

Téma 04_Mikroskopické techniky



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU



NÁRODNÍ
PLÁN OBNOVY

MR
MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

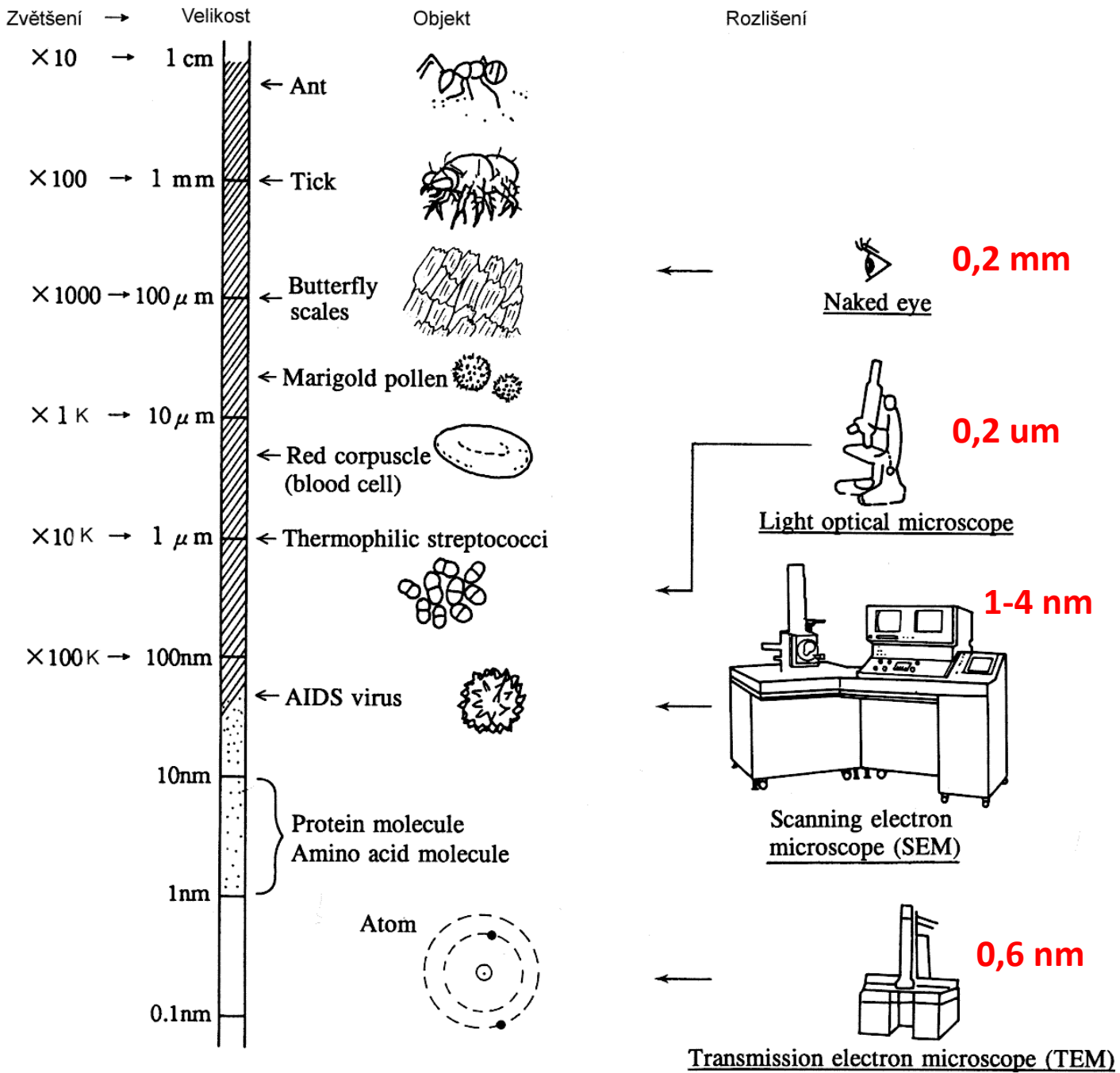
Mikroskopické (pozorovací) techniky

Světelná mikroskopie

- diagnostika bakterií
- virologické studie – detekce CPE, imunofluorescence
- tkáňové preparáty, cytochemie, histochemie

Elektronová mikroskopie

- hlavně pro diagnostiku virů
- pokročilé morfologické studie bakterií



Světelná mikroskopie

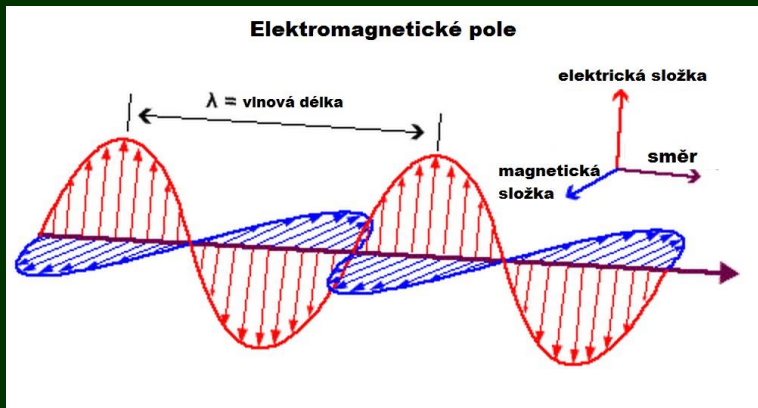
Světelná mikroskopie umožňuje pozorovat objekty, které již naše oko nedokáže rozlišit (rozlišovací schopnost, tedy schopnost rozeznat 2 u sebe ležící body, je u člověka 0,25mm). Rozlišovací schopnost světelné mikroskopie je přibližně 0,25 μm , což je dáno vlnovou délkou záření, které mikroskopem prochází (v tomto případě světlo, proud fotonů), ale také vlastnostmi objektivu (viz dále). Rozlišovací schopnost světelné mikroskopie je tedy 1000 krát větší, než rozlišovací schopnost lidského oka. Maximální užitečné zvětšení, kterého lze ve světelné mikroskopii dosáhnout, je až 2000 krát u speciálních mikroskopů. Pro vyšší úroveň detailu se využívá elektronová mikroskopie nebo mikroskopie atomárních sil.

Světelná mikroskopie: techniky přípravy mikroskopických preparátů
způsoby registrace pozorovaných objektů

Využití též v histochemii a cytochemii

Základy optiky

Světlo: příčné elektromagnetické vlnění



Vlnová délka

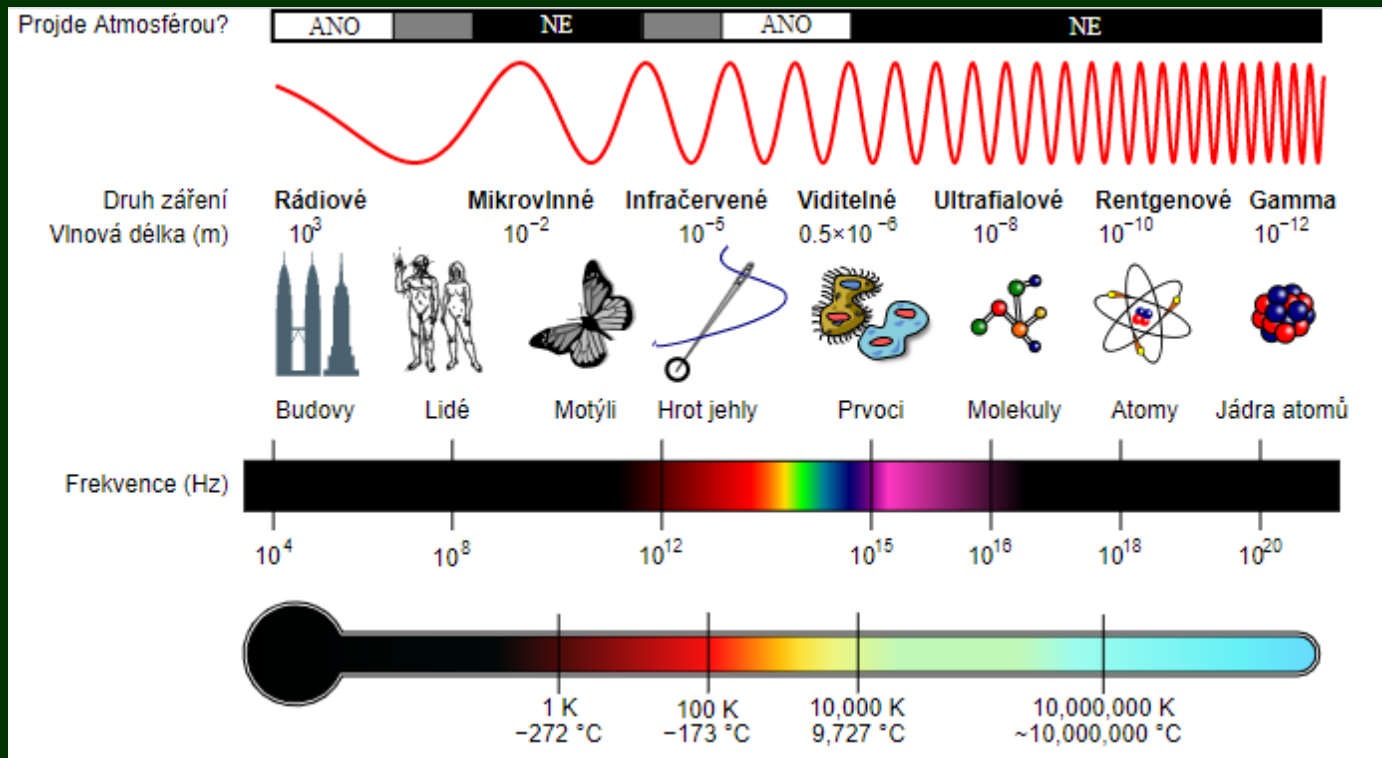
Amplituda vlny – intenzita světla

Bílé světlo

(polychromatické)

Barevné filtry

(monochromátory,
monochromatické
světlo)

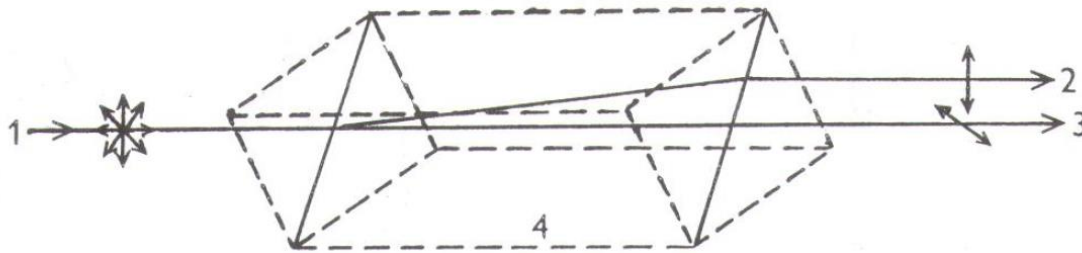
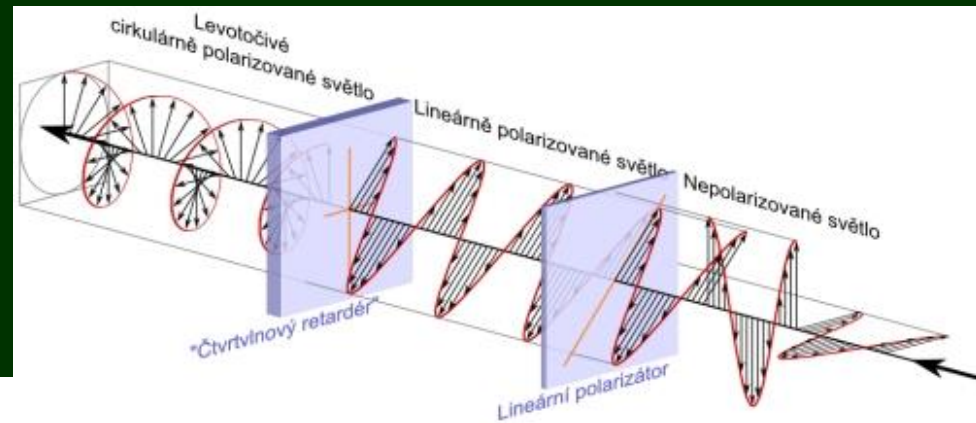


Nepolarizované záření

- vektor E kmitá v každém místě a v průběhu času ve všech možných směrech kolmých na směr šíření paprsku

Polarizované záření

- vzniká průchodem nepolarizovaného paprsku dvojlomným tělesem (např. krystalem islandského vápence)
- dochází k rozložení na dva paprsky polarizované, kmitající jen v jedné rovině, přičemž rovina kmitů (vlnění) jednoho z nich je kolmá k rovině kmitů druhého.



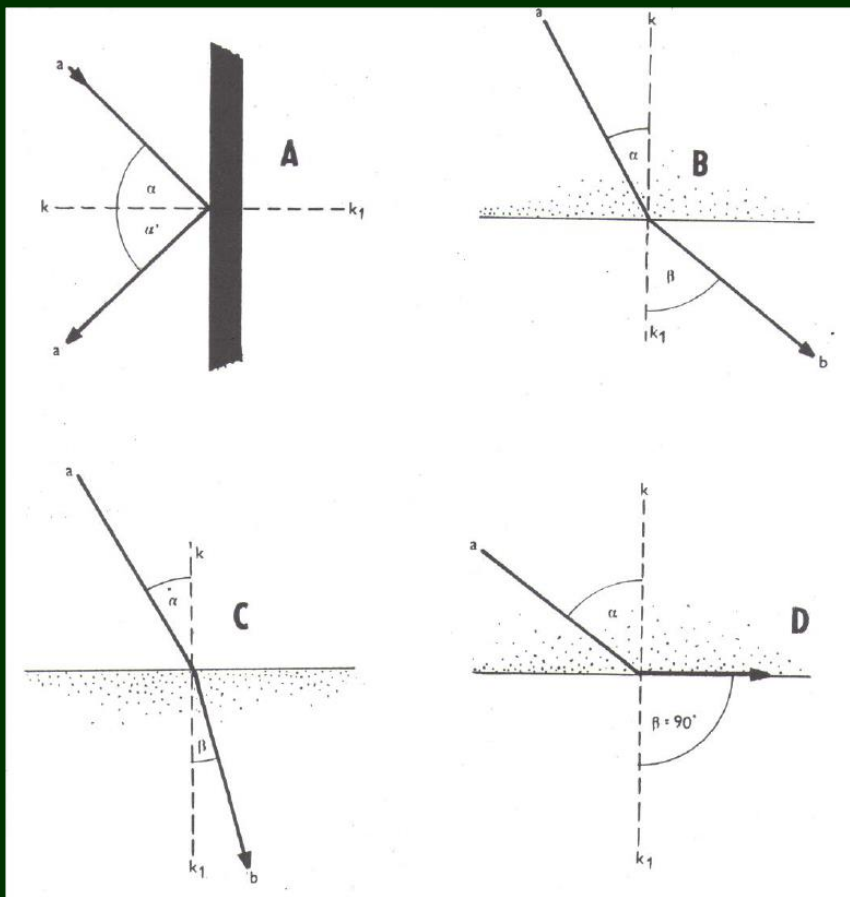
Obr. 2:

Vznik lineárně polarizovaného světla v krystalu islandského vápence

(1 = přirozené světlo, 2 = polarizovaný paprsek s vertikálním směrem kmitu, 3 = polarizovaný paprsek s horizontálním směrem kmitu, 4 = dvojlomný krystal).

Odraz a lom světla

Vzhledem k malé vlnové délce světla se šíří světlo v homogenním prostředí přímočaře
Na rozhraních dvou opticky různých prostředí (např. vzduchu a skla) nastává odraz nebo lom



Zákon odrazu

-na rovinném rozhraní 2 opt. prostředí se dopadající paprsek odráží tak, že úhel dopadu = úhlu odrazu, odražený paprsek zůstává v rovině určené dopadajícím paprskem a kolmicí dopadu

Zákon lomu

-proniká-li paprsek z jednoho optického prostředí do druhého a je-li nové prostředí jednolomné (izotropní), setrvává v rovině dopadu, ale vychýlí se z původního směru
-z prostř. opt. řidšího do hustšího = lom ke kolmici dopadu
-z prostř. opt. hustšího do řidšího = lom od kolmice dopadu

Je-li úhel lomu = 90° , pak úhel dopadu je tzv. mezní úhel

Je-li úhel dopadu $>$ mezní úhel, vzniká úplný odraz světla (tedy úhel lomu je $> 90^\circ$)

Optická hustota prostředí

- označuje se jako index lomu (N)
- stanovuje se refraktometrem

Indexy lomu různých prostředí (pro bílé světlo)

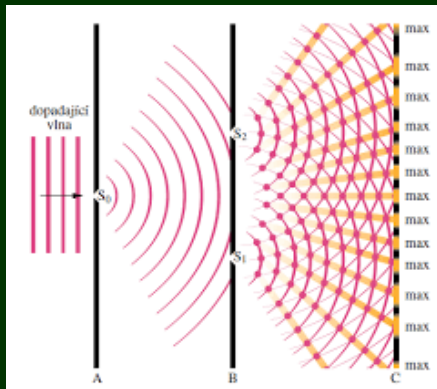
<i>Prostředí</i>	<i>N</i>	
vzduch (vakuum)	1,00	
krytal NaCl	1,54	
voda	1,33	
korunové sklo	1,61	
křemenné sklo	1,46	preparáty
flintové sklo	1,58	
diamant	2,42	
kanadský balzám	1,50	uzavírací médium
cedrový olej	1,52	imerze

Disperze (rozklad) světla

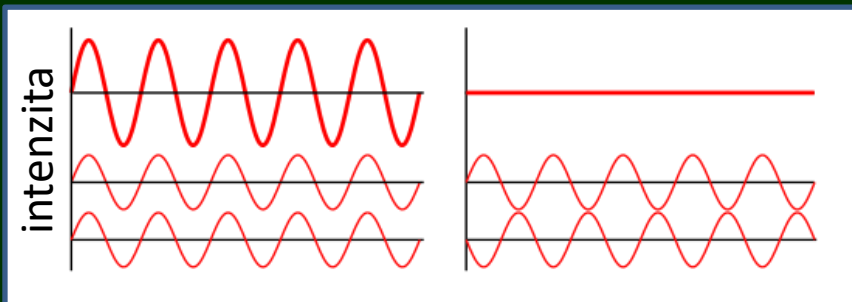


- závislost hodnot indexu lomu opt. prostředí na vlnové délce světla
- v rozdílných prostředích je disperze různá
- skleněný hranol: paprsky kratší vln. délky se lámou více než paprsky delší vln. délky
- vznik spektra (rozklad bílého světla na monochromatické složky)

Interference světla

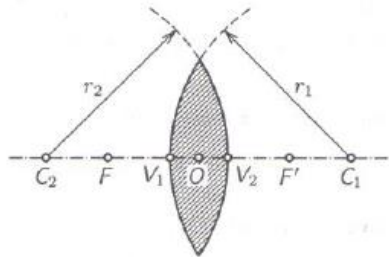


- koherentní světelná vlnění schopna interferovat (splývat v jeden světelný tok) získáváme jen ze světelných toků vycházejících z jediného zdroje světla
- interference nastane, když světlo určitého zdroje odrazem (zrcadly) nebo lomem (hranoly) vhodně rozdělíme a v určité vzdálenosti obdobným způsobem opět spojíme
- výsledek skládání (interference) je různý dle toho, setkají-li se paprsky o stejné fázi nebo paprsky s fází vlnění různě posunutou

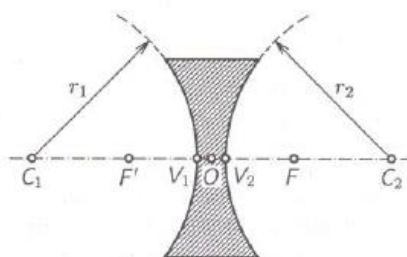


Čočky

- průhledná (nejčastěji skleněná) tělesa, omezená vypouklými (konvexními) nebo vydutými (konkávními) plochami
- spojky, rozptylky



6-41 Vyznačení základních pojmů u spojky



6-42 Vyznačení základních pojmů u rozptylky

Poloměry křivosti optických ploch r_1, r_2 — poloměry kulových ploch, které ohraničují čočky.

Optická osa čočky — přímka procházející středy C_1 a C_2 .

Vrcholy čočky V_1, V_2 — průsečky optické osy s optickými plochami. Vzdálenost $|V_1V_2|$ je šířka čočky.

Optický střed čočky O — střed úsečky V_1V_2 . U tzv. tenké čočky body V_1, V_2, O jsou velmi blízko sebe, šířka čočky je zanedbatelná vzhledem k průměru čočky.

Předmětový prostor — prostor, ze kterého světlo do čočky vstupuje (např. zleva).

Obrazový prostor — prostor, do kterého světlo po průchodu čočkou vystupuje (např. doprava).

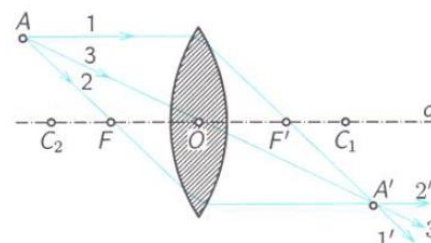
Obrazové ohnisko F' — obraz předmětového osového bodu, který je nekonečně daleko od čočky v předmětovém prostoru. U spojky je F' skutečné, u rozptylky neskutečné.

Obrazová ohnisková vzdálenost f' — vzdálenost $|F'O|$.

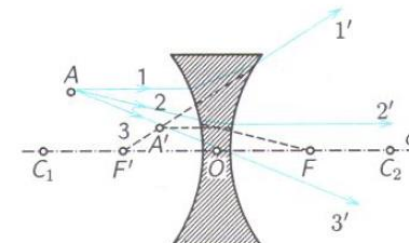
Předmětové ohnisko F — má obraz v obrazovém prostoru v osovém bodě, který je v nekonečnu.

Předmětová ohnisková vzdálenost f — vzdálenost $|FO|$.

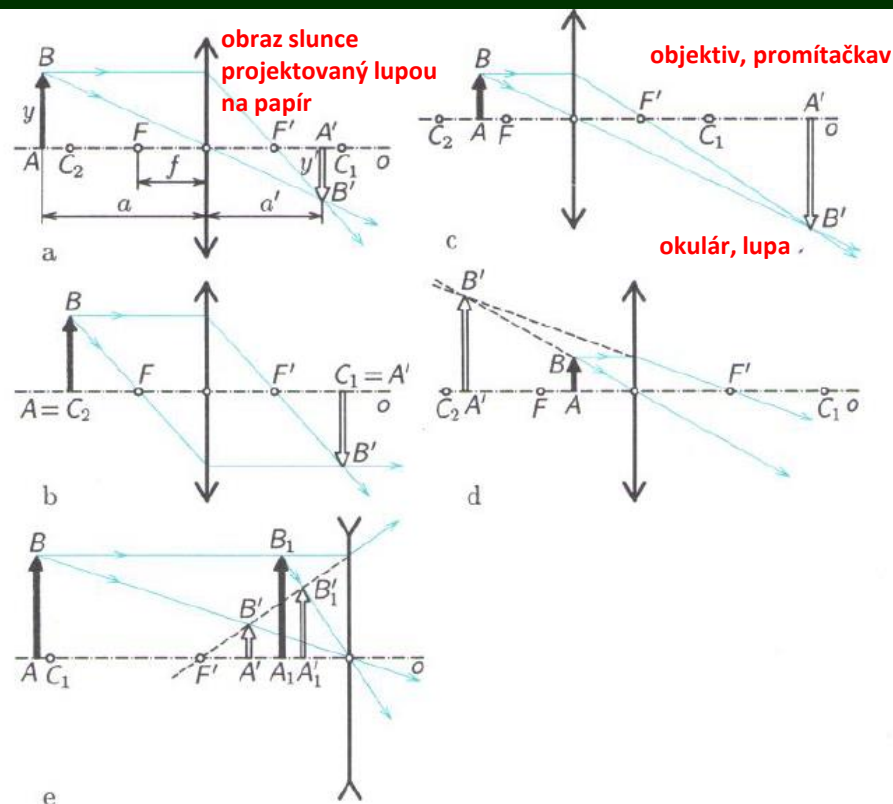
Ohnisková rovina (předmětová, obrazová) — rovina kolmá na optickou osu a procházející ohniskem (F, F').



