

# BLM I – 7: TEXT KE STUDIU

## ZÁKLADNÍ LITERATURA:

[http://www.are.cz/documents/ZAKLADNI\\_METODY\\_SVETELNE\\_MIKROSKOPIE.pdf](http://www.are.cz/documents/ZAKLADNI_METODY_SVETELNE_MIKROSKOPIE.pdf)

<http://dml.cz/dmlcz/139719> (Plášek, Jaromír: *Nové metody optické mikroskopie*, 1996)

<http://triton.paru.cas.cz/old-lem/book/Podkap/1.0.html> (Elektronová mikroskopie pro biology, Jana Nebesářová, 2001)

## 1. K OBJEKTIVŮM:

**OBJEKTIVY** - jsou jednou z nejdůležitějších částí mikroskopu, která rozhoduje o jeho kvalitě, jejich vlastnosti prošly dlouhým vývojem - od jednoduché čočky až k dnešním dokonalým objektivům.

**Vlastnosti objektivů** udávají číselné hodnoty pro zvětšení, numerickou aperturu, parfokální vzdálenost, pozorovací (pracovní) vzdálenost a průměr vstupní/výstupní pupily.

**Numerická apertura** je součin indexu lomu prostředí mezi vstupní čočkou objektivu a preparátem (krycím sklem) a sinem poloviny otvorového úhlu objektivu. Je měřítkem pro dosažitelnou rozlišovací schopnost objektivu, a tím též pro jeho zvětšení a pro světelný tok, který může objektiv zachytit.

**Parfokální vzdálenost** je vzdálenost od závitů objektivu k povrchu preparátu, případně krycího skla (v milimetrech). Má být pro všechny objektivy na jednom mikroskopu stejná, pak odpadá zaostřování při otáčení revolverovým nosičem.

**Pozorovací (pracovní) vzdálenost** se měří od vstupní čočky objektivu k rovině preparátu (krycího skla), se stoupajícím zvětšením klesá až na zlomky milimetru.

**Vady čoček** - objektiv není schopen zobrazit detaily bez zkreslení, které je způsobeno jeho zobrazovacími vadami. Nejdůležitější zobrazovací vady objektivu jsou:

- a) sférická odchylka
- b) sinusová vada
- c) sklenutí obrazu
- d) deformace obrazu (soudečkové a polštářkové)
- e) chromatická odchylka

Objektivy se v průběhu vývoje neustále zlepšují tím, že se u nich stále více potlačují zobrazovací vady (zbytkové vady, aberace). Název objektivu naznačuje, kterou zobrazovací vadu objektiv významně potlačuje. Potlačování zbytkových vad se říká korekce. Stupeň odstranění zbytkových vad (aberrace) je stejně jako u okuláru důležitým kritériem pro jakost objektivu.

**Optická korekce** - stupeň korekce barevné (chromatické) a kulové (sférické) optické vady objektivu. Korekce těchto vad může být kombinována s korekcí vyklenutí zorného pole (plan korekcí).

- **Achromatické objektivy (achromáty)** - jsou nejčastěji používaným typem objektivů s nejnižší úrovní korekce. Jsou vhodné pro běžné pozorování, ale ne tak docela pro barevnou fotografii. Na objektivu se tato úroveň korekce neoznačuje - objektivy bez označení jsou achromatické. Jsou výhodné např. při fluorescenci, protože jsou složeny z méně čoček, takže pohlcují méně ultrafialového záření.
- **Planachromatické objektivy** mají korekci vyklenutí zorného pole, používají se hlavně pro mikrofotografické práce.
- **Apochromatické objektivy (apochromáty)** - jsou typem objektivu s velmi dobře korigovanými vadami. V důsledku své konstrukce mají při daném zvětšení vysokou NA, ta se projeví jasnějším obrazem a vyšším rozlišením, které lze těmito objektivy dosáhnout.
- **Planapochromatické objektivy** - spojují vlastnosti apochromátů s plan-objektivy, patří k nejlepším a k nejdražším objektivům (s úrovní korekcí roste složitost konstrukce a tím i cena objektivů), proto se používají pouze u kvalitních mikroskopů, určených např. pro mikrofotografii.

