

## Mikroszkópiai alapok

Készítette: Kovács Ferenc

Mikroszkópia célja: láthatóvá tegye a minta szabad szemmel nem kivehető részleteit.

- nagyított, kontrasztos, jó felbontású (részletgazdag) képet állítson elő.
- Feloldóképesség: legkisebb részlet, amit a mikroszkóp felbont egy ideális mintában
- Legkisebb feloldható távolság ( $d_{min}$ ): hullámhosszfüggő, fénymikroszkópnál kb. 200 nm (0,2  $\mu\text{m}$ )
- A fénymikroszkópia láthatóvá tudja tenni a baktériumokat, az eukarióta sejtek sejt szervecskéit (organellumokat), de a biológiai makromolekulák szerkezetét nem.
- A tárgy az objektív 1-szeres és 2-szeres fókusz távolsága között, a fókuszponthoz közel van. Az objektív fordított állású, nagyított, valódi közbenső képet hoz létre az okulár fókusz síkjában. Ezt nagyítja tovább az okulár, és a közbensővel megegyező állású, nagyított, virtuális képet hoz létre a végtelenben.

### Véges tubushosszúságú és végtelenre korrigált sugármenetek:

Véges tubushossz hátránya: fókuszálásakor a mintát kell mozgatni, nem az objektívet, mert az objektív után a fénysugarak nem párhuzamosak.

Végtelen tubushossz: A legtöbb modern mikroszkóp ilyen. Az objektív után a nyaláb párhuzamos, így az objektív mozgatása nem befolyásolja a további képalkotást. A végtelenre korrigált lencserendszer előnye, hogy a fókuszálás végezhető az objektív mozgatásával (a minta helyett). Másrészt nem érzékeny a tubusban (objektív és tubuslencse között) elhelyezett egyéb optikai elemekre (szűrő, polarizátor stb.).

### Legáltalánosabb leképezési hibák:

Szférikus aberráció: oka, hogy a lencse szélein áthaladó sugarak nagyobb eltérést szenvednek, mint az optikai tengellyel kis szöget bezáró fénysugarak. Ebből az következik, hogy a párhuzamosan érkező fénysugarak nem egy fókuszpontban metszik egymást.

Asztigmatizmus: Akkor fordul elő, ha a tárgy távol van az optikai tengelytől, vagy pedig, ha a lencse görbületi sugara különböző irányok mentén eltérő. A tárgy képe nem egy pont, hanem az ún. szagittális és tangenciális fókusz síkokban egy-egy fókuszvonal.

Kromatikus aberráció: Oka: a rövidebb hullámhosszúságú fény közelebb fókuszálódik  
korrekció: különböző törésmutatójú anyagokból készült gyűjtő- és szórólencsék kombinációjával.

## **A mikroszkóp objektívek (tárgylencsék):**

Objektív: a mintáról (tárgyról) a fényt összegyűjtő (fókuszáló) lencse-. Fluoreszcencia mikroszkópnál ez a lencse végzi a tárgy közvetlen megvilágítását is, 2 vagy több (akár 10-20) komponensből álló összetett lencsék. Két fő jellemzőjük: nagyítás és a numerikus apertúra. Az objektív-revolverben lévő különböző nagyítású (pl. 5x, 10x, 20x, 40x, 60x, 100x) objektívek általában parfokálisak (közös fókuszpontúak). Nagyítás-váltáskor csak minimális fókusz-utánállítás szükséges, a minta fókuszban marad.

A numerikus apertúra szabja meg az objektívvel elérhető feloldást. Száraz objektívénél  $NA < 1$ , az NA immerziós folyadékkal növelhető. Az objektív optimális feloldását csak akkor éri el, ha teljes apertúráját megvilágításra kerül. Minél nagyobb az NA, általában annál kisebb a munkatávolság (objektív-minta távolság), annál kisebb a mélységélesség, és annál drágább az objektív.

A legolcsóbbak az akromát objektívek, melyek a piros és kék szín szerint kromatikusán korrigáltak. Ez azt jelenti, hogy e két színt közös fókuszpontba képezik le. -A plánakromát objektívek a 2 színre való korrigáltság mellett síkra is korrigáltak: a minta egész síkját élesen képezik le. Az apokromát objektívek kromatikusán 4 színre korrigáltak, szferikusán pedig 2 színre, főleg fényképezés esetén jelent előnyt erősebb korrekciójuk.

