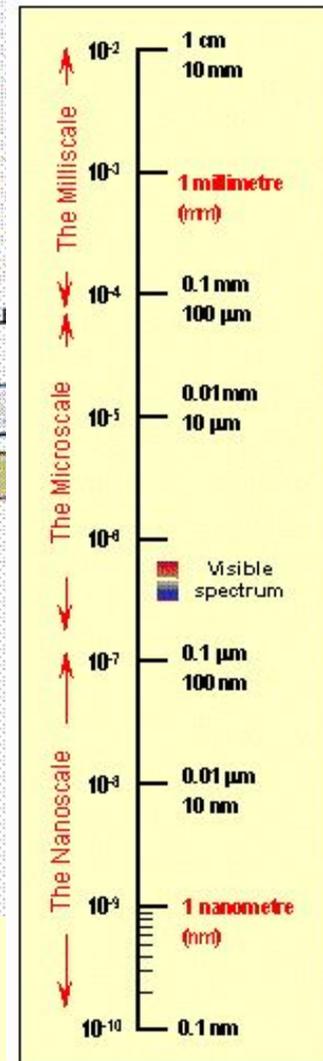
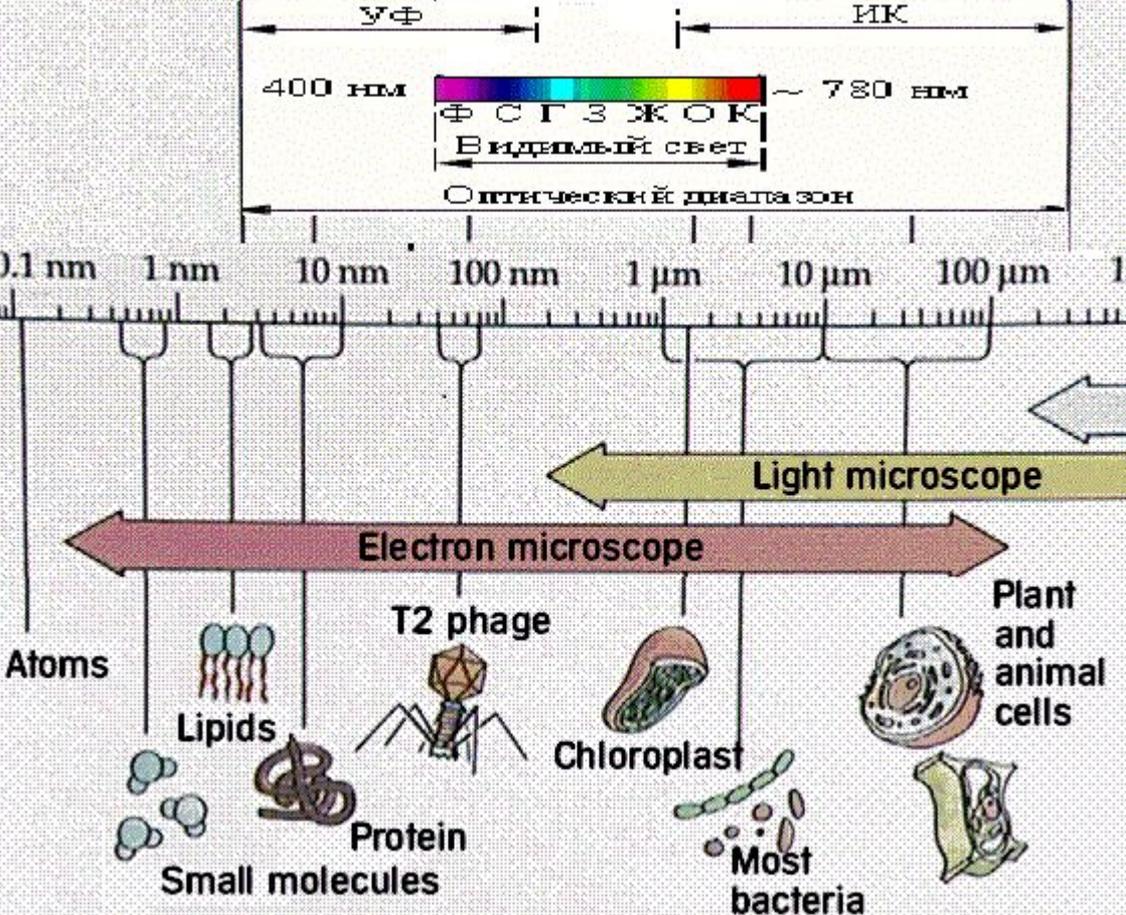


Методы микроскопии



Содержание

- ❑ **Методы световой микроскопии:**
 - Светлопольная микроскопия
 - Ультрафиолетовая микроскопия
 - Люминесцентная микроскопия
 - Микроскопия в темном поле зрения
 - Фазово-контрастная микроскопия
 - Интерференционная микроскопия
 - Поляризационная микроскопия
 - Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия
- ❑ **Методы электронной микроскопии**
- ❑ **Сканирующая зондовая микроскопия**



муравей
~ 5 mm



человеческий волос
~ 10-50 μm
толщина

Размер большинства бактерий от 1 до 10 мкм

- ❑ Диаметр кокков колеблется от 0,5 до 2,5 мкм, палочковидных и спиралевидных форм - от 0,1 до 2 мкм, длина палочковидных особей - от 0,2 до 8-10 мкм, длина спиралевидных особей - от 4 до 50 мкм.
- ❑ Человеческий глаз видит объекты величиной около 0,1 мм, а различает детали в объектах размером не менее 1 мм



Антони ван Левенгук (1632 – 1723). Нидерландский натуралист, один из основоположников научной микроскопии. За всю жизнь изготовил около 250 линз, добившись в конце концов увеличения в **150-300 раз**. С их помощью в 1673 первым из людей наблюдал и зарисовал микробов.



