

# Mikroskopické metody

Mikroskopie je souhrn aplikací optiky, které se využívají k zobrazení struktur, které nejsou viditelné pouhým okem. Oko (biofyzika) rozliší strukturu jednotlivých bodů (detailů), které jsou od sebe vzdáleny 0,2 mm a k tomu, aby bylo schopné rozlišit i menší struktury, je nutné je zvětšit pozorovací úhel. Různé způsoby mikroskopického zobrazování se rozlišují na základě druhu záření přicházejícího do objektu (světlo, ultrafialové záření, polarizované světlo, infračervené záření apod.), nebo podle způsobu uspořádání optické soustavy (procházející světlo, odražené světlo, emitované fluorescence, apod.). Tam, kde nestačí rozlišovací schopnost světelné mikroskopie (rozliší 200 nm), se používá mikroskopie elektronová nebo mikroskopie atomárních sil, které rozliší detaily na úrovni 0,1 nm.

## Optická mikroskopie

Optická mikroskopie umožňuje pozorovat věci, které již naše oko nedokáže rozlišit (rozlišovací schopnost, tedy schopnost rozeznat 2 u sebe ležící body, je u člověka 0,25 mm). Rozlišovací schopnost světelné mikroskopie je přibližně **0,25  $\mu\text{m}$** , 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 u speciálních mikroskopů. Pro vyšší úroveň detailu se využívá elektronová mikroskopie nebo mikroskopie atomárních sil.

Světelný mikroskop se skládá ze **tří spojných optických soustav**: osvětlovací soustava (kondenzor), objektiv a okulár. Dále má část mechanickou, která mikroskop dotváří.

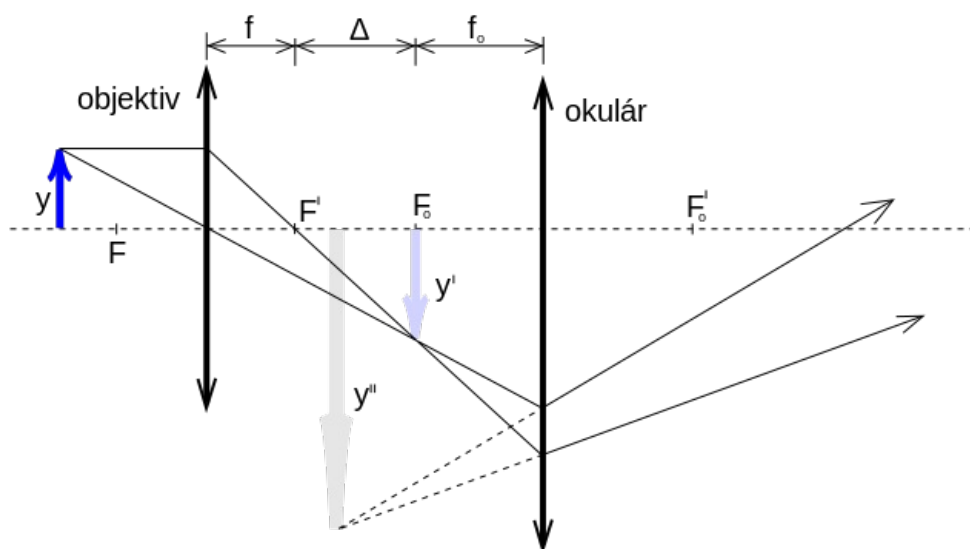
**Osvětlovací soustava** (na obrázku pod číslem 7) slouží k osvětlení preparátu, nejčastěji proti směru pozorování. Preparát, který je tímto způsobem prosvětlován, tak musí být částečně průhledný.

**Objektiv** (na obrázku pod číslem 3) je soustava čoček s velmi krátkou ohniskovou vzdáleností, které dohromady fungují jako spojná čočka a zobrazují tak předmět (preparát) převrácený, skutečný a zvětšený. Výsledný obraz se promítá mezi ohnisko okuláru a okulár.

**Okuláry** (na obrázku pod číslem 1) jsou také tvořeny soustavou čoček, které fungují jako čočka spojná. V tomto případě plní funkci lupy, která vytváří obraz zdánlivý, přímý a zvětšený obraz.



Optical microscope nikon alphaphot



Podrobnější informace o světelné mikroskopii najdete zde: [Světelná mikroskopie](#).

