



A SEJTKUTATÁS STRUKTURÁLIS VIZSGÁLÓMÓDSZEREI, A MIKROSZKÓPOK

Kovács Tamás

Néhány adat a méretekről

- Az emberi szem maximális feloldóképessége 0,1 mm – 100 μm
- Egy átlagos eukarióta sejt mérete 10-50 μm
- Sejtmag: 5-30 μm
- Prokarióták már 1 μm alatt

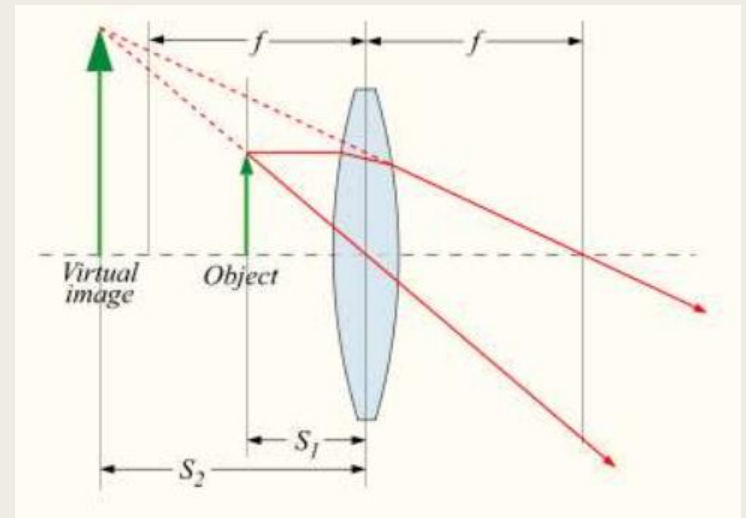
Mikroszkópok

A képalkotás két alapvető módszere:

- Optikai módszer:
lencserendszerek nagyított 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.

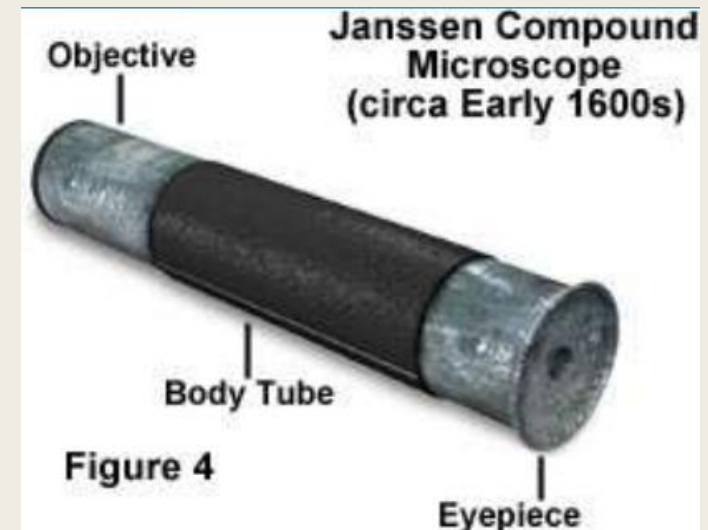
Nagyító

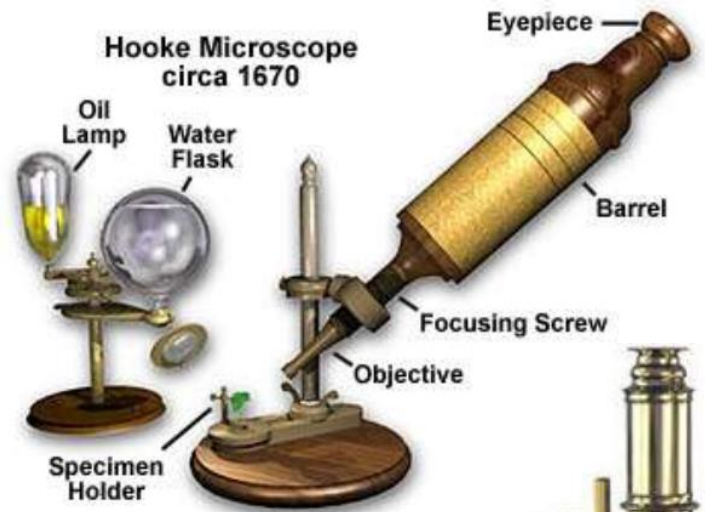
- Valószínűleg már időszámításunk előtt használták
- Abu Ali Muhamed Ben el-Hasan Ibn el Heitham el Basri ír róla először
- Az 1600-as évek óta használják tudatosan kutatási / megfigyelési célokra (bolhanéző üveg)
- Antoni van Leewenhoek (1632-1723)



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 teleszkópot is kifejlesztette, Hans Janssen-t és fiát, Zachariast.





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.

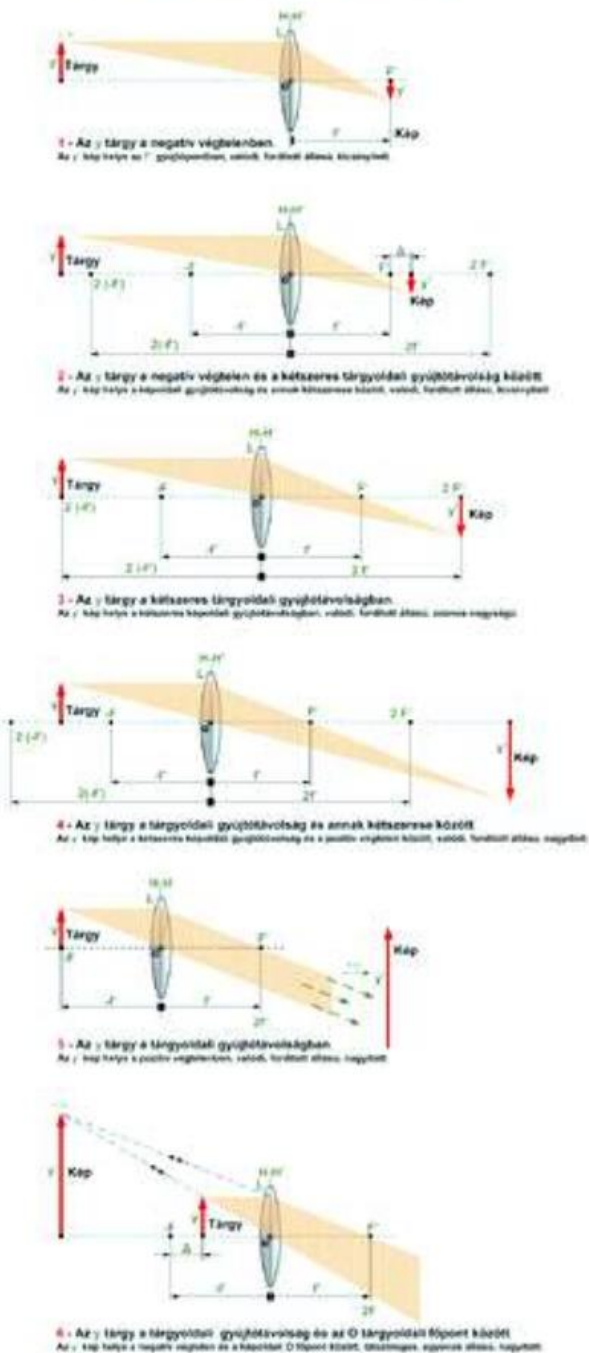


**Pacini
Compound
Microscope
(circa 1845)**

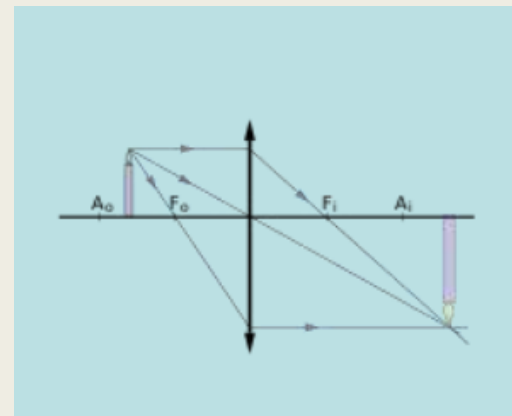


English Tripod Microscope
made and sold by John Yarwell in the 1680s. The microscope is constructed of lignum vitae pasteboard, and gold-tooled leather.

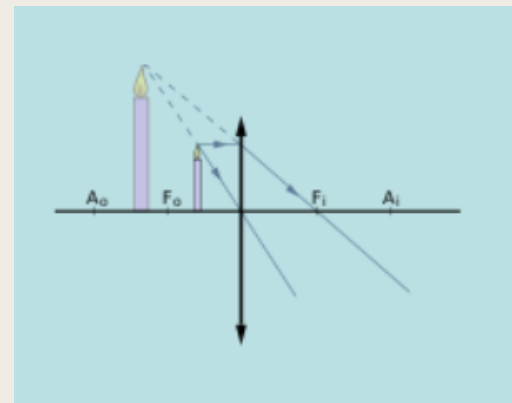
Egy kis optika ...



- 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 végtelenbe).



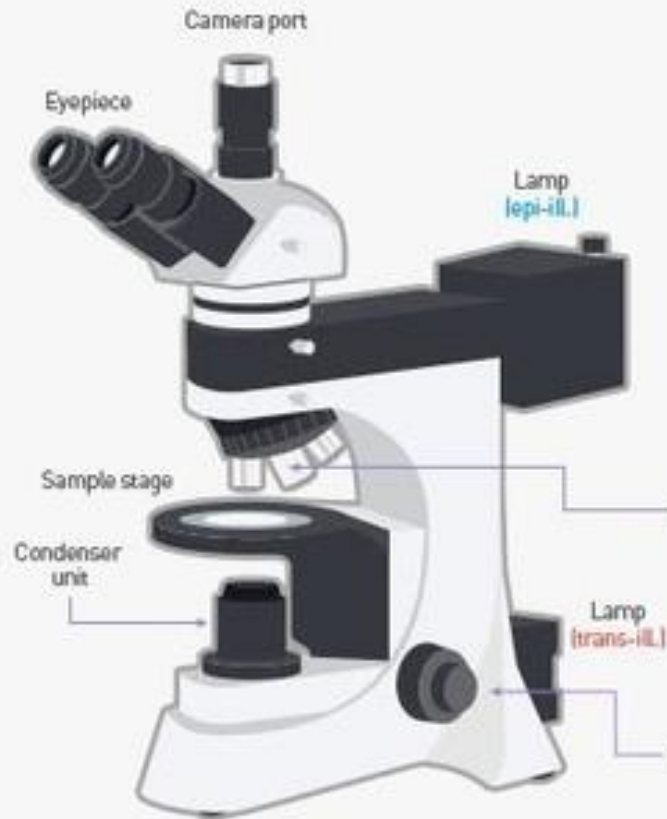
A mikroszkóp optikai elemei

- Megvilágítás / fényforrás
- Megvilágítás modulálása
- Kondenzor
- Tárgy (prepi)
- Objektív
- Kép modulálása
- Okulár
- Detektor

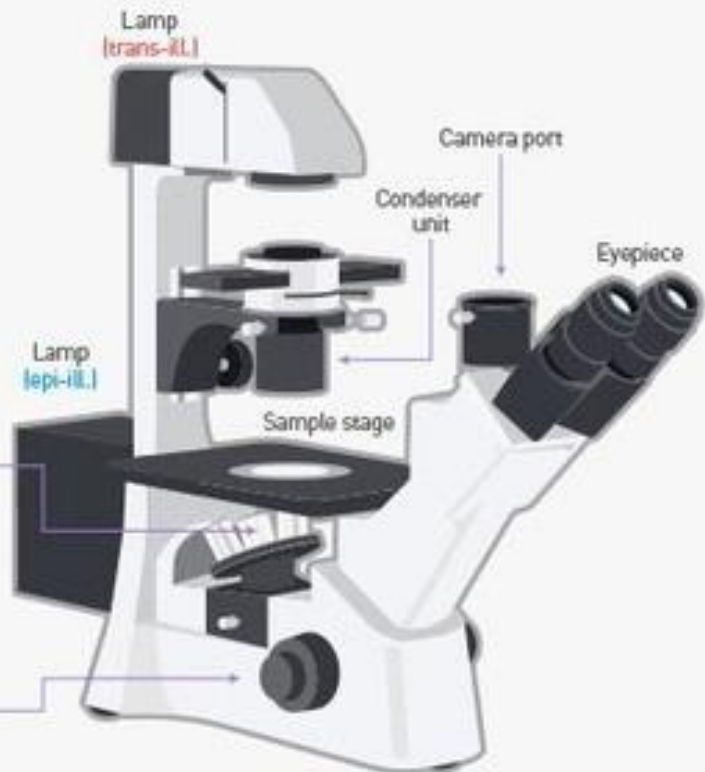
Microscope Component	Attributes
Illuminator	Light Source, Collector Lens, Field Diaphragm, Heat Filters, Light Balancing Filters, Diffuser, Neutral Density Filters
Light Conditioner	Condenser Iris, Darkfield Stop, Aperture Mask, Phase Annulus, Polarizer, Off-Center Slit Aperture, Nomarski Prism, Fluorescence Excitation Filter
Condenser	Numerical Aperture, Focal Length, Aberrations, Light Transmission, Immersion Media, Working Distance
Specimen	Slide Thickness, Cover Glass Thickness, Immersion Media, Absorption, Transmission, Diffraction, Fluorescence, Retardation, Birefringence
Objective	Magnification, Numerical Aperture, Focal Length, Immersion Media, Aberrations, Light Transmission, Optical Transfer Function, Working Distance
Image Filter	Compensator, Analyzer, Nomarski Prism, Objective Iris, Phase Plate, SSEE Filter, Modulator Plate, Light Transmission, Wavelength Selection, Fluorescence Barrier Filter
Eyepiece	Magnification, Aberrations, Field Size, Eye Point
Detector	Human Eye, Photographic Emulsion, Photomultiplier, Photodiode Array, Video Camera

A mai mikroszkópok: upright vs. inverz mikroszkóp

Upright microscope

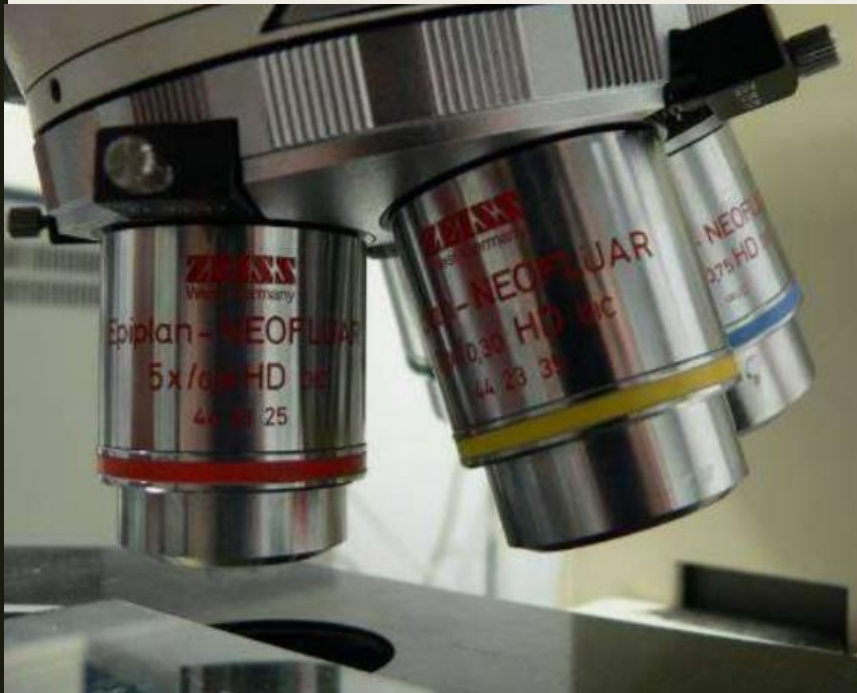


Inverted microscope



Az objektív

- A mikroszkóp feloldóképességét meghatározó fő optikai elem.
- Nem egy, hanem több lencséből álló lencserendszer.
- A fénytörési hibák nagy része itt korrigálható.



