

Mikroskopické techniky

„The role of the infinitely small in nature is infinitely large“
Louis Pasteur



Janssenovi Z 9 x,
~1595



Replika mikroskopu
Antony van
Leeuwenhoek
Z 50 – 275x - 17.století



"Objekt, který má reálně 1 milimetr, by měl při zvětšení tímto mikroskopem 700 metrů,"

Ústav molekulární genetiky AV ČR
v současnosti nejdokonalejší biologický prozařovací
elektronový mikroskop, prodaný v ČR – Tecnai T20

Zdroje:

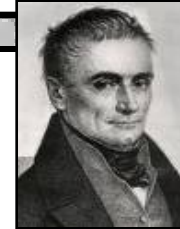
- Campbell N.A. a kol. (2006): Biologie, Computer press, Brno
- Dušan Matis a kolektiv: Mikroskopická technika. Skriptum PŘF Univerzity Komenského, 1993
- Jaromír Plášek: Nové metody optické mikroskopie. Skriptum Fyzikálního ústavu Univerzity Karlovy
- **Hrazdira.I., Mornstein V. (2001): Lékařská biofyzika a přístrojová technika, Neptun, Brno**
- Rosypal a kol. (1999): Úvod do molekulární biologie, Brno
- <http://www.natur.cuni.cz/biologie/servisni-laboratore/laborator-konfokalni-a-fluorescencni-mikroskopie>
- <http://www.microscopy.cz/>
- <http://www.fzu.cz/popularizace/elektronovym-mikroskopem-do-nitra-materialu-aneb-jak-vypada-jejich-struktura>

Buňka

minimální jednotka strukturní, funkční a reprodukční

- **Vývoj buněčné teorie**

rozvoj mikroskopie (17. století až současnost)



J.E. Purkyně



Jan Evangelista Purkyně (1787 –1869) mezi prvními na světě přisoudil buňkám jejich stěžejní význam pro život

Matthias.J. Schleiden (1804-81) a Theodor Schwann (1810-82)

1839 buněčná teorie: Vývoj živé přírody se opírá o růst a tvoření buněk, buňky rostlin a živočichů se shodují tvarem a funkcí. Buňka je základní, stavební a funkční jednotkou živých organismů.

Rudolf Virchow (1821-1902)

nové buňky vznikají jen dělením z již existujících“

Pasteur (1822-85)

fermentace, popřel teorii spontánního tvoření buněk



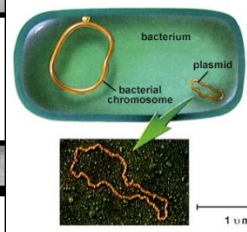
Louis Pasteur



R. Virchow

rozvoj biochemie 1.pol.20.stol **1953** struktura DNA (Watson, Crick, Franklinová)

Zvláštnosti prokaryotické buňky

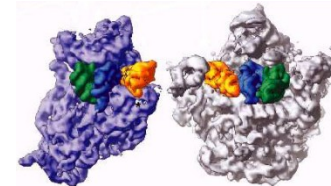


- **živý, otevřený systém** schopný **regulace a autoreprodukce**
- **jádro** neodděleno od CPL membránou, větš. kruhová (i lineární) DNA
- **haploidní buňky** (1 alela) množící se nepohlavně
- bez buněčných organel, jediná membrána je **cytoplasmatická**
- **ribosomy** se liší od ribosomů eukaryotních buněk – menší, volně v CPL
vyjma Archea:

5S, 16S a 23S rRNA

translace začíná N-formylmethioninem

geny pro RNA bez intronů



bakteriální ribozom

specifické struktury a vlastnosti bakt. buňky:

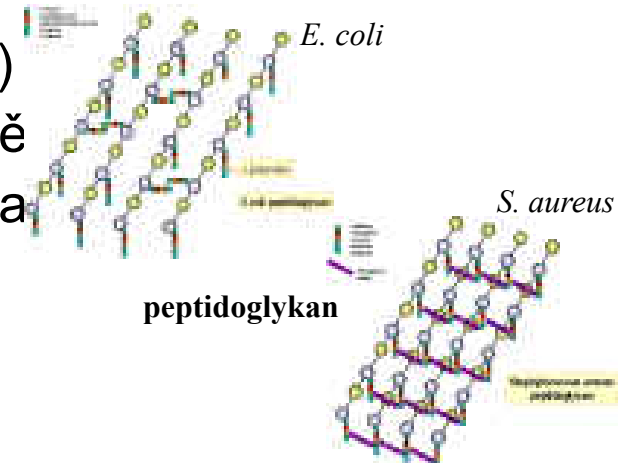
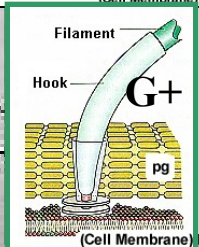
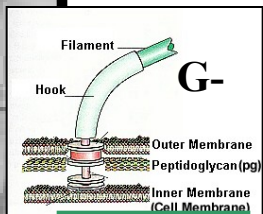
peptidoglykan (až na mykoplasmata)
steroly v membránách zcela výjimečně

bičík – globul. bílk. flagelin, pohyb rota

anaerobiosa, schopnost vázat N

tvorba kyseliny **PHB** (zásob.l.)

pokud **fotosyntéza** - anoxigenní



Velikost a tvary bakteriální buňky

velký poměr povrch/objem – velká plocha kontaktu buňky s prostředím

• Velikost bakt b. v μm

<i>Chlamydia</i>	0,3 x 0,3
<i>Bdellovibrio</i>	0,8 x 0,3
<i>Rickettsia</i>	1 x 0,3
<i>S. aureus</i>	0,8-1 x 0,8-1
<i>E. coli</i>	2-3 x 0,4-0,6
<i>B. subtilis</i>	1,8-4,8 x 0,9-1,1
<i>Streptomyces</i>	vlákno x 0,7-1,6
<i>Chromatium</i>	25 x 1
Spirochety	500



• Tvary bakt. buňky

Koky - sférické, oploštělé, lancetovité
- diplokoky, streptokoky, tetrády,
sarciny, stafylokoky

Tyčinky – rovné, zakřivené, větvcí se,
palisády pleomorfní

Kokobacily

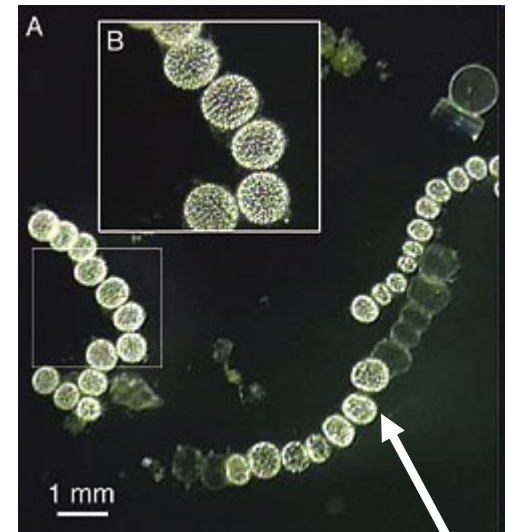
Pupeny

Prostéky

Spirily

Hvězdice

Mycelia



750 μm - největší známá prokaryotní buňka,
objevená r.1999: *Thiomargarita namibiensis*

Nejmenší (např. někteří příslušníci rodu *Mycoplasma*) měří 100 až 200 nm

Bacterial Morphology

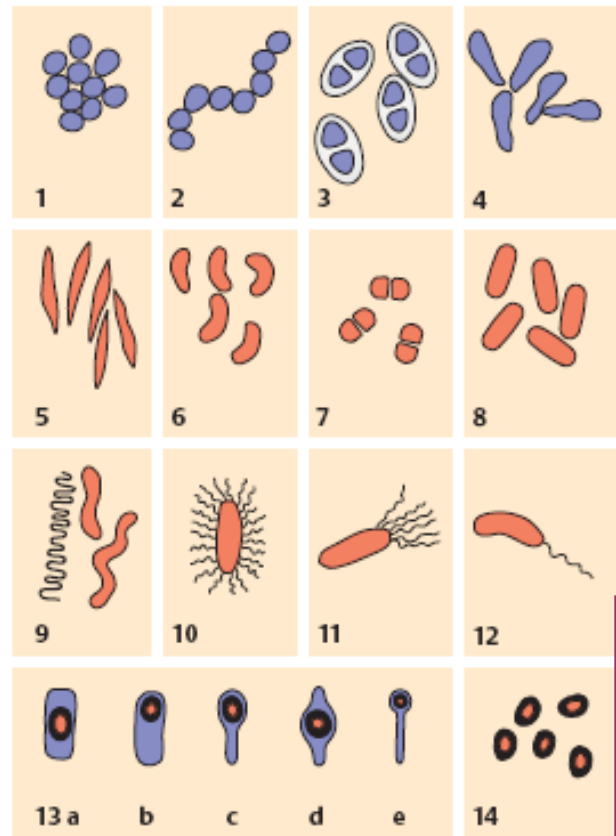
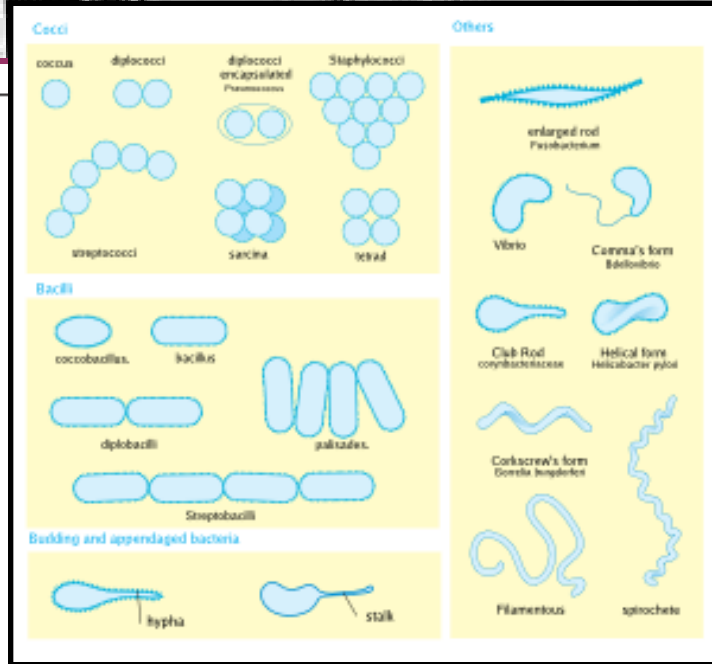
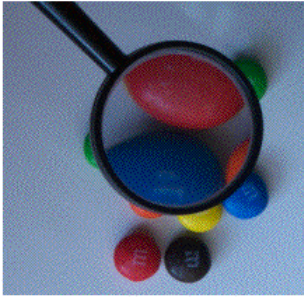


Fig. 3.1



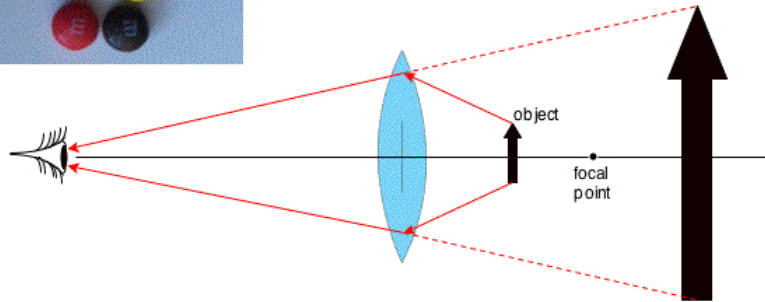
1. Gram-positive cocci in grape-like clusters (staphylococci)
2. Gram-positive cocci in chains (streptococci)
3. Gram-positive cocci with capsules (pneumococci)
4. Gram-positive, club-shaped, pleomorphic rods (corynebacteria)
5. Gram-negative rods with pointed ends (fusobacteria)
6. Gram-negative curved rods (here comma-shaped vibrios)
7. Gram-negative diplococci, adjacent sides flattened (neisseria)
8. Gram-negative straight rods with rounded ends (coli bacteria)
9. Spiral rods (spirilla) and Gram-negative curved rods (*Helicobacter*)
10. Peritrichous flagellation
11. Lophotrichous flagellation
12. Monotrichous flagellation
13. Formation of endospores (sporulation) in cells of the genera *Bacillus* and *Clostridium* (spore stain)
 - a) Central spore, vegetative cell shows no swelling
 - b) Terminal spore, vegetative cell shows no swelling
 - c) Terminal spore ("tennis racquet")
 - d) Central spore, vegetative cell shows swelling
 - e) Terminal spore ("drumstick")
14. Free spores (spore stain)

Magnification and Orientation II



Why doesn't a simple magnifying lens produce an inverted mirror image?

With the object closer to the lens than the focal point, the light rays diverge, giving the viewer the illusion that he/she is seeing a larger object, farther away, in the same orientation.



BioEd Online



Morfologie kolonií

- Velikost (průměr; mm)
- Tvar
- Profil
- Okraje
- Povrch
- Transparence – průhledná, průsvitná, neprůsvitná kolonie
- Barva - kolonie bezbarvá, pigment: naředlá, bělavá, žlutá ...

Další znaky

Vůně, zápach

– po jasmínu, žluklém másle, ovocný ...

Tvorba mycelia

Změny media – dvorec zbarvení, hemolýzy, precipitátu

Konzistence – zjišťuje se bakteriální kličkou (viskózní, mazlavá, drobivá, zarůstá do agaru)

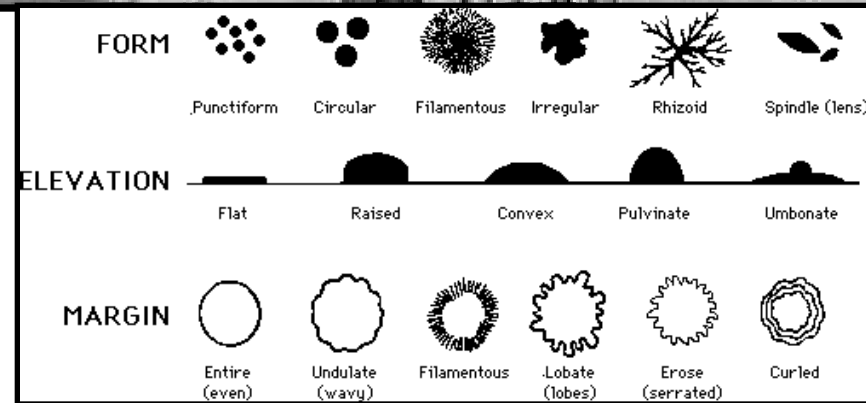


Figure 4
Colony mutants derived from SIN96 strain. Strains were grown on 1.5% agar medium for 50 hours at 25°C. The colony in the center is SIN96, with wild type morphotype and mutants at the periphery: 1) SINett, 2) CAD, 3) CIC, 4–6) cotton-like colonies.

Mikroskopie



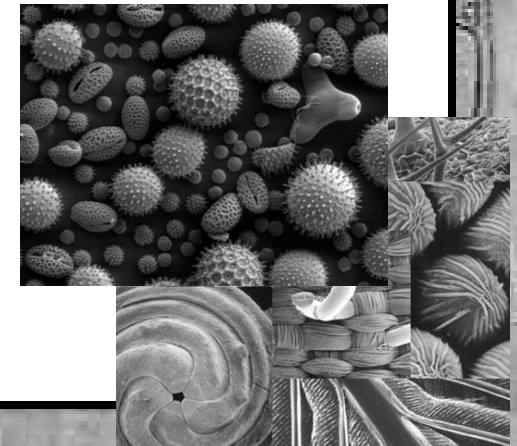
Lidské oko má rozlišovací schopnost 0,07 mm.

