

Světelná mikroskopie 1

1. Zadání

- 1) Seznamte se důkladně s jednotlivými prvky a s ovládáním světelného mikroskopu
- 2) Prostudujte sestavu osvětlovací soustavy a proveďte její nastavení podle Köhlerova schématu
- 3) Vycentrujte mikroskop
- 4) Proveďte kalibraci příčného zvětšení mikroskopu pomocí měrného okuláru a objektivního měřítka
- 5) Pomocí kalibrovaného mikroskopu změřte rozměry kvasinek a škrobových zrn
- 6) Seznamte se s prvky polarizačního mikroskopu
- 7) Studujte chování škrobových zrn v ortoskopickém uspořádání, zakreslete jejich vzhled a vysvětlete
- 8) Seznamte se s digitálním mikroskopem
- 9) Změřte rozměry kvasinek pomocí digitálního mikroskopu
- 10) Možnost pozorování vlastního preparátu pomocí digitálního mikroskopu

2. Pomůcky

Polarizační mikroskop, měrný okulár, objektivní měřítko, digitální mikroskop, zrcátko, podložní a krycí sklíčka, brambor, nůž, kvasnice

3. Teorie

Osvětlovací soustava podle Köhlerova schématu

Osvětlovací soustava se skládá ze zdroje S, kolektoru K, clonky kolektoru Cl(K), kondenzoru C a clonky kondenzoru Cl(C). Clonka Cl(K) je v ohniskové rovině K (primární obraz S), Cl(C) je v ohniskové rovině C.

Správné nastavení: S je zobrazen kolektorem na Cl(C), Cl(K) je zobrazena kondenzorem na P. Pak Cl(K) omezuje osvětlené pole preparátu P a Cl(C) ovlivňuje osvětlení P a aperturní úhel osvětlovací soustavy (nazývá se proto také aperturní clonka). Je dosaženo optimálního využití světla zdroje a homogenní osvětlení preparátu.

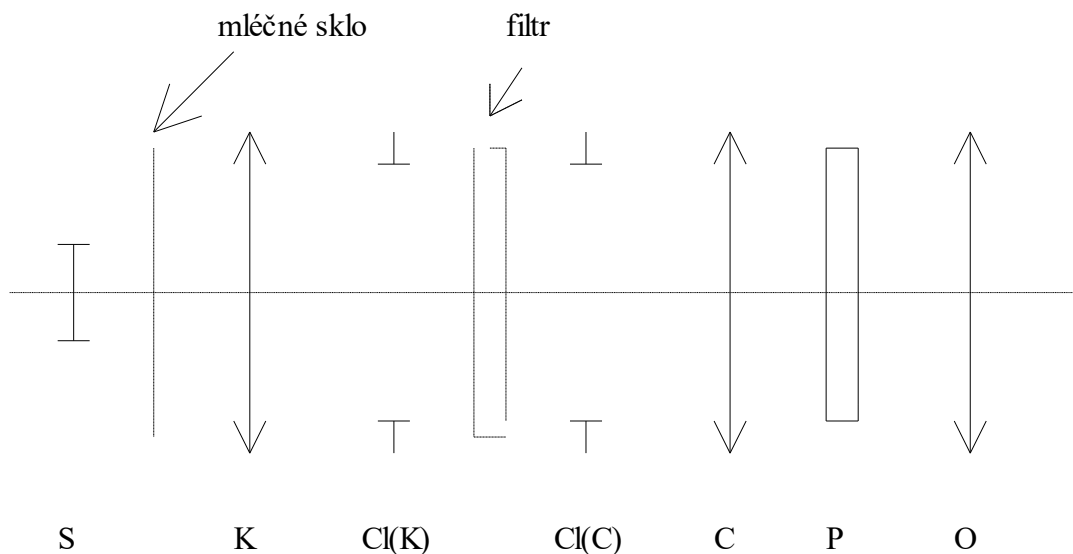


Schéma Köhlerova uspořádání osvětlovací soustavy světelného mikroskopu

Centrování mikroskopu

Cílem je seřídít mikroskop tak, aby všechny kruhové prvky měly střed na optické ose. Centrování lze provádět vůči opěrným (pevným) prvkům. U našeho mikroskopu jsou pevnými prvky kolektorová clonka, clonka zorného pole v okuláru a Amiciho-Bertrandova čočka. Centrovatelné prvky jsou: zdroj světla S, aperturní (kondenzorová) clonka Cl(K), stolek a objektiv (O).

