

Тема урока:

Различие между разрешением и увеличением оптического и электронного микроскопов.

Оптические или световые микроскопы (от греч. $\mu\kappa\rho\sigma$ — “мелкий” и $\sigma\kappa\omicron\lambda\epsilon\omega$ “вижу”) — оптический прибор, предназначенный для получения увеличенного изображения невидимых невооруженным глазом объектов.

Оптическая система микроскопа состоит из основных элементов, как объектив и окуляр. Они прикрепляются к передвижному тубусу, расположенному на металлической основе, в котором имеется предметный стол. Увеличение оптического микроскопа без дополнительных линз между объективом и окуляром равно произведению их увеличения. Все современные микроскопы имеют светосигнальную систему (в том числе ирисовый диафрагмальный конденсор), макро- и микровинты, нормализующие четкость изображения, систему управления состоянием конденсора. В специальных микроскопах по назначению могут использоваться дополнительные устройства и системы.

Световая микроскопия включает обычную просвечивающую микроскопию (светло-, темнопольную), фазово-контрастную, люминесцентную. В последнее время разработаны и другие способы микроскопии и микроскопы — инверсионная и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.

Светлопольная микроскопия позволяет исследовать объекты в проходящем свете в светлом поле. Данный вид микроскопии предназначен для исследования морфологии, размеров клеток, их взаимного расположения, структурной организации клеток и других особенностей. У светового микроскопа максимальная разрешающая способность составляет 0,2 мкм, что обеспечивает высокоточное увеличение микроскопа до 1500х.

Фазово-контрастная микроскопия позволяет более четко наблюдать живые прозрачные объекты, которые имеют коэффициенты преломления, близкие к коэффициентам преломления среды. Действие фазово-контрастного микроскопа основано на интерференции света в плоскости изображения, обусловленной сдвигом по фазе (при использовании фазового кольца в апертурной диафрагме). При фазово-контрастной микроскопии часто применяют биологические микроскопы с обратным расположением оптики — инвертированные микроскопы. У таких микроскопов объективы расположены снизу, а конденсор — сверху.

С помощью *фазово-контрастной микроскопии* изучают форму, размеры, взаимное расположение клеток, их подвижность, размножение, прорастание спор микроорганизмов и т. д. Благодаря применению этого способа микроскопии контраст живых неокрашенных микроорганизмов

резко увеличивается и они выглядят темными на светлом фоне (положительный фазовый контраст) или светлыми на темном фоне (отрицательный фазовый контраст).

Темнопольная микроскопия основана на освещении объекта косыми лучами света. При таком освещении лучи не попадают в объектив, поэтому поле зрения выглядит темным. Такое освещение препарата достигается использованием специального темнопольного конденсора. Темнопольная микроскопия является очень простым, но эффективным методом и хорошо подходит для получения изображения живых и неокрашенных биологических образцов. Учитывая простоту установки, качество получаемых изображений весьма хорошее.

При микроскопировании в темном поле можно увидеть объекты, величина которых измеряется сотыми долями микрометра, что находится за пределами разрешающей способности обычного светлопольного микроскопа. Однако наблюдение за объектами в темном поле позволяет исследовать только контуры клеток и не дает возможности рассмотреть их внутреннюю структуру.

Люминесцентная (флуоресцентная) микроскопия основана на способности ряда веществ биологического происхождения или некоторых красителей светиться при их освещении невидимым ультрафиолетовым или синим светом. При использовании ультрафиолетового света разрешающая способность микроскопа может достигать 0,1 мкм.

Клетки микроорганизмов обрабатывают специальными красителями — флуорохромами (акридиновый оранжевый, примулин, родамин и др.) в виде сильно разбавленных водных растворов: 1:500—1:100 000. Такие растворы слабо токсичны, что дает возможность изучать неповрежденную клетку. В зависимости от химического состава, клеточные структуры в разной степени адсорбируют красители и люминесцируют различным образом. Кроме того, флуорохромы неодинаково адсорбируются живыми и мертвыми клетками. Это позволяет использовать данный вид микроскопии для цитологических и иммунологических исследований, определения жизнеспособности клеток и т. д. (рис. 8.3.)