Pro mikroskopii lze využít jakékoli vlnění s vlnovou délkou kratší než jsou rozměry objektu.



- **Pojmy a schémata mikroskopie**
- **A) Optická** - zobrazení struktur lišících se vzájemně absorbcí viditelného světla
 - 1) **Varianty optického mikroskopu**
 - 2) **Speciální optické mikroskopy**

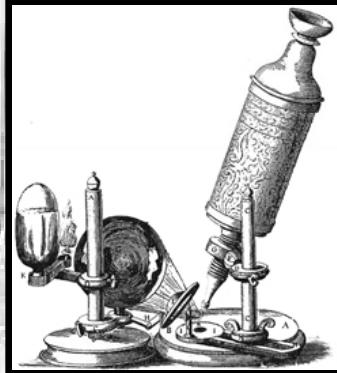
zobrazení struktur lišících se vzájemně např. absorbcí UV i IR světla
- **B) Elektronová**
- **C) Akustická**



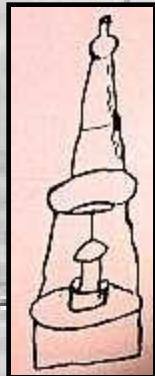
Historie mikroskopie



Tubulární mikroskop
Bratři Janssenové, 1595



Robert Hook 1665
Již olejová lampa



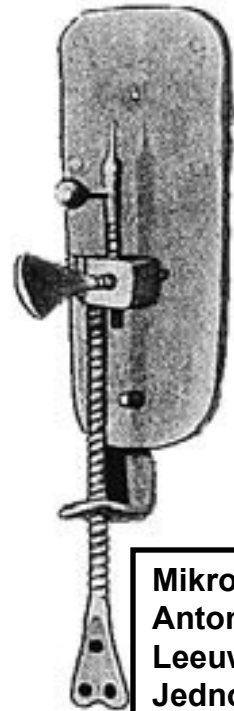
Nejstarší nákres
složeného
mikroskopu,
Isaac Beeckman,
Middelburg, 1625



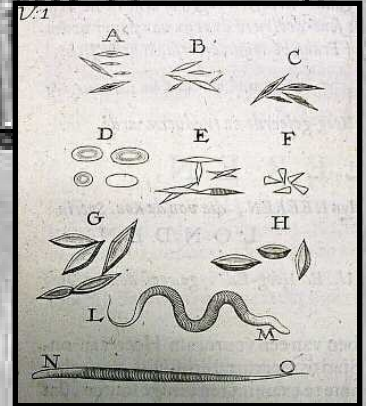
tot mijn
Doen
en meni
ende di
door M
men no
dekkinge niet aannemen, en zoo doet
Days-lant, zoo ik onderrigt werd.

90 ANTONI van LEEUWENHOEKS

Ik ben laten aftekenen treken enige deelen van deke fersvatien Boekje was leer daer uyt ik dat Bo Job. Fra of ik sag kleyne laren, als doch seer nu komt het aan



ren in 't geheel te weinig nut kon- arom ik maar een aftekenen. groot opgegeven erofcopiche Ob- de waren, welk verveylt was. Ik hoopende dat ik ar foo ras en had wa, door de H. niet bekomen, dig was: want de e in afgebeeld wa- ren wel groot, eteykent. Of dit ot-glasen, of dat is my onbekent



Krystaly vinného octa,
Antony van Leeuwenhoek

Mikroskop typ I, 1670
Antony van
Leeuwenhoek
Jednoduché,
zaostřovací šroub,
držák.
Bez světél.

Celkem 419 mikroskopů



John Yarwell
Compound
Monocular
Microscope
(circa late 1600s)

1595 – Zachariáš a Jan Janssenovi - 1. mikroskop

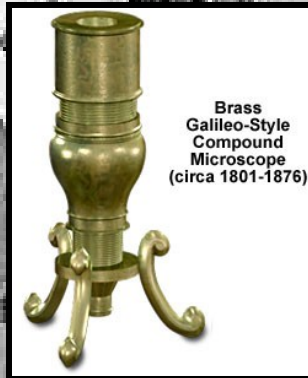




Cuff's Microscope
(circa mid 1700s)



John Marshall
Compound
English
Microscope
(circa 1720)



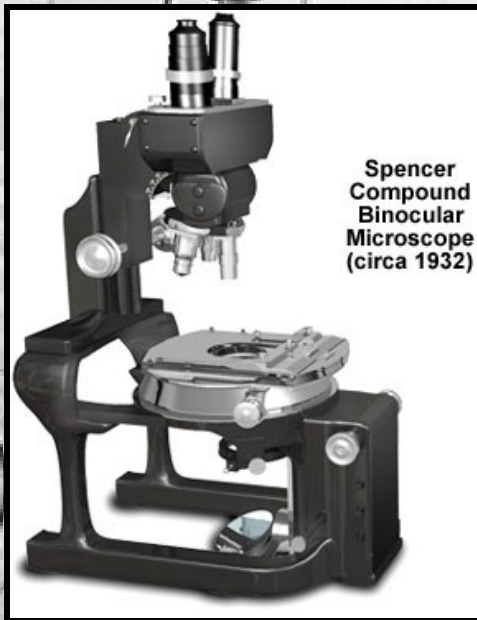
Brass
Galileo-Style
Compound
Microscope
(circa 1801-1876)



Early Ross
Compound Microscope
(circa 1831)



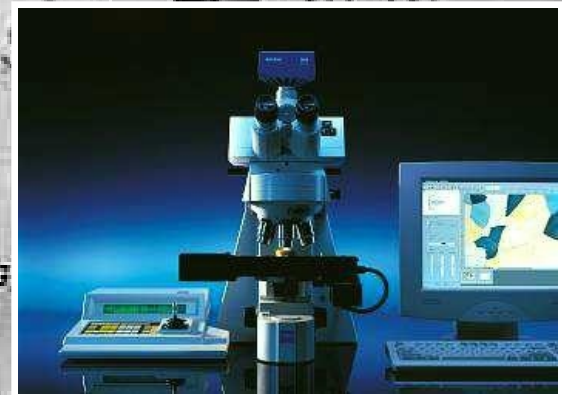
Oberhauser's
Drum
Microscope
(circa 1850)



Spencer
Compound
Binocular
Microscope
(circa 1932)



Carl Zeiss 1886
Složený monokulární mikroskop
Van Leeuwenhoekovy „Listy“



„Carl Zeiss“
binokulární mikroskop (design 2002)

Kterou metodou?

- Její dostupnost
- Záleží na mikroskopované struktuře
- Tolerance k artefaktům

Př: EM – tři hlavní skupinky preparátů

mesozomy, filamenta, nukleoid

**- dehydratace + barvení – ovlivňují
morfologii struktur**

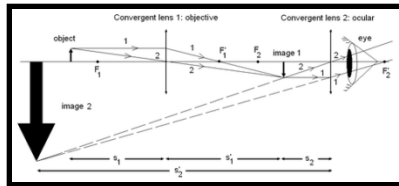
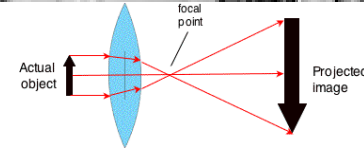
**- kryoelektronová mikroskopie – pozorování
hydratovaných zmražených buněk**

Optická (světelná) mikroskopie

Max. zvětšení 1500 X, max. rozlišení 200 nm

Stavba světelného mikroskopu

- mechanické součásti - stativ, noha, tubus, revolverový měnič objektivů, stolek, makro- a mikrošroub
- optika mikroskopu (objektiv a okulár) – kombinace čoček, korekce vad
- osvětlovací zařízení - světlo prochází objektem



- zdroj světla: lampa v noze s kolektorovou čočkou
kondenzor – ze 2-3 spojených čoček
- soustřeďuje světelné paprsky na objekt

Základem mikroskopu jsou dvě soustavy čoček:

1) Objektiv – převrací neskutečný, zvětšený a přímý obraz pozorovaný okulárem (lupou)

Výsledkem je neskutečný, zvětšený a převrácený obraz.

➡ - čím kratší ohnisková vzdálenost objektivu, tím větší je zvětšení ←

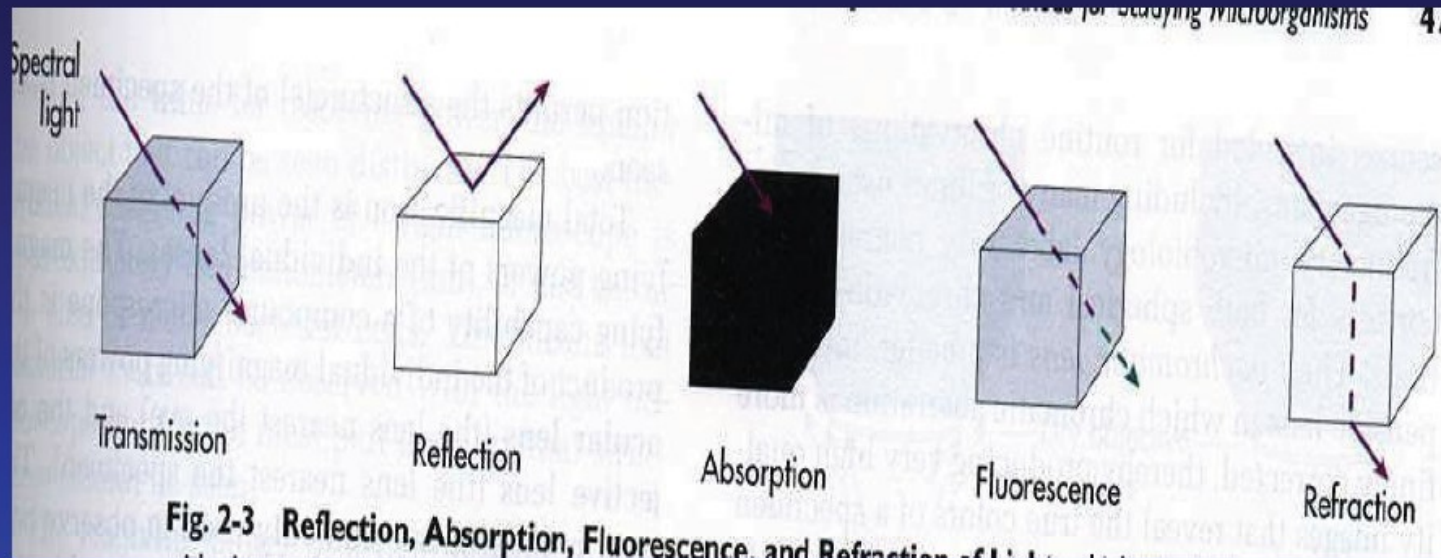
2) Okulár – zvětšuje obraz vytvořený objektivem, zvětšení je prázdné. Koriguje zbytek vad.

a) jeden – mikroskopy monokulární

b) dva – binokulární (Carl Zeiss 1933), světelný svazek rozdělen hranolem na dva

vznik obrazu

transmise, odraz, absorpce, fluorescence, lom



Na základě vlastností světla v prostředí vzniká obraz

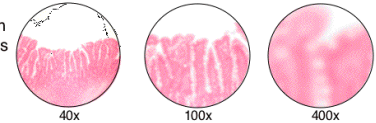
Pojmy mikroskopie

Celkové zvětšení Z

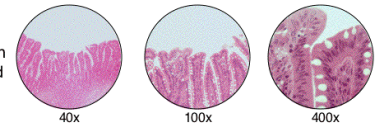
- kolikrát je obraz sledovaného objektu větší než o
- je dáno součinem zvětšení objektivu a okuláru
- omezeno **rozlišovací mezí**

“Empty” Magnification

Final magnification using a simple lens system (e.g., dissecting microscope)



Same images: Final magnification using a compound light microscope



 BioEd Online

Rozlišení - jak daleko musí být od sebe 2 body, aby nesplynuly v jeden

Rozlišovací mez - teorie výpočtu vychází z interference prošlých paprsků (E.K. Abbe)

$$\delta = \lambda / n \cdot \sin \alpha$$

Numerická
apertura

λ vlnová délka použitého světla – čím vyšší, tím vyšší rozlišení

n index lomu prostředí mezi čelem objektivu a sklíčkem

αúhel mezi optickou osou mikroskopu a kuželem paprsků vstupujících z preparátu do objektivu

Numerická apertura objektivu (NA)

$$n \cdot \sin \alpha$$

= součin úhlu dopadu paprsků
od objektu do objektivu a
indexu lomu

- čím je vyšší, tím vyšší je
rozlišovací schopnost
objektivu, ale nižší hloubková
ostrost

- Pracovní vzdálenost

- od povrchu čočky objektivu po krycí sklo

- Kontrast

- rozdíl ve vizualizaci objekt / pozadí

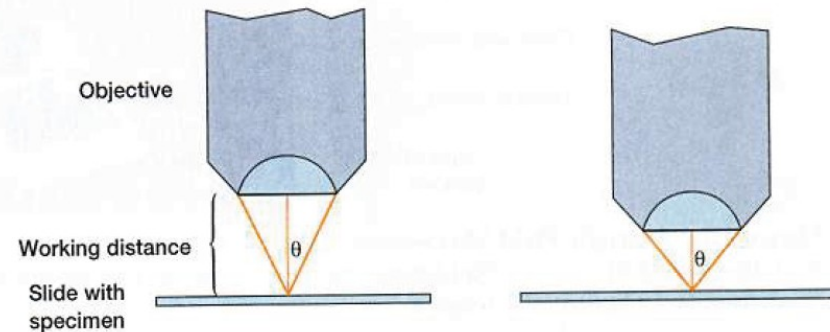


Figure 2.5 Numerical Aperture in Microscopy. The angular aperture θ is $\frac{1}{2}$ the angle of the cone of light that enters a lens from a specimen, and the numerical aperture is $n \sin \theta$. In the right-hand illustration the lens has larger angular and numerical apertures; its resolution is greater and its working distance smaller.

Suchý objektiv:

Paprsek vystupující z preparátu pod úhlem α se na rozhraní mezi krycím sklíčkem a vzduchem láme od kolmice a nemůže se již podílet na tvorbě obrazu.

menší index lomu
menší numerická
apertura
vyšší rozlišovací mez

$n = 1$

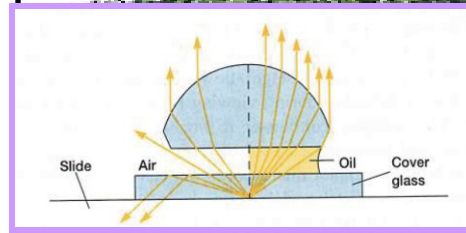
$$NA = \max 1$$

Pro žlutozelené světlo:

$$\lambda = 550 \text{ nm}$$

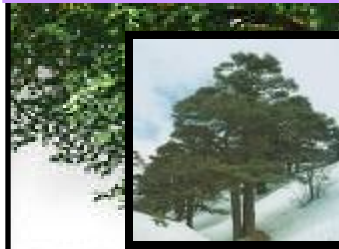
$$NA = 0,95$$

$$\text{Rozlišovací mez} = 0,6 \mu \text{ m}$$



Rozlišovací mez

$$\delta = \lambda / n \cdot \sin \alpha$$



R. Hook - po 1.olejová lampa
Kapalina zvyšuje účinek
světla

Ulm

Robert O'Brien

Imerzní objektiv:

Paprsek přecházející ze skla do imerzního prostředí svůj směr nemění a může se podílet na tvorbě obrazu.

