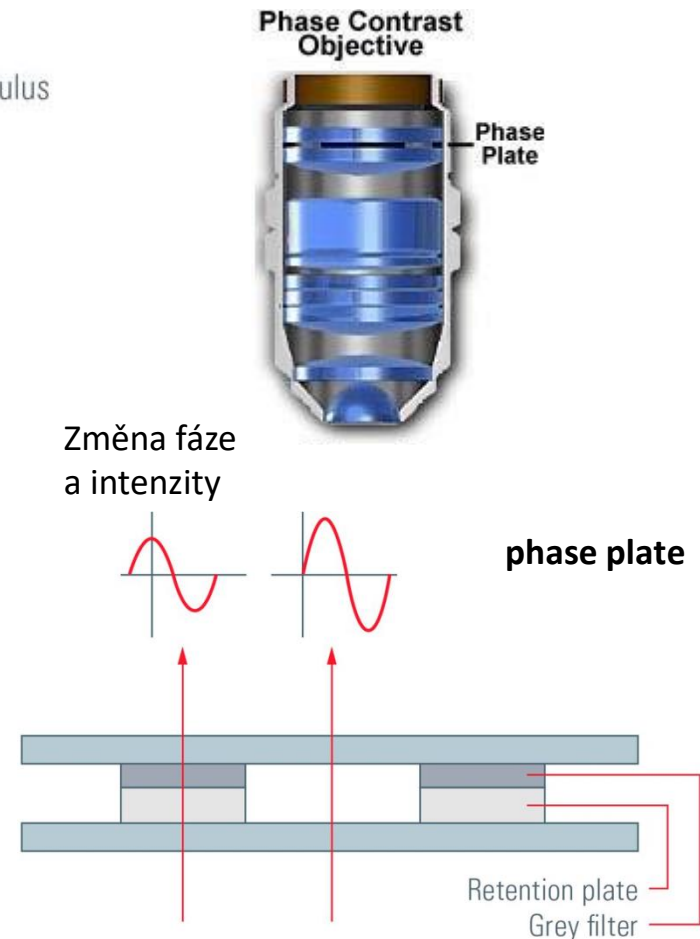
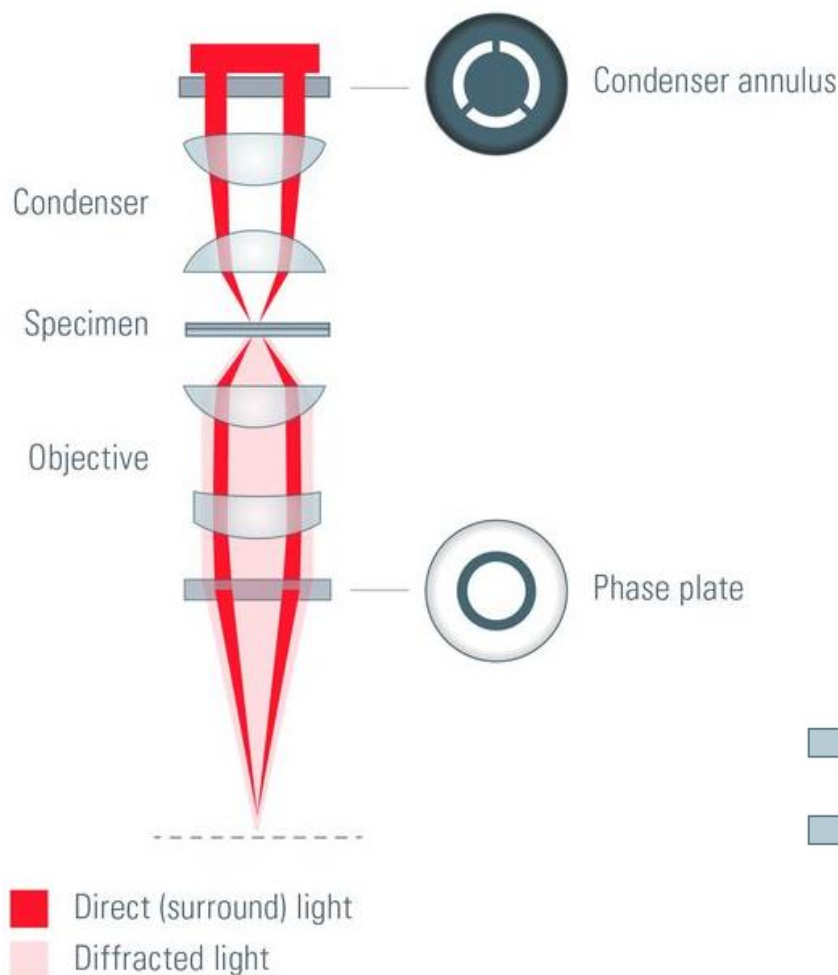
- pro kontrast platí:

$$K''_{(1-2)} = \frac{1 - c^2 \cos^2 \Delta\varphi - \sin^2 \Delta\varphi \pm 2c \cdot \cos \Delta\varphi \sin \Delta\varphi}{1 + c^2 \cos^2 \Delta\varphi + \sin^2 \Delta\varphi \pm 2c \cdot \cos \Delta\varphi \sin \Delta\varphi} \approx \frac{1 - c^2 - \Delta\varphi^2 \pm 2c\Delta\varphi}{1 + c^2 + \Delta\varphi^2 \pm 2c\Delta\varphi}$$

- pro $c \rightarrow 0$ se míra kontrastu zvyšuje, $K'' \rightarrow 1$ – pozitivní kontrast

Praktická realizace fázového kontrastu

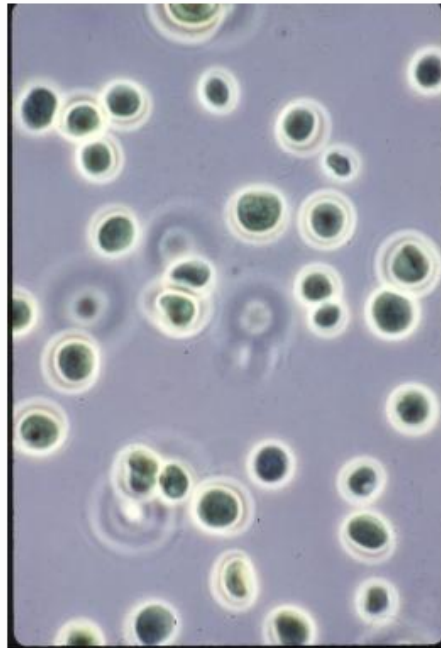
- v ohniskové rovině kondenzoru je **prstencová fázová clonka**
- v ohniskové rovině objektivu je komplementární **prstencová fázová destička**
- vzorek je osvětlen prstencem světla
- přímý (nedifraktovaný) paprsek po průchodu vzorkem prochází fázovou destičkou $\Rightarrow$ zeslabení intenzity a fázový posun o $\pi/2$



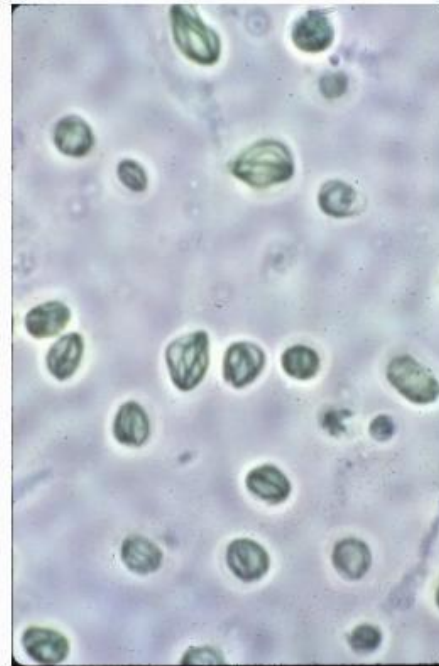
Zobrazovací artefakt fázového kontrastu

- průvodním jevem fázového kontrastu je vznik tzv. **aureoly** (haló efekt) - světlý obrys kolem **neporušeného** fázového objektů
- vzniká v důsledku ohybu paprsků na fázové destičce, lomu paprsků světla na velkém gradientu indexu lomu
- využívá se např. při posouzení intaktnosti izolovaných chloroplastů (kvalita izolace)

Izolované chloroplasty ve SM v režimu fázového kontrastu



Intact



Broken

Ultrafialová mikroskopie

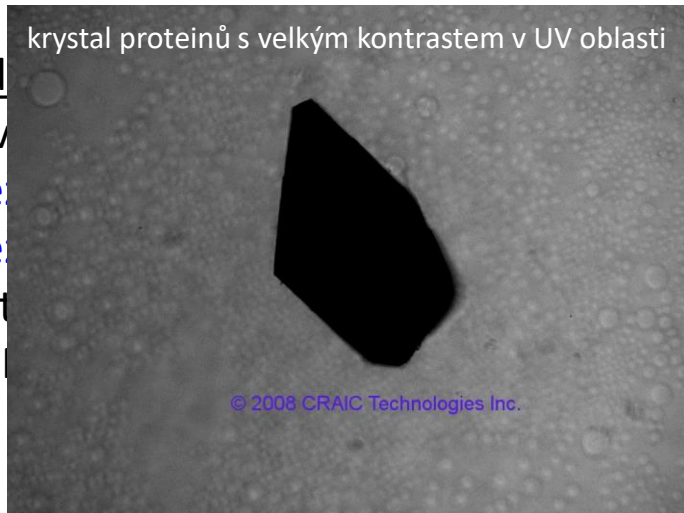
- zkracováním vlnové délky světla se zvyšuje rozlišovací schopnost SM
 - limity: pod 400 nm lidské oko není citlivé, pod 350 nm běžné sklo nepropouští