Микроскоп Гука



Микроскоп 1751 года

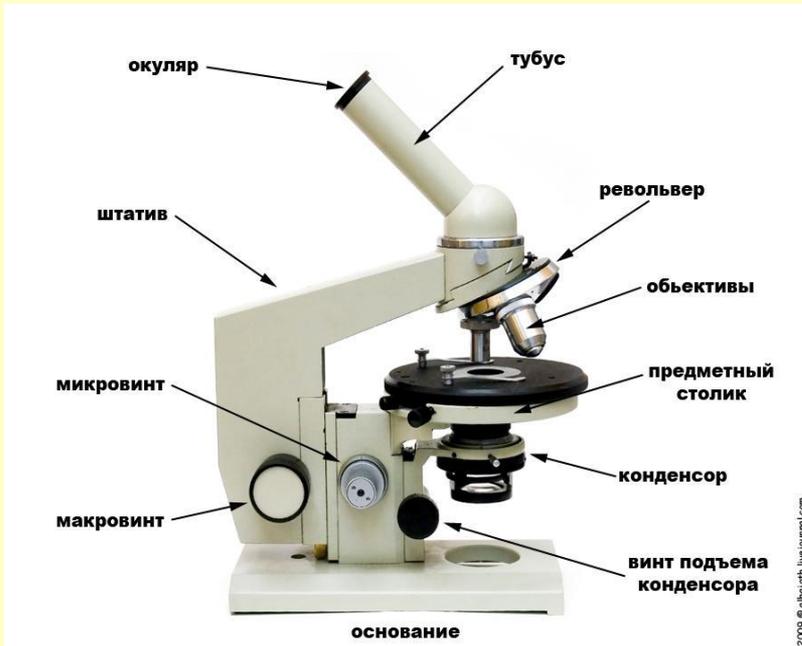


Современный световой микроскоп



Один из первых микроскопов, 1876 г.

Светлопольная микроскопия



- Основная оптическая часть любого микроскопа – **объектив**. Он состоит из сложной центрированной системы линз, дающей возможность получить правильное, увеличенное обратное изображение предмета.

Каждый объектив характеризуется следующими основными константами: фокусное расстояние, увеличение, разрешающая способность, числовая апертура, действующее отверстие. Собственное увеличение объективов указано на оправе (8, 10, 20, 40, 60, 90, 100).

Разрешающая способность объектива, т. е. свойство изображать мельчайшие детали препарата, характеризуется наименьшим расстоянием, при котором различают две тесно расположенные точки. Разрешающая способность определяется формулой:

$$E = \lambda/A,$$

где E – разрешающая способность объектива;

λ – длина световой волны;

A – числовая апертура.

Числовая апертура («охват» линзы) – произведение показателя преломления среды, отделяющей объект от передней линзы объектива микроскопа, на синус апертурного угла.

- Оптические микроскопы не могут давать разрешающей способности менее полупериода волны опорного излучения, таким образом, оптический микроскоп способен различать структуры с расстоянием между точками до $\sim 0,20$ мкм

Светлопольная микроскопия

- **Объективы** микроскопов подразделяются на **сухие и иммерсионные**. Объектив называется сухим потому, что между фронтальной линзой и исследуемым объектом находится воздух. При микроскопировании ввиду разницы показателей преломления стекла, на котором находится рассматриваемый препарат, и воздуха часть световых лучей отклоняется и не попадает в глаз исследователя.

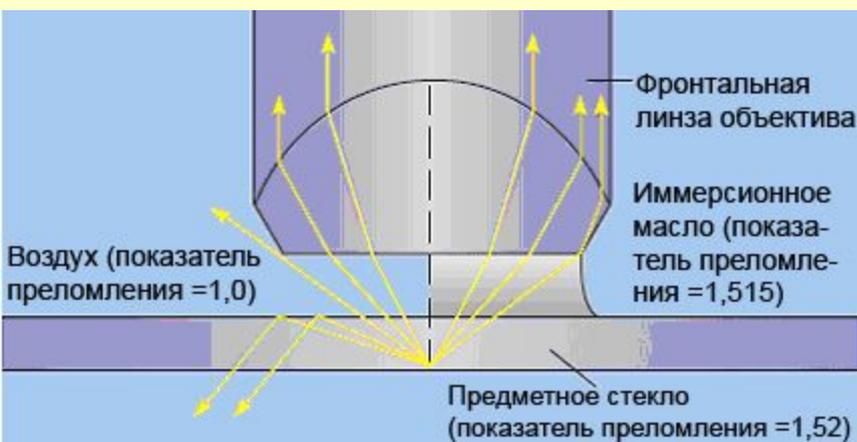


Схема хода лучей в сухой и иммерсионной системах.

Иммерсионная (погружная) система применяется для исследования микроорганизмов. Преимущество этой системы по сравнению с сухой заключается в том, что между стеклом и линзой устанавливается однородная (гомогенная) среда (стекло препарата + масло) с одинаковым показателем преломления. Поэтому падающие лучи, не подвергаясь преломлению и изменению направления, попадают в объектив, и этим достигается наилучшее освещение мельчайших объектов. Для этой цели часто применяется кедровое масло, показатель его преломления почти равен показателю преломления стекла. Капля этого масла наносится на стекло препарата, и в нее погружается иммерсионный объектив.



