МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И.ПИРОГОВА» (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. ПИРОГОВА МИНЗДРАВА РОССИИ)

КАФЕДРА КЛЕТОЧНОЙ БИОМЕДИЦИНЫ И КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПЕРЕДОВОЙ ИНЖЕНЕРНОЙ ШКОЛЫ

НЕЗЛИН ЛЕОНИД ПАВЛОВИЧ

ПРИНЦИПЫ ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ В БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Методическое пособие

Рекомендовано Центральным координационным методическим советом ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России для использования в образовательном процессе в качестве учебника (учебного пособия)

Москва 2026

Составители: Незлин Леонид Павлович

Рецензенты:
1. Яшин Валерий Александрович, гл. специалист Института биофизики клетки РАН;
2. Кухарский Михаил Сергеевич, зав. кафедрой общей и клеточной биологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России

ПРИНЦИПЫ ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ В БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ: методическое пособие для самостоятельной работы (практических занятий) студентов ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, 2024, 81 с.

Учебное пособие содержит теоретические и практические аспекты всех основных методов оптической микроскопии в биомедицинских исследованиях. В приложении приведены действующие нормативные документы, список литературы.
Пособие составлено в соответствии с действующими ФГОС по направлению подготовки 06.04.01 Биология (уровень магистратуры).
Пособие предназначено для студентов, обучающихся по программе магистратуры по направлению подготовки 06.04.01 Биология; направленность (профиль) образовательной программы: Клеточная и генная терапия, осваивающих дисциплину «Клеточные технологии». Пособие может представлять интерес для студентов, обучающихся по программам: 06.03.01 Биология (программа бакалавриата), 31.05.01 Лечебное дело (программа специалитета), 30.05.01 Медицинская биохимия (программа специалитета), 30.05.02 Медицинская биофизика (программа специалитета), 06.04.01 Биология (программа магистратуры).

© Автор/Составитель: Незлин Леонид Павлович, 2026 г.
© ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России, 2026 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ 4
2. ЧТО НУЖНО ЗНАТЬ ПРО СВЕТ 5
3. ПОСТРОЕНИЕ ИЗОБРАЖЕНИЯ В МИКРОСКОПЕ 8
4. АБЕРРАЦИИ ОПТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ 9
5. ДИФРАКЦИОННЫЙ ПРЕДЕЛ 11
6. ОПТИЧЕСКАЯ СХЕМА МИКРОСКОПА 12
7. ОБЪЕКТИВ 14
8. АПЕРТУРНЫЙ УГОЛ И ЧИСЛОВАЯ АПЕРТУРА ОБЪЕКТИВА 20
9. УСТРОЙСТВО МИКРОСКОПА ПРОХОДЯЩЕГО СВЕТА 22
10. СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ 24
    10-1. Микроскопия светлого поля. 24
    10-2. Контрастирование неокрашенных биологических объектов. 27
        10-2-1. Микроскопия темного поля. 27
        10-2-2. Фазовый контраст. 29
        10-2-3. Поляризационный контраст. 32
        10-2-4. Дифференциальный интерференционный контраст. 33
        10-2-5 ZEISS PlasDIC 35
        10-2-6. Модуляционный контраст Хоффмана. 36
    10-3. Флуоресцентная микроскопия 38
        10-3-1. Преимущества флуоресцентной микроскопии 38
        10-3-2. Принцип флуоресцентной микроскопии 39
        10-3-3. Осветители в флуоресцентной микроскопии 41
        10-3-4. Флуоресцентный кубик 45
        10-3-5. Устройство флуоресцентного микроскопа 48
11. РЕГИСТРАЦИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ МЗОБРАЖЕНИЙ 50
12. ОСНОВНЫЕ КЛАССЫ ОПТИЧЕСКИХ МИКРОСКОПОВ ДЛЯ БИО-МЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕТОДАМИ СВЕТОВОЙ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ. 56
13. ЗАКЛЮЧЕНИЕ 65
14. СПИСОК РЕКОМЕНДОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ И РЕСУРСЫ В ИНТЕРНЕТЕ 67
Приложение 1. ЧТО ОЗНАЧАЮТ ОБОЗНАЧЕНИЯ НА ОБЪЕКТИВАХ 68
Приложение 2. ТЕСТОВЫЕ ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ 71

Mikroskope und Fernröhre verwirren eigentlich den reinen Menschensinn.