- **Fluoritové objektivy** (semi-apochromáty, fluority) - jsou korekcí svých vad umístěny mezi achromáty a apochromáty. Jejich název fluority souvisí s kazivcem (fluoritem), který byl původně používán k výrobě některých jejich čoček. Představují obvykle cenově dostupnější řešení než apochromáty s velmi dobrou úrovní optických parametrů.
- **Planapochromatické fluoritové objektivy**, např. **planfluority**, využívají vynikajících optických vlastností fluoritového skla, které dobře propouští ultrafialové záření, používají se hlavně pro speciální účely, např. při fluorescenční mikroskopii.

**Barevné označení objektivů** - objektivy jsou označeny barevnými proužky, aby se usnadnila orientace při otáčení revolverovým nosičem objektivů (různé barvy pro různě zvětšující objektivy).

**Odpružené objektivy** - výstupní čočka objektivů s velkým zvětšením je při zaostření na preparát velmi blízko krycímu sklu a může dojít k mechanickému dotyku, proto jsou objektivy s velkým zvětšením vybaveny pružným uložením vstupní čočky, která se při dotyku krycího skla částečně zasune do pouzdra, čímž je objektiv chráněn před poškozením.

**Objektivy pro speciální pracovní postupy** - některé metody vyžadují objektivy upravené pro tyto metody. Sem patří fázový kontrast, Hoffmanův kontrast, případně Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC).

Metody různých fázových kontrastů nacházejí svoje uplatnění při pozorování objektů, které nelze barvit, jako např. při fertilizaci in vitro (metoda asistované reprodukce).

**2. INVERZNÍ MIKROSKOPY** - mají optickou soustavu "vzhůru nohama", tj. objektivy jsou pod preparátem a kondenzor s osvětlovací soupravou nad ním. Jsou vhodné pro pozorování kultur živých buněk a mikroorganismů např. na Petriho miskách, při zkoumání tkáňových kultur, kvality vody, rozbořech sedimentů vzniklých chemickou reakcí, pozorování krystalických struktur atd.

### 3. SPECIÁLNÍ ZPŮSOBY MIKROSKOPIE

Mikroskopické pozorování živých nezbarvených buněk je prakticky velice obtížné, a to pro velice malý kontrast jejich vnitřních struktur díky vysokému obsahu vody. Pro kvalitní pozorování mikroskopických objektů je nutné „uměle“ zvýšit kontrast (kontrast je definován rozdílem mezi jasným pozadím a jasným sledovaného objektu), kvalita obrazu nezávisí tedy pouze na zvětšení a rozlišovací schopnosti použitého mikroskopu.

Kontrast lze zvýšit použitím různých barvicích technik, ale chceme-li pozorovat živé buňky a pochody v nich, musíme použít speciální způsoby mikroskopování. Byla sestavena různá pomocná zařízení, která umožňují používat např. zvláštní druh osvětlení (mikroskopie v zástínu neboli v temném poli), zvláštní druh světla (fluorescenční mikroskopie) nebo speciální zařízení (fázová kontrastní mikroskopie). Zvláštní kapitolu tvoří mikroskopie elektronová.

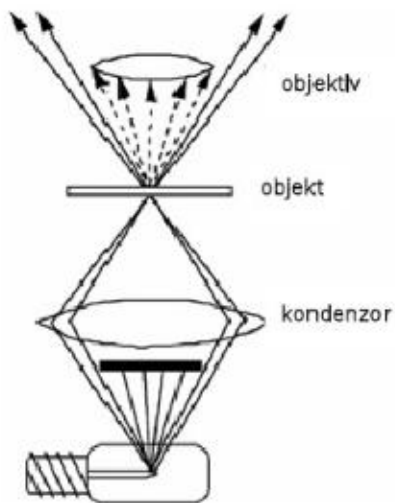
### POZOROVÁNÍ V POLARIZOVANÉM SVĚTLE

Polarizační mikroskop je kombinací světelného mikroskopu a polarimetru. Využívá lineárně polarizovaného světla, které kmitá v jedné rovině. Umožňuje zviditelnit struktury, jejichž stavební materiál se vyznačuje dvojlomem. V dnešní době se používá především v mineralogii a při zkoumání některých anizotropních systémů (příčně pruhovaný sval, buněčné stěny, škrobová zrna). Při zavedení elektronového mikroskopu postupně ztratil na významu.

