



ЛАБОРАТОРЕН МИКРОСКОП

Денис Синеков

II курс, НБУ

Преподавател: доц.

Милко Шишенков



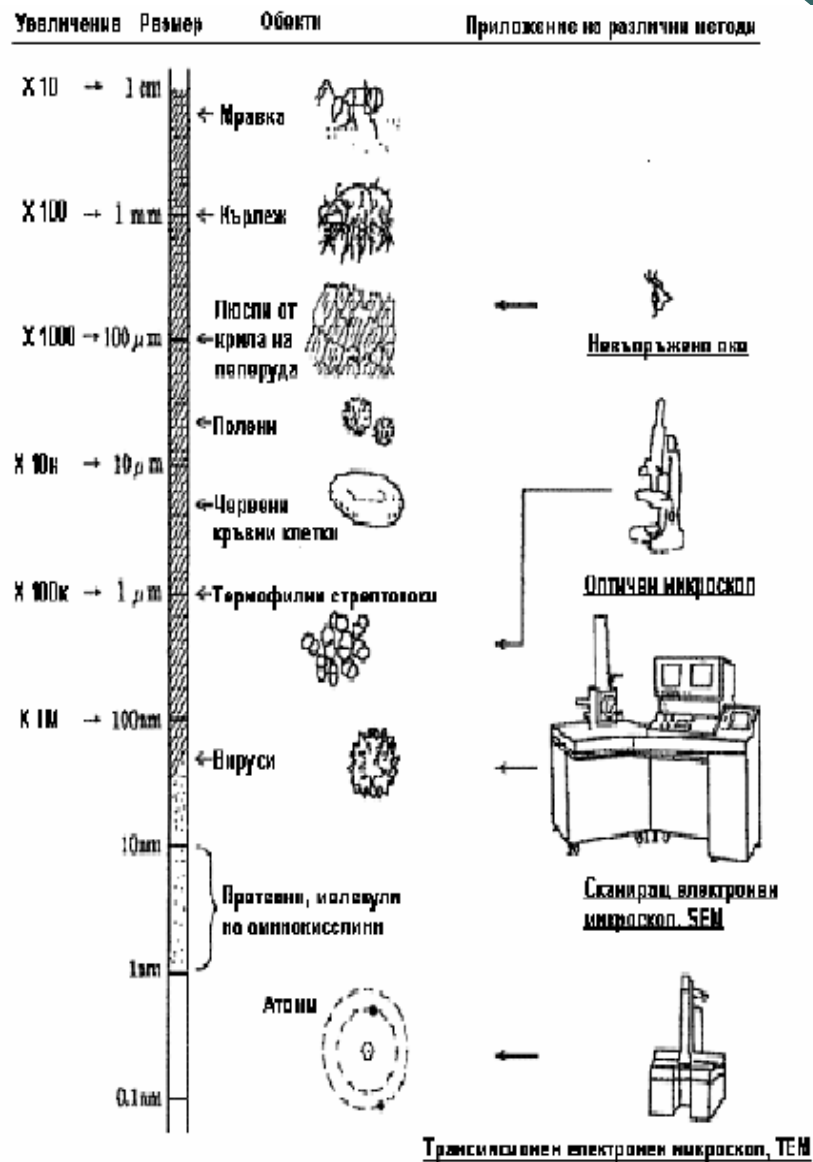
Микроскопът е оптически уред, който увеличава разделителната способност на окото. Със лабораторния /светлинния/ микроскоп тя е около 500 пъти увеличена, а с електронния микроскоп – около 500 000 пъти.

В зависимост от природата на лъчението, което се използва, се различават два вида микроскопи – светлинни или оптични и електронни. При оптичните микроскопи се използва светлинен поток от видимата – ултравиолетова или инфрачервена област на спектъра, а при електронните поток от електрони.