Imerzní prostředí - kapalina o stejném n jako krycí sklíčko. Často cedrový olej ($n = 1,52$). Imerze umožňuje korigovat některé opt. vady mikroskopu.

větší index lomu
vyšší úhel α
vyšší numerická apertura
nižší rozlišovací mez

$$NA = 1,2 - 1,4$$

Pro žlutozelené světlo:

$$\text{Rozlišovací mez} = 0,4 \mu \text{ m}$$

Optické vady (aberrace) objektivů:

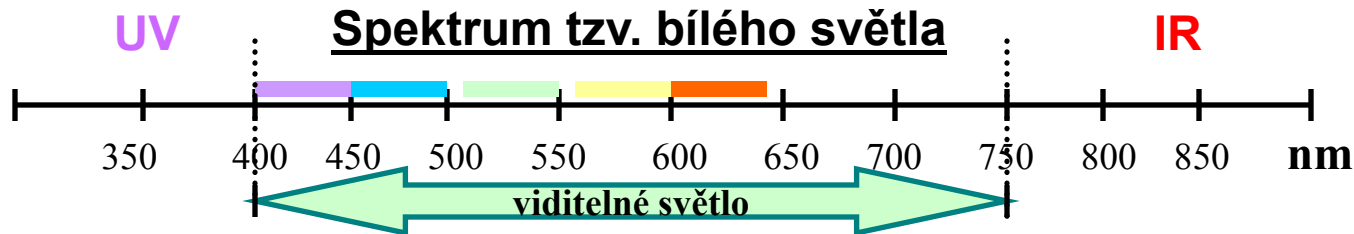
Otvorová vada (kulová, sférická)

Čočky objektivu nejsou tenké:
různý lom paprsků od optické osy
Bodový předmět zobrazen jako
úsečka

• Barevná vada (chromatická)

Je způsobena optickou disperzí
(závislost indexu lomu na vlnové
délce světla).

Bodový předmět zobrazován na různá
místa optické osy v závislosti na
vlnové délce světla.



Korekce vad

Kombinacemi vhodných spojných či rozptylných čoček z různých materiálů o různém n.
Rozlišení objektivů dle stupně korekce vad:

Achromáty – barevná vada korigována pro 2 barvy světla (červené a modrozelené), otvorová pro žluté

Semiapochromáty – barevná vada korigována pro 2 barvy blíže oběma koncům viditelného světla

Apochromáty – barevná: nejméně pro 3 barvy, otvorová pro 2. Nejdokonalejší objektivy pro bílé světlo

Planachromáty a planapochromáty – korigované i zklenutí zorného pole. Význam pro mikrofotografii.

Okuláry – typy dle účelu mikroskopie

- **Huygensův**
- **Ortoskopické** – nezkrslují zorné pole, přesně stejné zvětšení v celém zorném poli. Zejména k měřicím účelům.
- **Kompenzační** – kompenzují zbytkové chromatické vady.
- **Periplanatické** – odstraňují astigmatickou vadu silněji zvětšujících objektivů.
- **Brillovy** – dioptrické
- **Širokoúhlé** – průměr zorného pole až 2,5 cm
- **Projektivy** - mikrofotografie

Mikroskopie



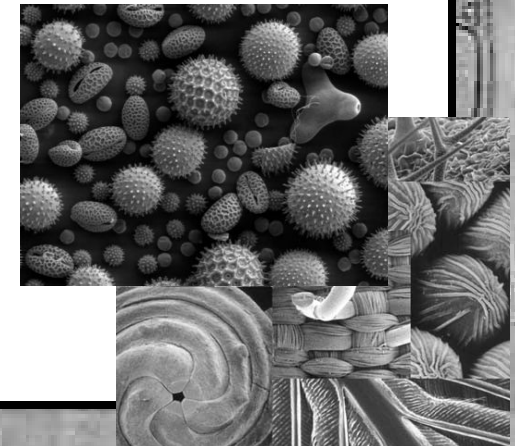
Lidské oko má rozlišovací schopnost 0,07 mm.

Pro mikroskopii lze využít jakékoli vlnění s vlnovou délkou kratší než jsou rozměry objektu.

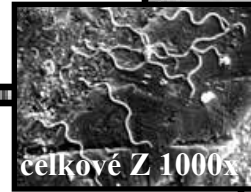


- **Pojmy a schémata mikroskopie**
- **A) Optická** - zobrazení struktur lišících se vzájemně absorbcí viditelného světla
 - 1) **Varianty optického mikroskopu**
 - 2) **Speciální optické mikroskopy**

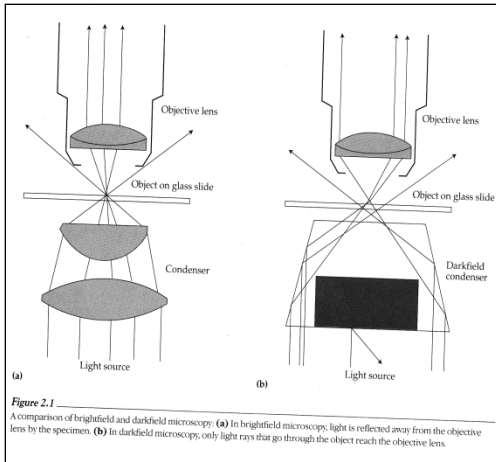
zobrazení struktur lišících se vzájemně např. absorbcí UV i IR světla
- **B) Elektronová**
- **C) Akustická**



Varianty optického mikroskopu

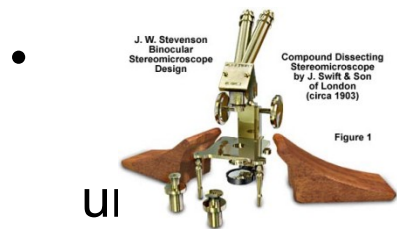


- 1) Mikroskopie v temném poli – pro zvýšení kontrastu



- preparát silný pro průchod paprsků
- pozorování v **odražených paprscích**
- upravený kondenzor osvětluje preparát zespodu
(čočka uprostřed zacloněná) – objekt svítí

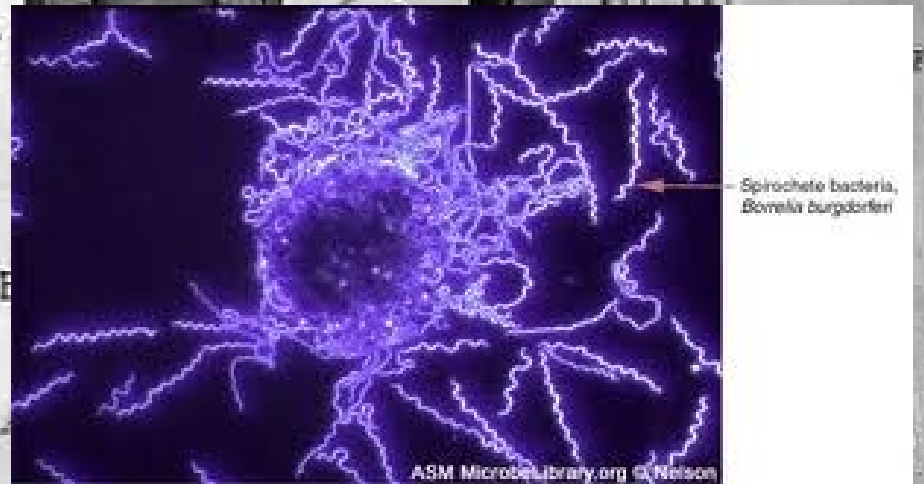
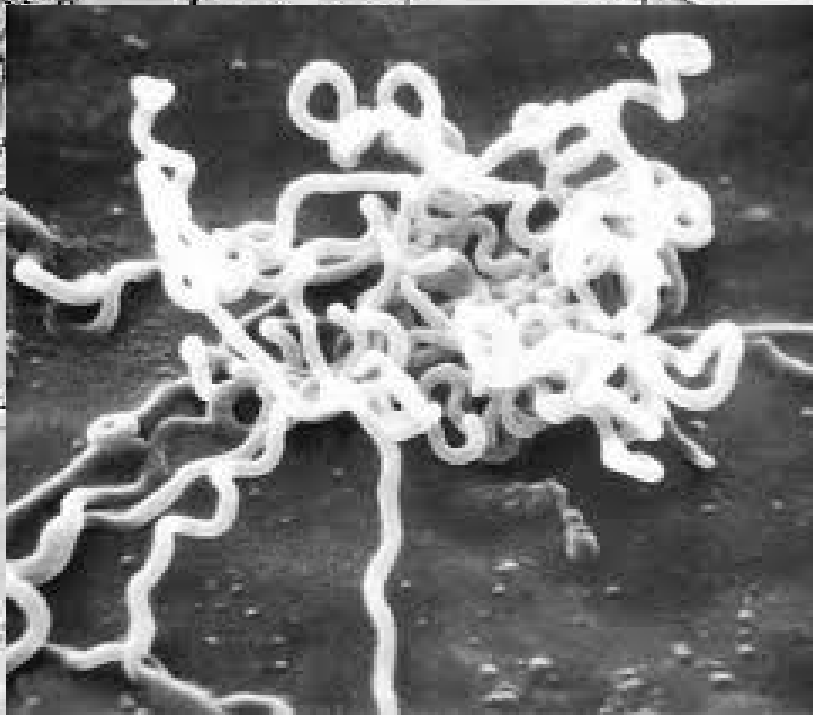
metoda na pozorování velmi malých objektů (prvoci, bakterie) a jejich struktur zaživa



- 2) Stereomikroskopie – 2 mikroskopy se samostatnými objektivy a okuláry - jejich optické osy svírají

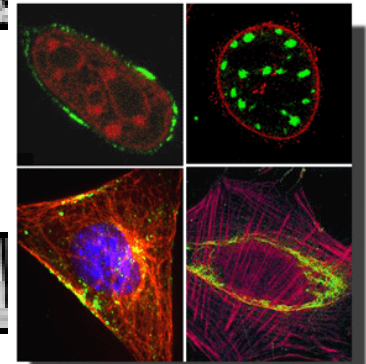
- plynulá změna zvětšení bez zaostření (operační mikroskopy)

- 3) Mikroskopy pro mikrofotografování, pro pořizování videozáznamu s digitálními kamerami, projekční mikroskopy, mikroskopy s mikromanipulátory



Speciální optické mikroskopy

zobrazení struktur lišících se vzájemně absorpcí např. UV, IR světla



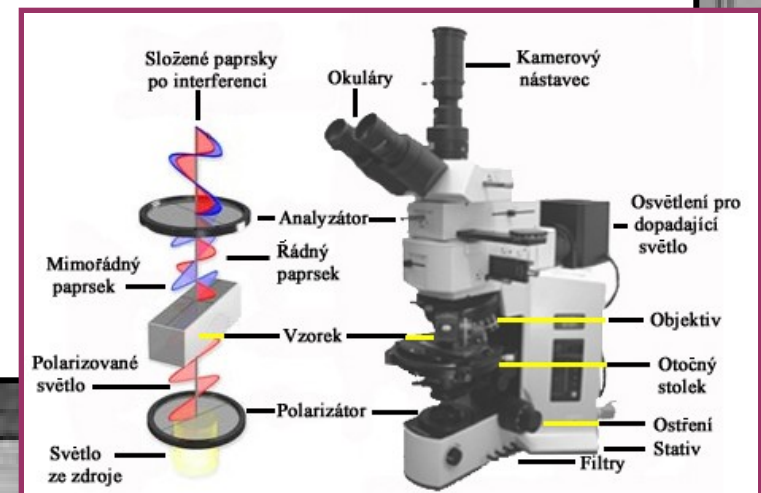
- fázově kontrastní mikroskop

1953 – Nobelova cena za objev – Frits Zernike
(1888 – 1966)

- interferenční mikroskop
 - diferenční interferenční kontrast



- polarizační mikroskop
- UV mikroskopie
- fluorescenční mikroskop

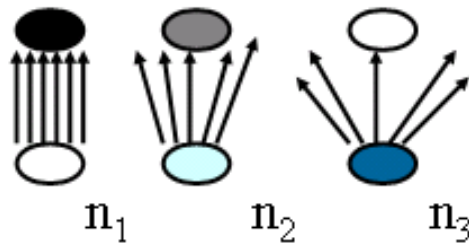


Fázový kontrast I.

- Klasický světelný mikroskop:
 - **details objektů** nejsou rozeznány vzhledem k **malému kontrastu** mezi strukturami s podobnou propustností světla



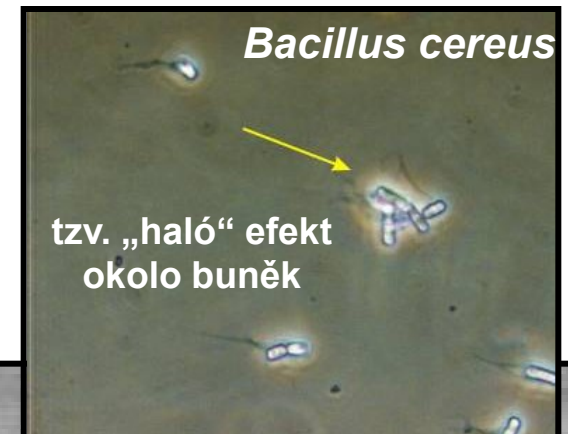
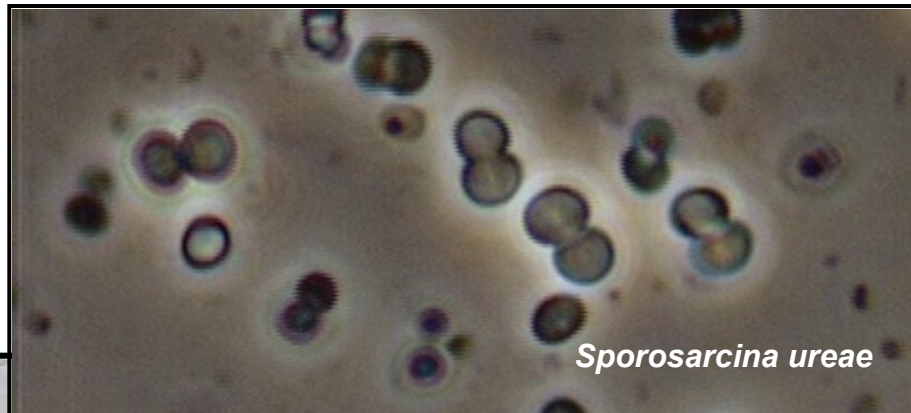
- Různé části prep. - různý index lomu a ohyb paprsků

