

# Metody světelné mikroskopie praktické použití v biologii

Mgr. Veronika Vymětalová, Ph.D.

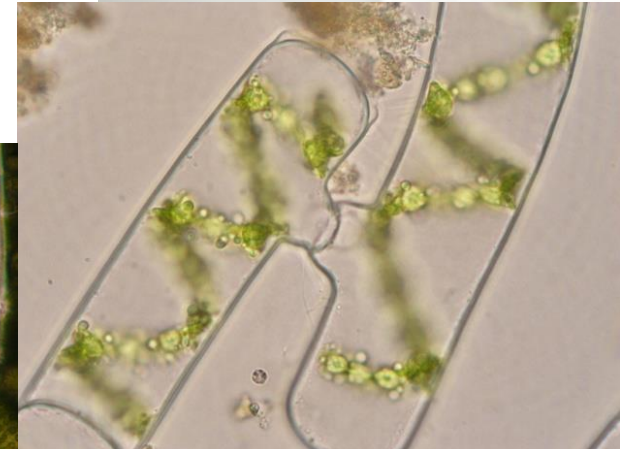
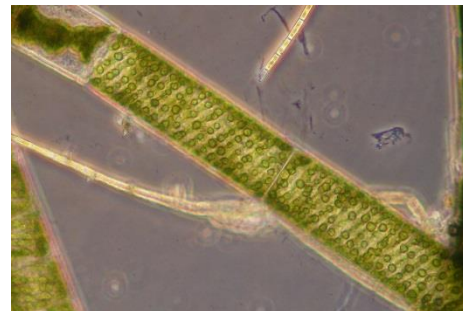
FBMI ČVUT v Praze

Vodárenská biologie 2020

5. - 6.2.2020 Praha

# Přístroje, přístrojová technika

- **Kvalita preparátů** – nativní preparáty, často bez barvení – pro vizualizaci struktur použijeme různé mikroskopické techniky.....
- **Kvalita mikroskopů** – běžné laboratorní mikroskopy – špičkové mikroskopy
- **Kvalita snímacích zařízení** – fotoaparáty, kamery
- **Použití softwaru** na úpravu snímků

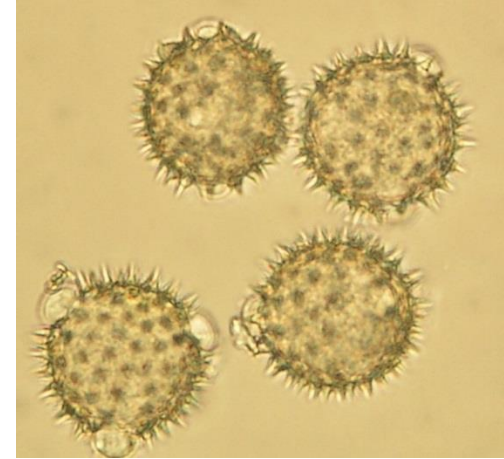
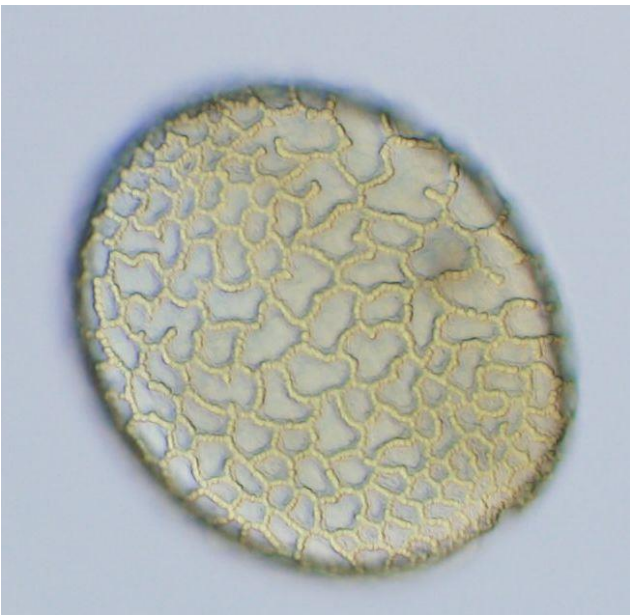
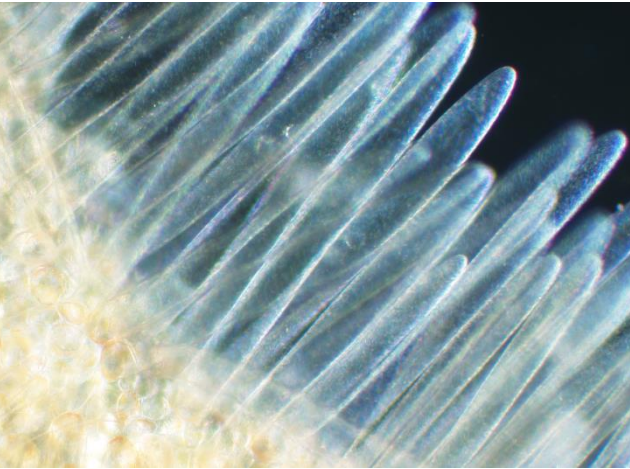


# Naše doporučení a zkušenosti

- **Výběr kvalitní optiky** – omezit použití EA (ekonomických achromátů), používat korekce optických vad čoček při fotografování
- **Mikroskopy od renomovaných firem** – Zeiss (nejstarší), Olympus, Nikon, Leica .....ale i Meopta (staré mikroskopy pokud nejsou příliš zničené)
- **Rozšiřovat možnosti mikroskopu** – mikroskop dnes je v podstatě „sestava modulů“, lze přizpůsobit, rozšířit procházející světlo o temné pole, fázový kontrast ....