6-43 Lom tří významných paprsků spojkou



6-44 Lom tří významných paprsků rozptylkou



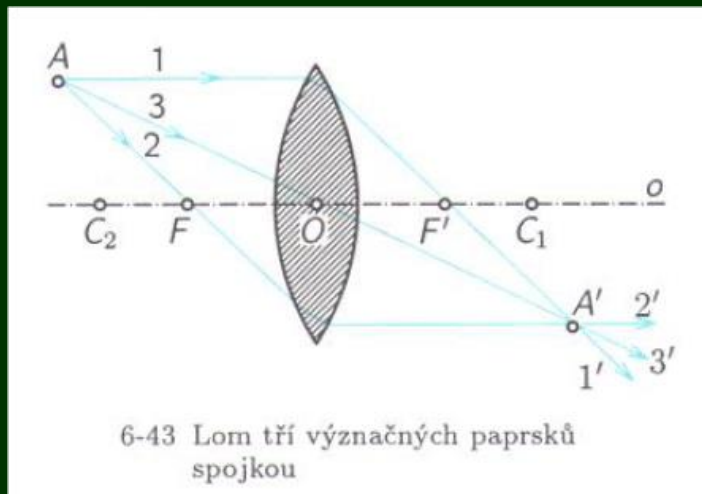
6-45 Zobrazení předmětu spojkou (a–d) a rozptylkou (e)

Hranoly

- skleněné doplňky optických systémů v mikroskopech ke změně chodu světelných paprsků pod různými úhly, k rozdělení paprsků, nebo difrakci světla
- dle potřeby jsou jejich plochy pod různými úhly vybroušené, nejčastěji průměr ve tvaru rovnostranného trojúhelníku
- hranoly z islandského vápence (nikoly) k vytváření polarizovaného světla

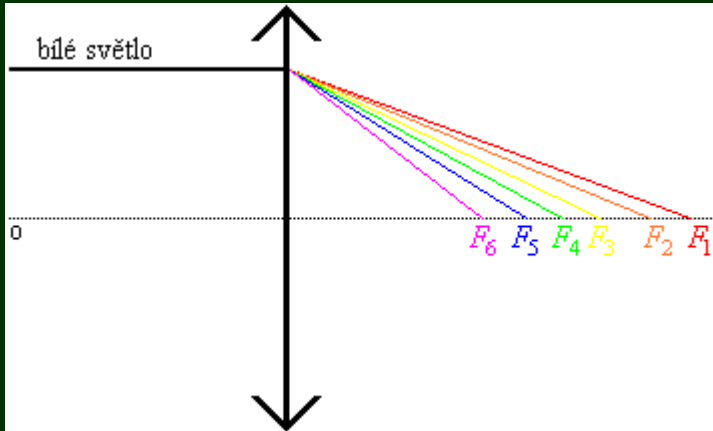
Geometrie zobrazování spojkou

- pro zjednodušení chod paprsků za přímočarý
- tři důležité paprsky:
 - a) rovnoběžný s optickou osou (na povrchu čočky se láme do obraz. ohniska) (1)
 - b) procházející středem čočky (neláme se, paprsek hlavní) (3)
 - c) procházející předmětovým ohniskem (láme se rovnoběžně s optickou osou) (2)

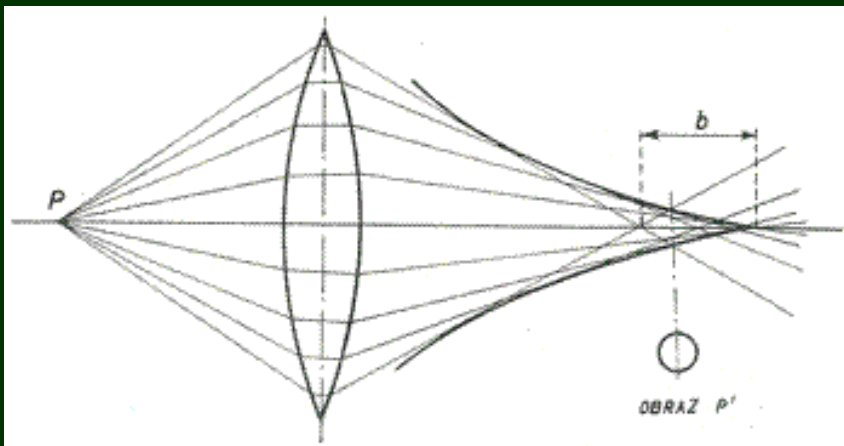


Vady čoček

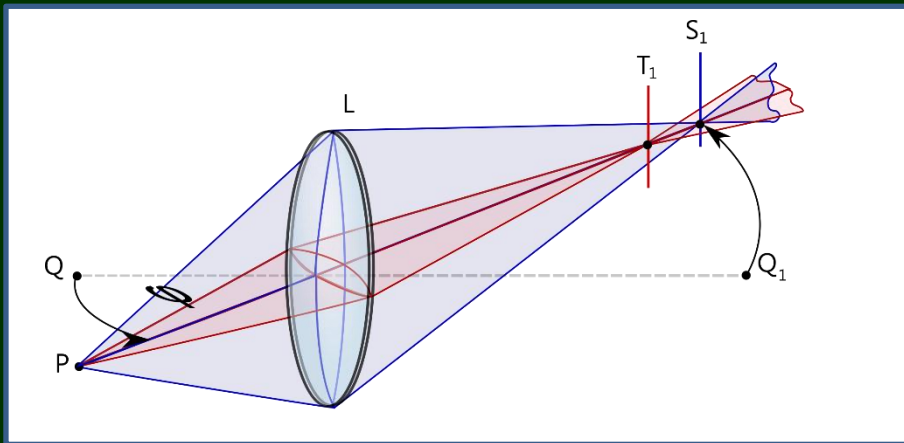
Vada barevná (chromatická, různé lom světla o různé vln. délce)



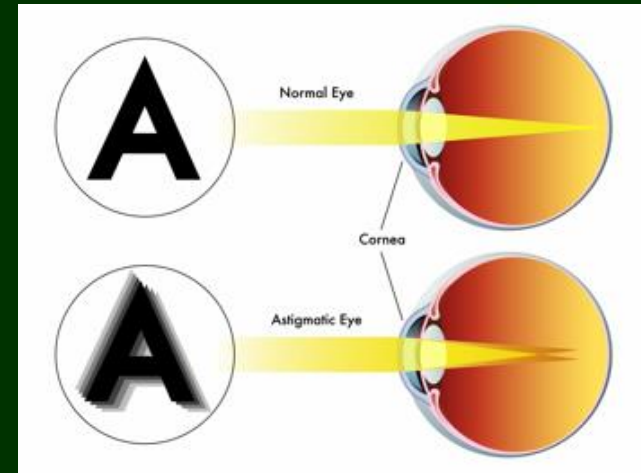
Vada sférická (kulová, paprsky rovnoběžné s osou se lámou různě podle jejich vzdálenosti od středu čočky, obrazem nejsou body ale kruhy)



Vada astigmatická

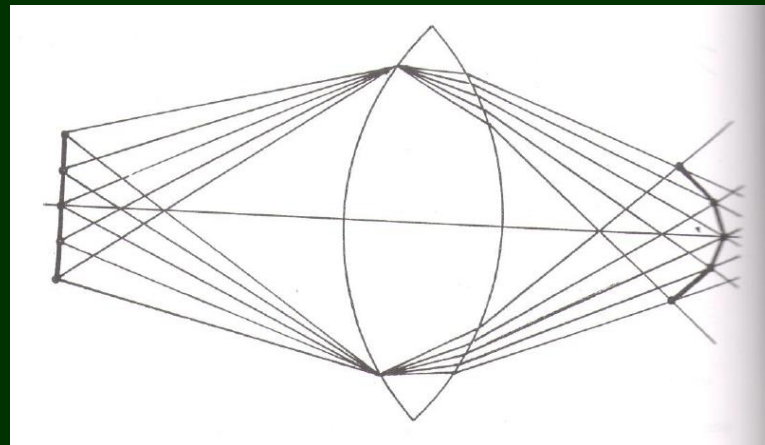


- paprsky, které dopadají na čočku ze strany (z bodu ležícího mimo opt. osu) se neprotou v jednom bodě, ale zobrazují se jako 2 linie na sebe kolmé



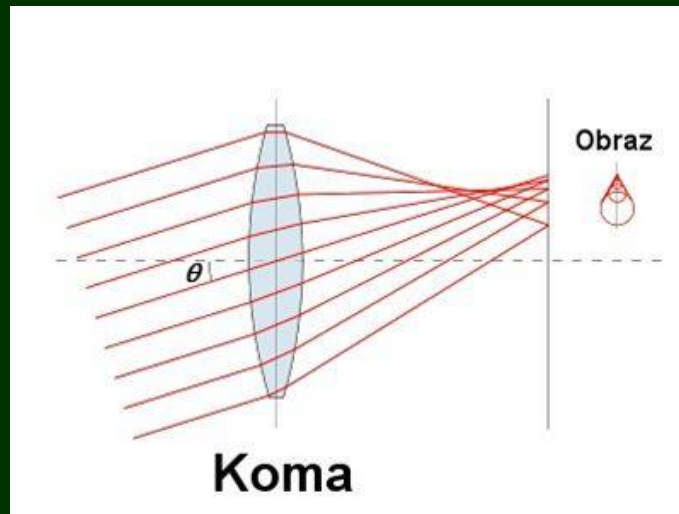
Vyklenutí zorného pole

- paprsky dopadající na čočku šikmo mají jiné ohnisko než rovnoběžné paprsky přímé.
- přímka se v bokorysu nezobrazuje jako přímka, ale jako oblouk
- nelze zaostřit na celý předmět



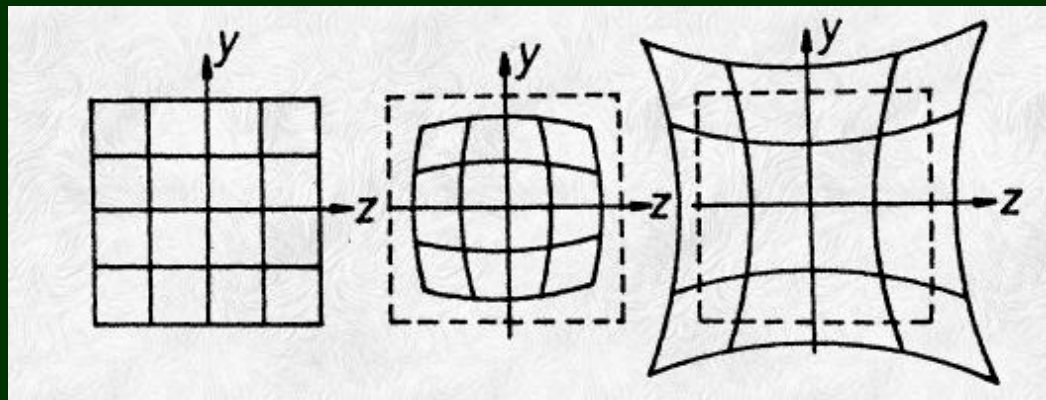
Koma

- bod ležící mimo osu čočky je zobrazen jako protáhlá ploška

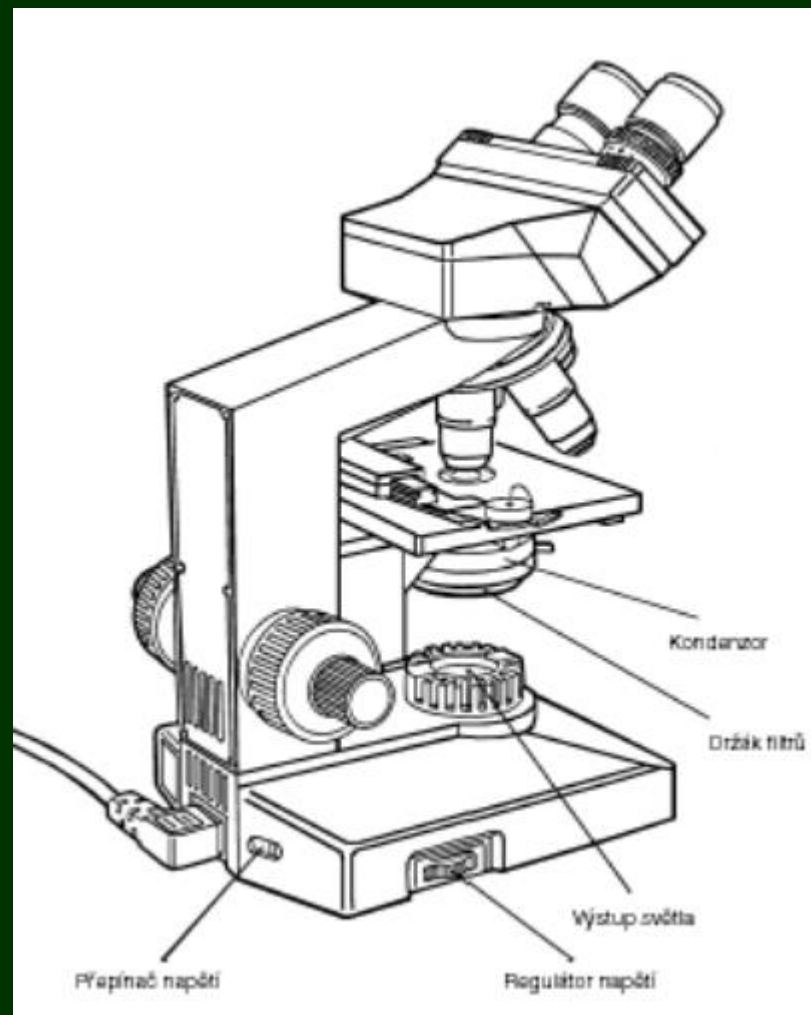
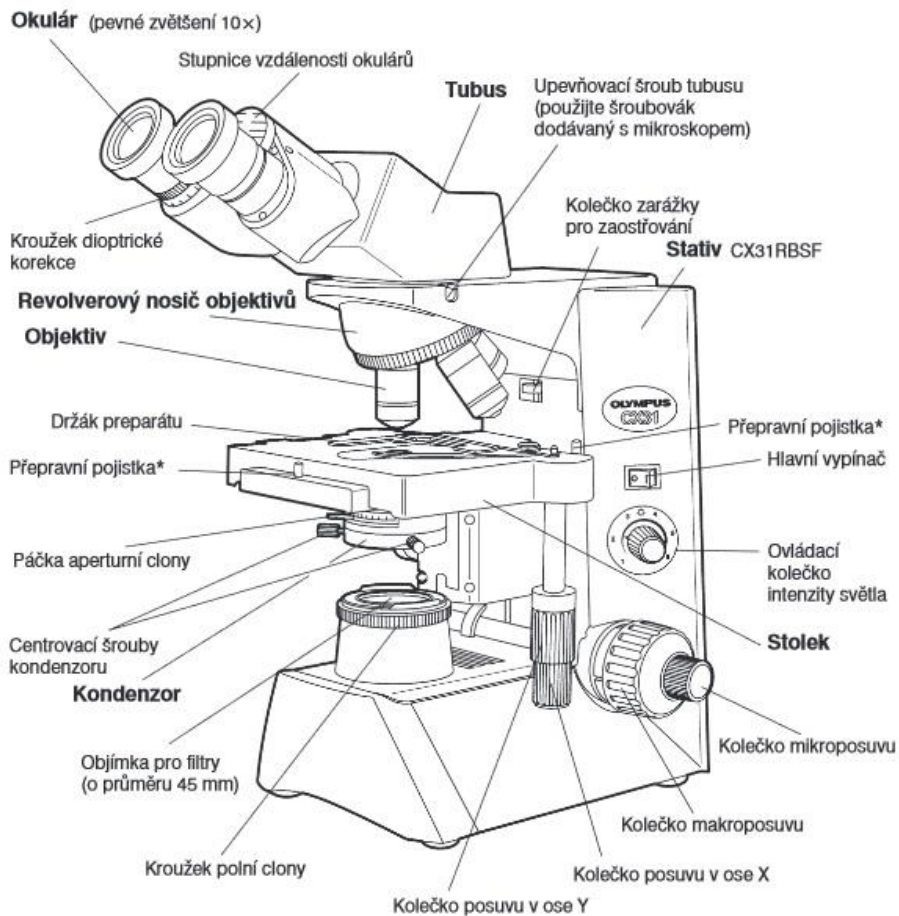


Distorze

- okraje zorného pole jsou více či méně zvětšené než je střed



Složený světelný mikroskop



Mikroskop

- optický přístroj sloužící ke zvětšení zorného úhlu při pozorování malých objektů
- je složen z optické, osvětlovací a mechanické části

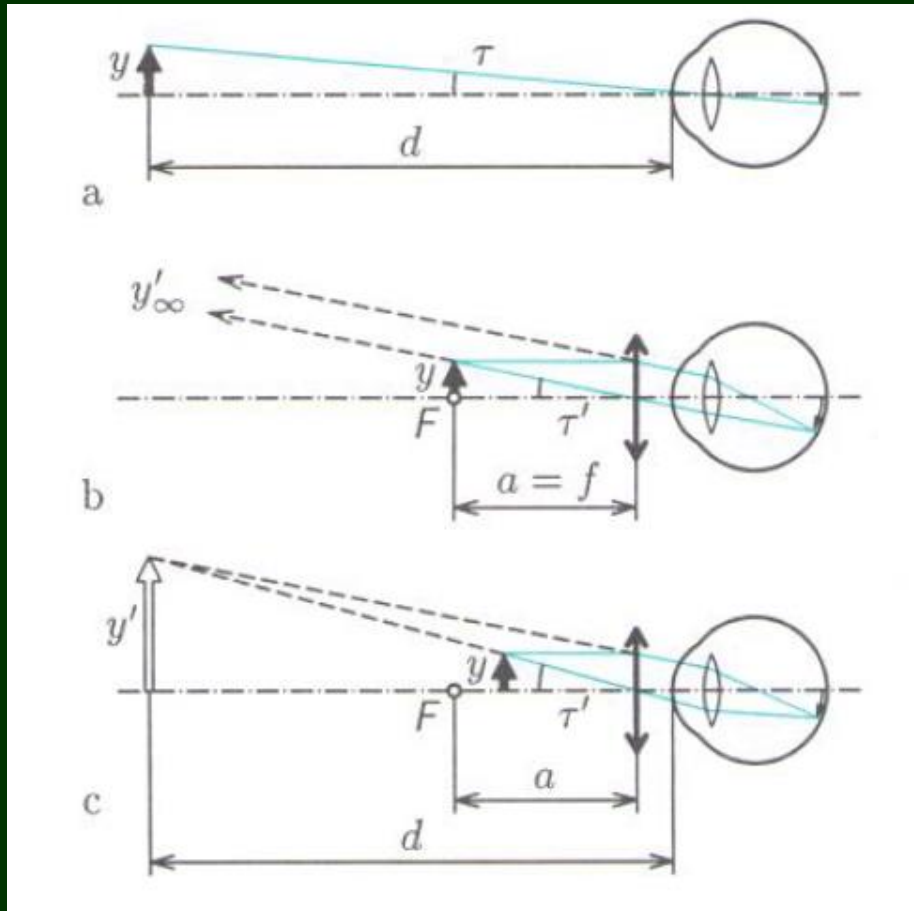
Objektivy

- je to spojná čočka (nebo spojná soustava) s malou ohniskovou vzdáleností f_1
- vytváří zvětšený převrácený a skutečný obraz předmětu, umístěného před jeho ohniskovou rovinou tak blízko, aby obraz vznikl v přiměřené vzdálenosti (zvané optickým intervalem nebo délkou optického tubusu) za P' .
- optický interval je určován mechanickou délkou tubusu, která se měří od dosedací plochy objektivu k dosedací ploše okuláru, pohybuje se kolem 170 mm

Okuláry

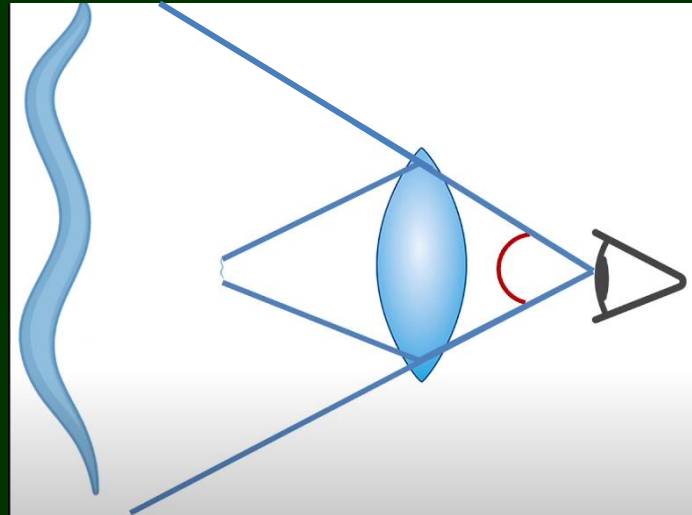
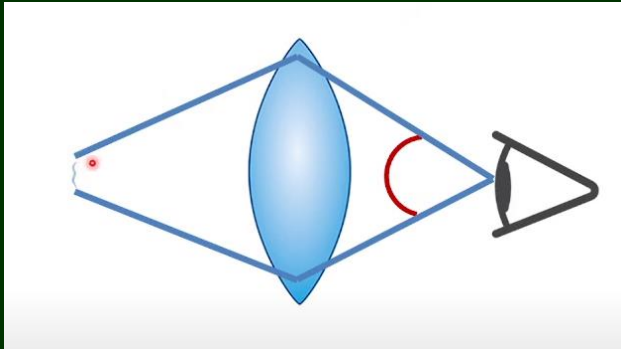
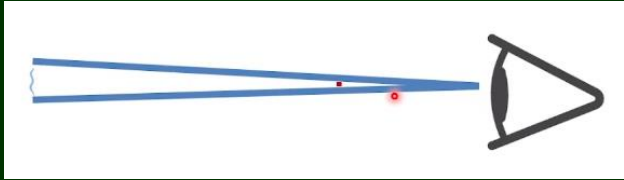
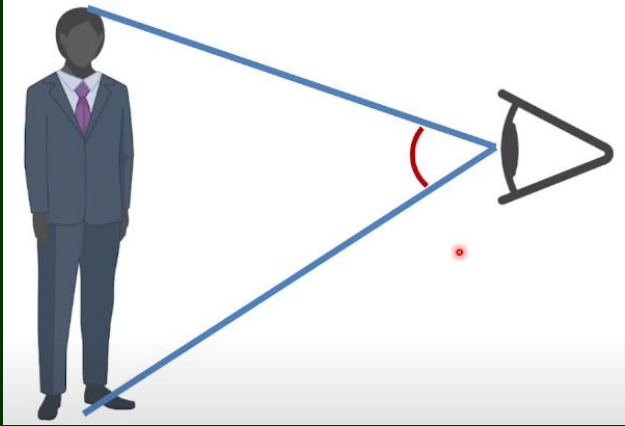
- pozoruje obraz vytvořený objektivem jako lupou
- nastaví se tak, aby tento obraz vznikl v jeho předmětové ohniskové rovině
- je to spojná čočka s větší ohniskovou vzdáleností f_2
- oko vidí neskutečný převrácený (vzhledem k objektu), příp. přímý (vzhledem k obrazu vytvořeného objektivem) pod zorným úhlem r'

Pozorování malého předmětu lupou

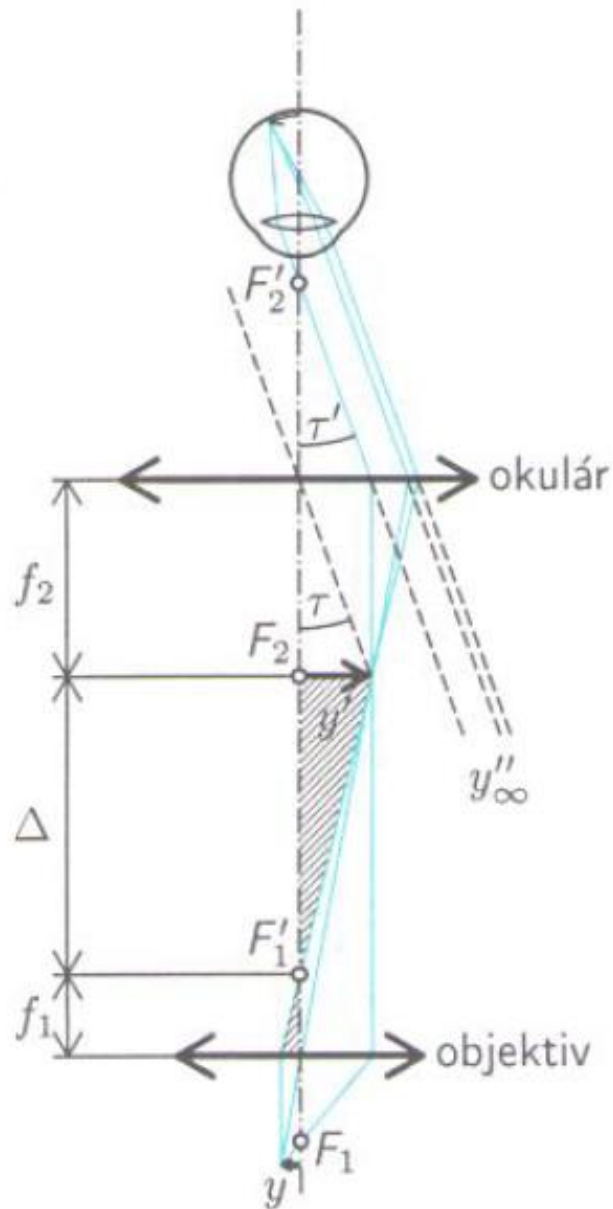


Zorný úhel r = úhel, který svírají okrajové paprsky předmětu procházející optickým středem oční čočky

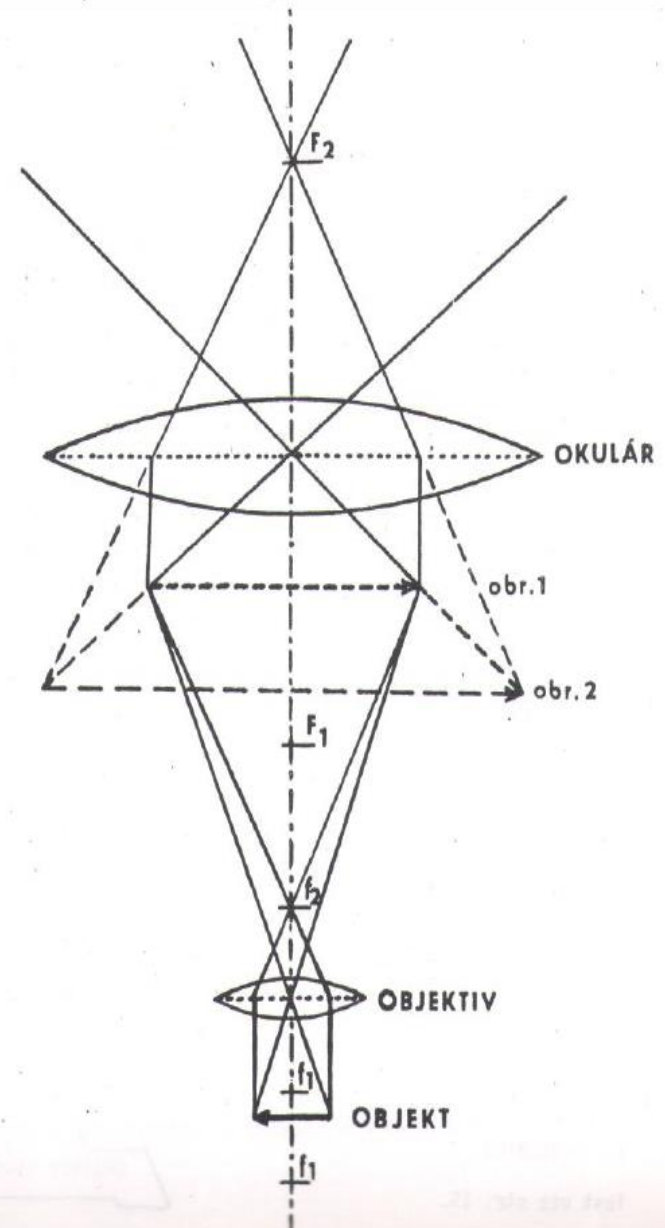
Konvenční zraková vzdálenost = vzd. ze které můžeme předměty delší dobu pozorovat bez větší únavy, $d = 25$ cm



Pozorování malého předmětu mikroskopem



Obr. 16:
 Geometrie zobrazování
 předmětu ve složeném
 mikroskopu při použití
 ortoskopického
 okuláru:
 obr. 1 = zvětšený,
 převrácený a skutečný
 obraz vytvořený ob-
 jektivem,
 obr. 2 = zvětšený
 neskutečný obraz
 pozorovaný okulárem
 jako lupou.
 Text viz str. 15.