Johann Wolfgang von Goethe

(Микроскоп и телескоп реально смущают чистое человеческое чувство

Иоганн Вольфганг фон Гёте)

1. ВВЕДЕНИЕ

Оптические микроскопы (или микроскопы дальнего поля) являются инструментом, который используется практически повсеместно в медико-биологических исследованиях и клеточной биологии. При этом, современный микроскоп – это сложный прибор, имеющий много возможностей и позволяющий работать с использованием множества разнообразных методов. Однако без знания того, как микроскоп устроен, каковы его возможности и ограничения, и как его настраивать при использовании различных методов, пользователь рискует потратить время и не получить необходимую ему информацию. Все это неминуемо сведет на нет проделанную работу. Данное руководство призвано объяснить пользователям базовые принципы работы на оптических микроскопах, начиная с диссекционных стереомикроскопов и заканчивая использованием методов световой и флуоресцентной микроскопии.

В этом руководстве в краткой форме представлена только та информация, которую необходимо знать пользователю, чтобы правильно выбрать оптический микроскоп для решения стоящих перед ним задач, настроить его и работать на нем, используя технику проходящего света (светлое поле, темное поле, фазовый, интерференционный, поляризационный и градиентный контраст), технику отраженного света и флуоресценции. Подробно описано устройство и принцип работы стереомикроскопов, а также подбор осветителей оптимальных для работы с биологическими объектами.

Оптические микроскопы выпускает много разных фирм, и работа на каждом имеет свои особенности. Мы не будем подробно описывать устройство и работу на конкретных микроскопах отдельных фирм, а сосредоточимся на общих принципах оптической микроскопии, настройки и работы на микроскопах. Понимая базовые принципы, пользователь без труда освоит любой современный микроскоп, прочитав руководство по его эксплуатации.

Автор выражает глубокую признательность за конструктивную критику и ценные замечания главному специалисту Института биофизики клетки (ИБК РАН, г. Пущино, Московская обл.) к.б.н. В.А. Яшину и старшему научному сотруднику Медицинского факультета Университета Пенсильвании (Филадельфия, США) к.б.н. А.Р.Мухитову.

2. ЧТО НУЖНО ЗНАТЬ ПРО СВЕТ

Свет имеет двойную природу – это и частица (**фотон**), и **электромагнитная волна**. Световая волна характеризуется **амплитудой** (яркость), длиной волны или **частотой** (цвет), **фазой** и **плоскостью поляризации**. Длина волны видимого света приблизительно от 400 до 750 нанометров (Рис. 1). Чем меньше длина волны, тем больше энергии несет фотон. Это необходимо помнить, поскольку даже относительно слабый ультрафиолетовый свет может повреждать биологические объекты, включая глаза пользователя.

