Optická (světelná) mikroskopie - [OM]

(Charlie Maslen, Jindřich Kropáček)

1. Úvod

Optická (světelná) mikroskopie je jednoduchá zobrazovací metoda, která nachází široké uplatnění v průmyslových, výzkumných a klinických laboratořích právě pro svou relativní nenáročnost na přístrojové vybavení a snadné ovládání. Slouží pro zobrazení a hlavně zvětšení (přiblížení) širokého spektra barevných i nebarevných materiálů (rostlinné a živočišné buňky, horniny, vlákna, polymery, stavební materiály, různé lékové formy atd.). Dále se může využívat například v mikrofluidice nebo při sledování pohybu částic v kapalině.

2. Teorie

Optický mikroskop umožňuje rozeznat struktury, které nejsou viditelné pouhým okem. Skládá se z osvětlovací části (zdroj světla, kondenzor, clona), mechanické části (podstavec, stojan a stolek s křížovým posunem) a optické části - objektivů a okulárů (monokulár nebo binokulár). Klasické mikroskopy mají sadu objektivů nad vzorkem, ovšem existují také tzv. invertované mikroskopy, které mají objektivy pod vzorkem, ty jsou vhodné hlavně pro pozorování biologických vzorků, např. buněčných kultur. K zobrazení se využívá viditelná část spektra (o vlnové délce 420 – 760 nm). Světelný mikroskop umožňuje zvětšit obraz vzorku až tisíckrát a rozlišit detaily až na úrovni 0,2 µm. Toto omezení je dáno vlnovou povahou světla, tedy ani v případě použití kvalitnějších či větších čoček se rozlišovací schopnost nezlepší. Pro kvalitní zobrazení preparátu je potřeba, aby jím procházelo světlo, které se dále soustředí na vzorek pomocí kondenzoru a při použití vhodné kombinace čoček se obraz zaostřuje na úroveň oka. Objektiv tvoří soustava čoček s velmi krátkou ohniskovou vzdáleností, která vytváří skutečný, převrácený a zvětšený obraz objektu, ten se promítá mezi ohnisko okuláru a okulár. Okulárem je pak tento obraz pozorován zdánlivě zvětšený. Výsledný obraz je tedy zdánlivý, zvětšený a převrácený.

Rozlišovací schopností mikroskopu se rozumí vzdálenost dvou bodů (a), které mikroskop zobrazí jako dva samostatné body. Je dána zářením, kterým objekt osvětlujeme, a vlastnostmi objektivu. Obecně platí, že není možné rozlišit body bližší než polovina vlnové délky záření (λ). Minimální vzdálenost, kdy lze rozlišit dva body se pak spočítá jako

$$a = \frac{0.61.\lambda}{n.sin(\alpha)} \tag{1}$$

kde n je index lomu prostředí před objektivem a α je polovina otvorového úhlu kužele paprsků, které mohou vstoupit do objektivu. Rozlišovací schopnost mikroskopu je také omezena množstvím světelných paprsků, které mohou vstoupit do objektivu (světelností).

Numerická apertura (NA) je jedna ze základních charakteristik objektivu a její hodnota je na objektivu přímo uvedena. Jedná se o schopnost objektivu zachytit co nejširší kužel paprsků, které procházejí objektem

$$NA = n.sin(\alpha) \tag{2}$$

Zvětšení (Z) světelného mikroskopu je násobkem zvětšení objektivu a okuláru

$$Z = d/f_{\rm objektiv} \cdot 250/f_{\rm okulár},$$
(3)

kde *d* je délka tubusu (vzdálenost objektivu a okuláru; délka tubusu je obvykle kolem 170 mm) a *f* je ohnisková vzdálenost. Většinou se místo ohniskově vzdálenosti na objektivech a okulárech uvádí přímo jejich zvětšení. Maximální užitečné zvětšení tedy závisí na rozlišovací schopnosti objektivu a rovná se asi tisícinásobku NA.

Optický mikroskop umožňuje měřit s několika různými kontrastními metodami. Mikroskop používaný v této úloze nabízí následující metody:

<u>Světlé pole (Bright Field, BF)</u>: Zobrazení preparátů ve světlém poli patří mezi základní a nejjednodušší zobrazovací metody. Světlo prochází vzorkem nebo je od něj odraženo, při tom nejsou měněny jeho vlastnosti použitím polarizačních nebo jiných filtrů. Používá se u barevných nebo přirozeně pigmentovaných preparátů s vysokým kontrastem.

