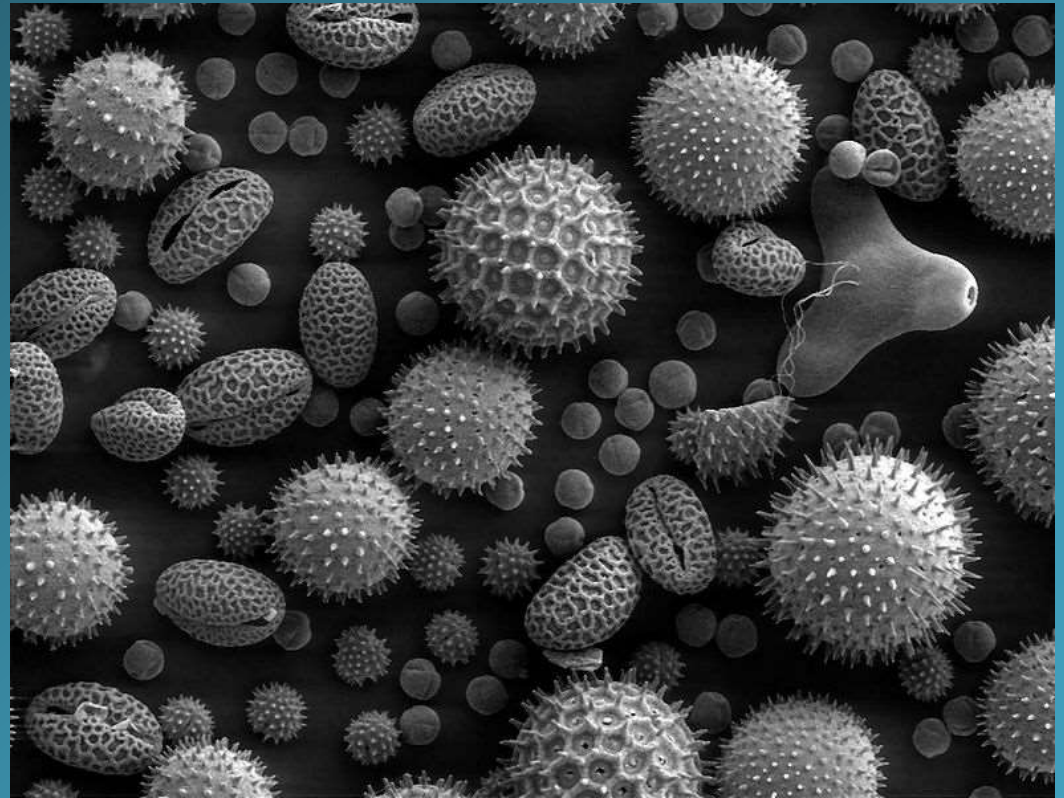


A sejtkutatás strukturális vizsgálómódszerei, mikroszkópok



Dávid Csaba

Néhány adat a méretekről

Az emberi szem maximális feloldóképessége 0,1 mm – 100 μm !

Egy átlagos eukariota sejt mérete 10-50 μm

Sejtmag: 5-30 μm

Prokarioták 1 μm alatt

Mikroszkópok

A képalkotás két alapvető módszere:

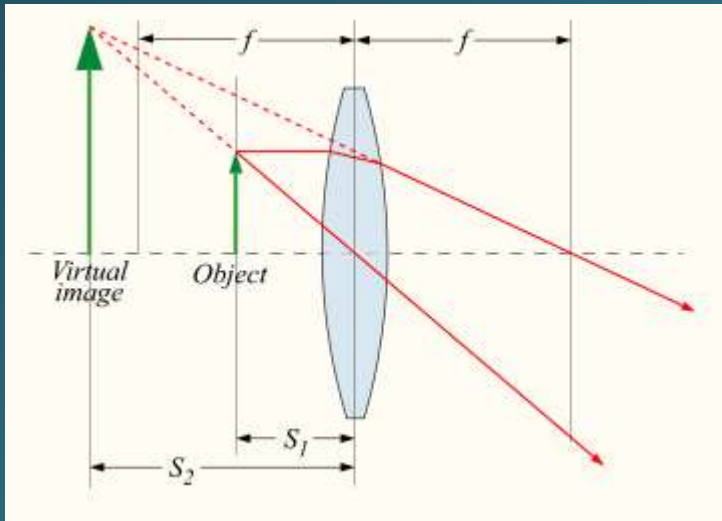
- * **Optikai módszer**

(lencserendszerek nagyított optikai képet alkotnak).

- * **Pásztázó (scanning) módszer**

(a tárgyat soronként letapogatjuk egy fényponttal, majd a regisztrált jelekből a kép összeáll a képernyőn egy szinkron futó pásztázó sugárral. A nagyítás a két pásztázott terület arányából adódik).

Nagyító



- valószínűleg már idősámításunk előtt használták
- Abu Ali Muhamed Ben el-Hasan Ibn el Heitham el Basri ír róla először (cca. 1000)
- az 1600-as évek óta használják tudatosan kutatási/megfigyelési célokra (bolhanéző üveg)
- Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723)

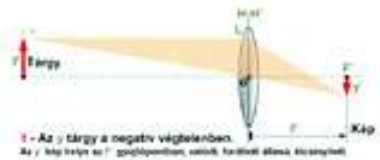


Összetett mikroszkóp

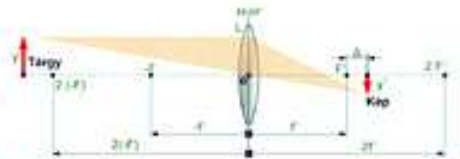
A mikroszkóp csaknem 400 éves múltra tekint vissza. Az elsőt Hollandiában készítették valamikor 1590 és 1608 között. Mind a dátum, mind a feltaláló(k) kiléte bizonytalan. Három szemüveggészítőt szoktak feltalálóinak nevezni: Hans Lippershey-t (aki az első igazi [teleszkópot](#) is kifejlesztette), Hans Janssen-t, és fiát, Zacharias-t.



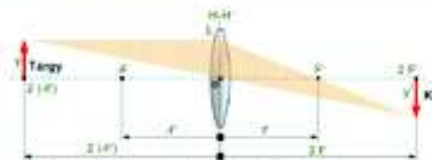
Valós tárgyak leképezése gyűjtőlencsével.



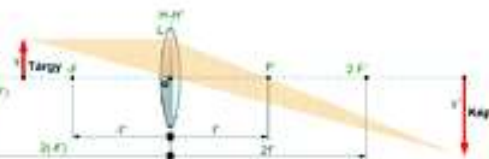
1 - Az o tárgy a negatív végtelenben.
Az y kép helye az f gyűjtőlencsénél, valós, fordított állású, kicsinyített.



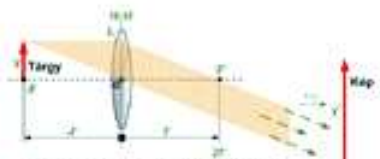
2 - Az o tárgy a negatív végtelen és a kétszeres tárgyoldali gyűjtőlencséség között.
Az y kép helye a kétszeres tárgyoldali gyűjtőlencséség és annak kétszerese között, valós, fordított állású, méretesített.



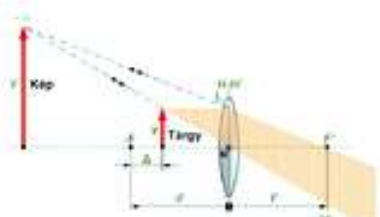
3 - Az o tárgy a kétszeres tárgyoldali gyűjtőlencséségben.
Az y kép helye a kétszeres tárgyoldali gyűjtőlencséségben, valós, fordított állású, mérete megnagyított.



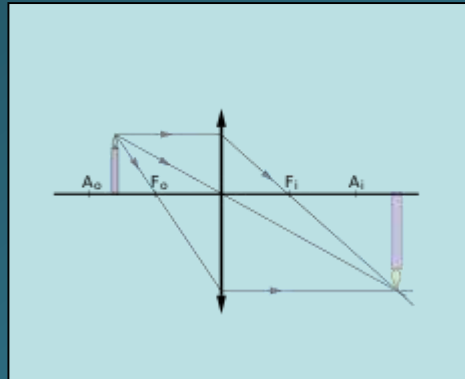
4 - Az o tárgy a tárgyoldali gyűjtőlencséség és annak kétszerese között.
Az y kép helye a kétszeresre kétszeres gyűjtőlencséség és a pozitív végtelen között, valós, fordított állású, mérete nő.



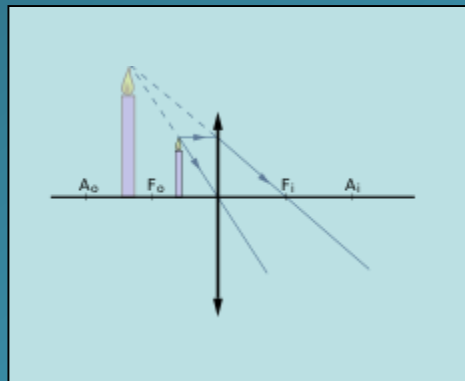
5 - Az o tárgy a tárgyoldali gyűjtőlencséségben.
Az y kép helye a pozitív végtelenben, valós, fordított állású, mérete nő.



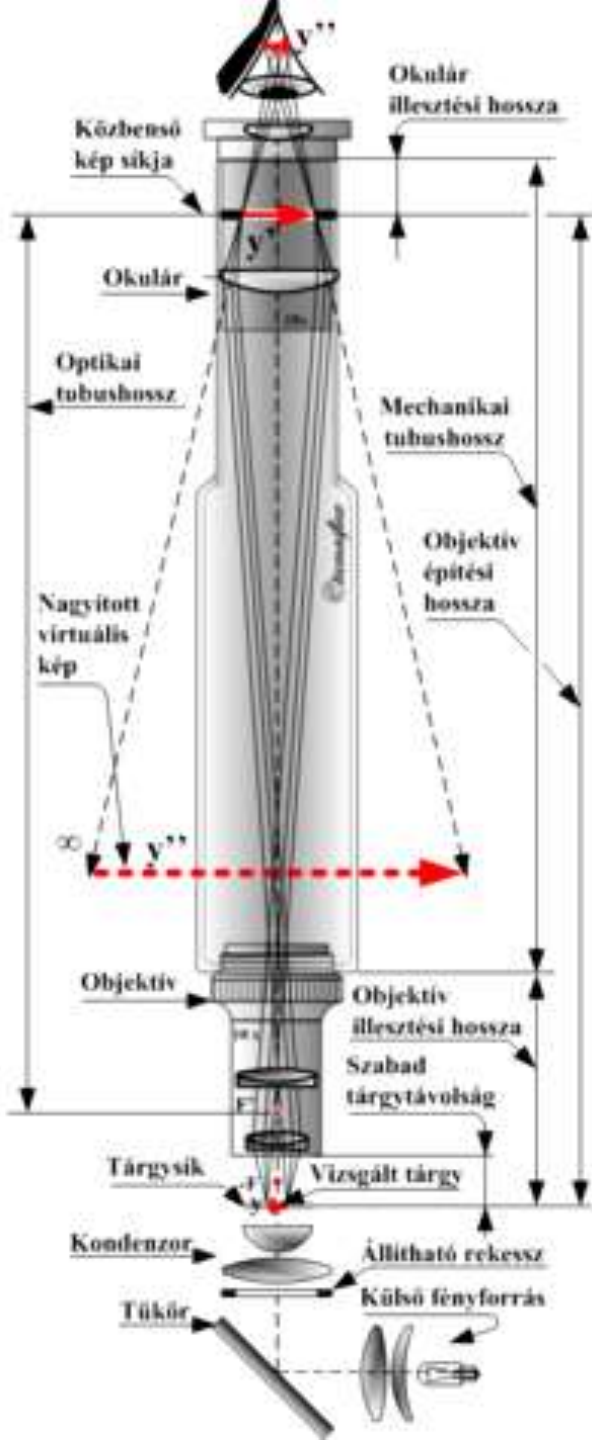
6 - Az o tárgy a tárgyoldali gyűjtőlencséség és az O tárgyoldali fókusz között.
Az y kép helye a pozitív végtelen és a tárgyoldali O fókusz között, mérete megnagyított, állású, mérete nő.



Az egyszeres és a kétszeres fókusz távolság között elhelyezkedő tárgyról fordított állású, valós, nagyított kép keletkezik - objektív



Ezt a fordított állású, valós, nagyított képet az objektív az okulár fókusz távolságán belülre (a fókusz síkba) vetíti, amiről tovább nagyított, virtuális képet képez le (a végtelenben)



kamera (?)