Postup centrování:

- 1) Zavřeme kolektorovou clonku. Přes zrcátko zkontrolujeme obraz zdroje světla na kolektorové cloně.
- 2) Vycentrujeme dvěma nasouvacími klíči zdroj světla tak, aby jeho obraz byl uprostřed kondenzorové clony.
- 3) Vložíme do mikroskopu libovolný preparát a zaostříme.
- 4) Stavěcími šrouby vycentrujeme otočný stolek tak, aby při jeho otáčení zůstával střed otáčení ve středu nitkového kříže okuláru.

Měření příčných rozměrů v mikroskopu (např. buněk, chloroplastů a celých lístků mechu)

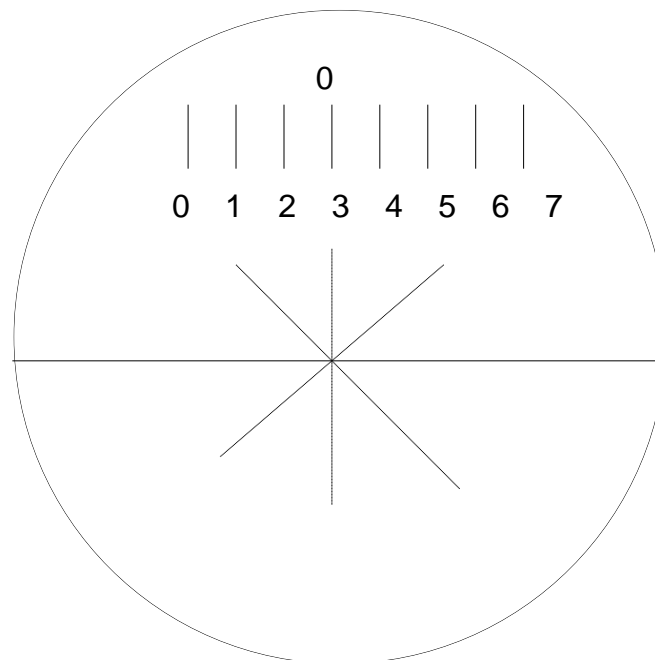
K měření příčných rozměrů objektů, které jsou celé vidět v mikroskopu využijeme měřicí okulár a kalibrovaný mikroskop.

Jeden z okulárů nahradíme měřícím okulárem firmy Carl Zeiss, Jena (zvětšení 15 x). Zorné pole zaostřené oční čočkou okuláru je znázorněné na obr. 2. V horní polovině je pevná stupnice osmi stejně vzdálených očíslovaných dílků. Je to hrubé okulárové měřítko (tzv. mikrometr). Pevný

střed pole je vyznačen jako vrchol pravého úhlu svíraného dvěma přerušovanými polopřímkami v pravé části zorného pole.

Vodorovná přerušovaná přímka, zrcadlový obraz dvou pevných polopřímek, krátká vertikální linie na střední přímce a dvojice pevných linií částečně se překrývající s pevnou stupnicí se současně pohybují při otáčení mikrometrického šroubu. Vzdálenost dvojice linií odpovídá deseti a vzdálenost sousedních pevných linií měřítka stu dílků na bubínku mikrometrického šroubu měrného okuláru. Splývá-li střed pohyblivé dvojice linií s pevnou linií, je na stupnici mikrometrického šroubu nula.

Pevné měřítko slouží k přibližnému odhadu rozměrů a k zápisu počáteční a koncové hodnoty měřeného rozměru. Pokud zvolíme jako jednotku jeden dílek stupnice mikrometrického šroubu, udává stupnice mikrometrického šroubu jednotky a desítky a čísla u linií pevného měřítka stovky těchto jednotek (např. 365 až 728 apod.). Měřicí okulár lze pomocí stavěcích šroubů vycentrovat vůči ose mikroskopu.



Zorné pole měřicího okuláru Carl Zeiss, Jena

Pro kalibraci máme k dispozici kromě měřicího okuláru ještě objektivní měřítko (tzv. objektivový mikrometr), ve kterém je jeden centimetr rozdělen přesně liniemi na sto dílků (označení 10 : 100). Alternativně jde pro kalibraci použít jakýkoliv preparát s přesně definovanými rozměry, třeba Bürkerova komůrka. Vložíme objektivní měřítko jako preparát do mikroskopu a zaostříme mikroskop na tuto stupnici. Otočíme stolek tak, aby linie měřítka byly přesně rovnoběžné s

liniemi stupnice v okuláru. Linie objektivního měřítka jsou při větším zvětšení poměrně široké, a proto při kalibračním postupu nastavujeme střed pohyblivé části okuláru nebo jednu z dvojice pohyblivých linií na stejný okraj či střed obrazu linie objektivního měřítka.