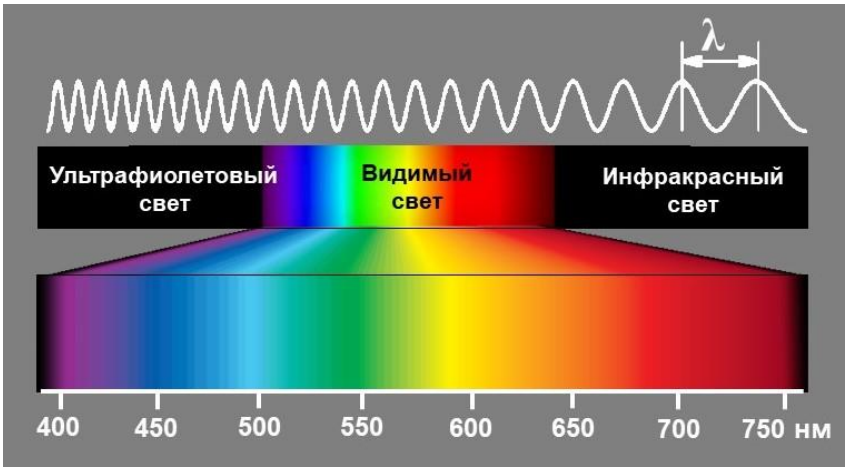


Рис. 1. Видимый свет имеет длину волны (λ) от 400 нм (фиолетовый) до 750 нм (красный). Свет с длиной волны меньше 400 нм называется ультрафиолетовым, а больше 750 нм инфракрасным.

Закономерности распространения света

В однородной среде световая волна распространяется в виде **фронта**. При этом, лучи света распространяются прямолинейно и независимо друг от друга. **Скорость света** в вакууме составляет 300 000 км/с, а в веществе она меньше и зависит от того, как фотоны взаимодействуют с атомами вещества (объекта). А поскольку фотоны разной длины волны взаимодействуют с атомами вещества по-разному, то скорость света разных длин волн в одном и том же веществе различается.

При прохождении света сквозь объект часть фотонов поглощается. Коэффициент поглощения света зависит от свойств объекта и длины волны света. Если объект избирательно поглощает или отражает свет определенной части спектра, то он приобретает «цвет».

При прохождении света между двумя средами с разными оптическими свойствами происходит **преломление света** – изменение направления его лучей. Это преломление тем сильнее, чем больше разница в скорости света при прохождении через эти среды.

Одной из важнейших оптических характеристик вещества является **показатель преломления**. В микроскопии используется относительный показатель преломления: отношение скорости света в воздухе и данной среде. То-есть, $\mathbf{n = v_{воздух}/v_{среды}}$. Чем он больше,

тем больше отклонение света при вхождении из воздуха в эту среду. Соответственно, показатель преломления воздуха равен 1.

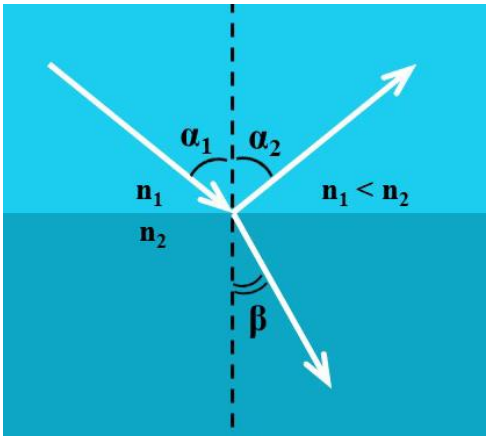


Рис. 2. Преломление и отражение света на границе двух сред с разными коэффициентами преломления (n_1 и n_2). Угол падения α_1 равен углу отражения α_2, а угол преломления β зависит от разницы коэффициентов преломления.

При падении света на границу двух сред с разными коэффициентами преломления часть света **отражается** (Рис. 2). **Угол отражения** при этом всегда равен **углу падения**. При увеличении угла падения до определенной величины достигается **полное внутреннее отражение**, когда падающий луч полностью отразится от границы раздела сред.

Поскольку при прохождении света из одной среды в другую скорость света, а значит и показатель его преломления по-разному изменяются в зависимости от длины волны, белый свет разлагается на **спектр** из составляющих его лучей. Это явление называется **дисперсией света** (Рис. 3). Радуга, которую мы видим в небе после дождя – это дисперсия солнечных лучей в дождевых каплях.