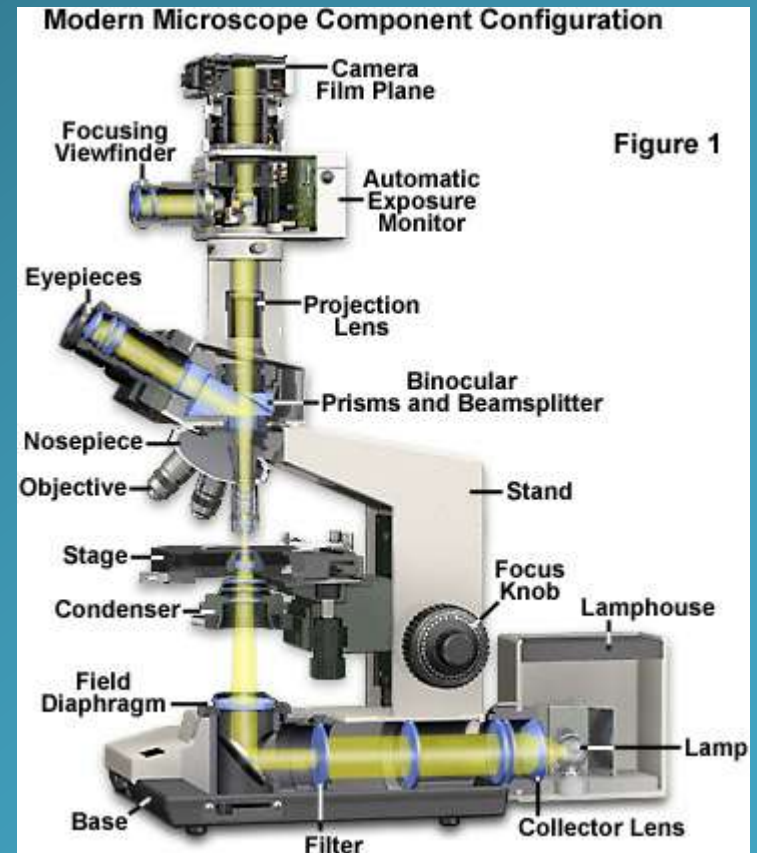
okulár

objektívek

mozgatható tárgyasztal (makro- és mikrométer csavar)

kondenzor (blende)

megvilágítás (mezőblende)



**Hooke Microscope
circa 1670**

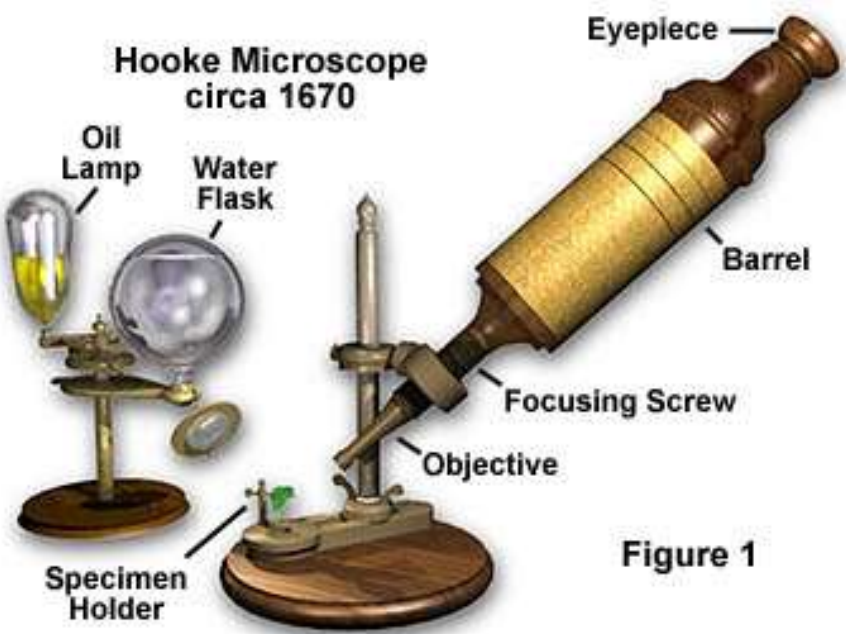


Figure 1



**English Tripod Microscope
made and sold by
John Yarwell in the 1680s.
The microscope is constructed of lignum vitae,
pasteboard, and gold-tooled leather.**



**Cuff-style microscopes,
popular in the mid-1700s,
were the first to provide
ease of use and accurate
focusing mechanisms.**



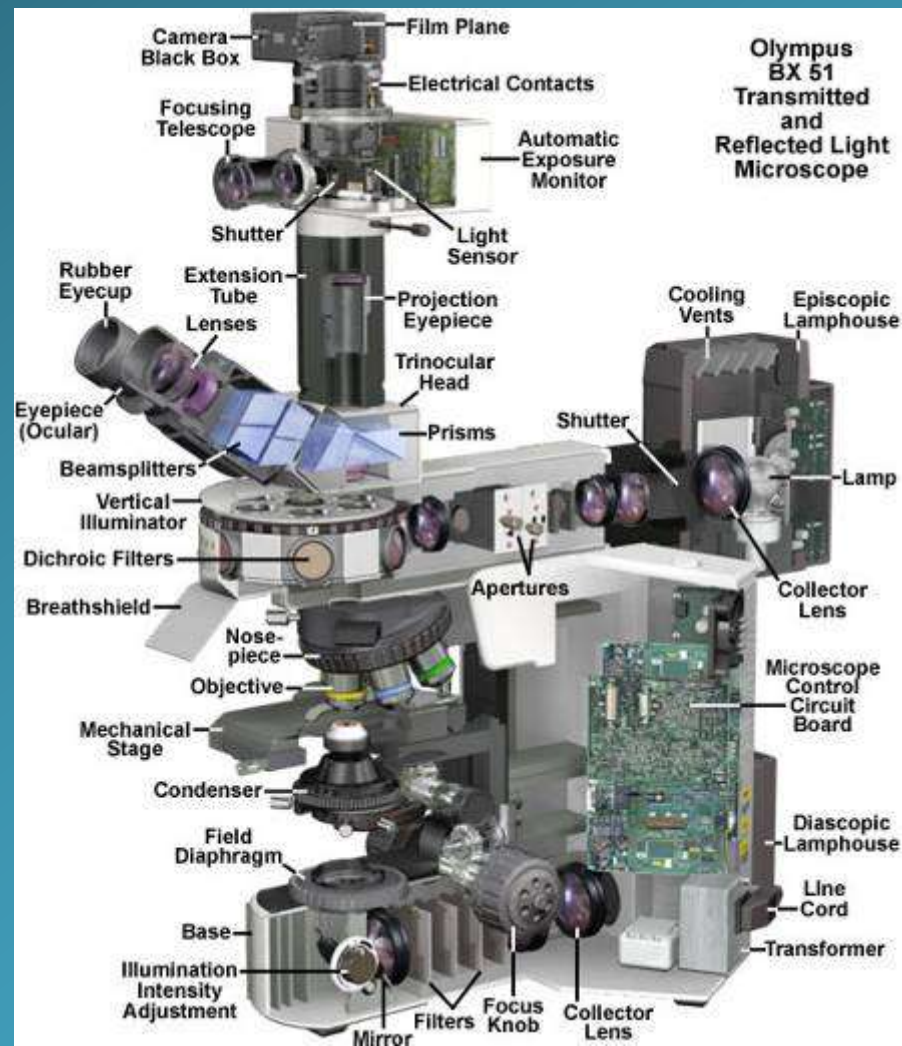
**Pacini
Compound
Microscope
(circa 1845)**



Designed for medical students in the late 19th Century, this Wenham-style binocular microscope, designed and built by Henry Crouch typifies advancements of the period.

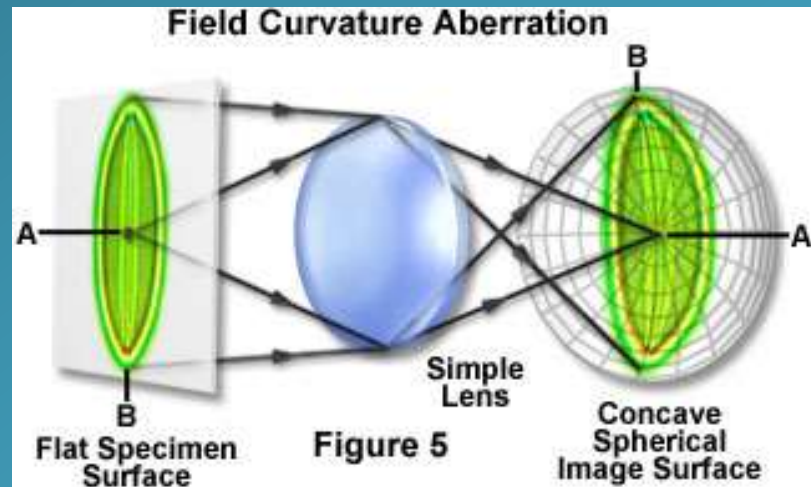
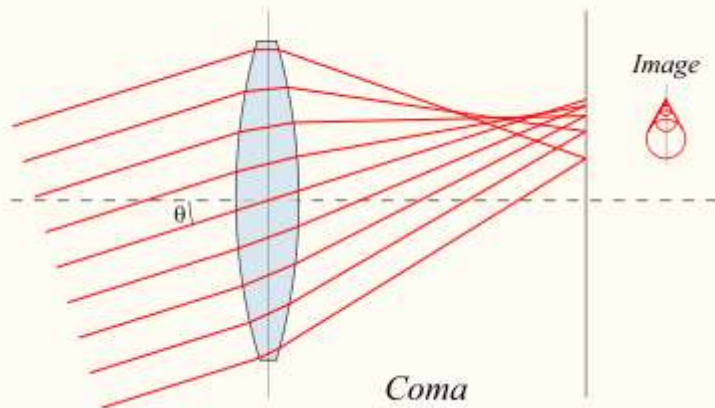
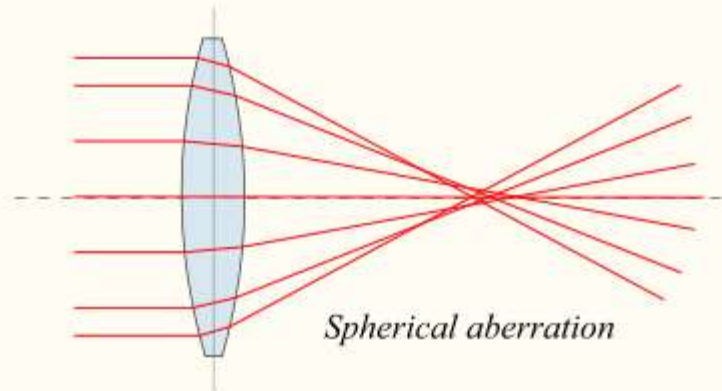
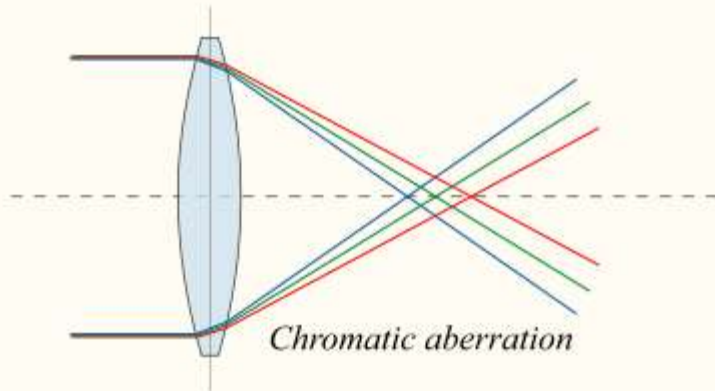


Zeiss Universal Fluorescence Microscope (circa 1960s)



Olympus BX 51 Transmitted and Reflected Light Microscope

Fénytörési hibák



Az objektív



A mikroszkóp feloldóképességét meghatározó fő optikai elem

Nem egy, hanem több lencséből álló lencserendszer

A fénytörési hibák nagy része itt korrigálható





Imm/Oil (+gyűrű) - immerziós

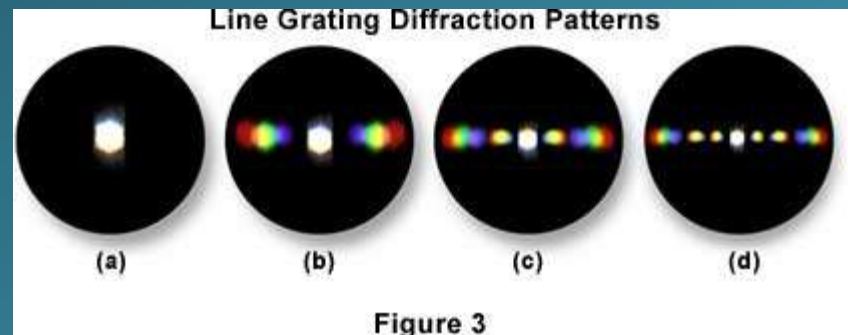
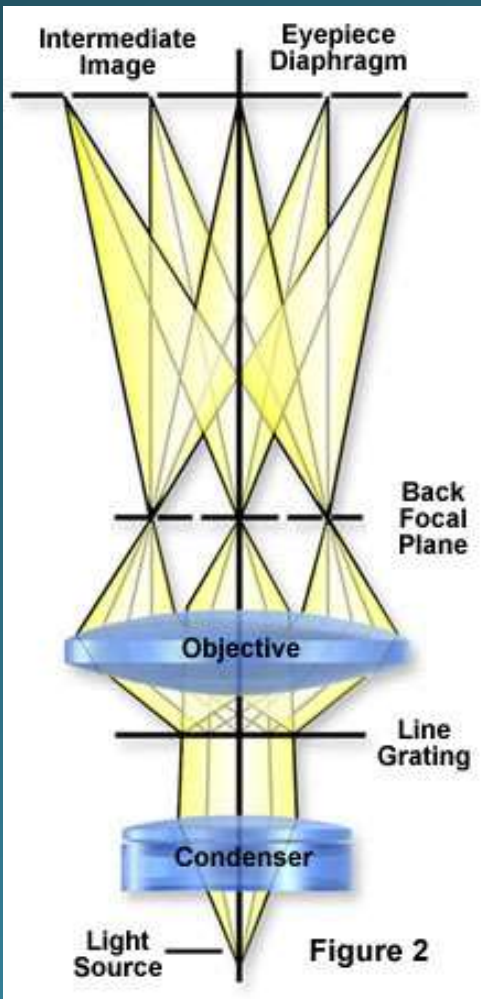
Ph – fáziskontraszt

DIC – Nomarski optika

Objective Correction for Optical Aberration

Objective Type	Spherical Aberration	Chromatic Aberration	Field Curvature
Achromat	1 Color	2 Colors	No
Plan Achromat	1 Color	2 Colors	Yes
Fluorite	2-3 Colors	2-3 Colors	No
Plan Fluorite	3-4 Colors	2-4 Colors	Yes
Plan Apochromat	3-4 Colors	4-5 Colors	Yes

Numerikus apertura, Abbe képlet

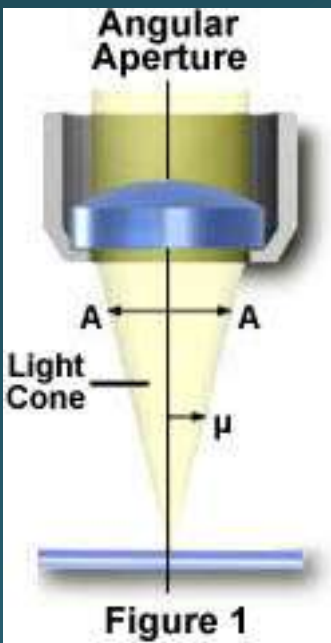


Feloldóképesség: két képpontnak az a legkisebb távolsága, amelynél őket különálló pontoknak érzékeljük

A tárgyról a rajta direkt áthaladt fénysugarak nem visznek információt, csak azok, amelyek szóródtak rajta

Legalább az elsőrendű szórt sugaraknak be kell jutniuk az optikai rendszerbe a kép keletkezéséhez

Minél magasabb rendű szórt sugarak lépnek be, annál részletgazdagabb a kép.