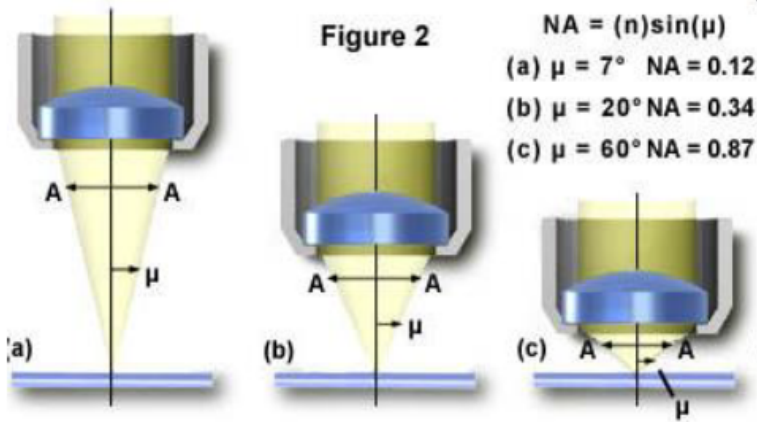
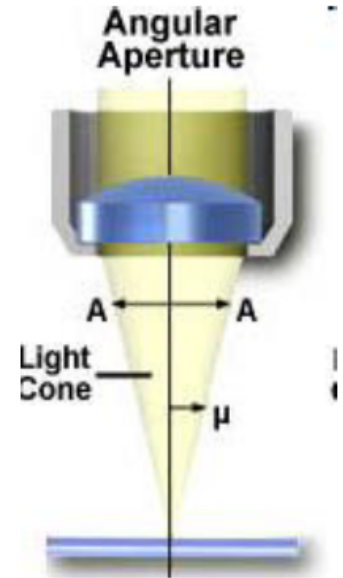
Az objektívek jellemzői

felbontás és numerikus apertúra (NA)

$$NA = n(\sin \mu)$$

n : törésmutató az objektív frontlencséje és a fedőlemez között

μ : az anguláris apertúra-érték fele



„száraz” objektív: NA max. 1
(de inkább kisebb)

törésmutató növelése: víz (1.33), glicerin (1.47), immerziós olaj (1.51)



NA 1 – 1.4 között (TIRF: akár 1.89 is!)

A feloldóképesség

- 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 ún. elsőrendű szórt sugaraknak be kell jutniuk az optikai rendszerbe a kép keletkezéséhez.
- Minél magasabb rendű szórt sugarak lépnek be, annál részletgazdagabb a kép.

Az Abbe-képlet

$$d = 0,61\lambda/n \sin\alpha$$

ahol d : a feloldóképesség

λ : a fény hullámhossza

n : a preparátum és objektív közötti közeg törésmutatója

α : az objektív félnyílásszöge

$$n \sin\alpha = NA$$

A legjobb feloldóképesség (minél kisebb d) akkor érhető el

- Ha λ minél kisebb (elektronmikroszkópia)
- NA minél nagyobb (immerziós objektívek)

Látható fénynél a teoretikusan elérhető

$d=0,2 \mu\text{m}$

Az objektívek jellemzői

felbontás és numerikus apertúra (NA)

a felbontás a nagyítástól nem, csak a megvilágító fény hullámhosszától és a NA-tól függ!

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

λ = wavelength of the light used (effective wavelength of white light: 550 nm)
 n = refractive index of the optical medium between the front lens and cover glass (air = 1; H₂O = 1.33; immersion oil = 1.518)
 α = half the opening angle of the objective used

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

Resolution versus Wavelength

Wavelength (nanometers)	Resolution (micrometers)
360	.19
400	.21
450	.24
500	.26
550	.29
600	.32
650	.34
700	.37

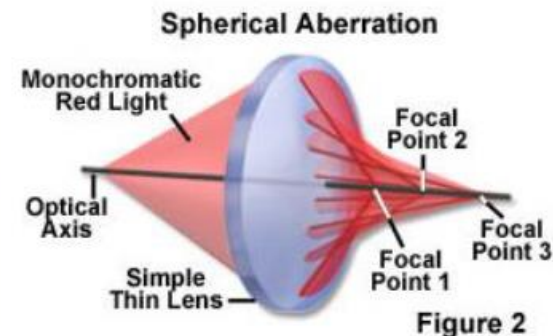
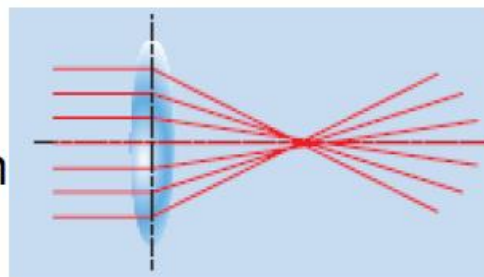
a fénymikroszkóp maximális (elméleti) x-y felbontása ~ 200 nm <-> STED és szuperrezolúciós mikroszkópia!

Az objektívhibák (aberrációk) és korrigálásuk

<http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/aberrationhome.html>

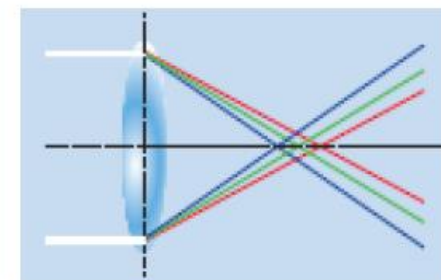
szférikus aberráció

ált. a törésközeghez való jobb alkalmazkodás segít – objektíven korrigeációs gallér




kromatikus aberráció

Apochromat lencsék: korrigáltak



Uncorrected Microscope Image



Choose A Specimen
Diatom Frustule

Image Position

Point Spread Functions

Lateral

Axial

Image Plane

Image Position

Ray Trace Diagram

Image Position


Lens

Optical Axis

Object

Uncorrected Fluorite
 Achromat Apochromat

Uncorrected Microscope Image



Choose A Specimen
Diatom Frustule

Image Position

Point Spread Functions

Lateral

Axial

Image Plane

Image Position

Ray Trace Diagram

Image Position

Lens

Optical Axis

Object

Uncorrected Fluorite
 Achromat Apochromat

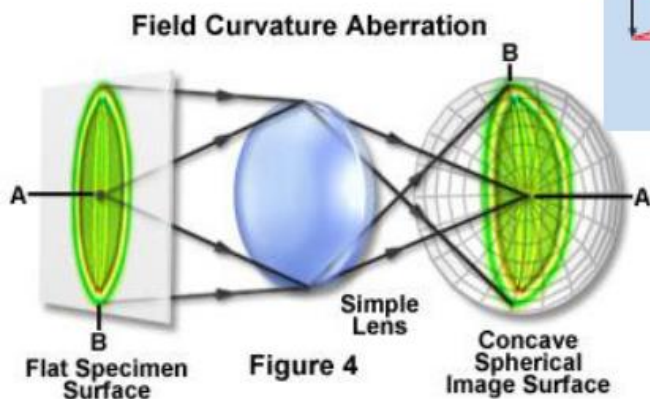
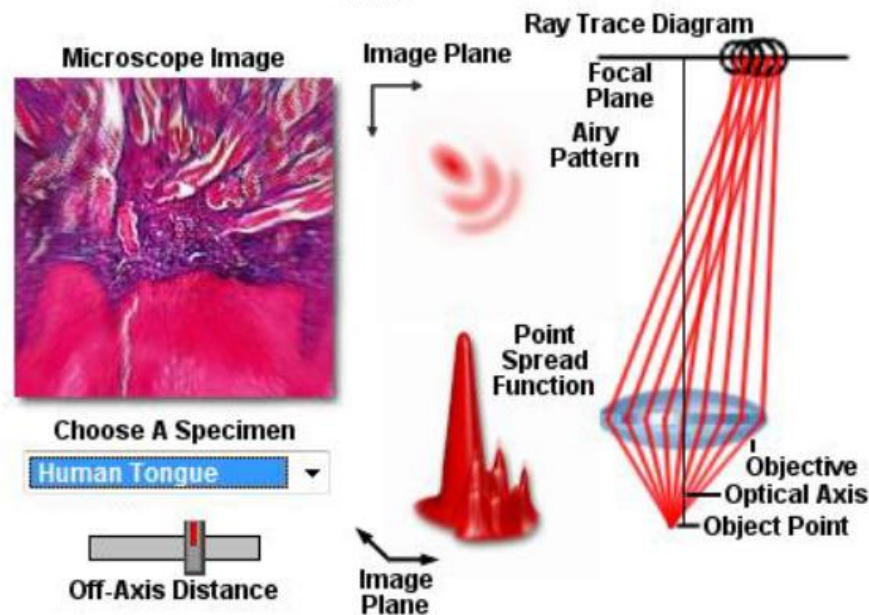
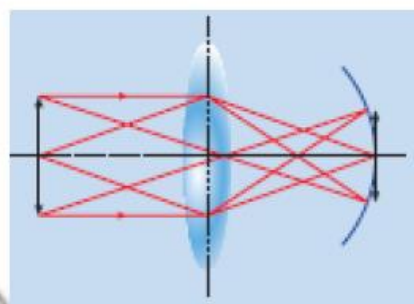
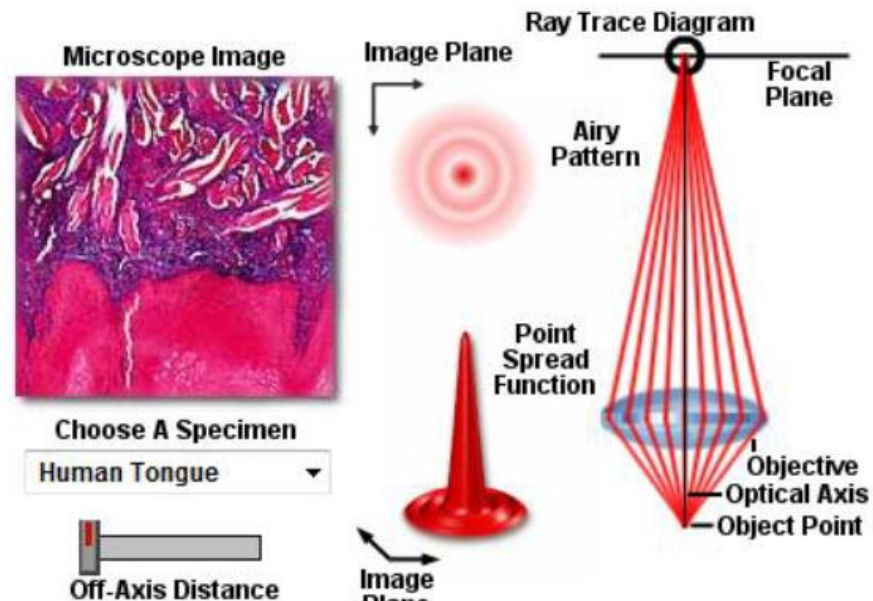
Az objektívhibák (aberrációk) és korrigálásuk

komatikus aberráció

középtengelytől eltérő megvilágítás –
mikroszkóp optikai tengelyének
centrálása

mezőgörbület

Plan/Plano objektívek



Az objektívhibák (aberrációk) és korrigálásuk

geometrikus aberráció

főleg sztereomikroszkópban

Geometric Distortion



Pincushion

Figure 6

Barrel



A-Plan:

- Field of view: 23 mm
- Flatness: *
- Color correction: *

Entry-level objectives for laboratory, routine and research microscopes



LD A-Plan:

- Field of view: 23 mm
- Flatness: **
- Color correction: **

Objectives with long working distance for inverted microscopes; attachable cover glass cap for thinner cover glasses measuring 0.17 to 0.6 mm



ACHROPLAN:

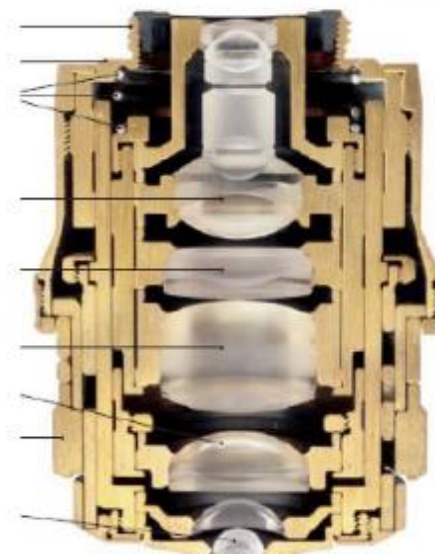
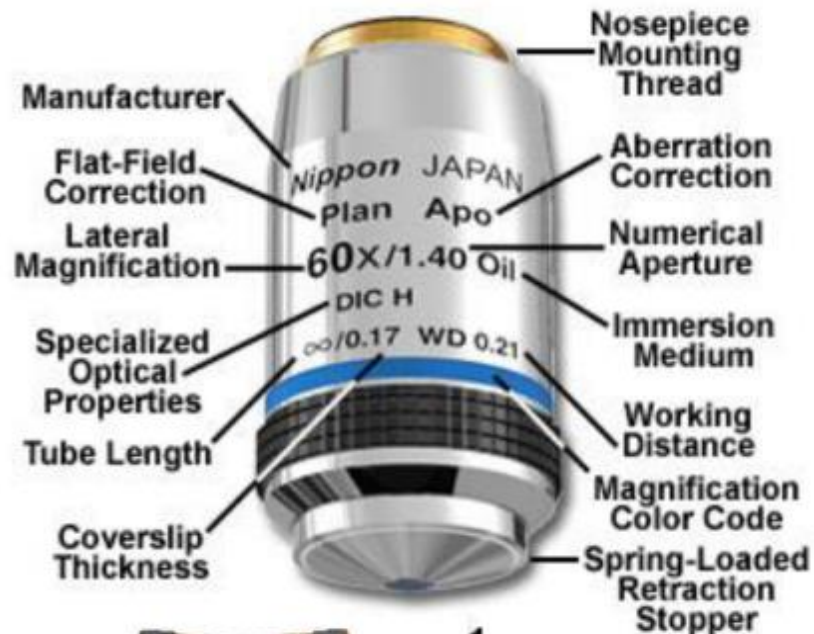
- Field of view: 23 mm
- Flatness: **
- Color correction: ***

Objectives in many variations for diverse applications

Az objektívek jelölése



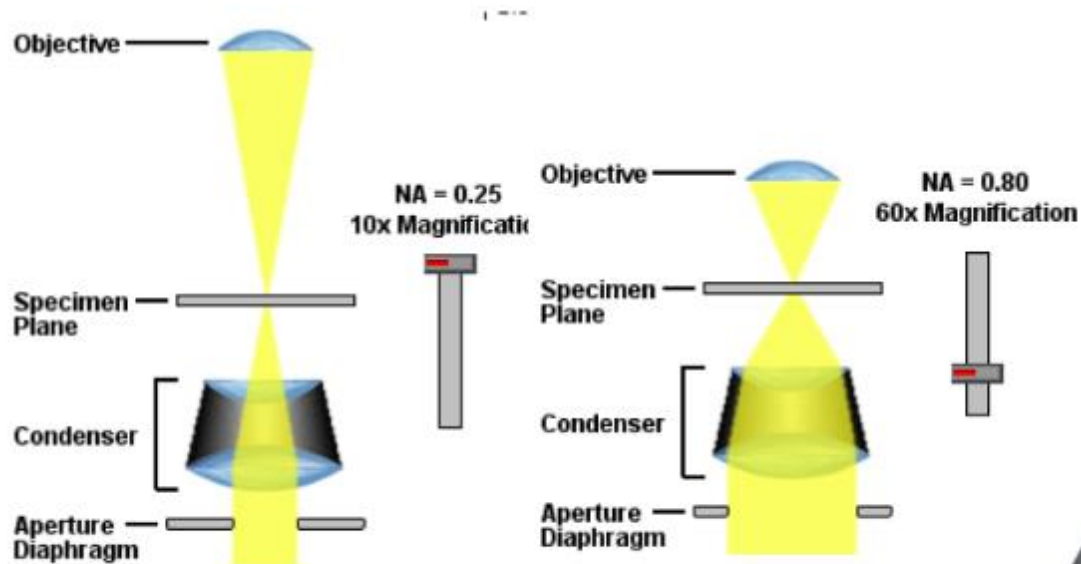
60x Plan Apochromat Objective



A kondenzor

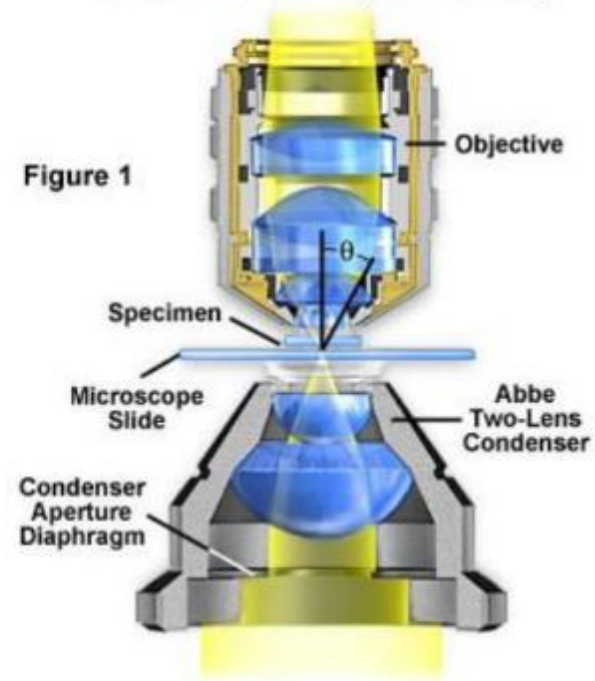
cél: a preparátum/látótér egyenletes megvilágítása