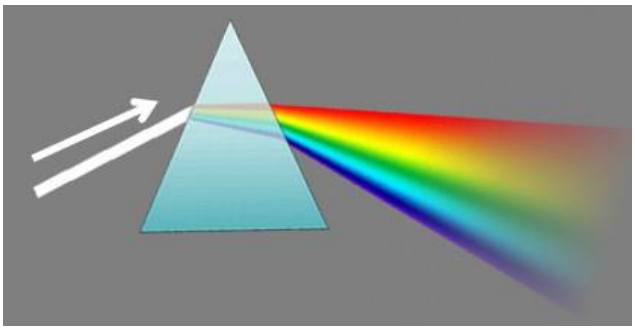


Рис. 3. Дисперсию света лучше всего наблюдать при прохождении белого света сквозь треугольную призму. Это явление используется в микроскопии в спектральных детекторах.

Световая волна (световой вектор) является поперечной. В обычных условиях она не поляризована, однако ее можно заставить колебаться в определенной плоскости. Это явление называется **поляризацией**. Одним из способов поляризовать свет является применение **поляризаторов**: фильтров из вещества с анизотропными свойствами, которое пропускает только свет, поляризованный в определенной плоскости (**линейная поляризация**). Если использовать пару из двух одинаковых поляризаторов, один перед объектом и один после (**анализатор**), то можно, поворачивая последний в плоскости, перпендикулярной оптической оси, выделить свет, поляризацию которого изменил объект.

Световые волны могут взаимодействовать друг с другом, этот процесс называется **интерференцией**. При интерференции **когерентных** (имеющих одинаковую частоту и плоскость поляризации), но различающихся по фазе волн результирующая волна будет больше или меньше в зависимости от того, насколько различаются фазы исходных волн. Если фазы совпадают, то результирующая яркость будет равна сумме исходных яркостей, а если они противоположны, то яркость будет снижаться (Рис. 4).

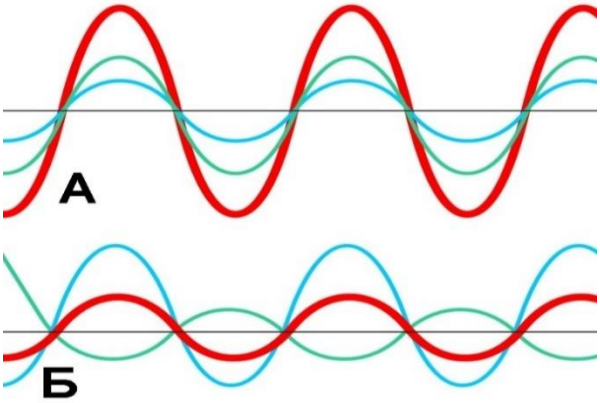


Рис. 4. Интерференция (красная волна) двух когерентных световых волн (синяя и зеленая волны), находящихся в одинаковой (А) и противоположной (Б) фазе.

Явление **дифракции** света заключается в том, что, огибая препятствие или проходя через отверстие, световая волна образует на границе вторичные волны, которые отклоняют свет от прямолинейного направления распространения (Рис. 5). Эти волны взаимодействуют между собой (явление интерференции), и граница препятствия «размывается». Чем меньше объект (препятствие), тем сильнее его изображение будет искажать дифракция (Рис. 5А). Если размеры объекта будут сравнимы или меньше длины световой волны, то его изображение будет превращается в пятно (**пятно рассеяния**, минимальный размер которого ограничен дифракцией) и при уменьшении размеров до определенного предела изображение будет полностью уничтожено дифракцией.