- Основная характеристика микроскопа – его **увеличение**. Линейным увеличением любой оптической системы называется отношение величины изображения, даваемого этой системой, к величине рассматриваемого предмета, выражается оно отношением $V = f/l$
- где V – линейное увеличение, f – величина изображения; l – величина предмета.
- *Увеличение микроскопа при данной длине тубуса равно произведению увеличений объектива и окуляра.* Для более полного использования разрешающей способности объектива и лучшего просмотра структуры препарата необходимо применять **полезное увеличение**. Установлено, что полезное увеличение микроскопа не может превышать числовую характеристику объектива более чем в 1000 раз. Допустим, имеется объектив с увеличением $\times 90$ и апертурой 1,25, полезное увеличение $1000 \times 1,25 = 1250$
- **Полезное увеличение** – это видимое увеличение, при котором глаз наблюдателя будет полностью использовать разрешающую способность микроскопа, то есть разрешающая способность микроскопа будет такая же, как и разрешающая способность глаза.
- Исходя из полезного увеличения, подбирают оптимально подходящий данному объективу окуляр. Разделив найденную величину полезного увеличения на увеличение используемого объектива, находят величину максимального увеличения окуляра, нужного для работы: $1250/90 = \times 14$. В данном случае лучше использовать окуляр с увеличением $\times 10$. При большем увеличении (например, $\times 15$) освещенность станет меньшей, а детали структуры окажутся расплывчатыми.
- *Предельная разрешающая способность иммерсионного микроскопа 0,2 мкм. Современные микроскопы дают увеличение в 700—900 раз.*

Ультрафиолетовая микроскопия



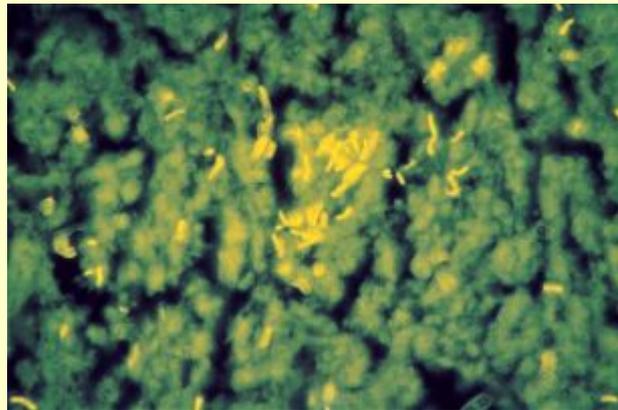
Ультрафиолетовые лучи невидимы для человеческого глаза. Поэтому изображения в УФ микроскопии регистрируют либо фотографически, либо с помощью электронно-оптического преобразователя или люминесцирующего экрана..

- Метод наблюдения в ультрафиолетовых (УФ) лучах позволяет увеличить предельную разрешающую способность микроскопа, которая зависит (см. выше) от длины волны λ применяемого излучения (для используемых в микроскопии УФ лучей $\lambda = 400—250 \text{ нм}$, тогда как для видимого света $\lambda = 700—400 \text{ нм}$).
- Но главным образом этот метод расширяет возможности микроскопических исследований за счёт того, что частицы многих веществ, прозрачные в видимом свете, сильно поглощают УФ излучение определённых длин волн и, следовательно, легко различимы в УФ изображениях.
- Характерными спектрами поглощения в УФ области обладает, например, ряд веществ, содержащихся в растительных и животных клетках (пуриновые основания, пиримидиновые основания, большинство витаминов, ароматические аминокислоты, некоторые липиды, тироксин и др.);
- С помощью ультрафиолетовой микроскопии уточняют локализацию и количество указанных веществ, а в случае исследования живых объектов — их изменения в процессе жизнедеятельности.

Люминесцентная микроскопия

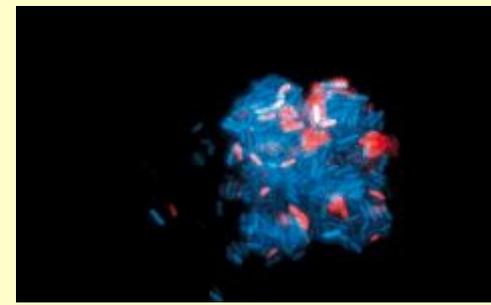


- Основана на использовании явления люминесценции (флюоресценции, холодного свечения) – способности некоторых веществ флюоресцировать, т. е. на доли секунд поглощать падающие на них УФ или коротковолновые (сине-фиолетовые) лучи, а затем снова испускать свет.
- Испускаемый свет имеет длину волны, превышающую длину волны поглощаемого света на 20–50 нм, т. е. смещен по длине волны в сторону длинноволновой области спектра. Так, например, если поглощается синий свет, то испускается зеленый свет. Зеленый свет преобразуется в желтый, желтый – в красно-оранжевый, а невидимое УФ- излучение – в видимый свет.
- Первичная (собственная) люминесценция наблюдается без предварительного окрашивания объекта. Вторичная (наведенная) возникает после окраски препаратов специальными люминесцирующими красителями – флюорохромами



Micobacterium tuberculosis (желтые)

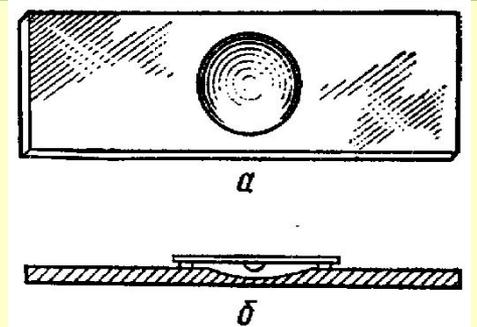
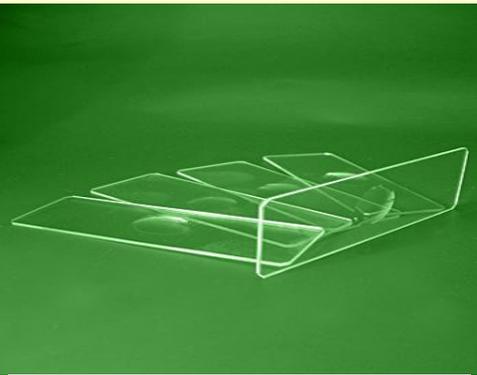
Преимущества люминесцентной микроскопии