az objektív NA-jának megfelelő fényoszlop jusson az objektívbe

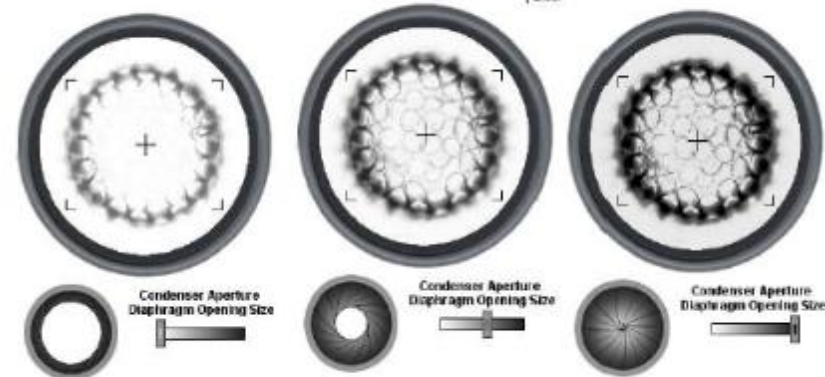


Abbe Condenser Optical Pathway

Figure 1



Minimum két lencse és egy blende alkotja

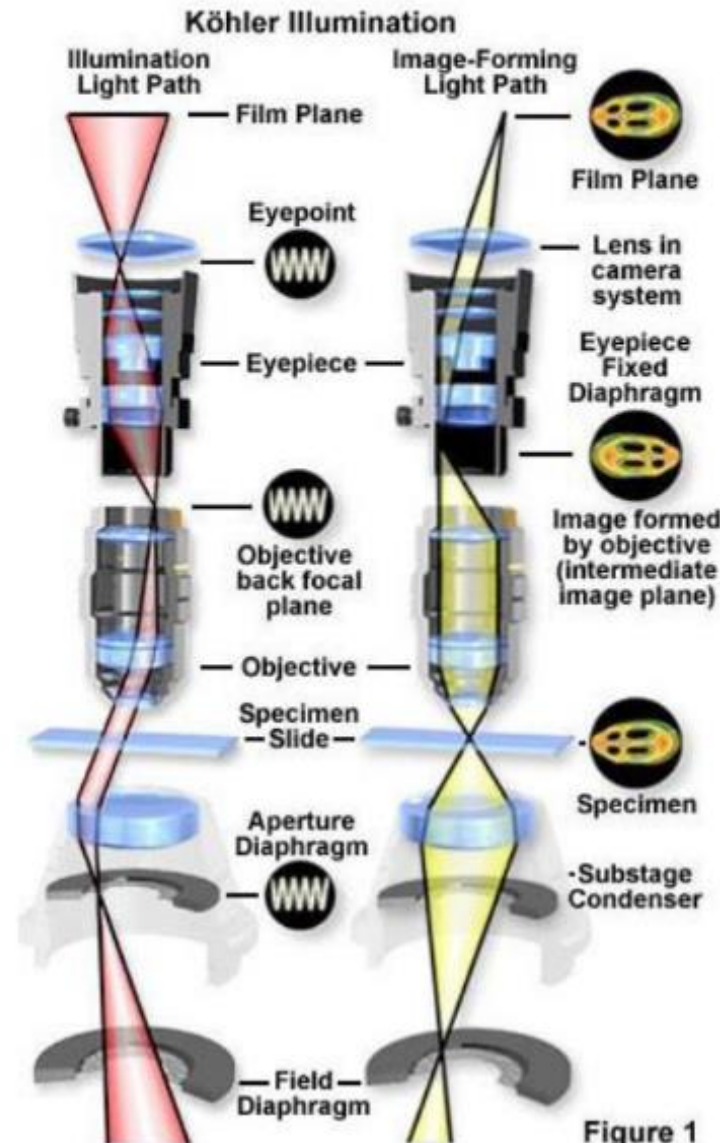
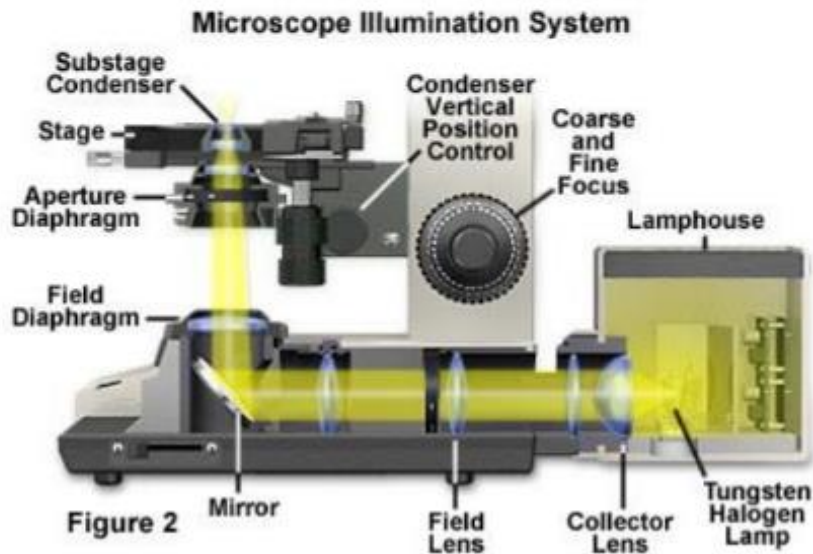


<http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/condensers.html>

A kondenzor

Köhler-féle megvilágítás: optikai fényút centrálása, a látótér egyenletes megvilágításának beállítása

konjugált síkok a megvilágító és a képalkotó optikai útban: optimálisan mindegyiken egyszerre éles a kép



A fénymikroszkóp konjugált síkjai

Aperture Conjugate Plane Locations

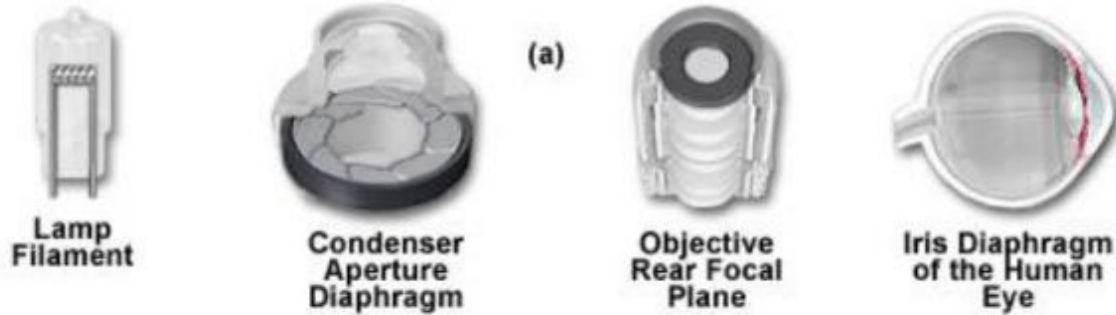


Image-Forming Conjugate Plane Locations

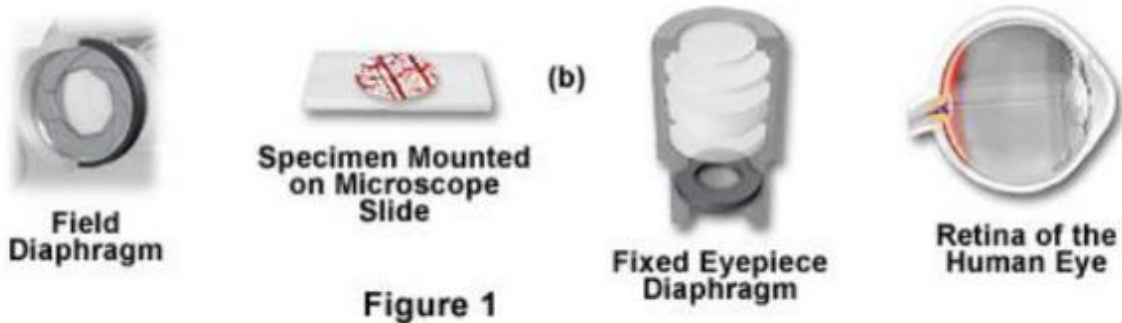


Figure 1

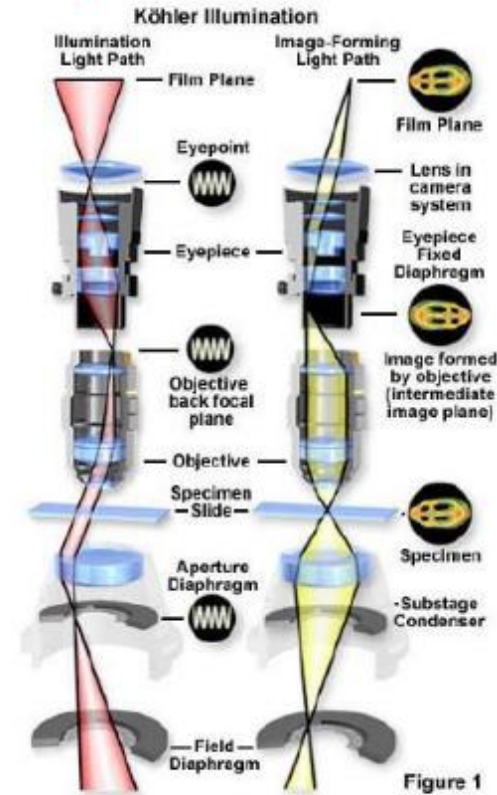


Figure 1

Microscope Illumination System

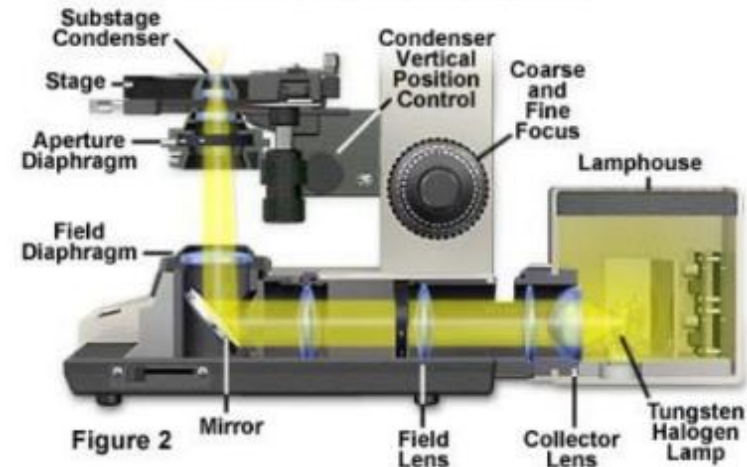


Figure 2

<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/basics/microscopeconjugateplanes/index.html>

A Köhler-féle megvilágítás beállítása

1. megfelelő objektív kiválasztása
2. kondenzor apertúra az objektív NA-jának megfelelő kinyitása
3. tárgy (prepi) fókusz síkba hozása (=élesre állás)
4. mezőrekesz beszűkítése (-> kép konjugált síkjának definiálása)
5. kondenzor lencse magasságának állításával a mezőrekesz képét a fókusz síkba hozzuk (= kép konjugált sík)
6. a kondenzor centrálása: a kondenzor centráló csavarok segítségével a kondenzor lencsét középre hozzuk -> látótér egyenletes megvilágítása
7. mezőrekesz kinyitása $\sim 1/3$ átmérővel tágabbra, mint az objektív látótére

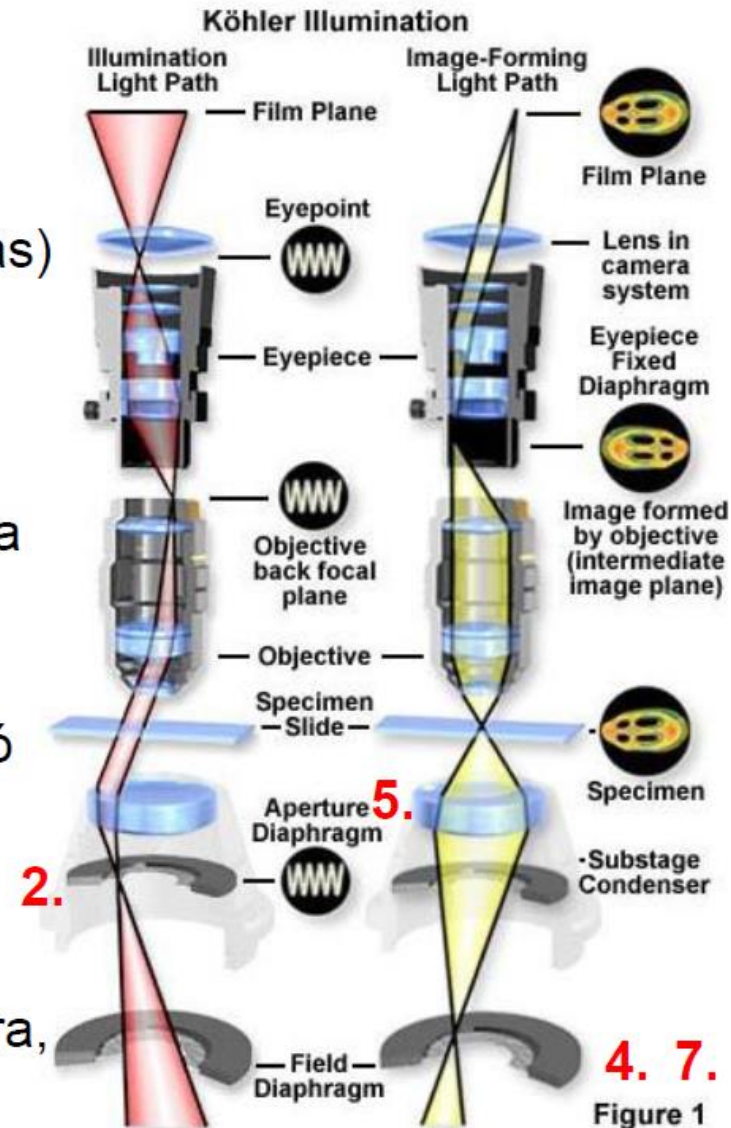
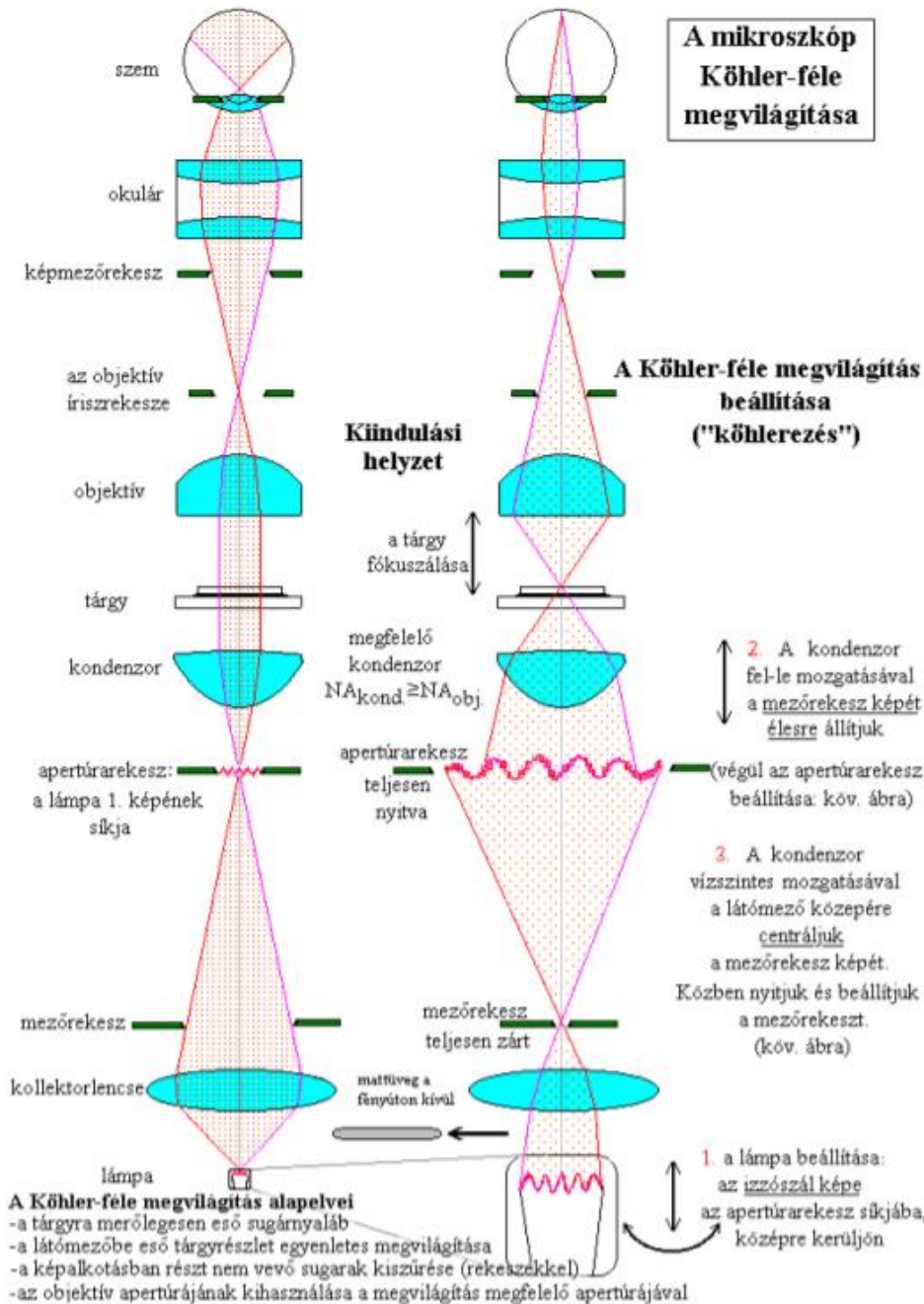