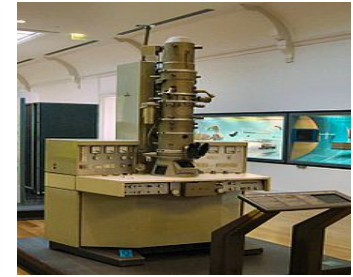


Микроскопът дава увеличен образ на недостъпни на големина за човешкото око близки обекти, с което увеличава разделната му способност. За човешкото око разделителната способност е от порядъка на 0.1 мм. С фотонният микроскоп тя достига 0.2 мм., т.е. 500 пъти повече, а с електронният микроскоп 0.2 мм., или 500 000 пъти повече.





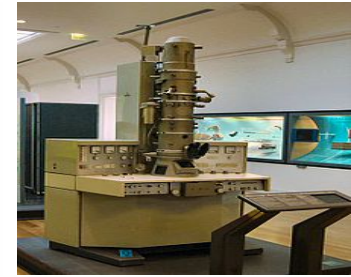
Кратка история



Използването на „стъклени камъни“ като лещи за уголемяване на образа от текст е споменато в още около 1000 г. пр.н.е. Развитието на съвременни оптични средства обаче започва едва през 1284 г., когато се счита че са изобретени първите очила. Три века по-късно, през 1590 г., баща и син производители на очила (Захари и Ханс Йенсен) установяват, че няколко лещи поставени в тръба силно увеличават образа на поставените пред тях предмети.



Кратка история



Развитието на микроскопските изследвания започва с микроскопа на Роберт Хук (1635-1703), увеличавал 30 пъти, преминава през този на Антони ван Льовенхук (1632-1723), увеличавал 270 пъти и достига до съвременните електронни микроскопи, увеличаващи около 500 000 пъти.

За развитието на светлинната микроскопия голям принос имат групата немски изследователи Ернст Карл Аббе, Карл Фридрих Цайс, Фридрих Ото Шот и А. Кьолер.

Ернст Карл Аббе през 1876 г. анализира ефекта на дифракция при образуването на образа в микроскопа. Съществен принос за оптимизиране конструкцията на оптичния микроскоп.

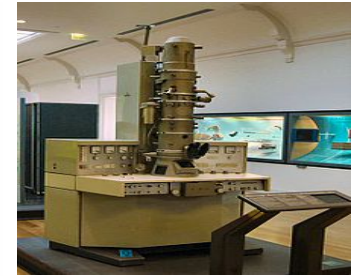
През 1886г. **Шот** създава нови оптични стъкла, а през 1886г – апохроматични лещи.

Карл Цайс прави множество лещи, които достигат до теоретичните граници на видимата светлина.