Typy objektivů

Achromáty

- korigovaná chromatická vada pro 2 vln. délky (žl + zel)
- nejčastěji používané objektivy
- kombinace s Huygensovými okuláry

Apochromáty

- korigována chrom. vada nejen pro žl + zel, ale i pro mod + čer
- apochr s větším zvětšením mají chromatickou vadu zvětšení (obraz vznikající při modrém světle je na okraji větší než obraz vznikající při červeném světle)
- kombinace s kompenzačními okuláry vyrovnávajícími barevnou vadu velikosti
- pro mikrofotografii

Planachromáty a planapochromáty

- korekce vyklenutí zorného pole
- kombinace s planokuláry
- mikrofotografie

Monochromáty

- spec. objektivy pro monochromatické světlo
- použití v UV mikroskopii

Vlastnosti objektivů

Ohnisková vzdálenost

- u soustavy čoček je to ekvivalentní ohnisková vzd. (oh vzd jediné čočky, co má opt. mohutnost jako celý systém čoček)
- od 20 mm do 1,5 mm
- objektivy > 20mm jsou velmi slabé
- objektivy 6 – 15 mm jsou střední
- objektivy < 5 mm jsou silné

d = konveční zraková vzdálenost,
250 mm

Vlastní zvětšení objektivu

- vypočítá se z ohniskové vzdálenosti $250 : f$ ($d = 250$ mm dělená ohn vzdáleností objektivu)
- větší ohn vzdálenost – menší zvětšení
- užitečné zvětšení (max 1000-násobek numerické apertury)
- prázdné zvětšení (nad tuto hodnotu, nezobrazí více detailů)

Pracovní vzdálenost objektivu

- kolmá vzdálenost pozorovaného předmětu od čelní čočky objektivu zaostřeného na pozorovaný objekt
- volná pracovní vzdálenost – kolmá vzdálenost mezi přední plochou čočky objektivu a krycím sklíčkem
- silnější objektiv – menší prac. vzdálenost

Otvorový úhel (angulární apertura)

- úhel, který svírají dva nejkrajnější paprsky, které se ještě dostávají do otvoru objektivu.
- nepřímo úměrný ohniskové vzdálenosti a závisí na tvaru čočky a konstrukci objektivu

Světelnost objektivu

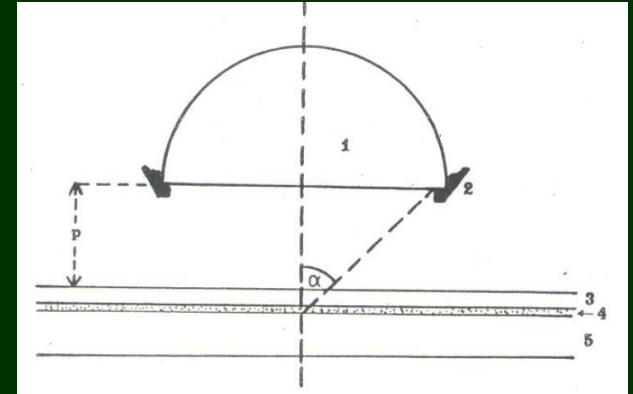
- schopnost objektivu zachytit co možná nejvíce paprsků přicházejících z předmětu do objektivu
- závisí na velikosti otvorového úhlu

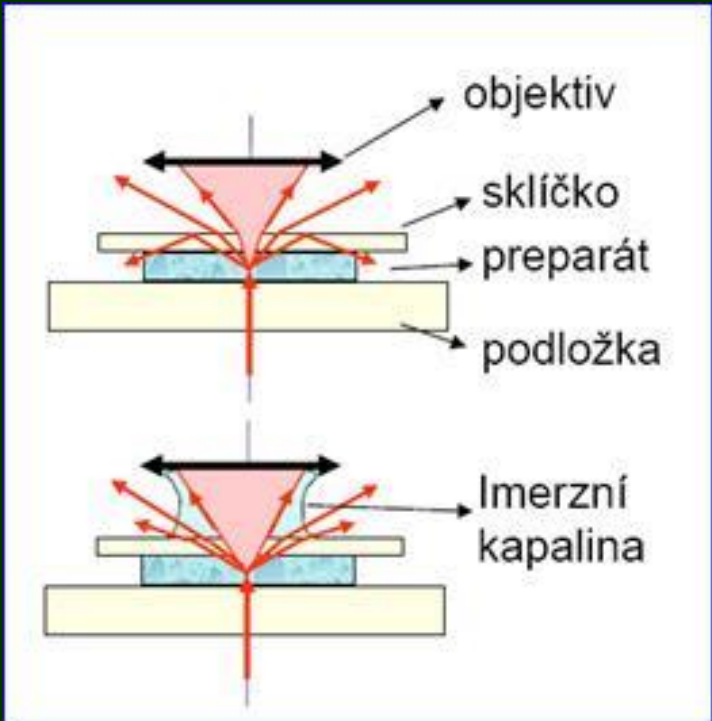
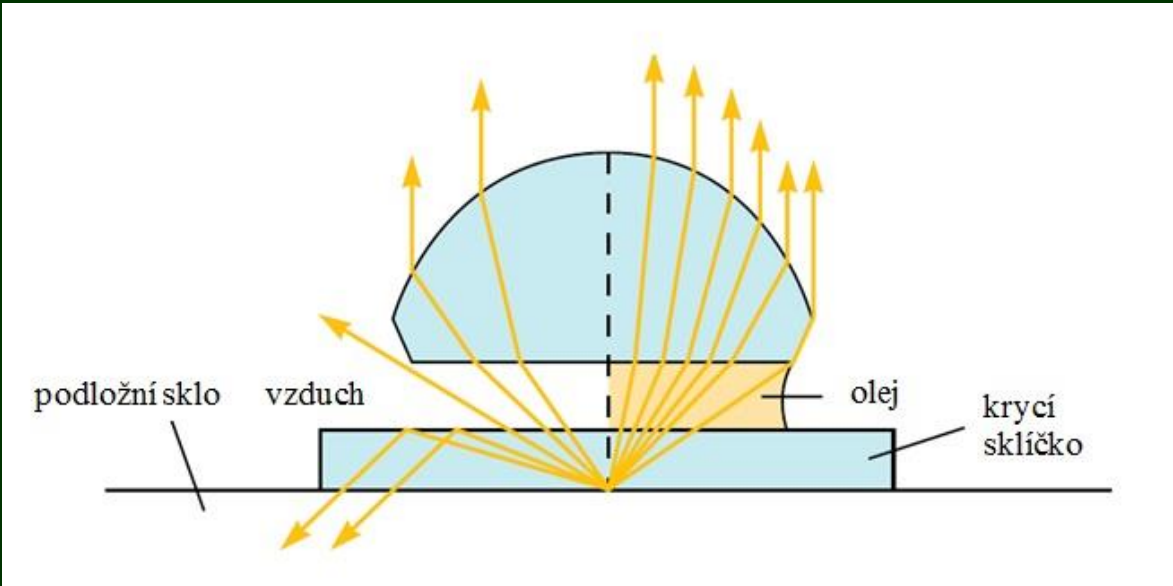
Lomivost prostředí

- též rozhoduje o množství paprsků, které objektiv přijme
- světelné** paprsky, které vycházejí z předmětu, vystupují po průchodu krycím sklem ($N = 1,51$) do vzduchu ($N = 1$).
- na rozhraní se lámou od kolmice, tedy vytvoří kužel větší než kužel paprsků, který byl ve skle
- tedy 2 úhly**: menší ve skle, větší ve vzduchu, pod nímž vstupují paprsky do objektivu
- následek: do objektivu se dostane menší množství paprsků, než které z předmětu vycházelo

Ponorné, imerzní objektivy

- velký rozdíl mezi N skla ($1,51$) a vzduchu (1) se sníží, jestliže se na krycí sklo kápne tekutina o vyšším N a objektiv se do ní ponoří
- destilovaná voda ($N = 1,33$): více paprsků
- cedrový olej ($N = 1,5$) – blízké N sklu, ještě více paprsků
- ponorné (imerzní) objektivy, vodní nebo olejová imerze





Numerická apertura

- vztah mezi otvorovým úhlem (angulární aperturou) a lomivostí prostředí

$$A = N \times \sin \alpha/2$$

- α = vstupní úhel paprsků do objektivu, N = Index lomu prostředí mezi objektivem a preparátem

- α je vždy menší než 180° , podíl je tedy menší než 90°

-čím větší je A , tím je vyšší rozlišovací schopnost objektivu a tím větší zvětšení

-výkonné objektivy mají α = až 140° , jejich A při N vzduchu = 0,91, vody = 1,25, cedr oleje = 1,42

Rozlišovací schopnost objektivu

-schopnost rozlišit 2 vedle sebe ležící body jako samostatné

-tím větší, čím větší je A objektivu

Penetrační (hloubková) schopnost ostrosti objektivu

-schopnost současně ostře zobrazit větší nebo menší počet rovinných vrstev předmětů

-je v obráceném poměru k A

-velmi silné objektivy (imerzní) mají jen malou hl. ostrosti, zobrazují často jen jednu rovinu

-slabší objektivy mají hl. ostrosti větší než silné

Suché objektivy

-mezi preparátem a čelní čočkou objektivu je vzduch

- $A < 1$ (0,85 – 0,94)

Okuláry

- opt. soustavy zvětšující obraz vytvořený objektivem
- zvětšení je prázdné (nezobrazují víc detailů než objektiv)

Huygensovy okuláry

- nejčastější
- 2 ploskovypuklé čočky zasazené do kov. objímky (horní = frontální čočka, spodní = sběrná, kolektivní)
- mezi nimi je kruhová clona, v jejíž rovině se tvoří obraz
- kombinací neachromatických čoček se odstraňují achromatická diference zvětšení a sférická vada

Kompenzační okuláry

- pro apochromatické objektivy, odstraňují chromatickou vadu

Periplanatické okuláry

- kombinace s planachromatickými objektivy

Osvětlovací zařízení

Kondenzor

- pod stolkem mikroskopu
- 2-3 spojky s krátkou ohniskovou vzdáleností
- pro soustředění paprsků pro dokonalé osvětlení zorného pole

Irisová clona

- reguluje množství světla přicházejícího do mikroskopu
- zasazena do spodního okraje pouzdra kondenzoru

Zrcátko

Mechanická část

Stativ

Nosič tubusu

Tubus (trubice spojující objektiv a okulár)

- vzdálenost mezi horním a dolním koncem tubusu je mechanická délka tubusu a reguluje se makrometrickým nebo mikrometrickým šroubem

Revolverový měnič objektivů

Stolek mikroskopu

Křížový vodič preparátu

Mikroskopie ve světlém poli (v procházejícím světle)

- Pozorování ve světlém poli je nejjednodušší (a nejstarší) technikou světelné mikroskopie
- Osvětlení je zajišťováno bílým světlem, kužel paprsků prochází vzorkem a vstupuje do objektivu
- Jeho nevýhodou je **nízký kontrast** při pozorování většiny biologických vzorků (protože jen málo z nich výrazněji **absorbuje** světlo), a proto je často nutné použití různých barvicích technik
- Naopak výhodou spočívá v již zmíněné jednoduchosti, a proto je tato metoda velmi oblíbená

Pro zvýšení kontrastu: metody fyzikální (optické) a chemické (barvení preparátů)

Mikroskopie temného pole

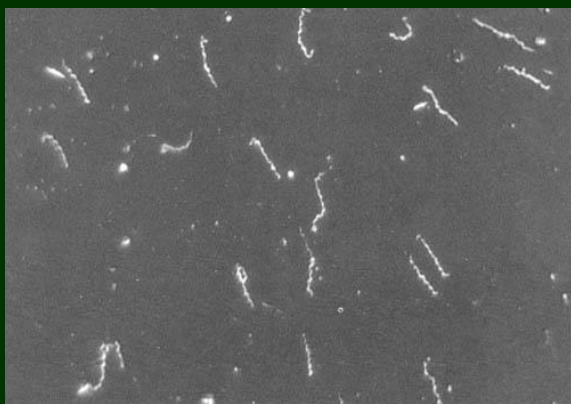
- Mikroskopie temného pole (DFM, darkfield microscopy) je typ světelné mikroskopie, při němž do objektivu vstupuje pouze světlo **difraktované (ohnuté), refraktované (lomené) a odražené** objektem.
- Světlo, které pouze prochází, objektiv mine. Toho je docíleno pomocí kruhové clony, které propouští jen úzký prstenec světla podél jejího obvodu
- Světlo za clonou následně prochází tak šikmo k rovině přístroje, že vstupuje do objektivu jen tehdy, dostane-li se mu do cesty pozorovaný objekt.
- Objekty jsou proto při mikroskopii temného pole pozorovány jako světlé předměty na tmavém pozadí (temném poli)
- Pro DFM jsou dnes k dispozici speciální zástinové kondenzory

Paraboloidní kondenzory (obr. 34a)

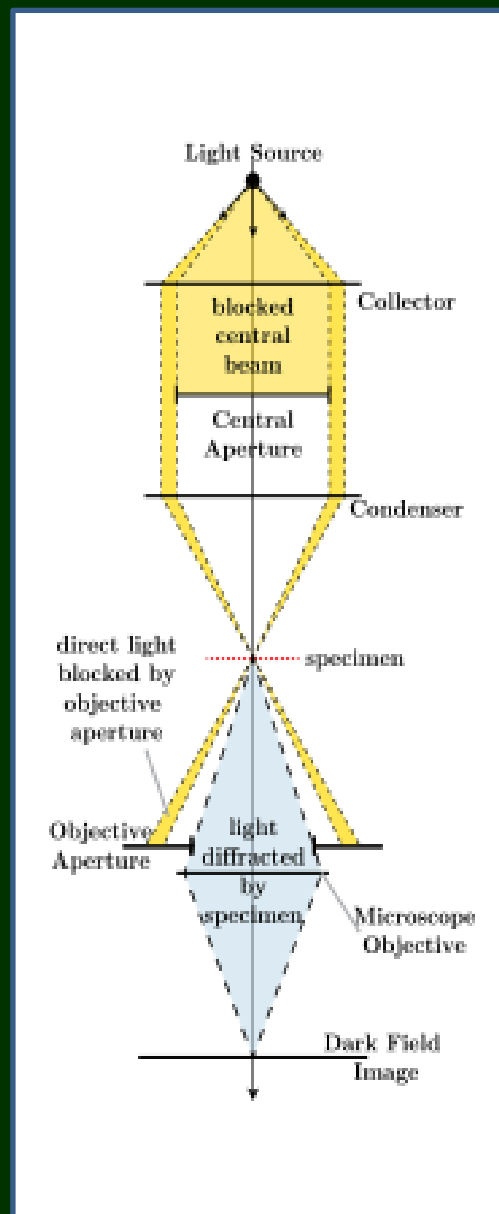
Základem těchto kondenzorů je skleněné těleso vybroušené do tvaru komolého rotačního paraboloidu. Na jeho spodní plochou stranu je umístěna centrální clona. V důsledku toho může do tělesa pronikat světlo jen mezi kruhým vymezeným obvodem centrální clony a obvodem spodní, rovné strany paraboloidu. Zaoblený povrch tělesa je postříbřený, jeho svrchní strana je plochá a celá pro světlo průchodná. Paprsky, které proniknou do tělesa při okrajích jeho spodní strany, se na postranní postříbřené ploše odrážejí pod šikmým úhlem do ohniska s umístěným objektem.

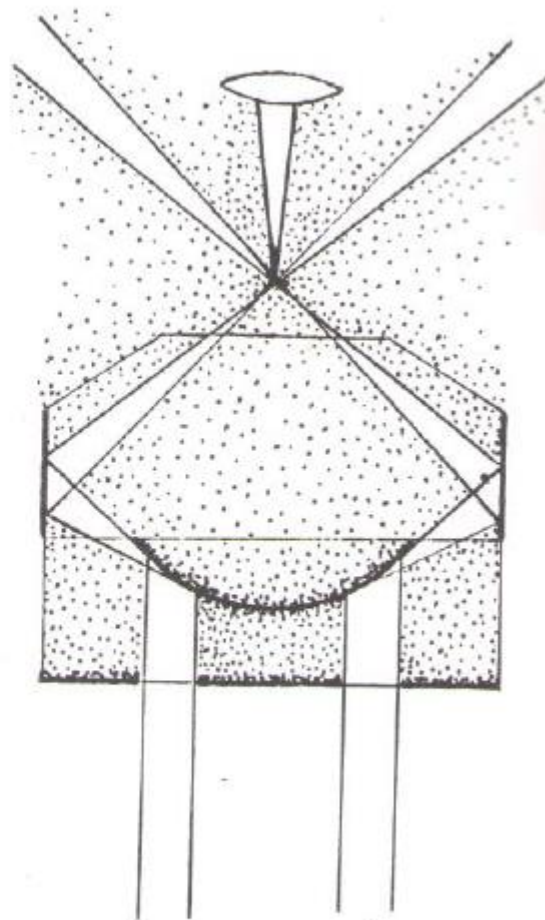
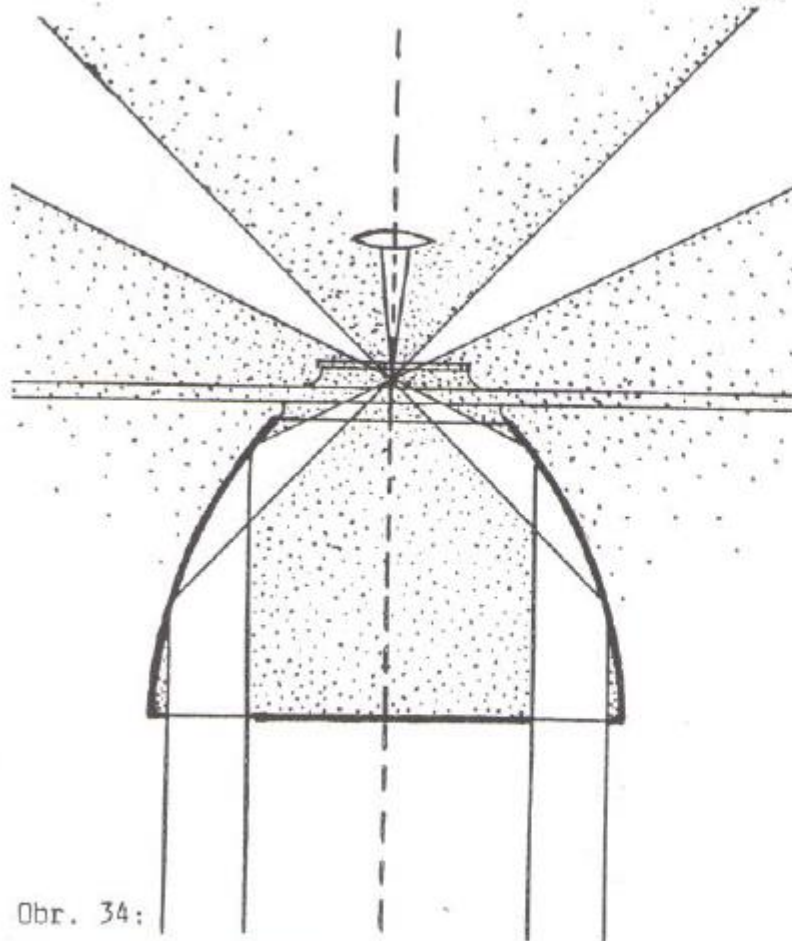
Kardioidní kondenzor (obr. 34b)

Základem jsou tři skleněné bloky se zrcadlicími plochami. K prvnímu odrazu světla, které může do kondenzoru okolo centrální clony proniknout, slouží polokulovitý blok usazený v jamce ve středu spodního velkého bloku. Spodní (oblá) plocha polokulovitého tělesa je postříbřena a slouží k odrazu světla na postříbřený a vhodným způsobem zabroušený povrch boční stěny spodního a svrchního bloku. Odtud je světlo odrazem soustředováno do ohniska pozorovaného objektu ležícího na optické ose mikroskopu. Takto je dosaženo velmi intenzivního osvětlování objektů pozorovaných ve středu zorného pole.



Borrelia (nahore) a T. pallidum (dole) zachycené pomocí DFM





Obr. 34:

Zástinové kondenzory:

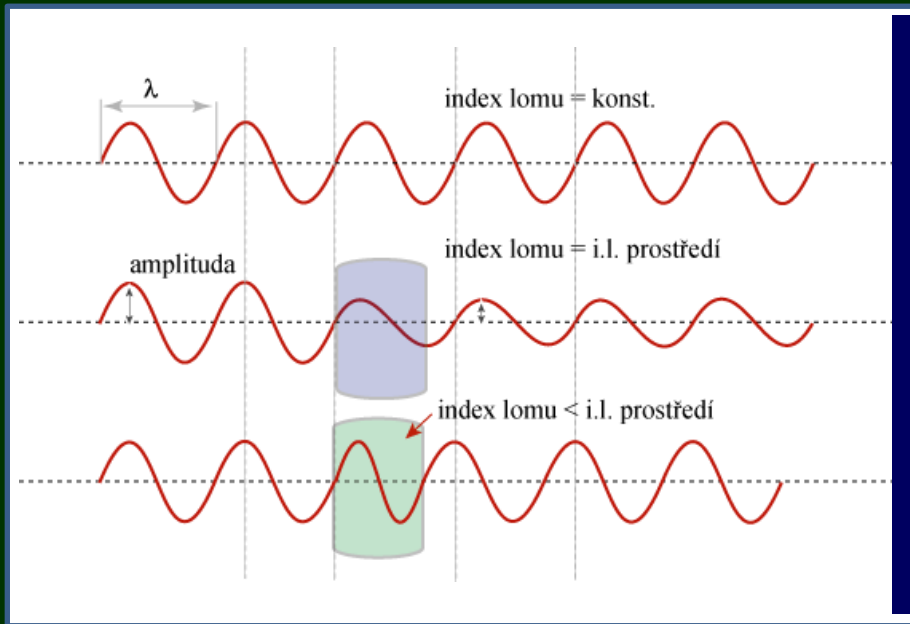
a = průběh paprsků v paraboloidním kondenzoru, b = průběh paprsků v kardioidním kondenzoru. Text viz str. 40.

Mikroskopie s fázovým kontrastem

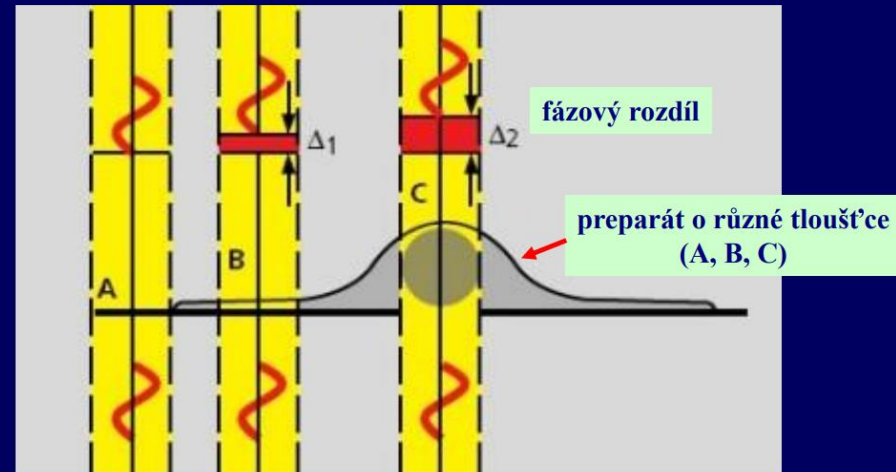
Většina světelných mikroskopů, které se používají pro zkoumání nejen biologických preparátů, umožňuje pozorování jen takových objektů, které **v různé míře pohlcují procházející světlo – mění tedy amplitudu** procházejícího elektromagnetického vlnění. Tyto objekty se nazývají **amplitudové**.