Figure 1

<http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/transkohler.html>

<http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/kohlerjava.html>

A mikroszkóp Köhler-féle megvilágítása



A Köhler-féle megvilágítás alapelvei

- a tárgyra merőlegesen eső sugárnyaláb
- a látómezőbe eső tárgyresztlet egyenes megvilágítása
- a képalkotásban részt nem vevő sugarak kiszűrése (rekeszekkel)
- az objektív apertúrájának kihasználása a megvilágítás megfelelő apertúrájával

Kontrasztfokozó eljárások

Süllyesztett kondenzor, szűkített kondenzorblende - információvesztés

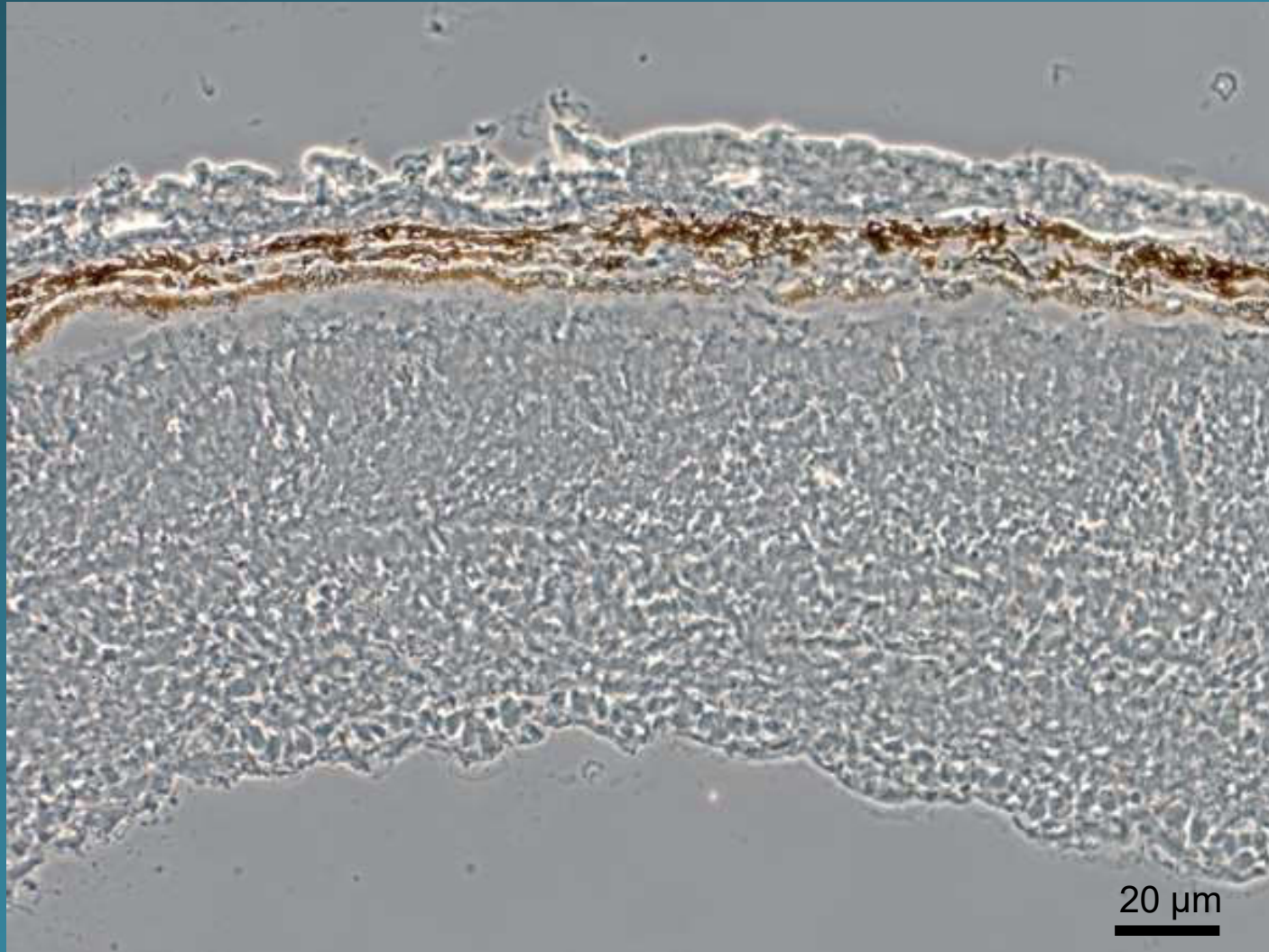
Fáziskontraszt: a fáziskülönbséget amplitudó különbséggé alakítja

Natív, festetlen, kis kontrasztú készítmények vizsgálatára

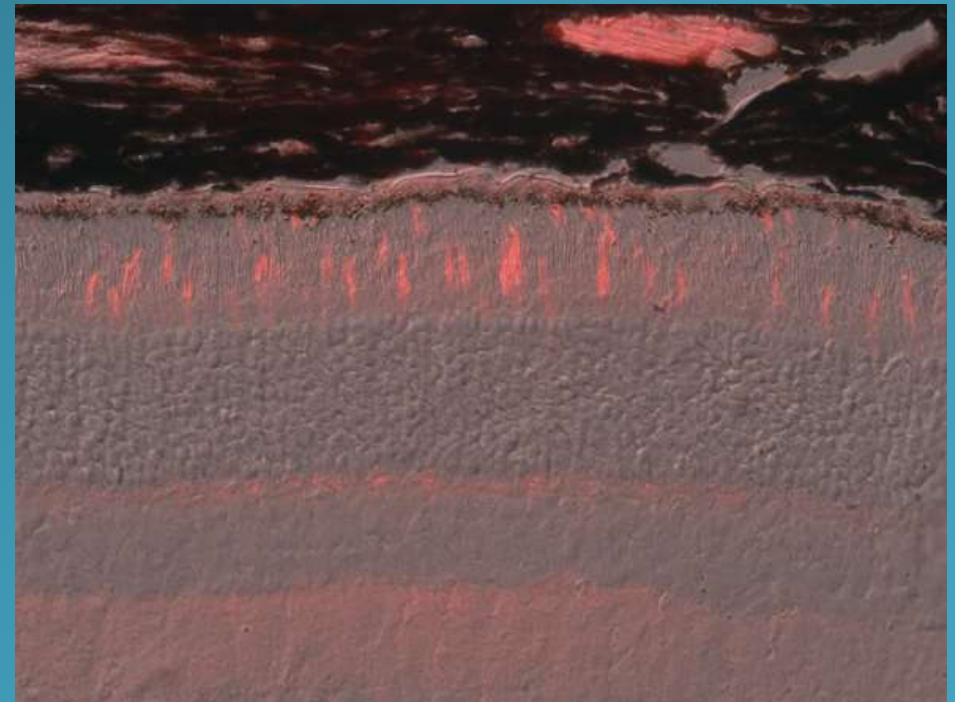
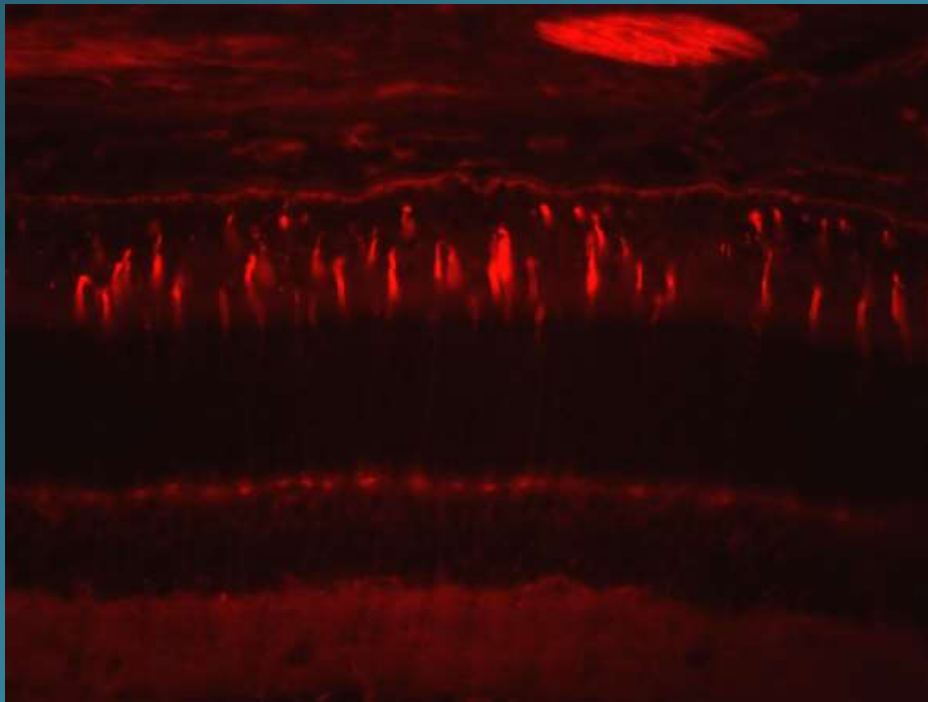
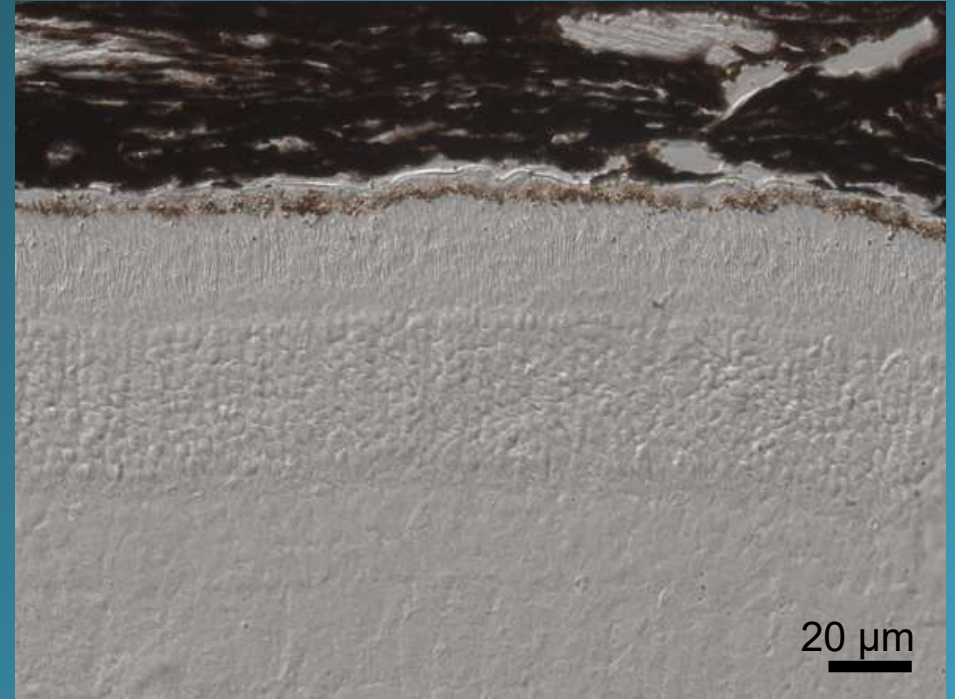
DIC: diferencia interferencia kontraszt (Nomarski optika)