Кьолер описва теорията на осветлението на микроскопа



Кратка история



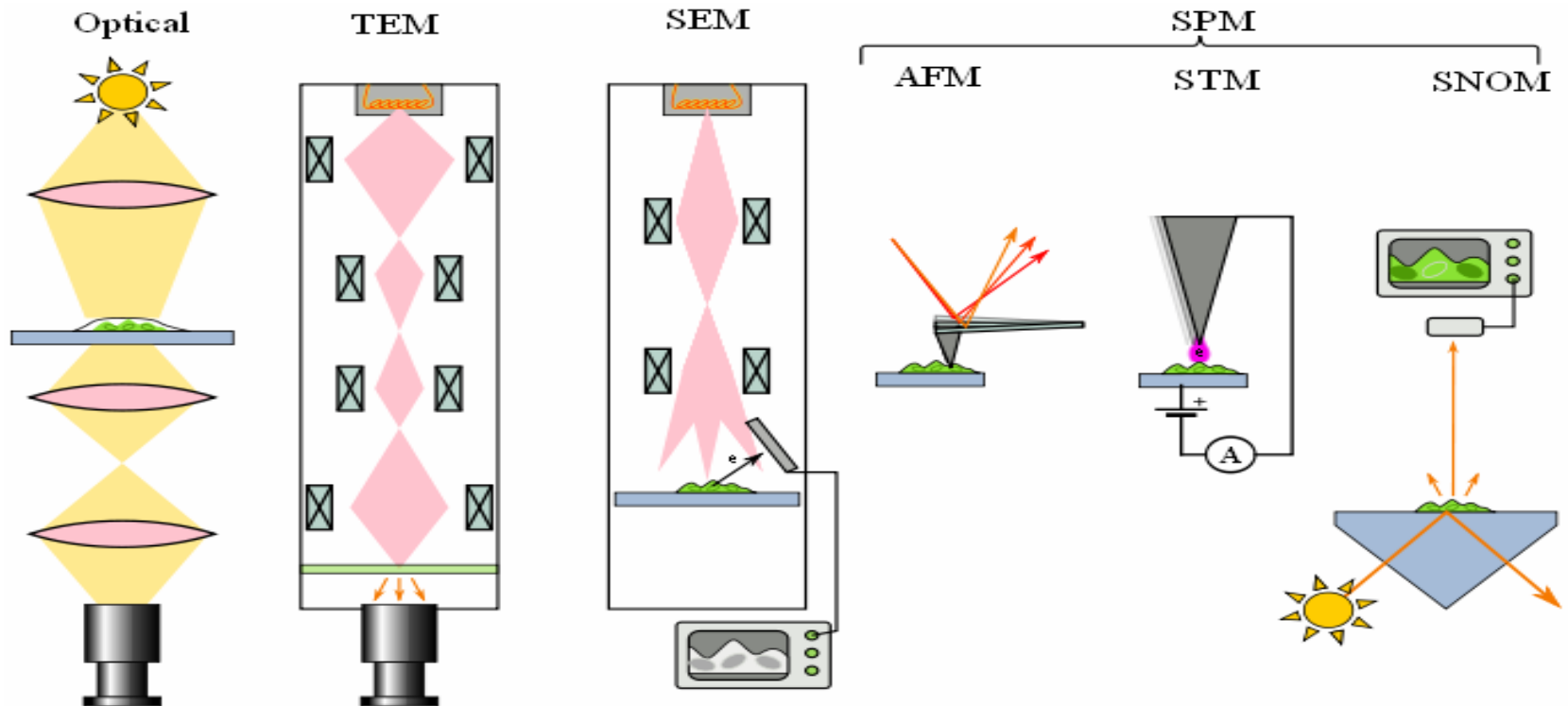
През 1932 г. Фриц Зернике (холандски физик) въвежда метода на фазов контраст, който позволява изследването на „безцветни“ (или почти прозрачни) биологични образци, за което получава Нобелова награда през 1952 г.

Електронният микроскоп е създаден през 1932г. от Макс Кнол, Ернст Руска и Бодо фон Борис.

Създаването на електронния микроскоп довежда до революционни открития за финия строеж на клетката.

Видове микроскопи

- светлинни(оптични), електронни (TEM и SEM) и сканиращи пробата микроскопи (SPM): AFM, STM, SNOM.



Устройство на светлинен микроскоп

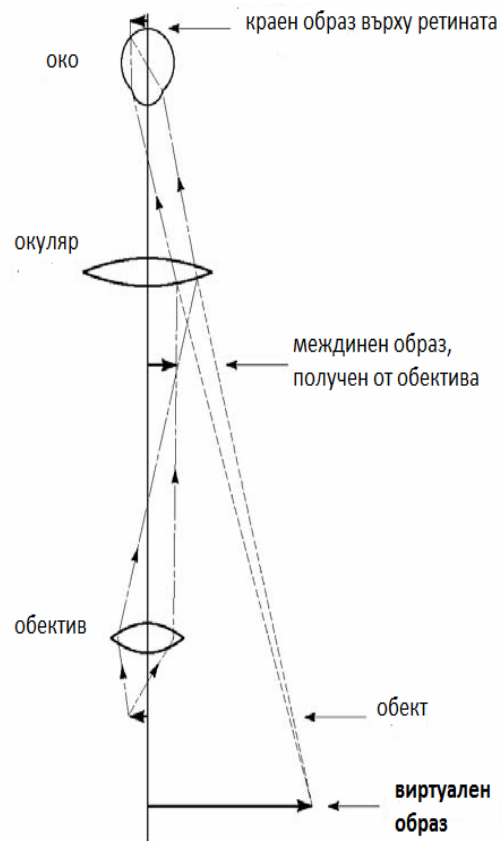
Съвременният светлинен микроскоп се състои от три системи.