Existuje ale mnoho objektů, které po průchodu světla poskytují velmi malé nebo **žádné rozdíly v absorpci** světelného záření a jsou tedy pro pozorování v procházejícím světle nevhodné. Tyto preparáty ale kvůli **různému indexu lomu** v různých bodech **mění fázi procházejícího světelného vlnění**. Paprsky procházející preparátem se tedy liší fází světelné vlny. Takovéto objekty nazýváme **fázové**. Patří mezi ně většina nebarvených biologických preparátů.

Malé fázové rozdíly však naše oko není schopno rozeznat, a proto se nám fázové objekty jeví jako bezstrukturní a průhledné. Proto k jejich pozorování není běžný mikroskop vhodný. Pro jejich pozorování byl tedy vynalezen tzv. **fázový mikroskop**, který je schopen **převést fázové změny na amplitudové**, a tedy na změny lidským okem pozorovatelné. Umožňuje tak pozorování mnohých buněčných struktur, které byly před vynalezením fázového mikroskopu pozorovatelné až na mrtvých a nabarvených buňkách.



Fázový posun vlnové délky světla průchodem preparátu o různé tloušťce

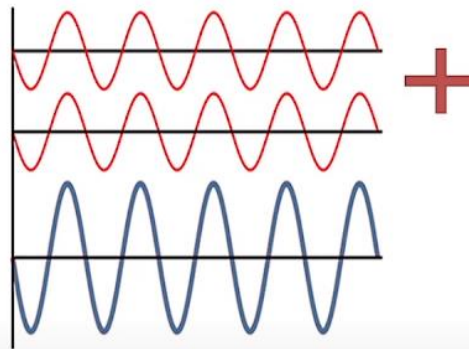


- při průchodu homogenním prostředím nedochází ke změně parametrů procházejícího světla - fáze i amplituda se nemění
- při průchodu objektem, neliší se indexem lomu, dochází k absorpci světla a změně jeho amplitudy (v porovnání s prvním případem), která se projeví změnou v intenzitě (jasu). Obvyklejší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

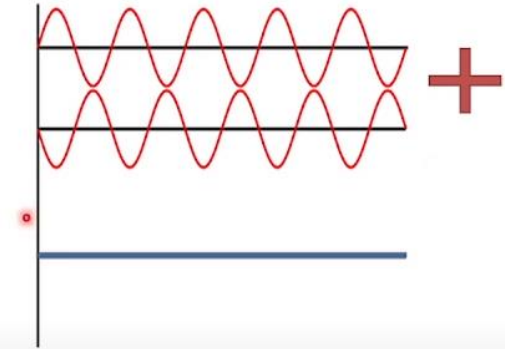
Phase contrast microscopy

- Constructive and destructive interface of wave

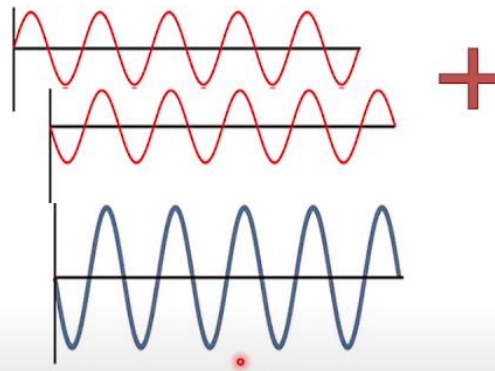
In phase

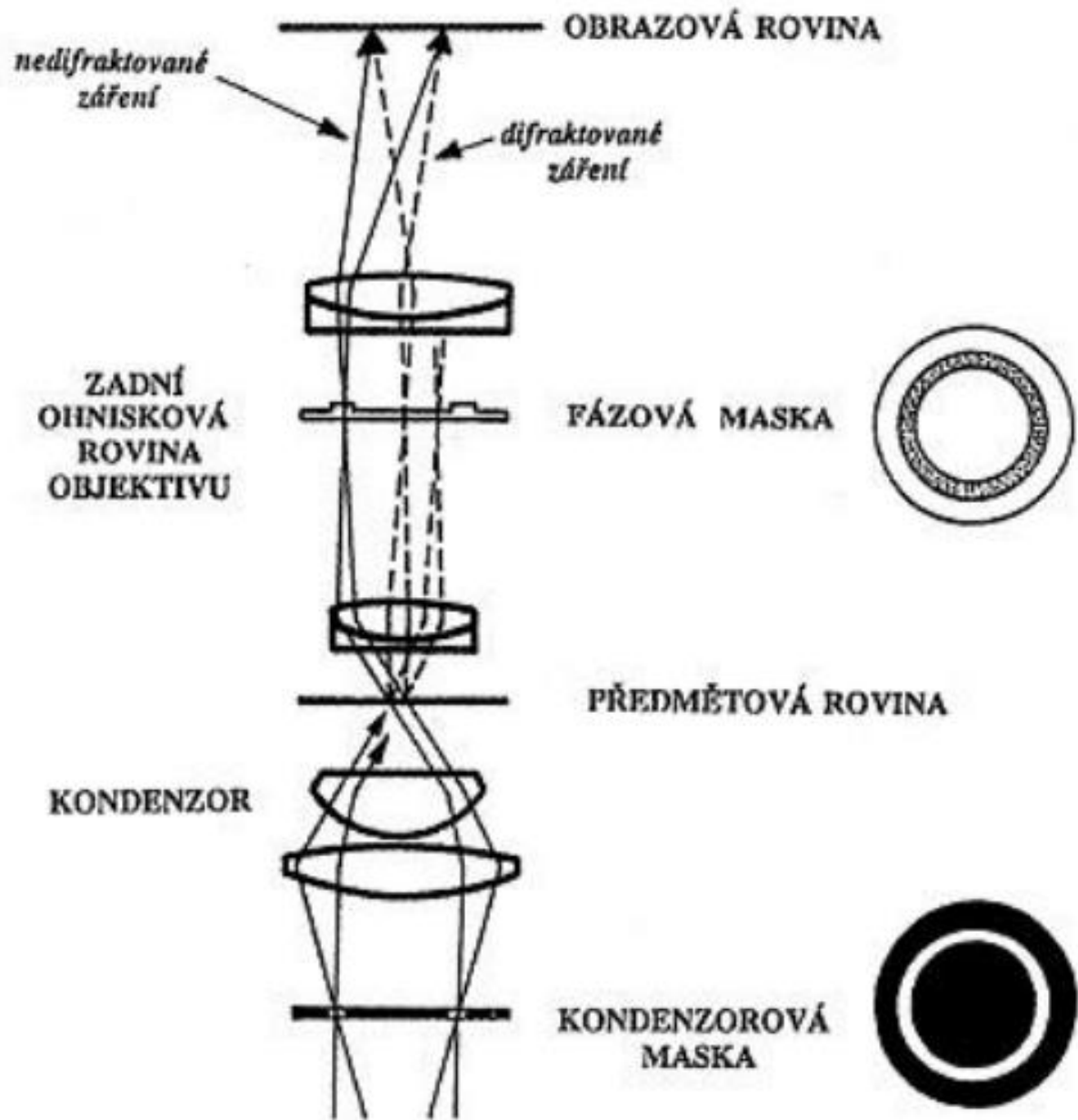


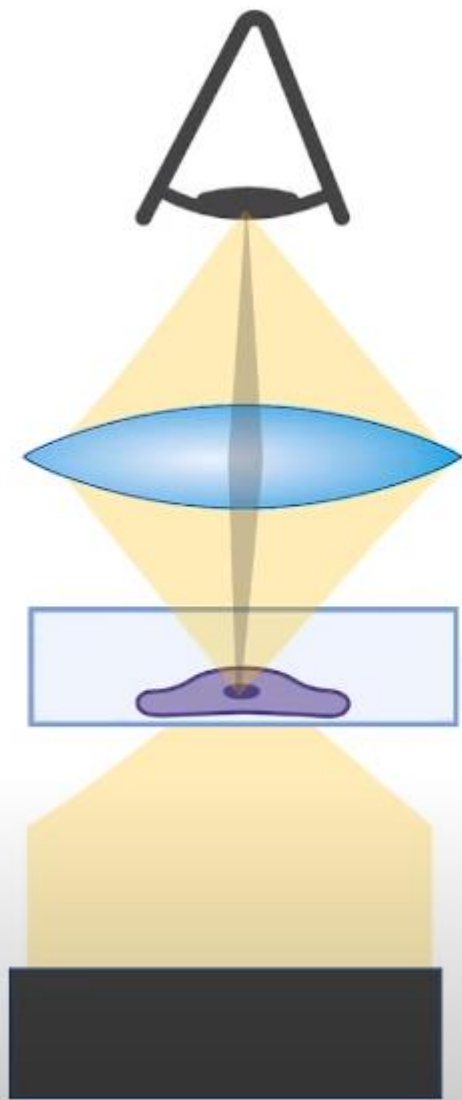
Out of phase



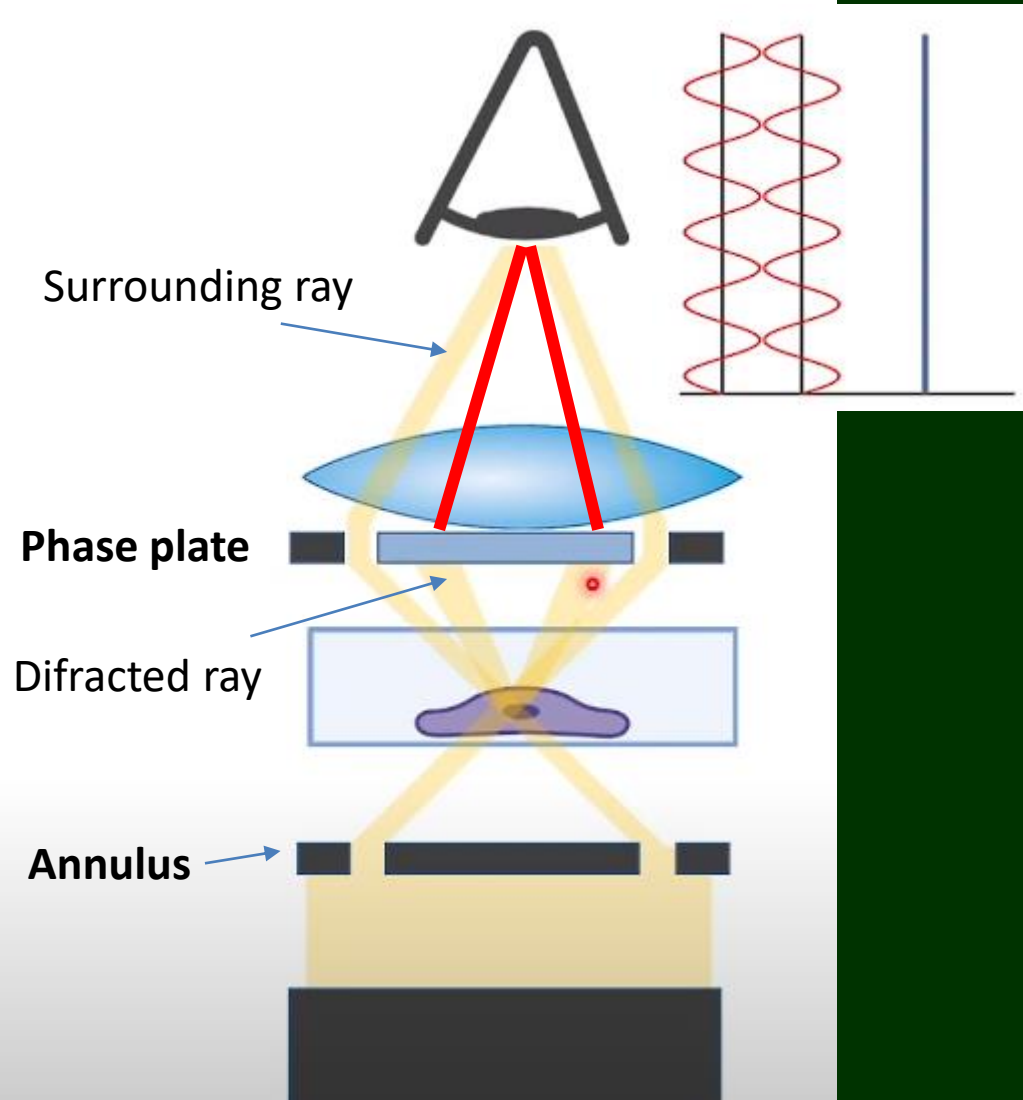
Phase shift







Mikroskopie v
procházejícím světle



Mikroskopie s fázovým
kontrastem

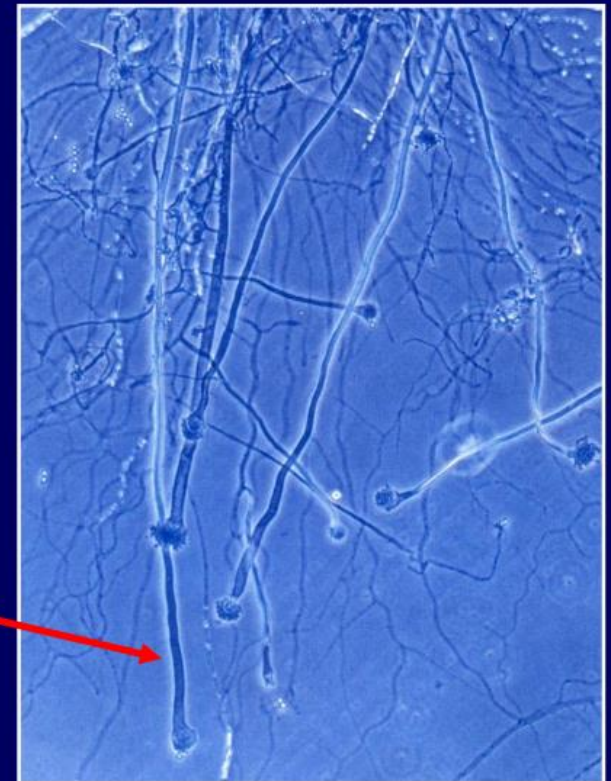
Pozitivní fázový kontrast

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

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

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

Houba *Rhizopus stolonifer*

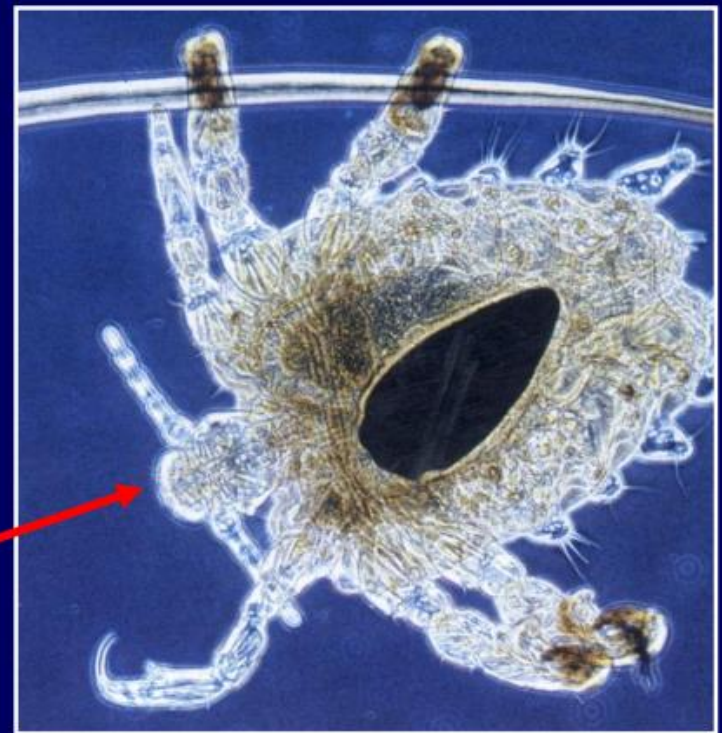


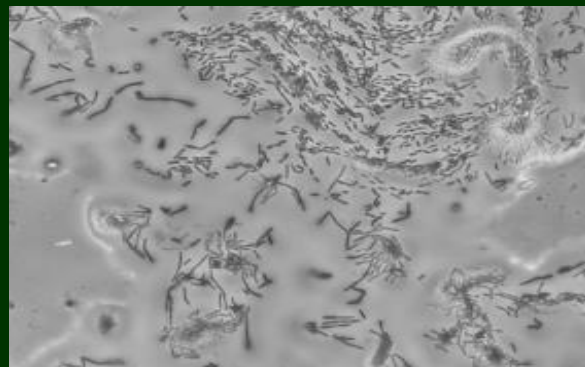
Z = 200x

Negativní fázový kontrast

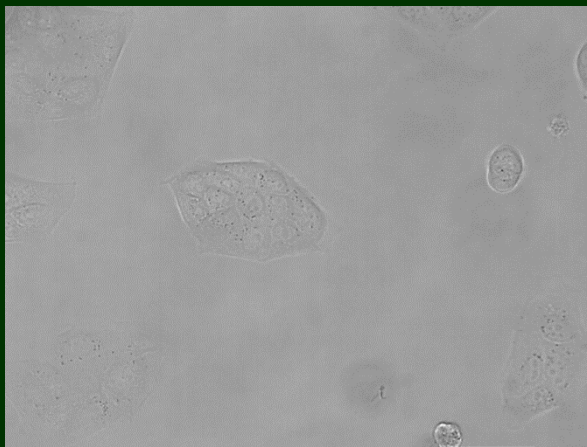
- fázová maska **zpožďuje** fázi **nedifraktovaného** záření o $\frac{1}{4}$ vlnové délky
 - interference těchto paprsků s paprsky zpožděnými průchodem silnějšími objekty → **konstruktivní interference**
- **tlustší části objektu světlé, tenčí tmavší**

Veš muňka (*Pthirus pubis*) s vajíčkem





bakteriální spora (vlevo)
a buňky *B. subtilis*
(vpravo ve fázovém
kontrastu)



MDCK buňky v
procházejícím světle
(vlevo) a ve fázovém
kontrastu (vpravo)



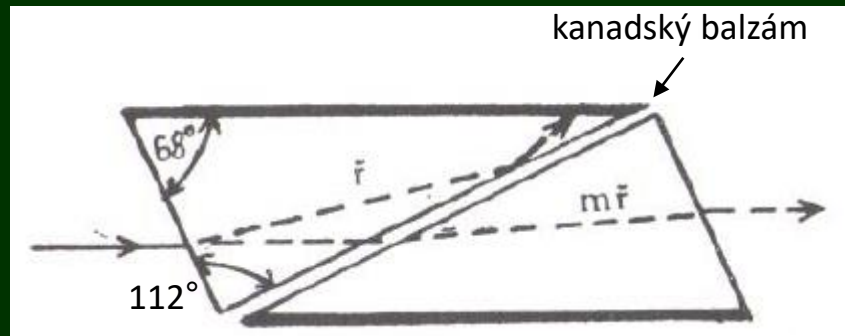
Amoeba proteus v
procházejícím světle
(vlevo) a ve fázovém
kontrastu (vpravo)

Polarizační mikroskopie

- využití polarizovaného světla k odlišení jedno- a dvojlomných struktur
- dojločné struktury: vlákna složená z fibrilárních plaparalelně uspořádaných makromolekul (např. myozinová filamenta), krystalické buněčné inkluze a struktury s vnitřním pnutím

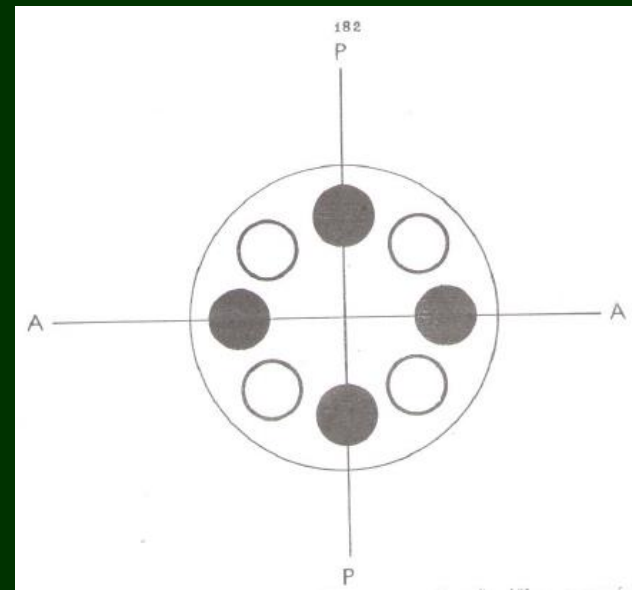
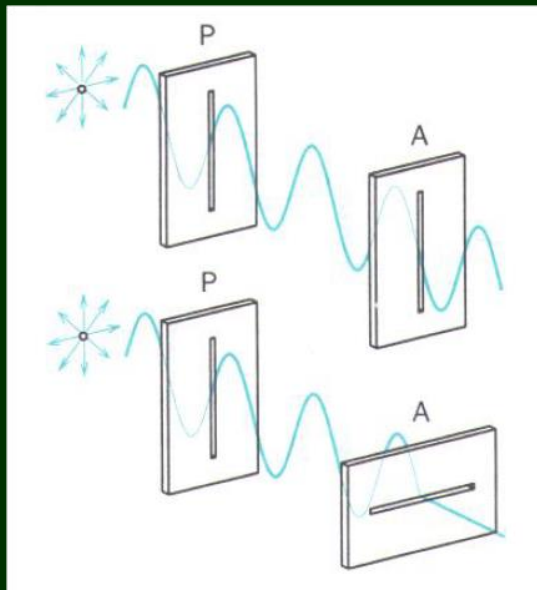
Konstrukční princip

- kromě běžné optiky též 2 polarizační prvky zvané nikoly (Nicolův hranol) z krystalu islandského vápence nebo syntetické pryskyřice
- první hranol zvaný polarizátor je umístěn pod kondenzorem, takže osvětluje zorné pole polarizovaným světlem



- řádný paprsek je pohlcen na černě obarvené boční stěně
- mimořádný paprsek projde do optické soustavy mikroskopu

- do prostoru tubusu nad objektivem je umístěn druhý nikol zvaný analyzátor
- natočíme-li polarizátor (v kondenzoru) tak, že rovina kmitů jím propouštěného světla je kolmá k rovině kmitů světla propouštěného analyzátozem, polarizované světlo v analyzátoru zaniká a zorné pole ztemní.
- při otáčení polarizátorem o 360° se zorné pole vždy po otočení o 90° 4x rozsvětí (zasvítí) a 4x zhasne.

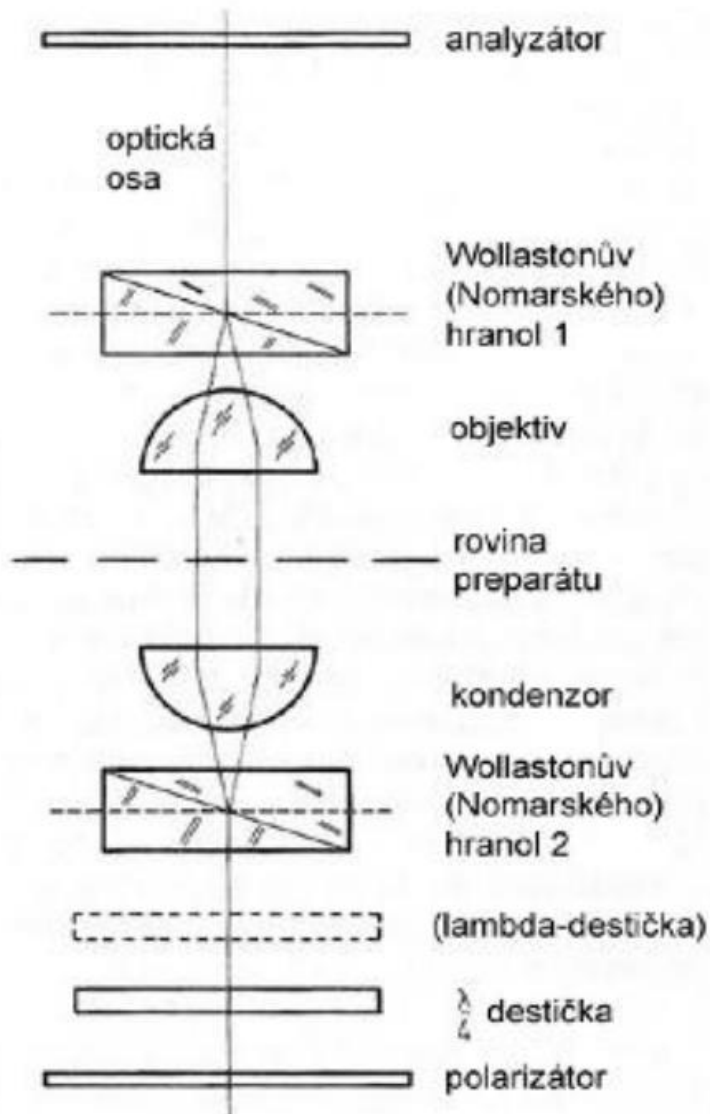


- při temném zorném poli struktury mohou být: 1. jednolomné, bez pravidelného uspořádání molekul a při jakékoli poloze nikolů jsou temné, a 2. dvojlomné s pravidelným uspořádáním částic. Tyto jsou světlé na tmavém poli.