Pseudotérhatású kép

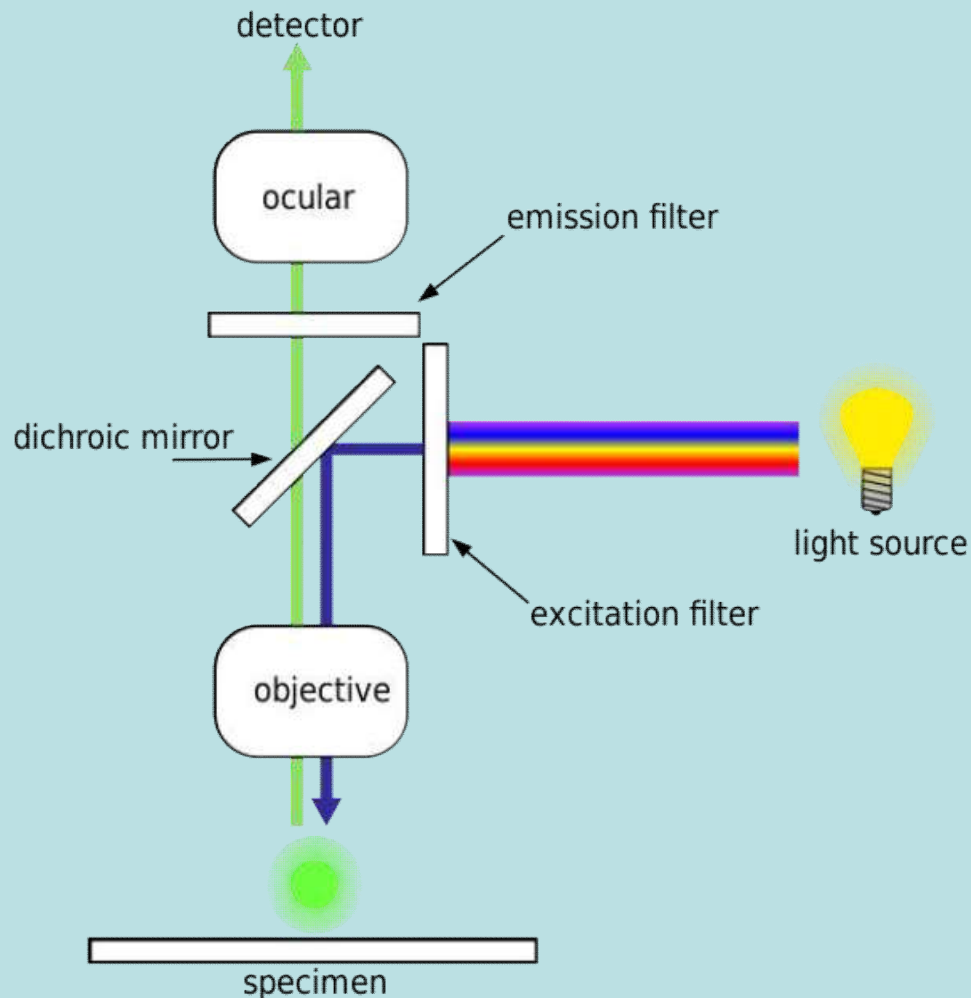
Fáziskontraszt mikroszkópia



DIC



Fluoreszcens mikroszkópia



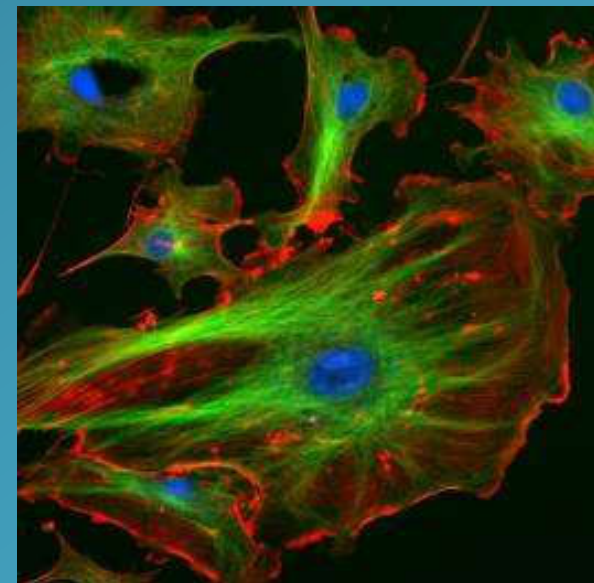
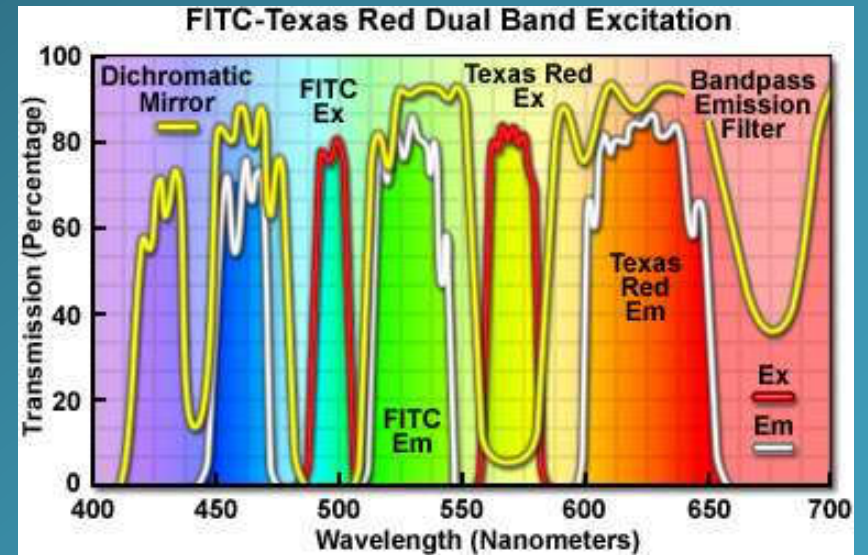
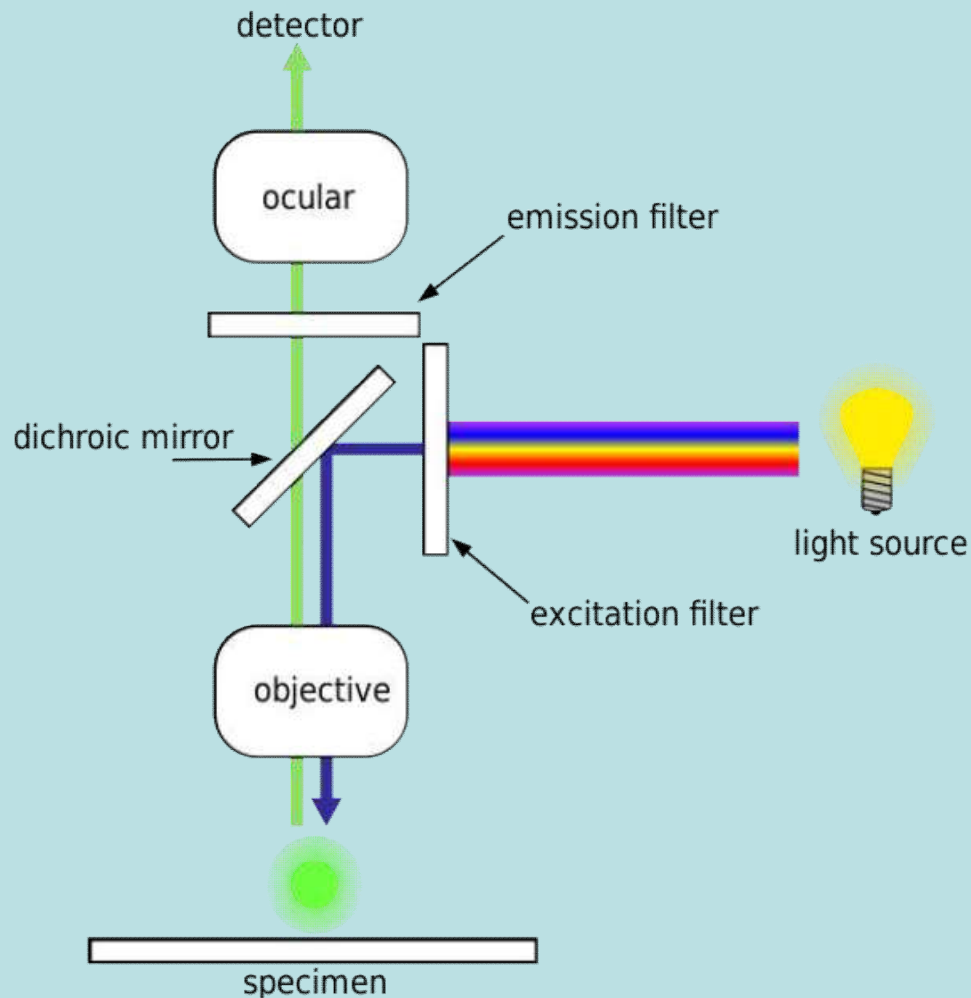
Nagyobb energiájú (alacsonyabb hullámhosszú) gerjesztő fény – UV-lámpa, LED, laser

Magasabb hullámhosszon emittált fény

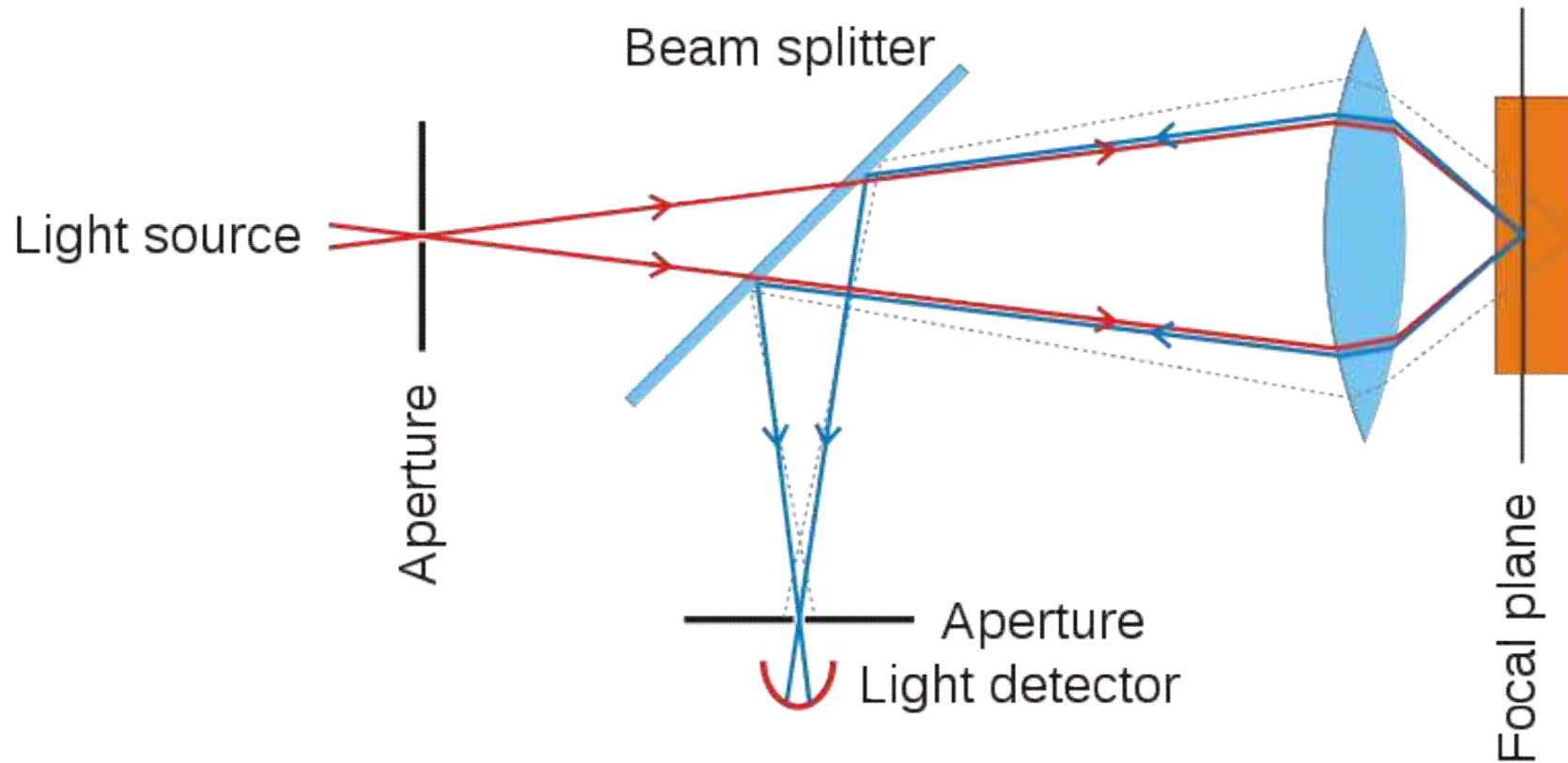
Szűrőrendszerek

Féligáteresztő tükör

Fluoreszcens mikroszkópia



Konfokális mikroszkóp



Confocal, laser-scanning microscope

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

A detektor csak az adott fókuszsíkból érkező fényt érzékeli (optikai szeletek)

Confocal and Widefield Fluorescence Microscopy

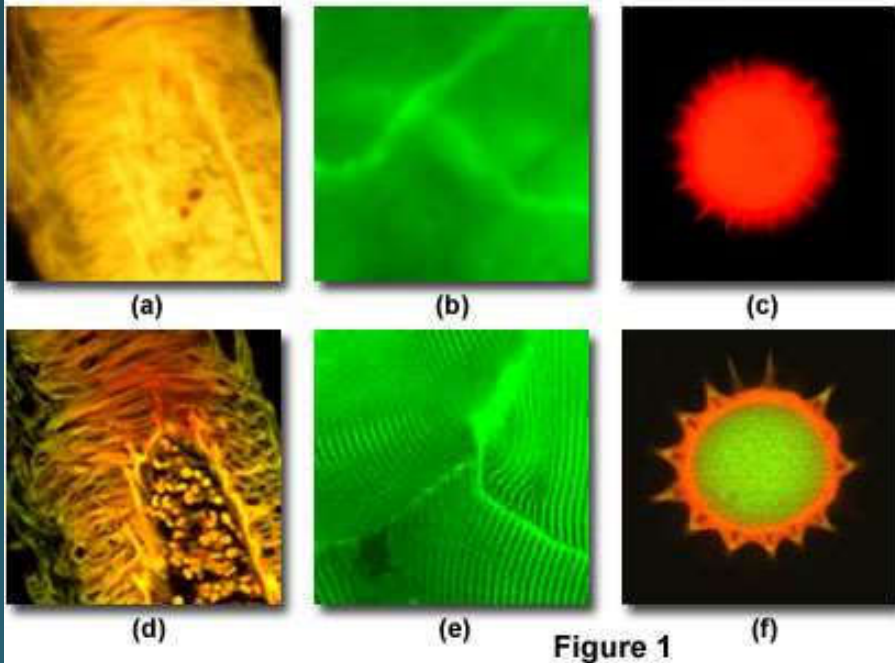


Figure 1

Three-Dimensional Volume Renders from Confocal Optical Sections

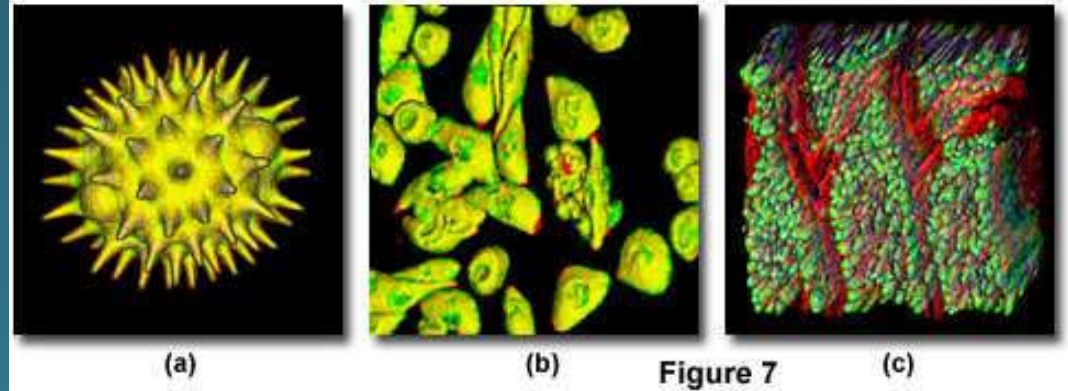


Figure 7

Pollen Grain Serial Optical Sections by Confocal Microscopy

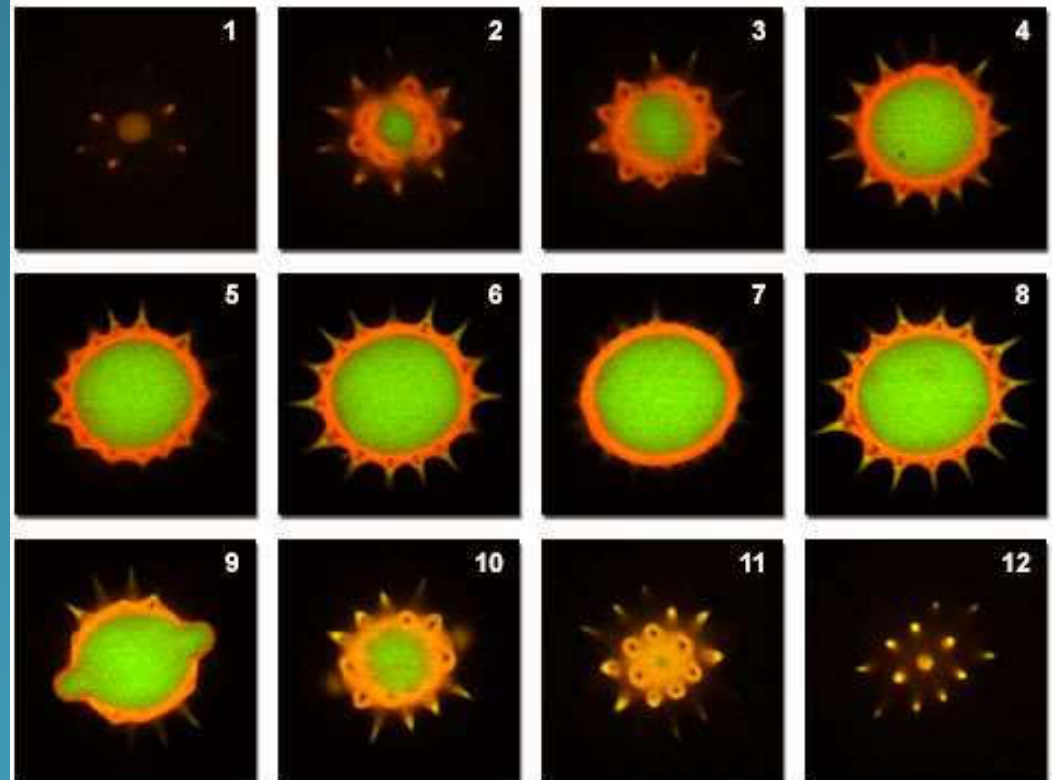
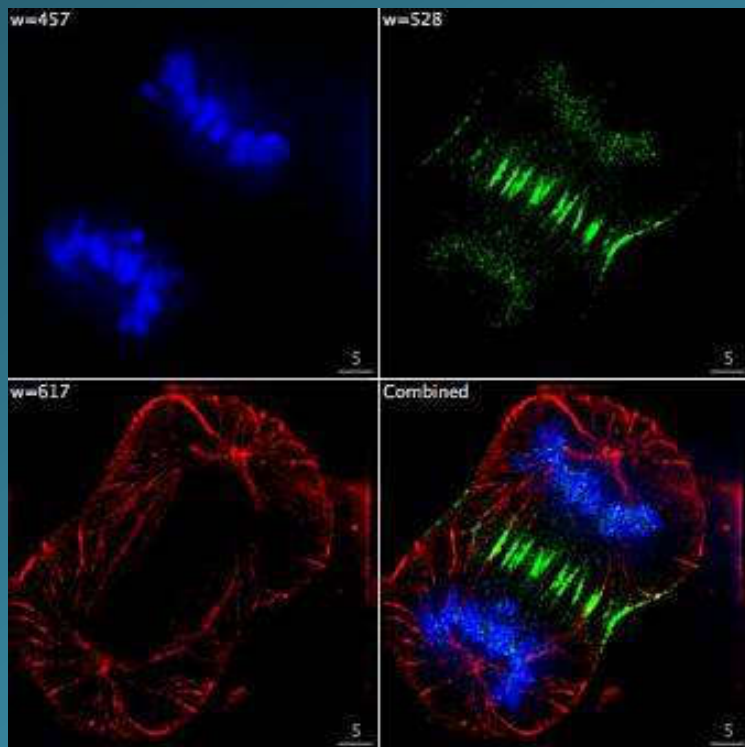
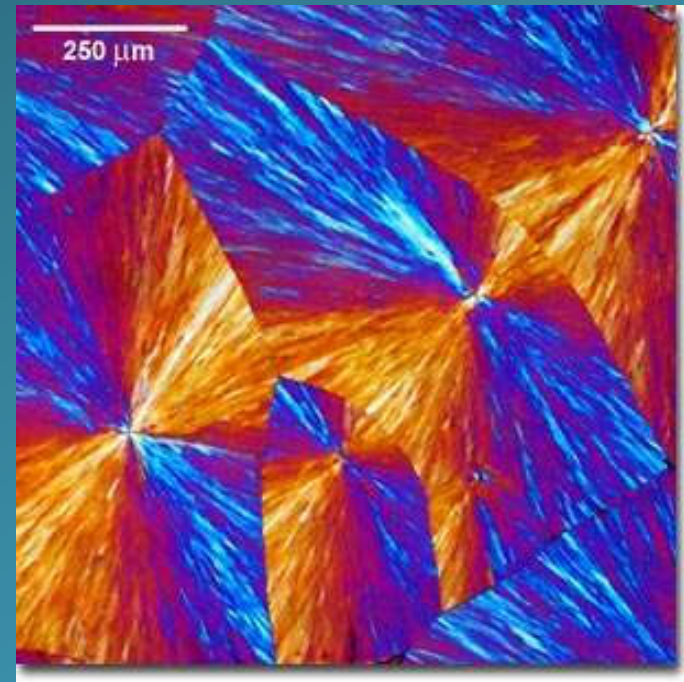
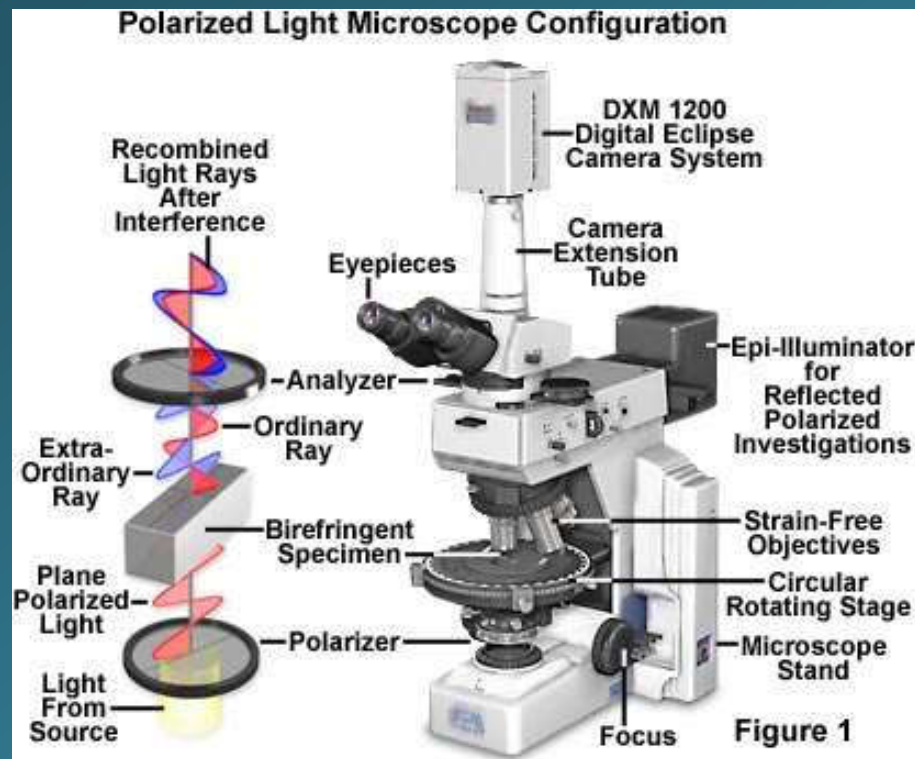