- Механична система. Състои се от отделните механизми по корпуса на уреда, като по-важните са – статив, предметна масичка, тубус(и), револверен механизъм, винтове за намиране на фокусното разстояние (макро- и микровинтове), и винтове за придвижване на предметната масичка или за частите на осветителната система.
- Осветителна система. Състои се от източника за осветяване на наблюдавания обект, кондензора, бленди и филтри по пътя на светлината.
- Оптична система. В нея се включват окулярите, обективите и ако има монтирани други на пътя на светлината оптични приспособления (лещи = корекционен индекс), които са между обекта и окуляра. На тях е означено увеличението, което постигат и някои технически характеристики (апертура, контролен № и др.).



Устройство на светлинен микроскоп / прод./

Обективът и окулярът са сложни системи от лещи с голямо увеличение, центрирани и свързани в тръба, наречена тубус. Фокусирането се постига като се променя разстоянието между образеца и обектива. Обективът изпълнява ролята на събирателна леща с малко фокусно разстояние и голямо увеличение. Намира се близо до изследвания обект. Дава реален образ, обърнат и увеличен, който попада във фокалната равнина на окуляра. Окулярът се състои от две лещи и играе ролята на лупа. Чрез него се наблюдава непосредствено с око. Междинният образ, получен от обектива, се наблюдава през окуляра, който дава допълнително увеличение. Крайният образ е недействителен и е разположен на разстояние на най-ясното виждане от окуляра.



Устройство на светлинен микроскоп / прод./

Реализацията на принципната схема в микроскопа е следната: Светлината от източника (напр. лампа с нагреваема жичка, ксенонова или живачна лампа, др.) преминава през система от колекторни и конденсорни лещи с диафрагми, които осигуряват равномерното осветяване на всички точки от образеца. Това е от първостепенна важност, понеже по такъв начин наблюдаваните разлики в изображението ще се дължат изцяло на образеца, а не на начина по който той е осветен. Отразените (или преминалите) през образеца лъчи и част от тези, разсеяни от него преминават през системата обектив-окуляр, и проектират увеличен образ върху ретината на окото. Чрез нагласяване на положението на образеца и лещите се постига фокусиране на образа, а чрез отваряне и затваряне на диафрагмите се постига изясняване на образа и оптимизация на разделителната способност. В съвременните микроскопи лещите са всъщност системи от лещи, чрез които се компенсират неидеалности като хроматична и сферична aberация, кома и астигматизъм, и изкривявания.

Основни характеристики



Основните качества, които характеризират всеки микроскоп са неговото:

- Увеличение;
- Разделителна способност;
- Контрастност

Увеличение

При дадена комбинация от обектив-окуляр общото увеличение се определя от произведението на увеличенията им, всяко от които се получава от фокусното разстояние f на съответната леща по формулата $M=f/(a-f)$, където a е разстоянието от обекта до равнината на лещата.