Požadavky na UV mikroskopii

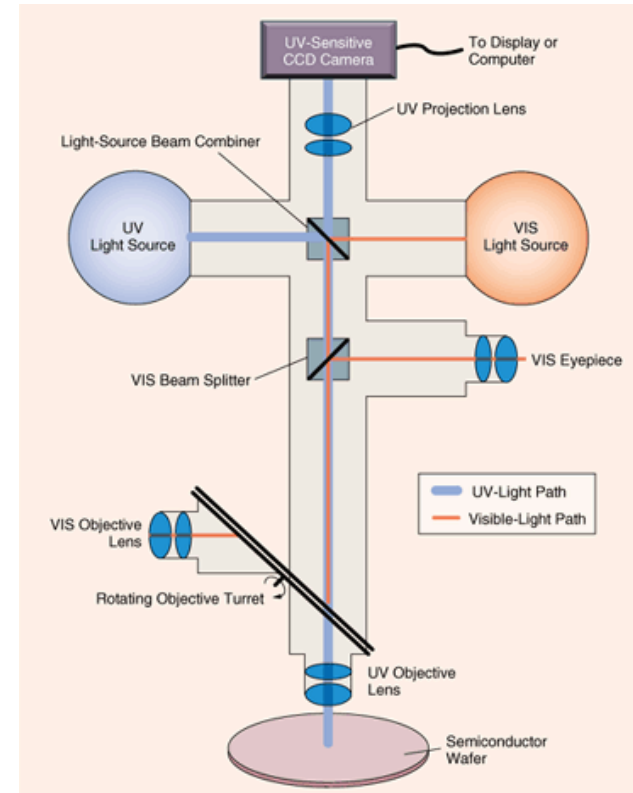
- zdroj: lampa s emisí v UV oblasti (např. rtuťové výbojky)
- optika: z křemenného skla (propouští UV) nebo zrcadlová optika
- detekce: fotografická, fluorescenční stínítko, UV-CCD kamera
- preparáty: UV mikroskopie umožňuje sledovat a lokalizovat objekty s absorpcí v UV oblasti (nukleové kyseliny – absorpce cca 260 nm; krystaly proteinů)

Vhod

- dv
- re
- re
- (ot
- „



kopu
tivu
ktiv



Infračervená mikroskopie

- využívá vlnové délky v oblasti 750 – 1100 nm (blízká IR - NIR)
 - limity: oko v této oblasti nad 750 nm není citlivé

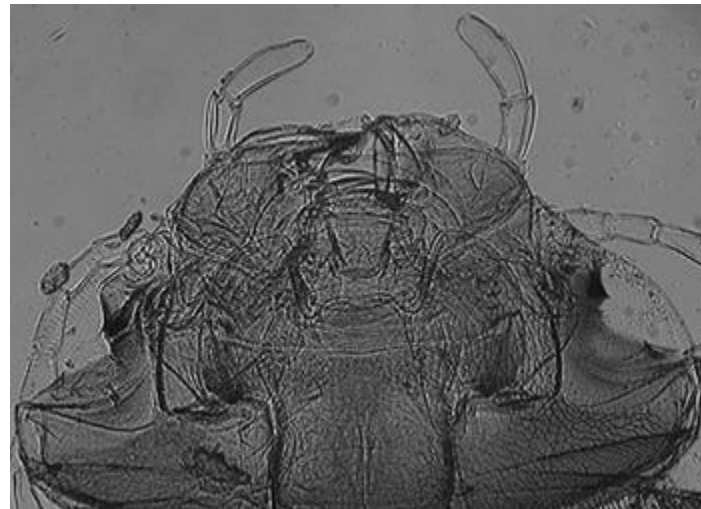
Požadavky na infračervenou mikroskopii

- zdroj: běžné žárovky, halogenky
- optika: běžné sklo nebo zrcadla
- detekce: CCD kamery, fotografický materiál citlivý pro IR oblast (např. barvivo kryptocyanin)
- preparáty: může být i silnější (IR proniká objekty snadněji než viditelné světlo,
 - preparáty lze i kontrastně barvit – např. kryptocyaninem
 - studium schránek korálů, chitinové schránky hmyzu

Potápník vroubený



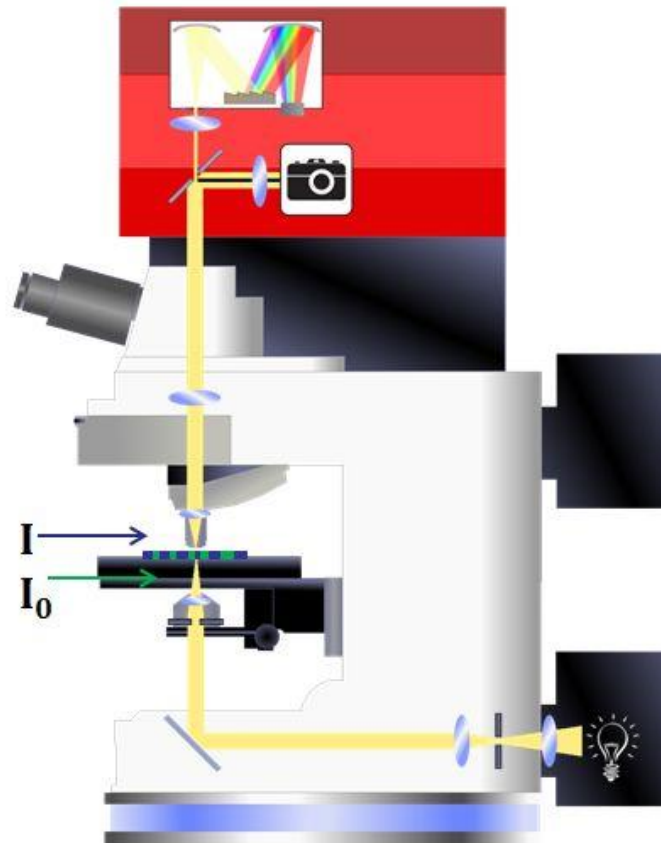
běžný SM - světlé pole



NIR mikroskopie

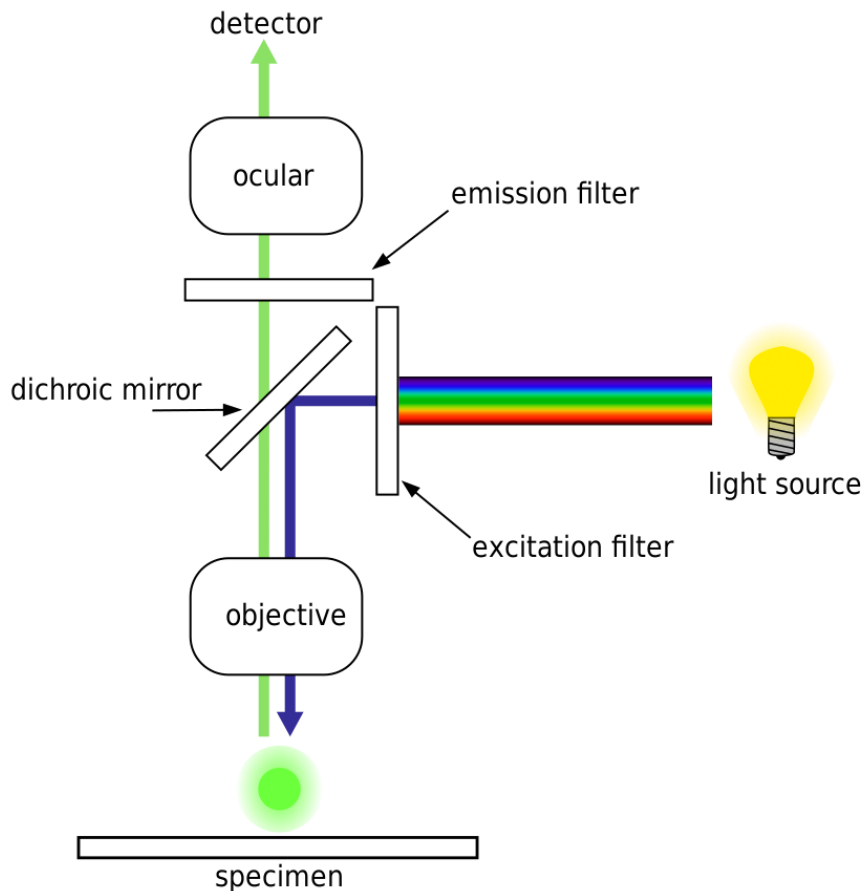
Mikrospektrofotometrie (cytofotometrie)

- kombinace mikroskopu a jednopaprskového absorpčního spektrofotometru
- proměřuje se kvantitativně absorpce světla o různých λ v různých místech preparátu
- využití při stanovení koncentrace určité látky v daném místě preparátu
- vlnová délka je vymezována optickými filtry nebo monochromátorem
- intenzita prošlého světla I detekována fotonásobičem



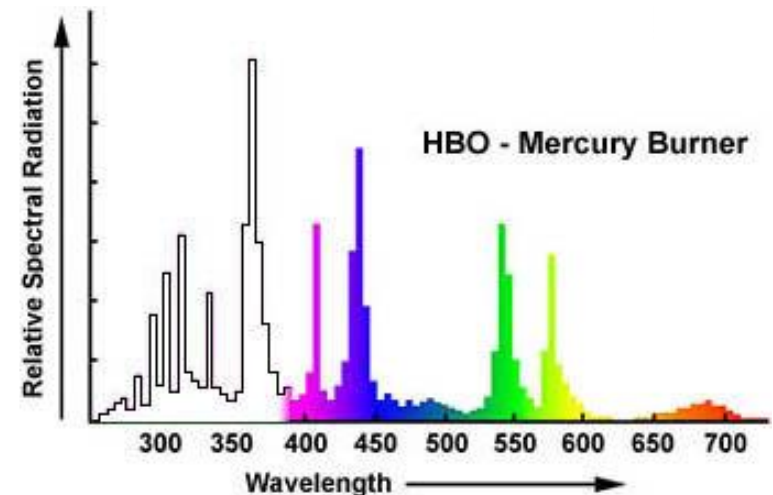
Fluorescenční mikroskopie

- *Fluorescence* – emise světla probíhající během absorpce energie excitačního světla (interval mezi absorpcí a emisí vyzářeného kvanta $\approx 10^{-6}$ s)
- osvětlení preparátu intenzivním světlem (externí zdroj), uspořádání v dopadajícím světle
- studium fluorescenčních materiálů – autofluorescence - preparát obsahuje fluorofor
- sekundární fluorescence – dodání fluorescenční značky (např. imunologie)



Zdroj intenzivního světla:

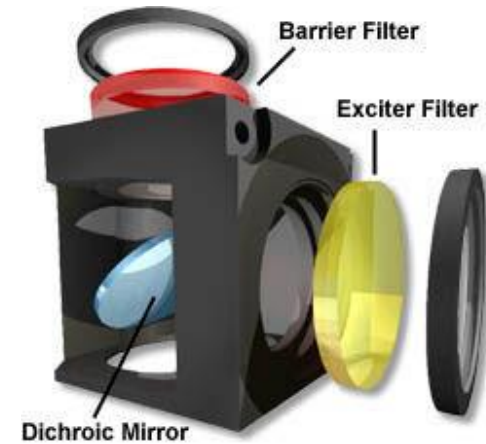
- vysokotlaké Hg a Xe výbojky (50 – 200W)
- největší intenzita v blízké UV oblasti