Abbe képlet: $d=0,61\lambda/ns\sin\alpha$

d: feloldóképesség

λ : fény hullámhossza

n: preparátum és objektív közötti közeg törésmutatója

α : objektív fél nyílásszöge

$ns\sin\alpha$ =numerikus apertura (NA) – jellemző az adott objektívre

A legjobb feloldóképesség (minél kisebb d) akkor érhető el ha:

λ minél kisebb (elektronmikroszkóp)

NA minél nagyobb (immerziós objektívek: max 1,4)

Látható fénynél a teoretikusan elérhető d: $0,2\mu\text{m}$

Oil Immersion and Numerical Aperture

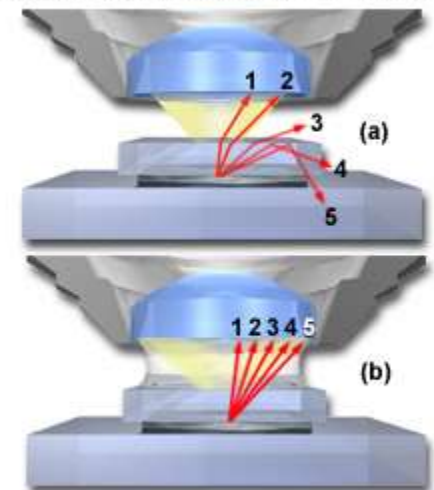


Figure 1

Resolution and Numerical Aperture by Objective Type

Objective Type						
Plan Achromat			Plan Fluorite		Plan Apochromat	
Magnification	N.A	Resolution (μm)	N.A	Resolution (μm)	N.A	Resolution (μm)
4x	0.10	2.75	0.13	2.12	0.20	1.375
10x	0.25	1.10	0.30	0.92	0.45	0.61
20x	0.40	0.69	0.50	0.55	0.75	0.37
40x	0.65	0.42	0.75	0.37	0.95	0.29
60x	0.75	0.37	0.85	0.32	0.95	0.29
100x	1.25	0.22	1.30	0.21	1.40	0.20

N.A. = Numerical Aperture

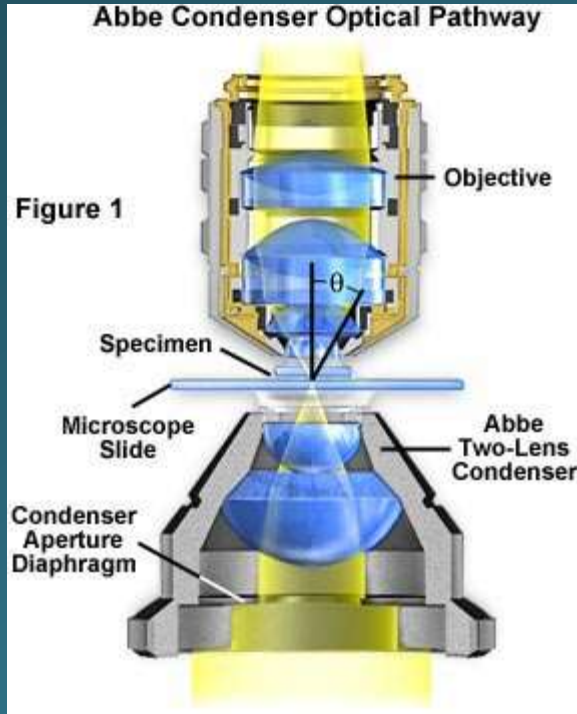
Common Immersion Media

Material	Refractive Index
Air	1.0003
Water	1.333
Glycerin	1.4695
Paraffin oil	1.480
Cedarwood oil	1.515
Synthetic oil	1.515
Anisole	1.5178
Bromonaphthalene	1.6585
Methylene iodide	1.740

Az okulár az objektív által leképzett képet nagyítja tovább, több részletet nem ad a képhez. A feloldóképességet tehát az objektív szabja meg, az okulár nagyításának növelése egy határon túl már általában felesleges (üres nagyítás).

A „maradék” fénytörési hibák egy része itt is korrigálható.

A kondenzzor

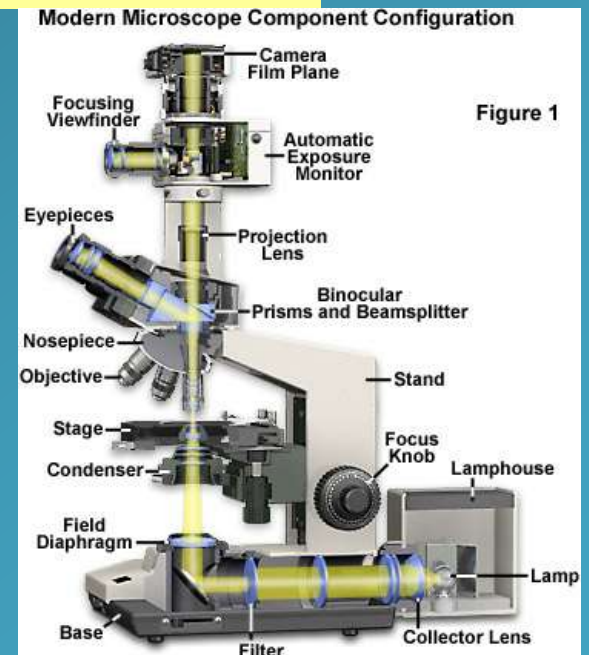


Minimum két lencse és egy blende alkotja

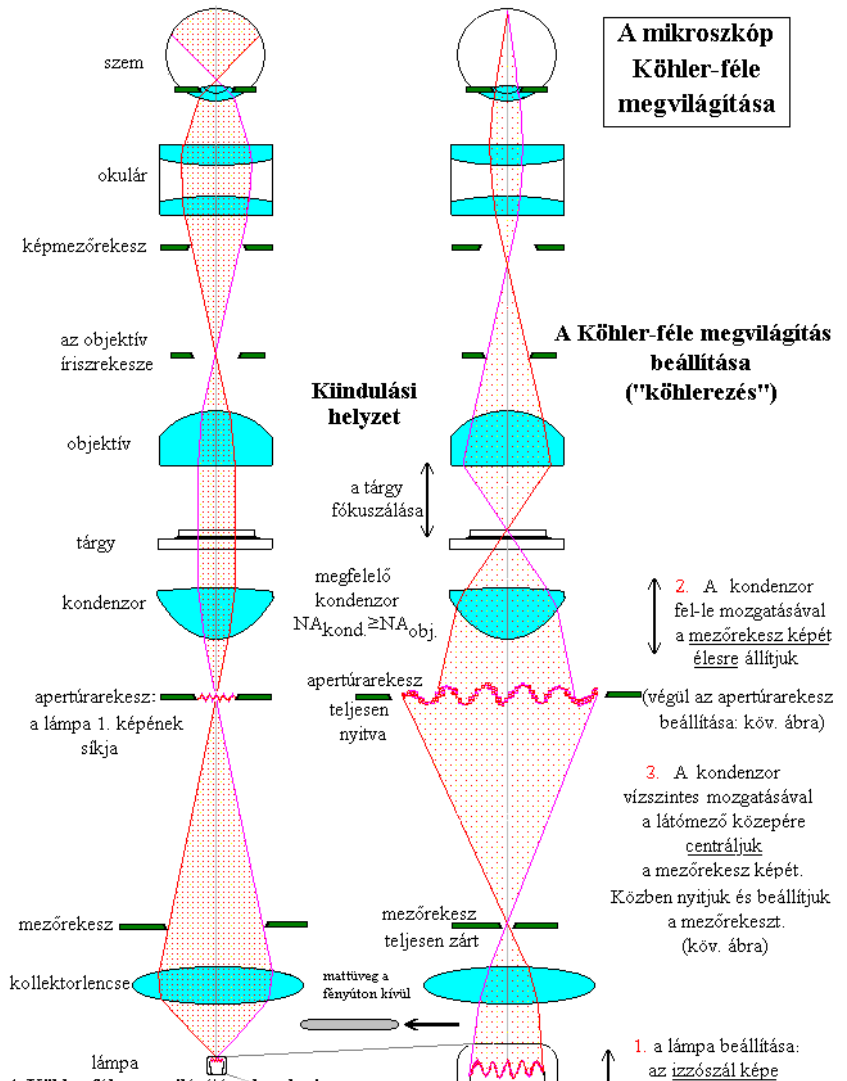
Biztosítja a tárgy erős, egyenletes megvilágítását, és a felesleges szórt sugarak kiszűrését

„speciális alkatrészek”

Köhler megvilágítás



**A mikroszkóp
Köhler-féle
megvilágítása**



Kiindulási helyzet

A Köhler-féle megvilágítás beállítása ("köhlerezés")

a tárgy fókuszálása

megfelelő kondenzor $NA_{kond.} \geq NA_{obj.}$

2. A kondenzor fel-le mozgásával a mezőrekesz képét élesre állítjuk

apertúra rekesz teljesen nyitva (végül az apertúra rekesz beállítása: köv. ábra)

3. A kondenzor vízszintes mozgásával a látómező közepére centráljuk a mezőrekesz képét. Közben nyitjuk és beállítjuk a mezőrekeszt. (köv. ábra)

A Köhler-féle megvilágítás alapelvei

- a tárgyra merőlegesen eső sugárnyaláb
- a látómezőbe eső tárgy részlet egyenletes megvilágítása
- a képképző részen nem vevő sugarak kiszűrése (rekeszekkel)
- az objektív apertúrájának kihasználása a megvilágítás megfelelő apertúrájával

1. a lámpa beállítása: az izzószál képe az apertúra rekesz síkjába, középre kerüljön

Kontrasztfokozó eljárások

Süllyesztett kondenzor, szűkített kondenzorblende - információvesztés

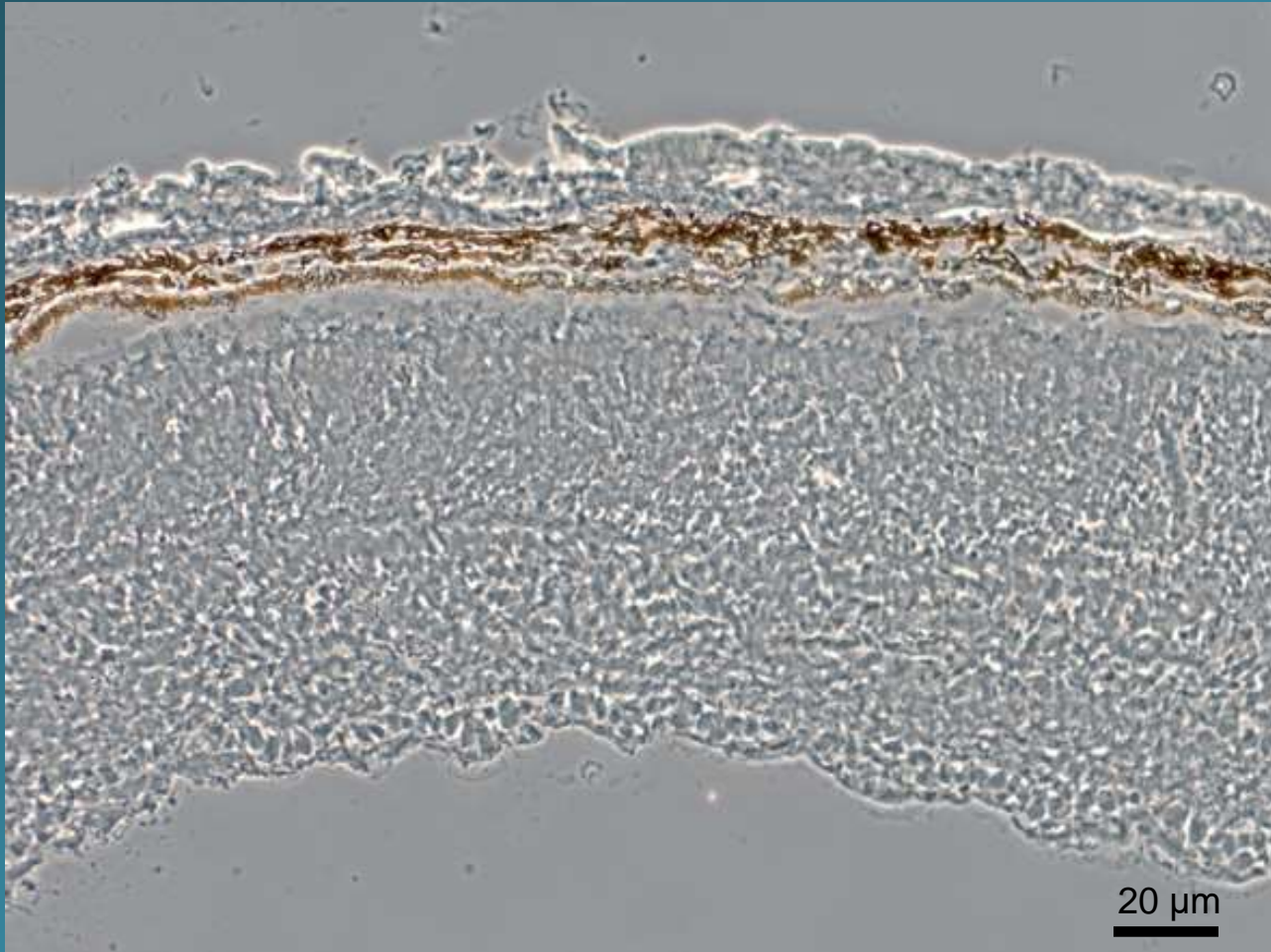
Fáziskontraszt: a fáziskülönbséget amplitudó különbséggé alakítja