Otáčením mikrometrického šroubu okuláru zjistíme, kolik dílků šroubu připadá na vzdálenost sousedních linií obrazu objektivního měřítka. Měření provádíme statisticky. Připadá-li v průměru na vzdálenost sousedních linií objektivního měřítka D dílků, je charakteristická konstanta uspořádání objektiv-okulár:

$$k = 0,1/D \text{ (mm)}.$$

Chceme-li nyní měřit příčné rozměry objektů v preparátu, posuneme pomocí křížového posuvu objekt do středu zorného pole a natočíme preparát pomocí otočného stolku do takové polohy, aby měřený rozměr splýval s vodorovnou linií zorného pole, nebo byl s ní alespoň rovnoběžný. Druhou možností dosažení této rovnoběžnosti je otočení měrného okuláru. Tento postup je méně praktický a u polarizačního mikroskopu využíváme s výhodou vycentrovaného otočného stolku.

Nyní nastavíme pomocí mikrometrického šroubu pohyblivý střed nitkového kříže na levý krajní bod měřené úsečky a odečteme hodnotu polohy m_A a totéž provedeme pro pravý krajní bod (hodnota m_B). Délka měřené úsečky je

$$d = k \cdot (m_B - m_A).$$

Tímto způsobem změříme příčné rozměry buněk a chloroplastů např. listů mechu. K měření příčných rozměrů objektů, jejichž obraz je větší než zorné pole mikroskopu lze použít křížových posuvů preparátu (x, y), které jsou nastavitelné s přesností na 0,1 mm za použití nonia obdobně jako u posuvného měřítka. Měřící okulár nastavíme nejlépe tak, aby vznikl nitkový kříž (střední poloha). Křížovým posunem preparátu nastavíme jeden krajní bod měřené úsečky (A) tak, aby splýval se středem nitkového kříže, a odečteme polohy na křížových posuvech (x_A, y_A). Totéž provedeme pro druhý krajní bod B (x_B, y_B). Vzdálenost bodů je dána vztahem

$$d = (x_B - x_A)^2 + (y_B - y_A)^2$$

Změřte rozměry kvasinek a škrobových zrn.

Některé další možnosti měření na mikroskopu

Plošná hustota objektů

Zjistíme celkovou plochu zorného pole (P) např. tím, že změříme jeho průměr. Pokud se jedná o objekty, které zcela pokrývají zorné pole a navzájem se nepřekrývají (např. buňky listu mechu nebo buňky pokožky cibule), lze průměrnou plochu jednoho objektu vypočítat ze vztahu

$$p = P / j,$$

kde j je počet objektů v zorném poli. Počet objektů připadajících na jednotkovou plochu je pak dán vztahem

$$i = j / P.$$

U větších objektů, z nichž některé zasahují do zorného pole jen částečně, je třeba zvolit pravidlo jejich počítání. Rozdělíme zorné pole na pravou a levou část a do počtu zahrneme jen buňky zcela uvnitř zorného pole a ty buňky, které částečně zasahují do levé části zorného pole. Ty, které zasahují do pravé části zorného pole do celkového počtu nezahrnujeme. Tato metoda není příliš přesná. Je třeba volit takové zvětšení, při němž je v zorném poli alespoň několik desítek objektů.

Tloušťka objektů v preparátu

Zde se využívá mikrometricky dělený šroub vertikálního posuvu stolku. Objekt při větším zvětšení zaostříme na jeho svrchní část a odečteme hodnotu m_A , pak na spodní část a odečteme m_B . Při určování tloušťky objektu musíme brát v úvahu indexy lomu médií u objektivu (n_o) a média obklopujícího vzorek v preparátu (n_p). Tloušťka objektu se pak vypočte ze vzorce

$$T = n_p / n_o \cdot (m_A - m_B).$$

U suchých objektivů je $n = 1$, u imersních $n = n_i$ (index lomu imersní kapaliny).

Některé biologické preparáty v ortoskopickém uspořádání polarizačního mikroskopu

Polarizační mikroskop v ortoskopickém uspořádání představuje kombinaci běžného mikroskopu a polarimetru. V osvětlovací soustavě je zařazen polarizátor (před kondenzorem). Jeho základní poloha (zapadávací) je taková, že preparát je osvětlován lineárně polarizovaným světlem, jehož elektrický vektor kmitá v zorném poli ve svislém směru. Je možné nastavit libovolný směr kmitání vektoru E , stupnice nastavení však není příliš přesná.