Figure 6



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



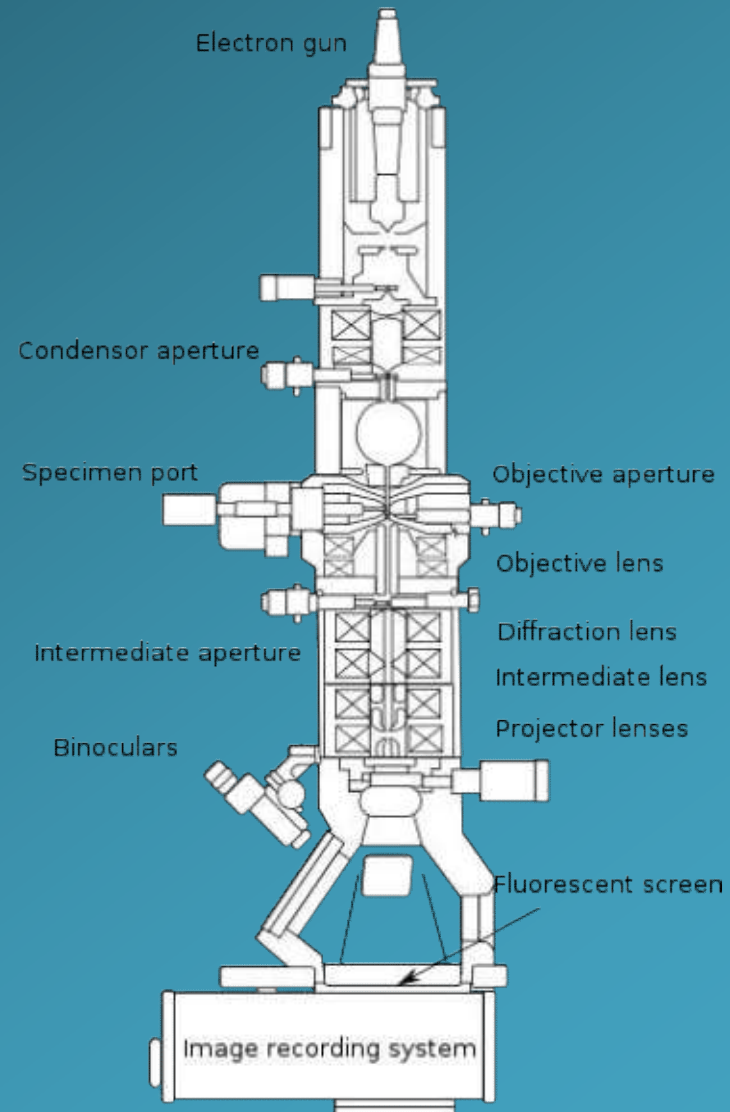
Két objektív, két okulár (14-16°): sztereo kép

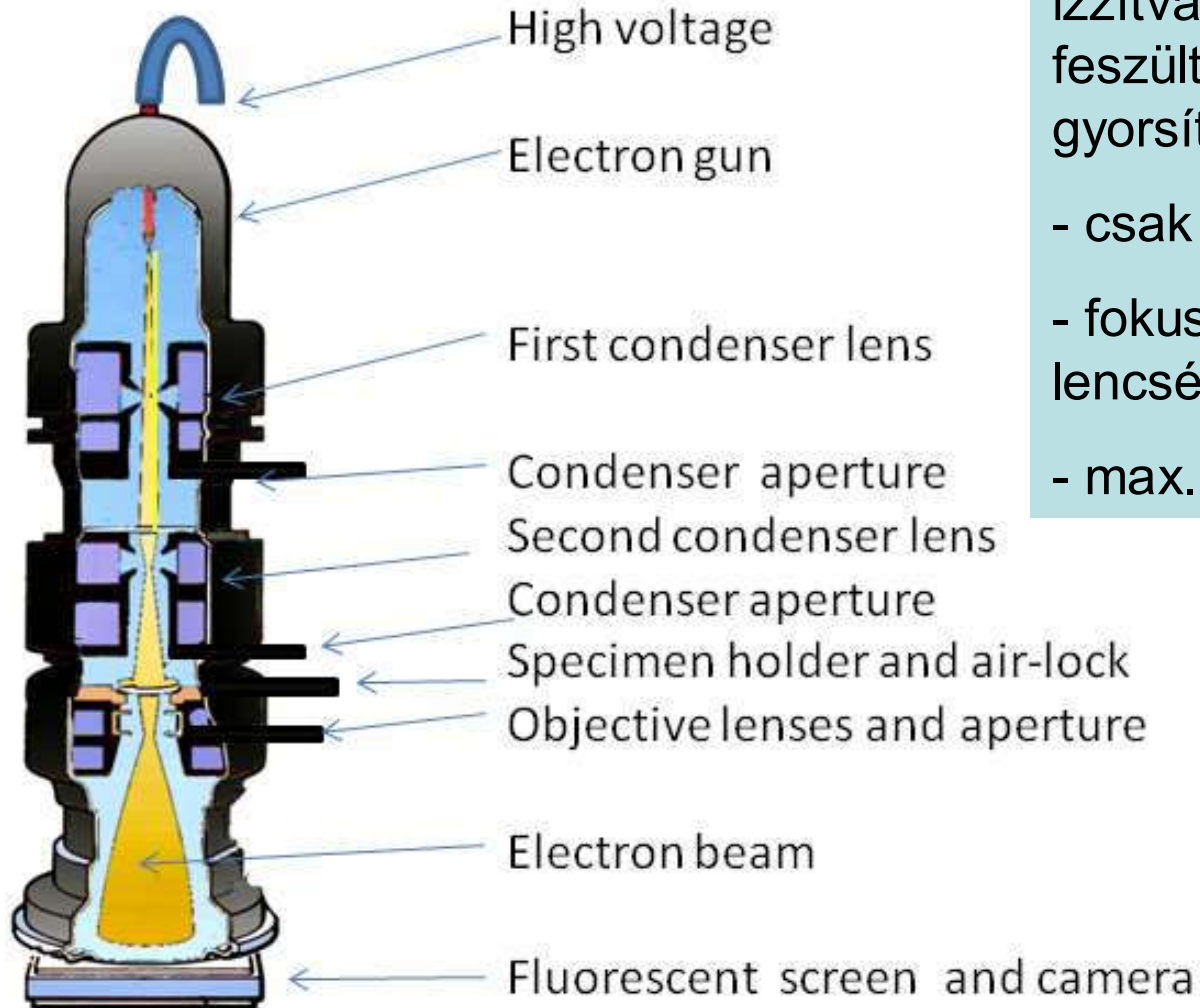
Viszonylag kis nagyítás

Oldalhelyes (nem fordított kép)

Preparáláshoz ideális

Transzmissziós elektronmikroszkóp

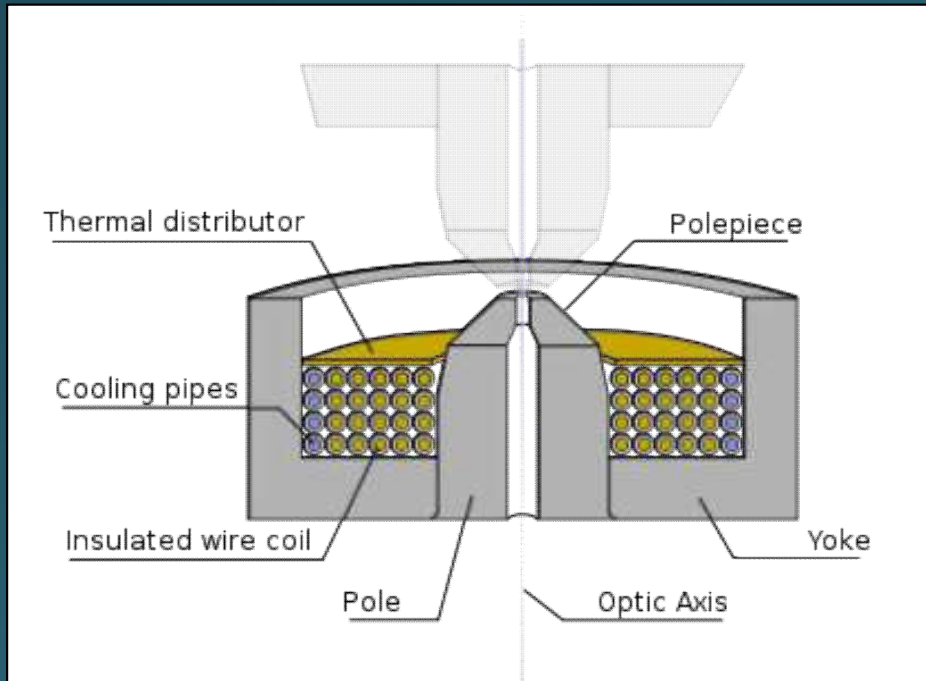




Transmission Electron Microscope

Felépítése hasonlít a fénymikroszkópokéhoz de:

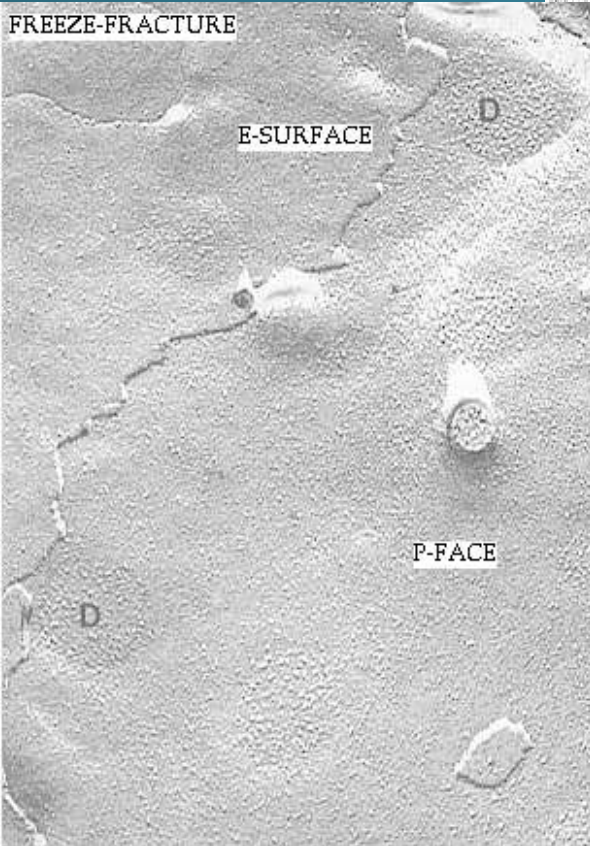
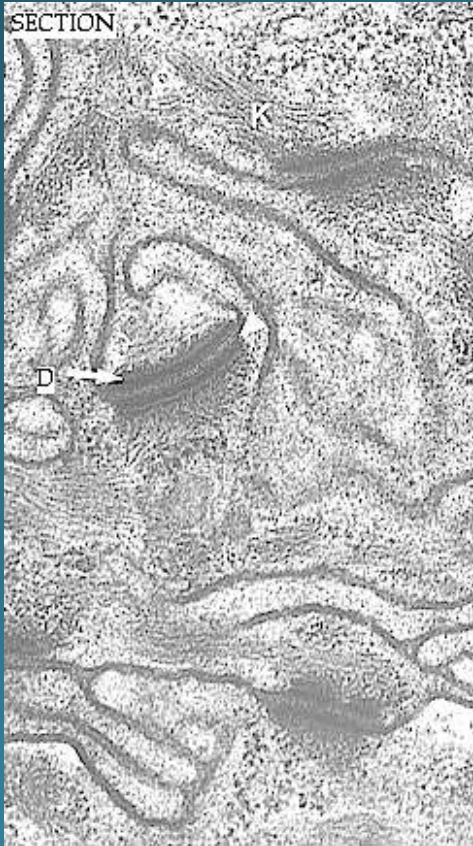
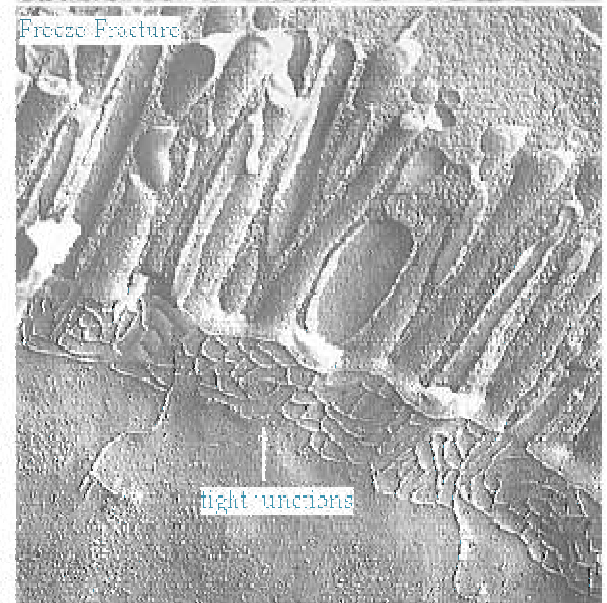
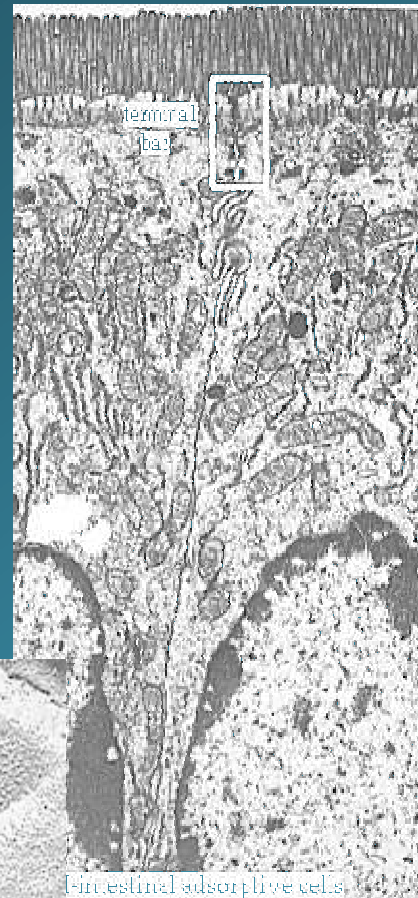
- elektronokat használ (wolframszálat izzítva nyerhetjük - katód), amelyet feszültségkülönbséggel (80-120KV) gyorsítunk az anód felé (hullámhossz)
- csak vákuumban!
- fókuszálni elektromágneses lencsékkel lehet
- max. feloldódéposság: 0.1nm