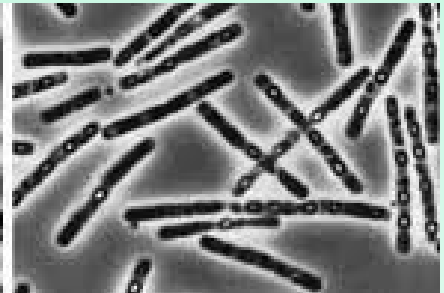
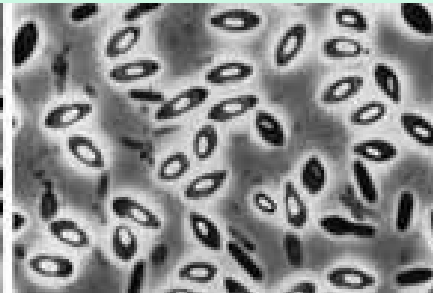
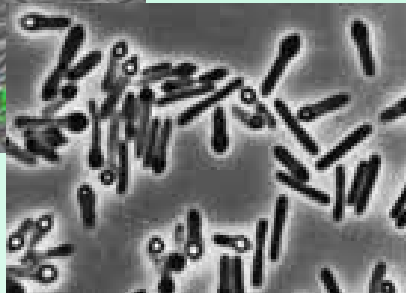
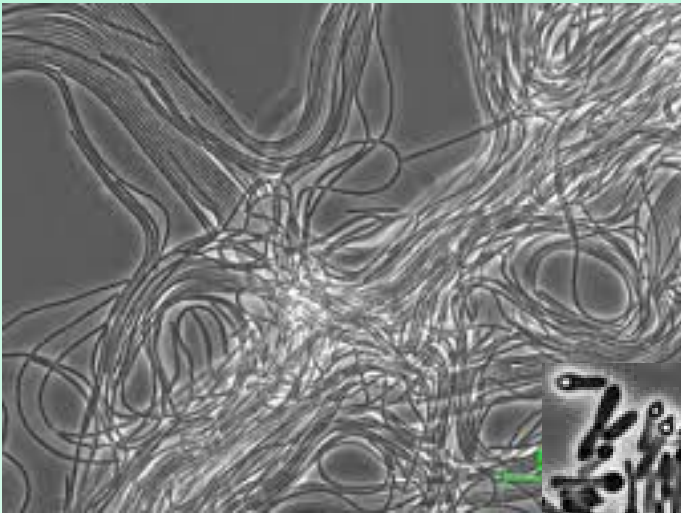
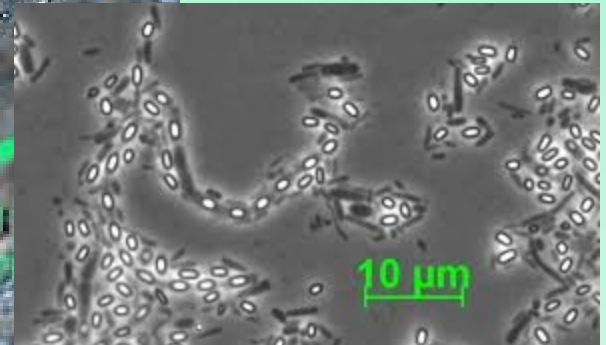
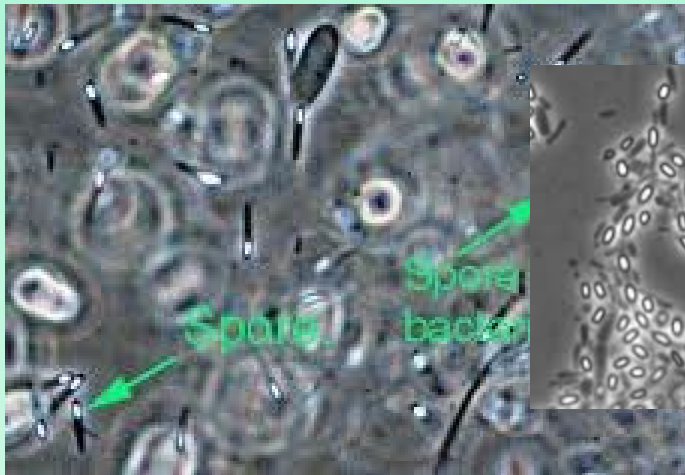
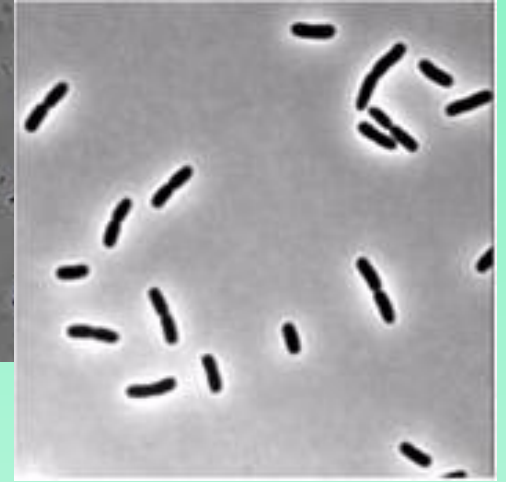
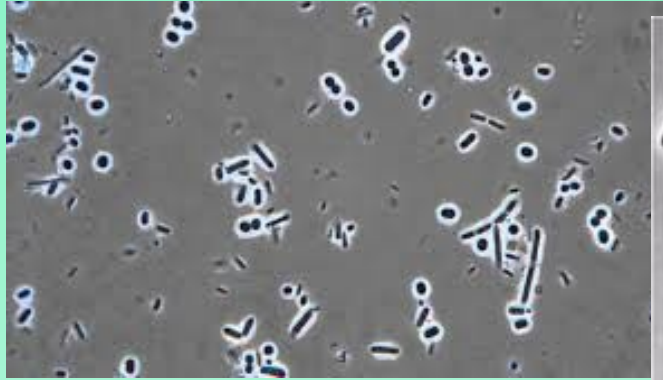
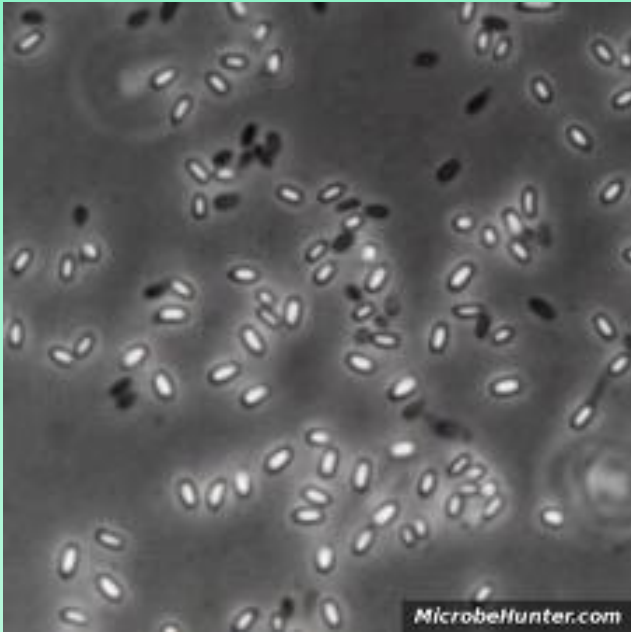


$$n_1 < n_2 < n_3$$

n_3 – objekty s vysokým n velmi ohýbají světlo

možnost pozorování živých objektů v nativním stavu bez barvení

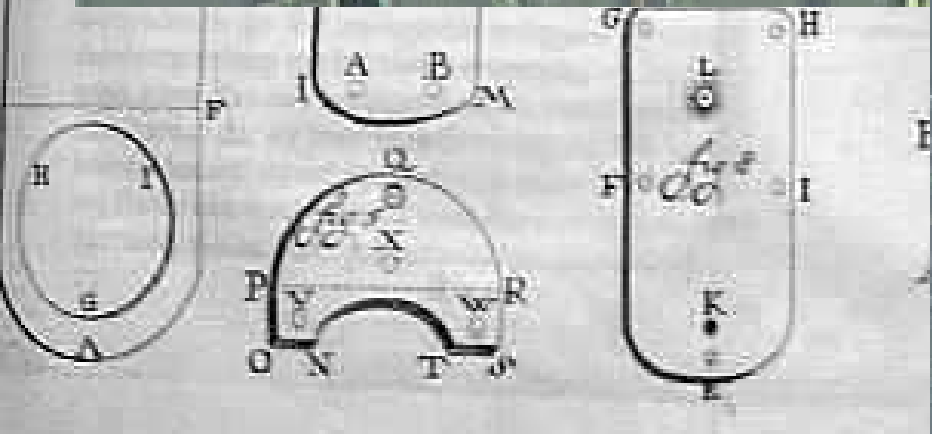
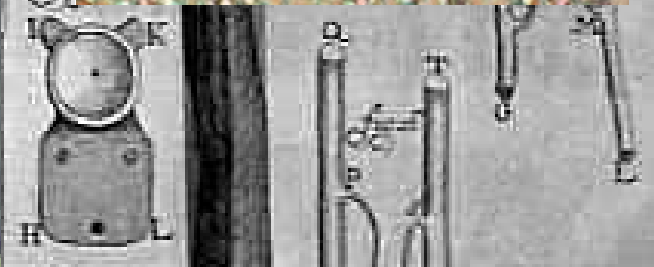
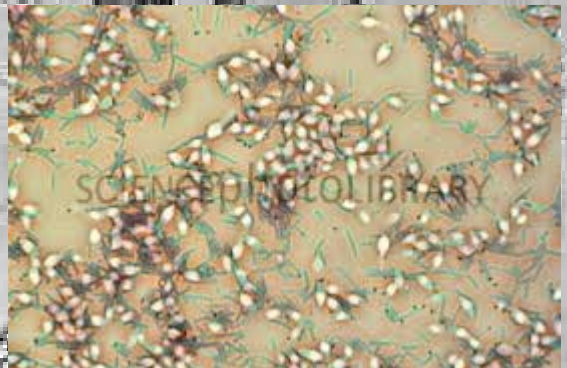


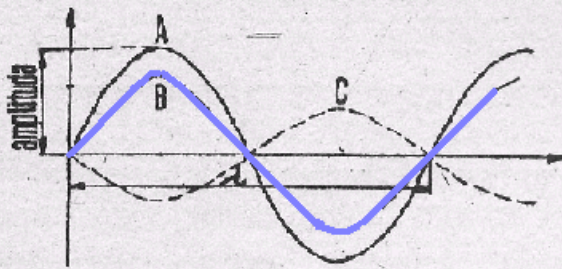


M	P	G	H
F	F	G	H



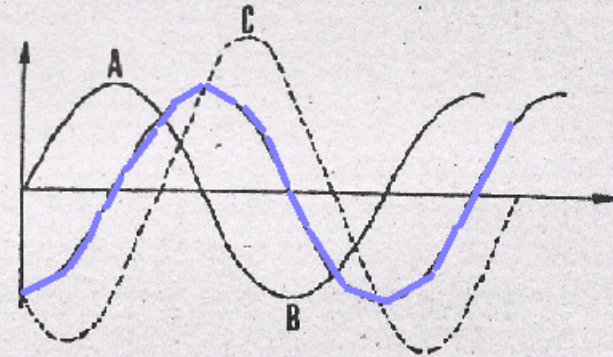
© Microscope World





Obr. 7. Průchod světla absorbojícím objektem

A - světelná vlna dopadající na objekt, B - světelná vlna po průchodu zbarveným objektem, C - světelná vlna po difrakci v objektu, (B vzniká interferencí A a C)

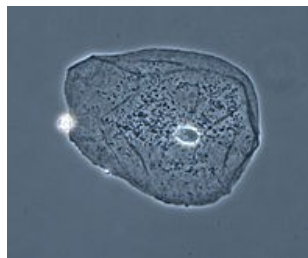


Obr. 8. Průchod světla transparentním objektem

A - světelná vlna dopadající na objekt, B - světelná vlna po průchodu transparentním objektem, C - světelná vlna po difrakci v objektu, (B vzniká interferencí A a C)

V **husté absorbojící části preparátu:**

vidíme ji jako světlou; dojde k částečné absorpci vlnové délky a ke změně amplitudy což zachytíme jako změnu intenzity světla.



$$B = A + C$$

Vlna C je oproti původní vlně A po difrakci **posunuta o 180**.

Při průchodu světelné vlny **transparent. objektem** se vlna zpozdí, nemění však intenzitu ani amplitudu, ale **posune se její fáze – často o 90**.

Mikroskop zvýší změnu ve fázi mezi původní vlnou A a vlnou po difrakci C na 180 - obě se pak po interferenci co nejvíce ruší.

Pozn: posun fáze je v závislosti na rozdílu indexu lomu dané struktury a okolí, na délce optické dráhy a na vlnové délce světla.

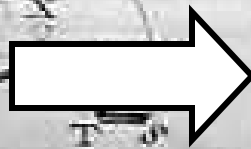
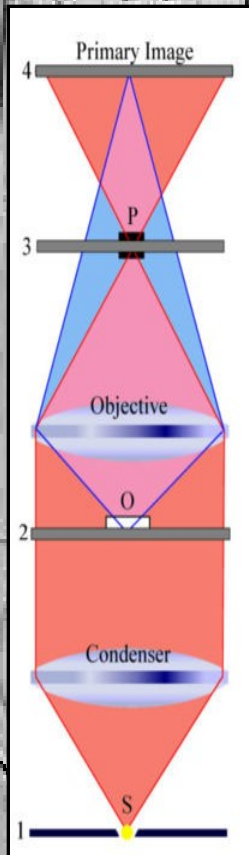
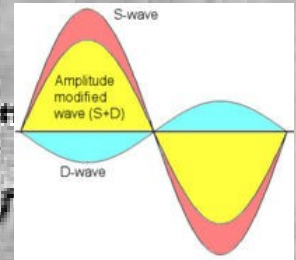
Fázový kontrast II

- **Princip:**

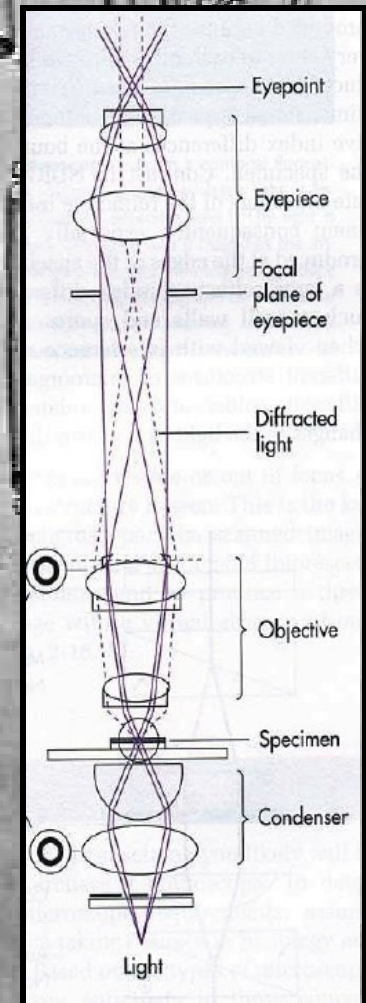
V kondenzoru - kruhová clona (zatemnělý střed)

Paprsky projdou vzorkem - na fázových objektech dojde k odchýlení některých paprsků z původního směru (vlivem ohybu, rozptylu, lomu).

V objektivu - čtvrtfázová destička, také tvar mezikruží. Na ni dopad paprsků, co nezměnily směr při interakci s fázovými objekty, ty posunuty, ostatní paprsky (se změněným směrem) destičku minou, nejsou posunuty.



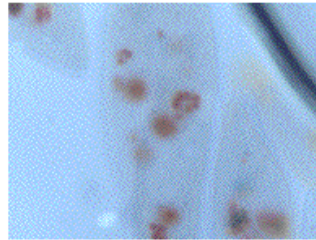
Rozdíly ve fázi světla převedeny
na změny kontrastu



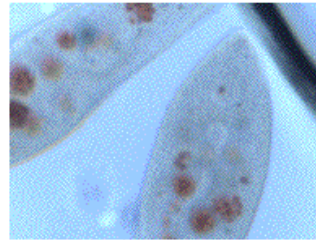
Fázový kontrast III.