- každý polarizovaný paprsek, který vychází z polarizátoru po proniknutí do analyzátoru se opětovně štěpí ve 2 další navzájem kolmo kmitající.
- z 1 polarizovaného paprsku, který pronikl z polarizátoru do objektu, vznikají tedy v analyzátoru dva paprsky, kmitající v rovině kolmé k rovině polarizátoru a dva v rovině stejné, jako má polarizátor
- paprsky kmitající kolmo k rovině polarizátoru analyzátor při kolmé poloze k polarizátoru (tj. při temném poli) propouští do oka pozorovatele.
- **výsledný efekt: dvojlomné struktury v temném poli světla září**

Interfereční mikroskopie

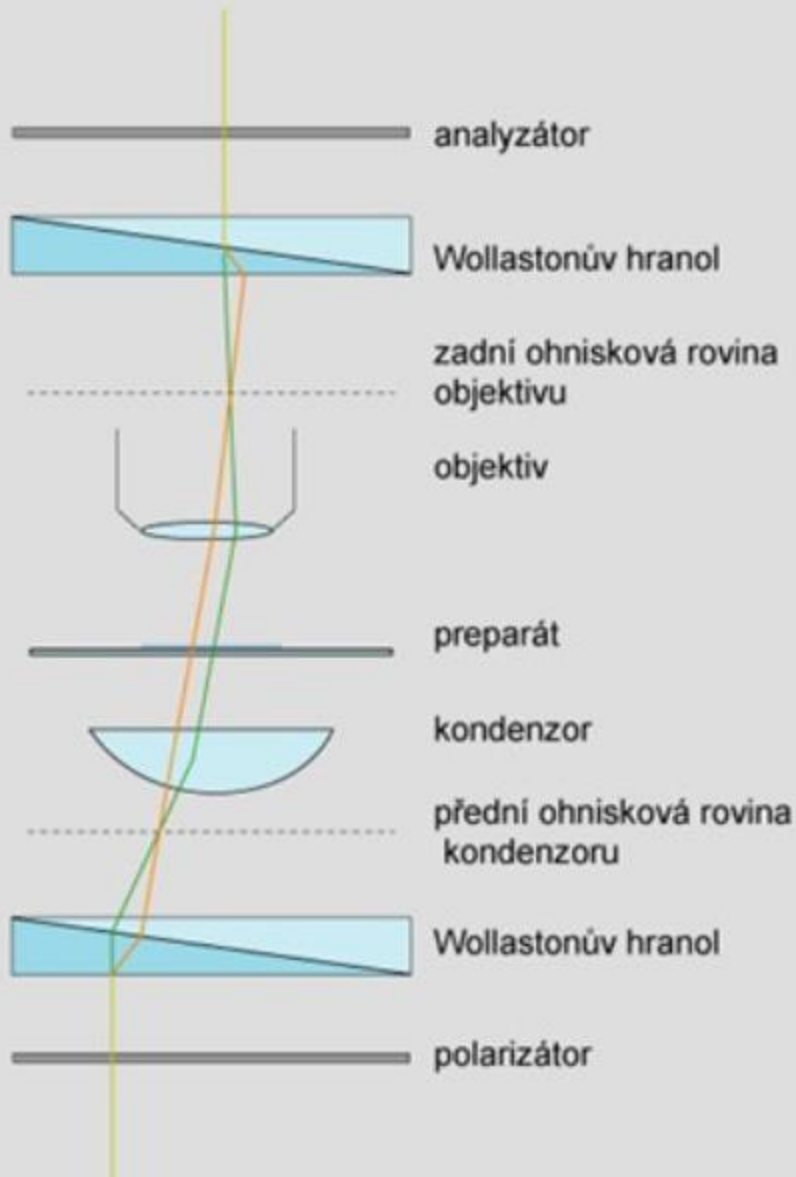
Nomarského diferenciální interference kontrast



Diferenciální interference kontrast dle Nomarského umožňuje díky páru vložených Wollastonových hranolů a páru zkřížených polarizátorů interferenci světelných příspěvků, které přicházejí ze sousedních míst vzorku, vzdálených od sebe o méně, než činí rozlišovací schopnost mikroskopu.

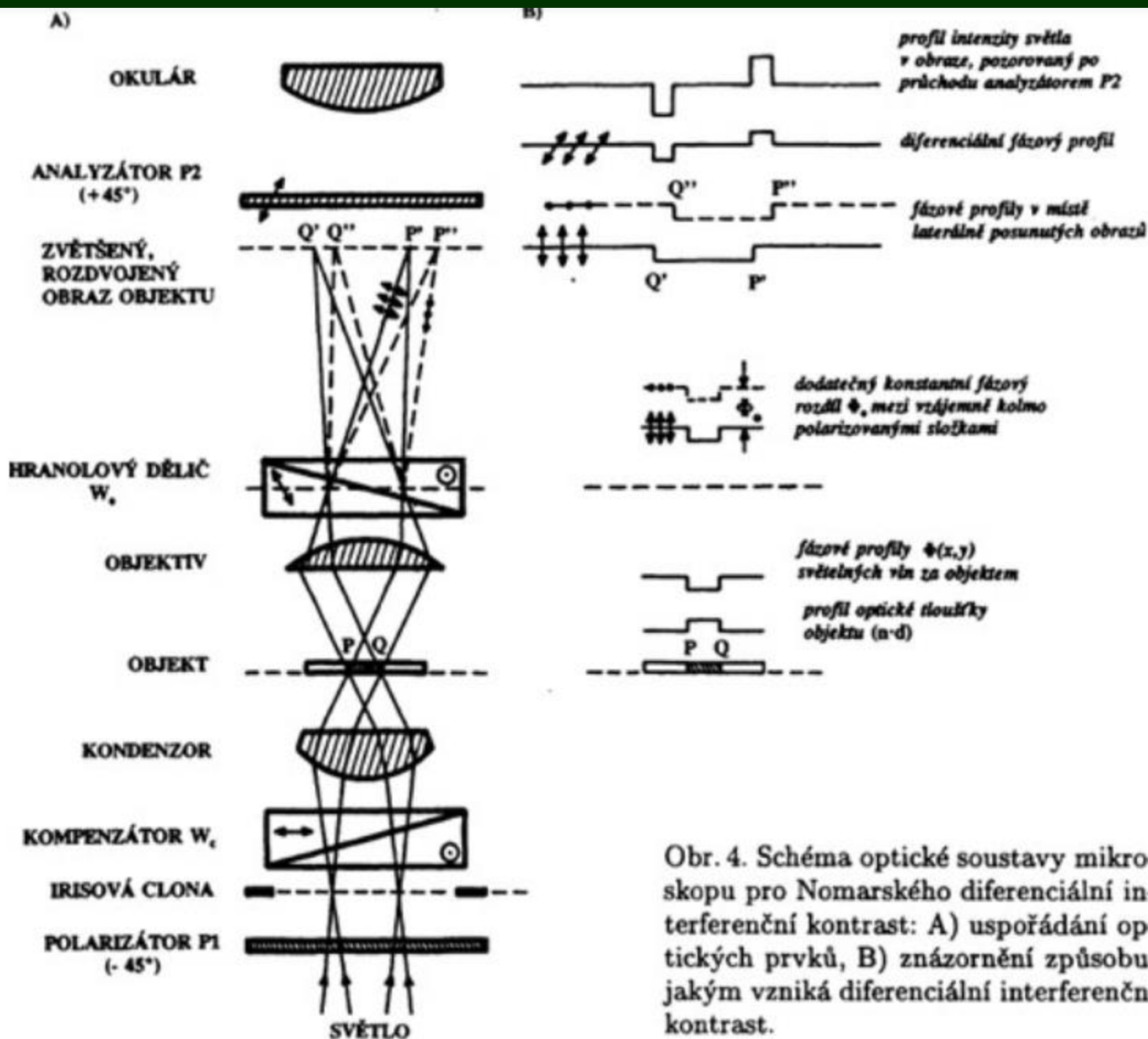
Takto se zviditelní oblasti, kde existují gradienty optické dráhy zobrazujících paprsků (optická dráha je součinem geometrické tloušťky a indexu lomu objektu).

<https://slideplayer.cz/slide/11340584/>



výsledný obraz objektu podle: indexu lomu, tloušťky, orientace vůči rovině Wollastonova hranolu, otáčení světla objektem

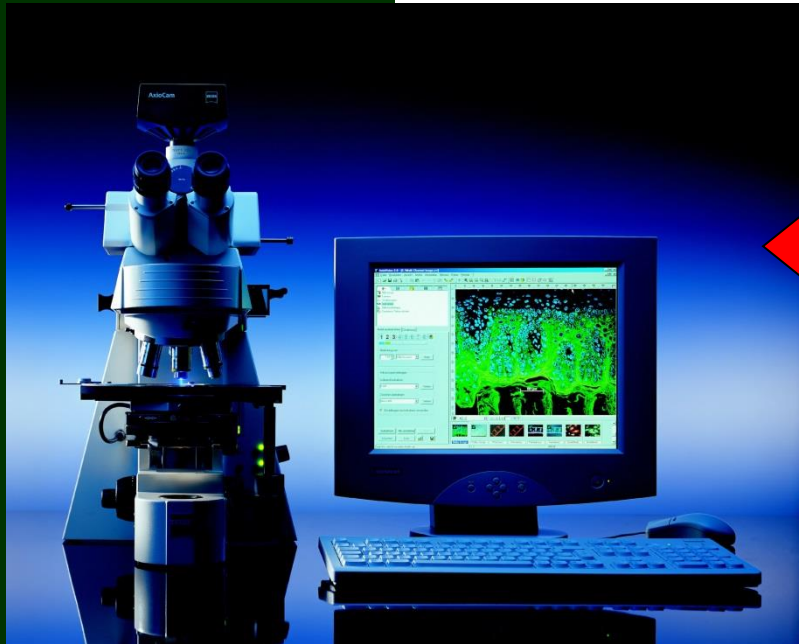
nižší úbytek světla než FK, není omezená NA objektivu,



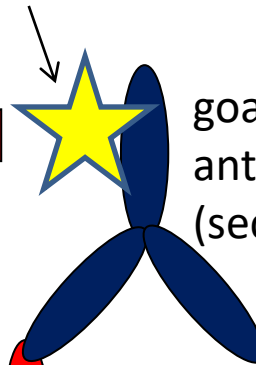
Obr. 4. Schéma optické soustavy mikroskopu pro Nomarského diferenciální interferenční kontrast: A) uspořádání optických prvků, B) znázornění způsobu, jakým vzniká diferenciální interferenční kontrast.

Fluorescenční mikroskopie

Fluorescence/confocal microscopy

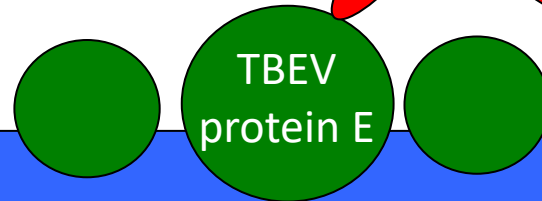
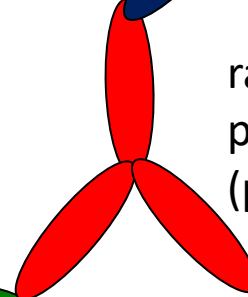


Fluorophore



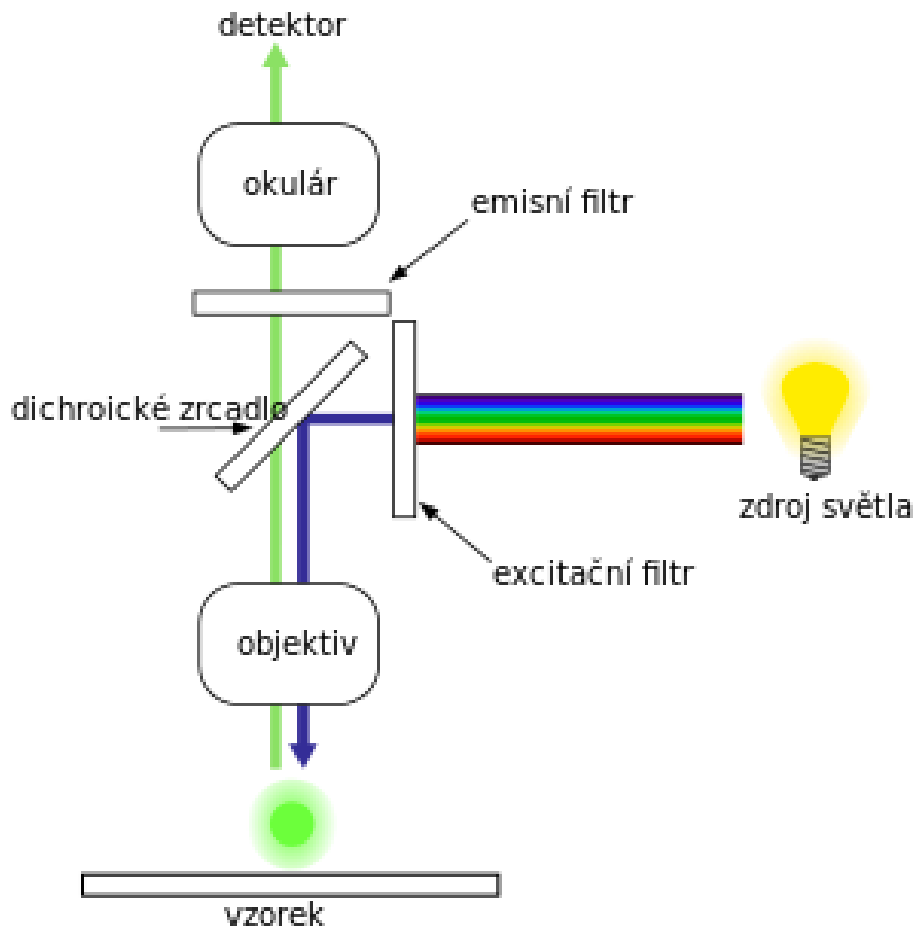
goat anti-rabbit
antibody
(secondary ab)

rabbit anti-TBEV
protein E antibody
(primary ab)



cell structures

Konstrukční princip fluorescenčního mikroskopu



Zdroj světla: rtuťová nebo xenonová výbojka (silný zdroj schopný excitace)

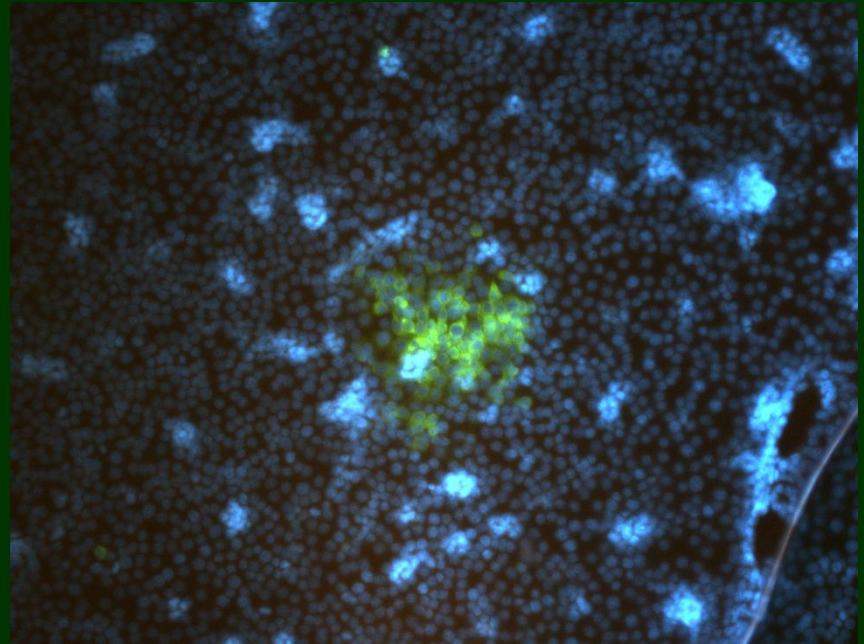
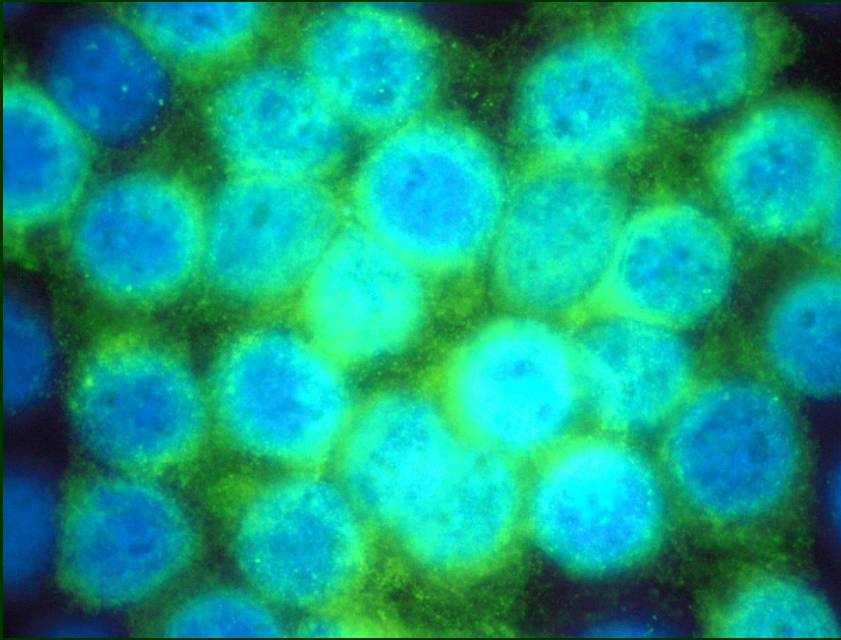
Selekční filtry selektující ze světla výbojky monochromatické světlo

Teplný filtr – brání přehřátí

Fluorochrome Excitation/Emission/Cube/Application Data

Fluorochrome	Excitation Wavelength	Emission Wavelength	Applicable Excitation	Comment
Fluorochrome Antibody Method				
Allophycocyanin (APC)	650	660	IY	Antibody Labeling
7-Amino-4-Methylcoumarin-3-Acetic Acid (AMCA)	350	450	U	Antibody Labeling
BODIPY FL	503	512	B, IB	Antibody Labeling
Cascade Blue	376	425	U	Antibody Labeling
Fluorescein-Isothiocyanate (FITC)	490	520	IB	Antibody Labeling
Phycoerythrin B (PE-B)	545	576	G	Antibody Labeling
Phycoerythrin R (PE-R)	490, 565	578	G, IB	Antibody Labeling
Rhodamine B-Isothiocyanate (RITC)	570	595	G	Antibody Labeling
Texas Red	596	620	IY	Antibody Labeling
Tetramethylrhodamine-Isothiocyanate (TRITC)	541	572	IG	Antibody Labeling

Immunofluorescence staining of TBEV-infected PS cells



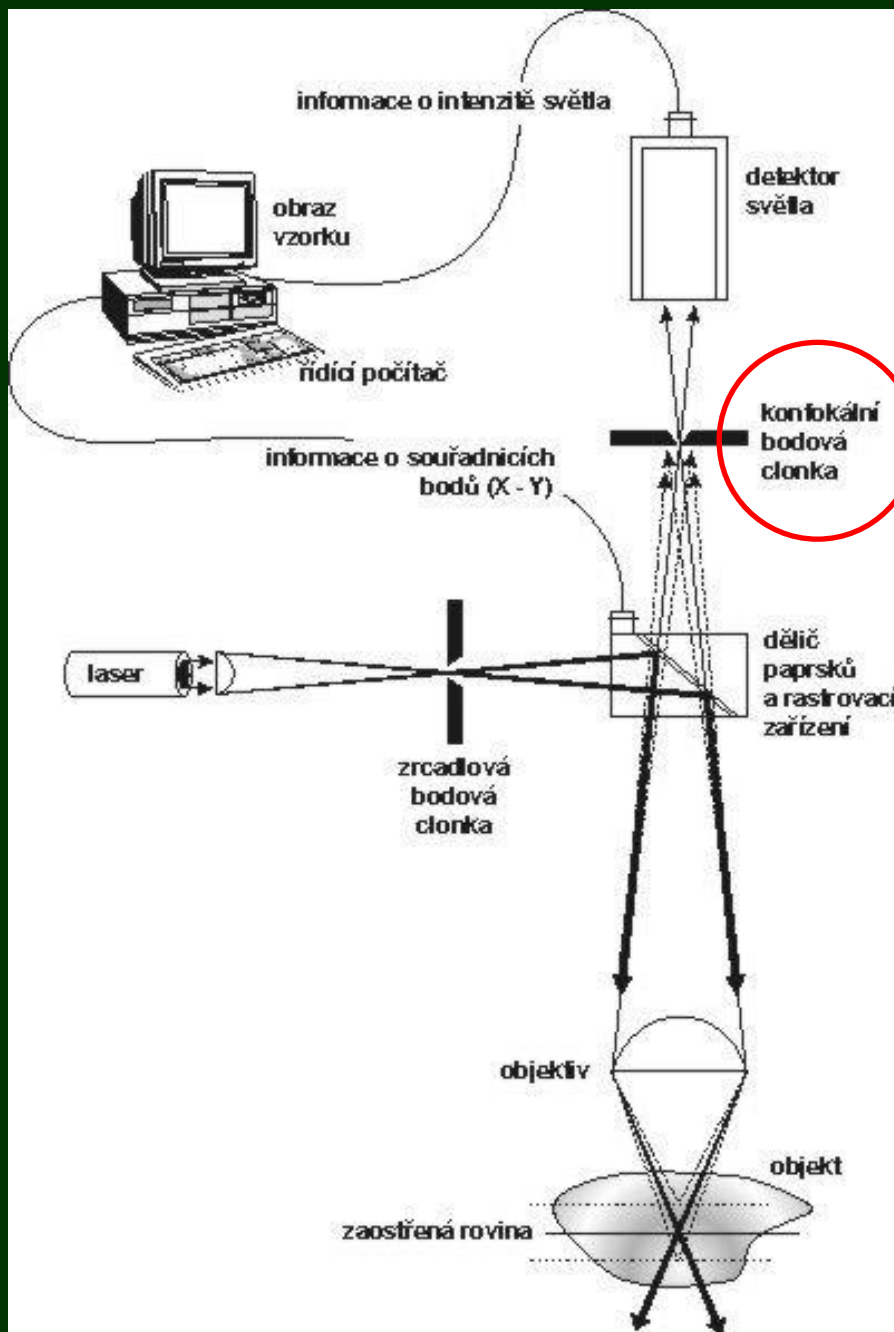
Konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskopie umožňuje sledovat objekty s vysokou rozlišovací schopností a bez rušivých vlivů právě nezaostřených rovin preparátu.

Je toho docíleno tak, že světlo vyzářené laserem směrem k preparátu prochází nejdříve úzkou štěrbinou - bodovou clonkou, která paprsek koncentruje do jednoho bodu ve vzorku. Odtud paprsky prochází do objektivu, kde je umístěna druhá clonka, která eliminuje paprsky, které nepocházejí z onoho bodu ve vzorku. Paprsky, které projdou jsou detekovány na fotonásobiči a informace o poloze a podobě jsou odeslány do počítače.

Zdrojem světla u konfokálního mikroskopu je laser (ultrafialové, infračervené nebo viditelné spektrum), který přes bodovou (konfokální) clonu a objektiv osvětluje preparát. Stejným objektivem poté prochází světlo odražené (případně emitované fluorescenční záření, pokud se jedná o fluorescenční konfokální mikroskopii). Paprsky prochází dichroickým zrcadlem a pokračují k bodové cloně, kde dochází k odfiltrování světla z jiných rovin. Nakonec paprsky vstupují do fotonásobiče, kde jsou zesíleny a detekovány.

Takto se analyzuje tolik bodů, aby byl pokryt celý vzorek a počítač mohl vytvořit výslednou podobu.



Ultrafialová mikroskopie

- Využívá jako světelný zdroj UV záření, které se vyznačuje kratší vlnovou délkou než má viditelné světlo, což **zvyšuje rozlišovací schopnost** mikroskopu.
- Pro člověka je UV záření neviditelné (ačkoliv některá zvířata jej dokáží vnímat) a proto je nutné záznam výsledného obrazu provádět fotograficky nebo pomocí speciální snímací **CCD kamery**.
- Protože běžné sklo UV záření nepropouští, je nahrazeno **optikou z křemenného skla** (případně z jiných vyhovujících materiálů).
- Až na tyto výjimky je základní uspořádání (předmět, objektiv, okulár) zachováno jako u optických mikroskopů.