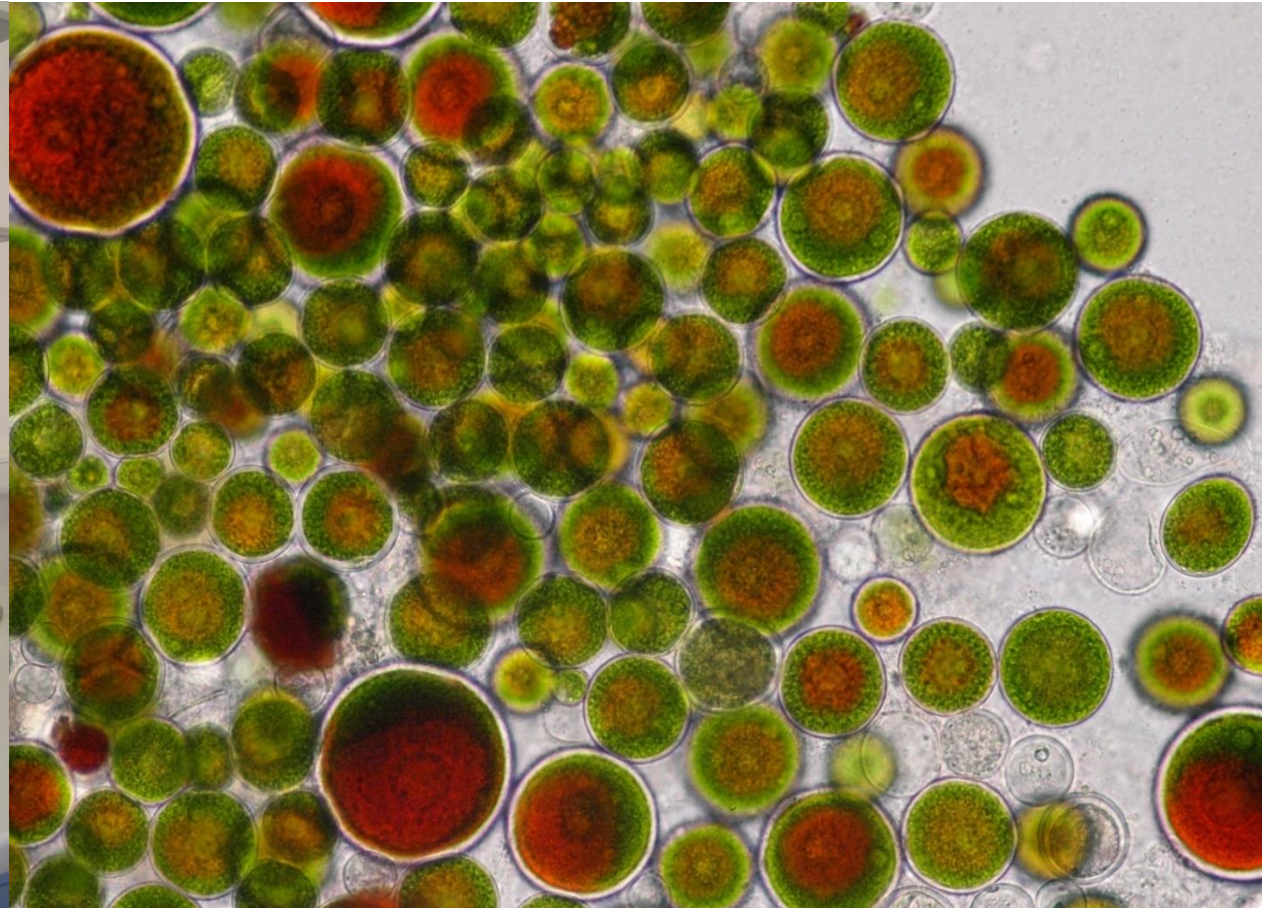
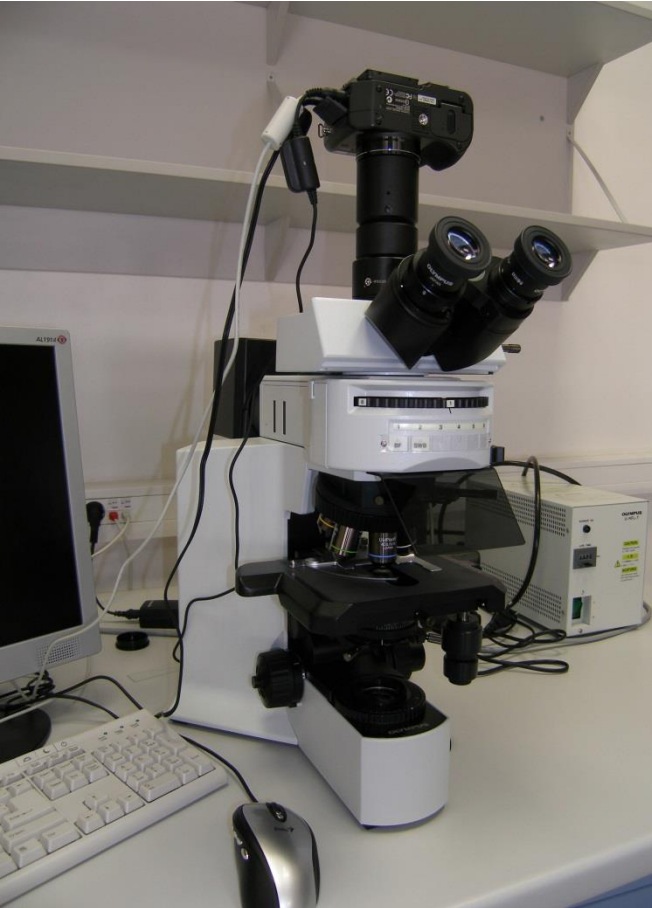
# Pozorované objekty