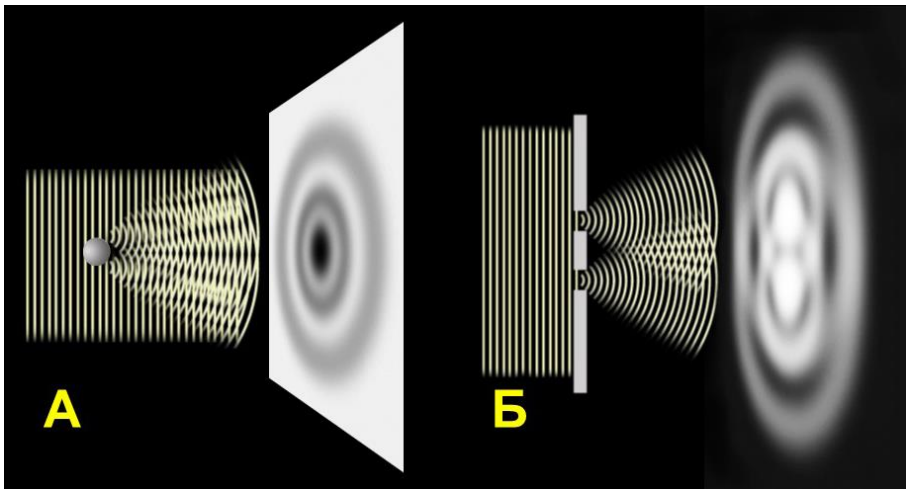


Рис. 5. Дифракция световой волны при огибании препятствия (А) и прохождении сквозь маленькие отверстия (Б).

То же самое наблюдается при прохождении света через маленькие отверстия (светящиеся точки). Если две светящиеся точки расположены близко друг от друга, то вторичные волны, образующие пятна рассеяния, интерферируют между собой, и при уменьшении расстояния между точками границы пятен начинают сливаться (Рис. 5Б).

3. ПОСТРОЕНИЕ ИЗОБРАЖЕНИЯ В МИКРОСКОПЕ

Для получения увеличенных изображений в оптическом микроскопе используются стеклянные линзы. Мы не будем описывать здесь основы геометрической оптики и ограничимся только информацией, которую стоит знать для работы на микроскопе.

Линзы собирают лучи, идущие параллельно, в определенной точке (**собирающие линзы**) или делают их расходящимися (**рассеивающие линзы**). Точка на оптической оси, из которой выходят лучи, идущие после преломления линзой параллельно, называется **передним фокусом** линзы (F1). Лучи, падающие на линзу параллельно оптической оси, собираются в точке, называемой **главным задним фокусом** (F2), а плоскость, проходящая через эту точку перпендикулярно оптической оси, называется фокальной плоскостью или **плоскостью фокуса**. На ней собираются лучи, идущие под углом к оптической оси (Рис. 6).