Увеличение W при оптични микроскопи

$WL=W_{obj}.W_{ok}$ – около 500 пъти

Увеличение/прод./

Оптимално и максимално допустимо увеличение на дадена микроскопска система

Съчетаването на даден обектив с окуляр не трябва да се извършва произволно. То се определя от числената апертура на обектива. Оптималното общо увеличение на микроскопската система, в която участва определен обектив, трябва да бъде около 500 пъти числената му апертура, а максимално допустимото около 1000 пъти. Например обектив с числена апертура 0,2 увеличение 10x позволява оптимално увеличение 100 пъти и максимално - 200, а обектив с числена апертура 1.25 (увеличение 100x) - 625, съответно 1250 пъти. Като се раздели полученото оптимално или максимално увеличение на познатото и написано върху гилзата на обектива негово собствено увеличение, се получава увеличението на окуляра, с който съответни обектив трябва да се съчетае. При първи обектив то ще бъде за оптимално увеличение 10 и за максимално-20 при втори -6,26 и съответно 12,5 По принцип, колкото по-висока е числената апертура на обектива, толкова по-слабо трябва да бъде увеличението на окуляра. Поставянето на недопустимо силен окуляр влошава качеството на образа.

Чрез увеличението на микроскопа се постига подобряване на разделителната способност на човешкото око.

Разделителна способност

Разделителна способност r – определя се от най- малкото разстояние между две точки на образеца, които се различават от наблюдателя като отделни. Установено е, че човешкото око има разделителна способност 0.1 мм. Разделителната способност на микроскопа се измерва по формулата $R = \lambda / 2A$, където λ е дължината на светлинната вълна, а A е апертурата на обектива.

Контрастност

Контрастност $K = (I_{фон} - I_{обр}) \times 100 / I_{фон}$

където $I_{фон}$ е светлинната интензивност на фона, а $I_{обр}$ – на образеца.

Плътни обекти върху прозрачен фон се разглеждат лесно в режим на преминаване или отражение. При тези режими се улавя възможно най-голяма част от преминалите или отразените лъчи, и обектите се наблюдават тъмни върху светъл фон (режим на светло поле). Често обаче се налага разглеждането на почти прозрачни обекти върху прозрачен фон, например клетки или вградени обекти със същата прозрачност като околната среда. При такива обекти липсва амплитуден контраст и те се виждат трудно в режим на преминаване или отражение. Въпреки това, при преминаване през образеца светлината дифрактира от границите на обекта и променя фазовата си разлика. Понеже окото не е чувствително към фазата то не може да улови фазовото отместване. При такива образци е необходимо фазовата разлика да се превърне в амплитудна. Това се прави с метода на фазов контраст в микроскопията, при който лъчът преминал през образеца интерферира с опорен лъч.

Контрастност

Друг начин за наблюдаване на обекти с нисък контраст е в режим на тъмно поле. В обичайния режим на светло поле се наблюдава преминалата или отразената светлина и дифрактиралите лъчи. В режим на тъмно поле се блокира преминалия/отразения лъч и се наблюдават само дифрактиралите лъчи. Границите на обектите се виждат светли на тъмен фон, оттам и наименованието на метода. По такъв начин могат да се наблюдават обекти дори по-малки от разделителната способност на микроскопа в режим на светло поле.

Някои обекти имат способността да променят поляризацията на светлината. За такива обекти е възможно постигането на висок контраст при поставянето на образеца между два поляризиращи елемента. При кръстосването на поляризиращия и анализиращия елемент се премахва преминалата светлина и преминава само светлина чиято поляризация е променена от образеца.

Видове оптични микроскопи

- Фазовоконтрастен
- Интерферентен
- Поляризационен
- Флуоресцентен
- Конфокален и др.

Фазовоконтрастен

Фазовоконтрастният микроскоп е създаден от Frits Zernike между 1935г. и 1936г. Принципът на фазовоконтрастната микроскопия се състои в това, че скоростта и посоката на светлината се променя, когато преминава през среди с различен индекс на пречупване. Получените различия във фазата с помощта на специална оптична система се трансформират в различия на интензитета на светлината, което води до получаването на съответния образ. Фазовоконтрастният микроскоп е подходящ за наблюдение на неоцветени клетки и тъкани.

Интерферентен

Интерферентният микроскоп представлява вариант на фазовоконтрастната микроскопия, при което е възможно количествено измерване на различията в плътността на изследвания обект.