Za objektivem je umístěn analyzátor, jehož kmitosměr je nastavitelný s přesností na jednu úhlovou minutu. Dvě základní polohy analyzátoru jsou:

- zkřížená se směrem polarizátoru (černá střední stupnice);
- svírající úhel 45 stupňů se směrem polarizátoru (červená stupnice).

Analyzátor se zařazuje do optické osy tak, že se otočnými kotouči nastaví červené tečky nad sebe. Na těchto kotoučích jsou nastavitelné ještě dvě další kombinace teček (odspodu):

- černá-černá: analyzátor vyřazen z optické osy;

- červená - černá: analyzátor vyřazen, zařazen pomocný filtr.

Šroubem na pravé straně tubusu lze polohu analyzátoru aretovat. Před manipulací s analyzátozem musí být tento šroub povoleno.

V biologickém materiálu lze očekávat několik různých typů oblastí podle jejich vlivu na lineárně polarizované světlo:

a) Izotropní, opticky neaktivní oblasti nemění stav polarizace procházejícího světla, v ortoskopickém režimu jsou tmavé.

b) Opticky aktivní oblasti stáčí rovinu polarizace lineárně polarizovaného světla. V biologických materiálech (vzhledem k malé tloušťce preparátů) nejsou tyto oblasti běžně detekovatelné.

c) Anizotropní oblasti charakteru jednoosých či dvojosých krystalů s různým směrem os vůči rovině preparátu. Tyto oblasti vykazují anizotropní efekty a jsou v biologii nejčastější.

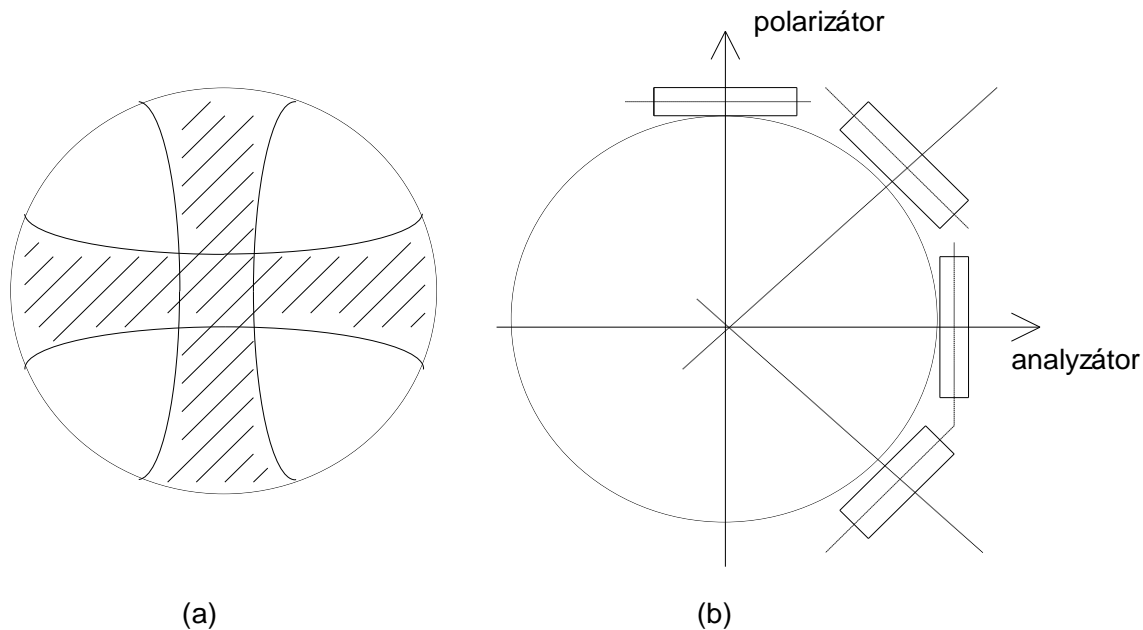
Škrobová zrna

Jak známo, škrobová zrna mají vrstevnatou strukturu, která je zřetelná i na obrazu v běžném mikroskopu. V ortoskopickém uspořádání polarizačního mikroskopu lze získat další potvrzení této představy. V zářicím zrnu je černý "maltézský kříž", jehož ramena jsou rovnoběžná se směry polarizátoru a analyzátoru.