Escherichia coli
(синие – живые,
красные – погибшие)

- ❑ цветное светящееся изображение микроорганизмов на чёрном фоне;
- ❑ обнаружение и установление локализации и концентрации живых и погибших микроорганизмов;
- ❑ возможность обнаружения микроорганизмов в исследуемом материале в небольших концентрациях вследствие высокой степени контрастности изображения;
- ❑ при использовании коротких УФ лучей разрешающая способность люминесцентного микроскопа увеличивается до 0,1 мкм;
- ❑ экспресс-идентификация антигенов микроорганизмов в РИФ;
- ❑ возможность исследования прозрачных и непрозрачных объектов;
- ❑ возможность исследования жизненных процессов в динамике;
- ❑ использование люминесцентной микроскопии при цитологических и гистохимических исследованиях, так как флюорохромы могут распределяться в клетке диффузно либо избирательно окрашивать отдельные клеточные структуры или определенные химические соединения биологического объекта.

Микроскопия нативных (неокрашенных) микроорганизмов



Предметные стекла с полированными лунками (а) и шлифованными краями разработаны для микроскопии препаратов «висячая капля» (б).
Толщина стекла - 1 мм.



Бактериальная культура в жидкой среде.



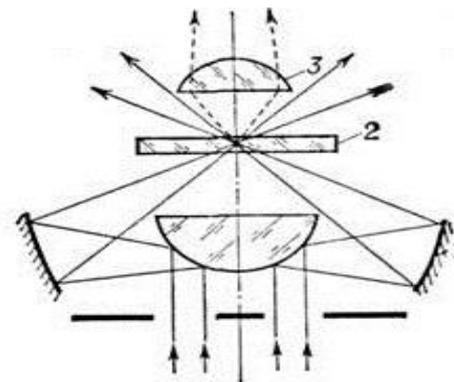
Препараты «раздавленная капля».
Исследуемый материал (бактериальная культура в физиологическом растворе) наносят на предметное стекло, которое покрывают покровным. Капля материала заполняет все пространство между покровным и предметным стеклом, образуя ровный слой.

Микроскопия в темном поле зрения

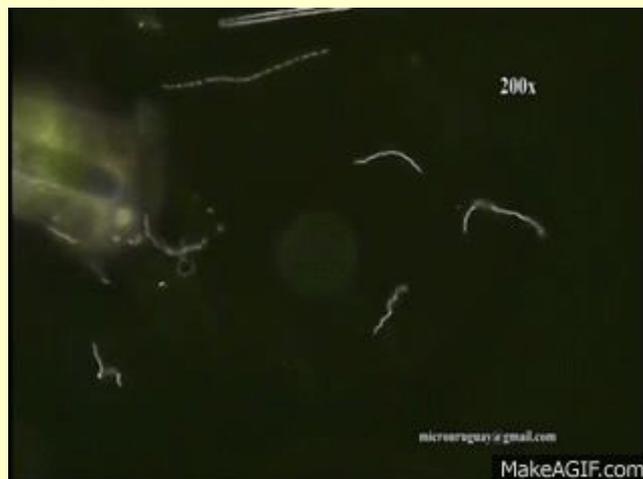
- ❑ Микроскопия в темном поле зрения основана на следующем принципе.
- ❑ Лучи освещают объект не снизу, а сбоку и не попадают в глаза наблюдателя, поле зрения остается темным, а объект на его фоне оказывается светящимся.
- ❑ Это достигается с помощью специального конденсора (параболоид), или обычного конденсора, прикрытого в центре кружком черной бумаги.
- ❑ Темнопольная микроскопия используется для изучения живых неокрашенных микроорганизмов.



Конденсор
темного поля



Метод темного поля в проходящем свете: 1 — конденсор; 2 — препарат; 3 — объектив.



Трепонета в темном поле зрения

Фазово-контрастная микроскопия

Оборудование для фазово-контрастных наблюдений

На любой оптический микроскоп устанавливается фазово-контрастный комплект, состоящий из:

- 4 объективных линзы
- центрирующий телескоп
- фазовая конденсаторная линза Цернике



Фазово-контрастный комплект, используемый National Optical Model в микроскопах 160 серии

В РФ выпускается комплект для фазово-контрастной микроскопии КФ-4 и КФ-5

- Фазовоконтрастная микроскопия значительно повышает контрастность объекта и используется для изучения нативных препаратов.

Фазово-контрастная микроскопия *Bacillus cereus*



- При прохождении пучка света через неокрашенный объект изменяется лишь фаза колебания световой волны, что не воспринимается человеческим глазом.
- Чтобы изображение стало контрастным необходимо превратить фазовые изменения световой волны в видимые амплитудные.
- Это достигается с помощью фазовоконтрастного конденсора и фазового объектива.
- Фазовоконтрастный конденсор представляет собой обычный объектив с револьвером и набором кольцевых диафрагм для каждого объектива.
- Фазовый объектив снабжен фазовой пластинкой, которую получают нанесением солей редкоземельных элементов на объектив.
- Изображение кольцевой диафрагмы совпадает с кольцом фазовой пластинки соответствующего объектива.