Поляризационен микроскоп

Използва се, когато е необходимо да се определи наличието и специфичните оптични качества на веществата, които имат свойството да пречупват двойно светлината. Характерни за устройството му са поляризаторът, разположен под кондензора (превръща преминаващата през него светлина в равнинно поляризирана), и анализаторът, разположен над обектива (с него се определя равнината на поляризации на светлината, излизаща от обекта). При кръстосани анализатор и поляризатор зрителното поле е тъмно поради несъответствие между равнините на поляризации. На зрителното поле личат само тези двойно пречупващи светлинни обекти, чийто равнина на поляризации съвпада с равнината на анализатора. При употребата на компенсатори различията в поляризацията се преобразуват в цветни разлики. В биологичните обекти оптично активни са тези вещества, които имат кристална или линейно периодична структура, например някои мембрани, колагенните влакна, течните кристали на мастните киселини и пр.

Конфокален микроскоп

Конфокалният сканиращ микроскоп е създаден през 1988г. Той дава възможност да се установи точната локализация на някои клетъчни органели в живите клетки, като се наблюдават поредица от оптични срезове, т.е. На различни оптични равнини. Този вид микроскоп има способността да представя компютърно-обработени триизмерни образи на клетките и техните органели.

Правила за работа с микроскоп

- 1. При пренасяне се държи за дъговидния тубусодържател в изправено положение. Наклоняването е свързано с опасност да падне окулярът или огледалцето.
- 2. Преди започване на работа механичните и оптичните части се почистват от прах с малко плат или специална кожа.





Правила за работа с микроскоп

Оптичните части не се пипат с пръсти, за да не се замърсят лещите.

Ако в зрителното поле без препарат се виждат различни обекти, когато при завъртане на окуляра се движат заедно с него, това означава, че околярър е замърсен. Почиства се най-напред с мека чиста кърпа, а след това с плат напоен в бензин. Ако външното почистване на лещите се окаже недостатъчно, околярър се развинтва и лещите се почистват внимателно от вътрешната страна.

При нужда от вътрешно почистване се изпращат в специална лаборатория.

4. За предпазване на обективите от прах окулярът на микроскопа стои винаги в тубуса.



Правила за работа с микроскоп

5. Спазване на правила при микроскопско наблюдение.

- **Микроскопирането започва винаги с най малкия обектив.** Той се наглася чрез внимателно завъртане на револверния механизъм, при което със специфичното щракване обективът попада на мястото (в гнездото) върху обекта.
- **Проверяване изправността на осветлението.** Зрителното поле трябва да се вижда през окулярите като светъл кръг, при което допълнително може да се нагласи диоптърът на окулярите и тяхното центриране се изравнява с междузеничното разстояние. Кондензорът се повдига до максимално горно положение и се нагласяят наличните бленди и филтри.
- **Правилно поставяне на хистологичния препарат в гнездото на предметната масичка.** При това действие предметното стъкло се поставя да лежи на масичката, като покривното стъкло трябва да е отгоре.
- **Приближаване на препарата максимално близко до обектива.** Приближаването се извършва под контрол, (гледа се отстрани на микроскопа, а не през окулярите), и чрез завъртане на макровинта за намиране на фокусното разстояние препаратът трябва да е отдалечен на около 2-3 мм от обектива, ако няма конструкторско ограничение. Съвременните микроскопи имат вградена защита на отдалечение 1-2 см, която се усеща чрез макровинта.



Правила за работа с микроскоп

Намиране на фокусното разстояние. Поглежда се през окулярите, при което отново се завърта макровинтът, като посоката на въртене е обратната на предишното действие (препаратът се отдалечава от обектива). При внимателно манипулиране се намира фокусното разстояние, и ако е необходимо чрез микровинта се прави допълнителна фина настройка, така че образът да се вижда най-ясно.