Contrast

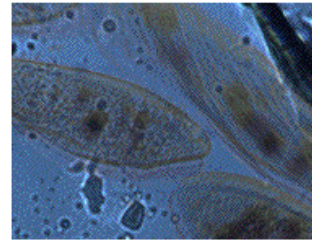
Three views of *Paramecium caudatum* (food vacuoles contain stained yeast cells)



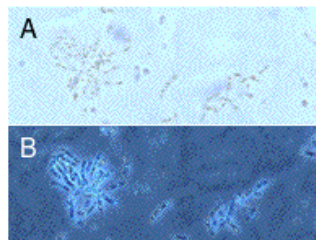
low contrast



optimum contrast

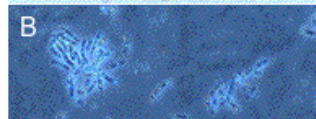


high contrast



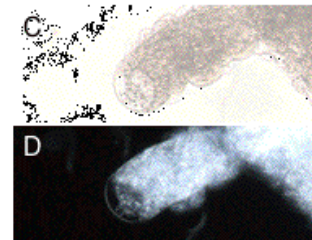
A

(left) *Bacillus thuringiensis* with endospores: (A) bright field; (B) phase contrast (400x)

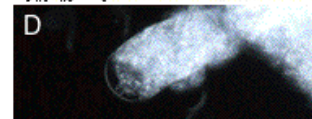


B

(right) Pseudopodium of *Chaos (Pelomyxa) carolinensis*: (C) bright field; (D) dark field (100x)



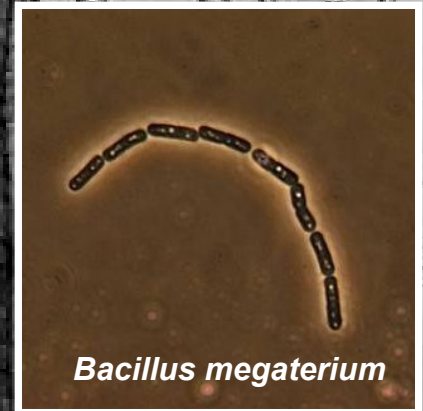
C



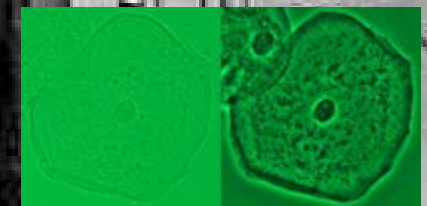
D



Epiteliální buňka



Bacillus megaterium



BioEd Online

Obraz je vytvářen interferencí paprsků fázově posunutých i neposunutých

- Pozitivní fázový kontrast: objekty **tmavší vůči pozadí** (fázově posunuty paprsky se změněným šířením)
- Negativní fázový kontrast jsou-li objekty oproti pozadí relativně **světlejší** (fázově posunuty paprsky nevychýlené ze svého směru)

Interferenční mikroskop

- **Princip:** pracuje se **2 koherentními** (interference schopnými) **paprsky**,
 1. prochází objektem
 2. vedle objektu**Obraz:** vzniká interferencí obou oddělených paprsků.

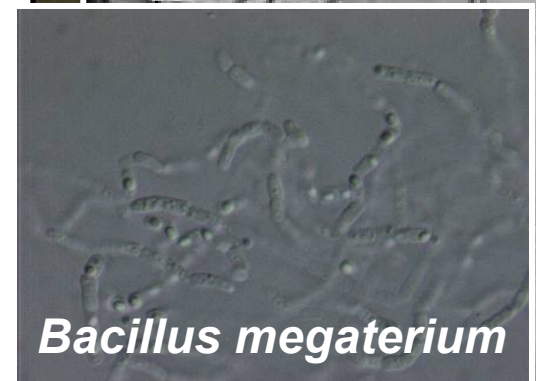
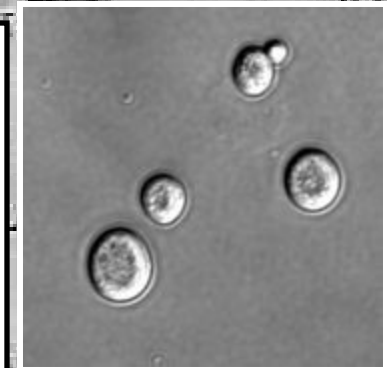
Výhoda: možnost přímého měření indexu lomu objektů.

Varianta interferenčního mikroskopu:

Mikroskopy s **diferenčním interferenčním kontrastem dle Nomarského (DIC)**

Hlavní součásti:

Polarizátor srovnává vlny, jež jsou v různých rovinách Nomarského destička v kondenzoru je hranol, jež zpracovává polarizované světlo tak, že **na preparát jdou dva paprsky souběžně vedle sebe**. V analyzátoru vidíme 3D obraz v závislosti na **různém n** různých částí buňky. Zvýrazněním i malých rozdílů vznikne **plastický obraz povrchu buňky**.



Bacillus megaterium

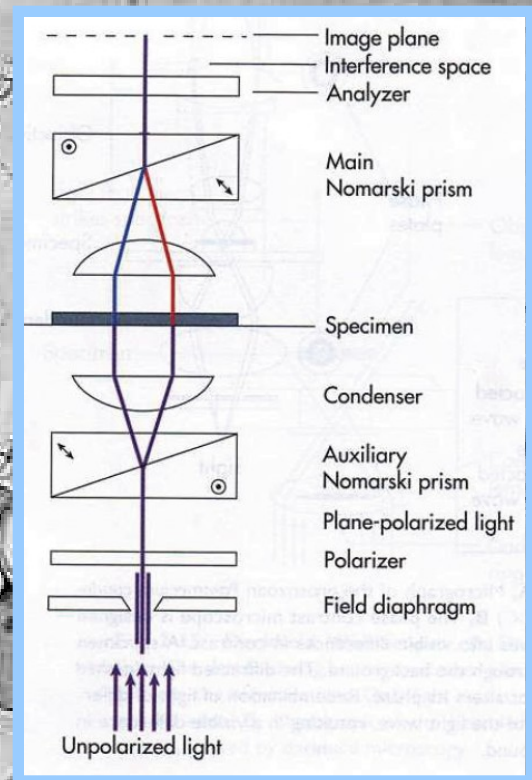
Bacillus cereus

Sporosarcina ureae

- Princip: svazek polarizovaného světla je po průchodu preparátem štěpen polarizačním filtrem na **2 nepatrně posunuté svazky** (nastává dvojlom).

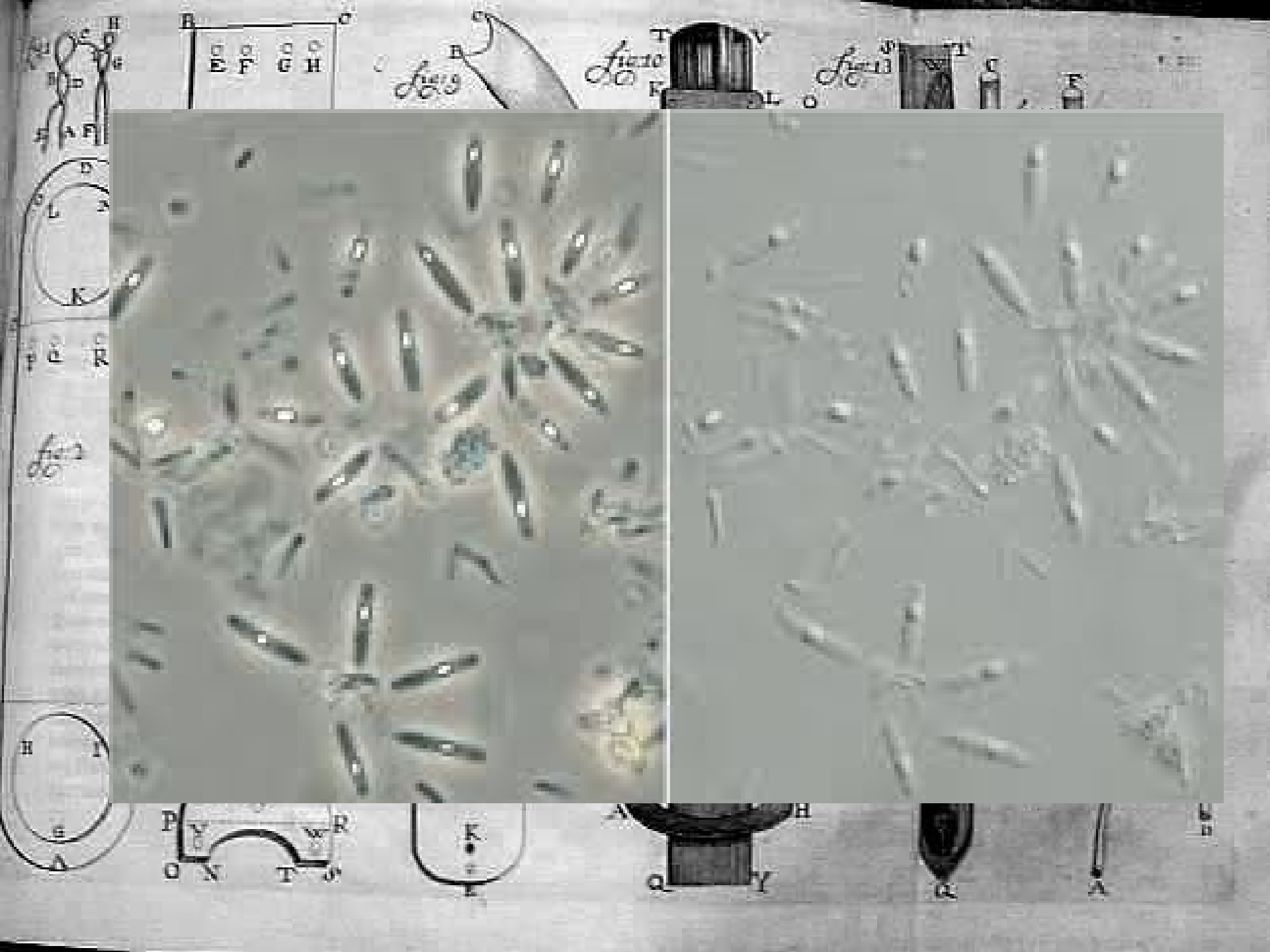
Takto se vytvoří i **dva nepatrně posunuté obrazy**, navzájem „kolmo polarizované“.

Oblasti obrazů s fázovým posunem (způsobeného fázovými objekty preparátu) se přesně nekryjí a **místa překryvu různého fáz.posunu jsou interferencí zviditelněna** změnou jasu či barevným obrysem, v závislosti na použití monochromatického / polychromatického světla.



Výhoda: citlivé i na velmi malou změnu optické dráhy paprsků

(optická dráha je součinem indexu lomu a geometrické dráhy paprsku v daném prostředí)



Polarizační mikroskop

- zviditelnění opticky aktivních nebo dvojlom vykazujících struktur
- Princip: spojení konvenčního mikroskopu a polarimetru.
- Optickou aktivitou se projevují i některé složky cytoplazmy i proudění cytoplazmy.

UV mikroskopie

- Princip: optika mikroskopu musí být z **křemenného skla** (dobře propouští UV). Obraz nepozorujeme okem, je zviditelněn na **luminiscenčním stínítku** a je fotografován.
- Kratší vlnová délka UV = **vyšší rozlišovací schopnost**, té obvykle ale dosaženo není. Optika má korigovány vady pro jedinou vlnovou délku – takovou, co je přítomna ve zdroji UV záření.
- Výhoda: přímé pozorování struktur propouštějících viditelné, ale **pohlcujících UV světlo** (bílkoviny, DNA).

Fluorescenční mikroskop

Mycobacterium phlei

Auramin-rodamin

Využívá schopnosti některých látek

po ozáření světlem o kratší vlnové délce emitovat viditelné světlo o delší vlnové délce.

Využito dlouhovlnné UV a přilehlá oblast viditelného spektra emitovaného halogenovými lampami.

UV světlu je přizpůsobena optika kondenzoru, zbytek optického systému totožný s běžným optickým mikroskopem.

Přidány filtry (bariérový) chrání lidské oko před zbytkovým UV.

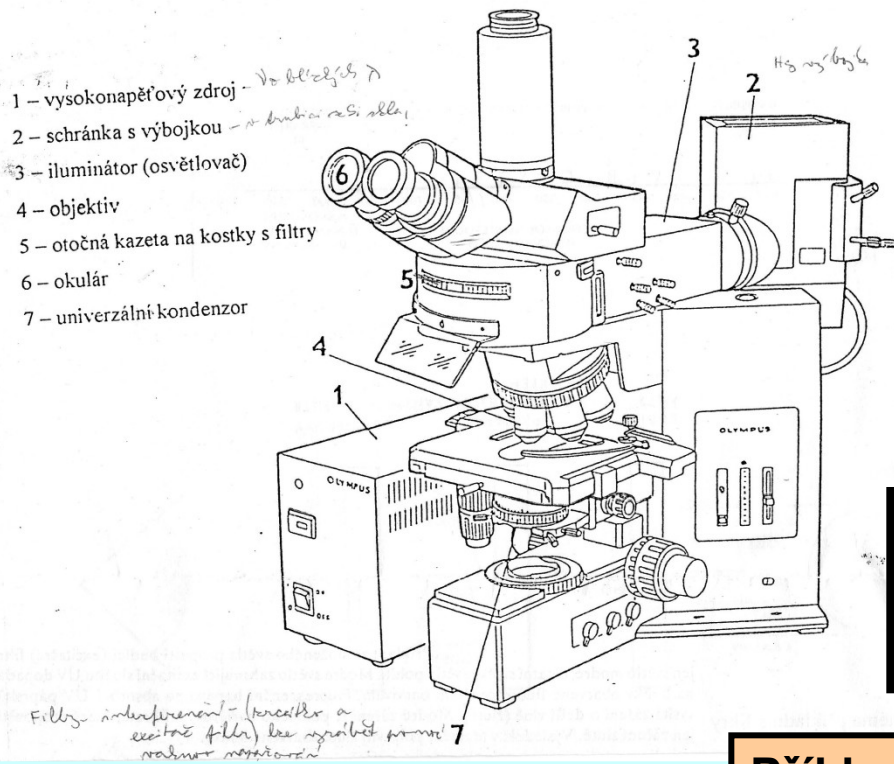
Fluorescenci vykazují:

někt. složky živé hmoty i bez obarvení (látky s aromatickým jádrem či heterocyklem – např. amk. tryptofan), většinu preparátů však barvíme fluorescenčními barvivy na zákl. specifické interakce s buněčnými strukturami. Mnohdy je fluorescenční barvivo (fluorochrom, fluorescenční sonda) navázáno na protilátku specifickou pro určitou bílkovinu v cytoplazmě, tak lze selektivně zviditelnit složky cytoskeletu eukaryotických buněk, chromatin, membránové bílkoviny apod.