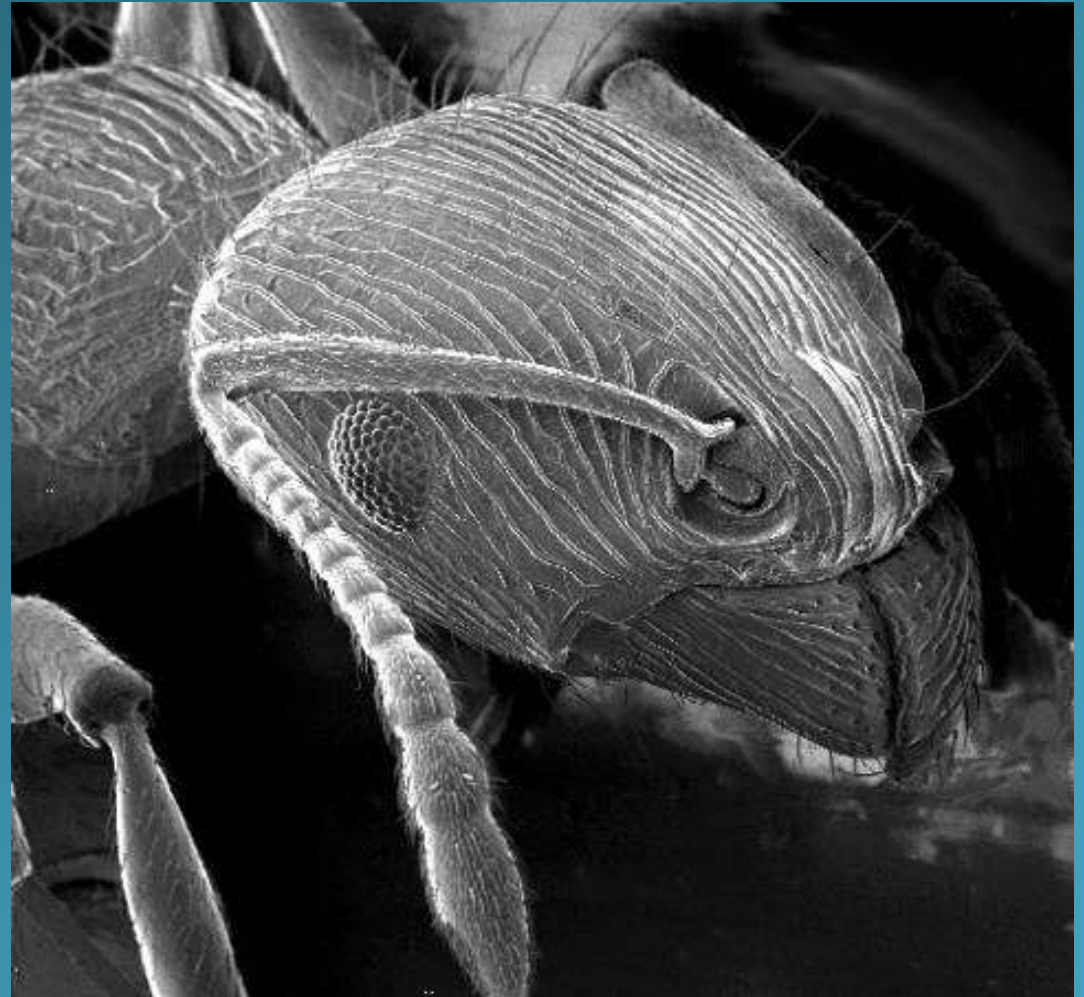
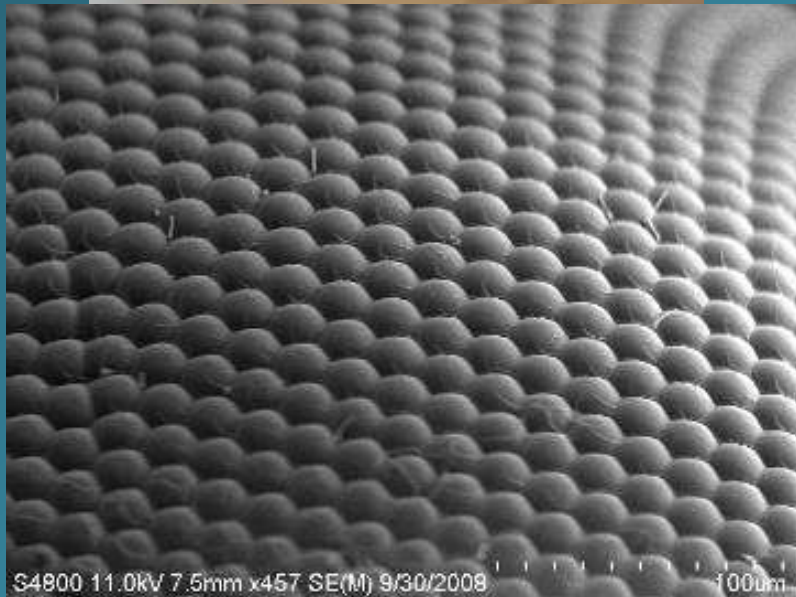
A tárgyon áthaladó elektronok egy része szóródik, ezeket egy blende kirekeszti a képalkotásból, helyükön a képen sötét foltok láthatók. (electron dense struktúrák – félrevezető elnevezés)

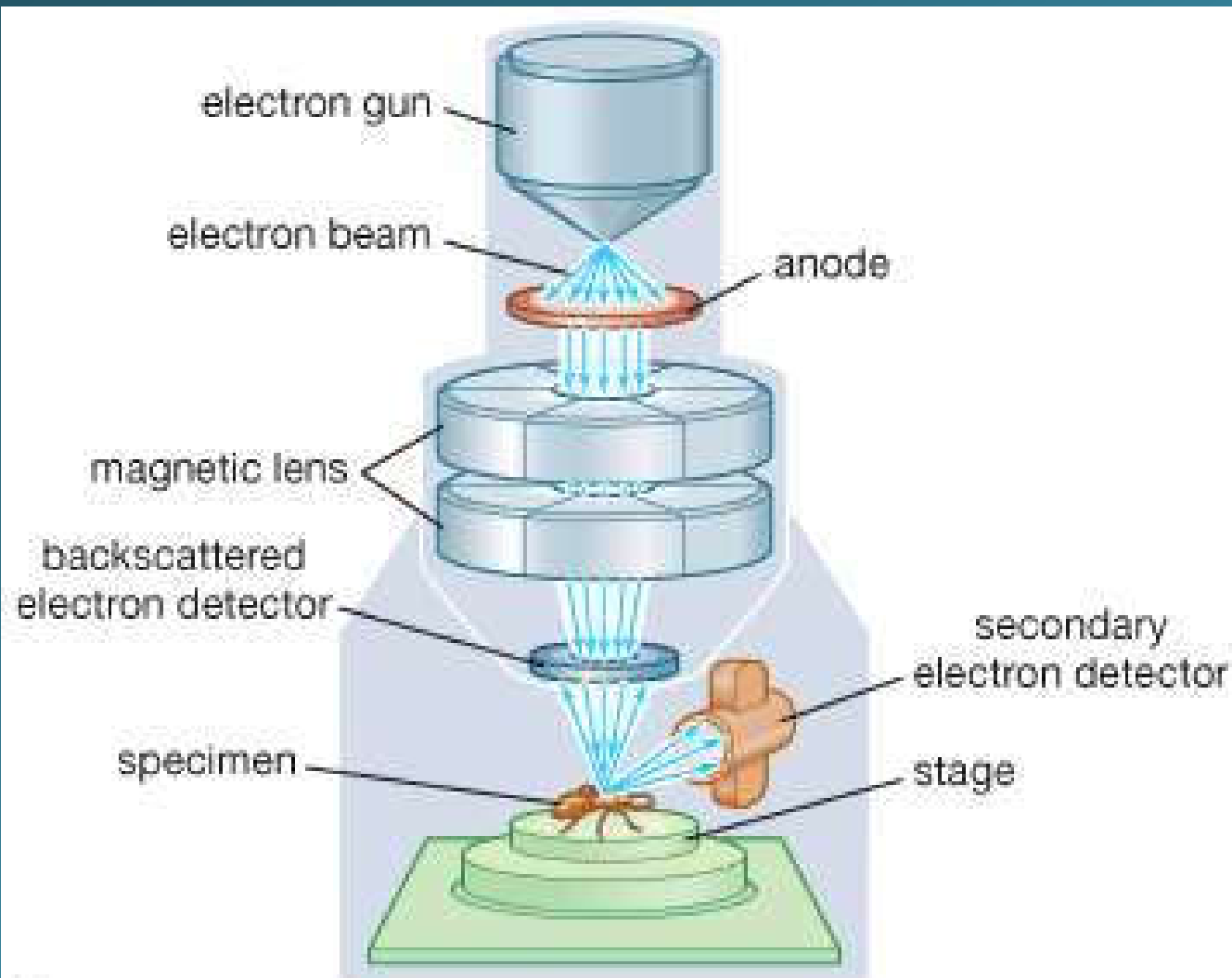
A magasabb atomszámú elemek jobban szórják az elektronokat, ezek kontrasztfokozásra felhasználhatók (ozmium, arany, ezüst, ólom, urán)

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

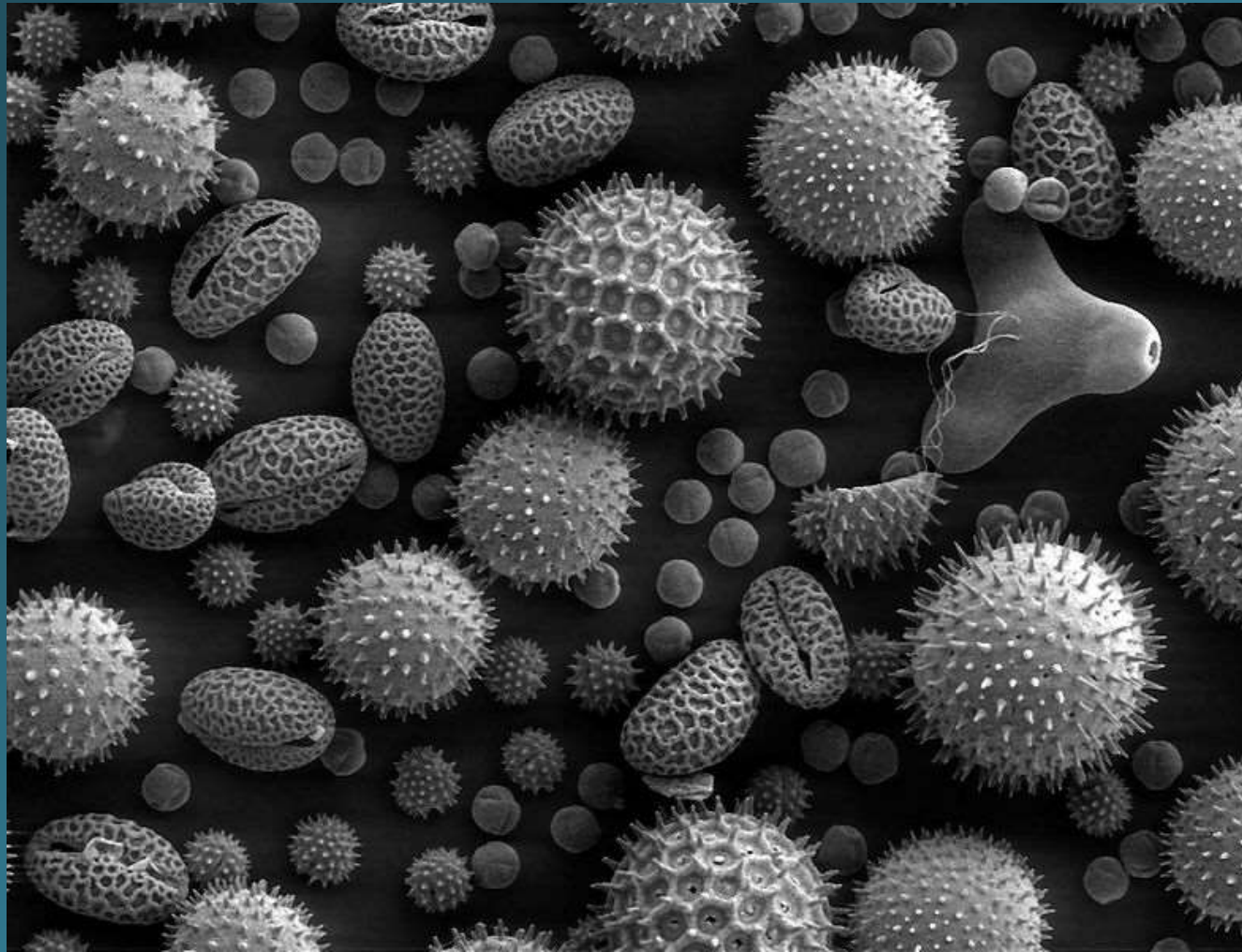


Pásztázó elektronmikroszkóp





© 2008 Encyclopædia Britannica, Inc.



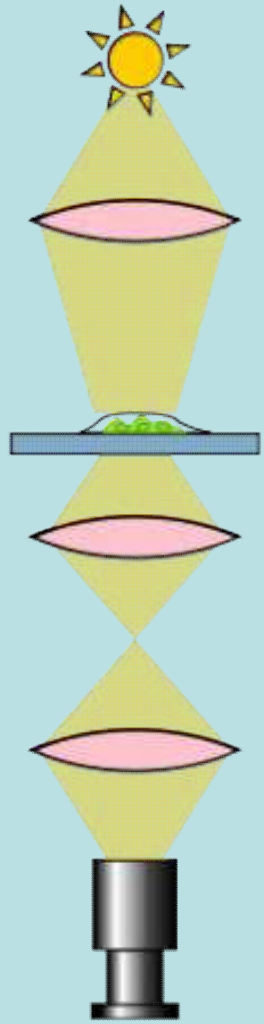
Fókuszált elektronnyalábbal tapogatójuk le a tárgy felületét