## Zobrazovací metody ve světelné mikroskopii

## Metoda světelného pole

### Metoda procházejícího světla

Metoda světelného pole je úvodní metodou optické mikroskopie. Světlo **prochází** pozorovaným objektem (v procházejícím světle) a soustava dvou spojných čoček vytváří skutečný, zvětšený a převrácený obraz, který pozorujeme přes okulár. Při této metodě má objekt tmavé obrysy a nachází se ve **světlem poli** na rozdíl od tmavého pole, kde objekt je světlý a nachází se naopak v tmavém poli.

## Metoda tmavého pole

### Metoda tmavého pole

Princip této metody spočívá v tom, že předmět je osvětlený pomocí **kondenzoru** tak, že do roviny objektu **vstupují jen okrajové**, velmi šikmé světelné **paprsky**, dokud **středové** nejsou **pohlcené**, a proto se vůbec při zobrazování neuplatňují. Objekt je teda osvětlený ze stran a paprsky se od něho odrážejí a lámou. **Do objektivu** sa tedy dostane **světlo**, které je **rozptýlené předmětem**. Předmět se jeví jako **svítící na tmavém pozadí**, a proto je velmi dobře viditelný. Tudíž při pozorování v tmavém poli je prázdné zorné pole tmavé a až světlo, které se rozptýlí při dopadu na preparát a následně prochází částečně objektivem, vytváří obraz.

Při pozorování v tmavém poli září na tmavém podkladě ty části objektu, na kterých dochází k dostatečnému rozdílu při průchodu světla pozorovaným objektem, jako například na jeho hranách.

Pro suché objekty s numerickou aperturou do 0,65 nejsou potřeba speciální kondenzory, provádí se **zastínění** výstupní čočky kondenzoru **clonou** pro tmavé pole, která je ve volitelné výbavě mikroskopu. Zdroj musí mít dostatečný výkon, neboť se pro tomto pozorování používá jen zlomek světelné intenzity zdroje. Při použití objektivů vysokých číselných apertur, hlavně imerzních objektivů, se pro tmavé pole používají **imerzní kardioidní kondenzory**. Tyto kondenzory mají numerickou aperturu 1,05 a jejich přední čočka se spojuje se spodní stranou preparátu imerzním olejem. Číselná apertura objektivu musí být vždy menší než apertura kondenzoru, jinak by došlo k osvětlení ve světlem poli.

Metoda se používá pro **pozorování drobných objektů a jejich povrchových struktur**, např. prvoků, bakterií, rostlinných pletiv, pelových zrn atd.

## Metoda fázového kontrastu

### Metoda fázového kontrastu

Tento způsob mikroskopování, který objevil v roce 1932 (a v 1953 obdržel Nobelovu cenu) holandský fyzik Frits Zernike, umožňuje **zřetelné vstoupení i nejmenších struktur**, které jsou v běžném světle skoro neviditelné.

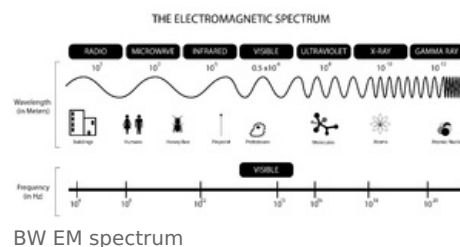
Metoda slouží k **zvýraznění kontrastu** malých fázových objektů, u kterých se detaily od okolí absorpcí neliší, ale způsobují změnu fáze. Metoda **převádí rozdíly** v posunu **fáze světla** procházejícího různými částmi objektu, které nevidíme, **na rozdíly intenzit**, které pozorovat můžeme.

Přesnější princip fungování spočívá ve vložení speciální destičky s kruhovou šterbinou na kondenzor, na které vzniká ohybové spektrum. Nebarevné objekty, které se liší od okolí indexem lomu a tloušťkou, způsobují změnu fáze procházejícího světelného vlnění, kterou ale lidské oko nezaregistruje. Speciální destička zabezpečí posun fáze světla přímého obrazu světelného zdroje o  $\frac{1}{4}$  vlnové délky oproti fázi světla ohybových obrazů. Při interferenci vln v obrazové rovině se části objektu, které různým způsobem mění fáze světla, projeví různou intenzitou světla. Dostaneme tak kontrastní obraz fázového předmětu.

Výhodou této metody je, že **nepoškozuje živé biologické objekty a umožňuje jejich pozorování v čase**. To je například důležité při studiu buněčných a tkáňových kultur. Fázová mikroskopie nám rovněž umožňuje pozorovat celý průběh mitózy.