- **Mikrobiologie** – bakterie/cyanobakterie, řasy, kvasinky, prvoci...
- **Biologické „struktury“** – např. pylová zrna – prostorové útvary
- **Biologie** – eukaryotní buňky a jejich struktury, tkáně a pletiva mnohobuněčných organismů

# Mikroskopie v procházejícím světle,

kvalita použitého mikroskopu a snímacího zařízení



Mikroskop Olympus BX 51, fotoaparát Camedia C-5050, mikrofotografie kultury *Haematococcus pluvialis* (foto V. Vymětalová)

# Temné pole (Dark field)

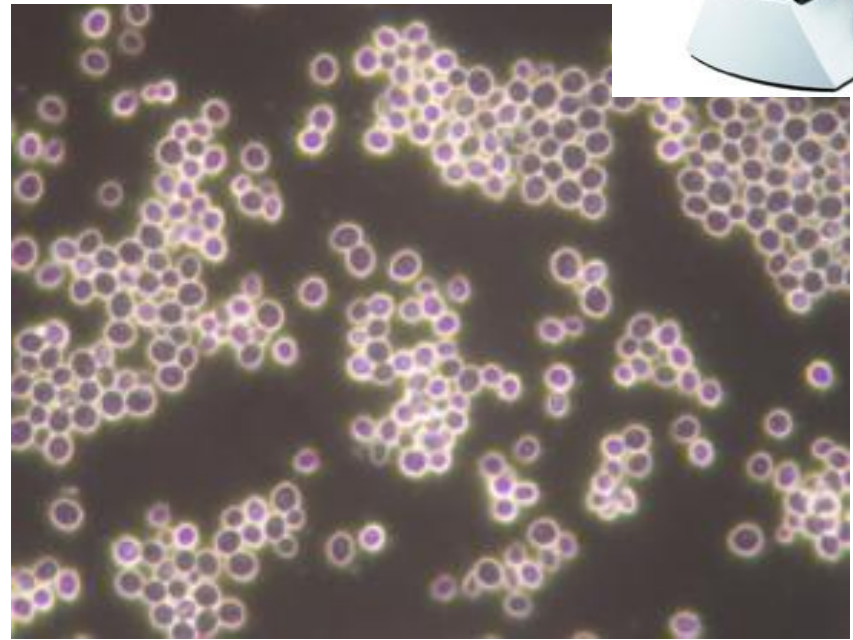
- Metoda mikroskopování v temném poli (zástinu) využívá **jednoduchého vyřazení centrálních paprsků, které procházejí kondenzorem, clonou (např. Kromova clona).**
- Pozorovaný objekt je tedy osvětlen pouze odraženými, šikmo dopadajícími paprsky.
- **Zorné pole je temné a na něm vystupují zářící pozorované objekty.**
- Metoda umožňuje pozorování i velmi malých objektů např. bakterií, organel a drobných inkluzí, proto se často používá v mikrobiologii a buněčné biologii.



# Mikroskopie v procházejícím světle a temné pole



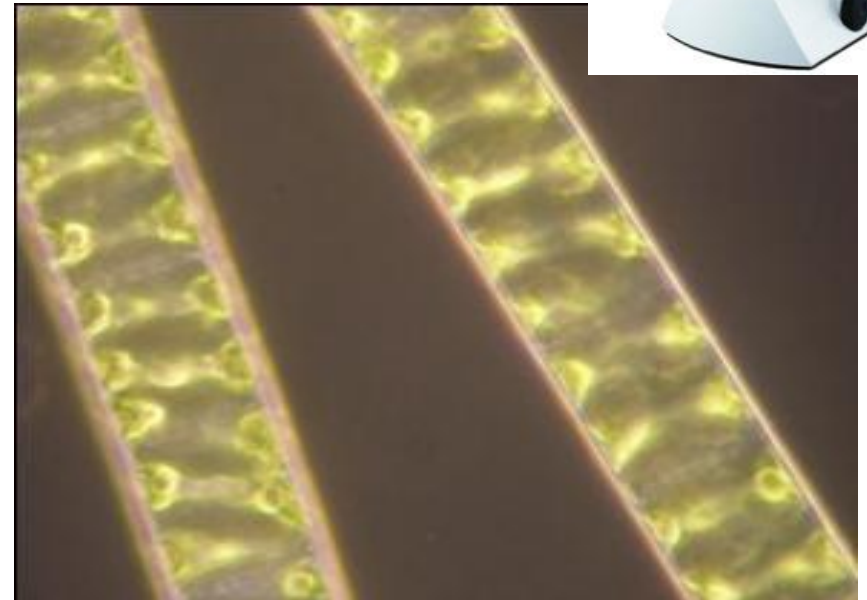
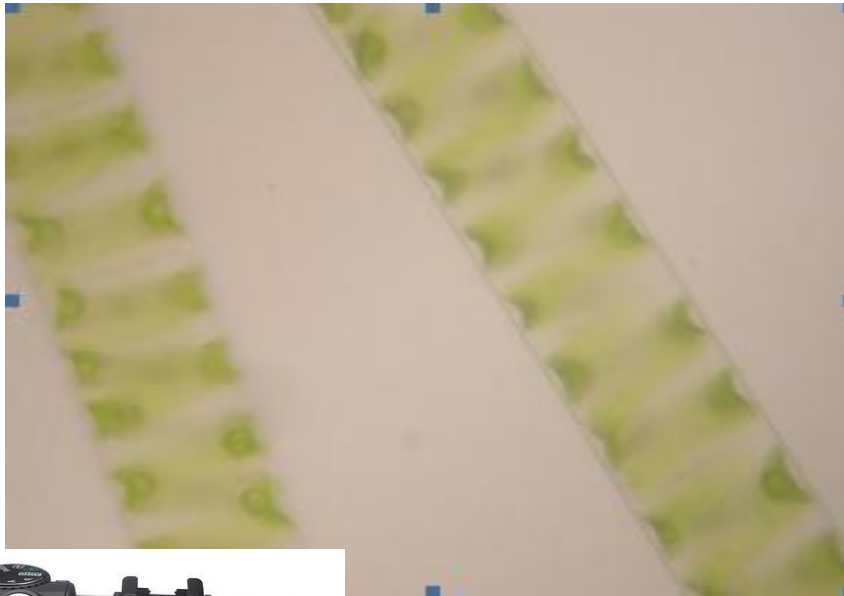
Použitý laboratorní mikroskop Olympus BX21 a BX31, procházející světlo a temné pole, s připojeným fotoaparátem SP-350, kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*