Polarizace je uskutečněna filtry (polarizátor, analyzátor), které jsou v optické ose mikroskopu.

- Polarizátor - v osvětlovací soustavě (pod kondenzorem nebo v něm)
- Analyzátor - za objektivem (v tubusu nebo nad okulárem)

a) Jednolomné látky: voda, cytoplazma, buněčné jádro - zůstávají při zkřížených filtrech tmavé (nejsou zobrazeny).

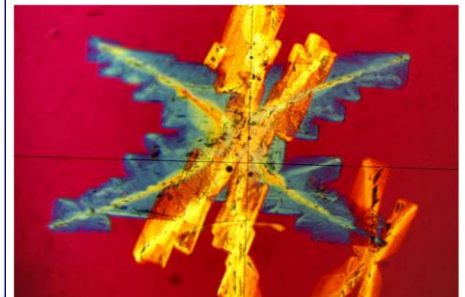
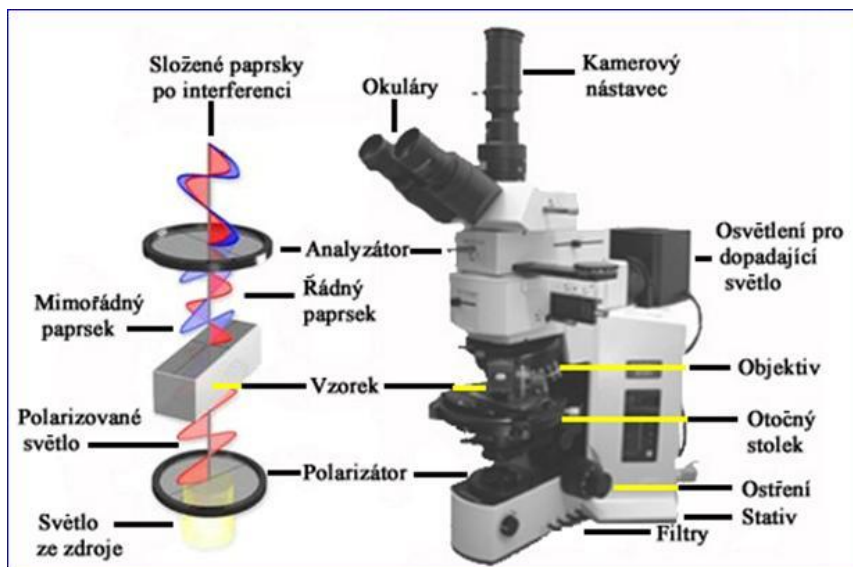


Obr. 4 Chod paprsků při mikroskopování v temném poli

b) Dvojlomné látky: krystaly, celulózní buněčné stěny - mění rovinu polarizovaného světla, a proto jsou při zkřížených filtrech zobrazeny světle na tmavém pozadí.

Původní paprsek se po průchodu vzorkem rozdělí na 2 nové, řádný a mimořádný, které jsou navzájem fázově posunuté a kmitají v různých rovinách. V analyzátoru se oba paprsky složí do stejné roviny kmitu a jejich fázový posun se projeví vznikem interferenčních barev.

Metoda se užívá pro zobrazení lineárně uspořádaných a krystalických buněčných struktur, např. tonofibril, krystalických inkluzí (na obr. analýza močových kamenů), keratinových a celulózových struktur, výbrusů kostí apod.



### POZOROVÁNÍ V TEMNÉM POLI (V ZÁSTINU)

Clona zachycuje paprsky procházející přímo do objektivu. Objekty jsou osvětleny z boku a my pozorujeme pouze světlo, které se na nich láme nebo odráží. Prázdné zorné pole je při tomto postupu tmavé. Teprve to světlo, které se rozptýlí při dopadu na preparát, prochází částečně objektivem a vytváří obraz objektu, v temném poli pak jednotlivé části preparátu intenzivně září (na obr. zooplankton).



