

Srovnání mikroskopických technik

Zdravé lidské oko je schopno rozlišit dva body, které jsou od sebe vzdáleny 0,2 mm. Pro pozorování jemnějších detailů je nutné zvětšit pozorovací úhel. S využitím mikroskopických technik dokážeme rozlišit jednotlivé body, mezi kterými je menší vzdálenost, a získat tak podrobnější informace o struktuře pozorovaného vzorku.

První světelný mikroskop byl zkonstruován již před více než 400 lety v Nizozemí Zachariásem Janssenem. A v průběhu následujících let konstrukce mikroskopů prošla dalším vývojem. V roce 1830 se podařilo odstranit chromatickou vadu objektivu, později byl odstraněn astigmatismus čoček světelného mikroskopu. V 30. letech 20. století byl zkonstruován elektronový mikroskop, ve kterém je místo světelného záření využito proudu urychlených elektronů. Díky využití proudu elektronů jako korpuskulárního záření o výrazně nižší vlnové délce, než má záření světelné, je elektronový mikroskop schopný rozlišit detaily v rozsahu 0,2 nm. Mezitím došlo ve světelné mikroskopii k objevu fluorescenčních barviv (fluorochromů), která při absorpci budícího záření emitují viditelné světlo, a rozšířila se mikroskopie fluorescenční. Ke konci 20. století se objevují mikroskopy konfokální. S využitím některých moderních mikroskopických technik jsme schopni získat trojrozměrné zobrazení předmětu, rozlišit struktury na atomární úrovni nebo selektivně detekovat jednotlivé molekuly.

Rozlišovací schopnost mikroskopických technik

Rozlišovací schopnost mikroskopu je dána vztahem, kde d_{\min} je minimální vzdálenost dvou bodů, které jsou pomocí mikroskopu rozlišitelné.

$$R = 1/d_{\min}$$

Uvažujeme-li vzorek jako optickou mřížku kolmou na optickou osu, tak podle Abbeho teorie po ohybu rovnoměrně procházejícího svazku paprsků na optické mřížce vznikají v obrazové rovině interferenční maxima a minima.

$$n \cdot d \cdot \sin \alpha = k \cdot \lambda$$

- n** - index lomu
- d** - vzdálenost dvou vrypů
- α** - aperturní úhel (úhel odklonu paprsků od optické osy)
- λ** - vlnová délka světla ve vakuu

Pro rozlišení skutečného obrazu mřížky musí být v obrazové rovině maximum nultého a prvního řádu. Pro aperturní úhel α , který ještě prochází objektivem, je nejmenší rozlišovací mez d_{\min} :

$$d_{\min} = \lambda / (n \cdot \sin \alpha)$$

Kde $n \cdot \sin \alpha = A$ - numerická apertura

Pro dosažení nejvyšší rozlišovací schopnosti mikroskopu je nutné zajistit maximální hodnoty numerické apertury:

- a)** Vhodnou konstrukcí objektivu
- b)** Imerzní vrstvou mezi preparátem a objektivem - průhledná látka o vyšším indexu lomu (např. cedrový olej)

Mikroskopické techniky podle uspořádání soustavy

Dopadající světlo

Světlo dopadá na povrch vzorku ze strany pozorování. Využívá se při zobrazování neprůhledných vzorků a při studiu povrchů.

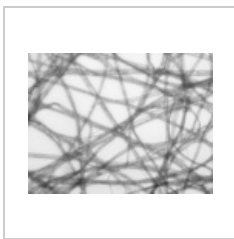
Procházející světlo

Preparát je částečně průhledný, je světlem prosvěcován a procházející paprsky vstupují do objektivu. Při práci s tkáňovými kulturami se využívá tzv. inverzního mikroskopu, kdy zdroj světla se nachází nad vzorkem a objektiv pod.

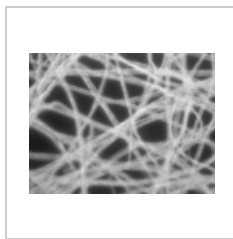
Metoda světlého pole - světelný kužel prochází preparátem a vstupuje do objektivu.

Metoda temného pole - světelný kužel je odkloněn a do objektivu vstupují pouze paprsky v důsledku rozptylu, odrazu či ohybu na struktuře preparátu. Paprsky pak dopadají do objektivu, kde zobrazují obrysy struktur preparátu na temném pozadí.

Objekty pro mikroskopii procházejícím světlem musí být dostatečně kontrastní. Proto se preparáty pro světelnou mikroskopii zvýrazňují barvením. Při průchodu záření preparátem dojde k snížení jeho amplitudy.