- Fluorescein
- DAPI
- Calcofluor
- Akridinová oranž

Schéma a princip fluorescenčního mikroskopu

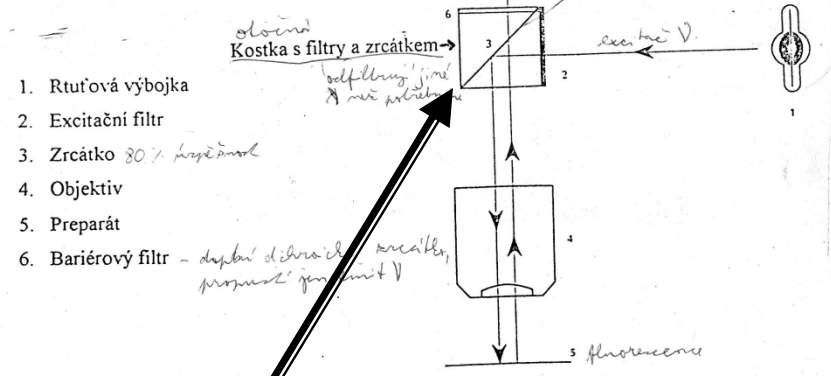
Schéma fluorescenčního mikroskopu Olympus



- 1 - vysokonapěťový zdroj
- 2 - schránka s výbojkou
- 3 - iluminátor (osvětlovač)
- 4 - objektiv
- 5 - otočná kazeta na kostky s filtry
- 6 - okulár
- 7 - univerzální kondenzor

Filtry interferenční - (précizní a excitace filtry) lze upravit pomocí volného nastavení

Schéma principu fluorescenční mikroskopie

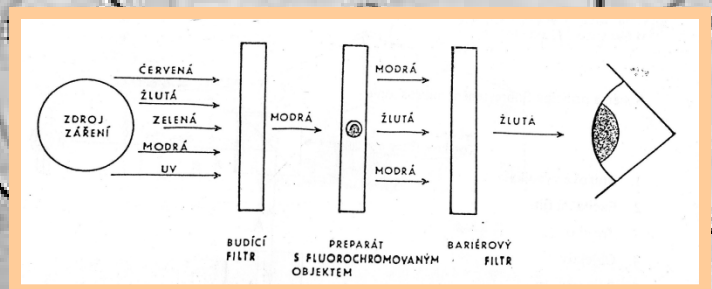


1. Rtuťová výbojka
2. Excitační filtr
3. Zrcátko 80% propětné
4. Objektiv
5. Preparát
6. Bariérový filtr - dýchá dle vlnové délky, propouští jen světlo V

Princip fluorescenčního mikroskopu
 Otočná kostka s filtry a zrcátkem.
 Zrcátko rozdělí excitační a emitované světlo

Příklad s filtry:

Složené světlo po průchodu excitačním filtrem redukováno na světlo modré, ost. pohlceno. Modré světlo dopadá na buňky s fluoresc. barvivem, to vysílá paprsky o delší vlně (žluté). Modré je pohlceno bariér.filtrem. **V temném poli svítí žluté buňky.**



Doposud zmiňované optické mikroskopy (**optický + varianty a speciální mikroskopy**) **vytvářejí obraz okamžitě, jako spojitý celek.**

Optické mikroskopy **vytvářející obraz postupně, z jednotlivých bodů (pixelů)**

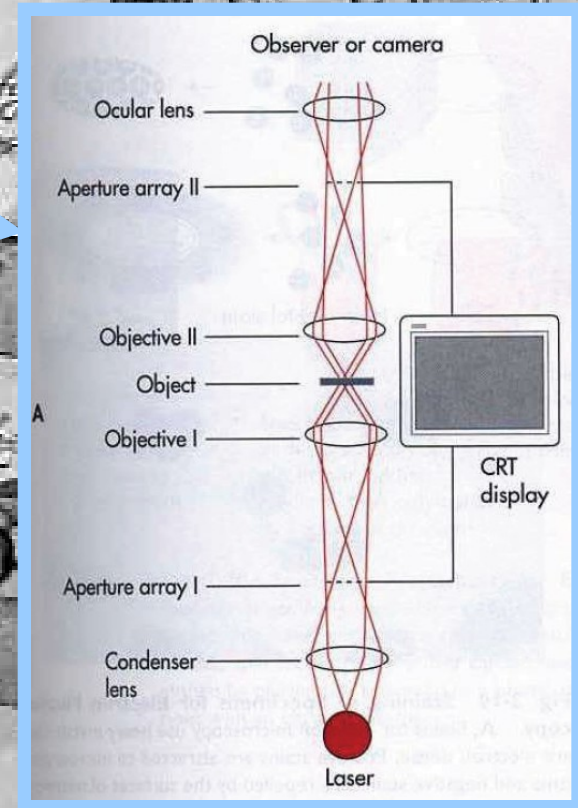
= **nesou informaci z úzkého světelného paprsku:**

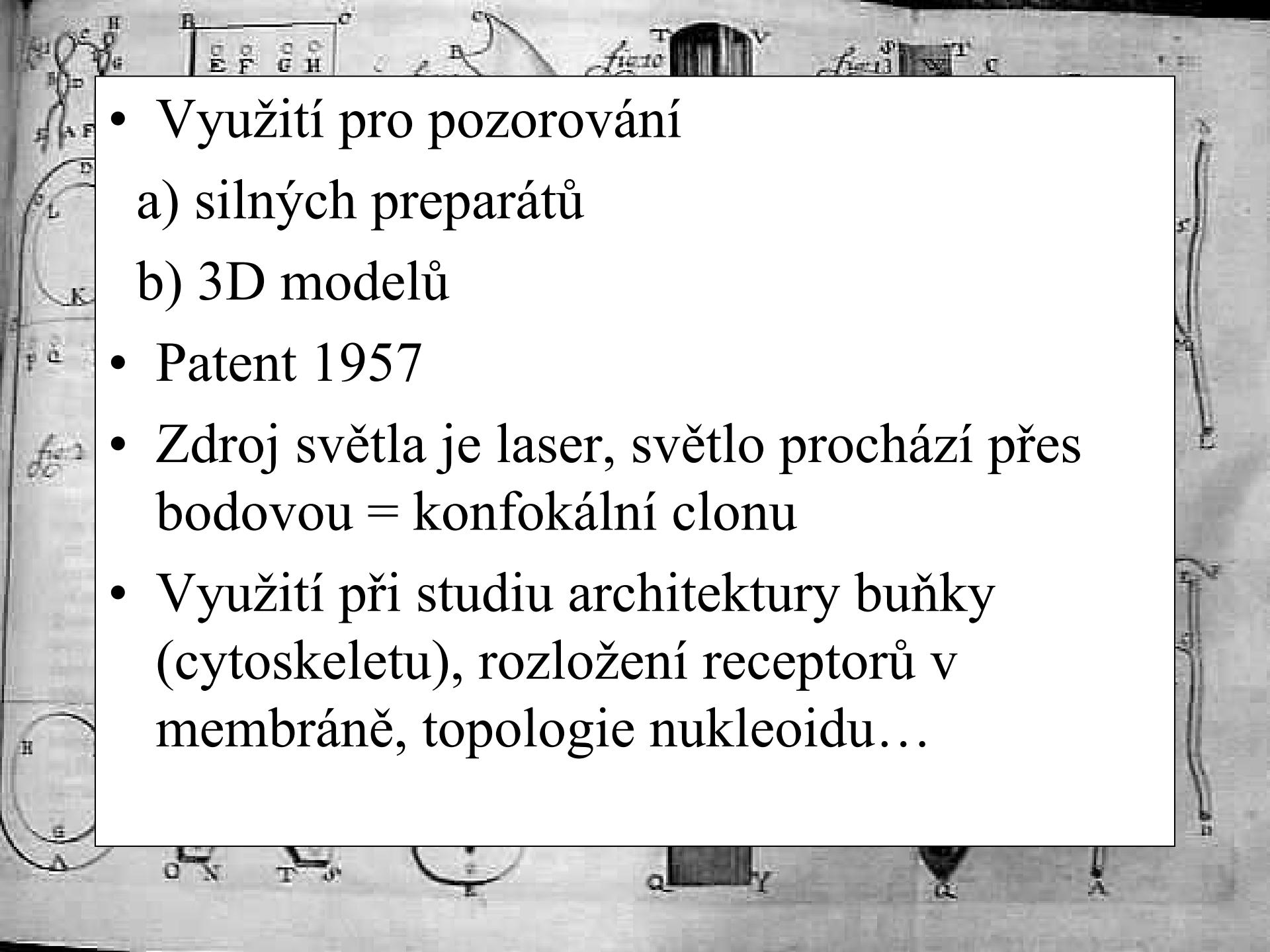
1. laserový řádkovací (rastrovací, skenovací) konfokální mikroskop

▪ Rušivé světlo z vrstev nad a pod rovinou ostrosti odstraněno z dráhy k detektoru zábranou s malým otvorem – **výsledek: perfektně ostrý obraz. Paprsek se po objektu posouvá a obraz jednotlivých bodů se skládá v PC. Posunem paprsku do jiné hloubky lze vytvořit optické řezy a skládat je do 3D obrazu.**

▪ Význam: možnost pozorování i relativně **silných preparátů**, včetně nativních.

▪ Konfokální mikroskop lze upravit i pro konfokální fluorescenční mikroskopii



- 
- The background of the slide features several scientific diagrams and a table. At the top left, there is a table with a grid of letters:

E	D	C	B
F	F	G	H

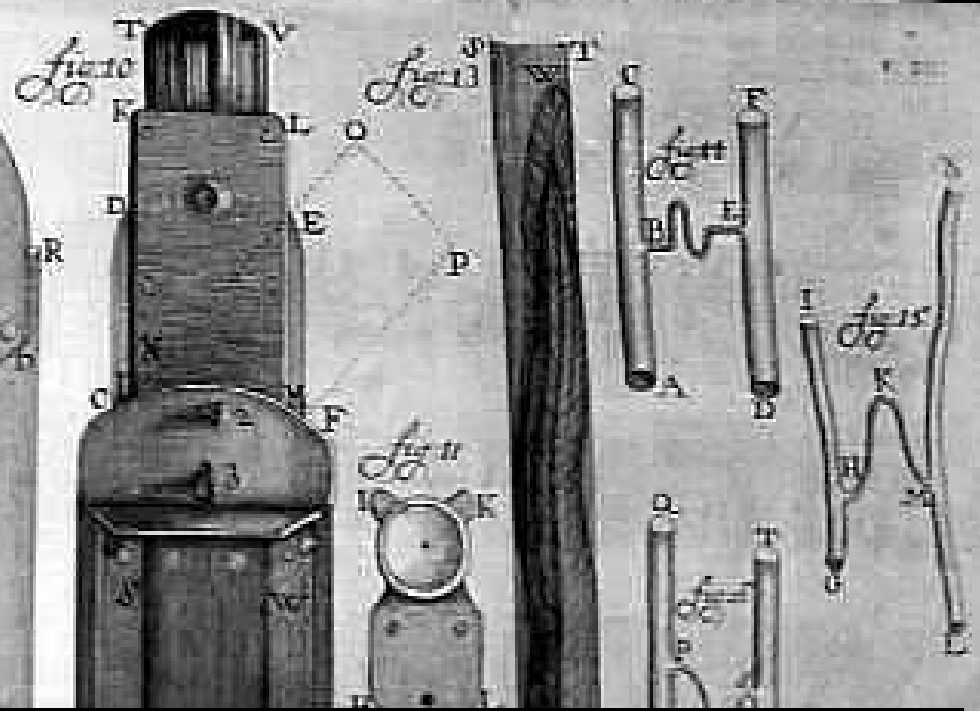
. To the right of the table are various diagrams, including a circular diagram with points labeled A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z. There are also some handwritten notes and labels like 'fig. 10' and 'fig. 11'.
- Využití pro pozorování
 - a) silných preparátů
 - b) 3D modelů
 - Patent 1957
 - Zdroj světla je laser, světlo prochází přes bodovou = konfokální clonu
 - Využití při studiu architektury buňky (cytoskeletu), rozložení receptorů v membráně, topologie nukleoidu...

2. barevný řádkovací mikroskop „s letící stopou“

- místo mechanického řádkovacího systému používá jasnou bílou světelnou stopu, která přebíhá po řádcích na obrazovce osciloskopu.
- Výhody: výborné rozlišení, vysoký kontrast (úpravou jasu zdrojové světelné stopy v závislosti na absorbanci preparátu)

3. optická skenovací mikroskopie v blízkém poli NFOS

- velmi úzký světelný paprsek prochází po řádcích velmi tenkým preparátem a jsou měřeny **změny jeho intenzity**.
- Výhody: rozlišení **10 – 100x vyšší** než u klasického světelného mikroskopu. Výhodou oproti elektronové mikroskopii (viz dále) je, že vzorek **nemusí být umístěn ve vakuu** ale lze jej pozorovat např. ve vodném prostředí.



Ernest Ruska

Německý vědec

nositel Nobelovy ceny (1986)

za objev elektronového
mikroskopu (1931)

Elektronová mikroskopie (EM)

- Zobrazení předmětů pomocí **urychlených elektronových svazků** – elektrony mají vlnovou délku de Broglieových hmotnost.vln
- Urychlením lze dosáhnout stotisíckrát kratších vlnových délek
Rozlišovací schopnost pak ($\sigma = \lambda / n \cdot \sin \alpha$): velmi malá λ
- Vlivem velkých optických vad použitých čoček (**magnetické**)

poměrně **malá numerická apertura**
– řádově setiny.

Rozlišovací mez: desetiny nm

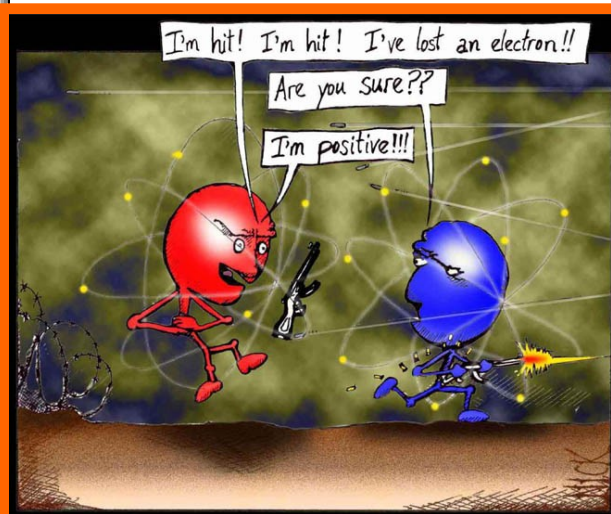
Dělení EM dle způsobu
zobrazování

transmisní

emisní

odrazové (v praxi málo
používané)