Infračervená mikroskopie

- Základní charakteristika je ve využití infračerveného záření pro zobrazení předmětu.
- Infračervené záření, jehož vlnová délka se pohybuje v intervalu 760 nm - 1 mm (v IRM se používá hlavně vlnových délek v rozsahu 760-1100 nm, tzv. blízká oblast), je neviditelné a má výrazné tepelné účinky (lidské tělo je vnímá jako sálavé teplo).
- Zdrojem je wolframová žárovka
- Optika se používá zrcadlová nebo apochromatická
- Některými objekty proniká snadněji než viditelné světlo a proto ho lze využít i pro **studium silnějších preparátů**.
- Využití IRM je i v možnosti **analýzy složitých směsí, kdy složky směsi mají různé absorpční vlastnosti v infračervené oblasti**.
- Obraz je zachycen na citlivý fotografický materiál nebo pomocí specifických detektorů (neviditelný pro lidské oko)

Mikroskopická identifikace mikroorganismů

- některé morfologické znaky mikroorganismů je třeba posuzovat v mikroskopickém preparátu
- **nativní preparát:** posouzení skutečného tvaru živé buňky, pohybu bakterií atd. Vývoj a růst mikroorganismů pozorujeme v tzv. vlhké komůrce, kde jsou buňky umístěny ve visuté kapce
- **vitálně barvený preparát:** pro diferencované vybarvení některých buněčných struktur nebo k rozlišení živých a mrtvých buněk
- **negativně barvené preparáty:** mezistupeň mezi vitálními a fixovanými preparáty – pozorování nezbarvených buněk na kontrastním pozadí
- **fixované a barvené preparáty:** lepší rozlišení jednotlivých typů bezbarvých bakteriálních buněk, jejichž tvar a struktura jsou bez předchozího barvení v optickém mikroskopu málo zřetelné

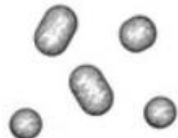
Morfologie bakteriálních buněk



COCCI



OVOID COCCI



COCOBACILLI



BACILLI(RODS)



LONG RODS



VIBRIOS



DIPHTHEROIDS



SPIRILLI



FILAMENTS



SPIROCHETES

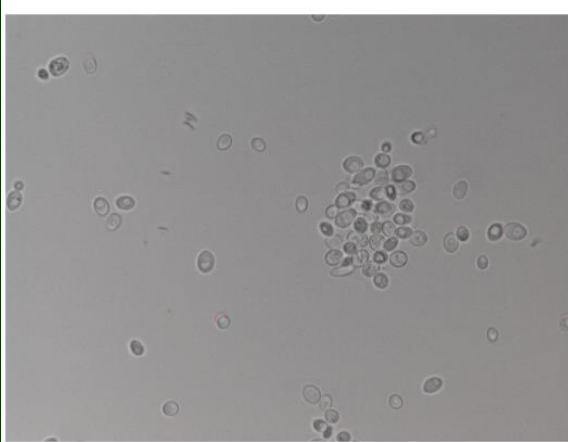
velikost: 0.3 – 10 μm

Nativní preparát

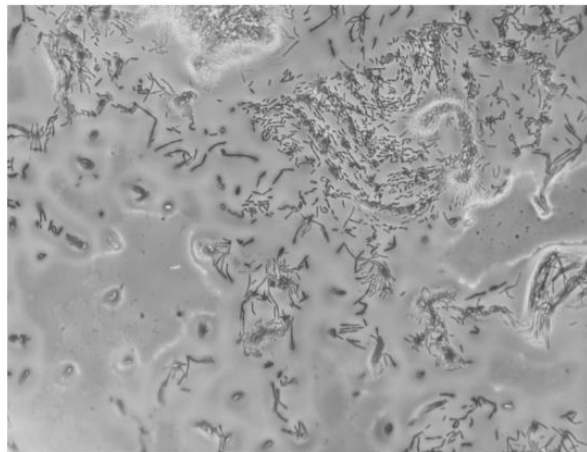
- výhoda: možnost sledovat objekt zaživa – pohyb a činnost celých buněk, organel, bičíků, membrán atd.
- nevýhoda: časové omezení, výběr materiálu omezen
- čerstvé preparáty prohlížíme ve vodě nebo ve fyziologických médiích (ta jsou přirozená: krevní sérum, amniová tekutina nebo umělá: fyz. roztok, Ringerův roztok, růstová média atd.).
- u čerstvých preparátů můžeme použít **vitální barvení** ke zvýraznění složek buňky
- bazická barviva: metylenová modř, toluidinová modř, nilská modř, neutrální červeň, Janusova zeleň, Janusova čerň
- tato barví např. vakuom, chondriom
- kyselá barviva: trypanová modř, pyrrholová modř, lithiový karmín
- hromadí se v buňce v podobě zrn

Nativní preparát v bakteriologii (nebarvený)

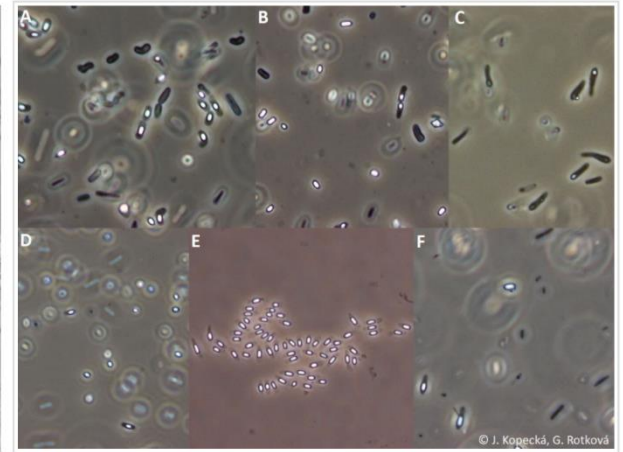
- * Podložní sklo vyjmeme z alkoholu, přidržíme nad plamenem a položíme na tmavou podložku
- * Do středu sklíčka nanese kapku sterilní vody a vyžíhanou kličkou do ní přeneseme malé množství kultury kultivované na ztuženém agarovém mediu
- * Po důkladném rozmíchání překryjeme suspenzi krycím sklem tak, aby se netvořily bublinky (k překrytí použijeme preparační jehlu nebo sklíčko držíme za hrany a opatrně pokládáme). Pokud kapalina přesahuje okraje krycího skla, odsajeme ji filtračním papírem



Obr.1: Saccharomyces cerevisiae ve světlém poli



Obr.1: Bacillus subtilis ve fázovém kontrastu



Obr. 48. Použití fázového kontrastu u sporujících bakterií; *Bacillus cereus* (A), *B. megaterium* (B), *B. sphaericus* (C), *B. subtilis* (D), *B. thuringiensis* (E), *Paenibacillus polymyxa* (F).
© J. Kopecká, G. Rotková

Vitální barvení

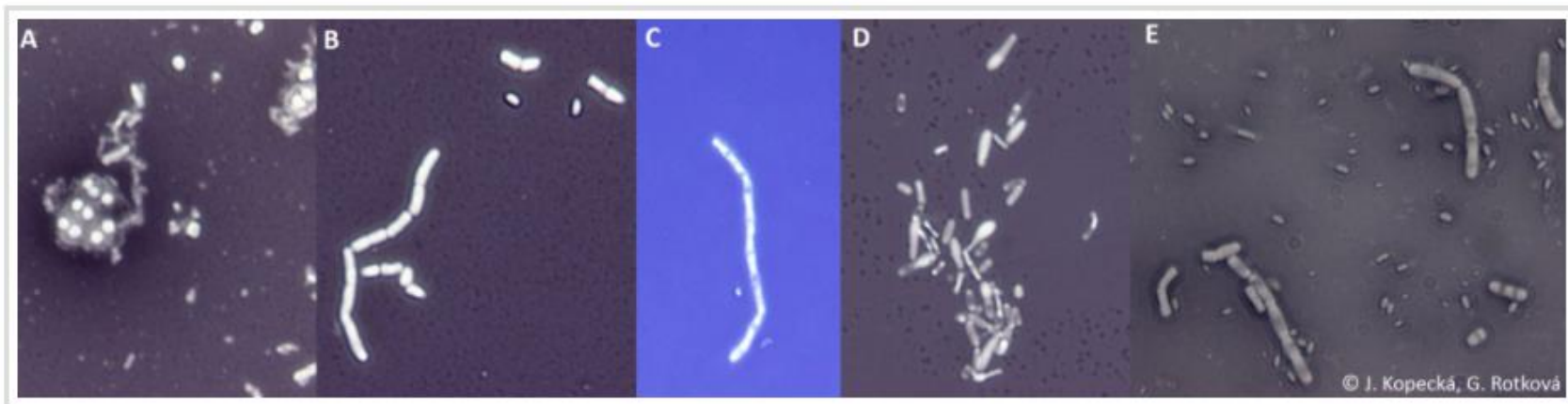
- stanovení % živých a mrtvých buněk má v praxi důležitou roli: jakost pekařského droždí, kontrola pivovarských kvasnic během technologického procesu.
- mrtvé buňky se stanoví buď přímo tzv. vitálním testem nebo nepřímo, kultivačně
- v přímém barvení: využití netoxických barviv, nejčastěji methylenová modř, barví mrtvé buňky modře, živé zůstávají nezbarveny (penetrace poškozenou BS)
- počítají se živé a mrtvé buňky ve dvaceti zorných polích vitálního preparátu, počet mrtvých buněk vyjadřujeme v % celkového počtu

Negativní barvení

- tvoří přechod mezi pozorováním nezbarvených živých organismů a fixovaným barveným preparátem.
- jedná se o obarvení pozadí, buňky zůstávají neobarvené, jejich obrysy jsou orámovány barvivem.
- k mikroskopickému stanovení pouzder a slizů, k měření velikosti bakteriálních buněk, kdy nemůžeme preparát fixovat, protože by došlo ke změně velikosti buněk a k deformaci pouzder
- barviva: nigrosin, Kongo-červeň

* 1. Barvení nigrosinem: Klička kultury bakterií se suspenduje v kapce vody na sklíčku a přidá se kapka nigrosinu. Rozmíchá se a pomocí druhého krycího sklíčka rozetře. Necháme uschnout volně na vzduchu. Nefixujeme!

* 2. Barvení Kongo-červení: Na sklíčko se kápne kapka Kongo-červeně a přímo v ní se suspendují buňky. Suspenze se rozetře po povrchu sklíčka a nechá zaschnout. Převrstvíme na několik sekund HCl, slijeme, přebytečnou HCl (neoplachujeme) , osušíme filtračním papírem a dosušíme na vzduchu.



Obr. 46 Negativní barvení nigrosinem, *Azotobacter vinelandii* (A), *Bacillus megaterium* (B), *B. mycoides* (C), *B. sphaericus* (D), *B. thuringiensis* (E)

Fixace

- rychlé vysrážení (denaturace) bílkovin protoplazmy buněk a tkání fixačními prostředky za účelem zbránění samovolného rozkladu živé tkáně/buněk
- fixační prostředky: fyzikální a chemické
- FYZIKÁLNÍ:
 - fixace teplem zasucha (bakteriologie, fix. nátěrů, několikrát protáhnout nesvítivým plamenem kahanu)
 - fixace teplem v tekutině (horká fixáž, v zoologii, např. horkým 70% alkoholem nebo horkou kys. sublimát-octovou)
 - fixace vyschnutím (krevní nátěry, prvoci, při studiu povrchových struktur)
 - fixace tkáně vysušením při nízké teplotě – Altmann-Gesh (histologie, histochemie – důkaz termolabilních látek)

Fixovaný preparát v bakteriologii

- * Podložní sklo vyjmeme z alkoholu, přidržíme nad plamenem a položíme na tmavou podložku blízko plamene
- * Do středu sklíčka nanese kapku sterilní vody a vyžíhanou kličkou do ní přeneseme malé množství kultury
- * Po důkladném rozmíchání suspenze zhotovíme pomocí sterilní kličky nebo druhého podložního skla nátěr o ploše cca 2 cm²
- * Preparát necháme volně na vzduchu uschnout a fixujeme

Fixace:

Účelem fixace je usmrcení buněk, neboť mrtvé buňky lépe přijímají barvivo, a zároveň přilnutí buněk k podložnímu sklu, aby nebyly během barvicí procedury odplaveny. Bakterie fixujeme zpravidla plamenem, mikroskopické houby a kvasinky většinou chemicky (etanol, aceton). Fixace plísňů a kvasinek se provádí pouze při speciálních typech barvení a její postup bývá součástí barvicí metodiky.

Fixace plamenem: Sklíčko se zaschlým nátěrem třikrát protáhneme nesvítivým plamenem kahanu tak, aby bakteriální kultura byla umístěna na horní straně sklíčka.

Po vychladnutí barvíme.

Chemická fixativa

- roztoky jedné nebo více chem. sloučenin anorg/org původů = fixační tekutina/směs
- někdy i páry (formaldehyd, kys osmičelá)
- požadavky: rychlý průnik do objektů, zachování struktury objektu, zachování barvitelnosti

Obecný postup

- kousek tkáně (bloček) vložíme do fix. tekutiny
- fixujeme materiál co nejčerstvější
- fix. objekt nemá mít větší rozměry než krychlička o hraně 1 cm, větší rozměry – injekce tekutiny do tkáně
- fix. tekutiny musí být dostatečné množství, min. 50x více než je objem fix. objektu
- fix. tekutina musí mít přístup k objektu ze všech stran (na dno nádoby vata, filtr. papír...)

Čtyři skupiny fixačních činidel

- 1. minerální kyseliny (kys. chromová, osmičelá)
- 2. soli kovů (dvojchroma draselný, chlorid rtuťnatý –sublimát)
- 3. organické kyseliny (kys. octová ledová, kys. trichloroctová, kys. pikrová)
- 4. organické redukční prostředky (formaldehyd, etanol, metanol, aceton)

fixační směsi:

-alkohol-formaldehyd-kys. octová, sublimát-alkohol (podle Schaudina), sublimát-formaldehyd-kys. octová (podle Stieveho), sublimát-kys. octová, Zenkerova fixáž, fixační směsi s kys. pikrovou (Bouinova fixáž), fix. směsi s kys. chromovou, fix. směsi s chloroformem (Carnoy), fix. směsi s kys. osmičelou (Flemmingova fixáž)

Barvení

- cílem zvýraznit některé struktury
- selektivní neboli specifické barvení
- molekula barviva se skládá ze dvou složek: chromoforu a auxochromu
- chromofor: ta část, kde je skupina atomů schopných absorpce světla viditelné části spektra světelného záření
- auxochrom: ta část, co se spec. váže na substrát (iontová, kovalentní vazba)

Barviva dle chromoforů:

- NO₂ (nitro)
- N=O (nitroso)
- N= (Indamin)
- N=N= (azo)
- chininová konfigurace

Barviva dle auxochromů

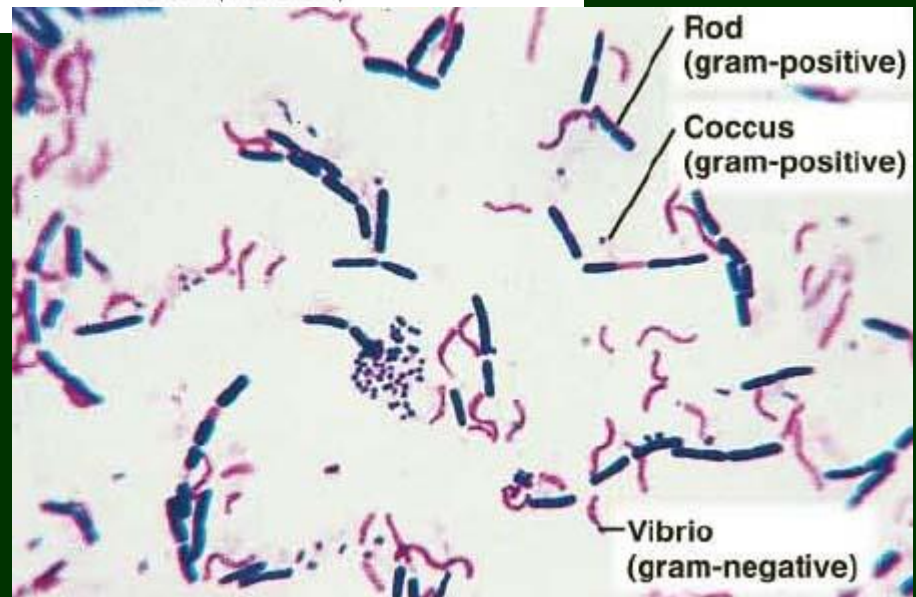
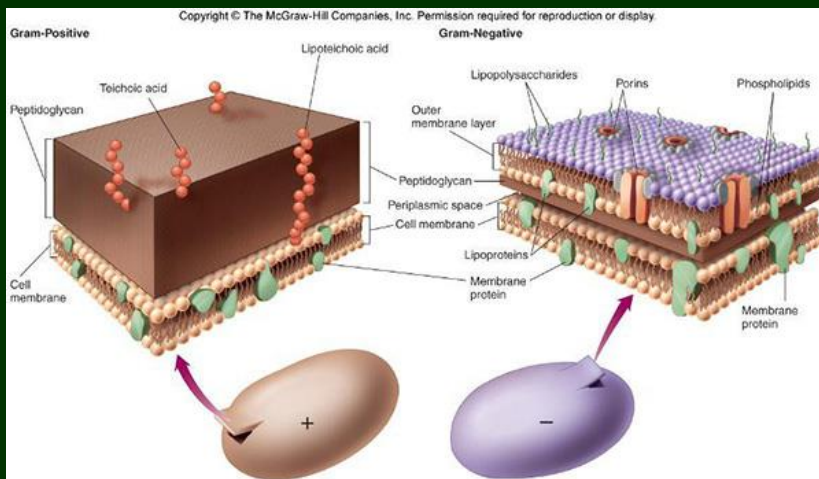
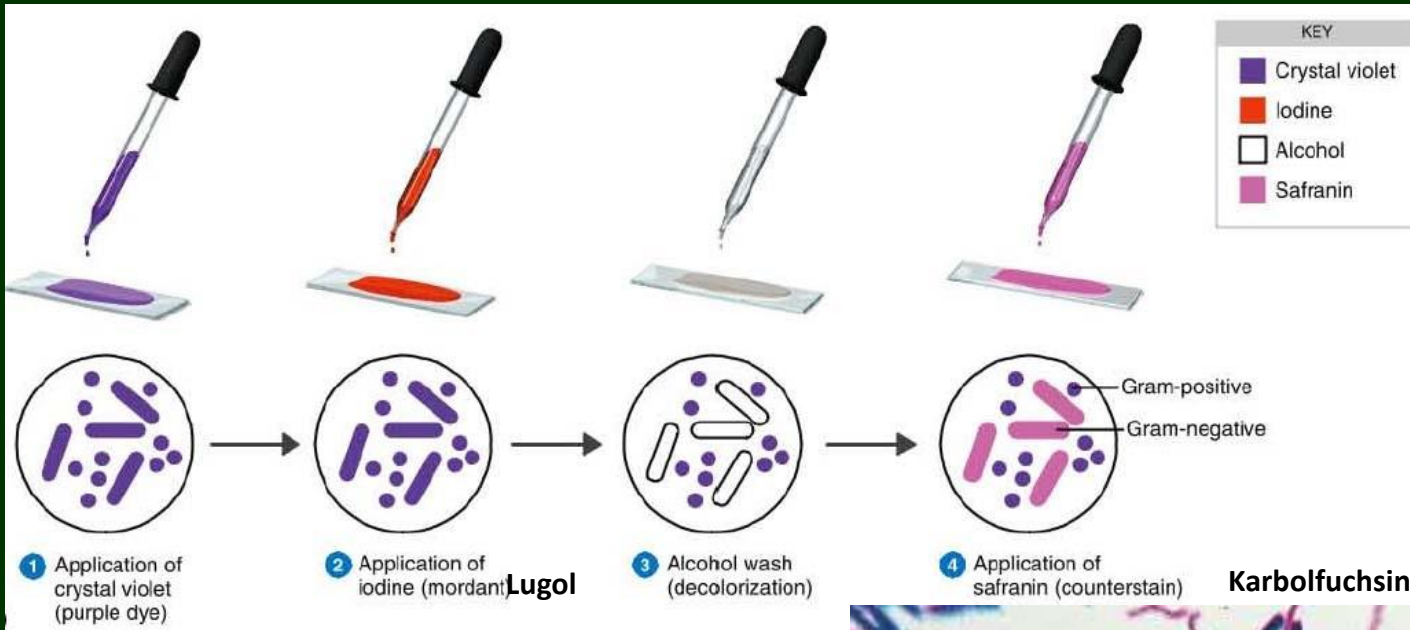
- kyselá (anionická – chromogen + kyselinotvorná skupina), např. eosin
- bazická (kationická – chromogen + bazotvorné skupiny), anpř. mehylen. modř
- neutrální (sůl složenou z barevné báze a barvené kyseliny)

Způsoby barvení

1. Progresivní (objekt barvíme do žádaného odstínu, pak barvení ukončíme, např. Mayerův kamencový karmín)
2. Regresivní (objekt přebarvíme, přebytečné barvivo extrahujeme, např. solný karmín, boraxový karmín)
3. Sukcedánní (objekt obarvíme dvěma nebo více barvivy po sobě, každé barví jinou složku buňky, např. hematoxylin a eosin)
4. Simultánní (objekt barvíme současně dvěma nebo více barvivy rozpuštěnými v témže roztoku, např. Giemsa)
5. Orthocheomatické (barvíme různými odstíny jedné barvy, např. kys. pikrová)
6. Metachromatické (urč. složky tkáně se barví jiným odstínem než má barvivo, např. thionin (modrý/fialový) barví mezibuněčnou hmotu chrupavky a hlen načervenalé)

Barvení podle Grama

- jedná se o regresivní barvení
- provádí se jak pro barvení suchých roztěrů tak pro barvení řezů (studium bakterií v tkáni)



Barvení řezů (Gram-Weigertova metoda)

- před zaléváním do parafinu tkáň **fixovat** např. formaldehydem
- po prosycení řezů vodou **jádra** slabě předbarvíme kamencovým **hematoxylinem**
- oplachováním vodou diferencujeme tmavě fialovou barvu do barvy modré
- **cytoplasmu** buněk předbarvíme po dobu 1-5 min žlutým, ve vodě rozpustným **eosinem** (0.5 až 1%)
- preparát opláchneme vodou
- barvíme 5 až 10 min genciálovou violetí, na rozdíl od metody barvení roztěrů ZA STUDENA
- oplach vodou
- 5 min prosycení Lugolovým roztokem
- oplach, osušit filtračním papírem
- osušený diferencujeme a současně odvodňujeme směsí anilinového oleje a 90% akoholu v poměru 1:1
- převedeme **do karbol-xylenu**
- dokonale odvodníme v karbol-xylenu
- **převedeme do xylenu**
- **montujeme do kanadského balzámu**

Při diferenciaci vzdorují odbarvení alkoholem všechny objekty nebo struktury s bazickou bílkovinnou složkou, která má schopnost pevně vázat jód (jodofilní struktury). Metoda je běžně používána v bakteriologii pro rozlišení G+ a G-. V cytologii např. k barvení chromozomů, kde jód se váže na bazických bílkovinách – histonech.

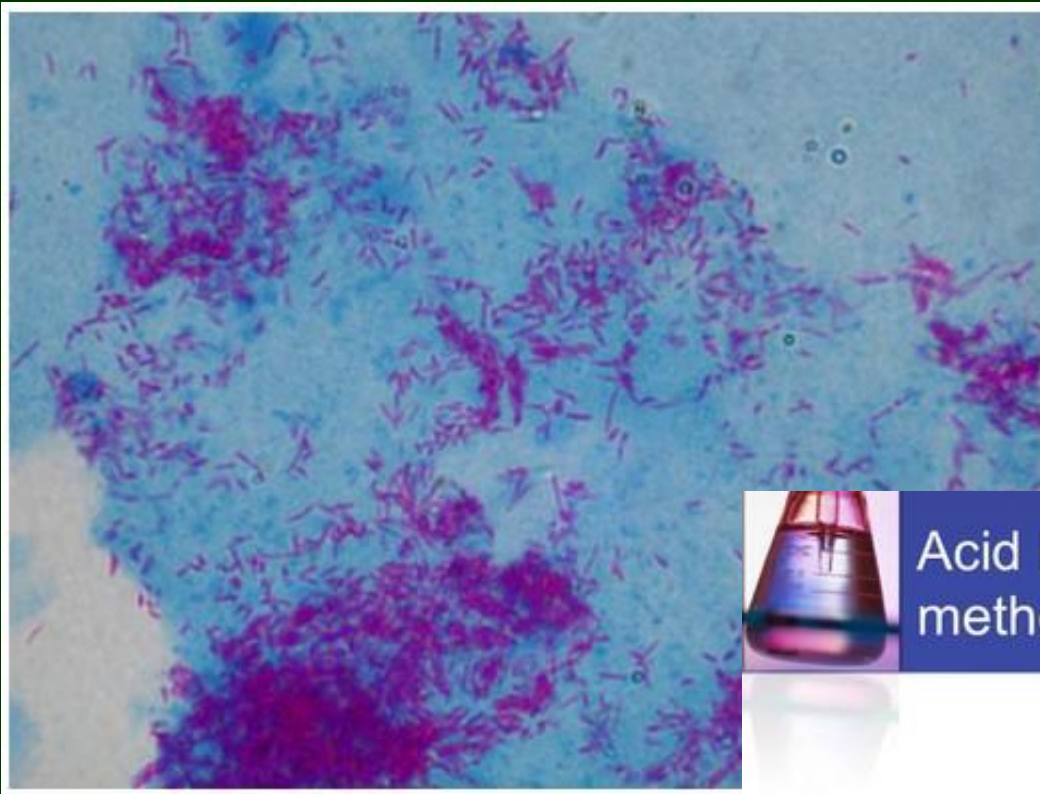
Ziehl–Neelsen stain (acid fast staining)

The Ziehl–Neelsen stain, also known as the acid-fast stain, was first described by two German doctors: the bacteriologist Franz Ziehl (1859–1926) and the pathologist Friedrich Neelsen (1854–1898).

It is a special bacteriological stain used to identify acid-fast organisms, mainly Mycobacteria. Mycobacterium tuberculosis is the most important of this group because it is responsible for tuberculosis .

Acid fast organisms like Mycobacterium contain large amounts of lipid substances within their cell walls called **mycolic acids**. These acids resist staining by ordinary methods such as a Gram stain. It can also be used to stain a few other bacteria, such as Nocardia. The reagents used are Ziehl–Neelsen **carbol fuchsin, acid alcohol, and methylene blue**. Acid-fast bacilli will be bright red after staining.