Mikrofotografie kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*., světelná mikroskopie, temné pole, zvětšeno 40x,  
studentská práce Bc. K. Picková

# Mikroskopie v procházejícím světle a temné pole

Použitý laboratorní mikroskop Olympus BX21 a BX31,  
procházející světlo a temné pole, s připojeným  
fotoaparátem SP-350



Mikrofotografie řasy *Spirogyra* sp., světelná mikroskopie, temné pole,  
zvětšeno 40x, studentská práce Bc. K. Picková



# PROMICAM LITE 10

PROMICAM LITE 10 je cenově výhodná barevná CMOS kamera vhodná pro běžnou mikrofotografickou dokumentaci.

## Hlavní vlastnosti:

- CMOS senzor s úhlopříčkou 1/2,3"
- Rozlišení senzoru 10 Mpx
- Snímková frekvence živého obrazu až 31 snímků za sekundu
- Rozhraní USB 3.0 / USB 3.1 Gen 1 zpětně kompatibilní s USB 2.0
- Malé rozměry a nízká hmotnost
- USB konektor s pojistnými šroubky
- Podporováno programy QuickPHOTO

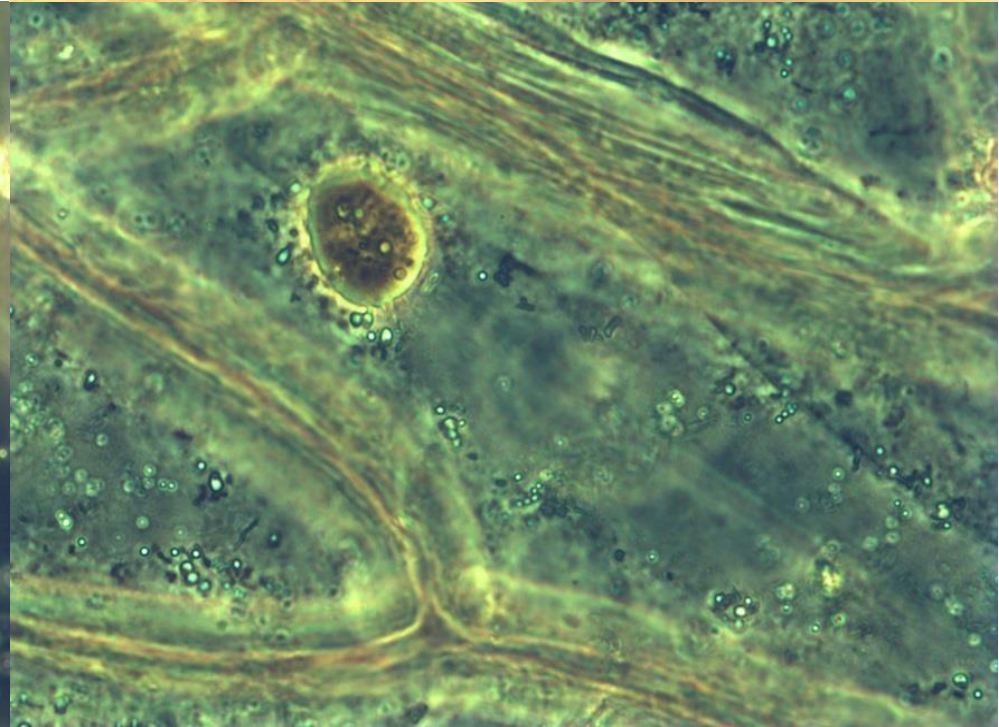
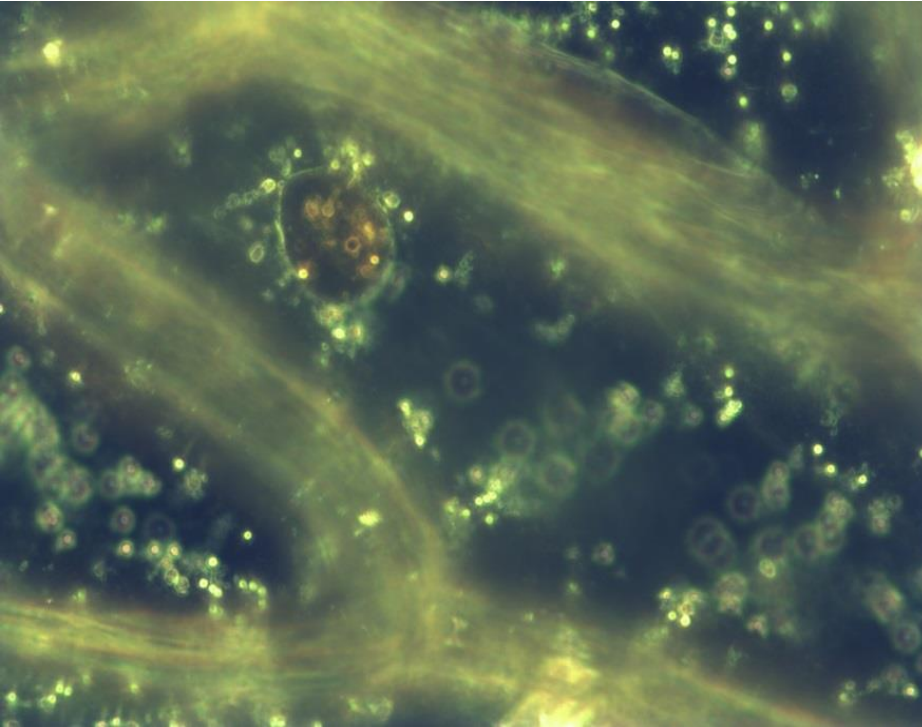
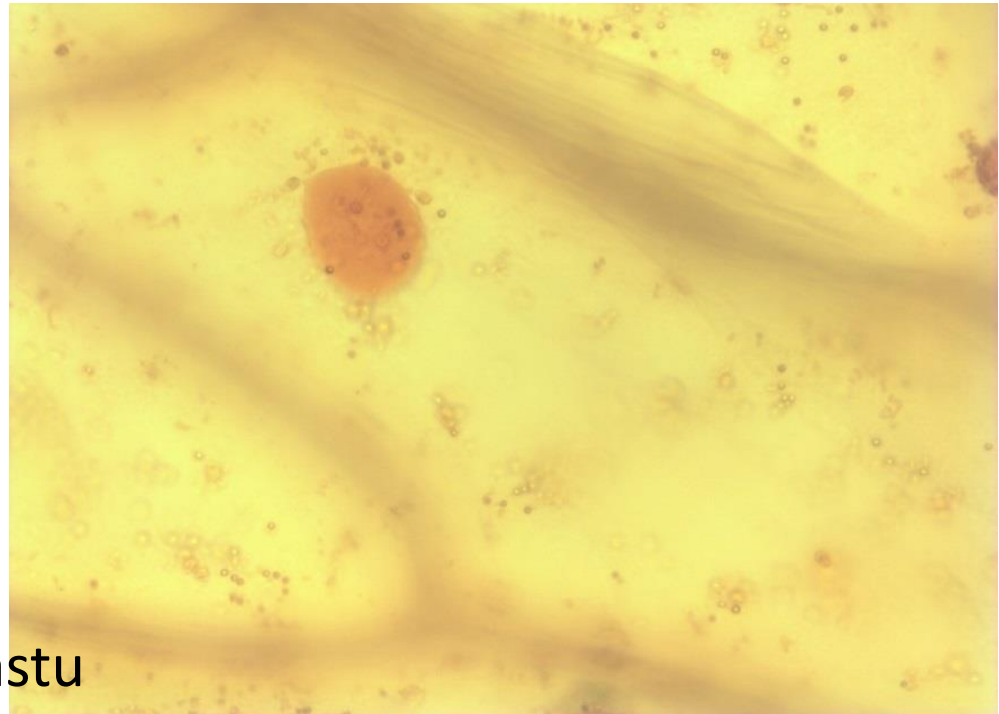


# Fázový kontrast

- V roce 1934 publikoval Fritz Zernike své první práce o metodě fázového kontrastu.
- Metoda umožňuje pozorování nezbarvených struktur, často se s ní setkáme v mikrobiologii a při pozorování nezbarvených buněk tkáňových kultur, dobře vizualizuje např. bičíky, řasinky a povrchové struktury.
- Princip metody spočívá v použití tzv. **fázového kondenzoru** a **fázových objektivů**, tj. ve vložení tzv. kondenzorové masky do přední ohniskové roviny kondenzoru a fázové masky, která je nanesena na skleněnou podložku v zadní ohniskové rovině objektivu.
- Fázová maska mění fázi procházejícího záření o úhel  $\alpha$  či může částečně absorbovat procházející záření.
- **Tento posun se projeví ve změně intenzity barvy v obraze, tlustější a hustější oblasti jsou tmavější, než slabší a řidší.**
- Metoda fázového kontrastu není vhodná k pozorování silně lomivých objektů, v tomto případě vzniká silně zářící rozhraní mezi objektem a okolním prostředím tzv. halo a nelze přesně určit ohraničení objektu a silně absorbujících zbarvených objektů.