Natív, festetlen, kis kontrasztú készítmények vizsgálatára

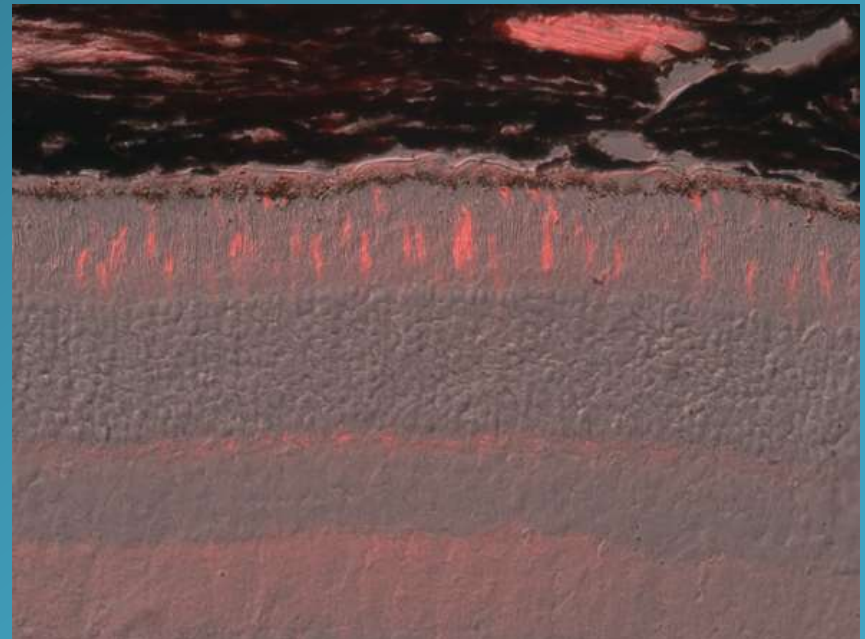
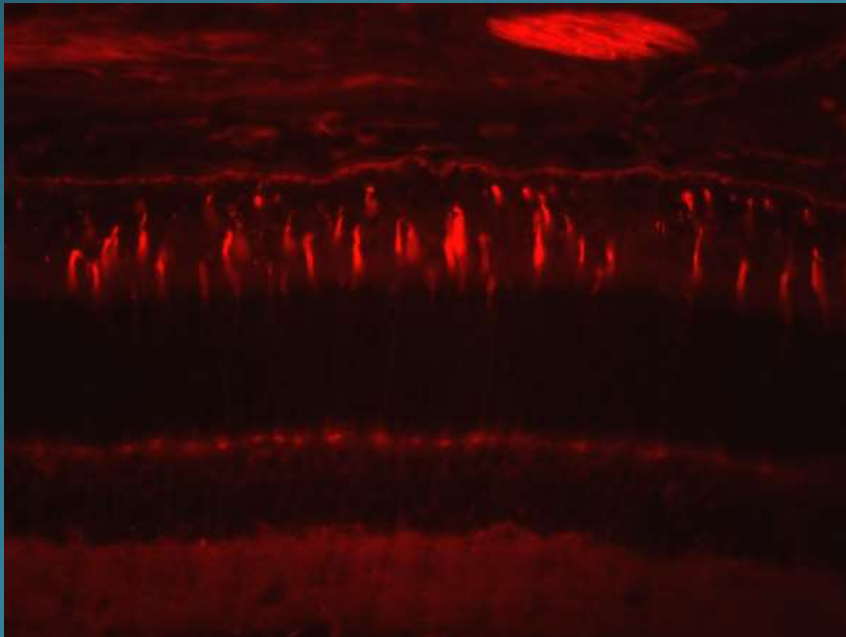
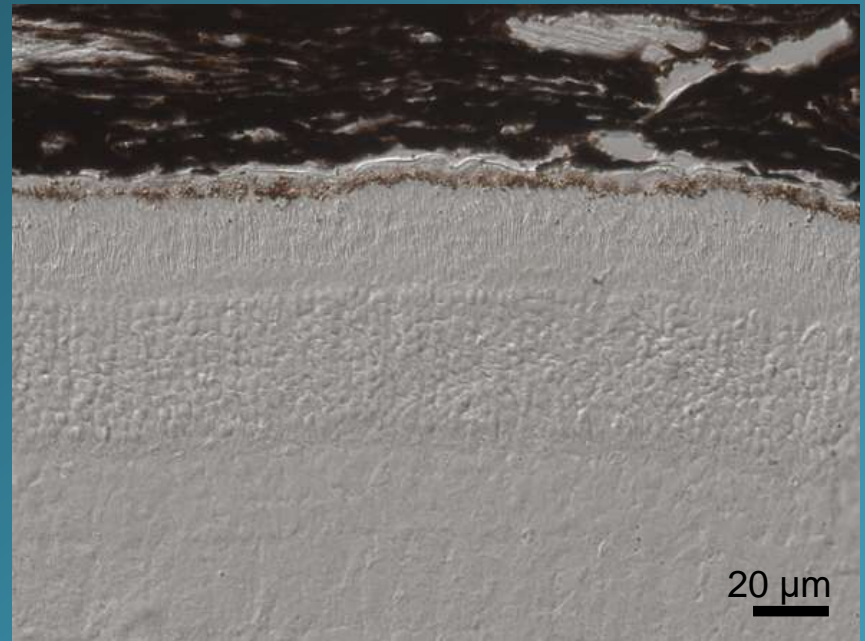
DIC: diferencia interferencia kontraszt (Nomarski optika)

Pseudotérhatású kép

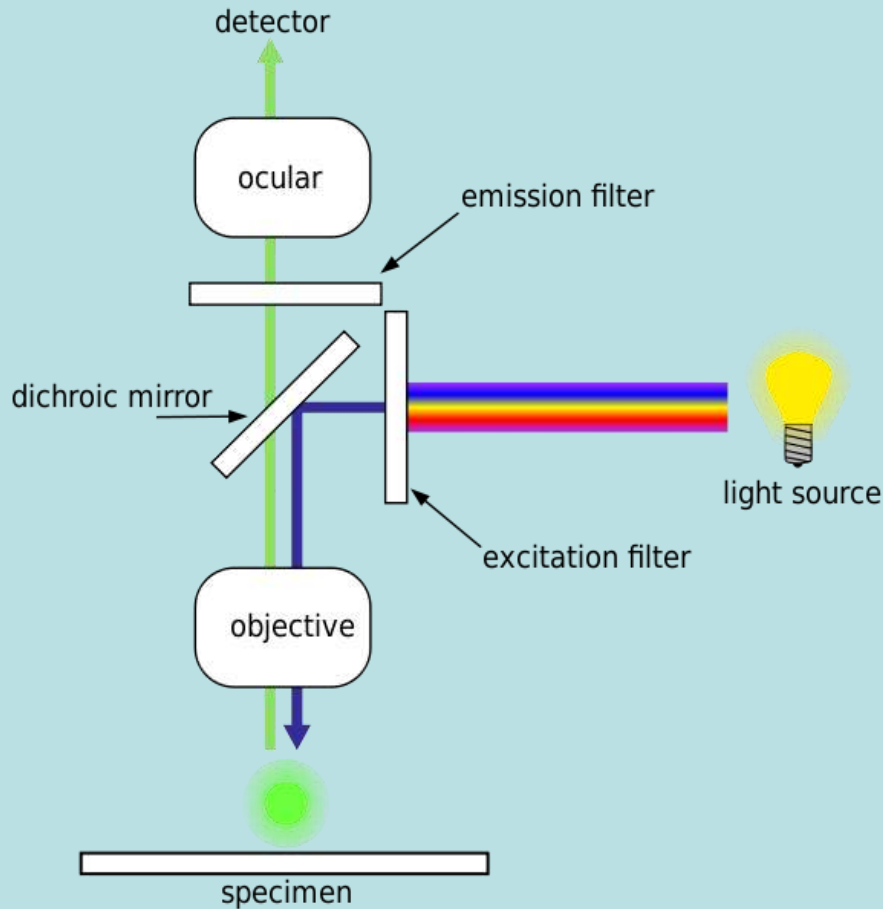
Fáziskontraszt mikroszkópia



DIC



Fluoreszcens mikroszkópia



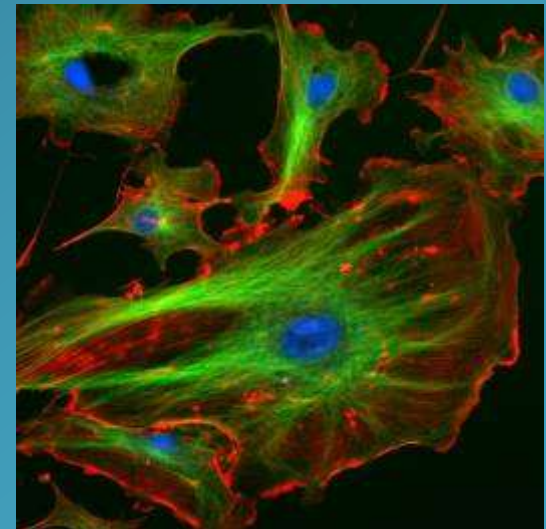
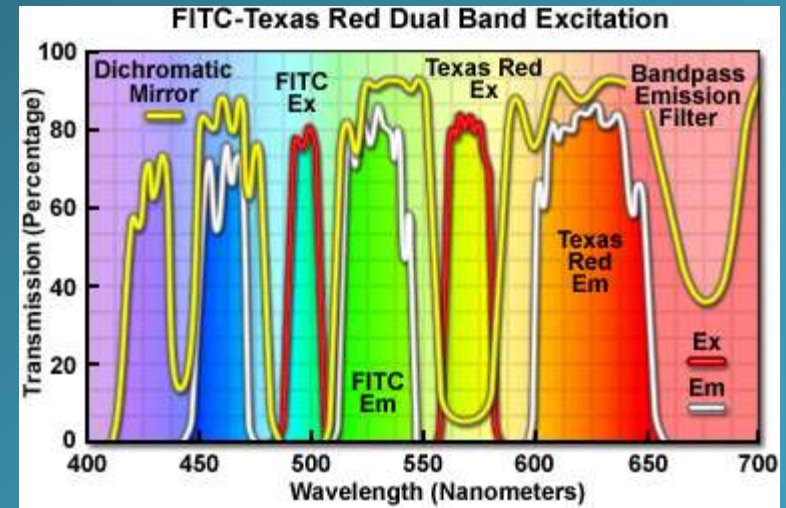
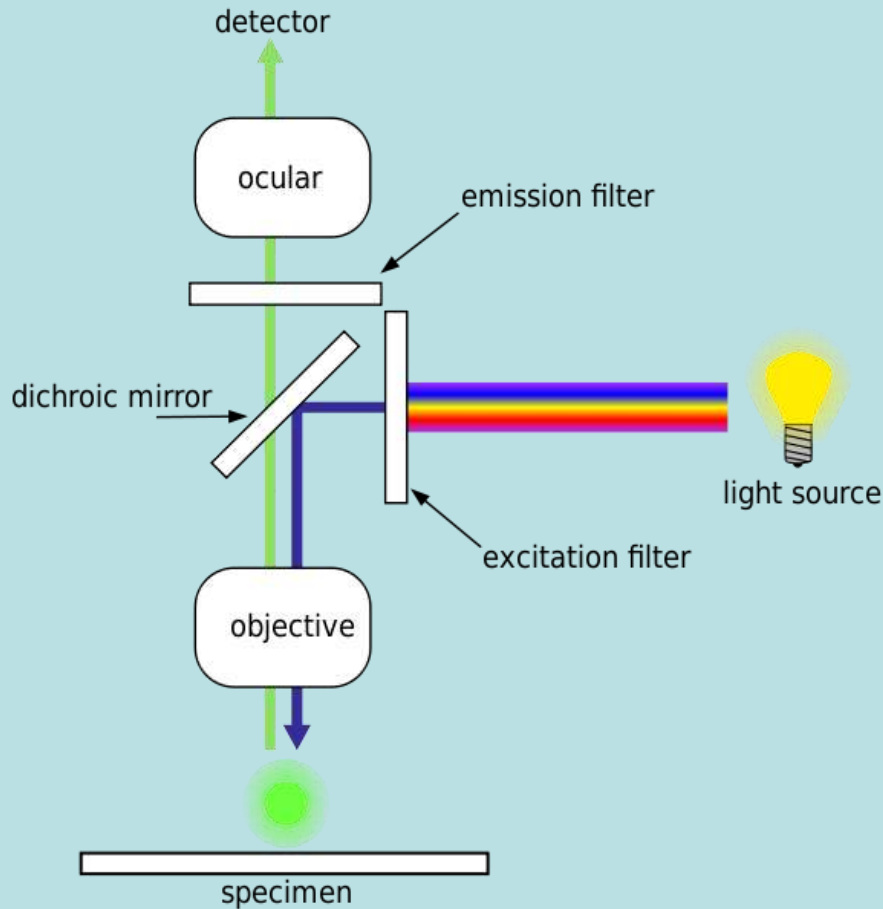
Nagyobb energiájú (alacsonyabb hullámhosszú) gerjesztő fény – UV-lámpa, LED, laser

Magasabb hullámhosszon emittált fény

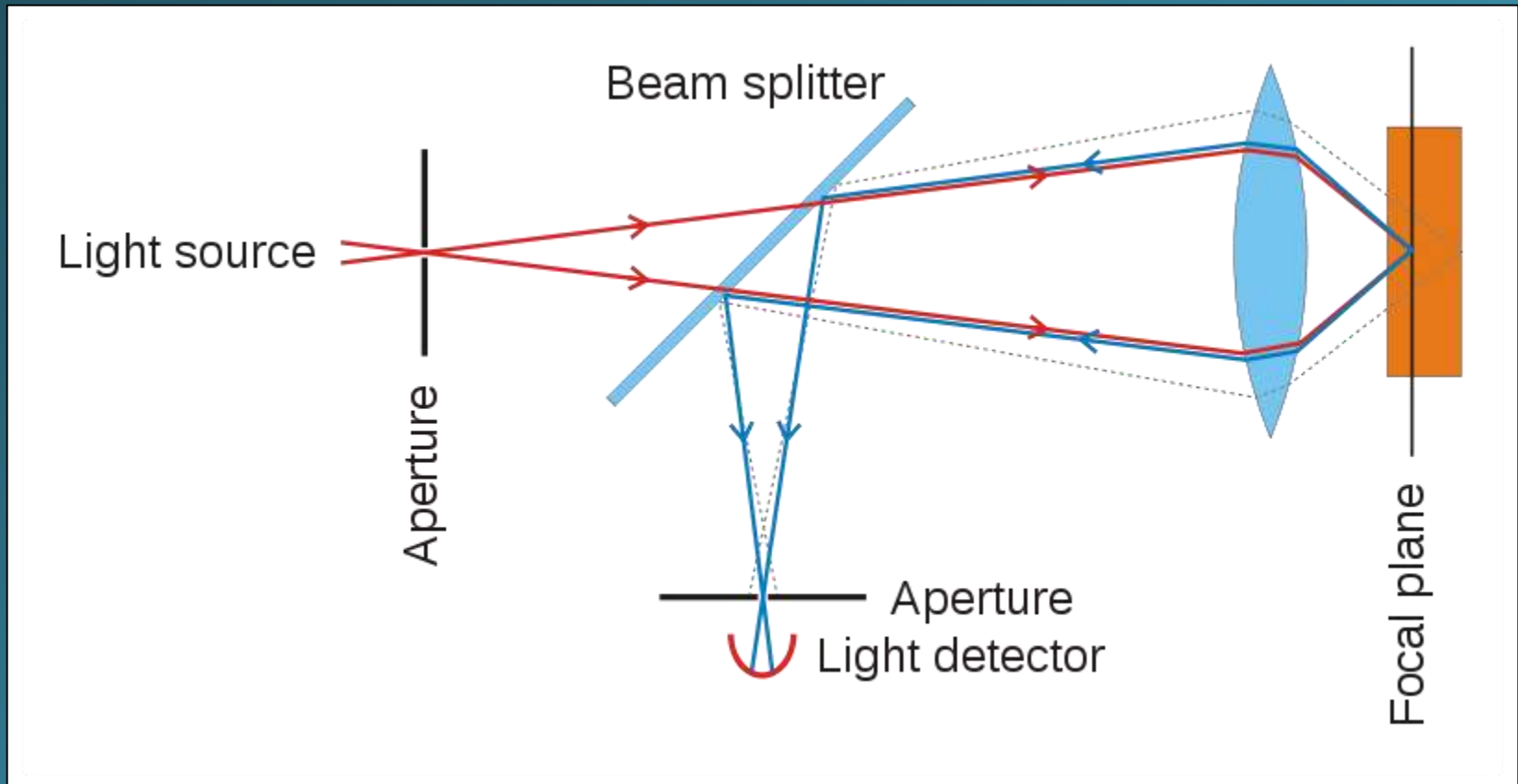
Szűrőrendszerek

Féligáteresztő tükör

Fluoreszcens mikroszkópia



Konfokális mikroszkóp



Confocal, laser-scanning microscope

Gerjesztés: lézer fényvel letapogatás (pontonként, és csak egy fluorokrómot gerjeszt)