Initially, Carbol Fuchsin stains every cell. When they are destained with acid-alcohol, only non-acid-fast bacteria get destained since they do not have a thick, waxy lipid layer like acid-fast bacteria. When counter stain is applied, non-acid-fast bacteria pick it up and become blue when viewed under the microscope. Acid-fast bacteria retain Carbol Fuchsin so they appear red.



Acid fast stained mycobacteria



Acid Fast Stain (aka Ziehl-Neelsen method)

Acid-Fast



Heat + Fuchsin

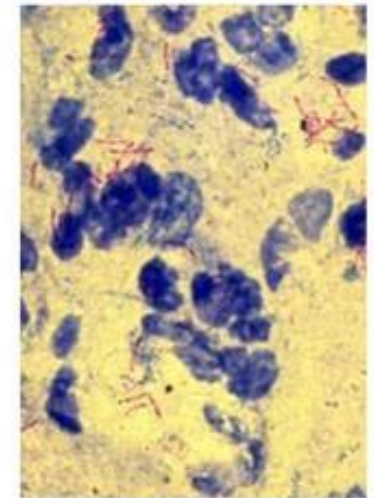


Acid alcohol



Methylene blue

Non-AF



*Mycobacterium
Tuberculosis*

Barvení pouzder (kapsulí)

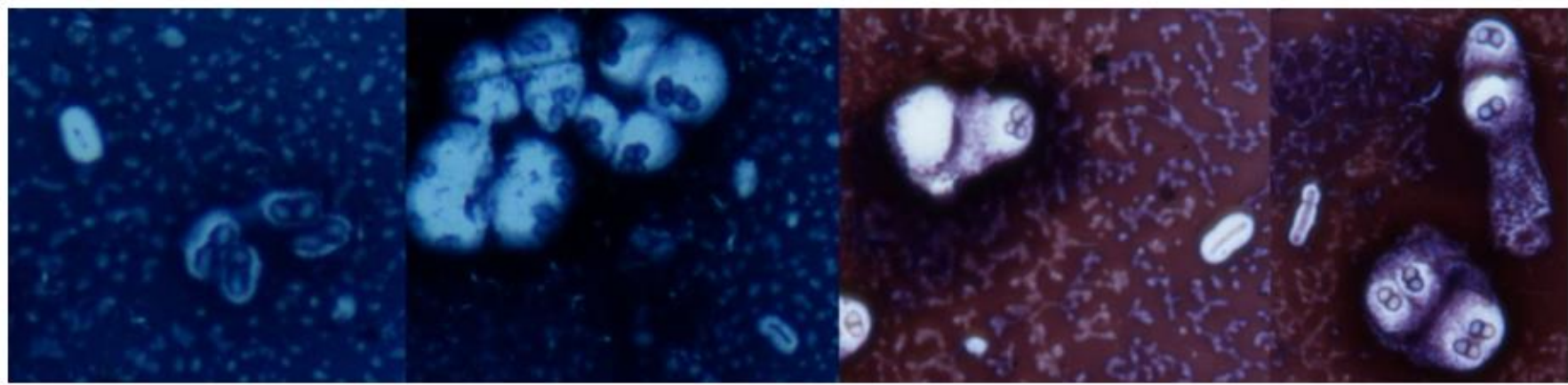
- některé druhy bakterií tvoří za vhodných podmínek slizovité obaly kolem svých buněk (např. *Azotobacter* sp)
- jsou složeny z polysacharidů, silně hydratované a chrání buňku proti nepříznivým podmínkám.
- sliz. obaly se vyskytují ve formě ostře ohraničených pouzder (kapsulí) nebo se difuzně zředují do prostředí.
- na agarových vrstvách rostou takové bakterie ve formě mukózních kolonií
- tato forma může spontánní mutací přecházet na formu, která sliz netvoří
- polysacharidové obaly znesnadňují izolaci bakterií, neboť se na nich zachycují buňky jiných druhů.
- důkaz tvorby pouzder je založen na špatném pronikání některých sloučenin slizovou vrstvou

1.metoda: Do kapky dest. vody na podložním sklíčku se přenese malé množství kultury *Azotobacteria* z nahromadovací půdy. Promíchá se a suspenze se rozetře po povrchu sklíčka. Nechá se uschnout volně na vzduchu. Nefixovat! Barvíme horkým karbolfuchsinem, kterým sklíčko převrstvíme a opatrně zahříváme nad plamenem do výstupu par, 1-2 minuty. Opláchneme vodou a negativně obarvíme nigrosinem, který se kápne do rohu sklíčka a rozetře do tenké vrstvy. Rychle osušíme, např. vysoušečem na vlasy, aby se buňky neodbarvily.

- pozorujeme pod imerzí: červené buňky, růžová pouzdra, šedé pozadí

2.metoda: Připravíme preparát *Azotobacteria* negativně obarvený Kongo-červení (viz předchozí úloha) a buňky obarvíme metylenovou modří - preparát se převrství na 3 minuty, potom se slije a usuší volně na vzduchu.

- pozorujeme pod imerzí: modré buňky, světlá pouzdra, modré pozadí



Obr. 47 Negativní barvení zástupců rodu *Azotobacter*

Barvení spór

- některé rody bakterií (např. Bacillus, Clostridium) mohou vytvářet klidové formy zvané spóry (mohou vznikat pouze uvnitř buňky, označují se také jako endospory).
- povrch spór je tvořen silným, špatně propustným obalem, proto jsou velice odolné vůči působení nepříznivých vlivů a toxických látek a také obtížně barvitelné
- v preparátech barvených běžnými technikami zůstávají neobarvené, vybarví se pouze jejich obal.
- proto se barví po předchozím moření nebo za tepla pomocí silných barviv potom se těžko odbarvují kyselinami (acidorezistence) i jinými sloučeninami
- barviva pro barvení spór: eozin, kongo-červeň nebo neutrální červeň, malachitová zeleň, safranin, karbolfuschin, metylenová modř
- kyseliny pro moření a odbarvování: 5% kys. chromová, 5% kys. sírová

Examples of endospore-forming bacteria include the genera:

- *Acetonema*
- *Actinomyces*
- *Alkalibacillus*
- *Ammoniphilus*
- *Amphibacillus*
- *Anaerobacter*
- *Anaerospora*
- *Aneurinibacillus*
- *Anoxybacillus*
- *Bacillus*
- *Brevibacillus*
- *Caldanaerobacter*
- *Caloramator*
- *Caminicella*
- *Cerasibacillus*
- *Clostridium*
- *Clostridiisalibacter*
- *Cohnella*
- *Dendrosporobacter*
- *Desulfotomaculum*
- *Desulfosporomusa*
- *Desulfosporosinus*
- *Desulfoviregula*
- *Desulfunispora*
- *Desulfurispora*
- *Filifactor*
- *Filobacillus*
- *Gelria*
- *Geobacillus*
- *Geosporobacter*
- *Gracilibacillus*
- *Halobacillus*
- *Halonatronum*
- *Heliobacterium*
- *Heliophilum*
- *Laceyella*
- *Lentibacillus*
- *Lysinibacillus*
- *Mahella*
- *Metabacterium*
- *Moorella*
- *Natroniella*
- *Oceanobacillus*
- *Orenia*
- *Ornithinibacillus*
- *Oxalophagus*
- *Oxobacter*
- *Paenibacillus*
- *Paralibacillus*
- *Pelospira*
- *Pelotomaculum*
- *Piscibacillus*
- *Planifilum*
- *Pontibacillus*
- *Propionispora*
- *Salinibacillus*
- *Salsuginibacillus*
- *Seinonella*
- *Shimazuella*
- *Sporacetigenium*
- *Sporoanaerobacter*
- *Sporobacter*
- *Sporobacterium*
- *Sporohalobacter*
- *Sporolactobacillus*
- *Sporomusa*
- *Sporosarcina*
- *Sporotalea*
- *Sporotomaculum*
- *Syntrophomonas*
- *Syntrophospora*
- *Tenuibacillus*
- *Tepidibacter*
- *Terribacillus*
- *Thalassobacillus*
- *Thermoacetogenium*
- *Thermoactinomyces*
- *Thermoalkalibacillus*
- *Thermoanaerobacter*
- *Thermoanaeromonas*
- *Thermobacillus*
- *Thermoflavimicrobium*
- *Thermovenabulum*
- *Tuberibacillus*
- *Virgibacillus*
- *Vulcanobacillus*

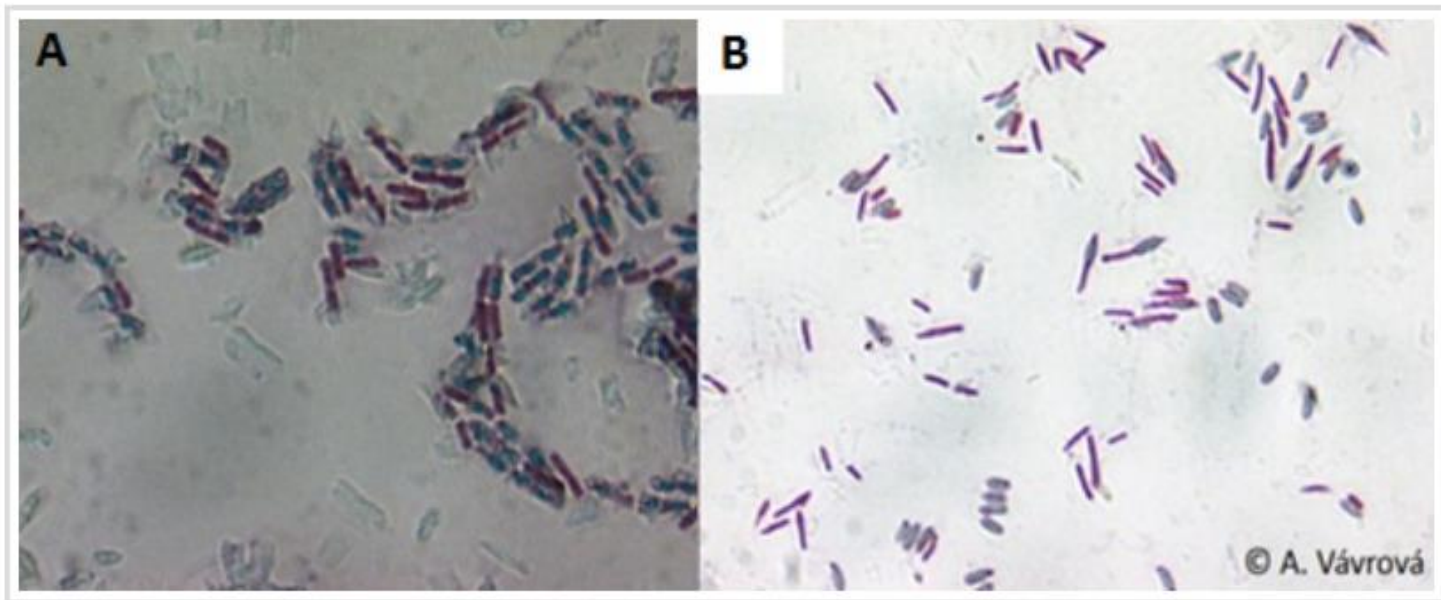
Preparát se připraví běžným způsobem, po uschnutí se fixuje a barví:

1. Metoda:

- nátěr se převrství malachitovou zelení, nad kahanem zahřeje do výstupu par a potom za stálého přihřívání a doplňování barviva barví 5 min. Pak opláchnout vodou, dobarvit kontrastním barvivem – eozinem, kongo-červení nebo neutrální červení. Znovu se opláchne a usuší na vzduchu.
- spory jsou zbarveny zeleně, zbylý obsah červeně

2. Metoda:

- nátěr moříme 10 min kys. chromovou, opláchneme vodou, pokryjeme karbolfuchsinem a zahříváme nad mírným plamenem do výstupu par, barvivo nesmí vyschnout.
- po zchladnutí se opláchne vodou a odbarvuje 5% kys. sírovou, pak znovu opláchneme vodou.
- odbarvené vegetativní buňky se dobarví methylenovou modří, preparát opláche vodou a usuší na vzduchu
- spory jsou červené, zbytek buňky modrý



Obr. 49 Endospory *Bacillus cereus* (A) a *Paenibacillus alvei* (B) obarvené Schaeffer-Fultonovou metodou

Trvalý preparát

- celkové (totální)
- nátěry (roztěry), roztlakové preparáty, otisky
- řezové preparáty (prosycení parafinem nebo celoidinem a krájení na mikrotomech)

Uzavírací média – s vodou mísitelná a s vodou nemísitelná

Uzavírací média s vodou mísitelná – jde o objekty neobarvené, někdy vhodné projasnění, ta co zůstávají tekutá, nutno rámovat např. du Noyerovým tmelem, lak na nehty

Média: glycerol (N = 1,4), glycerol-želatina, Liquido Faure (tuhne, netřeba rámovat), Amannum lactofenol, Liquido de Swane

Uzavírací média s vodou nemísitelná (dobrá projasňovací prostředí, k uzavírání barevných i barvených preparátů, dobře tuhnou, netřeba rámovat)

Média: (kanadský balzám, solakryl, pryskyřice dammara, fenol-alkohol)

Kanadský balzám: původně pryskyřice ze severoamerické jedle, dnes příprava synteticky. Rozpustnost v org. solventech (xylen, benzen, chloroform, terpentýn). Vysoký index lomu N = 1,535. Dobře projasňuje. Preparáty v něm vydrží neomezeně dlouho. Pomalu tuhne, uchovávat vodorovně.

Dnes další prostředky: mowiol (polyvinylalkohol) nebo glycerol + DABKO (Glycerol s 1, 4-Diazobicyclo-2,2,2-octane), obě s vodou mísitelné

Trvalý preparát v bakteriologii

Pokud si potřebujeme obarvený preparát bakterií uchovat jako srovnávací a dokladový materiál, zhotovíme si trvalý preparát.

Postup:

- * Po mikroskopické kontrole odstraníme imerzní olej opláchnutím preparátu xylenem a vysušíme na vzduchu
- * Na nátěr nanese malé množství kanadského balzámu, přikryjeme odmaštěným krycím sklem, jemně zatížíme, aby balzám vyplnil celý prostor mezi podložním a krycím sklem. Stejněměrný tlak by měl trvat alespoň 10 minut.
- * Preparát necháme vyschnout na temném, bezprašném místě dva až tři týdny. Potom odstraníme přebytek zaschlého balzámu kolem okrajů krycího skla, preparát uchováváme v suchu a temnu.

Suché roztěry

- nanese se na sklíčko a rozetře se
- po zaschnutí fixujeme chemicky (metanol, formaldehyd) nebo tepelně nad kahanem (bakteriologie)
- barvíme pomocí Gramovy metody nebo Giemsa-Romanowski

Vlhké roztěry

- spíše pro detailní cytologické studie prvoků, střevních, kožních parazitů, spermatogeneze atd.
- preparáty nesmějí během celé doby vyschnout
- barvení Heidenhainovým železitým hematoxylinem, Mannovou metodou aj.

Roztlaky

- tkáň se tlakem rozprostře do plochy, buňky se rozvolní a jsou dobře pozorovatelné
- hlavně v karyologii
- barvení acetobarvivy (rozpuštěné v kys. octové) např. acetokarmínem nebo acetoorceinem.

Řezové preparáty

- pro studium bakterií v tkáních, pro studium histologických a histopatologických změn způsobených patogenním organismem/virem
- řezy se provádějí pomocí mikrotomů – tloušťka řezů 3 až 10 μm
- postup: a) odběr vzorku, b) fixace, c) vypírání fixace, d) zalití do parafinu nebo jiného média na krájení řezů, e) vlastní řezání f) odparafinování

Zalévání do parafinu

- princip spočívá v přesycení odvodněného objektu parafinem zahřátým na 56 až 58 $^{\circ}\text{C}$. Parafin vyplní mikroskopické prostory, možno proto dělat velmi tenké řezy.
- nevhodné pro řezání tvrdých tkání (šlach, chrupavek, kostí) a tkání, ve kterých máme dokazovat lipidy (extrakce lipidů organickými solventy).

Postup:

1. odvodňování
2. prosycení intermediem a směsí intermedia (rozpuštědla s parafinem a parafinem)
3. prosycování tkáně parafinem a zalití do čistého parafinu.

Odvodňování

- odvodňujeme vzestupnou alkoholovou řadou

Přehled odvodňování (podle Vacka, 1988):

alkohol	bloček menší než $0,5 \text{ cm}^3$	bloček do 1 cm^3	bloček větší než 1 cm^3
70%	2 hod.	2 hod.	4 hod.
80%	2 hod.	4 hod.	6 hod.
96%	6 hod.	6 hod.	6 hod.
100% I.	1 hod.	2 hod.	4 hod.
100% II.	1 hod.	2 hod.	4 hod.
100% III.	1 hod.	2 hod.	4 hod.

Prosycení intermediem a parafinem

- odstranění alkoholu z tkáně a nahrazení parafinem
- prosycení látkou, která dobře rozpouští parafin a mísí se s alkoholem
- taková látka se nazývá intermedium
- intermedia: xylen, benzen, chloroform, tetralin, metylbenzoát, cedrový olej, thyosalicylát, butanol
- intermedia jsou látky s nižším bodem varu, odstraňují se odpařením v termostatu (benzen, xylen, chloroform) nebo látky s vyšším bodem varu, které se úplně odstranit nedají, ale s parafinem tvoří dobře řezatelnou hmotu (methylbenzoát a další).

Prosycení parafinem a zalití

- teplota v termostatu při prosycení parafinem má být o 2 °C vyšší než bod tání použitého parafinu.
- parafin je v nádobkách I, II, III, číslo III je nejčistší parafin

Odvodnění vzestupnou alkoholovou řadou	Teplota	Čas
benzen I	pokožová	10-15 min
benzen II	pokožová	10-15 min
benzen III	pokožová	10-15 min
benzen-parafin	40°C	1/2-1 hod
parafin I	58°C	2-4 hod
parafin II	58°C	4-6 hod
parafin III	58°C	8-12 hod
vlastní zalití		

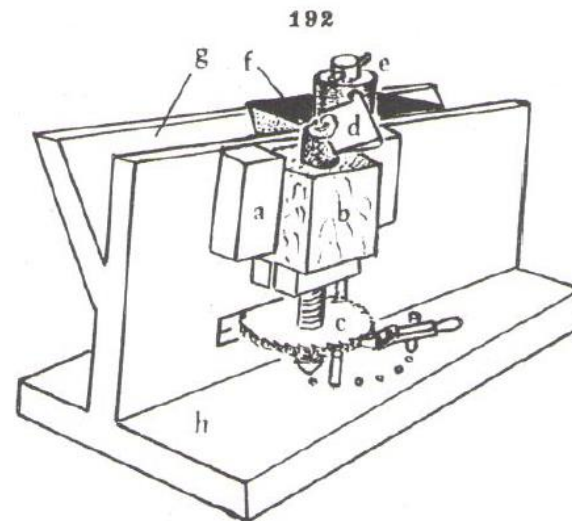
Řezání tkáňových bločků

- provádíme na speciálních přístrojích MIKROTOMECH
- existují tři typy- sáňkový, rotační a zmrazovací

Sáňkový mikrotom: pro řezy parafinové, celoidinové, celodanové

Rotační mikrotom: pouze pro parafinové řezy

Zmrazovací: pro řezání objektů ztuhlých při nízké teplotě



Obr. 47:

Schéma sáňkového mikrotomu: a = neapolská svorka k uchycení špalíčku s bločkem, b = špalíček s přitmeleným parafinovým bločkem, c = mikrometrický šroub pro nastavení a posouvání tloušťky řezů, d = mikrotomový nůž, e = svorka k uchycení mikrotomového nože, f = sáň s mikrotomovým nožem, g = vodící dráha pro sáň, h = litinový podstavec. Text viz str. 93-94.

Na zmrazovacím mikrotomu se řežou buď tkáně nezalité nebo zalité do želatiny, zmrazené pomocí pevného CO₂

Použití pro rychlou histologickou diagnostiku, na řezání tkání, které nemohou být zality do parafinu ani celoidinu (řídke tkáně nebo důkaz lipidů) nebo při některých histochemických vyšetřeních (např. enzymy).

Řezání parafinových bločků:

1. přitavení parafinového bločku na podložku, kterou upínáme do neapolské svorky mikrotomu
2. nasazení nože
3. upevnění podložky s bločkem do neapolské svorky
4. vlastní řezání, zachycování a snímání řezů z nože
5. lepení řezů (natažení řezů a nalepení na podložní sklo)
6. odparafinování (xylen – sestupná alkoholová řada 100% - 96% - 70% - destilovaná voda)

Barvení eosináty methylenového azuru, violeti a modři podle Giemsy-Romanowského

Rozotky: metanol a barvivo (Giemsovo barvivo, komerčně dostupné)

- čerstvý roztěrový preparát necháme na vzduchu oschnout
- suchý roztěr fixujeme 3 min metanolem
- osušíme filtračním papírem a necháme doschnout na vzduchu
- preparát umístíme na skleněné tyčinky do Petriho misky tak, aby byl roztěrem obrácen ke dnu misky. Do misky nalejeme 10 mL destilované vody, do které nakapeme 0,2 mL Giemsova barviva. Dobarvíme 30 minut.
- po obarvení stříčkou s destilkou preparát opláchneme
- osušíme filtračním papírem a dosušíme na vzduchu. Neuzavíráme do kanadského balzámu.

Použití: Je nejčastěji využíváno v protozoologii ke znázornění prvoků a k barvení krevních roztěrů. Používá se však také k barvení některých bakterií či velkých virů.

Barvení pro histologické studie v bakteriologii a virologii

1. Weigert van Giesonovo barvení

- železitý hamatoxylin Weigertův
- pikrofuchsin
- kyselina fosforwolframová

Materiál před barvením fixujeme vhodnou fixáží

- řezy prosycené vodou barvíme Weigertovým železitým hamatoxylinem
- vypíráme v tekoucí vodě, oplach destilkou
- moříme v 5% kys. fosfowolframové
- oplach destilkou, barvíme pikrofuchsinem
- oplach 80% alkoholem, převézt do 96% alkoholu a pak 100% alkoholu
- projasníme xylenem a uzavíráme do kanadského balzámu

Použití: pro přehledné histologické preparáty, též v embryologii. Jádra buněk modročerně až hnědočerně, kolagenní vazivo třešňově červeně, svalová tkáň žlutě, erytrocyty žlutě

2. Trichromatické barvení podle Malloryho

Barvivo I: 1% kyselý fuchsin

Barvivo II: anilinová modř, oranž G, kys. šťavelová, destilovaná voda

Roztok III: = fixativ barviva I, 1% kys. fosfomolybdenanová

Materiál fixujeme sublimátovými fixážemi

- v barvivo I barvíme 3 min
- oplach v destilce, fixujeme v roztoku III 3 až 5 min
- oplach v destilce, barvíme v barvivo II 2 min
- oplach v destilce, diferencujeme v 96% alkoholu
- odvodnit ve 100% alkoholu, projasnit v xylenu a uzavírat do kanadského balzámu.

Použití: polychromatické obarvení řezových preparátů. Buněčná jádra červeně nebo oranžově, jádérka oranžově nebo žlutě, vaziva, sliz a sekrety modře.

3. Oranž-eosin-toluidinová modř podle Dominiciho (sukcesivní barvení)

Barvivo I: eosin žlutý, oranž G, destilovaná voda

Barvivo II: toluidinová modř 0,5%

Fixace řezů nebo vlhkých roztěrů sublimátovými fix. prostředky

- řezy nebo roztěry barvíme 15 až 30 min v barvivo I
- oplach v destilce a krátce barvit v roztoku II
- oplach v destilce, diferencovat v 96% etanolu, až modrá zůstanou jen buněčná jádra (z preparátu se přestanou uvolňovat modré obláčky toluidinové modře)
- odvodníme 100% etanolem a převedeme do kanadského balzámu

Použití: polychromatické barvení řezů a vlhkých roztěrů. Chromatin modře, nukleoly červeně, sekrety modře. Doporučuje se při studiu buněčných jader, krevních elementů ve tkáních na řezech a při studiu bakterií v řezech.

Heidenhainův železitý hematoxylin

Roztok I: 5% vodný roztok kamence železito-amonného (mořidlo)

Roztok II: 10% alkoholický roztok hematoxylinu a dest. vody

Roztok III: 2% vodný roztok kamence železito-amonného (diferenciační roztok)

Použití: na řezech a vlhkých roztěrech se zbarví sytě černě jádra, jadérka, chromozomy, mitochondrie, centrozom, bičíky, bazální tělíska.

4. Erlichův kyselý hematoxylin

Reagenty: hematoxylin, 100% etanol, ledová kys. octová, glycerol, kamenec draselný, dest. voda

Před řezáním a barvením materiál fixujeme libovolnou fixází kromě fixází s OsO₄

- vodou prosycené řezy nebo roztěry barvíme v připraveném roztoku několik minut.
- obarvené řezy umístíme do kyvety, kterou necháme pomalu protékat vodu, až jádra buněk mají sytě modrou barvu
- pomocí 0,1% eosinem nebo van Giesonem dobarvíme cytoplasmu
- řezy odvodníme a uzavřeme do kanadského balzámu

Použití: vhodné pro barvení totálních preparátů, řezů i roztěrů. Modré zbarvení buněčných jader a chromatinu

5. Kamencový karmín podle Mayera

Diferenciační roztok: 0,5% síran hlinitodraselný

Barvivo: kys. karmínová, kamenech draselný, dest. voda, kys. salicylová

Před barvením prosycujeme objekty (fixované sublimáty) vodou. Metoda je vhodná pro barvení totálních i řezových preparátů.