Электронный микроскоп (ЭМ) — прибор, позволяющий максимальному увеличению объектов до 200 000 раз, в отличие от оптического микроскопа, вместо светового потока используется пучок электронов с энергией 200 эВ—400 кэВ и более (например, электронные микроскопы высокого разрешения с нарастающим напряжением 1 МВ).

Так как длина электронов волн де-Бройли в разнице потенциалов, ускоренных в электрическом поле 1000 В (0,4 Е), меньше длины видимых световых волн, решающая способность электронного микроскопа в 1000—10000 раз превышает решающую способность традиционного светового микроскопа и возможно меньше чем на один Ангстрем на последних лучших приборах. Для получения изображения на электронном



оптический микроскоп



электронный микроскоп

Рис. 8.3. Оптический и электронный микроскопы

микроскопе используются специальные магнитные линзы, управляющие движением электронов в цепи прибора с помощью магнитного поля.

Электронная микроскопия позволяет обнаружить объекты, которые не разрешаются при использовании световых или ультрафиолетовых лучей. Теоретически разрешение просвечивающего электронного микроскопа составляет 0,002 нм; реальное разрешение современных электронных микроскопов приближается к 0,1 нм. На практике разрешение для биологических объектов достигает 2 нм.

Короткая длина волны электронов позволяет различить объекты размером 0,5—1,0 нм. В современных электронных микроскопах на экране достигается увеличение 5000—200 000. Благодаря столь высокому разрешению становится возможным выявление деталей бактериальных структур. Например, с помощью напыления солей тяжелых металлов, окружающих бактерию и проникающих в поверхностные неровности, получают контрастирование за счет дифференциальной задержки электронов. Этот эффект получил название негативного контрастирования.

Электронный микроскоп, в котором изображение формируется благодаря прохождению (просвечиванию) электронов через образец, называют просвечивающим (или трансмиссионным).


В сканирующем электронном микроскопе (растровая электронная микроскопия (РЭМ)) пучок электронов быстро сканирует поверхность образца, вызывая излучение, которое формирует изображение на светящемся экране. Для РЭМ характерны высокая разрешающая способность, большой диапазон увеличений, большая глубина фокусировки, многообразие режимов работы. Сканирующий микроскоп дает картину поверхностей и позволяет получать трехмерное изображение.


Лазерная конфокальная микроскопия дает возможность получить отчетливое изображение и наблюдать объекты в фокусе по всему полю. Данный метод пригоден лишь для исследования самосветящихся (флуоресцентных) объектов. При сочетании с компьютерной техникой возможна пространственная реконструкция изучаемого объекта. В конфокальном лазерном сканирующем микроскопе изображения внутренних сечений формируются за счет сканирования сфокусированным лазерным пучком от разных (405, 488, 532, 635 нм) лазеров и пространственной фильтрации излучения. При использовании сканирующей микроскопии ближнего поля (СМБП) достигается высокая разрешающая способность. Наименьший размер элемента, полученного с помощью СМБП, составляет 20 нм при длине волны света 0,486 нм. В изображении контролируемого элемента отсутствуют дифракционные или интерференционные эффекты, затрудняющие определение его границ. Отличительной особенностью СМБП по сравнению с атомно-силовым микроскопом является чувствительность к оптическим характеристикам поверхности контролируемого образца, длине волны света, люминесценции и др.

Компьютерная интерференционная микроскопия позволяет получить высококонтрастное изображение при наблюдении субклеточных структур; во многих случаях применяется для изучения живых клеток. Принцип действия автоматизированного интерференционного микроскопа основан на интерференции световых пучков лазерного излучения, отраженного от опорного зеркала и зеркала, на котором помещен измеряемый фазовый объект. Теоретически предельно достижимая разрешающая способность может составить в среднем 0,2 нм, практически она составляет 0,4 мкм.


Рентгеновская компьютерная томография (РКТ), позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) позволяют наблюдать объекты в обычных условиях.

ЗАДАНИЯ:

 Опишите особенности использования электронного микроскопа

 Выделите известные вам типы микроскопов и дайте объяснение принципам наблюдения для разных типов микроскопов.

 Нарисуйте схему света в оптическом микроскопе.

-  1. Объясните, почему изменяется величина линейного увеличения при работе с электронным микроскопом по сравнению с микроскопом оптическим.
2. Охарактеризуйте принцип работы на люминесцентном микроскопе.