A detektor csak az adott fókusz síkból érkező fényt érzékeli (optikai szelekt)

Confocal and Widefield Fluorescence Microscopy

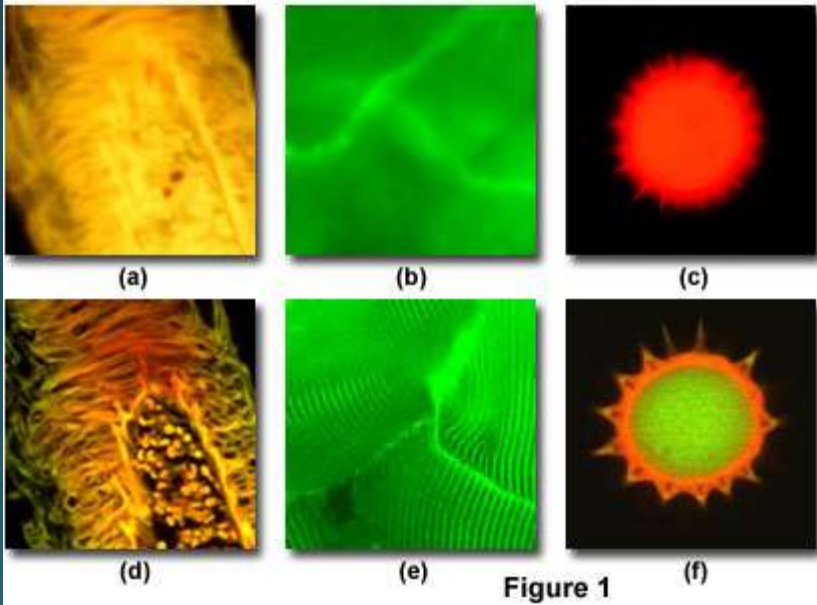


Figure 1

Three-Dimensional Volume Renders from Confocal Optical Sections

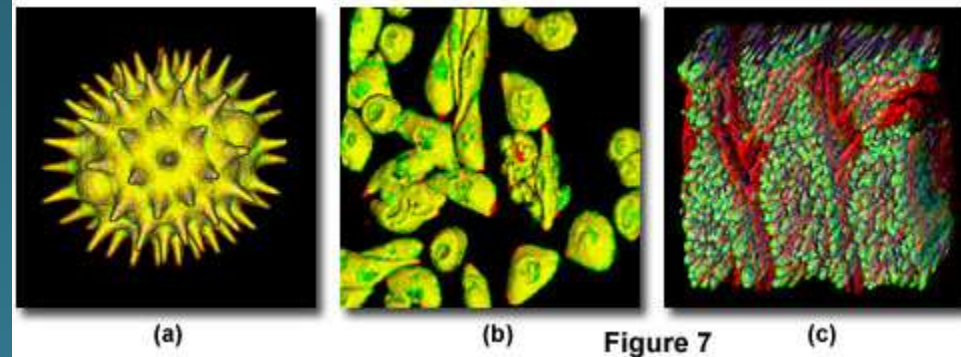


Figure 7

Pollen Grain Serial Optical Sections by Confocal Microscopy

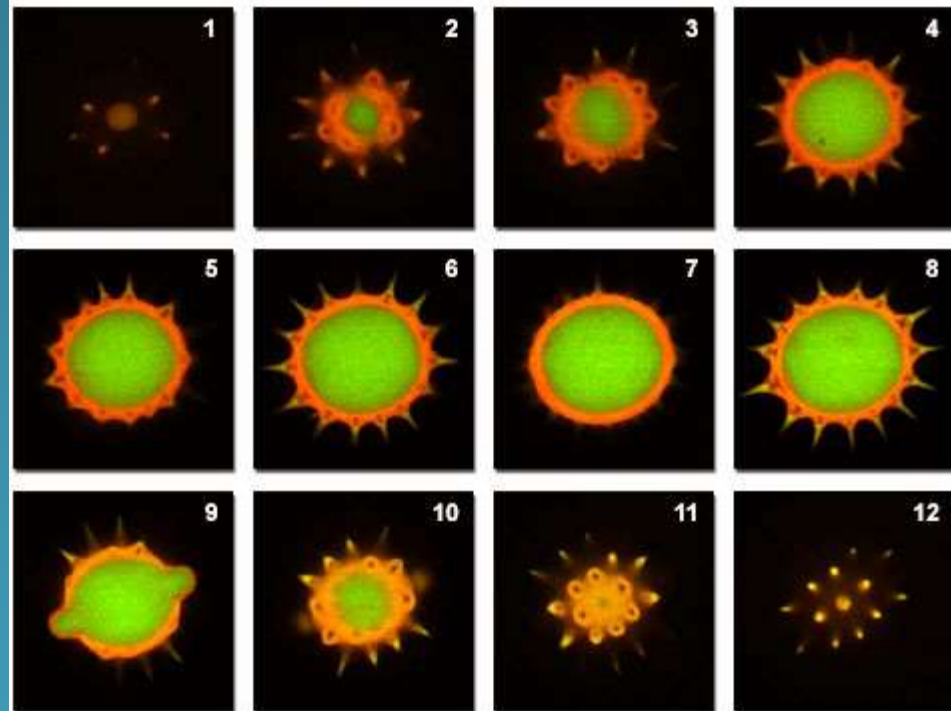
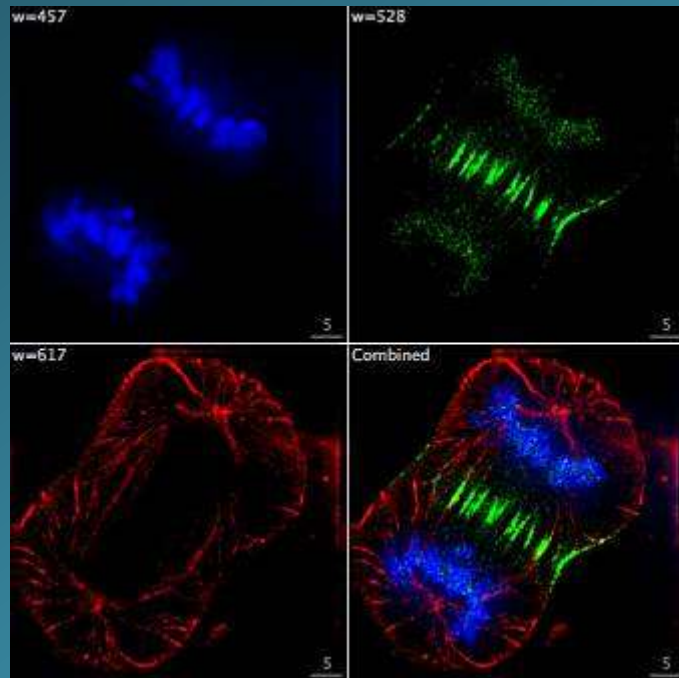
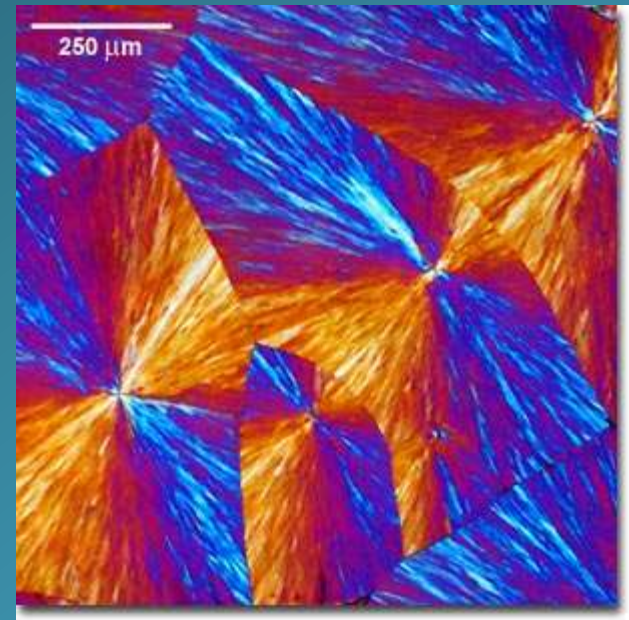
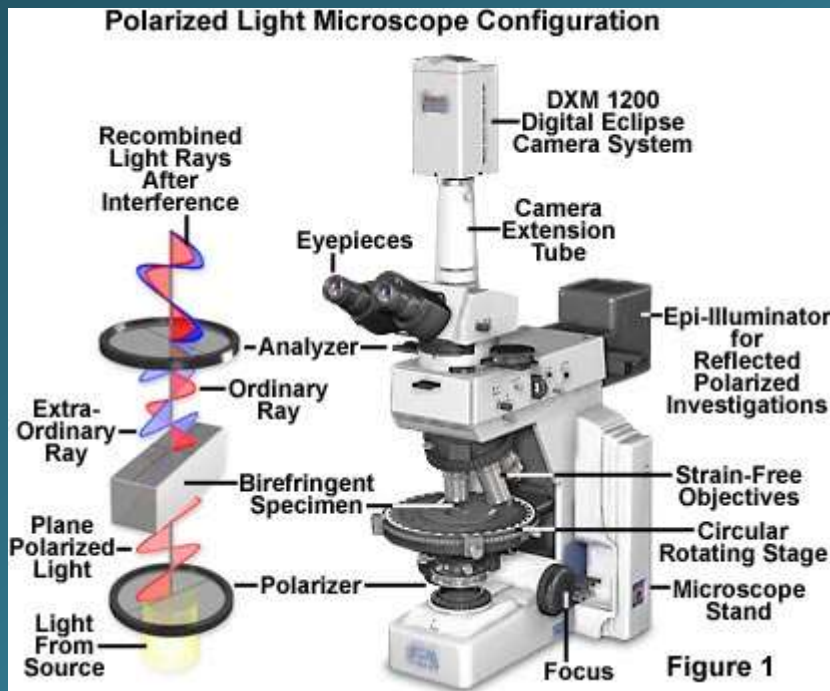


Figure 6



Polarizációs mikroszkóp



Anizotróp (kettősen törő) anyagok vizsgálatára

Invert mikroszkóp



Fordított optikai rendszer:

a megvilágító rendszer felül

az objektív alul helyezkedik el

Biztosítja a megfelelő fókusztávolságot
olyan rendszerekben is, ahol ez felülről
nem volna lehetséges

(sejt- és szövettenyésztés)

Sztereo mikroszkóp



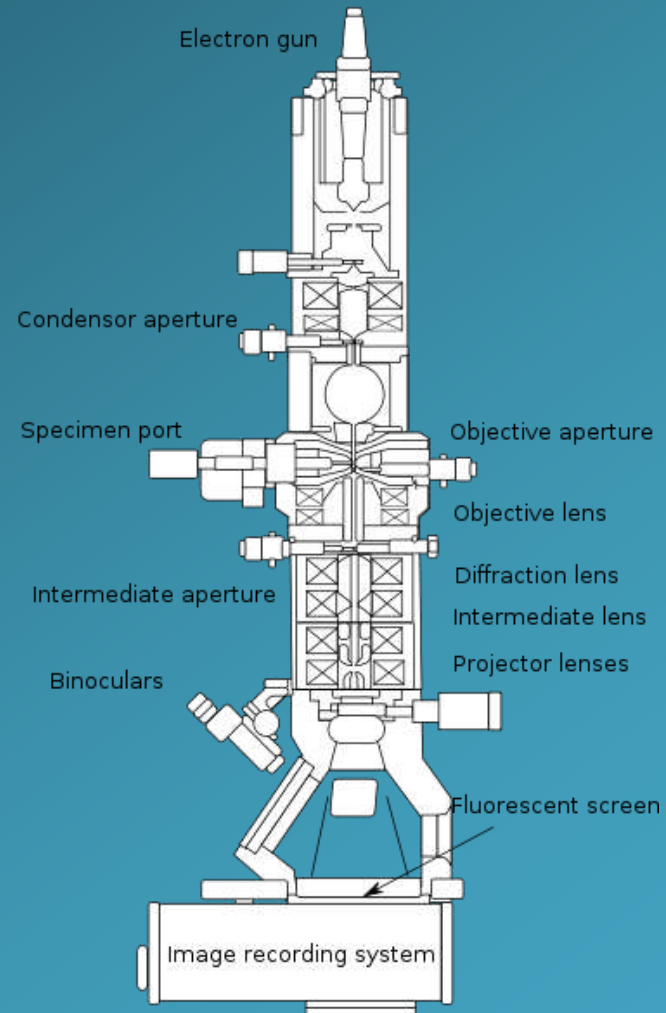
Két objektív, két okulár (14-16°): sztereo kép

Viszonylag kis nagyítás

Oldalhelyes (nem fordított kép)