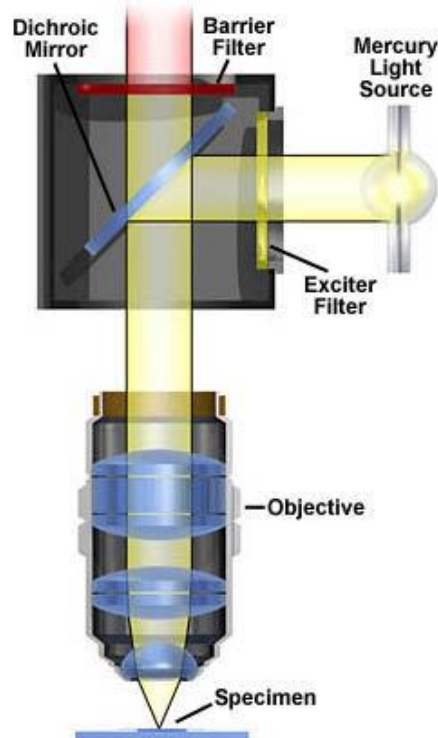
Fluorescenční mikroskopie

Konstrukce filtru

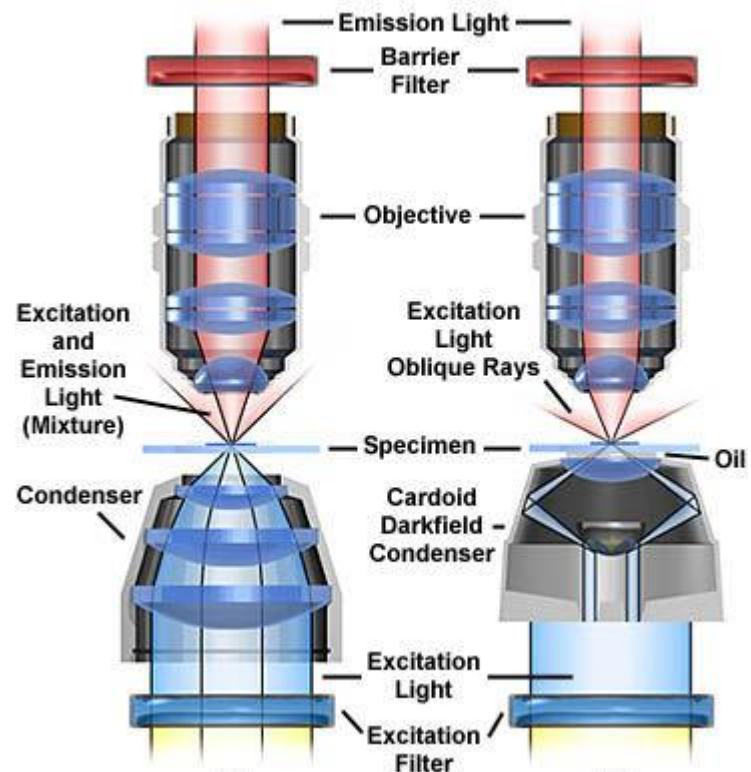
- všechny tři typy filtru vestavěné do jednoho kompletu
- *excitační filtr* – volba požadované excitační λ
- *dichroické zrcadlo* - filtr odráží excitační λ a propouští emisní λ
- *bariérový filtr* – potlačení nebo absorpce excitační λ
- propouští jen emisní λ na detektor



fluorescence v odraženém světle



fluorescence v prošlém světle

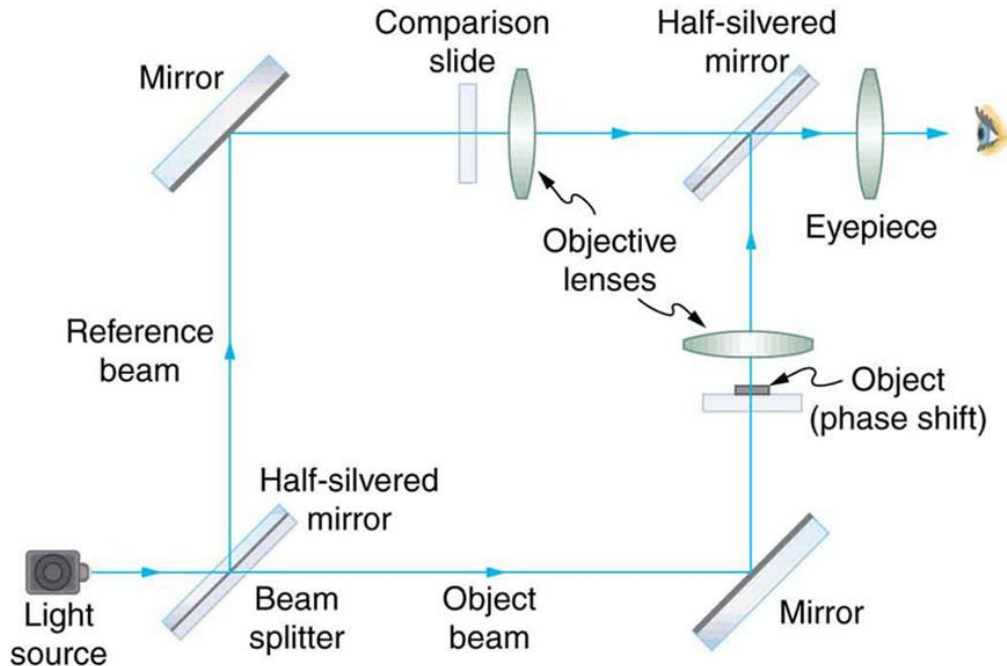


Interferenční mikroskopie

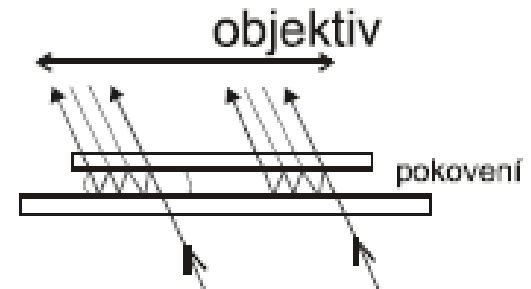
- kombinace mikroskopu a interferometru
- vhodné pro studium fázových objektů (průhledné, barvení je nežádoucí)
- studium topografie povrchů (např. referenční a zkoumaný povrch)

Rozlišujeme: dvoupaprsková a mnohápaprsková interference

Uspořádání pro dvoupaprskovou interferenci (Machův-Zehnderův interferometr)



Mnohápaprsková interference (Fabry-Perotův interferometr)



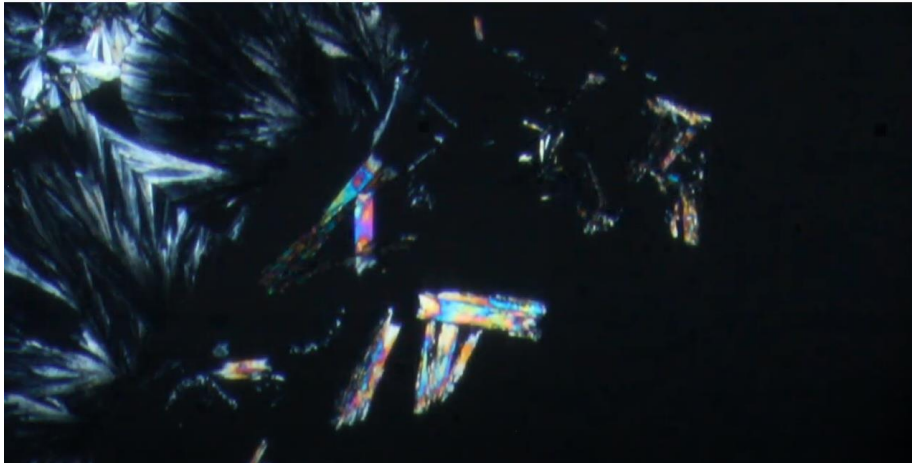
- díky pokovení krycího i podložního sklíčka dochází k mnohanásobnému odrazu a interferenci

- pro rozdělní svazku se používají i dvojlomné hranoly

Interferenční mikroskopie

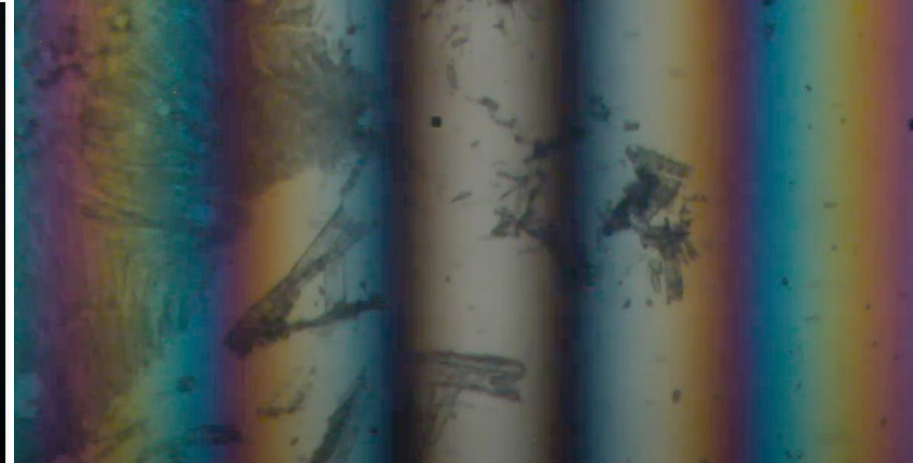
Režim obrazu - závisí na přesnosti nastavení interferometru – fázového rozdílu referenčního a měřicího paprsku

Homogenní pole



- fázový objekt - světlý/tmavý oproti pozadí (v monochromatickém světle)
- fázový objekt – různě barevný (v bílém světle)

Proužky stejné tloušťky



- obraz pokryt proužky (při nepřesném nastavení interferometru)
- fázový objekt lze odlišit díky odlišné hustotě a sklonu proužků