<u>Tmavé pole (Dark Field, DF)</u>: Zobrazování vzorků v tmavém poli zvyšuje kontrast snímaného objektu, a proto je vhodné pro průhledné nebarevné preparáty, např. živé buňky. Mikroskopování v tmavém poli je umožněno blokací středového světelného paprsku, vzniká dutý kužel světla, který prochází spíše okolím kuželu než kuželem samotným. Je ideální pro zobrazení obrysů, hran, hranic a gradientu indexu lomu, ale nepodává obsáhlé informace o vnitřní struktuře vzorku.

<u>Polarizátor</u>: Lineární polarizační filtr propouští jen světlo kmitající v jedné rovině, tzv. polarizované světlo. Většina pevných látek má optické vlastnosti, které mění orientaci dopadajícího polarizovaného světla. Toho je využíváno pro zjištění informací o struktuře a složení materiálu, např. sferulity u polymerů, složení materiálů nebo anizotropních systémů (příčně pruhovaný sval, minerály, škrobová zrna).

<u>Diferenciální interferenční kontrastní mikroskopie (DIC)</u>: DIC mikroskopie je technika fázového kontrastu, která využívá změn v indexu lomu pro zviditelnění průhledných struktur. Spočívá ve využití gradientu změny délky optické dráhy, který poskytuje vysoký kontrast a efekt zobrazení ve 3D. Zobrazením preparátu pomocí technikou DIC je kontrast tvořen výhradně optickými jevy. DIC je ideální pro nebarvené živé vzorky, např. buněčné kultury, embrya atd. Je nutno ho používat v kombinaci s polarizátorem.

<u>Fluorescenční mikroskopie</u>: Ozářením fluoreskujících látek světlem o patřičné vlnové délce dojde k jejich excitaci a k následnému návratu na původní energetickou hladinu. Tento návrat doprovází emise fotonu o vyšší vlnové délce, než byla ta excitační (díky částečné ztrátě energie).

Emitované záření je pak detekováno. Tato technika je využívána především v mikrobiologii pro pozorování proteinů nebo nukleových kyselin.

2.1. Velikost částic a tvarové faktory

Částice jsou velmi malé části hmoty s charakteristickými vlastnostmi (velikost, hmotnost, elektrický náboj atd.). A právě velikost je jedním z nejdůležitějších parametrů, který se u částic určuje. Mírou velikosti částic je lineární rozměr neboli délka [m]. Velikost je tedy jednoznačně definovaná pro kulovité částice, které odpovídají průměru (resp. poloměru). Částice mají málokdy kulový tvar, proto se u nich určují tzv. tvarové faktory. To jsou odvozené průměry, které jsou určeny měřením vybrané vlastnosti závislé na velikosti částic a vztažením této vlastnosti na vybranou lineární dimenzi. Nejčastěji se používají ekvivalentní průměry různých typů (např. objemový, povrchový nebo hydrodynamický ekvivalentní průměr).

Pro charakterizaci tvaru a velikosti částic můžeme použít sítovou analýzu, metody založené na ohybu a rozptylu světla (laserová difrakce, dynamický rozptyl světla) nebo mikroskopické metody s užitím obrazové analýzy. Při použití optické mikroskopie se pro vyjádření průměru disperzních částic nepravidelného tvaru nejčastěji používají ekvivalentní průměr, Martinův a Feretův průměr.

<u>Ekvivalentní průměr</u> je roven průměru kruhu o stejné ploše jako je plocha průmětu sledované částice (Obr. 1a).

<u>Martinův průměr</u> je roven délce čáry, která půlí plochu průmětu disperzní částice. Směr, kterým je vedena dělicí čára, je libovolný, ale musí být stejný u všech proměřovaných částic (Obr. 1b).

<u>Feretův průměr</u> je roven vzdálenosti bodů, v nichž se dvě paralelní tečny dotýkají obvodu průmětu částice. Směr, kterým jsou vedeny tečny, musí být stejný u všech proměřovaných částic (obr. 1c).



Obr. 1: Znázornění definice a) ekvivalentního průměru; b) Martinova průměra a c) Feretova průměru částic.

2.2. Sferulity

Sferulity (Obr. 2) jsou sférické semikrystalické regiony uvnitř nerozvětvených lineárních polymerů. Vznik sferulitů je ovlivněn několika parametry, např. počtem nukleačních míst, strukturou polymerního řetězce, rychlostí chlazení taveniny atd. Mohou být veliké od několika mikrometrů až po milimetry. Sferulity se skládají z vysoce uspořádaných lamel a díky tomu mají

semikrystalické polymery vyšší hustotu, tvrdost a křehkost než neuspořádané amorfní polymery. Ve vzorku polymeru mohou být pozorovány optickým mikroskopem za využití polarizačního filtru.



Obr. 2: Sferulity v polyethylenglykolu zobrazeny v polarizovaném světle.