Při otáčení zrna se tento zásadní vzhled nemění, kříž zůstává ve své poloze, jen se mírně deformuje. Tento jev se dá vysvětlit následovně. Škrob se ukládá zhruba v kulových slupkách tak, že osy molekul jsou tečné ke kulové ploše. U plochých zrn jsou tyto osy přednostně orientované v rovině plochy zrna.

Úvahy analogické předchozím vedou k závěru, že v libovolné poloze zrna budou vertikální a horizontální směry tmavé a maximální jas budou mít osy kvadrantů.

Jiným příkladem biologického materiálu s anizotropními oblastmi jsou příčně pruhované svaly, jejichž vlákna obsahují typické anizotropní oblasti. Je možné jejich chování demonstrovat na preparátech z masa.



Vzhled škrobového zrna v ortoskopickém režimu polarizačního mikroskopu (a) a jeho plošný model (b).

Extrakce škrobových zrn z brambor

- 1) Brambor oloupeme a nakrájíme na drobné části
- 2) Kousky bramboru vložíme do kádinky a necháme 10 minut usazovat
- 3) Opatrně slijeme. Škrobové zrna zůstanou usazené na dně
- 4) K usazeným škrobovým zrnům přidáme 5 ml destilované vody, promícháme a nanese 20 ul na mikroskopické sklíčko

Digitální mikroskop

V předchozí části praktika jste se seznámili s nastavením a ovládním klasického optického mikroskopu. V další části praktika prozkoumejte možnosti digitálního mikroskopu, kalibrujte ho pro měření rozměrů za pomoci objektivního měřítka, změřte rozměry kvasinek a škrobových zrn a diskutujte výhody a nevýhody obou mikroskopů. Svou konstrukcí spadá digitální mikroskop mezi mikroskopy pracující v režimu odraženého světla, takže odpadá potřeba tenkého průhledného preparátu. Pro speštění úlohy je možnost pozorovat vlastní preparát (mezi osvědčené preparáty patří drobné kovové předměty, různé druhy hmyzu, display mobilního telefonu).

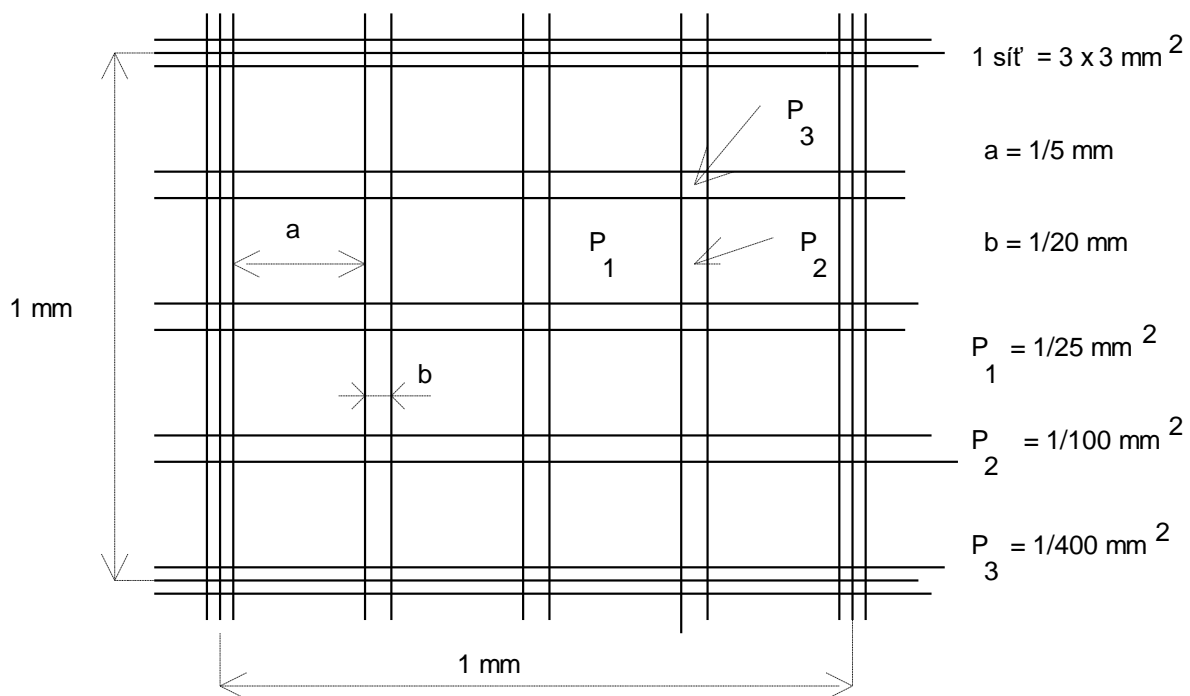
Počítání kvasinek pomocí Bürkerovy komůrky

Bürkerova počítací komůrka má dvě počítací site. K naplnění komůrek je možné opět použít pipety 25 μl nebo speciálně upravené pipety ze skleněné trubičky, vytažené v kapiláru.