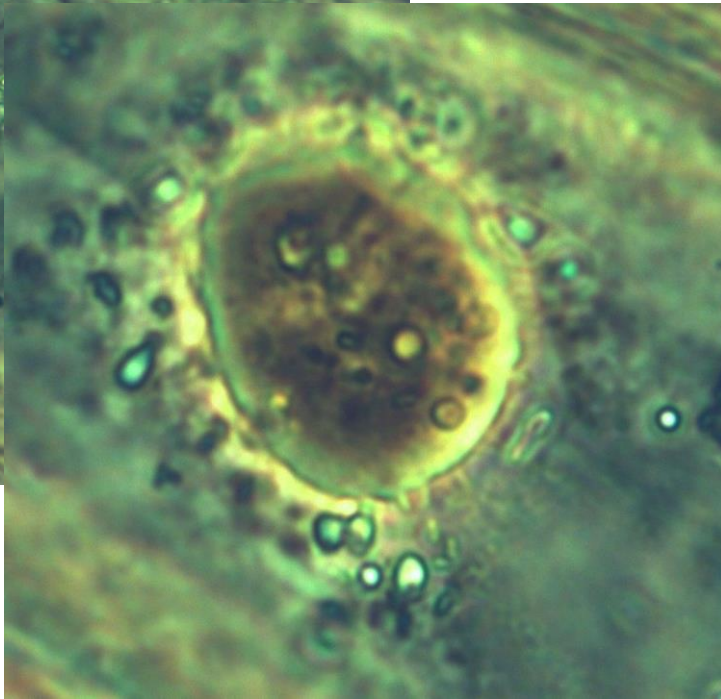
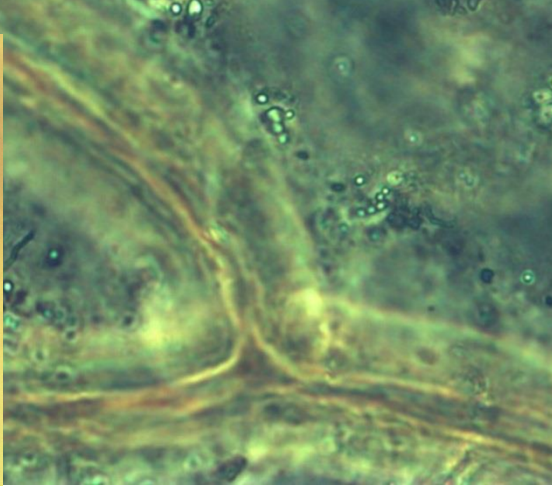
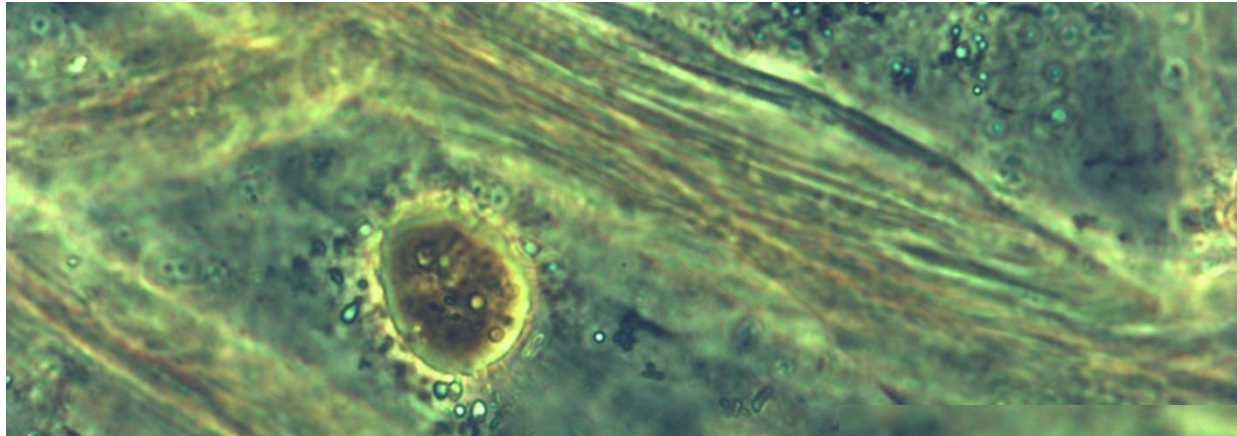


Mikrofotografie preparátu buněk  
v procházejícím světle,  
v temném poli a ve fázovém kontrastu