Kondenzor pro mikroskopování v zástinu se spojuje s podložním sklíčkem imerzí a apertura se nastaví na nejvyšší hodnotu. Tato metoda se používá při studiu organismů a částí buněk, které se nedají dobře



barvit a jsou přitom malé, takže se špatně rozlišují normálním světleným mikroskopem (spirochety, velké viry, mitochondrie, centrioly, lysozomy, peroxizomy).

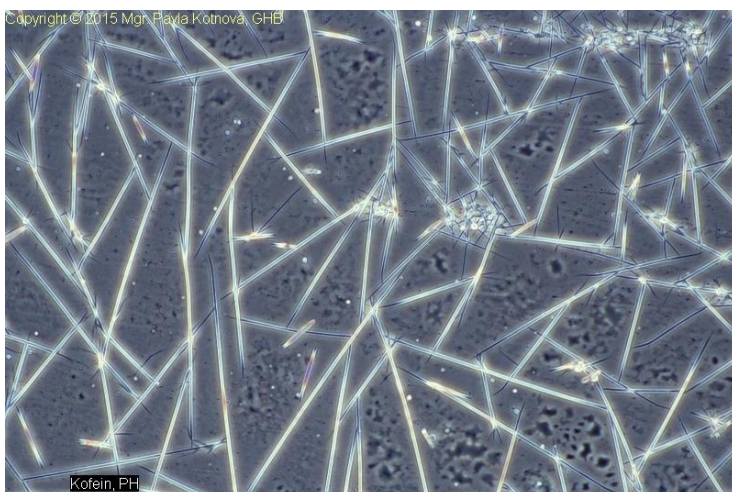
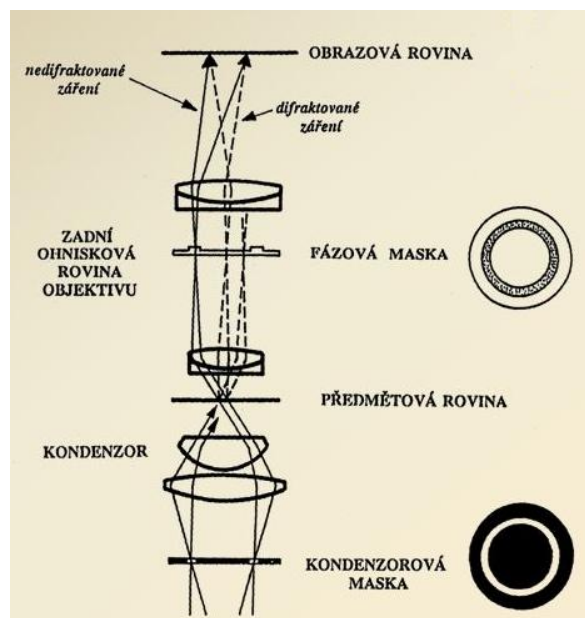
Používá se buď speciálních kondenzorů (paraboloidních), nebo se pod kondenzor vloží clonka s neprostupným středem, takže nepropouští středové paprsky. Podobného efektu dosáhneme tím, že na zdroj světla položíme minci.

## FÁZOVÝ KONTRAST

V roce 1953 získal Frits Zernike za fázový kontrast Nobelovu cenu v oblasti fyziky.

Princip fázového kontrastu spočívá v tom, že fázové rozdíly světelných paprsků procházejících buňkou, které lidské oko nevnímá, se mění příslušným zařízením v rozdíly amplitudy, které rozeznáváme jako světlejší a tmavší místa objektu (na obr. kofein).

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



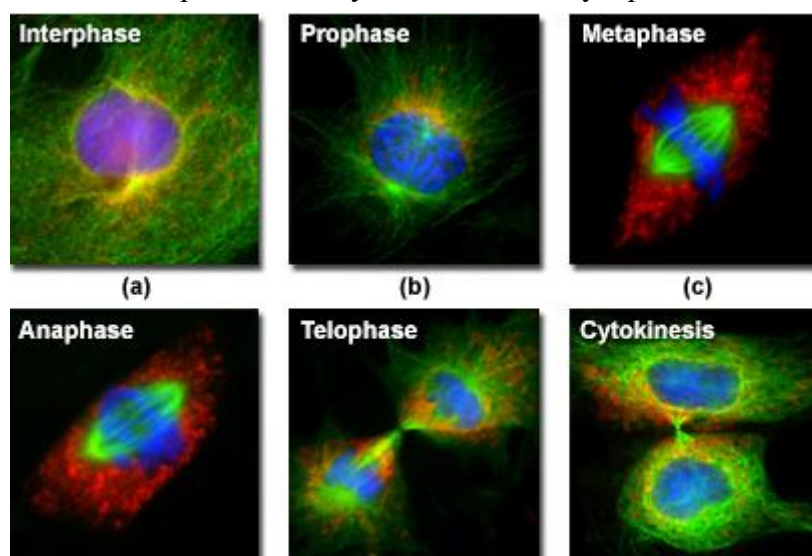
## FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