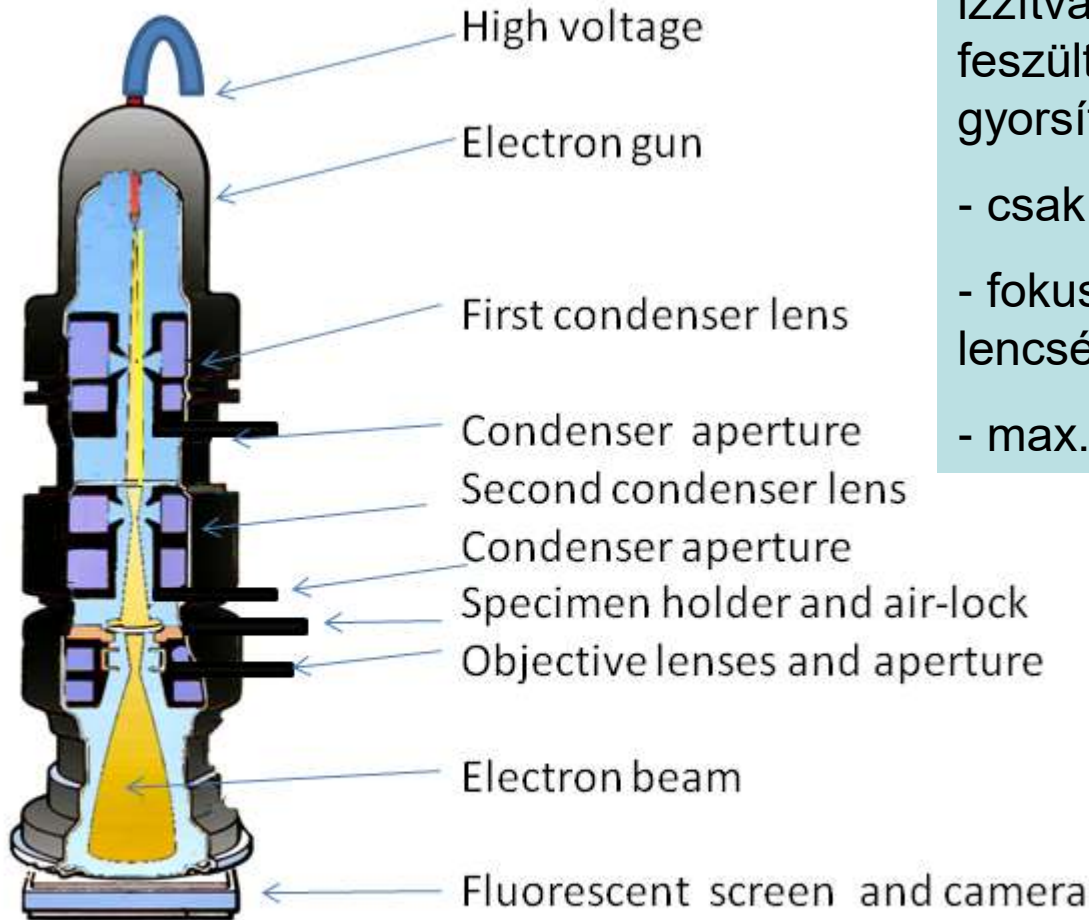
Preparáláshoz ideális

Transzmissziós elektronmikroszkóp

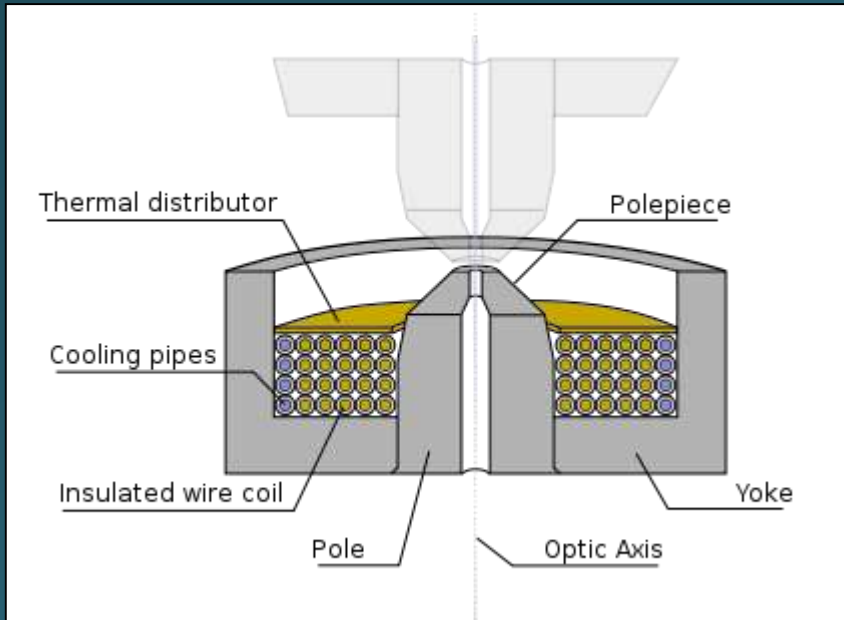


Felépítése hasonlít a fénymikroszkópokéhoz de:

- elektronokat használ (wolframszálat izzítva nyerhetjük - katód), amelyet feszültségkülönbséggel (80-120KV) gyorsítunk az anód felé (hullámhossz)
- csak vákuumban!
- fókuszálni elektromágneses lencsékkel lehet
- max. feloldódéposság: 0.1nm



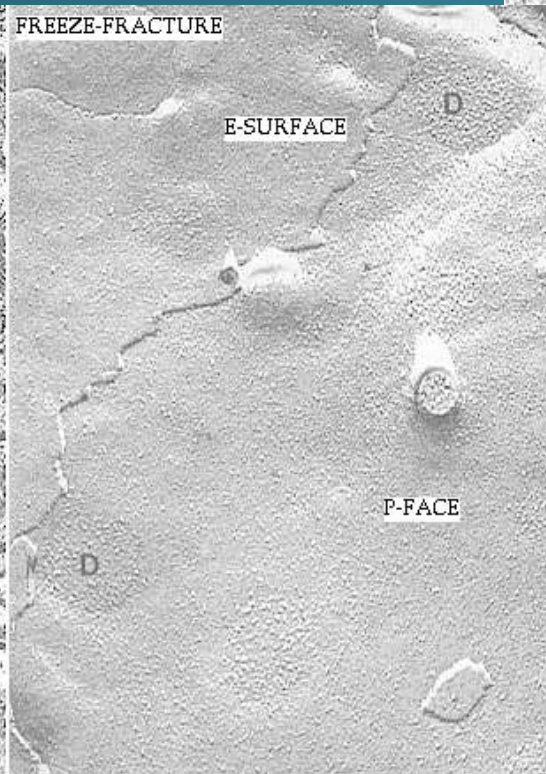
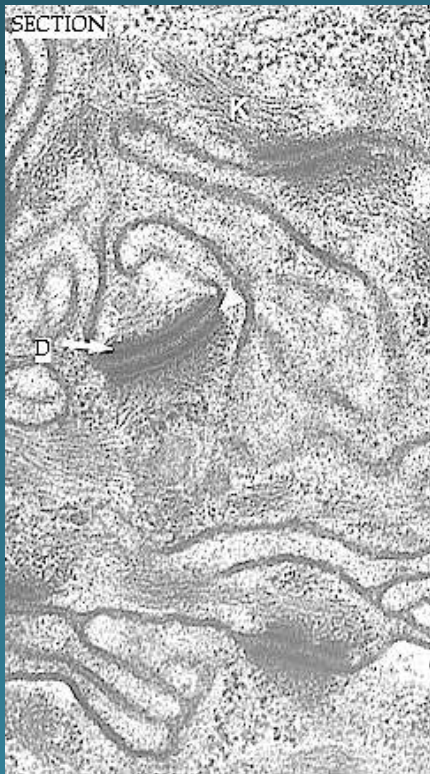
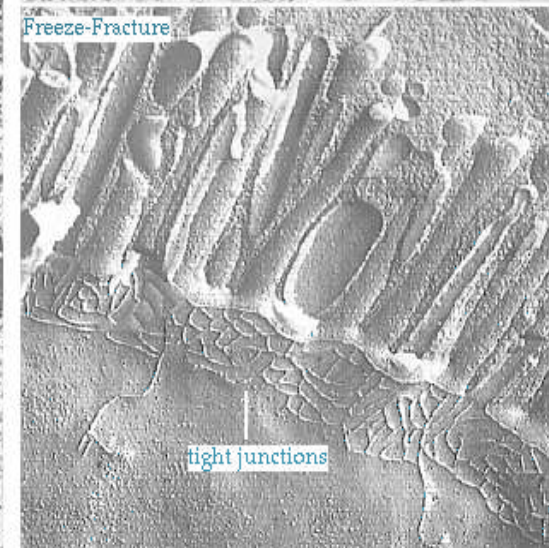
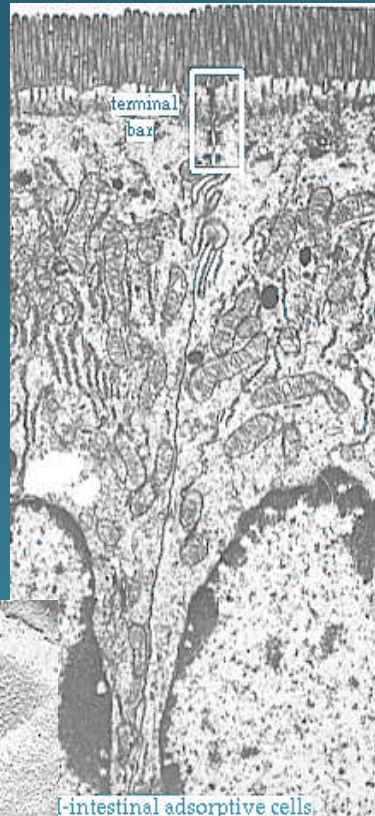
Transmission Electron Microscope



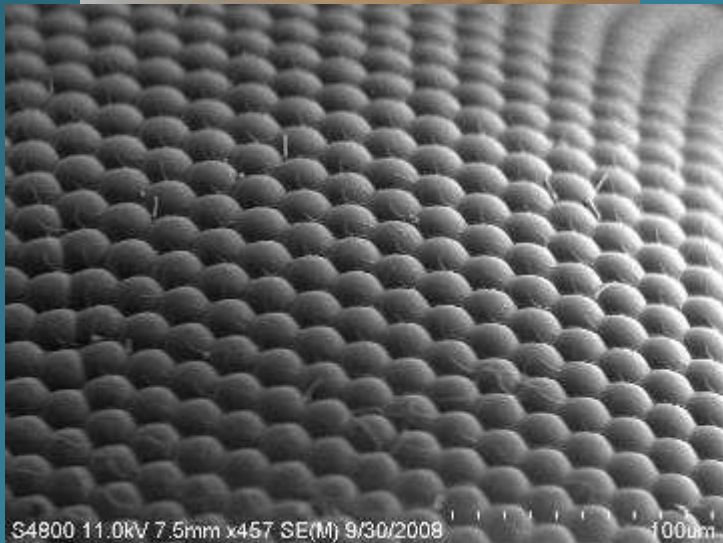
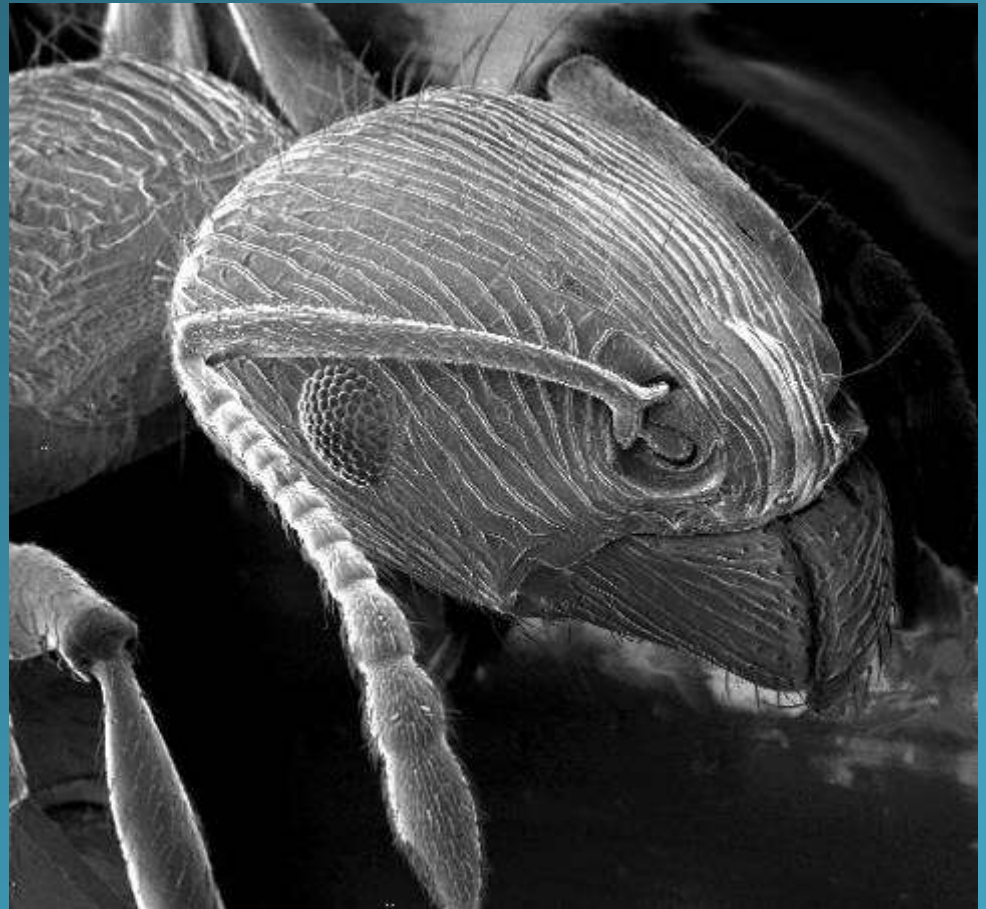
A tárgyon áthaladó elektronok egy része szóródik, ezeket egy blende kirekeszti a képalkotásból, helyükön a képen sötét foltok láthatók. (electron dense struktúrák – félrevezető elnevezés)