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

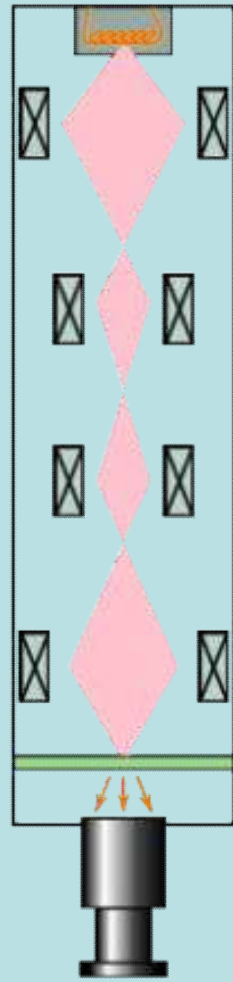
A felületről ad információt

Microscopes

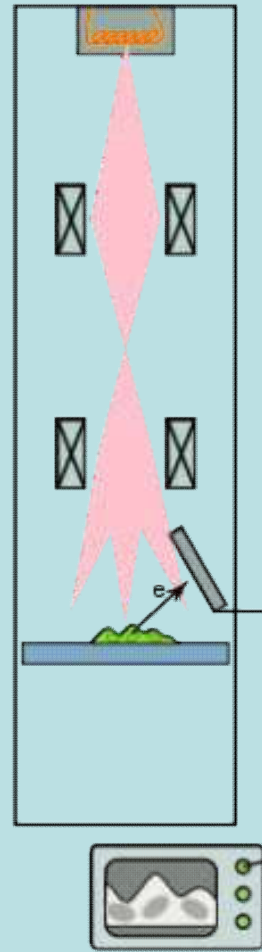
Optical



TEM

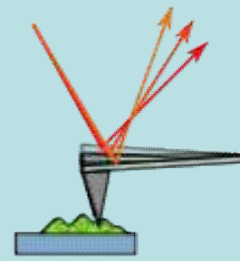


SEM

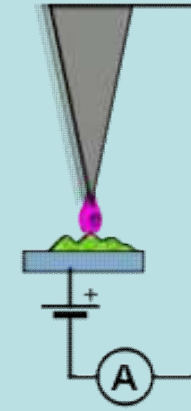


SPM

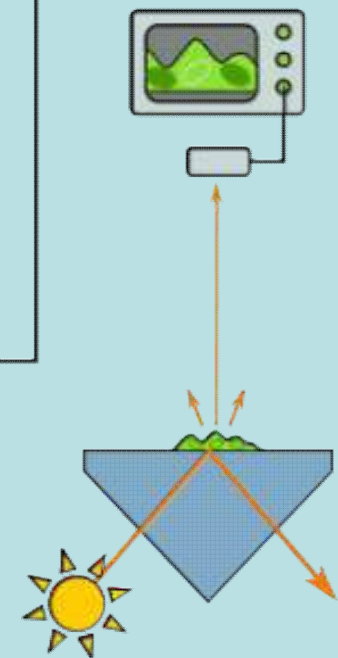
AFM



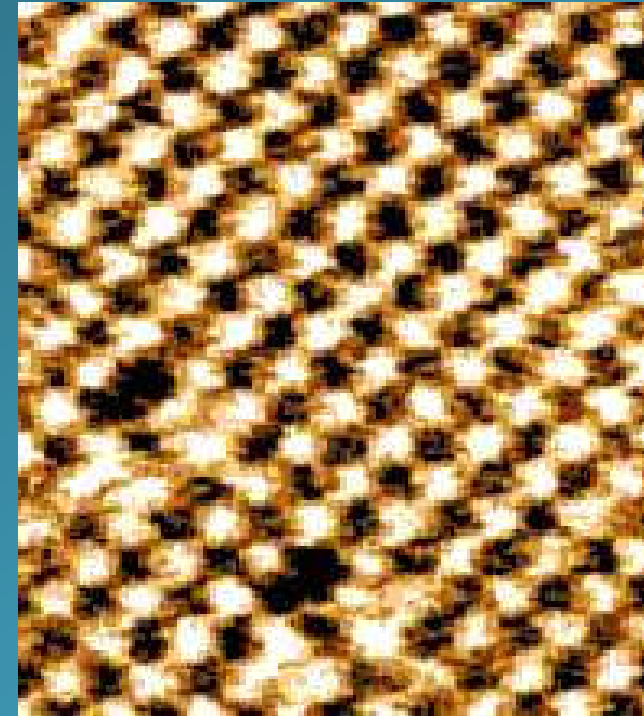
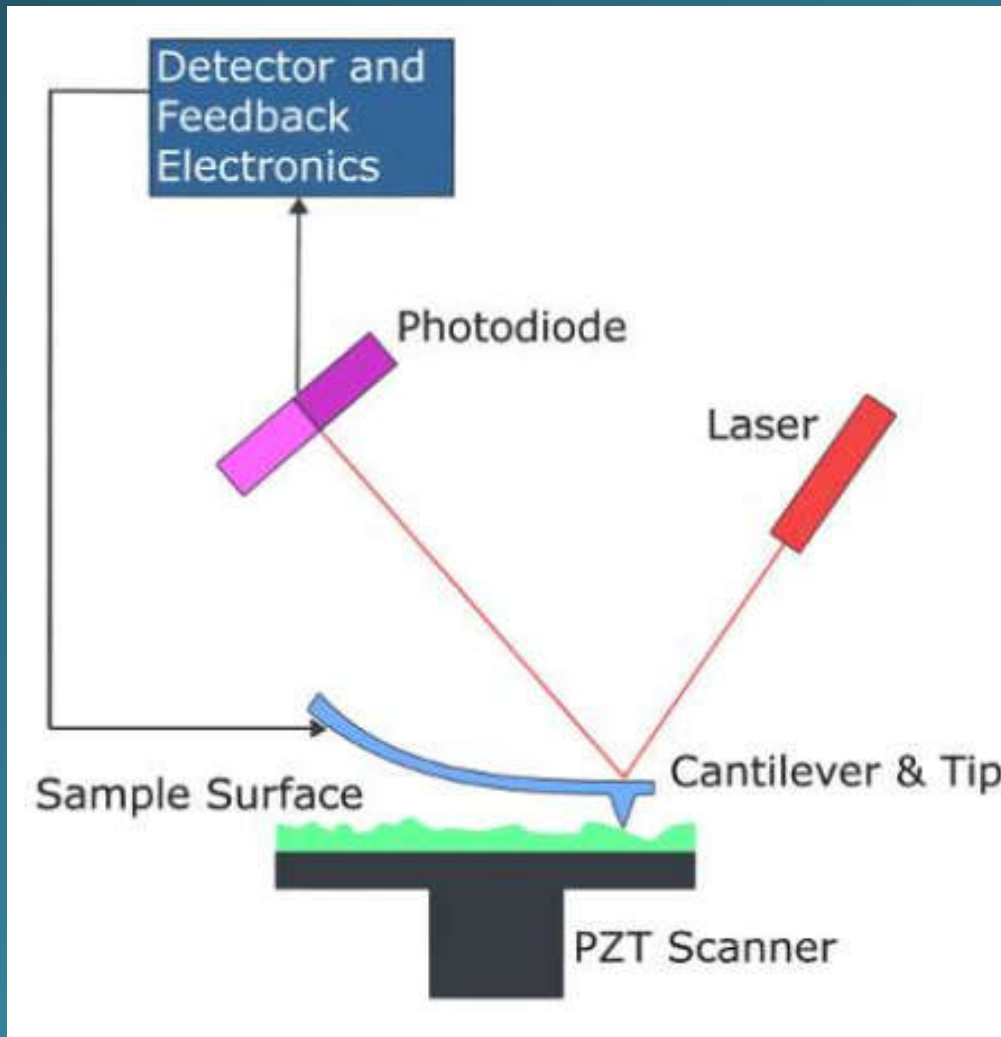
STM



SNOM



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

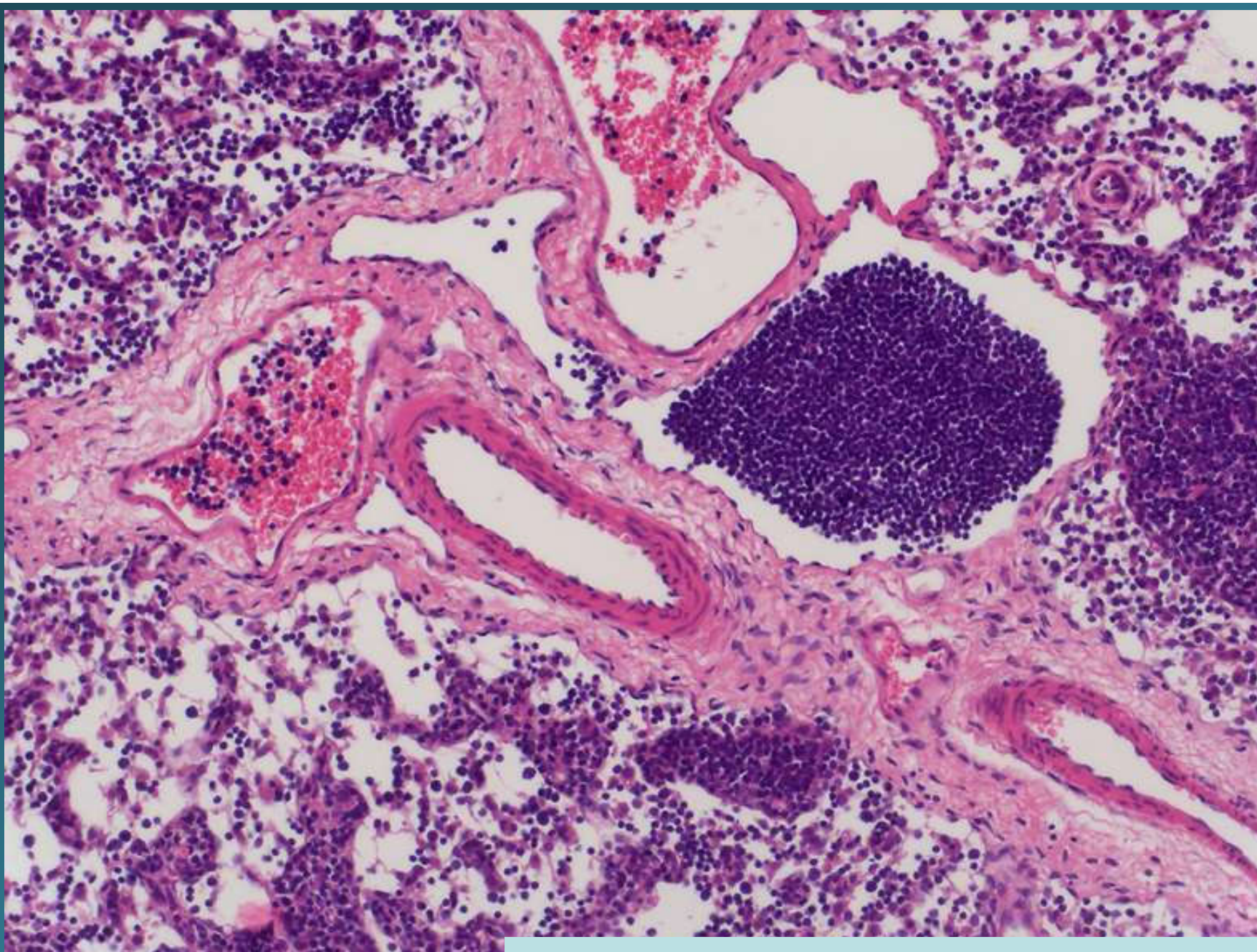
Rendkívül sokféle létezik

eg: hematoxin-eozin (leggyakoribb)

azan (kollagén rostok a kötőszövetben)

orcein (elasztikus rostok)

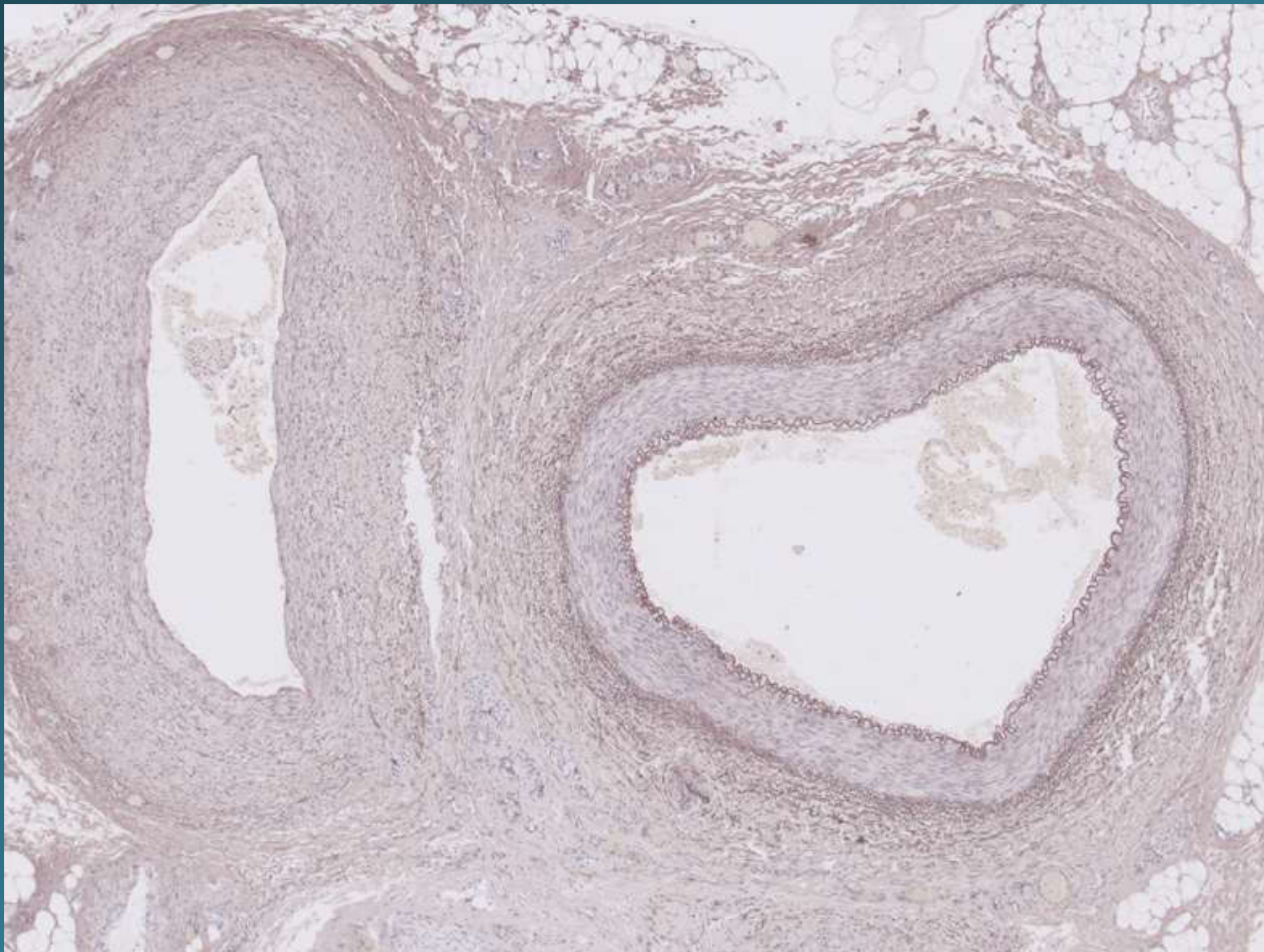
immuncitokémia etc.



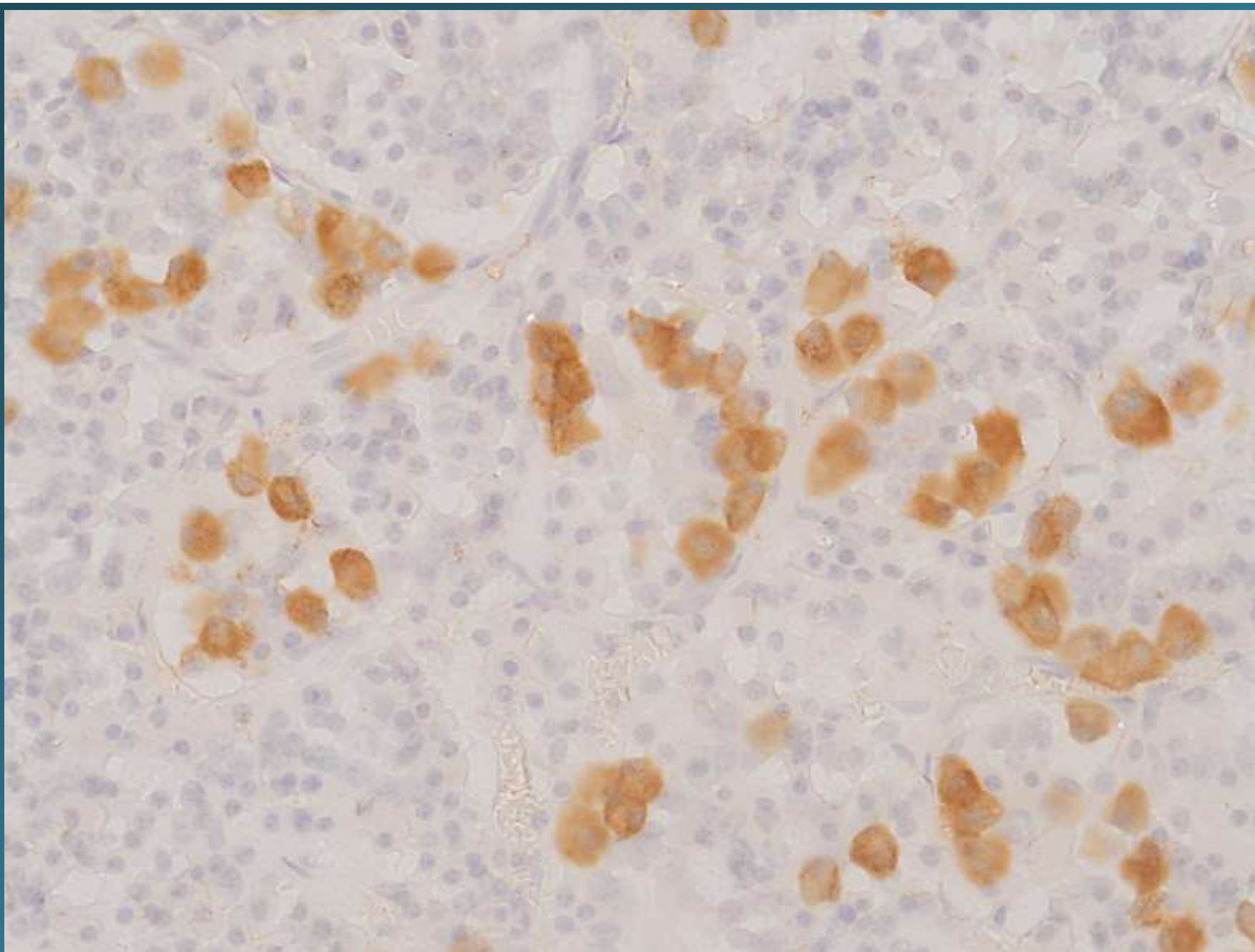
Nyirokcsomó - hematoxin-eozin festés

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>