Fluorescenční mikroskopie umožňuje zobrazit určité látky obsažené v buňkách často v minimálním množství. Metoda je založena na skutečnosti, že některé chemické látky (fluorochromy) po dopadu světla o kratší vlnové délce září světlem o delší vlnové délce - tedy světlem jiné barvy. Tento jev se nazývá fluorescence. Je projevem intramolekulové energetické změny vzbuzené v látce absorbovaným zářením. U látek, které jsou samy o sobě schopné fluorescence, mluvíme o **primární fluorescenci (autofluorescenci)**. Fluorescenci můžeme také vyvolat navázáním fluorescenčního barviva nebo sondy na nefluorescenční cíl a indukujeme tak **sekundární (nepřímou) fluorescenci**. Látky, které jsou fluorescence schopné a které používáme k fluorescenčnímu barvení, se označují jako **fluorochromy**. Často jsou konjugované do komplexu **fluorescenční sondy** s dalšími složkami, např. krátkými řetězci nukleových kyselin nebo protilátkami, které specifikují jejich interakci s cílovými molekulami a strukturami.

Princip nejčastěji užívaného postupu spočívá ve vazbě fluorochromu na určitou buněčnou složku (polysacharid, protein), která pak např. v modrém budícím světle září světlem žlutým. Aby modré

světlo budící fluorescenci nevadilo při pozorování, musí být odstraněno bariérovým filtrem. Ten pohltí modré světlo vycházející z preparátu do objektivu a do okuláru propustí jen světlo žluté. Výsledkem je tedy obraz žlutě zářících struktur v temném poli.

Varianta této metody s použitím mnoha různých fluorochromů se užívá k vizualizaci buněčných jader, chromozomů, jadérek, cytoskeletu a jeho složek, specifických buněčných antigenů a dalších struktur. V mikrobiologii slouží k mikroskopickému průkazu mikroorganismů v klinických vzorcích (sputum, moč, kožní šupiny aj.). V imunodiagnostice se užívá k detekci buněčných antigenů sdružených s určitými chorobami. Podstata této imunofluorescenční metody je v tom, že molekuly protilátky (zpravidla monoklonální) označené navázaným fluorochromem se specificky vážou s molekulami buněčných a tkáňových antigenů, čímž vznikají komplexy (antigen + protilátka + fluorochrom), které ve vhodném budícím záření v mikroskopu fluoreskují a tím indikují přítomnost antigenu v buňce či tkáni. Obr. – průběh mitózy – klokan, ledviny, epiteliální buňky.



## ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP

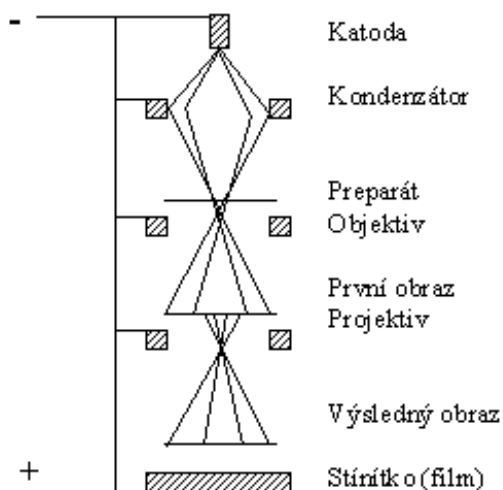
Elektronové mikroskopy pracují s proudem elektronů ve vakuu. Proud elektronů je záření velmi malé vlnové délky. Dva typy - transmisní a rastrovací elektronový mikroskop.