## Ultrafialová mikroskopie

Ultrafialová mikroskopie využívá jako světelný zdroj UV záření, které se vyznačuje kratší vlnovou délkou než má viditelné světlo v rozsahu přibližně 400 - 10 nm, což **zvýšuje 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).

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.

Základní uspořádání (předmět, objektiv, okulár) zůstává zachováno jako u optických mikroskopů, avšak pro zaznamenávání je vzhledem k charakteru záření nutné používat speciální fotomateriály citlivé na infračervené záření. Další odlišností je využití sférických zrcadel místo klasických čoček, protože infračervené záření je pohlcováno sklem a po průchodu sklem se neláme jako viditelné záření.

## Inverzní mikroskopie

Inverzní mikroskopie využívá obvykle viditelného záření a řeší potřebu pozorování objektů, **nesevřených** do stísněného prostoru mezi podložním a krycím sklíčkem. Umožňuje pozorování objektů v tlustostěnných nádobách (např. Petriho miskách), případně objektů volně plovoucích v kapalinách v různých miskách. Z využití viditelného záření také vyplývá omezená možnost zvětšení.

Konstrukčně se uvedených předností dosahuje tím, že se **zdroj světla nachází nad mikroskopovým stolcem**, předmět je uložen v misce na stolku, objektiv je uložen pod stolcem a okulárová část bývá zařazena za hranolový nebo planární odražeč (zrcadlo) do směru příhodného pro pohodlné pozorování.

Více o inverzním mikroskopu najdete zde: [Inverzní mikroskop](#)

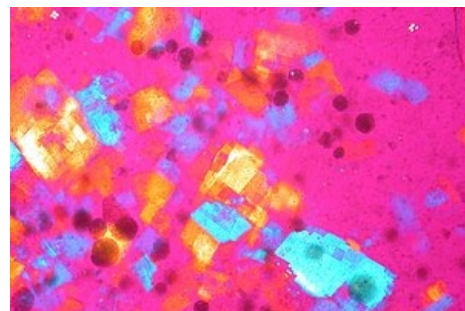


Inverted Microscope

## Polarizační mikroskopie

Polarizační mikroskopie využívá optické aktivity zkoumaného preparátu (tj. schopnost preparátu stáčet rovinu polarizovaného světla). Polarizační mikroskop je tedy kombinací polarimetru a mikroskopu. Konstrukčně je PM zcela shodný se standardním optickým mikroskopem, avšak do optické dráhy světla jsou zařazeny dva polarizační filtry, které mají zkřížené polarizační roviny. Paprsky zdroje světla procházejí nejprve tzv.

**polarizátorem** (dříve krystal dvojlomné látky, nyní plastový polarizační filtr) - zde dochází ke vzniku **polarizovaného světla**, dále procházejí pozorovaným objektem, normálním objektivem, dále druhým polarizačním filtrem tzv. **analyzátorem** a následně okulárem. Jestliže má pozorovaný objekt, ležící mezi polarizátorem a analyzátozem, polarizační vlastnosti, dojde po průchodu světla preparátem ke stočení polarizační roviny a vznikne obraz v černém poli a barevný obraz předmětu. Ten vzniká tím, že preparát způsobil porušení podmínky zkřížení rovin a jeví se jako barevný.



Cholesterol Crystals Synovial Fluid Polarized Light

Více o polarizační mikroskopii najdete zde: [Polarizační mikroskopie](#)

## Interferenční mikroskopie

Interferenční mikroskopie pracuje na principu porovnávání paprsku po průchodu vzduchem a druhého po průchodu vzorkem. Tato metoda se využívá při zkoumání průhledných struktur, které nechceme z nějakých důvodů barvit. Dále slouží k vizualizaci různých povrchů a membrán.

Dvousvazkový interferenční mikroskop se skládá z optického mikroskopu a interferometru. Pomocí soustavy interferometru, kondenzoru a Wollastonova hranolu je paprsek přicházející k preparátu rozdělen na dva. Jeden prochází skrz vzorek, který změní jeho fázi. Druhý prochází mimo a slouží proto jako referenční. Tato metoda pracuje na principu temného pole - při vhodném nastavení interferometru je přicházející paprsek složen ze dvou, které jsou vůči sobě posunuty o půl vlnové délky, takže v případě neumístění vzorku se paprsky "vyruší" a v zorném poli neuvidíme nic. Když však jeden paprsek bude procházet preparátem a jeho vlnová délka se změní, změní se i celková vlnová délka výsledného paprsku a v interferometru, potažmo v okuláru už nebude "temno" ale obraz zkoumaného vzorku.