Řezy:

- barvníme 15 min
- odmýt ve vodě
- diferenciaci v kamenci draselném až do zřetelného vystoupení jader (kontrolujeme pod mikroskopem)
- odmýt
- odvodnit a zalít do kanadského balzámu

Barvení eosináty methylenového azuru, violeti a modři podle Giemsy-Romanowského

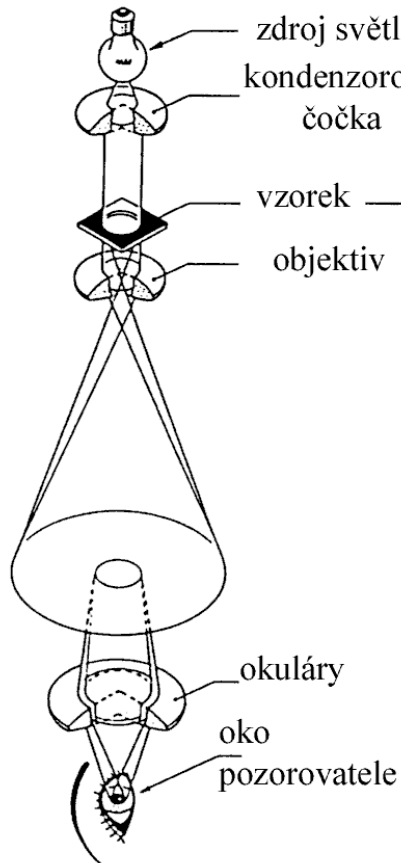
Rozotky: metanol a barvivo (Giemsovo barvivo, komerčně dostupné)

- čerstvý roztěrový preparát necháme na vzduchu oschnout
- suchý roztěr fixujeme 3 min metanolem
- osušíme filtračním papírem a necháme doschnout na vzduchu
- preparát umístíme na skleněné tyčinky do Petriho misky tak, aby byl roztěrem obrácen ke dnu misky. Do misky nalejeme 10 mL destilované vody, do které nakapeme 0,2 mL Giemsova barviva. Dobarvíme 30 minut.
- po obarvení stříčkou s destilkou preparát opláchneme
- osušíme filtračním papírem a dosušíme na vzduchu. Neuzavíráme do kanadského balzámu.

Použití: Je nejčastěji využíváno v protozoologii ke znázornění prvoků a k barvení krevních roztěrů. Používá se však také k barvení některých bakterií či velkých virů.

Elektronová mikroskopie

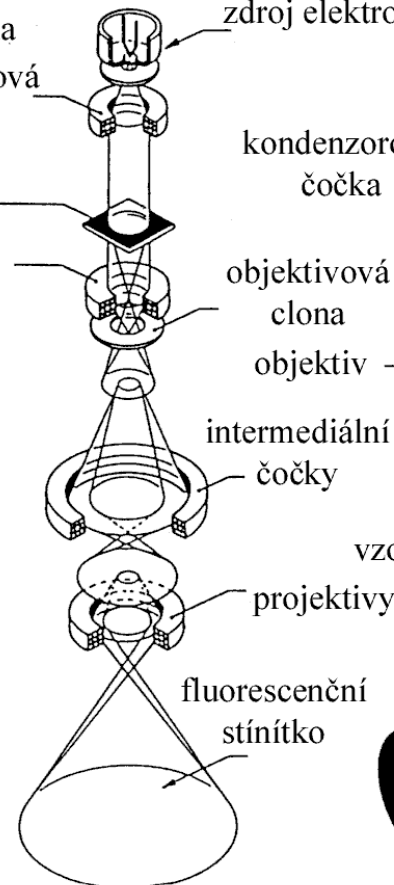
Světelný mikroskop



Rozlišení 200 nm

Zvětšení ~×2000

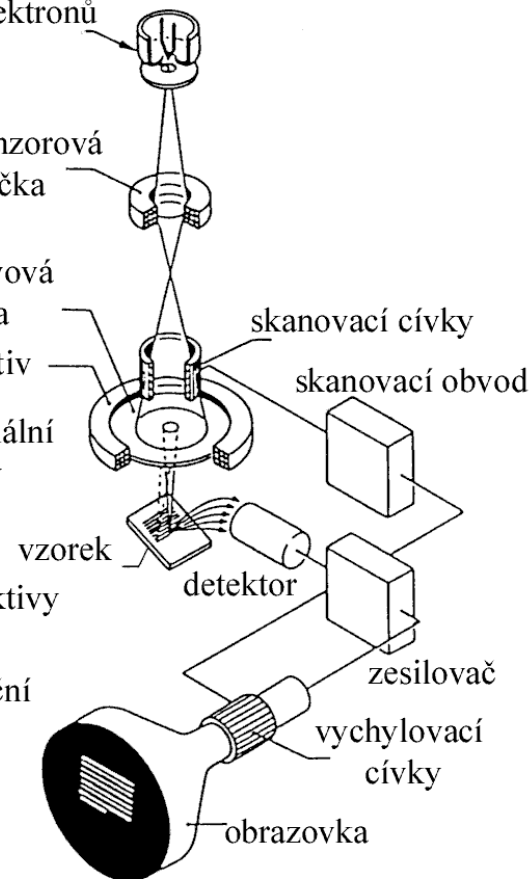
TEM



0.1 nm

×50~×1,500,000

SEM



0.5 nm

×10~×1,000,000

Elektronová mikroskopie

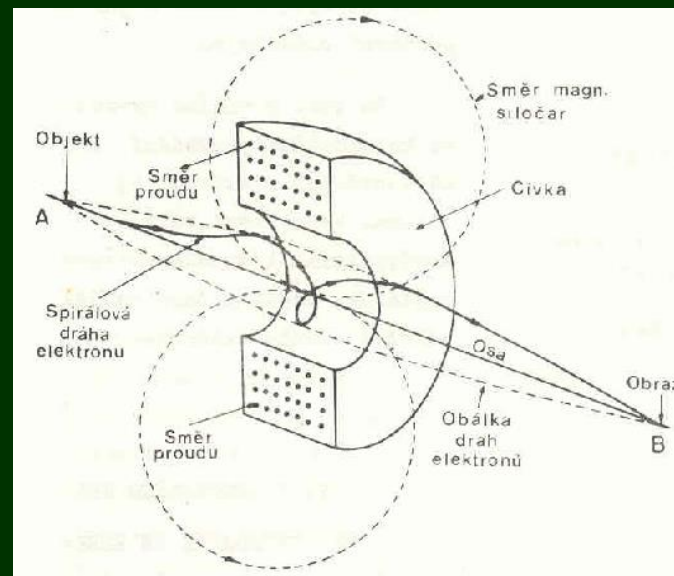
Pro úspěšnou vizualizaci musí být ve vzorku alespoň 10^6 virových partikulí v 1 ml. Použité zvětšení bývá 50,000 - 60,000x. Viry lze prokázat v těchto typech vzorků:

Stolice	rotaviry, adenoviry viry skupiny Norwalk astroviry, kaliciviry
Tekutina z puchýřů	HSV VZV
Kožní seškrab	papillomaviry, orf virus, virus molluscum contagiosum

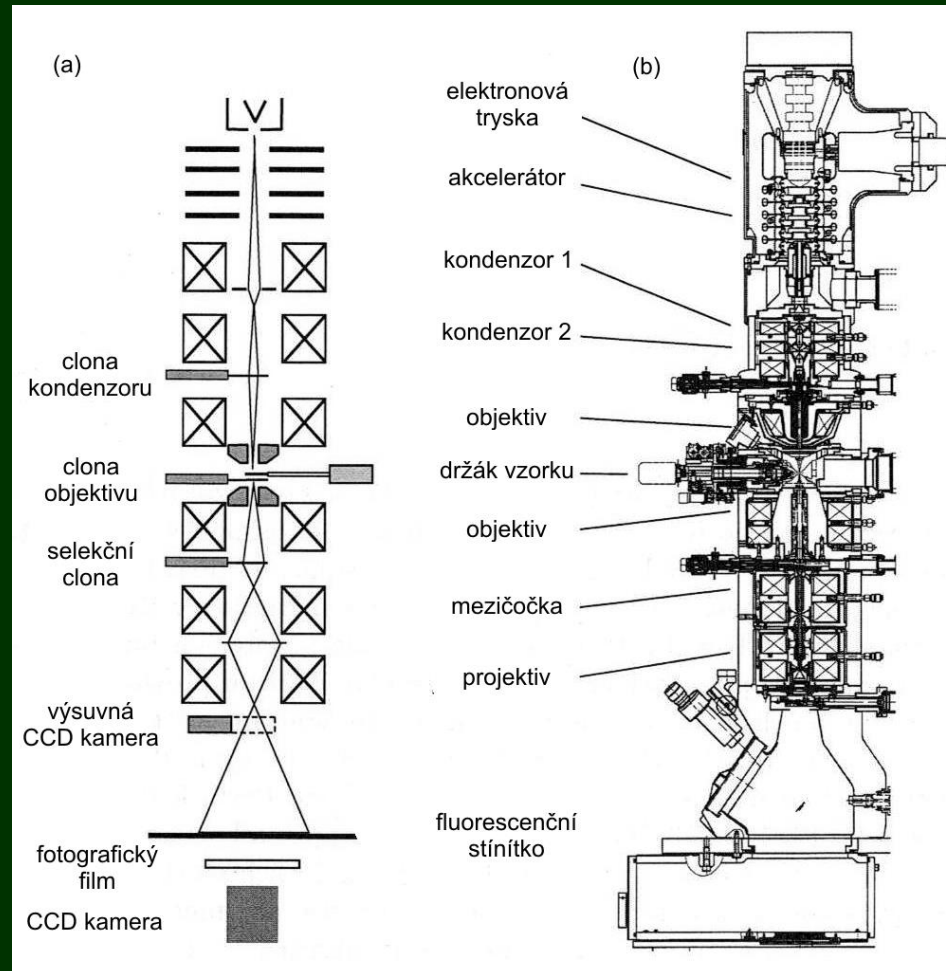
Transmisní elektronový mikroskop

Zdrojem zobrazujícího vlnění je tzv. elektronová tryska. Zobrazovacím prostředím je vakuum, protože ve vzduchu by docházelo k pohlcování elektronů. K úpravě chodu elektronového svazku se používají tzv. elektromagnetické čočky, což jsou prakticky různé typy cívek. Výsledný obraz nelze pozorovat přímo okem, ale např. prostřednictvím fluorescenčního stínítka či obrazovky, díky nimž lze proud dopadajících elektronů zviditelnit.

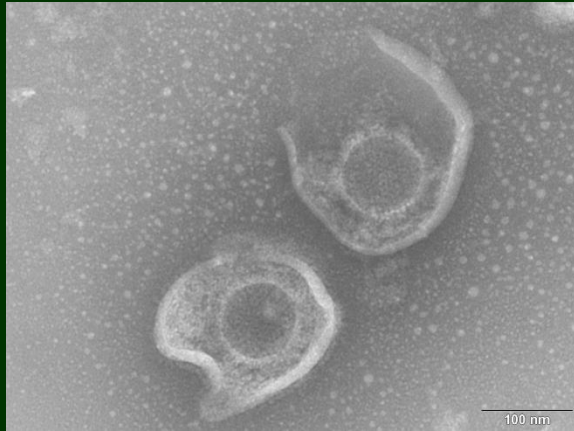
Působení magnetického pole na tvar trajektorie letícího elektronu lze využít k sestavení tzv. elektromagnetické čočky, která by fungovala přibližně stejně jako skleněná čočka v případě světla. Nejjednodušší elektromagnetickou čočkou je solenoid. Solenoid je cívka s velkým počtem závitů, jejichž průměr je mnohem menší než délka cívky. Uvnitř solenoidu vzniká homogenní magnetické pole a v okolí solenoidu nehomogenní magnetické pole.



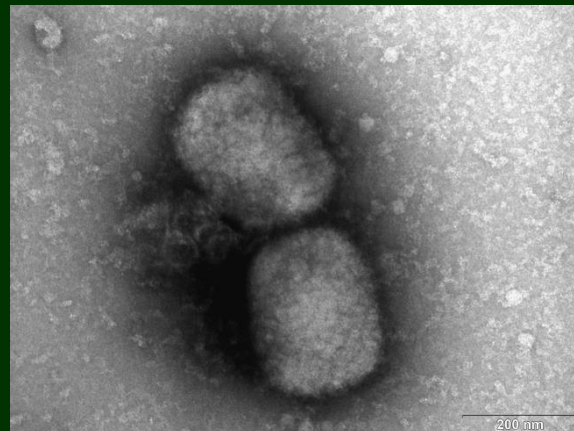
TEM detekuje elektrony, které procházejí hmotou preparátu. Jedná se o elektrony, které projdou elektronovým obalem atomů preparátu (vychýlení z původní dráhy, ale neztratí energii. Odražené TEM nedetekuje), nebo elektrony, které se srazí s elektrony v el. obalu atomů preparátu (úbytek energie, změna vlnové délky).



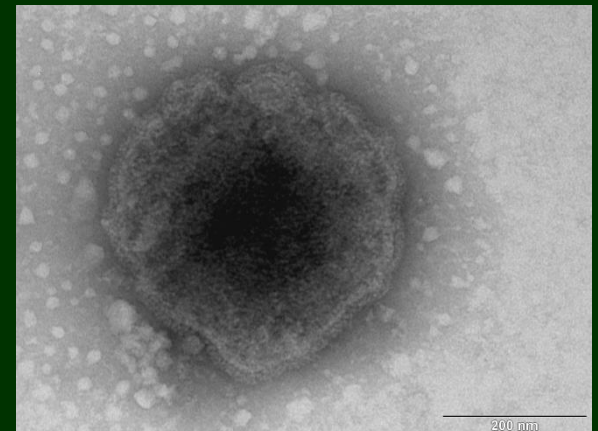
Fotografie virových částic (transmisní EM, negativní barvení)



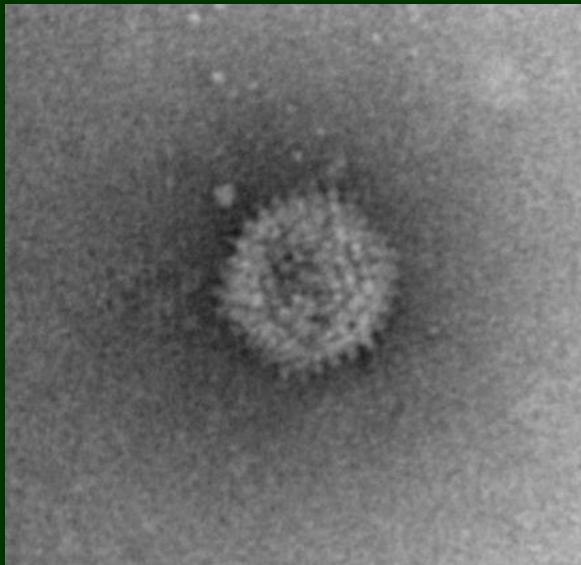
herpes simplex



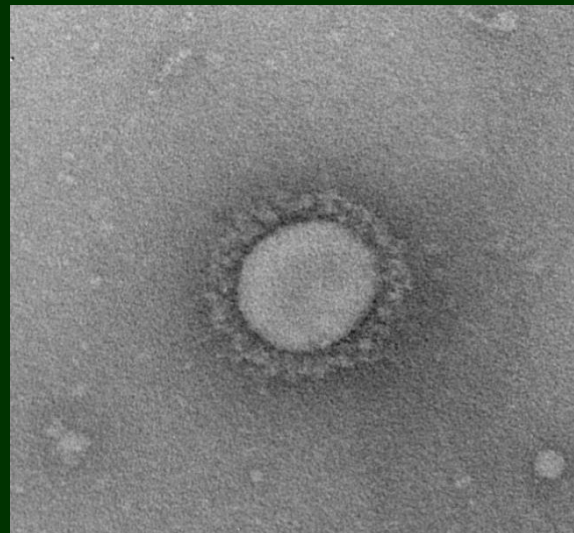
poxvirus



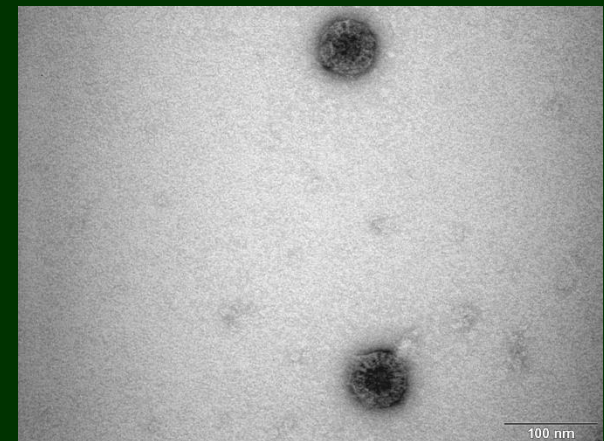
paramyxovirus



adenovirus



coronavirus

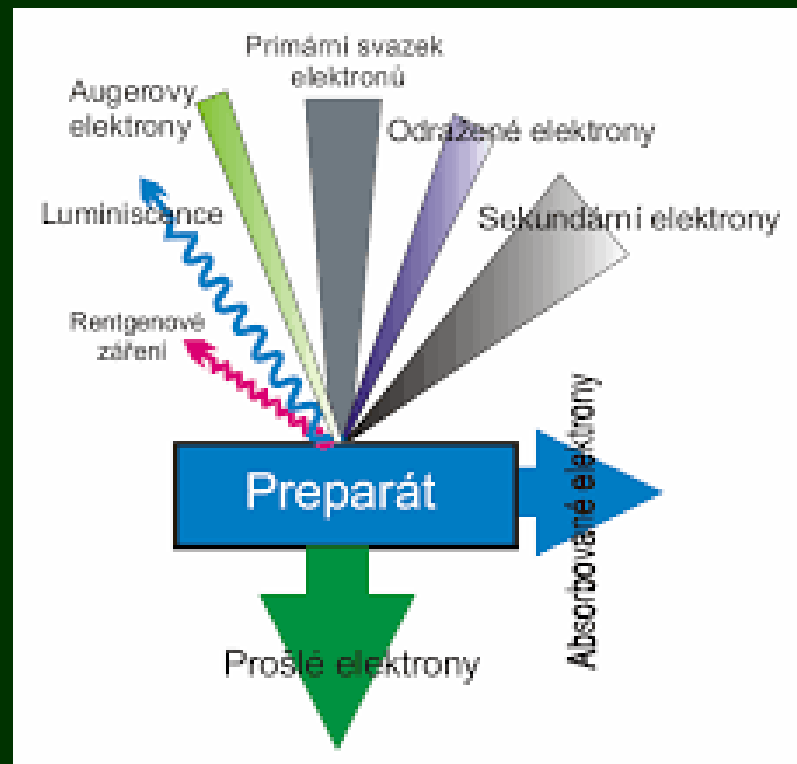


rotavirus

Skenovací (rastrovací) elektronový mikroskop

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

Detekují se odražené elektrony (studium povrchu, reliéfu), primární elektrony (prošlé vzorkem), sekundární elektrony (vyražené ze vzorku, používají se k analýze prvkového složení), někdy RTG fotony



Elektronová mikroskopie

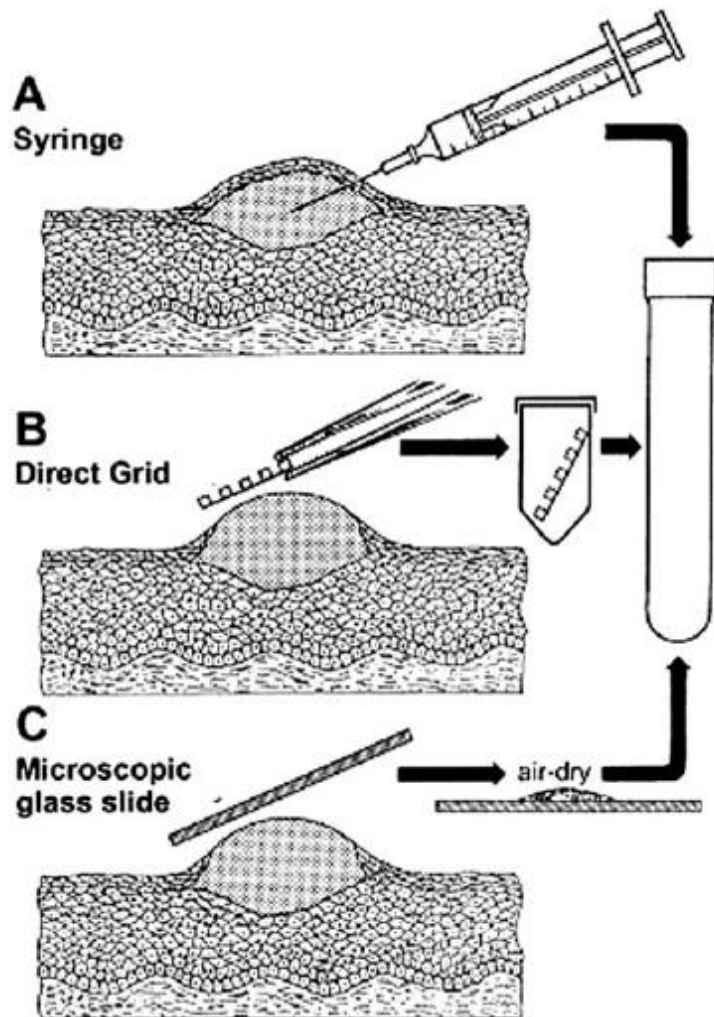
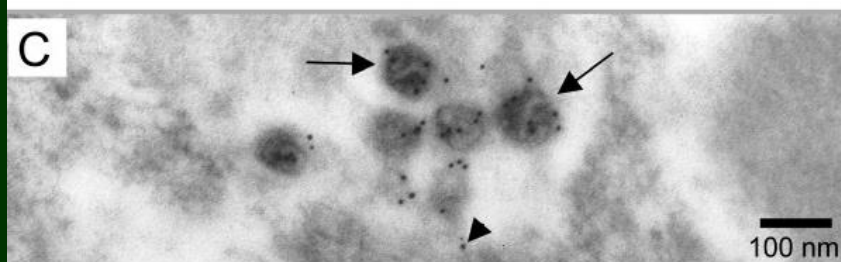
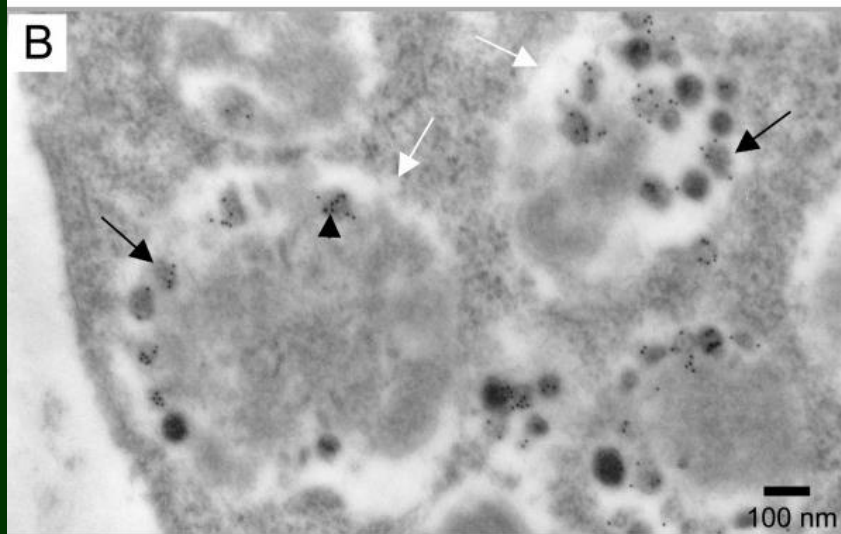
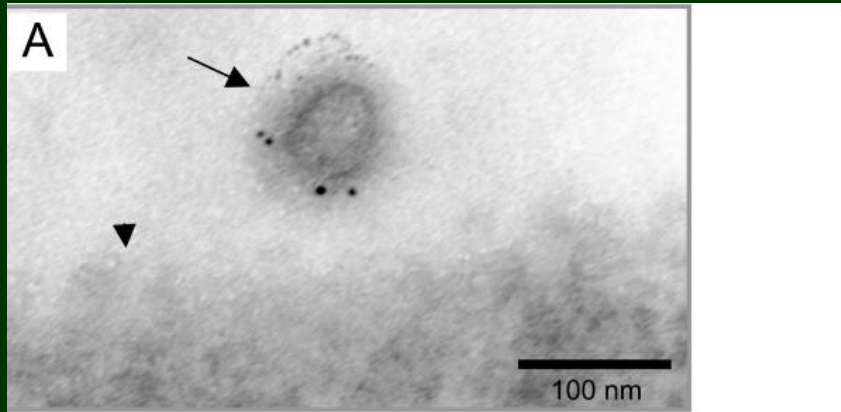


Figure 3. Three methods for efficient collection of vesicular and blister fluids for diagnostic electron microscopy. A. The contents of a vesicle are collected into the barrel of a needle. B. After the blister is opened, a coated electron microscope grid is touched to the fluid and air-dried (direct electron microscopy). C. A glass microscope slide is touched directly to an unroofed lesion and a smear prepared. Samples are then placed in rigid containers for transport to the electron microscopy laboratory.



Hlavní nevýhoda spočívá v nízké citlivosti detekce, nákladnosti. Nutná značná zkušenost s rozlišením virových částic od jiných částí buněk či artefaktů.

Imunoelektronová mikroskopie



Na protilátky navázány částičky koloidního zlata; možno současná detekce více patogenů – použijí se kuličky různé velikosti.

Imunoelektronová mikroskopie vykazuje mnohem vyšší citlivost v porovnání s klasickou elektronovou mikroskopií; v diagnostice se však obvykle nepoužívá.