Интерференционная микроскопия

- решает те же задачи, что и фазово-контрастная. Но если последняя позволяет наблюдать лишь контуры объектов исследования, то с помощью интерференционной микроскопии можно изучать детали прозрачного объекта и проводить их количественный анализ.

МИМ (Модуляционная Интерференционная Микроскопия)

создан оптический прибор, позволяющий осуществлять 3D измерения образцов

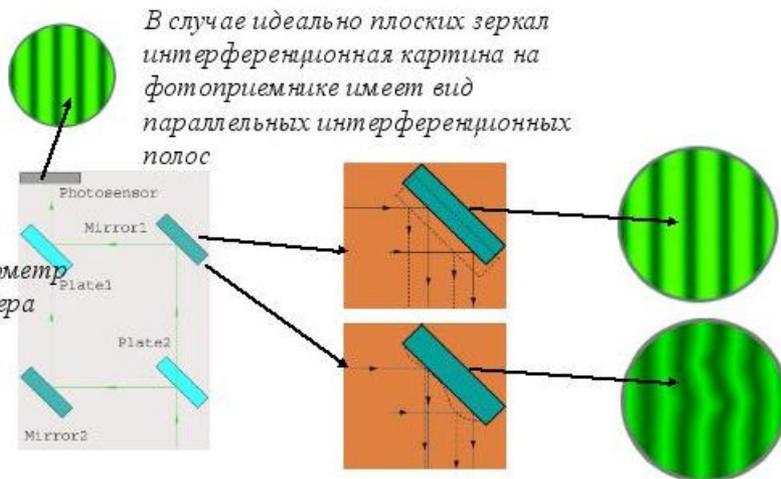


ИССЛЕДОВАНИЕ СПОР

Разработан оригинальный метод определения жизнеспособности спор микроспоридий рода *Nosem* методом лазерной интерференционной микроскопии

Сущность метода заключается в установлении различий в морфологии живых и убитых спор ноземы по их фазовым портретам.

Принцип работы МИМ

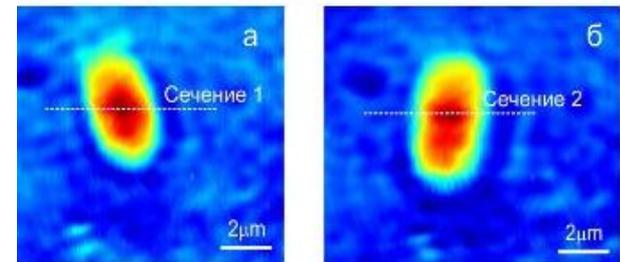


В случае идеально плоских зеркал интерференционная картина на фотоприемнике имеет вид параллельных интерференционных полос

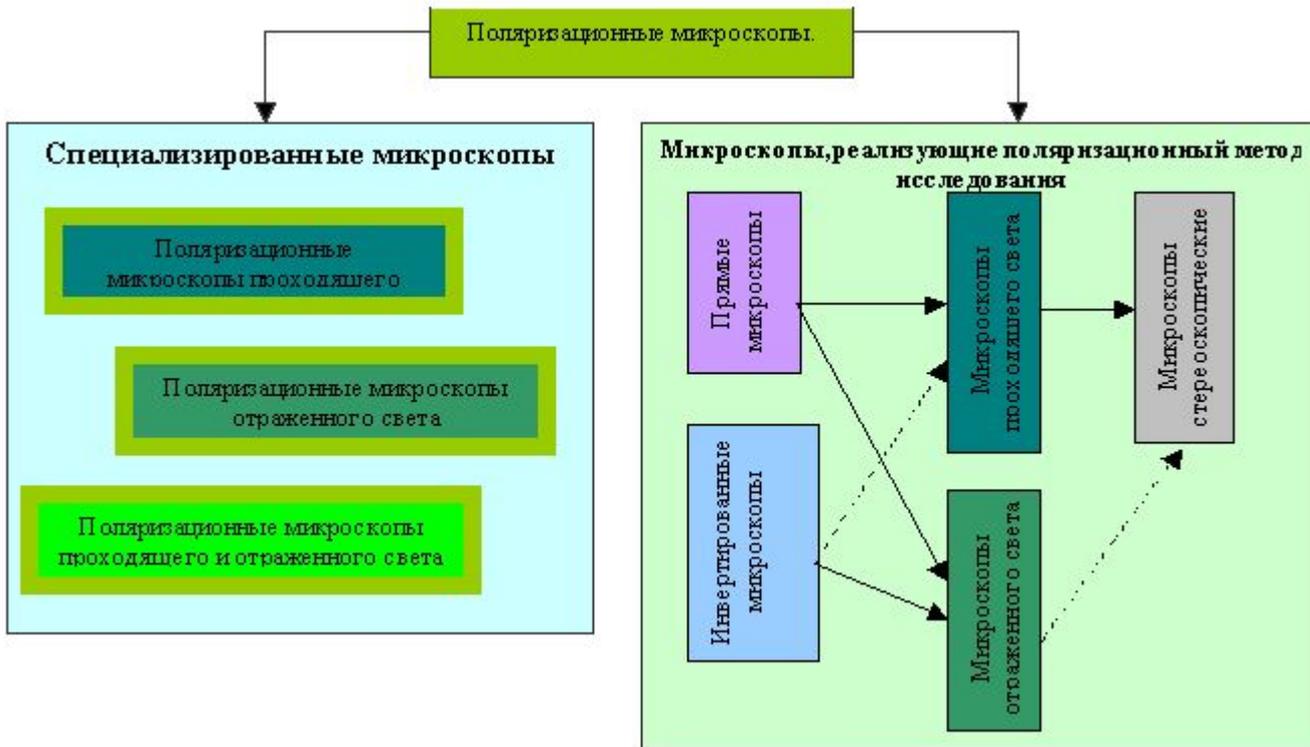
В случае оптически неоднородного объекта интерферометра интерференционная картина претерпевает искажения пропорционально высоте объекта

Интерферометр Маха-Цендера

При периодическом перемещении зеркала 2 мы получаем ряд интерферограмм и рассчитываем разность фаз между объектным и опорным пучками для каждого пикселя фотоприемника



Поляризационная микроскопия



- позволяет изучать объекты исследования в свете, образованном двумя лучами, поляризованными во взаимно перпендикулярных плоскостях, т.е. в поляризованном свете.
- Для этого используют пленчатые поляриды или призмы Николя, которые помещают в микроскопе между источником света и препаратом.