Existují ještě vícesvazkové mikroskopy, které porovnávají více paprsků a mikroskopy využívající interferenčního fázového kontrastu, který umožňuje zvýraznění určité buněčné struktury.

Více o interferenční mikroskopii najdete zde: [Interferenční mikroskopie](#)

## Fluorescenční mikroskopie

Fluorescence je proces kdy nějaká látka **po absorpci kvanta záření emituje záření o delší vlnové délce**. Můžeme mluvit o fluorescenci primární, to když látka v preparátu sama funguje jako fluorochrom (např. chlorofyl), a o sekundární, kdy je ke vzorku přidán fluorochrom, který označí původně nefluorescenční struktury (např. imunoglobuliny s fluorescenčním markerem v imunohistochemii).

Samotný jev je závislý na elektronovém obalu jednotlivých atomů. Když elektron v obalu absorbuje foton, zvýší se jeho energie a excitovaný elektron "přeskočí" do orbitalu s vyšší energií. Postupně ale energii ztrácí v podobě fotonu s nižší energií a delší vlnovou délkou a elektron padá do původního orbitalu. Fotony s nižší energií se emitují v podobě světla, které pozorujeme v mikroskopu.

Fluorescenční mikroskop je optický mikroskop se silným zdrojem záření (většinou rtuťové, nebo xenonové výbojky), monochromátorem (propustí jen jednu vlnovou délku - barvu světla) a kondenzorem.

Tento mikroskop se používá např. k detekci jednotlivých proteinů, či molekul v buňce.

## Laserová konfokální skenovací 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.

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

Více o konfokálním mikroskopu najdete zde: Konfokální mikroskop

## Elektronová mikroskopie

Více o elektronové mikroskopii najdete zde: Elektronová mikroskopie

Díky mikroskopii jsme schopni pozorovat věci, které jsou nad rámec rozlišitelnosti našeho oka, a tedy jsou pro nás běžným okem neviditelné. Mikroskopie využívá metody uhlového zvětšení. Zvětšujeme při tom **zorný úhel**, který svírají paprsky vycházející z okrajových bodů předmětu a procházejí optickým středem oční čočky. Úhlové zvětšení optických přístrojů charakterizuje následující vzorec:

$$\gamma = \tau' / \tau$$

Kde  $\tau'$  je zvětšený zorný úhel při pozorování optickým přístrojem a  $\tau$  je zorný uhel při pozorování okem. Jestliže se bavíme o mikroskopii, uhlové zvětšení mikroskopu je:

$$\gamma = \Delta d / f_1 \times f_2$$

kde  $f_1$  je obrazová ohnisková vzdálenost objektivu,  $f_2$  je předmětová ohnisková vzdálenost okuláru,  $\Delta$  je optický interval mikroskopu a  $d$  je konvenční zraková vzdálenost. Podle typu dopadajícího záření na objektiv rozlišujeme různé typy mikroskopie, např. světelná, polarizační, fluorescenční a elektronová.

### Elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie pracuje na podobném principu jako mikroskopie světelná, která využívá princip lupy ke zvětšení zorného úhlu. V případě světelného mikroskopu **okulár** funguje jako lupa, kterou se pozorovatel dívá na obraz vytvořený **objektivem**. Jak okulár tak objektiv představují soustavu dvou spojných čoček. U elektronové mikroskopie je to podobně, ale na rozdíl od světelné, která využívá proud fotonů a spojně skleněné čočky, v elektronové mikroskopii je proud fotonů nahrazený **proudem elektronů** a k nasměrování paprsků přes vzorek na obrazovku se používají **elektromagnetické čočky (magnety)**. Pod elektromagnetickou čočkou si můžeme představit v podstatě cívku, která vytváří vhodně tvarované magnetické pole, které ovlivňuje dráhu elektronů. **Zvětšení a rozlišovací schopnost** jsou v elektronovém mikroskopu **značně lepší** a to hlavně díky mezní rozlišovací schopnosti. Ta je přímo úměrná vlnové délce dopadajícího záření. Protože elektrony mají kratší vlnovou délku než světlo, jejich rozlišovací schopnost je mnohokrát větší a dosahuje až 0,05 nm. Zvětšení ve špičkových mikroskopech může dosahovat až 10 000 000 x.