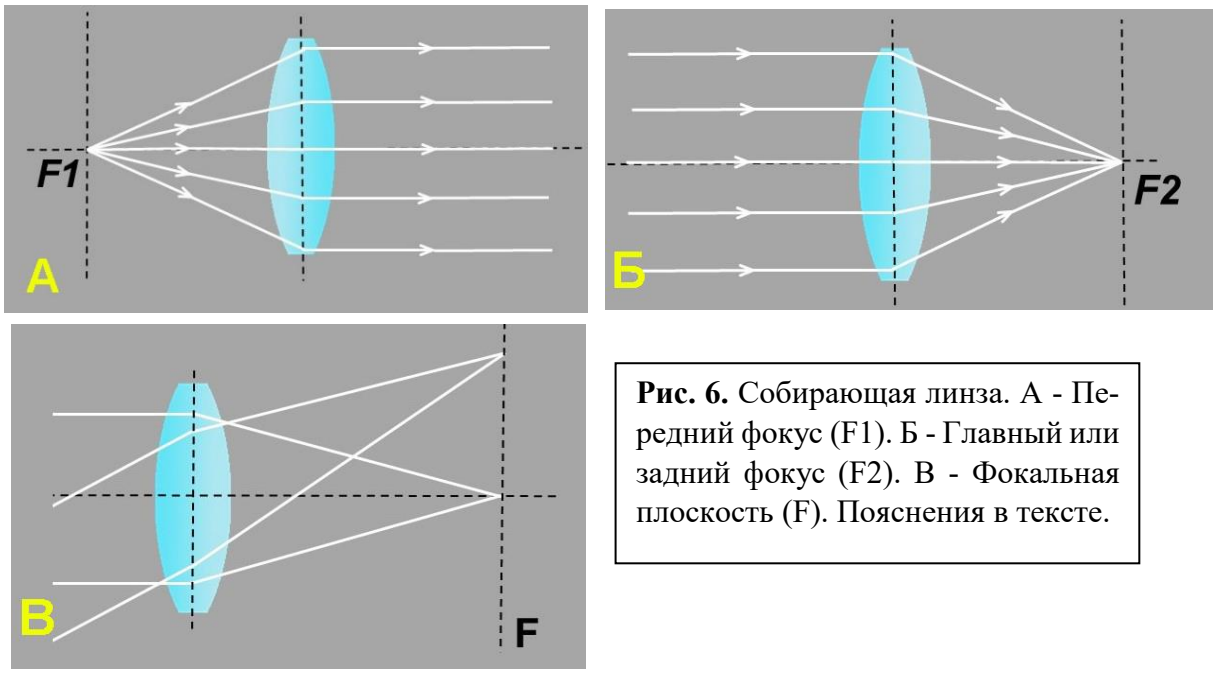


Рис. 6. Собирающая линза. А - Передний фокус (F1). Б - Главный или задний фокус (F2). В - Фокальная плоскость (F). Пояснения в тексте.

Благодаря своей способности преломлять свет линзы могут давать изображение предметов, которое будет равным, увеличенным, или уменьшенным в зависимости от положения объекта относительно переднего фокуса линзы (Рис. 7). Задачей микроскопа является, понятное дело, построение увеличенных изображений.

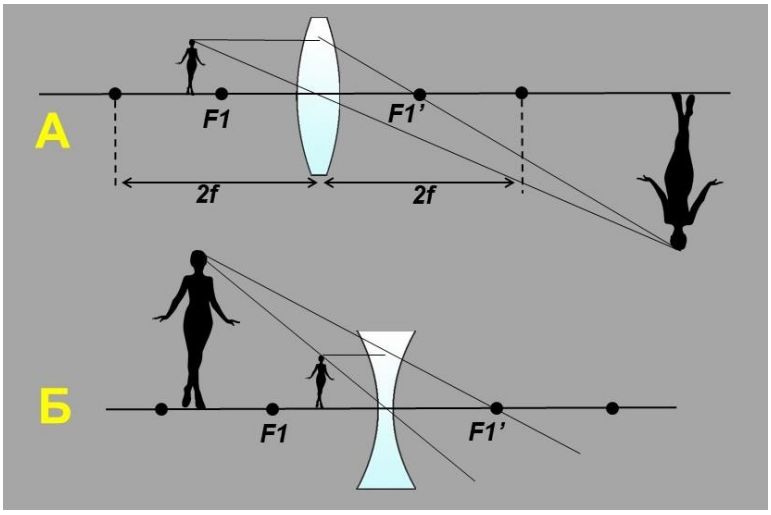


Рис. 7. Примеры построения увеличенного изображения объекта. А. Собирающая линза. Объект находится между передним фокусом и двойным передним фокусом. Б. Рассеивающая линза. Объект находится между линзой и передним фокусом.

Простейший микроскоп (а именно такими и были первые микроскопы) состоит из двух собирающих линз – объектива и окуляра. Объектив дает увеличенное изображение объекта, а окуляр его дополнительно увеличивает и проецирует на хрусталик глаза (Рис. 8).