- Многие биологические объекты имеют строгую молекулярную ориентацию, являются анизотропными и обладают положительным двойным преломлением света.
- Сопоставление характера преломления лучей поляризованного света и величины анизотропии объекта позволяет судить о молекулярной организации его структуры.
- При этом в поляризованном свете можно исследовать как окрашенные, так и неокрашенные препараты.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

- является одной из основ для экспериментальных работ на живых системах микроуровня.
- Конфокальные микроскопы позволяют получать многомерные конфокальные флуоресцентные изображения с высоким разрешением и контрастом.
- Термин “конфокальная” означает “софокусная” – в плоскости, оптически сопряженной с фокальной плоскостью объектива, находится конфокальная диафрагма. Это позволяет регистрировать сигнал лишь от тонкого слоя.
- Конфокальный микроскоп отличается от "классического" оптического микроскопа тем, что в каждый момент времени регистрируется изображение одной точки объекта, а полноценное изображение строится путем сканирования (движения образца или перестройки оптической системы).
- Записав в памяти компьютера серию оптических срезов, можно провести объемную реконструкцию объекта и получить его трехмерное изображение.
- Современные системы позволяют быстро и с высоким разрешением получать 4D и 5D - мерные изображения структуры клеток, изучать локализацию белков и следить за динамическими процессами в живой клетке



Бактерии, живущие в зубном налете.

Электронная микроскопия

- В электронном микроскопе вместо световых волн используются электронные лучи, обладающие чрезвычайно малой длиной волны и высокой разрешающей способностью

Трансмиссивный электронный микроскоп

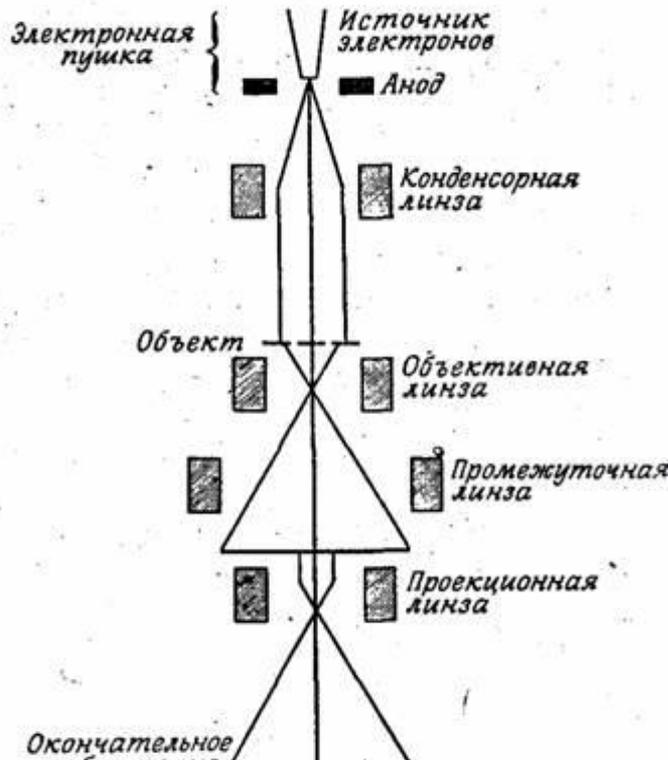
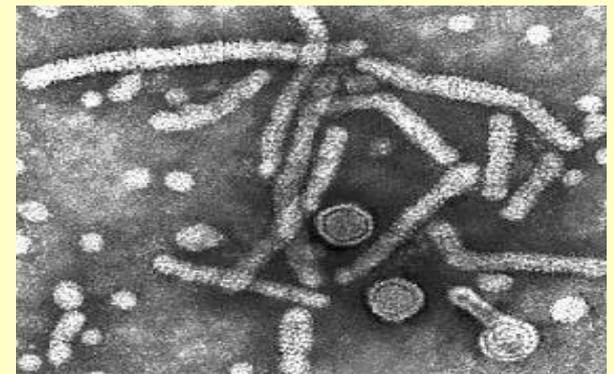
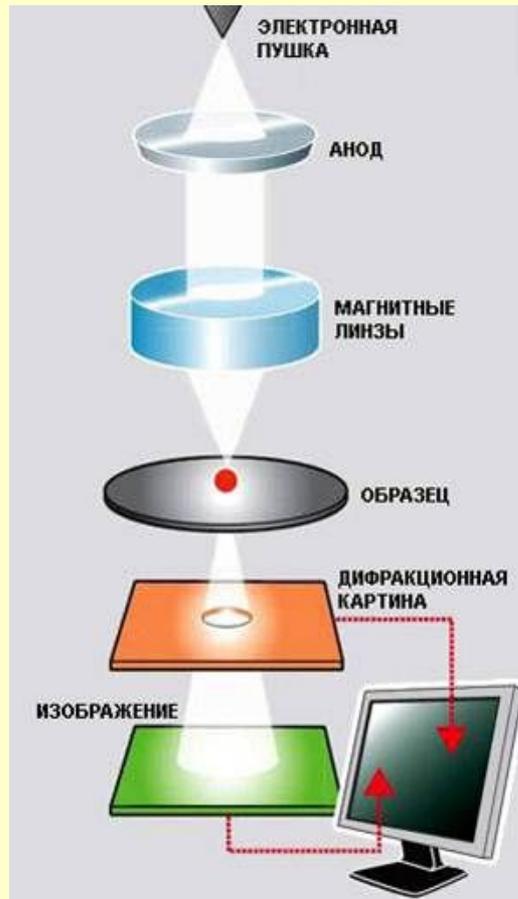