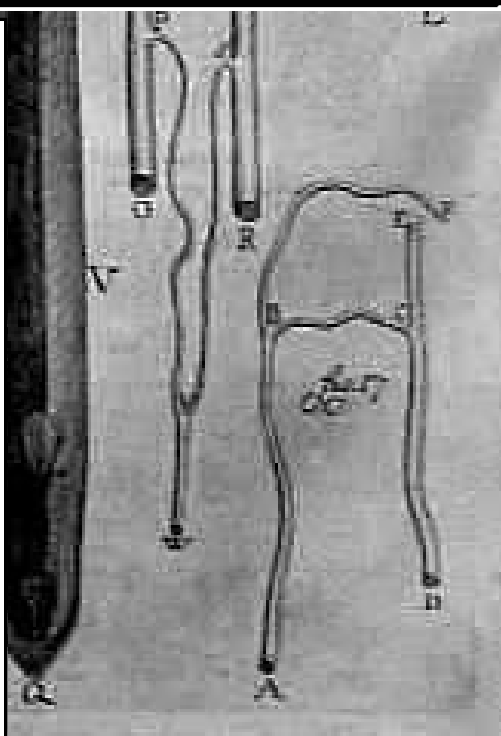
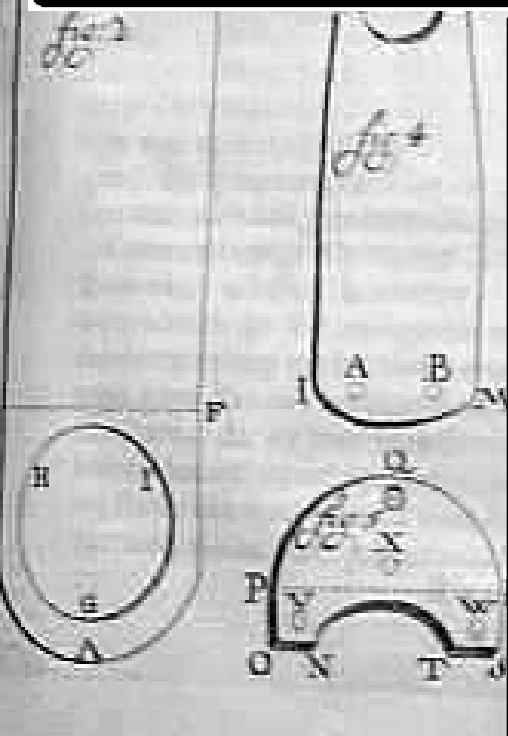
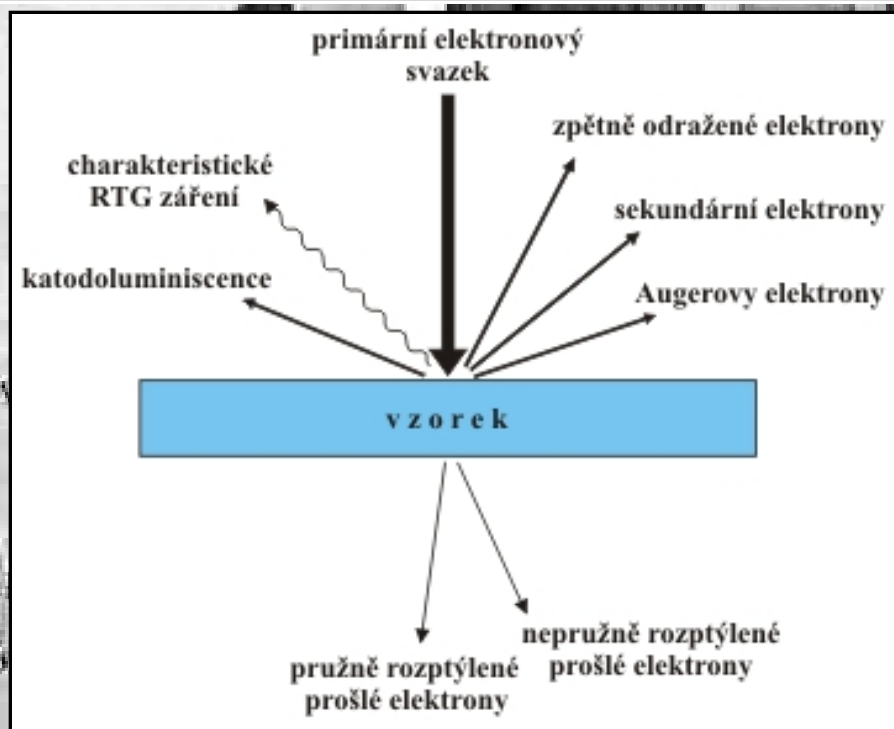
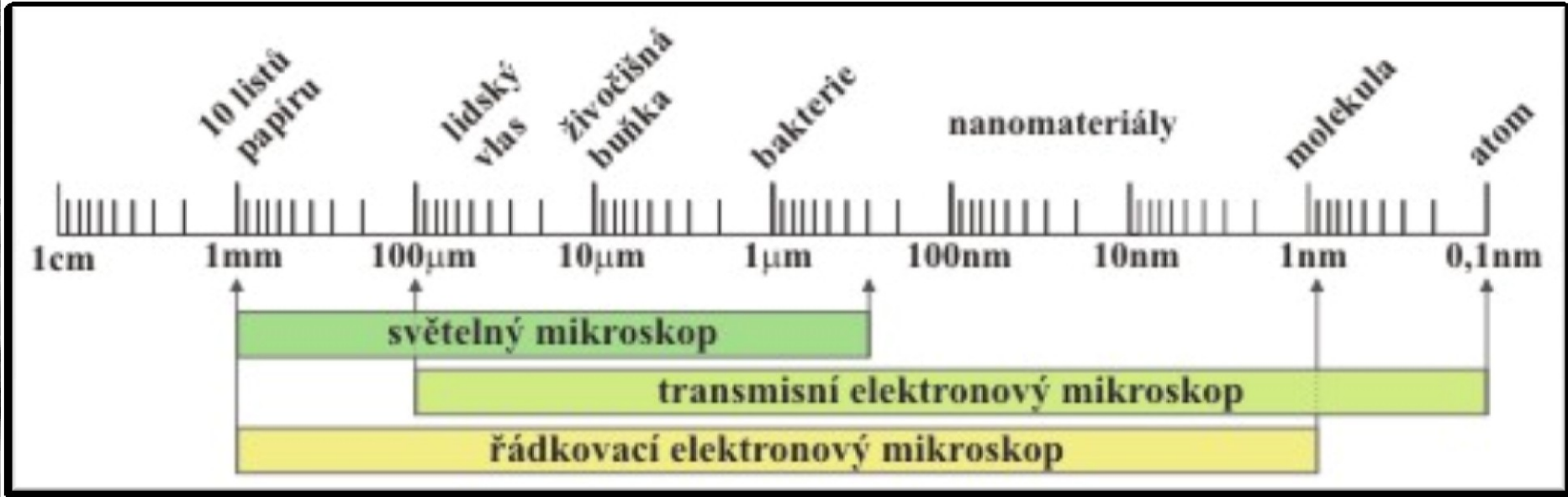
řádkovací (skenovací či
rastrovací)

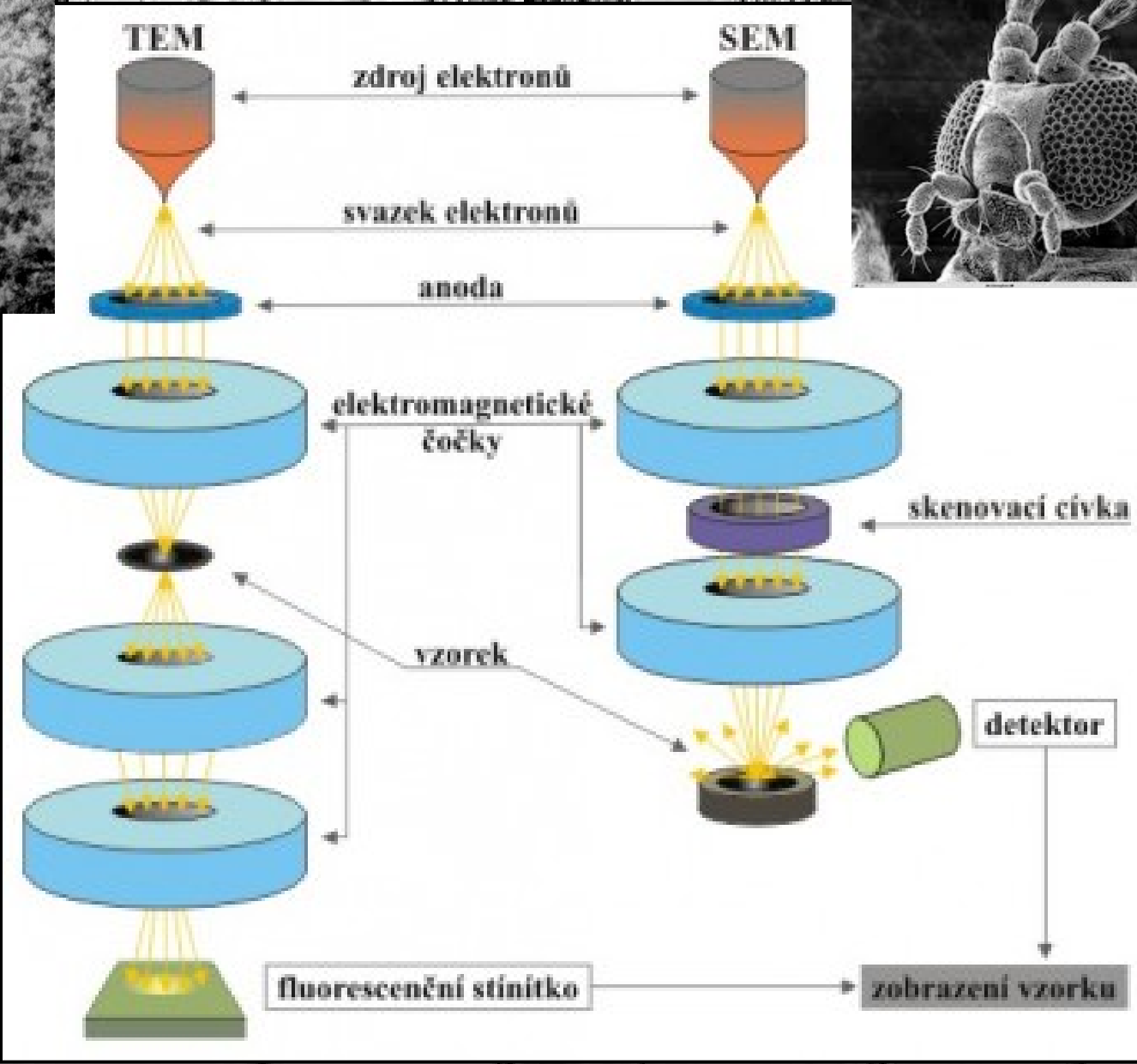
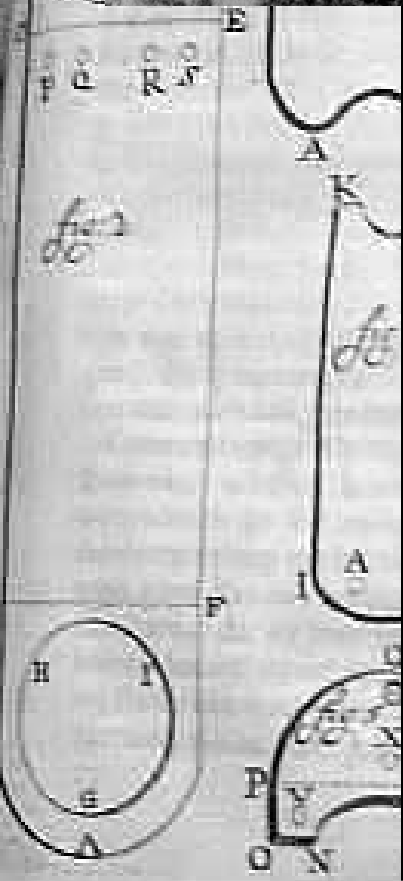
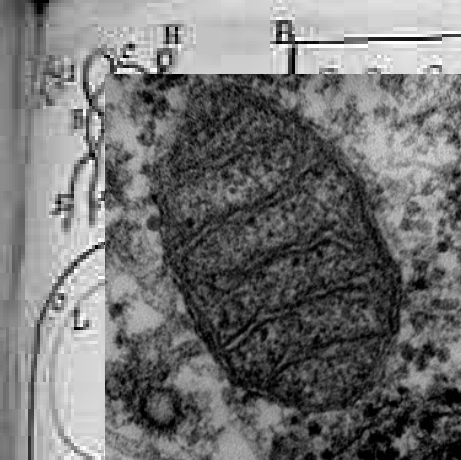


Another casualty in the War of the Atoms.



Elektronový mikroskop





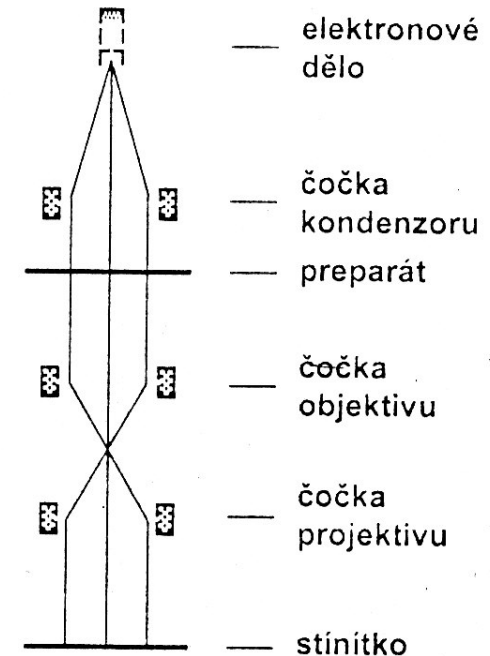
Transmisní elektronový mikroskop (TEM)



Pomocí TEM lze studovat vznik, vlastnosti a vzájemné působení jednotlivých poruch krystalové struktury vzorků.

Transmisní elektronový mikroskop (TEM)

- V biologické praxi:
Z 5 000 - 100 000
rozlišení: **desetiny nm** (větší molekuly)
- Struktura objektu: průchodem el.svazku
- Elektronový paprsek: ze **žhaveného kovového vlákna**
- Proti rozptylu elektronů: v tubusu EM **vysoké vakuum**
- Čočky vytvářeny obvykle rotačně symetrickým **elmag. polem**
- Konečný obraz pozorujeme **nepřímo, projekcí na luminiscenční stínítko**



Nevýhody: speciální postupy pro fixaci a barvení; vakuum; vysoký tlak, jako „barviva“: soli a oxidy těžkých kovů, nutno rozlišit artefakty vzniklé zpracováním preparátu.



Procházející elektrony se zachycují a obraz se zvětší a fotografuje.

Metoda umožňuje pozorovat

detaily buňky a virových částic.

Ke kontrastnímu znázornění zvýraznění struktur se používá **negativní barvení** solemi těžkých kovů,

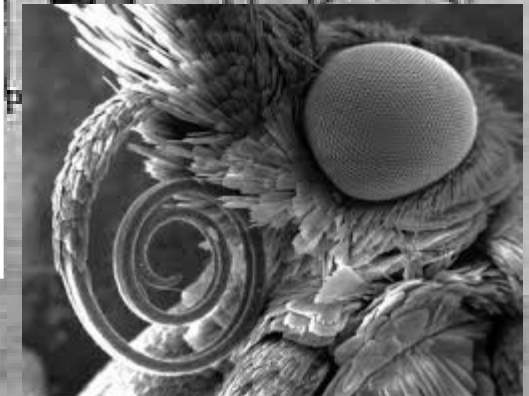
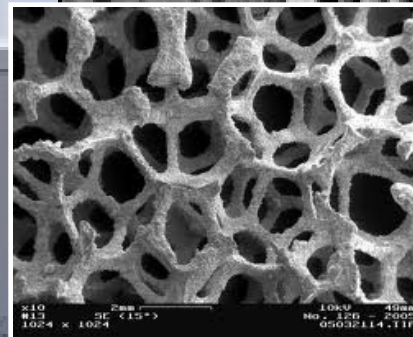
které **nepropuštějí elektrony** například uranyl acetát, molybdenan amonný.

Rastrovací elektronová mikroskopie

(skenovací, řádkovací, Scanning Electron Microscope - SEM)



Popularita SEM pramení z možnosti získat obrázky povrchů širokého spektra materiálů, které jsou navíc jednoduše interpretovatelné.



Rastrovací elektronová mikroskopie

(skenovací, řádkovací, Scanning Electron Microscope - SEM)

- velmi úzký **paprsek elektronů** je vychylovacím systémem nucen **přejíždět po povrchu preparátu** po řádcích
- Rozlišovací schopnost SEM o 1-2 řády menší než TEM, ale **možnost pozorování objektů s komplikovanou 3D strukturou** (signál totiž nese informaci o sklonu povrchu v místě dopadu svazku elektronů) **výsledkem je obraz s vysokou hloubkou ostrosti**

Nevýhody: pokovování povrchu preparátu, složitá fixace.

Problém rozlišení artefaktů vzniklých zpracováním preparátu



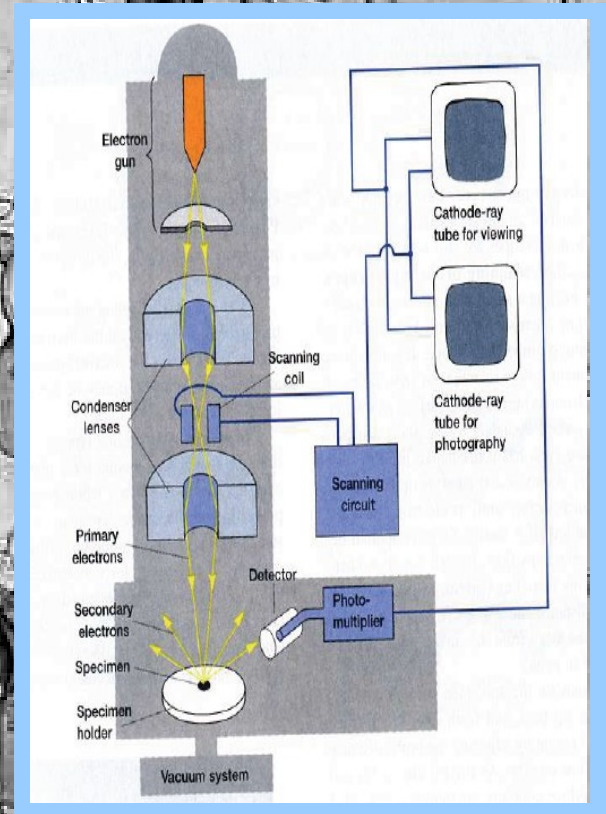
Rastrovací elektronová mikroskopie
znázorňuje povrch objektu (bakterie, viru,
leukocytu),

tence potaženého paprskem iontů kovu,
například platiny.