Použití: zviditelnění buněk tkání a jejich součástí, studium topografie povrchů

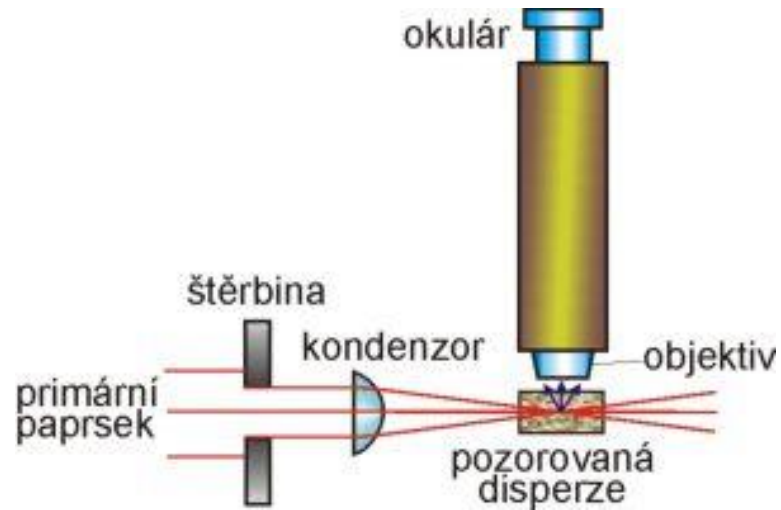
Ultramikroskopie

- pozorování malých částic o velikosti srovnatelné s vlnovou délkou světla v bočním osvětlení (viz Tyndallův jev)

Tyndallův jev



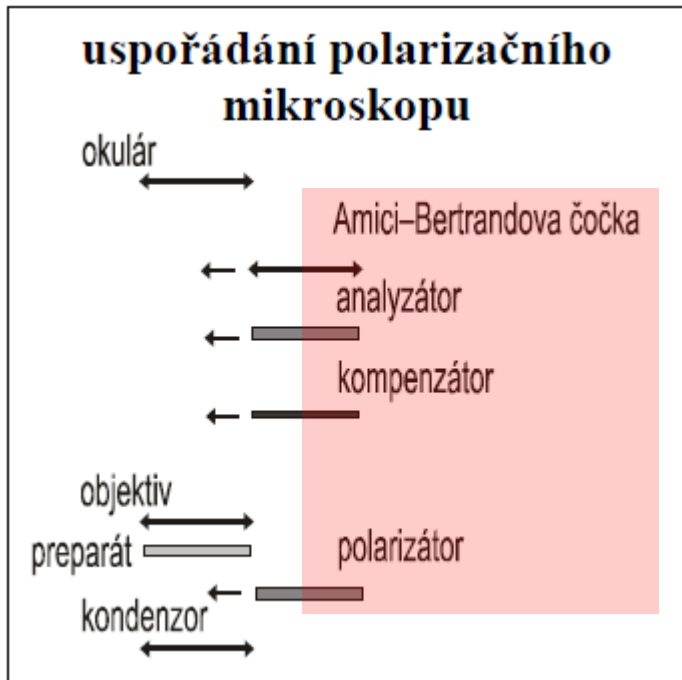
Schéma ultramikroskopu



- objektiv detekuje rozptýlené světlo disperzními částicemi
- jednotlivé částice se jeví jako zářící body na temném pozadí (speciální metoda temného pole)
- zobrazí se částice o velikosti až 1 nm $\Rightarrow$ ve vzorku lze dokázat jejich přítomnost, počet, pohyb
- nelze zjistit přímo tvar a velikost částic

Polarizační mikroskopie

- kombinace světelného mikroskopu a polarimetru
- studium opticky aktivních (stáčí rovinu polarizovaného světla) a anizotropních (vykazují dvojlom světla) vzorků
- pro polarizační mikroskopii je třeba SM doplnit o několik prvků



Amici-Bertrandova čočka

- spolu s okulárem vytváří pomocný mikroskop zaostřený na zadní ohniskovou rovinu objektivu (interferenční obrazec)

Analyzátor

- otočný, výchozí pracovní poloha – zkřížený s polarizátorem

Kompenzátor

- umožňuje variabilní změnu fáze (optimální fázový posuv mezi řádným a mimořádným paprskem) a tím zlepšení kontrastu

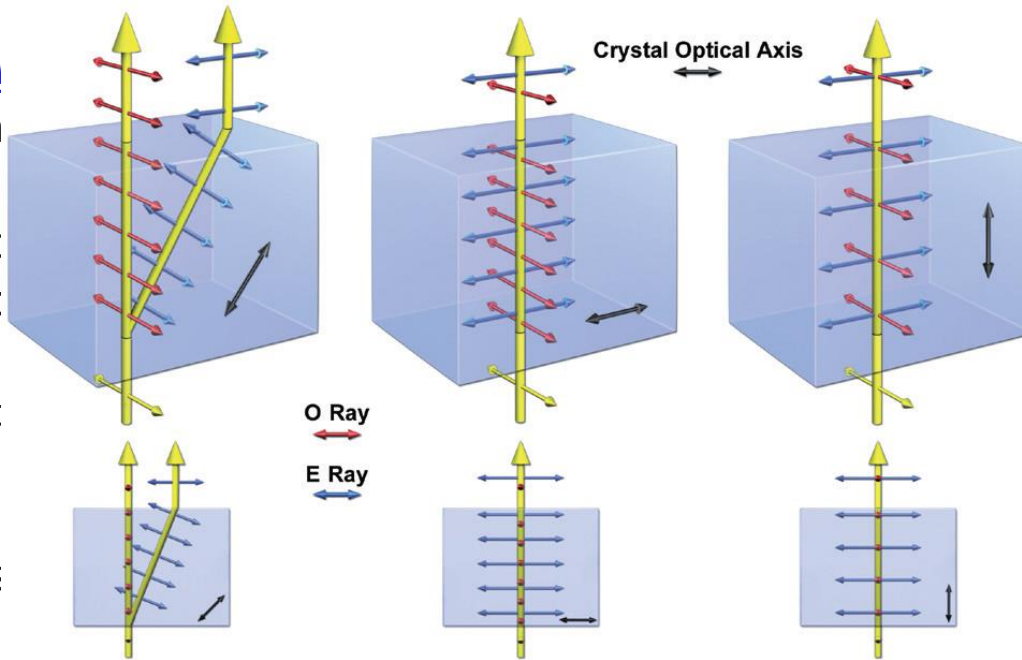
Otočný stolek – přesně nastavitelný

Polarizátor

Pracovní režimy polarizačního mikroskopu

Ortoskopické uspořádání

- polarizátor a analyzer jsou vzájemně vyřazeny
- lze takto rozlišit minerály (jednoduché)
- pro opticky neaktivní minerály
 - izotropní látka
 - analyzátor
- pro opticky aktivní minerály
 - otáčením s



a kompenzátor jsou
optický charakter
pole
a to je zkříženém
mikroskopu
le i rozjasněné
v. **zhášení**

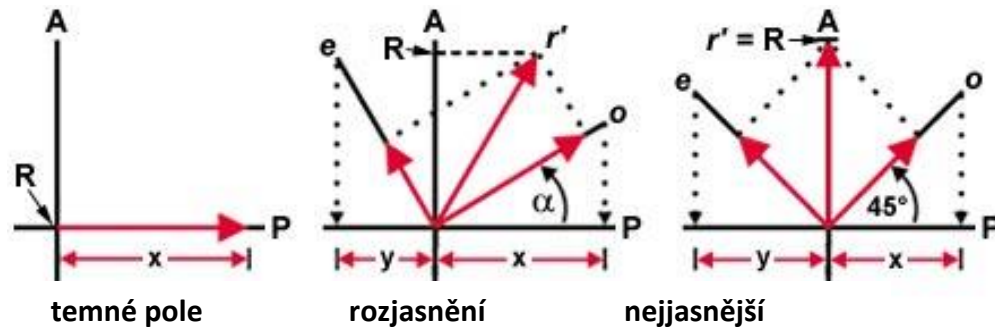
Studium minerálů

- studují se **řezy minerálů** (neznámá orientace řezu vzhledem k optické ose minerálu)
- „screening“ řezů pomocí ortoskopického uspořádání
- nejvhodnější jsou řezy minerálů **kolmé na optickou osu** – umožňují definovanou orientaci řezu na stolku mikroskopu
 - *jeli směr šíření polarizovaného světla paralelní s optickou osou anizotropního krystalu, jeví se jako izotropní (nedochází k dvojlomu) a v mikroskopu je při otáčení vzorku stále temné pole!*
- nejvýraznější efekty (např. **zhášení**) jsou pozorovány na řezu, který má v mikroskopu optickou osu ve směru kolmém na směr šíření polarizovaného světla

Pracovní režimy polarizačního mikroskopu

Zhášení anizotropního krystalu (ortoskopické uspořádání)

- v ploše obecného řezu jsou **dva** vzájemně kolmé **směry** (dány rovinou polarizace řádného a mimořádného paprsku), kterými polarizovaný paprsek projde beze změny $\Rightarrow$ nezmění se rovina polarizovaného světla – **směr optické osy**
 - je-li některý ze **směrů** rovnoběžný s rovinou kmitu polarizátoru (nebo analyzátoru), dojde v této speciální poloze ke zhášení – tzv. temné pole
- pro jiné úhly prochází analyzátozem paprsek s nenulovou amplitudou – rozjasnění krystalu
- otáčení o $360^\circ \Rightarrow 4$ polohy vyhasnutí



Pozorování krystalu v okuláru:

Optická osa krystalu je paralelní s dlouhou osou krystalu a rovinou kmitu polarizátoru