### Transmisní elektronový mikroskop

Viditelný obraz se vytváří na fluorescenčním stínítku svazkem elektronů, které prošly studovaným vzorkem nebo ve vzorku difraktovaly. Zdrojem proudu elektronů je kovová katoda, která po rozžhavení vysílá elektrony urychlované elektrickým polem o napětí 50 – 200 kV. Proud elektronů

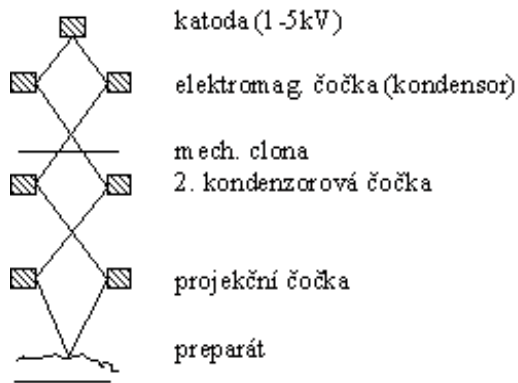
prochází tzv. elektronovou čočkou, kterou tvoří elektrické pole zvláštního kondenzátoru nebo magnetické pole cívky. Tato elektronová čočka soustřeďuje elektrony na pozorovaný předmět.

Vrstva preparátu musí být velmi tenká, přibližně 1  $\mu\text{m}$ , aby nepohlcovala elektrony. Proud elektronů pak prochází další elektronovou čočkou – objektivem a vytvoří první elektronový obraz. Část tohoto obrazu se elektronovou čočkou – projektivem – znovu zvětší a výsledný obrazec se promítá buď na stínítko, nebo se zachytí na fotografické desce či filmu. Tyto, a samozřejmě i další součásti elektronového mikroskopu, jsou uloženy ve vzduchotěsné válcové nádobě, z níž je vyčerpán vzduch, aby se proud elektronů nezeslaboval.



K přípravě vzorků pro transmisní elektronový mikroskop se používá několik metod:

- **metoda obtisků** (replik) - povrch silnější než 10 - 50 nm se pokrývá replikou. To může být např. roztok celulózy, který se nakápne na pozorovaný povrch a nechá se roztéct. Po zaschnutí repliku sejmete a pozorujeme.
- **příprava ultratenkých řezů** - používá se ultramikrotom. Fixace glutaraldehydem - fixuje rychleji, účinněji a lépe jak formol, kyselinou osmičelou, atp., zalévání do umělých pryskyřic, skleněný nůž, řez 50 – 80 nm.
- **elektrochemické leptání** - vzorek je elektrochemicky leptán nebo iontově poprašován. V místě, kde se vzorek proleptá, jej pozorujeme.



### **Rastrovací (skenovací) elektronový mikroskop**

Rastrovací elektronový mikroskop pracuje tak, že postupně na všechna místa vzorku dopadá tenký svazek elektronů. Odražený (emitovaný) paprsek se převádí na viditelný obraz.

Preparát se před pozorováním pokryje tenkou (10-20 nm) vrstvou kovu (vakuovým napařováním, iontovým napařováním, impregnací).

*Mechanická clona* - vybírá pouze část elektronů, které dopadnou na preparát.

*Projekční čočka* - způsobí, aby zaostřený svazek elektronů dopadl na preparát.

### **Výhody a nevýhody elektronové mikroskopie**

Mezi největší výhody patří velmi velké zvětšení - řádově až 1 000 000.

U transmisních el. mikroskopů je nutné, aby vzorek byl velmi tenký, což lze považovat za nevýhodu. Další podstatná nevýhoda je to, že preparát musí být umístěn ve vakuu, což neumožňuje pozorovat živé organismy.

El. mikroskop má velké rozlišení (0,1 nm) a velkou hloubku ostrosti. Pohyb svazku elektronů lze řídit pomocí počítače, což umožňuje využít veškerý komfort, který tato technika poskytuje (zobrazit pouze výřez, odstranit šum snížením rastrovací rychlosti, tisknout obraz ...)

Za nevýhody lze považovat velké nároky na prostor a vysokou pořizovací cenu.

Obr. mitochondrie v transmisním a rastrovacím elektronovém mikroskopu