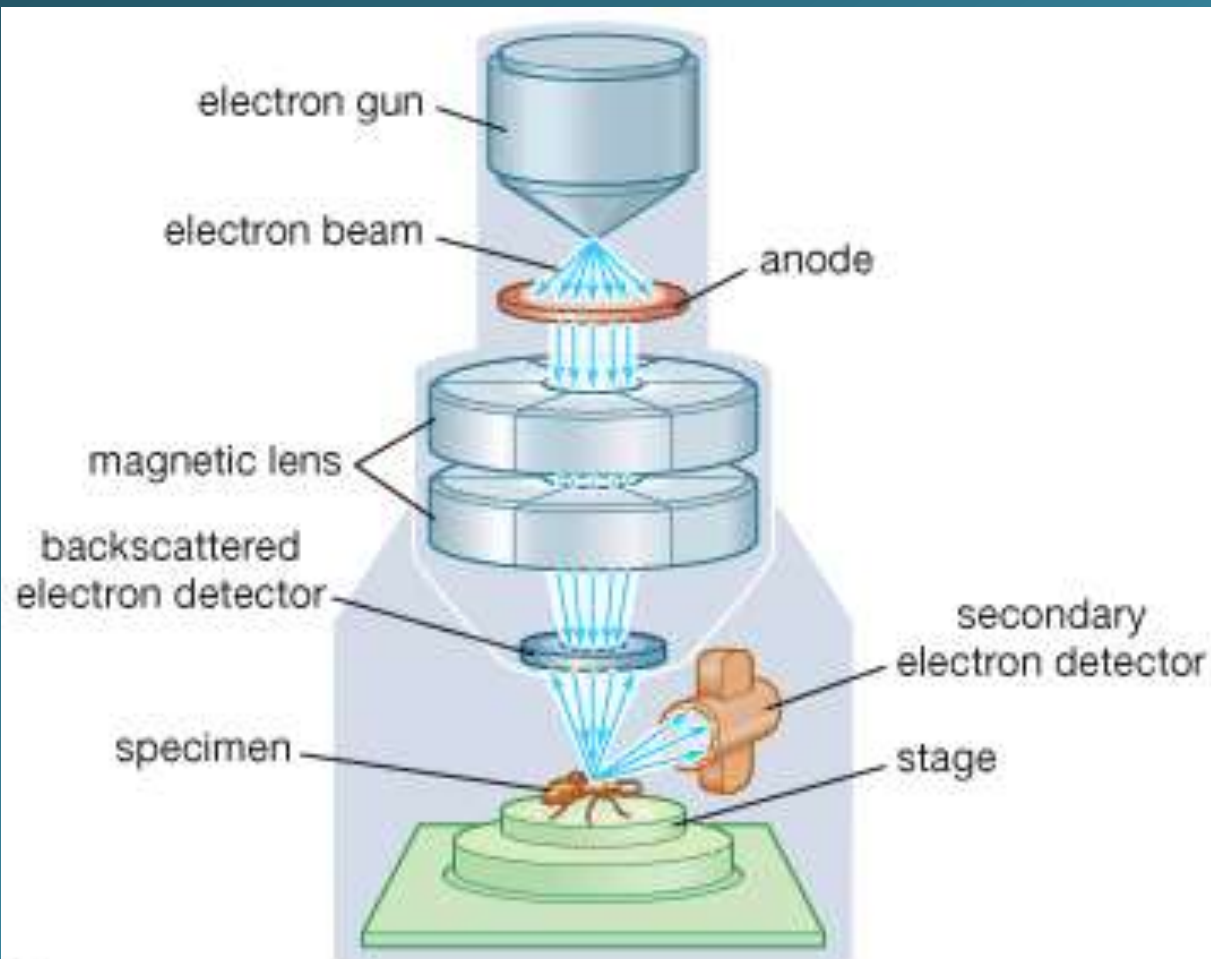
A magasabb atomszámú elemek jobban szórják az elektronokat, ezek kontrasztfokozásra felhasználhatók (ozmium, arany, ezüst, ólom, urán)

Csak nagyon vékony (ún. ultravékony 30-100 nm) metszetek használhatók

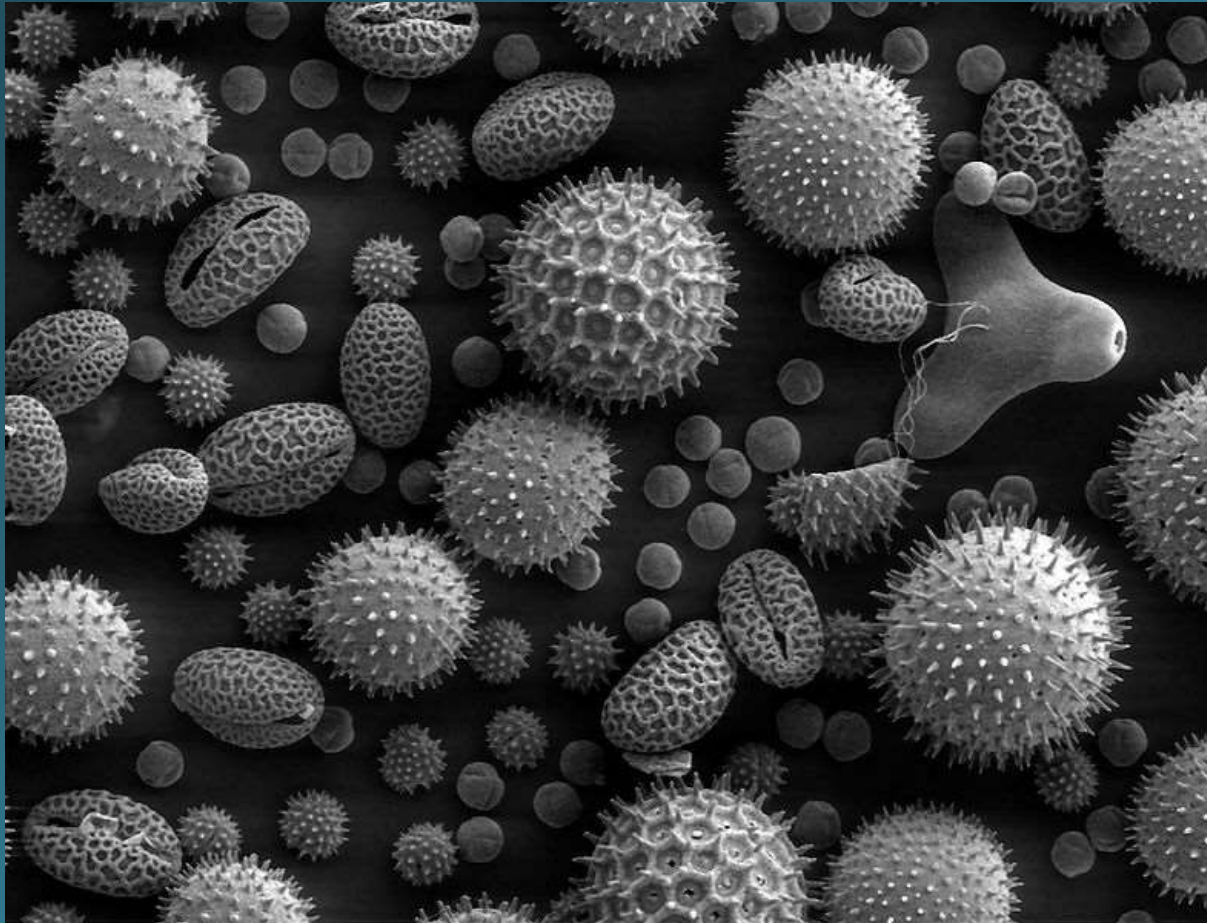


Pásztázó elektronmikroszkóp





© 2008 Encyclopædia Britannica, Inc.

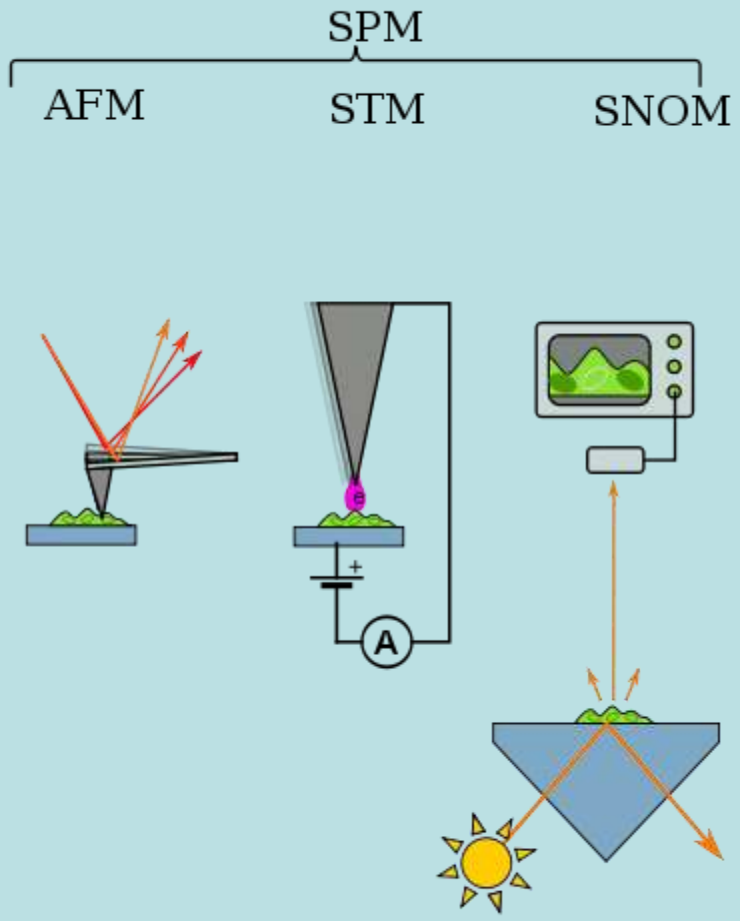
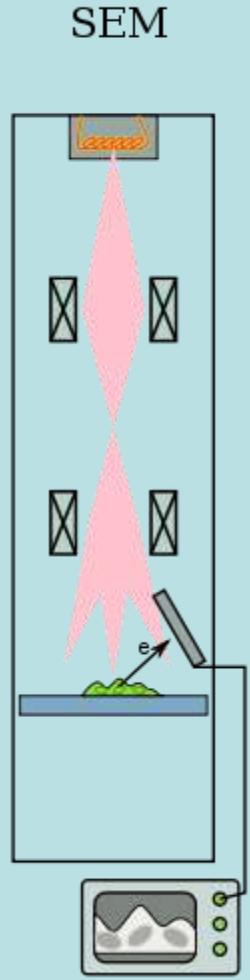
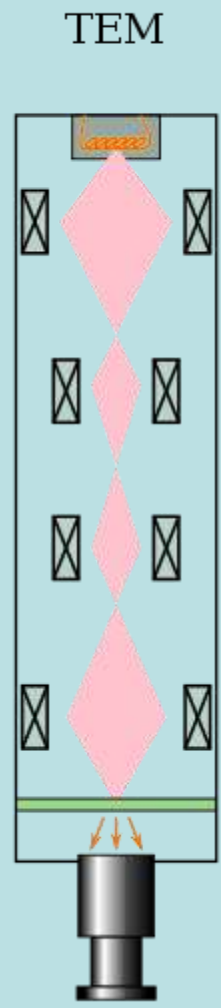
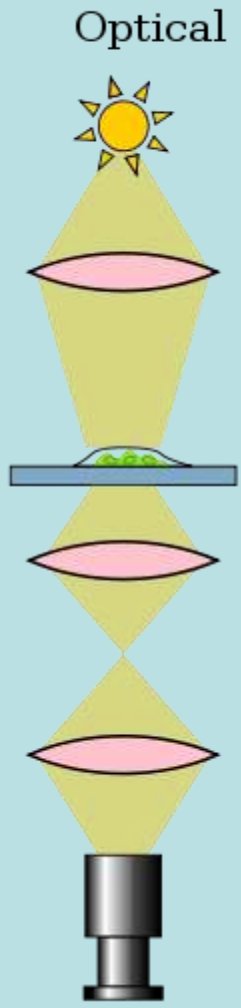


Fókuszált elektronnyalábbal tapogatjuk le a tárgy felületét

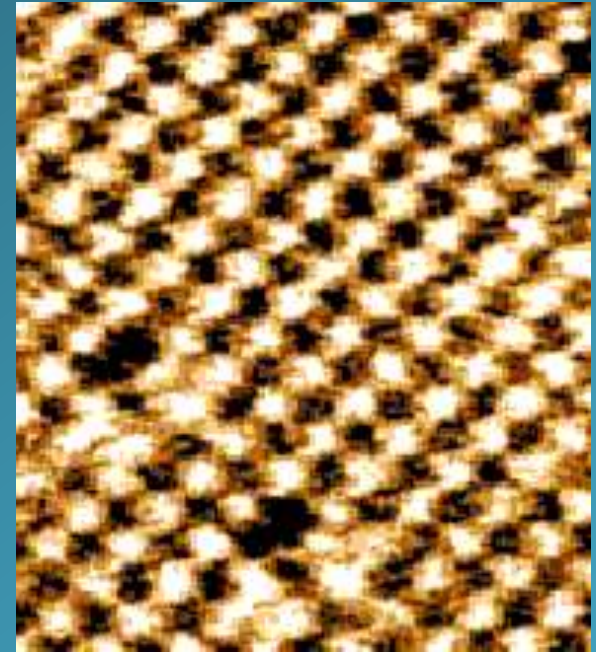
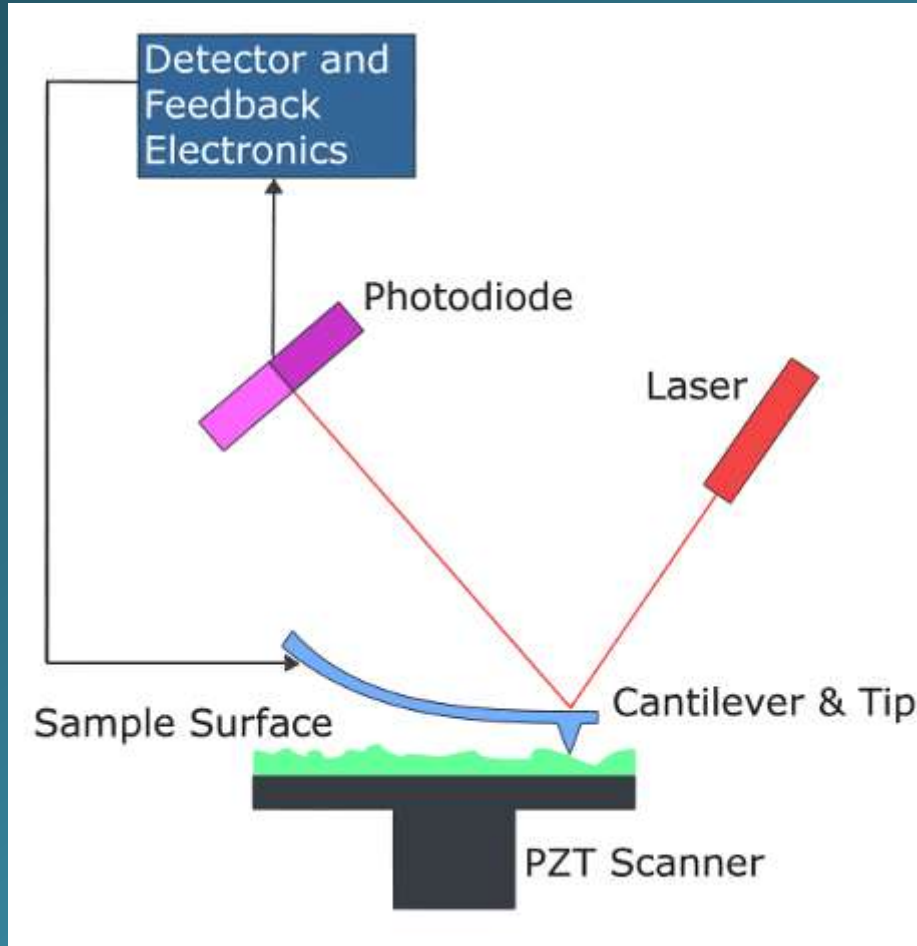
A felületről kilépő elektronokat detektáljuk, mérjük, pontonként, majd képpé alakítjuk

A felületről ad információt

Microscopes



Atomic Force Microscopy



Mikroszkópos preparátumok készítése

Fixálás

Beágyazás

Metszés, (kiterítés)

Festés

(Terítés), fedés

Mikroszkópos preparátumok készítése

Fixálás

Beágyazás

Metszés, (kiterítés)

Festés

(Terítés), fedés

Immerziós vagy perfúziós fixálás

4% paraformaldehid

esetleg glutáraldehid, alkoholok (metanol) etc.