Nedochází k dvojlomu



Dochází k dvojlomu

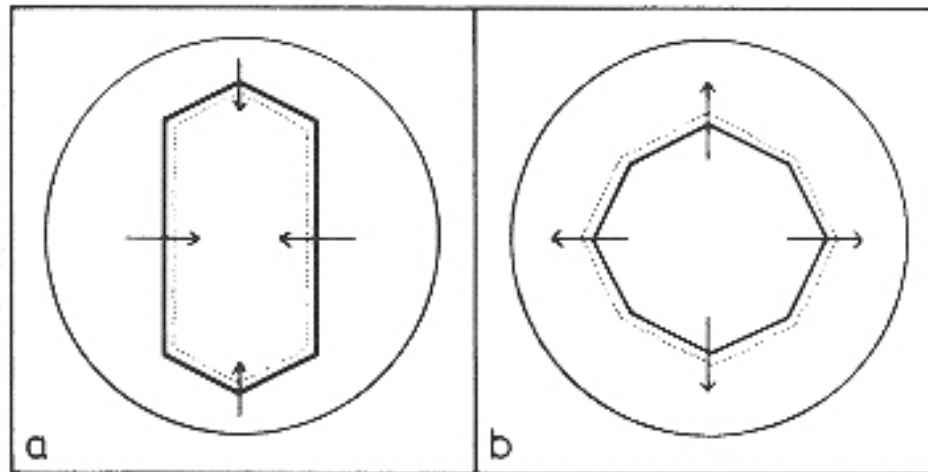


Dochází k dvojlomu

Pracovní režimy polarizačního mikroskopu

Ortoskopické uspořádání s vyřazeným analyzátorem

- pozorujeme tzv. *Beckeho linku* – vzniká při jemném rozostření na rozhraní dvou různě lomivých minerálů
- využívá se pro určení optického prostředí s vyšším indexem lomu, resp. nižším indexem lomu na hranici zrn dvou minerálů
- že při zvedání tubu (snižování stolku) vstupuje Beckeho linka do prostředí opticky hustšího (s vyšším indexem světelného lomu) $\Rightarrow$ světelné paprsky se v minerálu lámou ke kolmici a světlo se koncentruje na okraji opticky hustšího prostředí

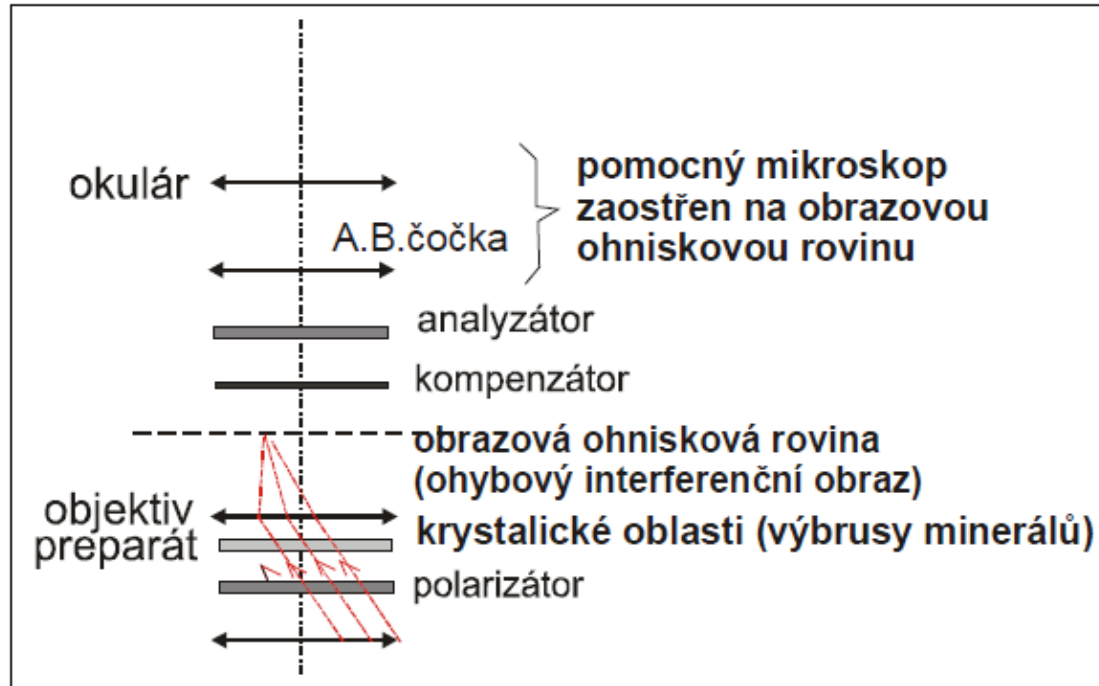


Princip Beckeho linky - při snižování stolku (zvedání tubu) vstupuje Beckeho linka do prostředí s vyšším indexem lomu. V případě (a) je to lomný minerál, v případě (b) je to lomné okolí.

Pracovní režimy polarizačního mikroskopu

Konoskopické uspořádání

- Amici-Bertrandova čočka je zasunuta do optické soustavy – pozorujeme interferenční obrazce
- charakteristické interferenční jevy vznikají např. na destičkách vybroušených krystalů – tzv. *konoskopické obrazce*

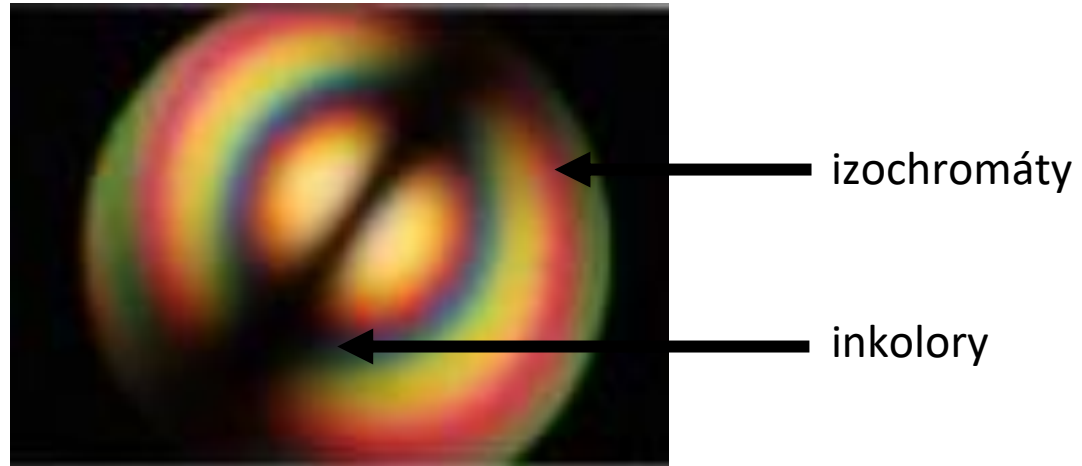


- rozdíl optických drah po průchodu destičkou anizotropního materiálu pod úhlem α
- vznikají dva paprsky $\mathbf{e}(\mathbf{n}_1)$ (mimořádný) a $\mathbf{o}(\mathbf{n}_2)$ (řádný), které interferují v zadní ohniskové rovině objektivu.
- za analyzátozem lze pozorovat směry, v nichž je stejný fázový posuv mezi $\mathbf{e}$ a $\mathbf{o}$ paprskem na křivkách zvaných *izochromáty*

Pracovní režimy polarizačního mikroskopu

Konoskopické uspořádání

Ukázka interferenčního obrazce dvojsového krystalu

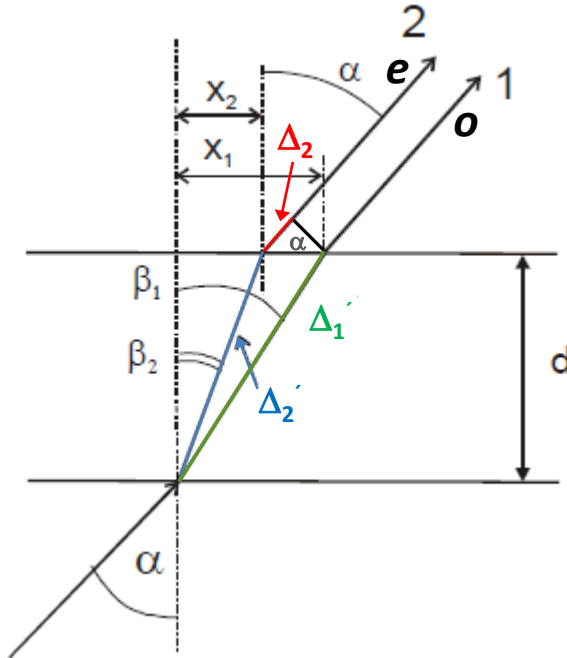


- izochromáty mají různé tvary
 - závisí celé řadě faktorů (např. typ krystalu, orientaci optické osy)
- Inkolory – temné oblasti v interferenčním obrazci
 - na analyzátor dopadá pouze ***o*** nebo ***e*** paprsek s rovinou polarizace danou polarizátorem $\Rightarrow$ takový paprsek neprojde a v obrazci vzniká temné místo

Pracovní režimy polarizačního mikroskopu

Konoskopické uspořádání

- odvození podmínek interference pro **řádný** a **mimořádný** paprsek – určit dráhový rozdíl Δ



Celkový optický dráhový rozdíl: $\Delta = \Delta'_1 - \Delta'_2 - \Delta_2$

$$\sin \alpha = n_1 \cdot \sin \beta_1$$

$$\sin \alpha = n_2 \cdot \sin \beta_2$$

$$\Delta'_1 = \frac{d \cdot n_1}{\cos \beta_1}$$

$$(\Delta'_1)^2 = \frac{d^2 \cdot n_1^2}{1 - \sin^2 \beta_1}$$

$$\sin^2 \beta_1 + \cos^2 \beta_1 = 1$$

$$(\Delta'_1)^2 = \frac{d^2 \cdot n_1^2}{1 - \frac{\sin^2 \alpha}{n_1^2}} = \frac{d^2 \cdot n_1^4}{n_1^2 - \sin^2 \alpha} \quad \sin \beta_1 = \frac{\sin \alpha}{n_1}$$

$$\Delta'_1 = \frac{d \cdot n_1^2}{\sqrt{n_1^2 - \sin^2 \alpha}}$$

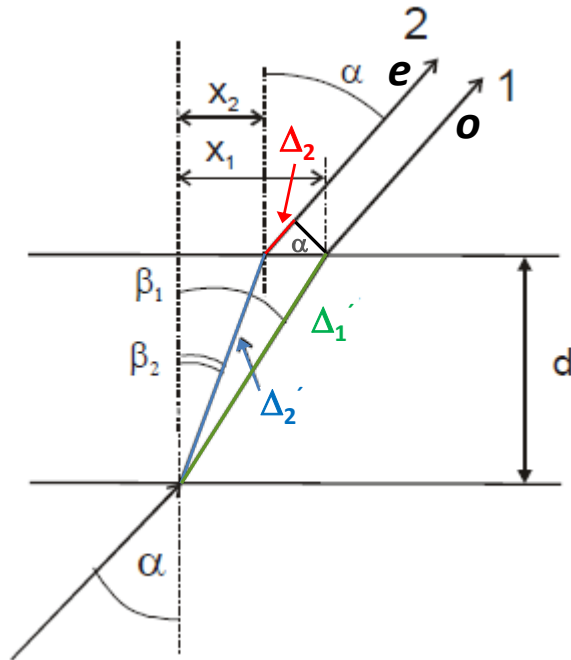
Obdobně odvodíme:

$$\Delta'_2 = \frac{d \cdot n_2^2}{\sqrt{n_2^2 - \sin^2 \alpha}}$$

Pracovní režimy polarizačního mikroskopu

Konoskopické uspořádání

- odvození podmínek interference pro řádný a mimořádný paprsek



Celkový optický dráhový rozdíl: $\Delta = \Delta'_1 - \Delta'_2 - \Delta_2$

$$\Delta'_1 = \frac{d \cdot n_1^2}{\sqrt{n_1^2 - \sin^2 \alpha}}$$

$$\Delta'_2 = \frac{d \cdot n_2^2}{\sqrt{n_2^2 - \sin^2 \alpha}}$$

$$\Delta_2 = (x_1 - x_2) \sin \alpha = d(\tan \beta_1 - \tan \beta_2) \sin \alpha$$

$$\begin{aligned} x_1 &= d \tan \beta_1, & x_2 &= d \tan \beta_2, & \tan \beta &= \frac{\sin \beta}{\cos \beta} \\ \sin \alpha &= n_1 \cdot \sin \beta_1 & \Delta'_1 &= \frac{d \cdot n_1^2}{\sqrt{n_1^2 - \sin^2 \alpha}} = \frac{d \cdot n_1}{\cos \beta_1} \end{aligned}$$

$$\Delta_2 = d \sin^2 \alpha \left(\frac{1}{\sqrt{n_1^2 - \sin^2 \alpha}} - \frac{1}{\sqrt{n_2^2 - \sin^2 \alpha}} \right)$$

$$\Delta(\alpha) = \Delta'_1 - \Delta'_2 - \Delta_2 = d(\sqrt{n_1^2 - \sin^2 \alpha} - \sqrt{n_2^2 - \sin^2 \alpha})$$

- rozdíl optických drah **o** a **e** závisí na α
- úhel α závisí na způsobu osvětlení – při použití kolimovaného paprsku velikost úhlu od středu zorného pole (středu preparátu) roste
- pro vznik **izochromátu** nutná interference **o** a **e** paprsků

Příprava preparátů pro světelný mikroskop

Nativní preparáty

- nevyžadují zvláštní přípravu, vhodné pro malé a tenké objekty
- živé objekty ve vodě nebo fyziologickém roztoku (prvoci, řasy, listy mechu, pokožka, atd.)

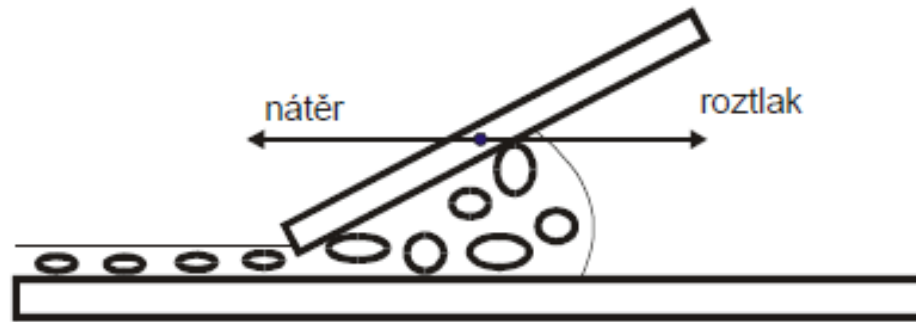


- pro zesílení kontrastu objektů lze použít fázového kontrastu, barvení preparátu , apod.
- metoda **macerace** – rozrušení buněčných stěn (rostlinný materiál) a uvolnění buněk pomocí maceračního činidla (kyseliny, čpavek, atd.)
- **Pozor!** Vzorek se zahřívá, odpařuje se médium, pod krycím sklem může být nedostatek O₂

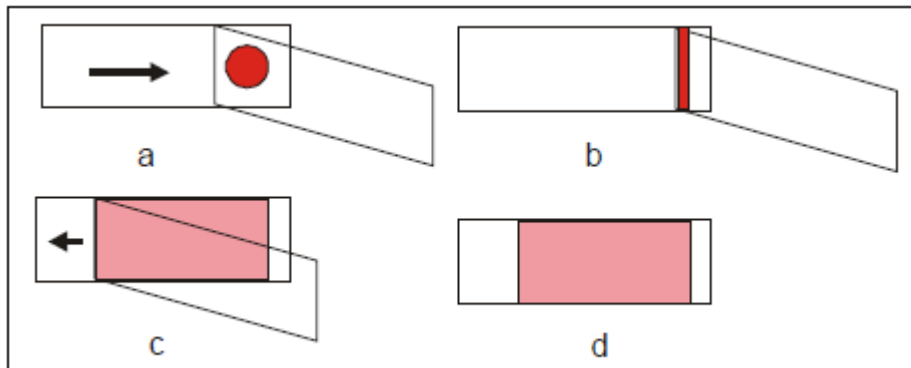
Příprava preparátů pro světelný mikroskop

Nátěry a roztlaky

- vzorek (měkká tkáň, suspenze částic) se roztře nebo natře na podložním nebo krycím skle
- nátěry mohou být suché nebo vlhké, obvykle se fixují a barví



Příklad: hematologické vyšetření krve (složení buněk, kvantitativní stanovení)



Postup:

- a) kapka na podložní sklíčko, druhé sklíčko šikmo
- b) spojit s kapkou krve
- c-d) rozetřít směrem od kapky po celé délce podložního sklíčka

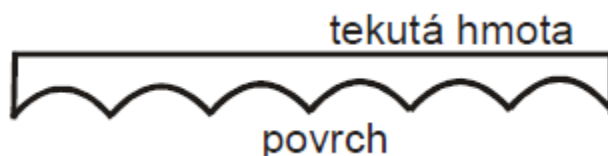
Příprava preparátů pro světelný mikroskop

Mikroreliéfy a adhezivní preparáty

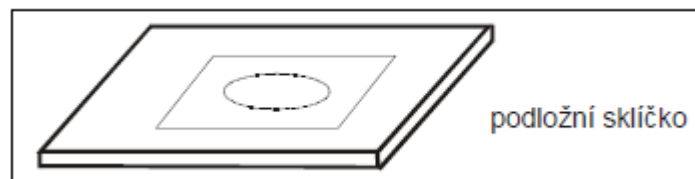
- studují se povrchy nebo povrchové vrstvy

Princip:

1. Nanesení tenké vrstvy rychle tuhnoucí průhledné hmoty (4-8% roztok celoidinu v acetonu, bezbarvý lak na nehty, lepidlo, kanagom, atd.) nebo lepící pásky (lepící povrch pásky je vhodné „zhomogenizovat“ namočením v benzenu a vysušit)

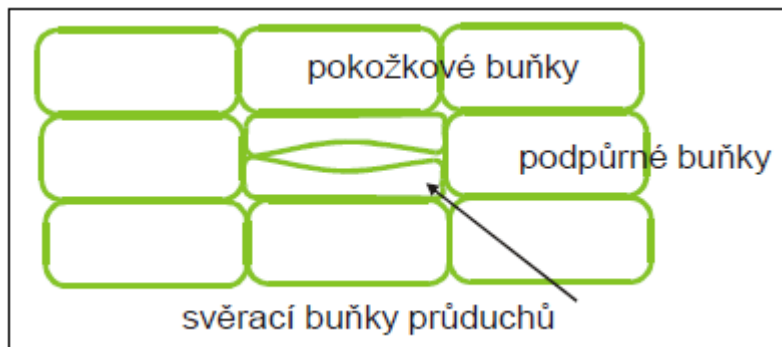


2. Otisk se sejme (sloupne) a přenese (přilepí) na podložní sklíčko



Příklad: studium pokožky listu

- studium otevřenosti průduchů
- počet průduchů na jednotku plochy
- velikost průduchů
- identifikace druhu



- odlitek měkkých nebo vlhkých tkání se provádí pomocí metakrylátu (polymer)

Příprava preparátů pro světelný mikroskop

Mikroreliéfy a adhezivní preparáty

Adhezivní metoda

- snímá se i svrchní vrstva buněk (lze použít i lepicí pásku)

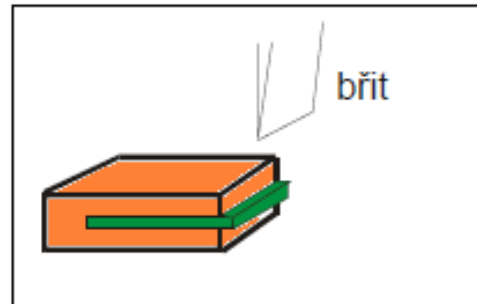


Řezy

- pro studium částí objemnějších vzorků

Princip:

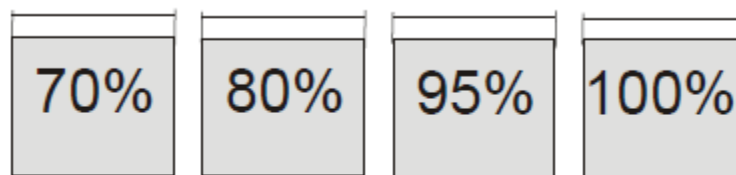
- z tkáně (pletiva) se po složité fixační proceduře připraví tenký řez (kontrastní), který se prohlíží ve SM v procházejícím světle
- nativní řez (bez fixace): např. v bločku mrkve je umístěn objekt (např. zelený list) a řeže se žiletkou na tenké plátky



Příprava preparátů pro světelný mikroskop

Procedura fixace:

- **odběr tkáně nebo pletiva**
- **fixace:** rychlé usmrcení buněk – minimální změny struktury, zastaví se rozklad vzorku
 - fixační činidla **fyzikální** – teplo, vysoušení, hluboké zmrazení, mrazové vysoušení
 - fixační činidlo **chemické**
 - Anorganické látky: oxid osmičelý, oxid chromový , chlorid rtuťnatý (pozor jedovaté látky – nutné dodržovat bezpečnostní a hygienická pravidla)
 - Organické kyseliny – kyselina octová ledová (tj. ~ 100% CH_3COOH), kyselina pikrová – $\text{C}_6\text{H}_6(\text{NO}_2)_3$ aj.
 - Organická redukční činidla – ethanol, methanol, formaldehyd
 - Speciální fixační tekutiny (kombinace látek) – Bouinova, Zenkerova, Formol, ...
- **vypírání fixáže ze vzorku** – pro každou fixáž je předepsaný postup, nejčastěji alkoholem, vodou , a pak alkoholem
- **zalévání do bloků**
 - a. odvodnění vzorku – vzestupná alkoholová nebo acetonová řada

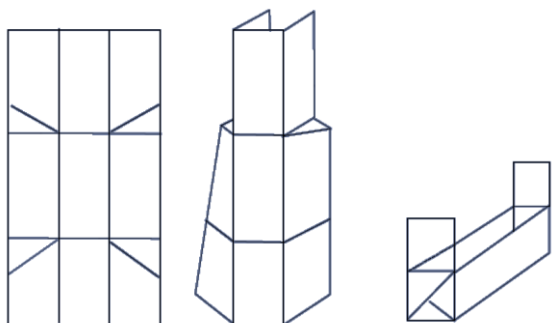


řádově hodiny (podle velikosti objektu)

Příprava preparátů pro světelný mikroskop

- **zalévání do bloků**

- b. prosycení vzorku rozpouštědlem zalévací hmoty (pro parafín je to benzen nebo xylén). Postupně do několika lázní až se vzorek projasní.
- c. prosycení vzorku roztokem zalévací hmoty (např. parafín jako nasycený roztok v benzenu – 35 až 40 °C)
- d. prosycení zalévací hmotou
 - *Parafín* - zahřát na teplotu o 2 °C vyšší, než je teplota tání (≤ 58 °C)
měkký parafín (45 – 50 °C) – pro měkké tkáně
střední (50 – 53 °C)
tvrdý (53 – 58 °C) – pro tvrdé tkáně
 - *Celoidin* – nitrát celulózy, rozpustný v éteru a alkohol/éteru (1:1) (pro tvrdé tkáně)
 - Želatina – pro řídké tkáně, které se jinak silně smrští, nebo tukové tkáně používá se 10 až 20 % roztok v destilované vodě
- e. zalití vzorku do formy (krabička) – zalévá se čistým parafínem



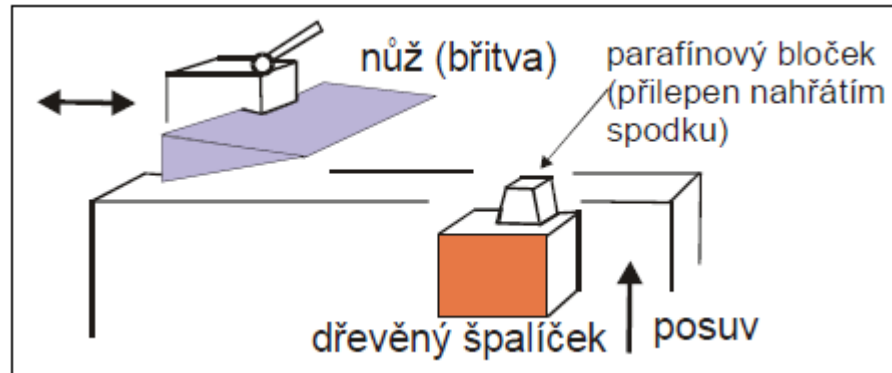
- Nalijeme rozehřátý parafín, nahřátou pinzetou vložíme objekt, krabičku ponoříme až po okraj do vody, posléze ji ponoříme celou. Po ztuhnutí odstraníme krabičku a parafín ořežeme, aby zbyly 3 – 4 mm parafínu kolem vzorku.

Příprava preparátů pro světelný mikroskop

- **krájení** – krájení tenkých řezů pomocí přístroje zvaného **mikrotom** (řezy v jednotkách μm)

Typy mikrotomů:

a. sáňkový



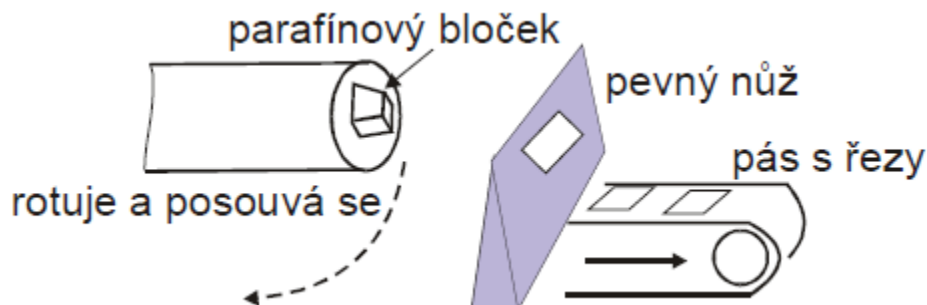
- změna sklonu nože
- bloček se vzorkem se posunuje o přesnou výšku



Příprava preparátů pro světelný mikroskop

Typy mikrotomů:

b. rotační

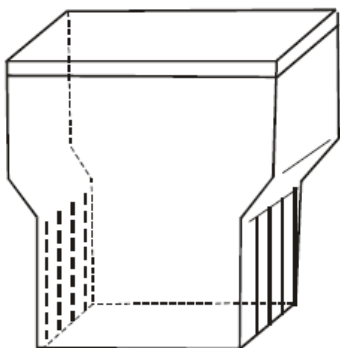


c. zmrazovací

- tkáně nezalitě nebo tkáně zalité v želatině
- chlazení vzorku a nože zajištěno kapalným CO₂
- elektrické chlazení

• barvení řezů

- kyselá barviva – barví cytoplasmu (eozin, erytrozin)
- zásaditá barviva – barví jádra buněk (DAPI, hematoxyliny, toluidinová modř, atd.)
- neutrální
- speciální kyvety na barvení (s drážkami na podložní skla)



- po barvení se řezy ještě odvodňují alkoholovou řadou
- projasňují (používá se rozpouštědlo xylén)
- uzavírají se kanadským balzámem + krycí sklíčko
- vysuší se

Některé histochemické metody

Kvalitativní důkaz určitých složek v buňce, tkáni nebo pletivu

Jednoduché příklady:

1. Asimilační škrob v buňkách rostlin - škrob se zbarví tmavofialově Lugolovým činidlem (škrobová zrna v mechu, zrn obilovin)

Hunt et al. · doi:10.1093/molbev/mss209

MBE

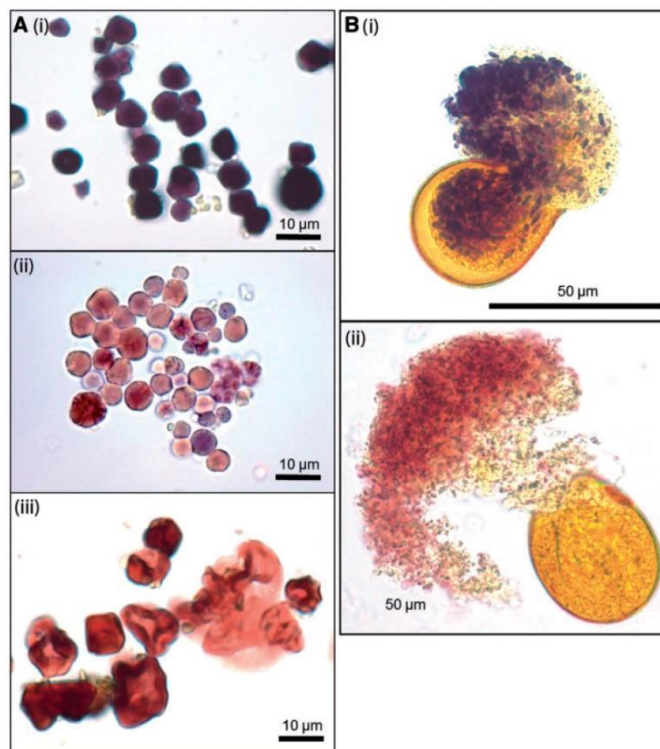


FIG. 1. *Panicum miliaceum* starch granules. Starch was stained with Lugol's solution and observed using a light microscope. The scale is indicated. (A) Material scraped from mature seeds. The genotypes and accessions shown are i: S_0/L_C , MIL-4 #1 (nonwaxy, dark blue-black staining); ii: S_{15}/L_C , line P017-10-2 (partially waxy, some granules staining red and some granules staining paler blue-purple, indicating the presence of amylose); iii: S_{15}/L_4 , MIL-82 #1 (waxy, granules stain red, some darkly. The characteristic blue of amylose staining is absent). (B) Pollen squashed on a microscope slide to release some of the starch granules within. The genotypes and accessions shown are i: S_0/L_C , MIL-4 #1 (blue-black staining, amylose present); ii: S_{15}/L_4 , MIL-70 #1 (red staining, amylose free).