Bürkerova komůrka, důkladně vyčištěná a suchá, je připravena s přitlačeným krycím sklíčkem. Toto sklíčko je speciální, tlustší, přesně rovinné se zabroušenými rohy. Mezi sklíčkem a sítí je při správné poloze mezera přesně 0,1 mm. Hrot pipety přiložíme k okraji sklíčka a 1-3 kapky suspenze necháme vtéci kapilárními silami pod sklíčko tak, aby byla zaplněna celá oblast sítě. Vnější přebytek suspenze (např. na krycím sklíčku) odsajeme čtverečkem z dřevité vaty, tampónem nebo filtračním papírem. Přebytečnou suspenzi uvnitř zachytí drážky komůrky.

Počítání kvasinek

1) Používáme zvětšení mikroskopu 100 - 300 x. Volíme takové osvětlení komůrky, aby jak síť, tak kvasinky kontrastně vystupovaly.

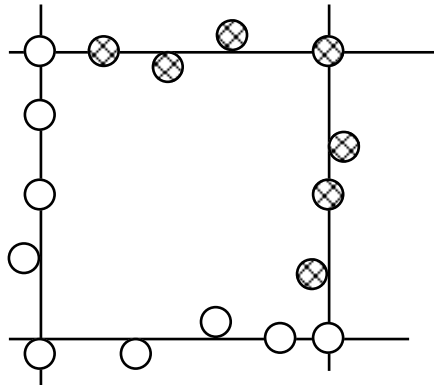


Část mřížové sítě Bürkerovy komůrky

2) Bürkerovo pravidlo. Kvasinky, které se dotýkají čar se počítají takto:

- zvolíme dvě sousední strany obdélníku (čtverce) např. horní a pravou. Spočteme všechny kvasinky, které na těchto stranách leží, nebo se jich dotýkají zevnitř i zevně.
- kvasinky, které se dotýkají nebo leží na dolní a levé straně se nepočítají;
- kvasinka, která leží na pravé a současně na dolní čáře a ta, která leží na horní a současně levé čáře se nepočítá.

Pravidlo lze snadno zdůvodnit představou o sousedních čtvercích a požadavkem, aby se žádná kvasinka nepočítala dvakrát.



Bürkerovo pravidlo. Počítají se vyšrafované kvasinky

3) Zvolíme si vhodný postup při počítání ve čtvercích (obdélnících) a to buď po řadách, sloupcích nebo diagonálně. Možný je meandrovitý postup. Mírným přeastřením můžeme vždy překontrolovat, zda jsme neopomněli kvasinku přilepenou na sklíčku nebo na dně.

4) Obecný výraz pro počet kvasinek v 1 mm^3 je

$$P = p z / (S t n)$$

kde P - počet kvasinek v 1 mm^3 , p - zjištěný počet kvasinek, n - počet počítaných ploch, S - velikost jedné plochy (mm^2), t - hloubka kyvety (mm), z - zředění.

e) Chyby měření

Ze statistického hlediska je pro daný proces měření vhodná Poissonova statistika.

$$P(p) = e^{-u} u^p / p!$$

kde u je střední hodnota počtu částic a $P(p)$ pravděpodobnost napočítání p částic. Absolutní chyba jednoho měření (statistický rozptyl) je \sqrt{p} a relativní $1/\sqrt{p} = \sqrt{p}/p$ (100 %). Snadno usoudíte, že postačí-li vám přesnost 10 %, napočítejte 100 kvasinek. Požadujete-li ovšem např. 5 % přesnost, je třeba spočítat 400 kvasinek atd. Určete přesnost vašich výsledků.

f) Čištění komůrky a pipet

Komůrku, krycí sklíčko a pipety čistíme ihned po použití vodou, lihem a éterem, případně postačí vodou se saponátem. Protahujeme je pouze koňskou žíní.