Схема трансмиссионного электронного микроскопа

- ❑ В качестве источника электронных лучей применяют электронную пушку, основой которой служит вольфрамовая нить, нагретая электрическим током.
- ❑ Между вольфрамовой нитью и анодом на пути электронов находится электрическое поле высокого напряжения.
- ❑ Электронный поток вызывает свечение фосфоресцирующего экрана.
- ❑ Проходя через объект, части которого имеют различную толщину, электроны будут соответственно задерживаться, что проявится на экране участками затемнения.
- ❑ Объект приобретает контрастность.
- ❑ Препараты для электронной микроскопии готовят на тончайших коллоидных пленках, исследуют объекты после их высушивания («нативные препараты»), напыления при помощи тяжелых металлов, ультратонких срезов метода реплик и др.

Трансмиссивная электронная микроскопия

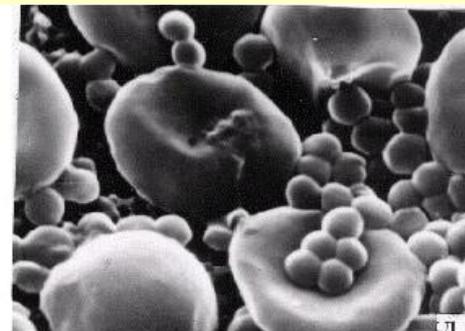
Просвечивающий электронный микроскоп JEM-2100



Вирус гепатита В

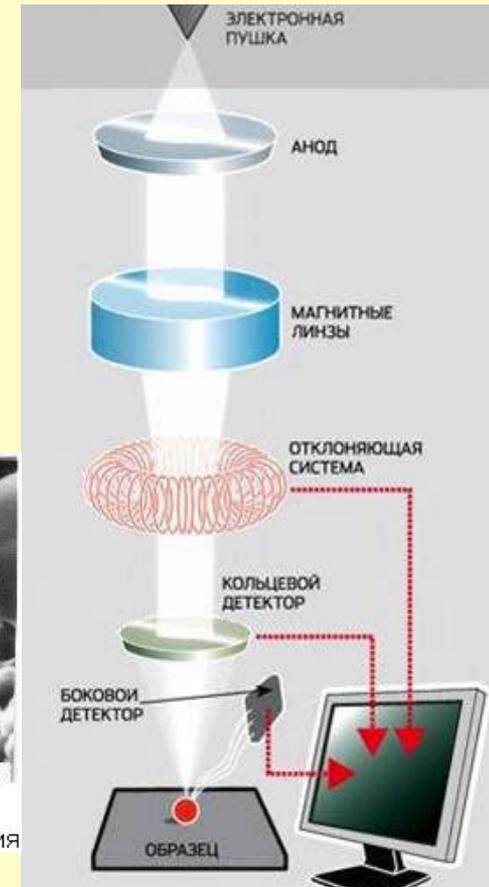
Сканирующий электронный микроскоп

- ❑ Если не просвечивать образец, а сканировать его поверхность сфокусированным в очень маленькое пятно (несколько нанометров) пучком электронов, последние не только рассеиваются на атомах образца, но и порождают вторичные электроны, рентгеновское и видимое излучение.
- ❑ На регистрации этих данных основана работа сканирующего электронного микроскопа.
- ❑ В отличие от просвечивающего ЭМ, с его помощью можно исследовать «толстые» образцы.
- ❑ Регистрируя углы рассеяния, интенсивность излучения и энергии вторичных электронов, можно изучать не только рельеф поверхности, но и химический состав образца, а также структуру образца в приповерхностном слое (десятки и сотни нанометров).
- ❑ Разрешение сканирующего электронного микроскопа обычно несколько меньше, чем у просвечивающего, и составляет от единиц до десятков нанометров.



S.aureus на эритроцитах
Сканирующая электронная микроскопия

Сканирующий просвечивающий электронный микроскоп с коррекцией сферической aberrации HD-2700



Сканирующий туннельный микроскоп (СТМ)

Сканирующий туннельный микроскоп не рассматривает, а, скорее, «ощупывает» исследуемую поверхность.