3. Cíl práce

Vypočítejte distribuci velikosti křemičitých částic. Stanovte ekvivalentní a Feretův průměr částic nepravidelných tvarů. Určete rovněž jejich kruhovitost a v závěru okomentujte naměřené výsledky.

4. Popis zařízení

4.1. Mikroskop Nikon ECLIPSE Ti2-U

V laboratořích je k dispozici optický mikroskop Nikon ECLIPSE Ti2-U (Obr. 3), který disponuje širokou řadou možností nastavení a zobrazení preparátů. Sestává se z binokuláru, sady výměnných objektivů pro zvětšení (4X, 10X, 20X, 40X a 100X). Mikroskop má posuvný pracovní stolek v osách XYZ, přičemž osy XY mohou být motorizované, episkopické osvětlení (200W rtuťová lampa), kostky s filtry pro epifluorescenční snímky, černobílou kameru, která může přenášet obraz do programu IC Capture. Vzorek lze sledovat buď pomocí binokuláru, nebo kamerou, nikoli však oboje současně.



Obr. 3: Schéma mikroskopu Nikon ECLIPSE Ti2-E s popiskami jednotlivých komponent.

4.2. IC Capture

IC Capture je software sloužící k pozorování obrazu, snímání obrazů, snímání sekvence obrazů nebo videa. Umožňuje základní funkce jako je sejmutí obrazu, jeho uložení, nastavení kamery, ROI (oblast ve které je obraz zaznamenáván) atd. Dále umožňuje nastavení doby expozice, automatickou expozici, gain, nastavení jasu, kontrastu, ostrosti, gama korekce atd. Umožňuje nastavit rozlišení, bitovou hloubku obrazu, případně FPS snímaného videa nebo sekvence. Na Obr. 4 je zobrazeno základní pracovní rozhraní. Stejné možnosti ovládání softwaru jsou jak v klasickém menu, tak znázorněny ikonami v příkazové liště.



Obr. 4: Pracovní plocha IC Capture.

4.3. IC Measure

IC Measure je software sloužící podobně jako IC Capture ke snímání obrazu, videa nebo sekvence snímků. Dále umožňuje měření délek, ploch a úhlů jak živého, tak statického obrazu. Tato data pak mohou být exportována v podobě tabulky ve formátu .csv.

4.4. ImageJ

ImageJ je software sloužící ke zpracování a analýze obrazu. Umožňuje základní editace jako například oříznutí, otáčení, překlápění, zoom. Je možné jej využít k měření délce úseček a úhlů. Dále umožňuje úpravy jasu, kontrastu, převod barevného obrazu na černobílý, převod sekvence skenů do 3D objektu. Funkce prahování umožňuje výběr rozsah stupňů šedi, které budou v binární vrstvě černé a které bílé. Užitečné operace s binárním obrazem jsou pak Eroze, Dilatace, Otevření a Uzavření.

Základní přehled funkcí:

Soubor: Uložení, Otevření, Import/Export Obrazu.

Obraz: Kontrast, Otočit, Převrátit.

ROI (Region of Interest) – určení oblasti v obrazu, ze kterého bude brán signál.

Prahování určuje, které pixely budou a které nebudou zahrnuty do binární vrstvy a tím zároveň, které části snímku budou analyzovány. Prahovaný obraz se spravuje řadou úkonů pod záložkou Binární.

Binární: Otevření, Uzavření, Eroze, Dilatace, Vyčištění, Vyhlazení aj.

Měření: Provést měření (pokyn pro změření objektů), Příznaky pro měření objektů (výběr měřených parametrů).

Makro: je funkcí, která umožní k nastavení sledu funkcí, aby uživatel nemusel tyto funkce nastavovat pro každé měření zvlášť.

Eroze: smršťuje vnější a vnitřní hranice černých ploch o velikost jednoho pixelu

Dilatace: přesný opak eroze – hranice černých ploch tedy rozšiřuje

Otevření: funkce ekvivalentní Erozi a následné Dilataci – cílem je zvětšení mezer mezi nevhodně se překrývajícími částicemi

Uzavření: funkce ekvivalentní Dilataci a následné Erozi – spojuje sousedící částice, které mají nevhodné mezery

Analyze particles: měří černé částice bíle oddělené

Užitečné rady

- Pro správné měření rozměrů, je nutné mít zaškrtnuté správné zvětšení v programu IC Measure, které odpovídá použitému objektivu při snímání obrazu. V programu ImageJ je pak nutné zadat velikost pixelu v záložce Analyze -> Set scale (pokud chceme použít stejné měřítko pro více obrazů, je třeba zaškrtnout možnost Global)
- 3. Všechny snímky musí mít vložené správné měřítko.
- 4. Na všechna snímání budete používat světlé pole (BF) nebo fluorescenci.
- 5. Nelze vyhodnocovat předměty, které se dotýkají krajů.