Metoda světelného pole



Metoda temného pole

Emise světla

Na principu luminiscence pracují fluorescenční mikroskopy. V preparátu je luminiscenční složka buď přítomna, nebo je do něj aplikována fluorescenční látka (fluorochrom). Při absorpci kvanta záření luminiscenční látkou je vyzařeno kvantum o jiné, většinou delší vlnové délce.

Mikroskopické techniky podle typu záření

Světelná mikroskopie

Kvalita obrazu a rozlišovací schopnost je závislá na kvalitě optické soustavy a světelného zdroje. Klasický světelný mikroskop využívá záření v oblasti viditelného světla. Existují ale i další metody světelné mikroskopie využívající monochromatické světlo, polarizované světlo nebo elektromagnetické záření v jiných vlnových délkách než je viditelná oblast světla.

Ultrafialová mikroskopie

Užitím ultrafialového záření se zvyšuje rozlišovací schopnost mikroskopu. Obraz se zaznamenává fotograficky nebo pomocí speciální snímací CCD kamery. Ultrafialové záření se využívá také pro zobrazení objektů obsahující UV absorbující látky.

Infračervená mikroskopie

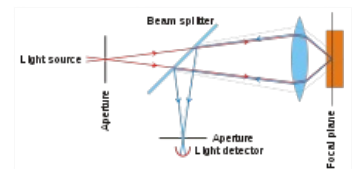
Některými objekty proniká infračervené záření snadněji než viditelné světlo a lze zobrazovat poměrně silné preparáty. Využívá se infračervené záření o vlnových délkách 750 - 1100 nm. Obraz se zaznamenává na speciální fotomateriály citlivé na IR.

Polarizační mikroskopie

Polarizační mikroskop kombinuje světelný mikroskop a polarimetr. V osvětlovací soustavě je zařazen polarizátor a za objektivem je analyzátor. Tím lze získat informace o optické aktivitě pozorovaného preparátu. Tento typ mikroskopu se využívá především v mineralogii, v biologii je vhodný pro pozorování některých anizotropních systémů, např. příčně pruhované svaloviny.

Laserová konfokální skenovací mikroskopie

Zdrojem záření u konfokální mikroskopie je laser. Laserový svazek prochází přes první konfokální clonku na dichroické zrcadlo a objektivem je zaměřen do určitého bodu preparátu. Světlo vzorkem odražené prochází zpětně objektivem, dichroickým zrcadlem a druhou konfokální clonkou v zadní ohniskové rovině. Tato clonka zabrání průchodu záření z míst mimo optickou rovinu. Světlo dále dopadá na detektor (fotonásobič). Informace jsou předávány do skenovacího zařízení společně se souřadnicemi daného bodu, ve kterém je z informací z jednotlivých skenovaných bodů zpracováván výsledný obraz. Konfokální mikroskop umožňuje vést série optických řezů vzorkem. Vyznačuje se vyšší rozlišovací schopností ve srovnání s ostatními metodami světelné mikroskopie.



princip konfokálního mikroskopu

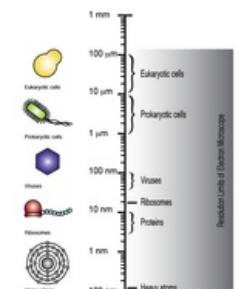
Elektronová mikroskopie

Funkce světelných paprsků je nahrazena proudem elektronů emitovaných ve vakuu elektronovou tryskou. A optické čočky světelného mikroskopu jsou nahrazeny systémem elektromagnetických čoček, jejichž pole působí na procházející elektrony.

Podle způsobu zobrazení rozlišujeme transmisní (TEM) a rastrovací elektronovou mikroskopii (REM).

V **transmisním elektronovém mikroskopu** proud elektronů prostupuje objektem a optikou a na luminiscenčním stínítku tvoří obraz. Jedná se o systém přímého pozorování a snímání obrazu.

V **rastrovacím elektronovém mikroskopu** je objekt řádkován urychleným svazkem elektronů a uvolněné elektrony ze vzorku jsou registrovány příslušným detektorem. Následně dochází ke zpracování výsledného obrazu. Jedná se o systém nepřímého pozorování a snímání obrazu.



rozlišovací schopnost elektronového mikroskopu

Související články

- Mikroskopické metody
- Světelná mikroskopie
- Elektronový mikroskop

Použitá literatura

- NAVRÁTIL, Leoš. Medicínská biofyzika. Vyd. 1. Praha: Grada, 2005, 524 s. ISBN 80-247-1152-4
- Studijní materiály předmětu Biofyzika v systému Moodle (<https://moodle.mefanet.cz/course/category.php?id=14>)
- VAJNER, Luděk, Jiří UHLÍK a Václava KONRÁDOVÁ. Lékařská histologie I.: cytologie a obecná histologie. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2010, 110 s. ISBN 978-80-246-1860-9.