Főleg az utóbbi időben terjedtek el a WF típusú szemlencsék, melyek szemüvegesek számára is lehetővé teszik betekintést, angolul az ilyen okulárokot wide angle / wide field vagy high eye point okulároknak nevezik. Az okulárok is optikailag korrigáltak, a nagyítás fel van tüntetve rajtuk.

## **Fluoreszcens mikroszkópia:**

A fluoreszcens mikroszkóp használatakor a vizsgált objektumot UV fénnel világítjuk meg. A megvilágító fény létrehozásához nagy erejű Xe-, Hg- gőz lámpát használunk fényforrásként. Alapjelenségeit a Jablonki-féle séma alapján értelmezzük. Az így létrehozott látható fényből a gerjesztő fény spektrumot (UV) az excitációs szűrővel szűrjük ki a látható fény spektrumából. A gerjesztő fény hatására a jelölőanyag vagy minta fény formájában energiát nyel el, gerjesztődik, energiafelvétel közben az elektron egyik szintről magasabbra jut, fotont nyel el a rendszer, majd emisszió során energialeadás közben az elektron vissza esik egy alacsonyabb energiaszintre és közben fotonokat bocsájt ki a rendszer. A fluoreszcensen jelölt vagy autofluoreszcens (festék nélkül is gerjeszthető) mintáról visszasugárzott (emittált) fényből az dikroikus szűrővel választjuk el a képalkotásban nem használt fényt. Az optikai filterek

általában üvegből készülnek és szerves vagy szervetlen anyagokat tartalmaznak, emiatt bizonyos hullámhosszú fény sugarakat átengednek, míg másokat nem

**Longpass filterek:** Magasabb hullámhosszú fény sugarakat enged át. Általában emissziós filterként használatosak.

**Shortpass filterek:** Rövidebb hullámhosszú fényt engednek át. Excitációs filterként használatosak.

**Bandpass filterek:** Előző kettő kombinációja. Csak egy meghatározott hullámhosszú fény sugarakat engednek át, minden más fényt blokkol.

### **Fluoreszcens festékek:**

Klasszikus festékek:

– Dapi (4',6-diamidino-2-phenylindole) • A DNS nagy árkaiba, a A-T gazdag régiókba kötődik, az emissziós intenzitása a bekötődéskor a legnagyobb. • A Dapi festék képes átjutni az intakt membránon, így élő sejtek festésére is alkalmas. • Excitációs maximuma: 358 nm UV spektrumban gerjesztve • Az emissziós spektruma széles, maximuma: 461 nm. • Ha RNS-hez kötődik, akkor az emissziós maximum 500 nm-re tolódik.

Holchest-festékcsalád: Hoechst 33258, Hoechst 33342, és Hoechst 34580

Interkalálódó festék: – PI (propidium iodide) – DNS-hez és RNS-hez is kötődik, nincs specifikusan preferált kötődési helye, interkalálódó festék. – Csak az elpusztult sejtekbe képes bejutni. – Erősen rákkeltő – Excitációs maximuma 538 nm. – Emissziós maximum 619 nm •

Cyanide festékek: – SYTO (membránpermeabilis) – SYTOX (impermeabilis)

UV alternatív festékek – DRAQ5 (membránpermeabilis) – DRAQ7 (impermeabilis).

### **Források:**

<http://openlabtools.eng.cam.ac.uk/Instruments/Microscope/Optics/>

[https://en.wikipedia.org/wiki/Chromatic\\_aberration](https://en.wikipedia.org/wiki/Chromatic_aberration)

<https://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/aberrations.html>

<https://www.bioopticsworld.com/biophotonicstools/article/16429919/3d-optical-imagingsinglemolecule-localizationmicroscopy-extreme-precision-in-3d-adaptive-optics-boostssuperresolution-microscopy>

<https://www.thermofisher.com/hu/en/home/life-science/cellanalysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/fundamentals-of-fluorescencemicroscopy/epifluorescence-microscope-basics.html>

[https://en.wikipedia.org/wiki/Stokes\\_shift](https://en.wikipedia.org/wiki/Stokes_shift)

<https://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-fundamentalsand-history-of-fluorescence-and-quantum-dots/>