5. Postup práce

5.1. Distribuce velikosti částic

Zapněte napájení mikroskopu (v zadní části nosné konstrukce vedle napájecího kabelu) a spusťte program IC Measure (zástupce na ploše nebo na liště). Na podložní sklíčko naneste vzorek a pečlivě jej rozprostřete. Vložte vzorek na pohyblivý stoleček a zaostřete na hladinu ostrosti při nejmenším zvětšení (4X). Na vzorek se nejprve podívejte binokuláry mikroskopu, poté použijte kameru pro jeho zobrazení na monitoru v IC Measure. Pro přepínání mezi mikroskopem a kamerou se používá otočný knoflík v pravé dolní části těla mikroskopu (viz Obr. 3 vlevo dole). V programu IC Measure stiskněte tlačítko *Microscope* a nastavte zvětšení které používáte. Následně klikněte na *Measurement, 3-Point Circle* a změřte velikosti částic. Pokud budete měnit velikost použitého objektivu, je potřeba změnit měřítko. Pro obrazovou analýzu budete zpracovávat minimálně 100 částic. Nakonec naměřená data exportujte ve formátu .csv.

5.2. Částice nepravidelného tvaru

Při zobrazování částic nepravidelného tvaru postupujte jako v předchozí úloze. Vyhodnocovat budete 10 částic písku. Nejprve částice nasnímejte v programu IC Capture (**Capture** – **Save Image**). Pro vyhodnocení snímků zapněte program ImageJ a otevřete je přetažením na lištu nebo kliknutím na *File – Open*. Snímek poté můžete oříznout na oblast, která vás zajímá nepříklad obdélníkovým výběrem a možností **Image – Crop**. Dále je potřeba převést snímek na Binární kliknutím na **Process – Binary – Make Binary**. Pokud chcete upravit prahy černé a bílé, klikněte na Image – Adjust – Threshold. Následně oddělte překrývající se částice opakovanými operacemi Erode a Dilate, pokud se částice překrývají moc, oddělte je ručně pixelovým perem s bílou barvou. Následně vyplňte mezery – Process – Binary – Fill holes. Možnosti toho, co chcete měřit jsou v záložce Analyze – Set measurements, kde zvolíte Area, Perimeter a Feret diameter. Měření pak provedete kliknutím na *Analyze – Analyze particles*. Následně se zobrazí okno, kde můžete nastavit rozsah velikosti měřených částic (například od 1000 px²), cirkularitu analyzovaných částic (0-1 jelikož jde o částice nepravidelného tvaru). Dále zvolíte Show: outlines, abyste viděli obrysy měřených částic, zaškrtnete display results a exclude on edges. Tabulku vyexportujeme do Excelu pro další zpracování. Výsledná tabulka by měla obsahovat plochu, ekvivalentní průměr, kruhovitost, Max. Feret a Min. Feret.

6. Zpracování výsledků

- 1. Distribuce velikosti částic: ilustrativní obrázek včetně měřítka a popisků, tabulka s naměřenými daty, grafické zobrazení distribuce (histogram) min. 100 částic
- Částice nepravidelných tvarů: ilustrativní obrázek včetně měřítka, tabulka s naměřenými daty, výsledný průměrný tvarový faktor (Ekvivalentní a Feretův průměr).

7. Bezpečnostní pokyny

- 1. Mikroskop lze začít používat až po proškolení laborantem.
- 2. Nepřibližujte se vzorkem těsně k objektivu, můžete ho poškodit.
- 3. Ujistěte se, zda při nastavování objektivu s větším zvětšením, nemůže vzorek v důsledku jeho výšky poškodit objektiv.
- 4. Obecně: se všemi součástky mikroskopu zacházejte opatrně, nikoli hrubou silou.

8. Kontrolní otázky

- 1. Na jakém principu funguje optická mikroskopie?
- 2. Jaké další typy mikroskopů znáte?
- 3. Které typy vzorků lze zobrazit na optickém mikroskopu a do jakého zvětšení?
- 4. Čím je dáno maximální zvětšení optického mikroskopu?
- 5. Co jsou to sferulity a u jakého materiálu je najdeme?
- 6. Vysvětlete pojem numerická apertura. Jaký má vliv na zvětšení preparátu?
- 7. Co je to ekvivalentní průměr a jak ho určíme?
- 8. Které další průměry znáte?
- 9. Jaké znáte kontrastní metody optických mikroskopů?
- 10. Jaké jsou cíle této úlohy?