Наблюдаване на препарата. За последващо разглеждане на определена структура от препарата чрез обектива с по-голямо увеличение, зоната със структурата се центрира на зрителното поле. Избира се обектив със следващо по-голямо увеличение и се наглася върху обекта чрез завъртане на револверния механизъм. При наличие на синхрон между обективите фокусното разстояние съвпада, но в определени случаи се налага дофокусиране чрез завъртане на микровинта за фокусното разстояние. За наблюдаване с по-големите обективи се изисква по-силна светлина, което се постига чрез отваряне на блендите, нагласяне на кондензора или манипулиране с филтрите.



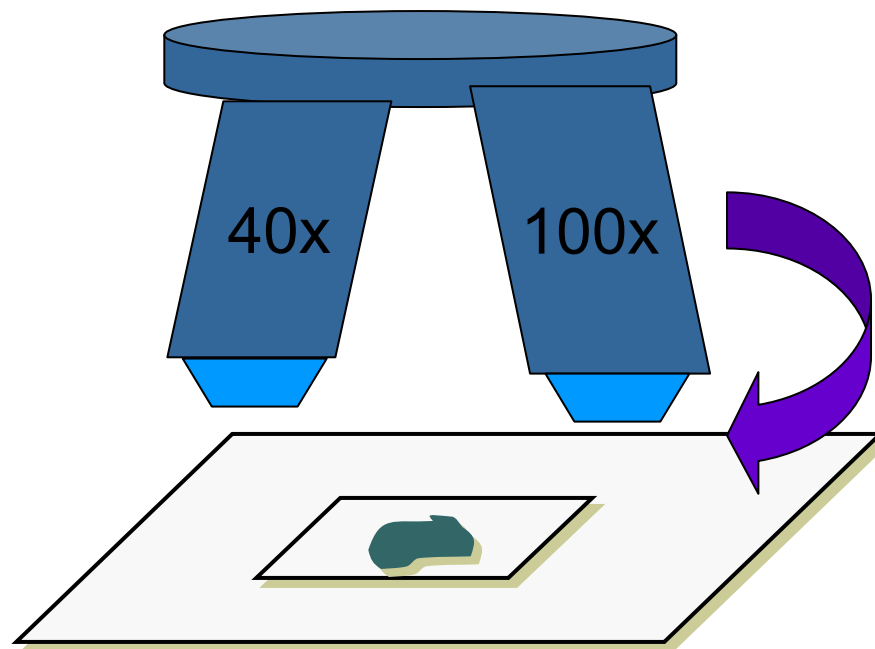
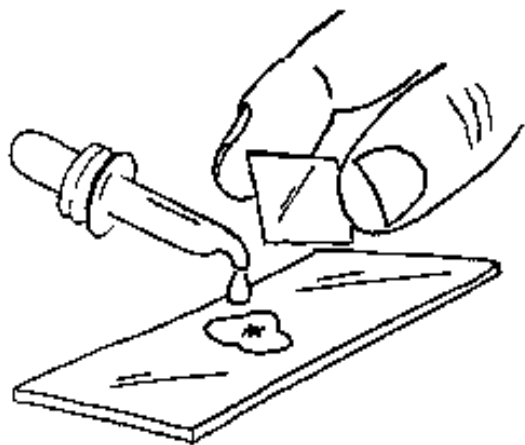
Правила за работа с микроскоп

Сухи и имерсионни обективи

Слабите и средните по увеличение обективи (до 63x) работят във въздушна среда между тях и обекта. Те се наричат сухи обективи. За да се намали загубата на светлина и за да се увеличи разделителната способност, най-силните обективи (100x) са конструирани да работят в маслена среда - кедрово или изкуствено масло с коефициент на пречупване на светлината $n=1.515$, близък до коефициента на стъклото. Те се наричат имерсионни и носят обикновено означението HI. След работа тези обективи трябва да се почистват с кисел, но не с алкохол. Предимно за витални (приживе) наблюдения се предлагат и водни имерсии, обикновено с по-слаби увеличени - от 60x до 90x.



Правила за работа с микроскоп





Правила за работа с микроскоп

След наблюдението тубуса на микроскопа се поставя в изходно положение.

Предметната масичка, обективът и окулярът се почистват.