Některé histochemické metody

Kvalitativní důkaz určitých složek v buňce, tkáni nebo pletivu

Jednoduché příklady:

1. Asimilační škrob v buňkách rostlin - škrob se zbarví tmavofialově Lugolovým činidlem (škrobová zrna v mechu, zrn obilovin)
2. Monosacharidy – s fenyldrazinem tvoří krystalické sloučeniny zvané *osazony* (směs fenyldrazinu, octanu sodného a kyseliny octové) $\Rightarrow$ identifikace monosacharidů



Figure 1. Needle shaped crystals (Glucose)



Figure 2. Needle shaped crystals (Fructose)



Figure 3. Needle shaped crystals (Mannose)

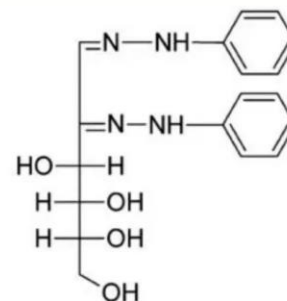
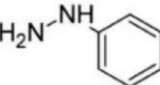
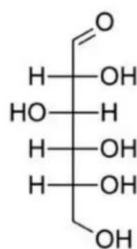


Figure Showing Needle Shaped Crystals of Fructose



Figure Showing Sun-flower

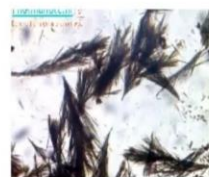
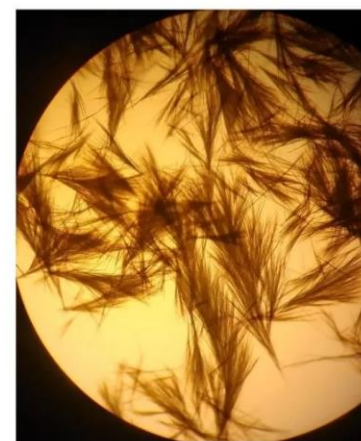


Figure Showing Needle Shaped Crystals of Glucose



Figure Showing Cotton Ball



Některé histochemické metody

Kvalitativní důkaz určitých složek v buňce, tkáni nebo pletivu

Jednoduché příklady:

1. Asimilační škrob v buňkách rostlin - škrob se zbarví tmavofialově Lugolovým činidlem (škrobová zrna v mechu, zrn obilovin)
2. Monosacharidy – s fenyhydrazinem tvoří krystalické sloučeniny zvané *osazony* (směs fenyhydrazinu, octanu sodného a kyseliny octové) $\Rightarrow$ identifikace monosacharidů
3. Celulóza – hl. stavební látka rostlinných buněčných stěn, reakce s chlórzinkjódem (KI, I, ZnCl_2 v H_2O); modrá až fialová barva buněčných stěn
4. Lignin – stavební složka dřeva (zabezpečuje dřevnatění buněčných stěn); floroglucinolová reakce (fluorglucinol v 96 % alkoholu + HCl) $\Rightarrow$ pletiva s ligninem zčervenejí
5. Tuky – červené barvivo Sudan III (v ethanolu a glycerinu). Kapénky tuku se obarví červeně (např. některá semena). Podobně se barví látky příbuzné tukům: suberin (z buněčných stěn) a kutin (z kutikuly).

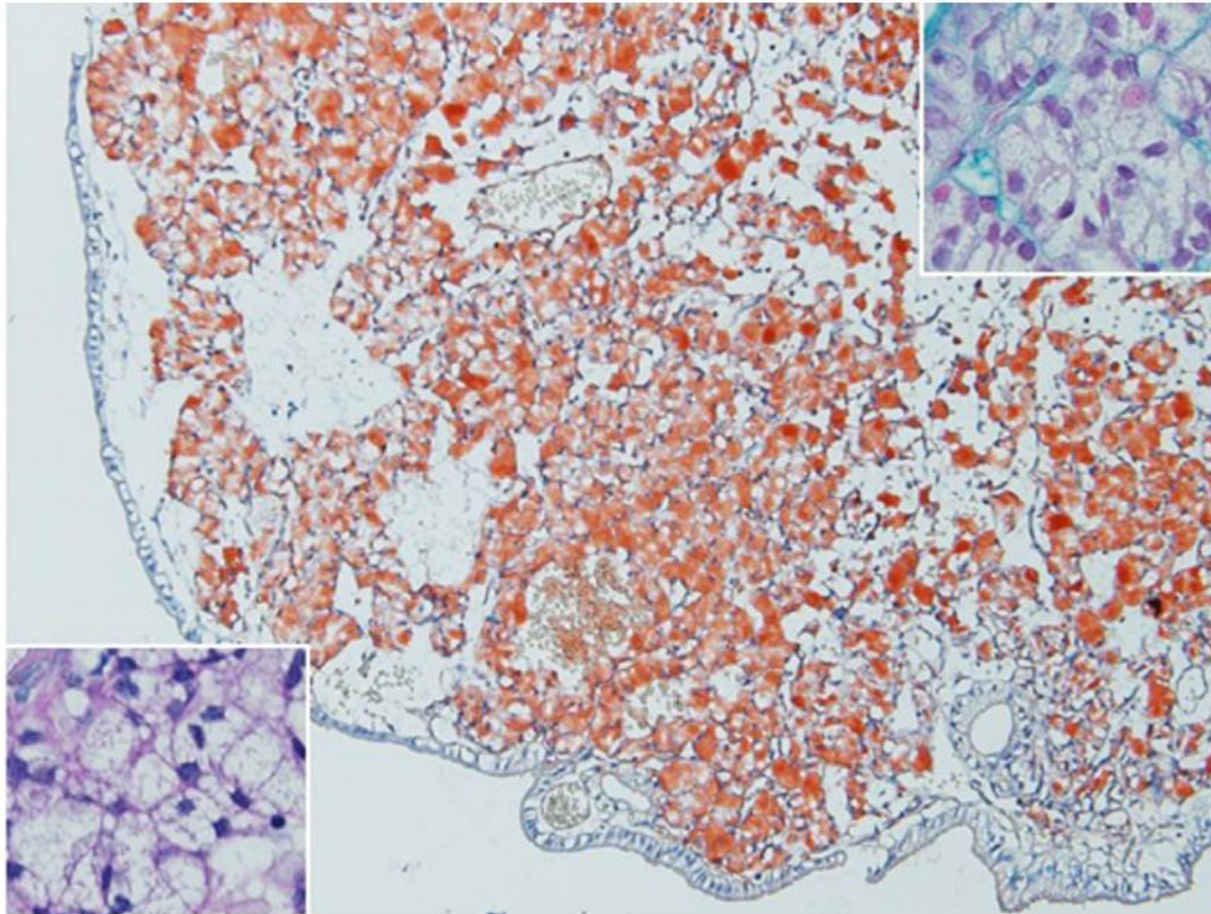


Fig. 5. Special stains of the tumor cells. While fat stain (Sudan III) shows strong and droplet-like positivity of foamy cytoplasm (original magnification $\times 100$), neither of periodic-acid Schiff stain (inset, left lower; $\times 400$) or Alcian blue (right upper; $\times 400$) is positive.

Některé histochemické metody

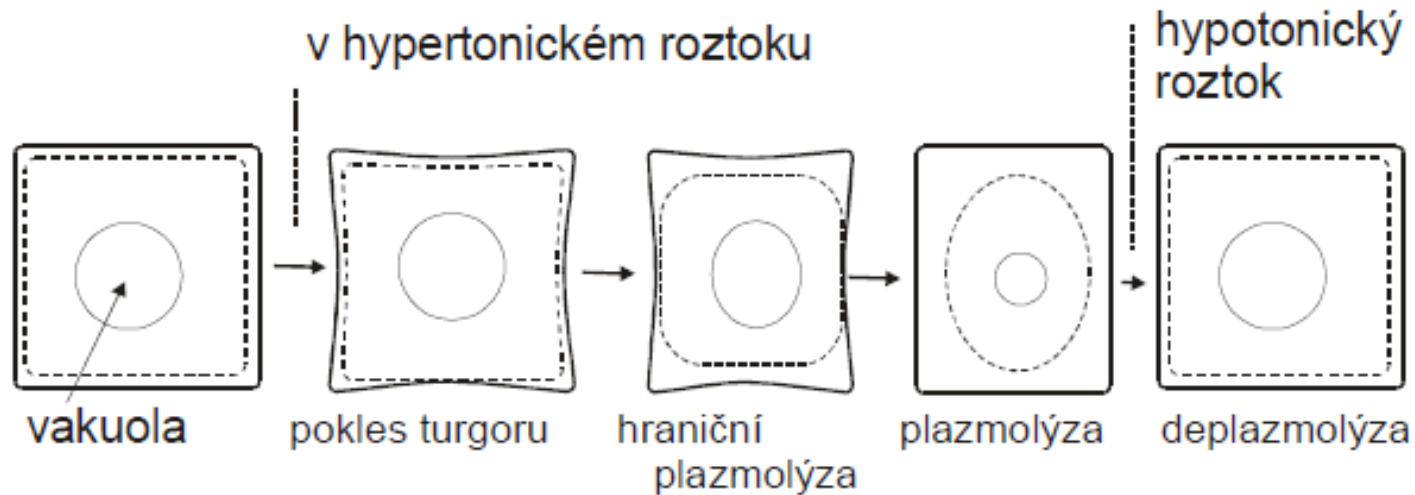
Kvalitativní důkaz určitých složek v buňce, tkáni nebo pletivu

Jednoduché příklady:

1. Asimilační škrob v buňkách rostlin - škrob se zbarví tmavofialově Lugolovým činidlem (škrobová zrna v mechu, zrn obilovin)
2. Monosacharidy – s fenyhydrazinem tvoří krystalické sloučeniny zvané *osazony* (směs fenyhydrazinu, octanu sodného a kyseliny octové) $\Rightarrow$ identifikace monosacharidů
3. Celulóza – hl. stavební látka rostlinných buněčných stěn, reakce s chlórzinkjódem (KI, I, ZnCl_2 v H_2O); modrá až fialová barva buněčných stěn
4. Lignin – stavební složka dřeva (zabezpečuje dřevnatění buněčných stěn); floroglucinolová reakce (fluorglucinol v 96 % alkoholu + HCl) $\Rightarrow$ pletiva s ligninem zčervenají
5. Tuky – červené barvivo Sudan III (v ethanolu a glycerinu). Kapénky tuku se obarví červeně (např. některá semena). Podobně se barví látky příbuzné tukům: suberin (z buněčných stěn) a kutin (z kutikuly).
6. Alkaloidy - u konkrétních rostlin pod vlivem kyselin (HCl, HNO_3) vzniknou krystalky dusičnanů či chloridů alkaloidů (př. dřšťál $\rightarrow$ alkaloid *berberidin* – HNO_3 – krystalky)
7. Vápník – detekce přes přítomnost krystalů šťavelanu vápenatého apod.

Studium dynamických dějů v rostlinných buňkách

Př.: pozorování osmotických jevů - pokles turgoru a plazmolýza díky osmotické ztrátě vody z buňky



- odchlípení buněčné membrány od buněčné stěny – *plazmolýza* – může být reverzibilní. Nereverzibilní plazmolýza - vede k buněčné smrti.

Vybrané zásady při mikroskopování

1. Mikroskop a jeho optiku udržujeme v čistotě, k čištění používáme benzín.
2. Preparát vždy pozorujeme nejdříve při menším zvětšení; revolverová výměna objektivů; doostřování. Sledujeme přibližování objektivu a preparátu ze strany, doostřujeme pohybem objektivu a preparátu od sebe.
3. Při pozorování obrazu se doporučuje mít obě oči otevřené.
4. Oči chráníme včasným seřízením jasu obrazu (clony, filtry).