# Olympus BX 31, Promicam Lite 10, procházející světlo versus fázový kontrast

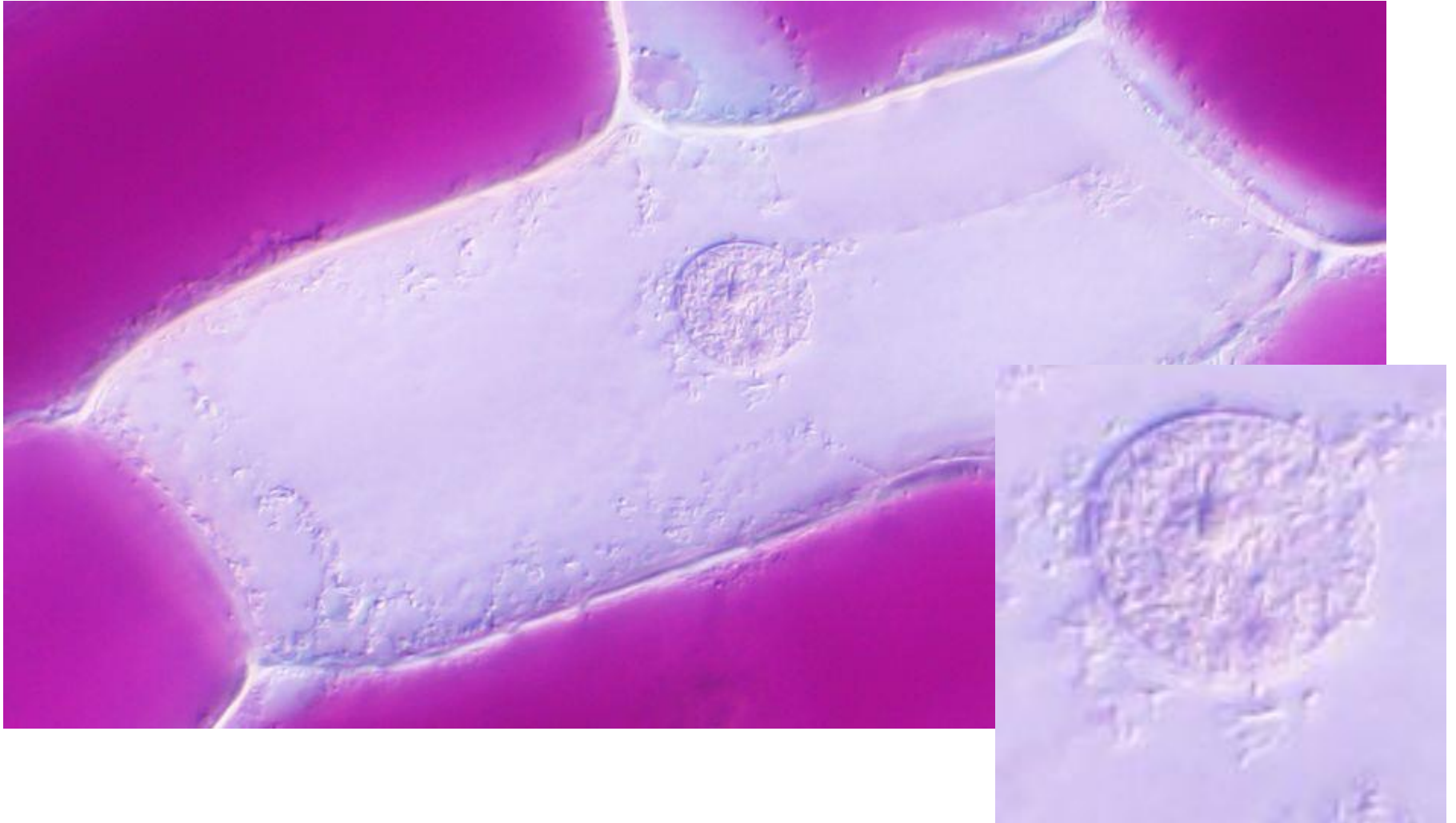


Mikrofotografie jádra a okolních struktur, procházející světlo  
versus fázový kontrast, V.Vymětalová

# Nomarského interferenční diferenciální kontrast (DIC)

- Principem Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu je polarizace světla s fázovým posunem. Polarizace světla dosáhneme pomocí dvou polarizačních hranolů (polarizátor, analyzátor).
- Světlo je tak rozděleno na dva paprsky. Fázový posuv vzniká ve dvou dvojlomných hranolových děličích (Wollastonovy hranoly).
- **Pozorovaný objekt se nám jeví třídimenzionální.**
- Nomarského diferenciální interferenční kontrast se v medicíně používá při pozorování nezbarvených živých buněk a mikroorganismů.

# Nomarského interferenční diferenciální kontrast (DIC)





# Program QuickPHOTO

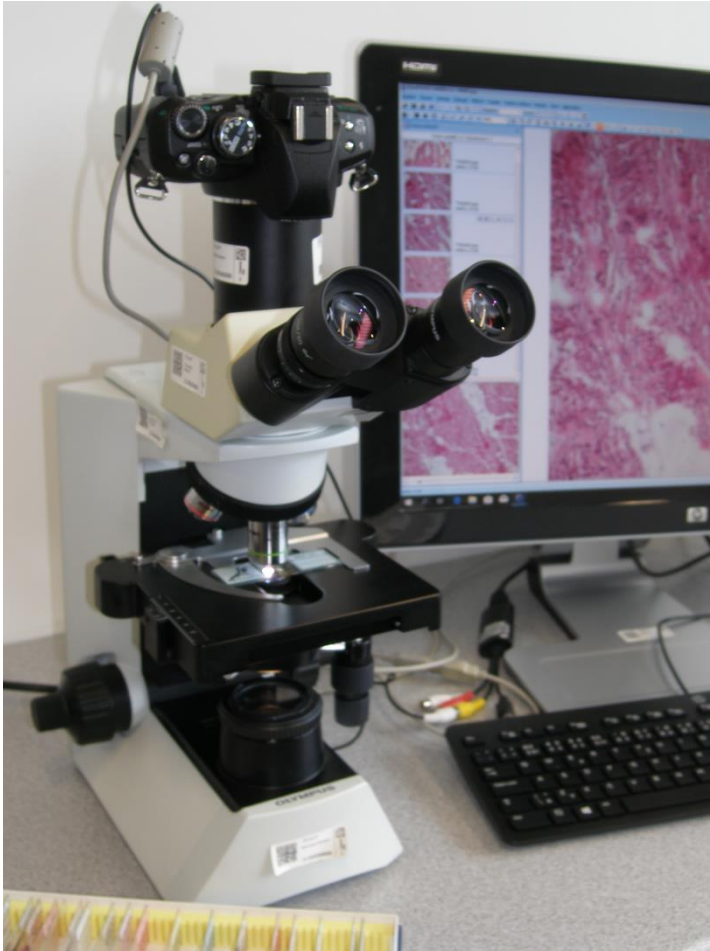


Foto V. Vymětalová

- Používáme program QuickPhoto.
- Umožňuje rychlé snímání preparátů, přehlednou archivaci snímků.
- Používáme i pro stanovení velikosti a jednoduchých parametrů pozorovaných objektů.
- Analýza obrazu LUCIA.