Cél: a szöveti struktúra lehető legjobb megtartása – legyen mit vizsgálni!

Egyes esetekben fagyasztással helyettesítik! (gyors patológiai diagnosztika)

Mikroszkópos preparátumok készítése

Fixálás

Beágyazás

Metszés, (kiterítés)

Festés

(Terítés), fedés

- paraffin, műgyanta, cryomatrix

Cél: egyenletesen lehessen metszeni

Leggyakrabban paraffinba ágyazunk, több lépcsőben:

-víztelenítés: felszálló alkoholsor

-intermedier: xilol

-paraffin

Metszés után, de festés előtt deparaffinálás

Mikroszkópos preparátumok készítése

Fixálás

Beágyazás

Metszés, (kiterítés)

Festés

(Terítés), fedés

Mikrotom: normál szövettani metszetek -5-10 μm

Ultramikrotom: fél- (0,5-1 μm) és ultravékony (30-100nm) metszetek

Cryotom (fagyasztott)

Cryomikrotom

Metszés után a metszeteket általában tárgylemezre terítik ki

Mikroszkópos preparátumok készítése

Fixálás

Beágyazás

Metszés, (kiterítés)

Festés

(Terítés), fedés

Célja a sejtek, szöveti komponensek, egyes esetekben a sejtalkotók elkülönítése

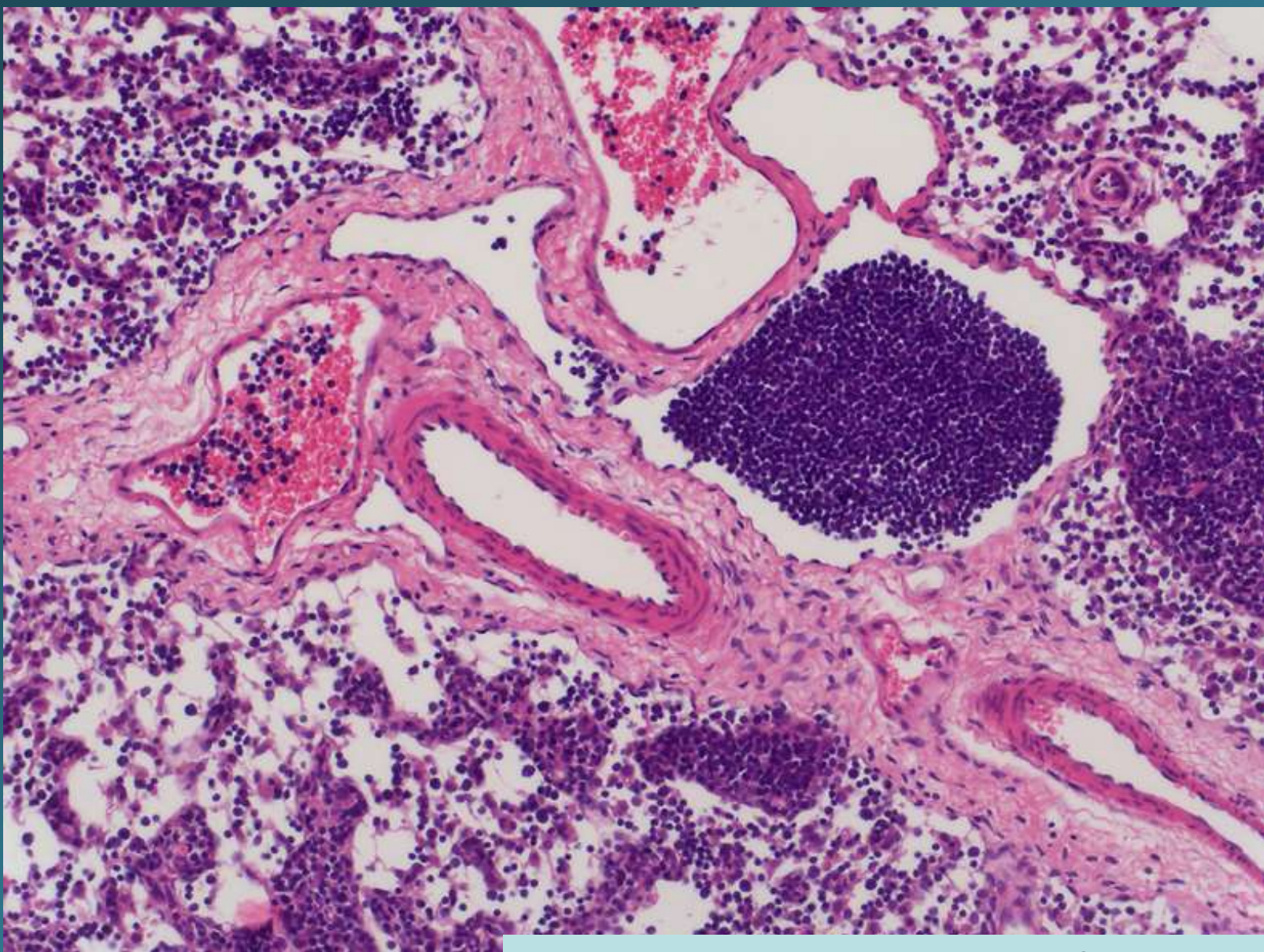
Rendkívül sokféle létezik

eg: hematoxin-eozin (leggyakoribb)

azan (kollagén rostok a kötőszövetben)

orcein (elasztikus rostok)

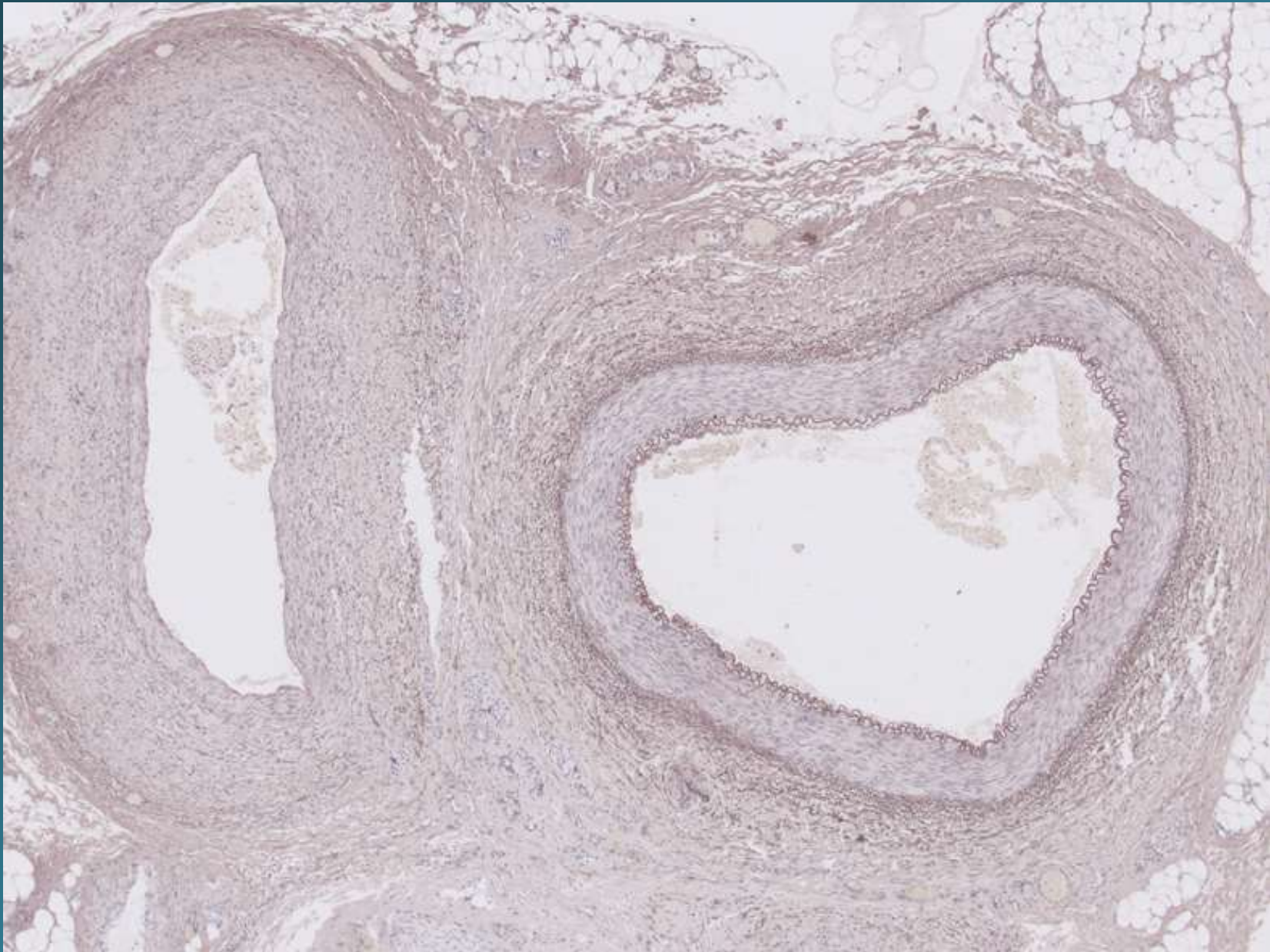
immuncitokémia etc.



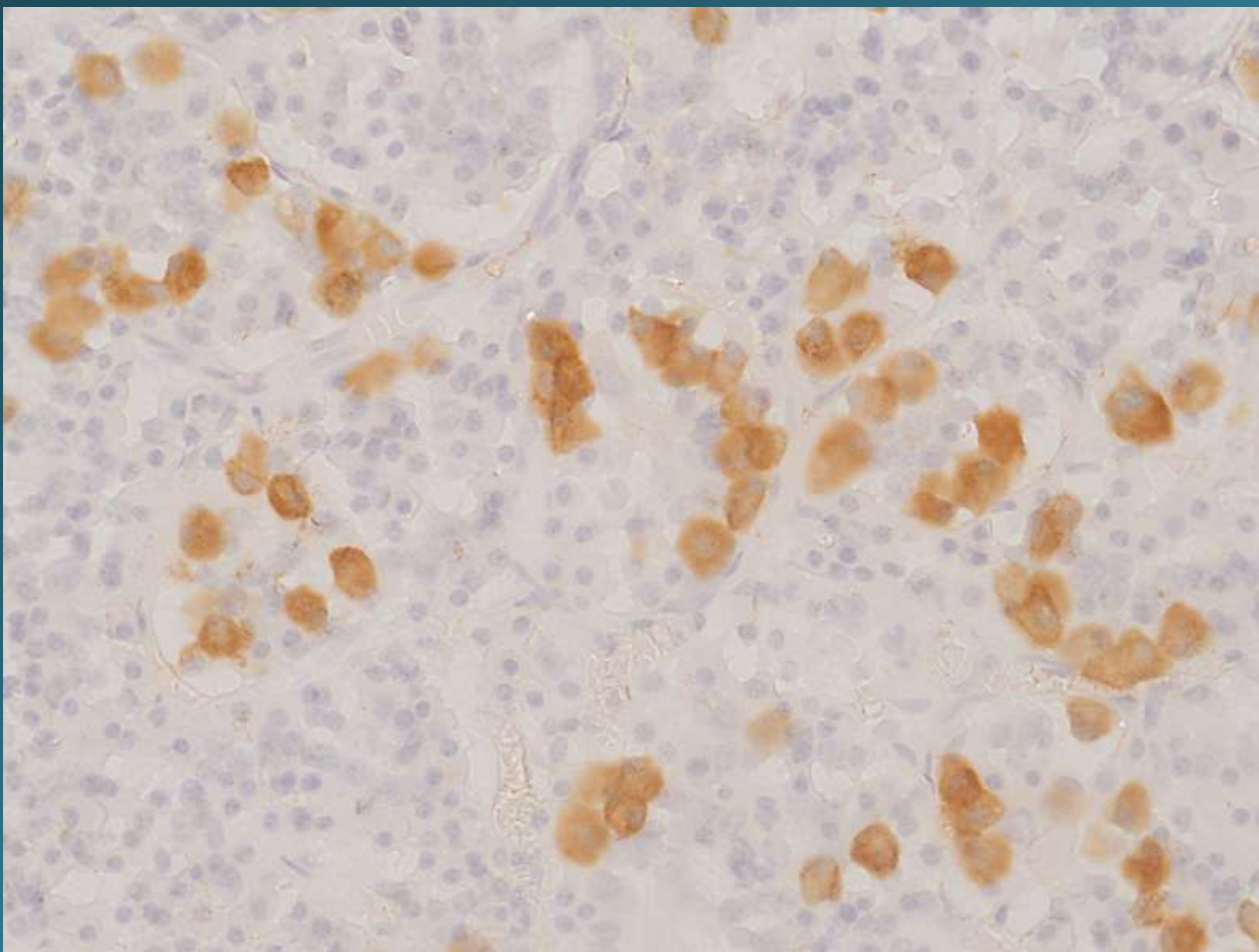
Nyirokcsomó - hematoxin-eozin festés

Ph függő festés

A magok kék, az citoplazma vöröses színben látszik.



Musculáris artéria és középnagy véna - orcein festés
A rugalmas rostok barnás színűre festődnek



Agyalapi mirigy, első lebeny, ACTH-termelő sejtek
Immuncitokémia

Mikroszkópos preparátumok készítése

Fixálás

Beágyazás

Metszés, (kiterítés)

Festés

(Terítés), fedés

Általában fontos a fedőanyag törésmutatója és a teljes vastagság kanadabalzsam, glicerin, speciális fedőanyagok (eg. anti-fading – fluorescens festésnél)

Felhasznált irodalom

Röhlich Pál: Szövettan, SOTE Képzéskutató, Oktatástechnológiai és Dokumentációs Központ, Budapest, 1999

Lovas Béla: Mikroszkóp – mikrokozmosz, Gondolat kiadó, Budapest, 1984

Molnár László – Gábrriel Róbert: Fény- és elektronmikroszkópos mikrotechnika, Dialóg Campus kiadó, Budapest – Pécs, 2001

A szövettani képek nagy része a Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet gyűjteményéből származik.

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/index.html>