Protože se pokovuje pod ostrým úhlem, v
místech, **kde se kovové ionty nedostanou**
vznikají stíny. Výsledkem je plastický
trojrozměrný obraz.

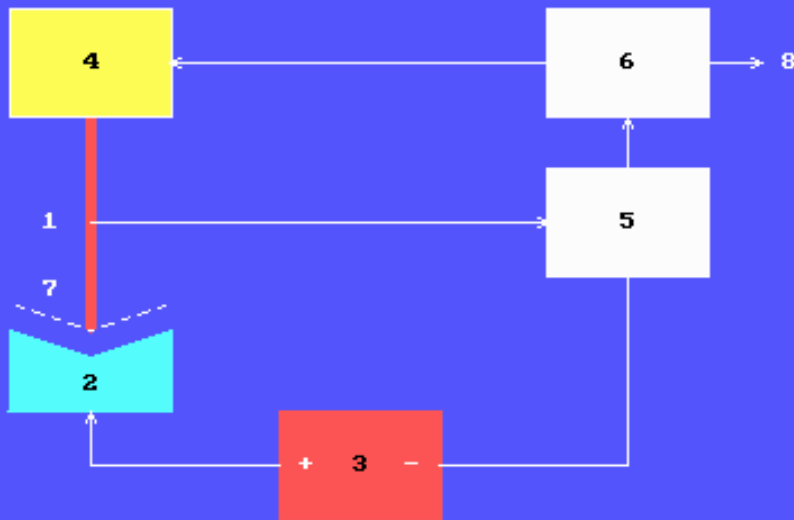
Skenovací tunelová elektronová mikroskopie (scanning tunneling electron microscopy, STM)

- Nad povrchem preparátu se pohybuje velmi tenký kovový hrot, ke kterému „tunelují“ elektrony z povrchu preparátu (tunelový efekt – jev kvantové mechaniky, kdy částice pronikají oblastí, na překonání níž by dle zákonů klasické mechaniky neměli dostatek energie)
- Zobrazuje se elektronová hustota na povrchu preparátu s rozlišením na úrovni rozměrů atomů.
- Výhody: Vzorky nemusí být ve vakuu, ale např. i ve vodném prostředí.



Vynalezen v laboratořích
IBM v Zürichu G.
Binnigem a H. Rohrerem
r.1980

ŘÁDKOVACÍ TUNELOVÝ MIKROSKOP

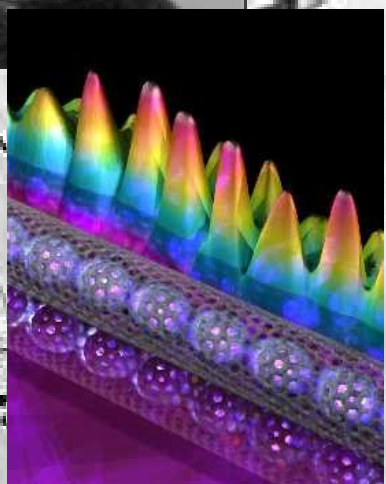
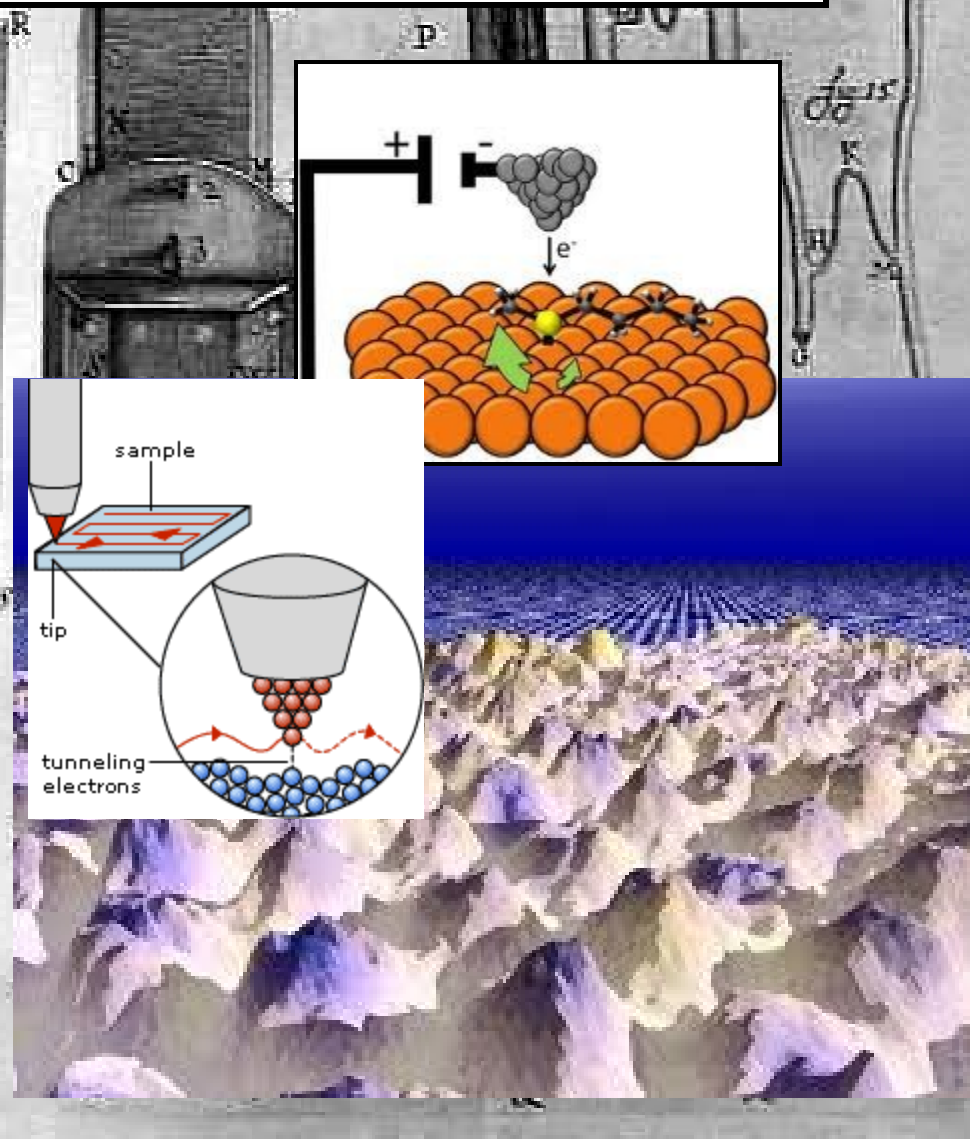
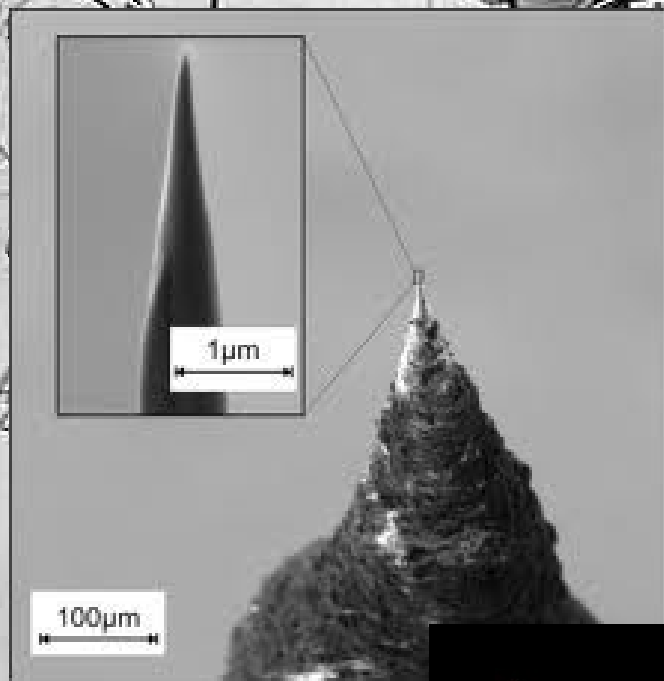


- 1) **jehla** s extrémně ostrým hrotem (pohybovat v řádcích - nanometry)
- 2) Na hrot je ze **zdroje 3)** přiloženo **elektrické napětí** vzhledem ke vzorku, jež může díky tunelovému efektu odsávat elektrony.
- 4) Výška hrotu nad vzorkem nastavována **piezoelektrickým systémem**

5) Proud snímaný jehlou měřen citlivým **měřidlem 5)** a je využit k tomu, aby se pomocí **regulátoru 6)** udržovala výška hrotu nad povrchem vzorku konstantní, jak je vyznačeno na obrázku čárkovanou křivkou 7) Hrot tak s extrémní přesností mapuje výškový profil vzorku. Další zpracování je pak záležitostí **počítače 8)**.

System je schopen rozeznat jednotlivé atomy na povrchu vzorku.

Skenovací tunelová elektronová mikroskopie (scanning tunneling electron microscopy, STM)



Akustická mikroskopie

UFM – Mikroskopie ultrazvukových sil

akustický mikroskop – zařízení, které vysílá na vzorek řádkovacím způsobem ultrazvukový signál, odezvu převádí na elektrický signál a na monitoru prezentuje rekonstruovaný videoobraz

- Hyperzvuk proniká v kapalinách i pevném prostředí do hloubky jednotek až desítek mikrometrů.
- Pozorování preparátů **neprostupných pro elektrony** a viditelné světlo.
- Informace o mechanických vlastnostech prostředí.

Barvení buněk



- **Gramovo barvení** – barvení bakterií jako identifikační metoda

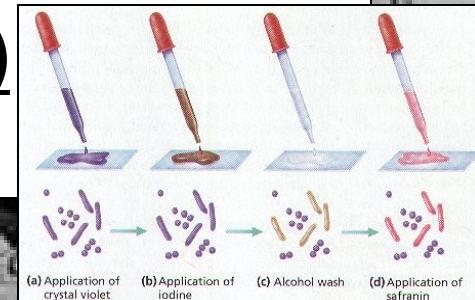
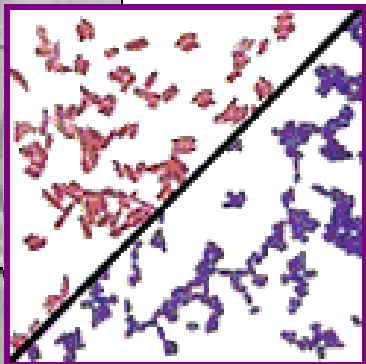
- Hans Christian Joachim Gram (1884)

1) Bazické barvivo --- 2) voda ----

3) Lugolův fixační roztok --- 4) voda ---

5) aceton, ethanol --- 6) voda ---

7) safranin (dobarvení)



Gramnegativní typ buněčné stěny:

peptidoglykan 10%, 2nm, porózní výplň mezi cytoplazmatickou membránou a vnější membránou. Barvivo se v porózní vrstvě nenaváže, odmyvá se.

Grampozitivní typ buněčné stěny:

peptidoglykan 40nm, 90%, hydrofobní struktura. Mezi polymerem je voda. Do hydratované vrstvy se dostává barvivo krystalové violeti, Lugolův roztok fixuje přímo na strukturách. Organické rozpouštědlo poté dehydratuje vrstvu. Barvivo zůstává pevně vázáno, **nedobarví se dál safraninem.**

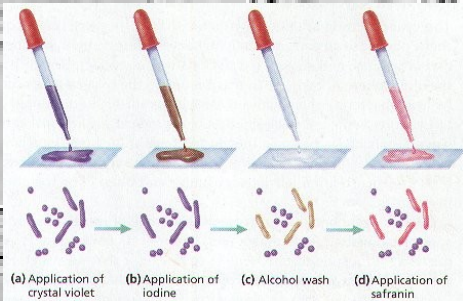
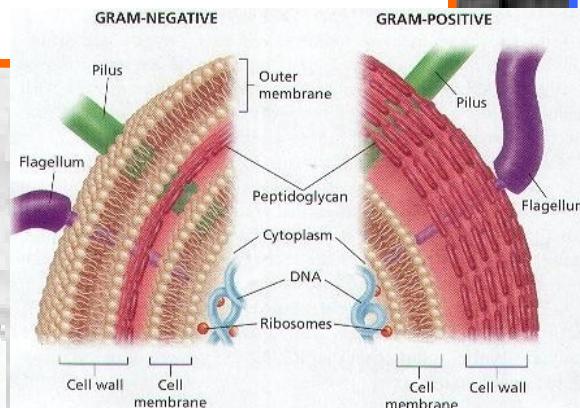


Table 2-1 Comparison of Various Types of Microscopes

Type of Microscope	Maximum Useful Magnification	Resolution	Description
Brightfield	<u>1,500×</u>	100–200 nm	Extensively used for the visualization of microorganisms; usually necessary to <u>stain</u> specimens for viewing
Darkfield	1,500×	100–200 nm	Used for viewing <u>live microorganisms</u> , particularly those with characteristic morphology; staining not required; specimen appears bright on a dark background
Ultraviolet	2,500×	100 nm	Improved resolution over normal light microscope; largely replaced by electron microscopes
Fluorescence	1,500×	100–200 nm	Uses fluorescent staining; useful in many <u>diagnostic procedures</u> for identifying microorganisms
Phase contrast	1,500×	100–200 nm	Used to <u>examine structures</u> of living microorganisms; does not require staining specimens
Nomarski differential interference	1,500×	100–200 nm	Used to examine structures of microorganisms; produces sharp, multicolored image with <u>three-dimensional appearance</u>
Confocal	1,500×	100–200 nm	Used to examine structures of microorganisms and individual microorganisms within mixtures of various types of microorganisms; uses fluorescence staining; produces blur-free image; used to produce three-dimensional images
Transmission electron (TEM)	<u>500,000–1,000,000×</u>	<u>1–2 nm</u>	Used to view ultrastructure of microorganisms, including viruses; much greater resolving power and useful magnification than can be achieved with light microscopy
Scanning electron (SEM)	10,000–1,000,000×	<u>1–10 nm</u>	Used for showing detailed surface structures of microorganisms; produces a three-dimensional image

Obrazová dokumentace a zpracování obrazu

- Zařízení
- Kompresce a formáty obrazu
- Pojmy
- Programy - analýza obrazu (LUCIA, NIS)

Zajímavé adresy a odkazy

- <http://www.gate2biotech.cz/nejdokonalejsi-elektronovy-mikroskop-ve-sluzbach-ustavu-molekularni-genetiky-av-cr/>
- <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/bacteriacell.html>
- <http://www.micro-scope.de/toc.html>
- <http://w3.uniroma1.it/MEDICFISIO/microscopy.htm>
- <http://www.euronet.nl/users/warnar/leeuwenhoek.html>



Děkuji za pozornost

Zdroje:

- Campbell N.A. a kol. (2006): Biologie, Computer press, Brno
- Dušan Matis a kolektiv: Mikroskopická technika. Skriptum PřF Univerzity Komenského, 1993
- Jaromír Plášek: Nové metody optické mikroskopie. Skriptum Fyzikálního ústavu Univerzity Karlovy
- **Hrazdira.I., Mornstein V. (2001): Lékařská biofyzika a přístrojová technika, Neptun, Brno**
- Rosypal a kol. (1999): Úvod do molekulární biologie, Brno