# Deep Focus - rozšiřující modul pro QuickPHOTO

- Deep Focus je přídatný modul k programům QuickPHOTO určený pro vytváření plně ostrých snímků, které z důvodu omezené hloubky ostrosti optických mikroskopů není možné nasnímat standardním způsobem.
- Výsledný plně ostrý snímek je složen z několika snímků s různou rovinou ostrosti. Z každého snímku je vybrána pouze ostrá část a z nich je složen výsledný snímek.
- Celý proces může být při použití zařízení pro motorizaci ostření automatizován.



Fotografie webové stránky Olympus

# Digitální mikroskop

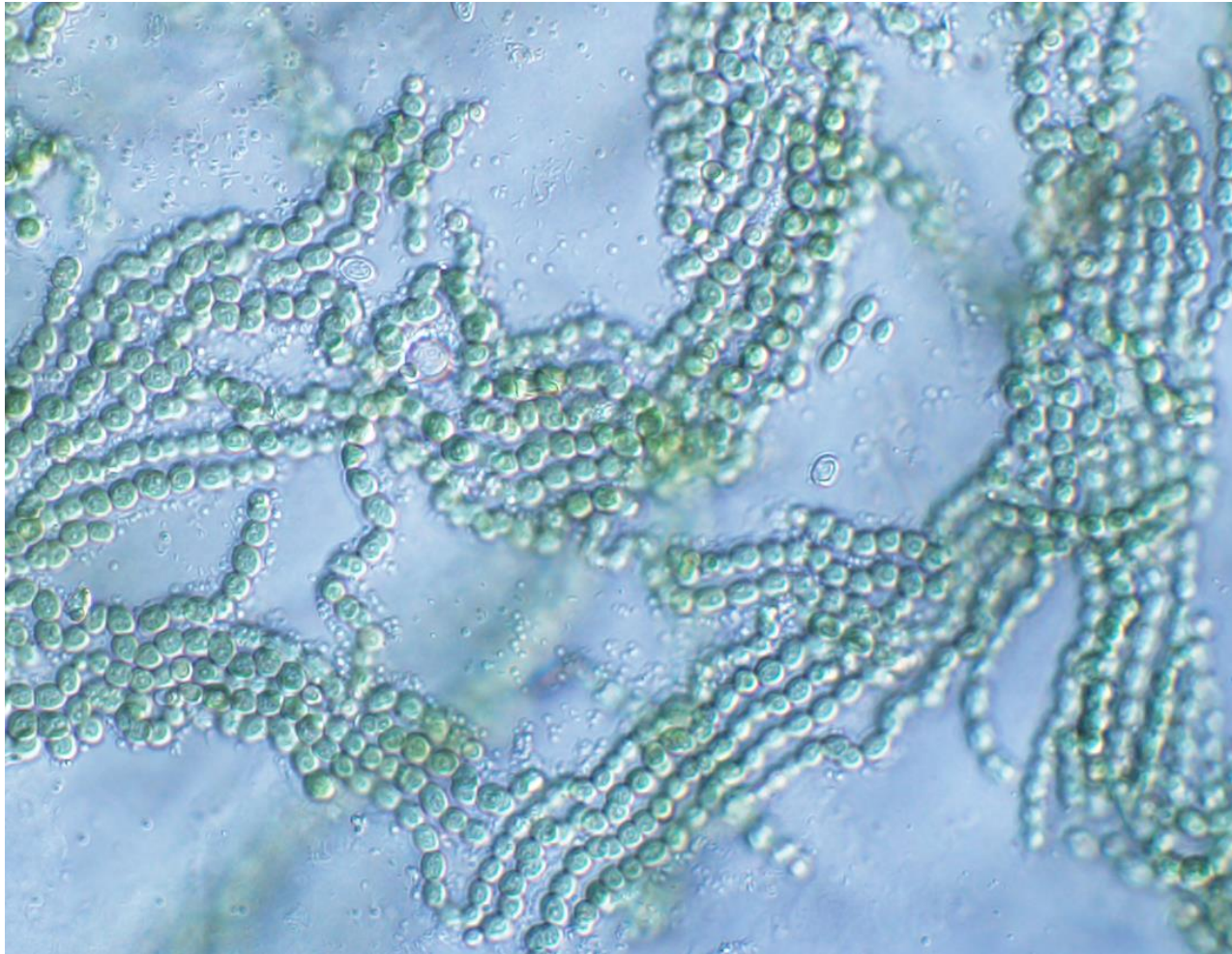
- Použití pro mikroskopování povrchových struktur a prostorového zobrazení.
- Omezené použití pro biologické nativní preparáty.



Fotografie J. Ryszawy, Fotobanka ČVUT



# Nomarského interferenční diferenciální kontrast (DIC)



- Mikrofotografie cyanobakterie r. *Nostoc*, DIC, V. Vymětalová

**Děkuji Vám za pozornost!**