Mezi základní dva typy elektronových mikroskopů patří, **mikroskop transmisní a mikroskop rastrovací**. U transmisního elektronového mikroskopu částice procházejí přímo přes vzorek a až potom jsou zachycené. Při tomto typu mikroskopie musí být urychlování napětí dostatečně velké, aby elektrony měly dostatečnou energii penetrovat přes vzorek a rovněž vzorek musí být velmi tenký, 10-500 nm. Zatímco **transmisní** mikroskop využívá **metodu procházejících elektronů, rastrovací metodu elektronů odražených**. U rastrovacího elektronového mikroskopu jsou částice nasměrované na přechod přes vzorek pod určitým uhem a následně se odrážejí, čímž se vytváří 3D obraz.

Elektronová mikroskopie se využívá v mnohých oblastech jako např. v materiálovém výzkumu nebo v biologických aplikacích. Je schopná poskytnout **komplexní informace o mikrostruktuře, chemickém složení a dalších vlastnostech zkoumaného vzorku**.

## Mikroskopie atomárních sil (AFM) ze skupiny metod sondové mikroskopie



Podstatou mikroskopu je sonda z křemíkového nitridu umístěná na pružině ze stejného materiálu. Na pružinu míří laser a jeho paprsek se odráží do fotodetektoru. Velikost sondy je v řádu jednotlivých nanometrů.

V bezkontaktním režimu Sonda přejíždí nad povrchem zkoumané látky a vlivem kapilárních a Van der Waalsových sil (v řádech nanonewtonů) se ohýbá pružina. Paprsek z laseru mění úhel dopadu i odrazu a na fotodetektor dopadá v jiném místě.

V dalším, kontaktním režimu se pružina ohýbá v souladu s povrchem, jak se sonda dotýká hlubších a vyšších míst.

Informace o místech dopadu na detektor počítač použije pro modelaci zkoumaného povrchu. Modifikace AFM umožní také vizualizaci magnetických domén, nebo detekci jednotlivých molekul na základě specifického chování sondy.

Výhodou této metody je až miliardové zvětšení, které dovoluje zobrazovat jednotlivé molekuly, výsledný 3D obraz a možnost měřit v různých prostředích (vakuum,

kapalina, vzduch...) bez speciálních úprav vzorku. Nevýhodou je velmi vysoká pořizovací cena a nízká rychlost.

Více o mikroskopii skenovací sondou najdete zde: Mikroskopie skenovací sondou

## Odkazy

### Zdroj

- KYMPLOVÁ, Jaroslava. *Katalog metod v biofyzice* [online]. [cit. 2012-09-20]. <<https://portal.lf1.cuni.cz/clanek-793-katalog-metod-v-biofyzice>>.
- NAVRÁTIL, Leoš a Jozef ROSINA. *Medicínská biofyzika*. 1. vydání. Praha : Grada, 2005. Kapitola 5.3.1 Mikroskopické metody. s. 241-251. ISBN 978-80-247-1152-2.
- KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ. *Klinická cytogenetika I..* 1. vydání. Praha : Nakladatelství Karolinum, 2006. Kapitola 2 Mikroskopická technika. s. 16-21. ISBN 80-246-1069-8.

<https://www.mikroskop-mikroskopy.cz/fazovy-kontrast/>

[https://www.fch.vut.cz/~zmeskal/obring/prednasky\\_2004/mikroskopie\\_2 \(martin julinek\).pdf](https://www.fch.vut.cz/~zmeskal/obring/prednasky_2004/mikroskopie_2_(martin_julinec).pdf)

<https://www.mikroskop-mikroskopy.cz/temne-pole/>

<http://biologie.upol.cz/mikroskopie/temne%20pole.htm>

<http://xarquon.jcu.cz/edu/zbb/fazovyk.pdf>

[http://fyzika.fce.vutbr.cz/file/kusak/AFM\\_mikroskopie.pdf](http://fyzika.fce.vutbr.cz/file/kusak/AFM_mikroskopie.pdf)

<http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/fluorescencni.htm>

[https://www.wikiskripta.eu/w/Interferen%C4%8Dn%C3%AD\\_mikroskopie](https://www.wikiskripta.eu/w/Interferen%C4%8Dn%C3%AD_mikroskopie)

[https://dml.cz/bitstream/handle/10338.dmlcz/138993/PokrokyMFA\\_10-1965-2\\_1.pdf](https://dml.cz/bitstream/handle/10338.dmlcz/138993/PokrokyMFA_10-1965-2_1.pdf)