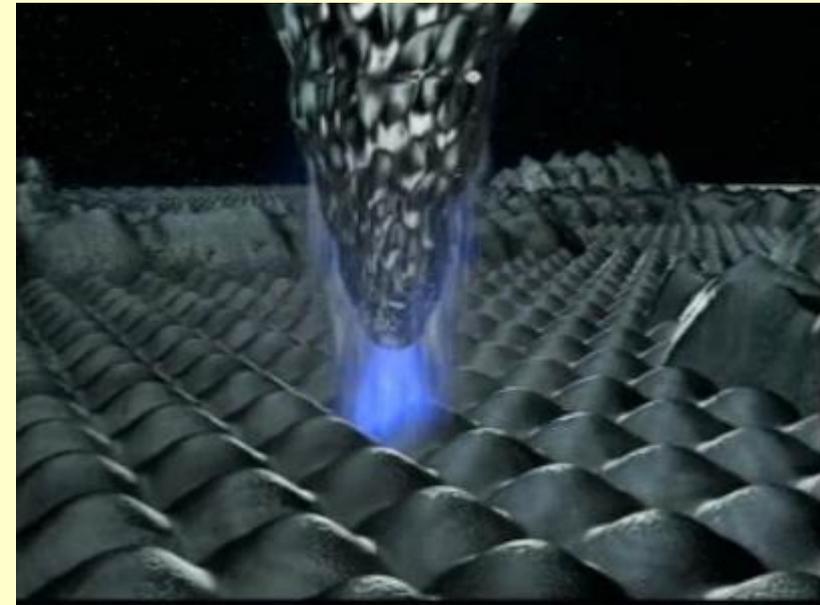
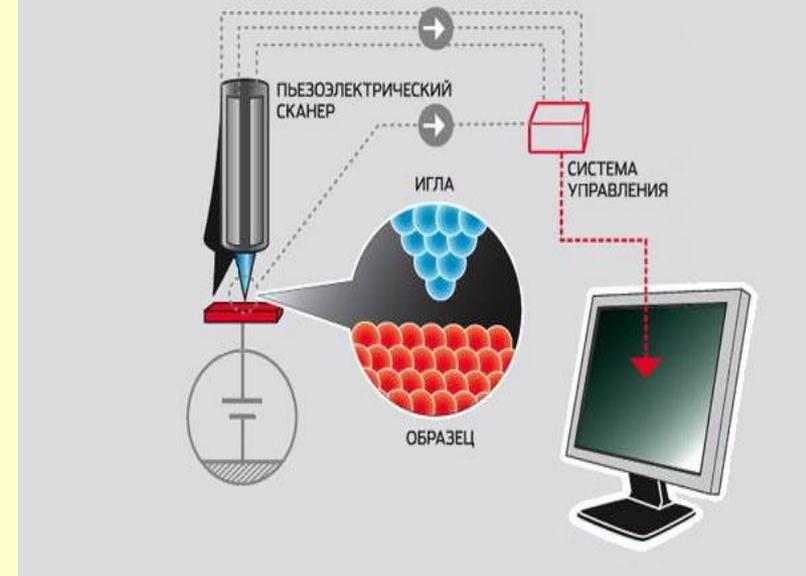
Очень тонкая игла-зонд с острием толщиной в один атом перемещается над поверхностью объекта на расстоянии порядка одного нанометра.

При этом, согласно законам квантовой механики, электроны преодолевают вакуумный барьер между объектом и иглой — туннелируют, и между зондом и образцом начинает течь ток.

Величина этого тока очень сильно зависит от расстояния между концом иглы и поверхностью образца — при изменении зазора на десятые доли нанометра ток может возрасти или уменьшиться на порядок.

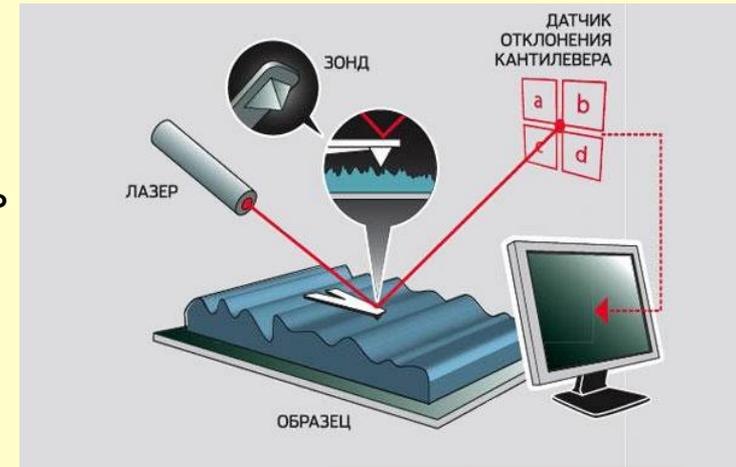
Так что, перемещая зонд вдоль поверхности с помощью пьезоэлементов и отслеживая изменение тока, можно исследовать ее рельеф практически «на ощупь».

Важное ограничение: объектом исследования могут быть только металлы или полупроводники



Атомно-силовой микроскоп (АСМ)

- ❑ АСМ и СТМ — частные случаи сканирующей зондовой микроскопии
- ❑ Одно из важных преимуществ АСМ — возможность его применения при исследованиях биологических образцов: он не требует вакуума или тонких слоев (в отличие от электронного микроскопа).
- ❑ Принцип его работы заключается в том, что на малых расстояниях между зондом и образцом действует сила, величина и направление которой зависят от зазора. Эту силу измеряют, закрепляя иглу зонда на упругом консольном подвесе (кантилевере) и определяя ее отклонение.

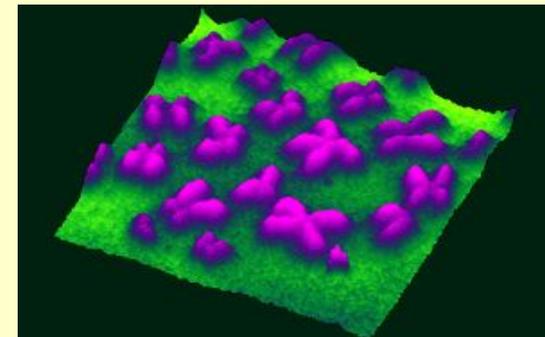


Бактерия из рода Pseudomonas



Разрешение таких микроскопов достигает доли нанометров, что позволяет наблюдать атомы!

Атомно-силовой микроскоп MFP-3D-BIO™ для исследования биологических объектов



Human Chromosomes. Thanks to Digital Instruments for the picture.