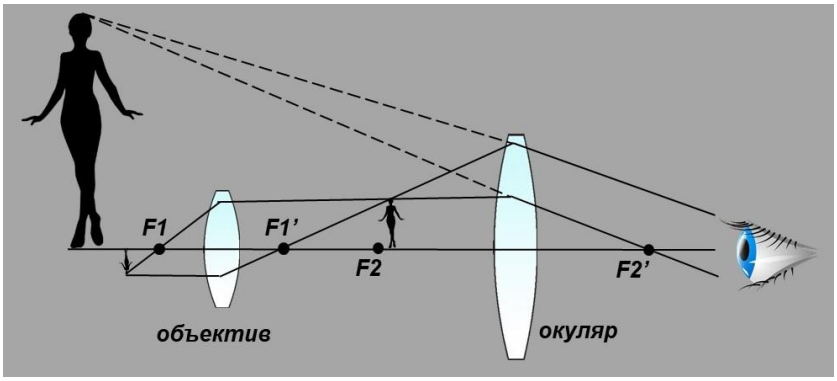


Рис. 8. Оптическая схема простейшего микроскопа из двух линз. Объектив формирует действительное перевернутое изображение объекта, а окуляр формирует мнимое увеличенное изображение.

4. АБЕРРАЦИИ ОПТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Поскольку края линзы преломляют свет сильнее, чем ее центральная часть, то лучи, попадающие на разные участки линзы, будут фокусироваться в разных плоскостях. К тому же, скорость света и показатели преломления для различных длин волн различаются. Все это приводит к появлению **аберраций**.

Аберрациями называют погрешности изображения в оптической системе, вызываемые отклонением лучей от того направления, по которому они должны были бы идти в идеальной оптической системе. Известно много различных аберраций, большинство которых производители микроскопов полностью или частично устраняют, и мы рассмотрим только те из них, про которые стоит знать пользователю. Аберрации подразделяются на **монохроматические** и **хроматические**.

Из монохроматических аберраций стоит знать про сферическую аберрацию и кривизну поля. **Сферическая аберрация** заключается в том, лучи, идущие параллельно оптической оси, но проходящие через центр и края линзы, фокусируются в разных плоскостях (Рис. 9).

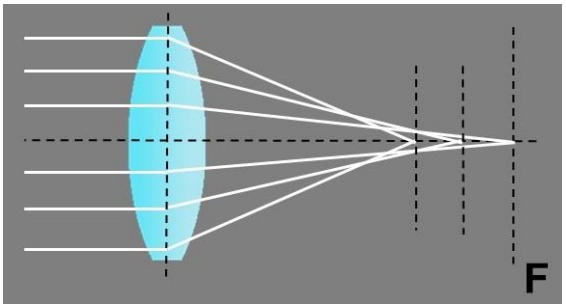


Рис. 9. Схема сферической аберрации. Из-за несовпадения фокусов для лучей света, проходящих на разных расстояниях от оптической оси, изображение точки превращается в размытое пятно.

Кривизна поля изображения заключается в том, что изображение плоского объекта, перпендикулярного к оптической оси, проецируется не на плоскость, а на сферическую поверхность (Рис. 10). В результате, или центр, или края изображения будут не резкими. Поэтому, если требуется регистрировать плоские объекты (например, гистологические срезы или монослой клеток), необходимо убедиться, что в микроскопе эта аберрация устранена (см. далее).

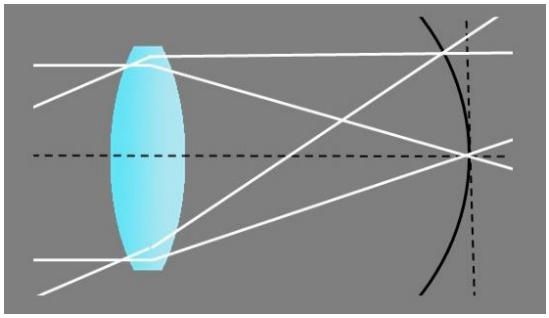


Рис. 10. Схема аберрации кривизна поля изображения. Изображение плоского объекта, перпендикулярного к оптической оси объектива, лежит на сферической поверхности. Эта аберрация вызывает неравномерную резкость по полю изображения.

Среди хроматических аберраций, причиной которых является различное преломление света различных длин волн (дисперсия), выделим хроматизм положения, когда свет разной длины волны фокусируется в различных точках вдоль оптической оси, и объект начинают окружать цветные ореолы (Рис.11). При работе с многоцветными объектами необходимо выбирать объективы, в которых эти аберрации устранены (см. далее).

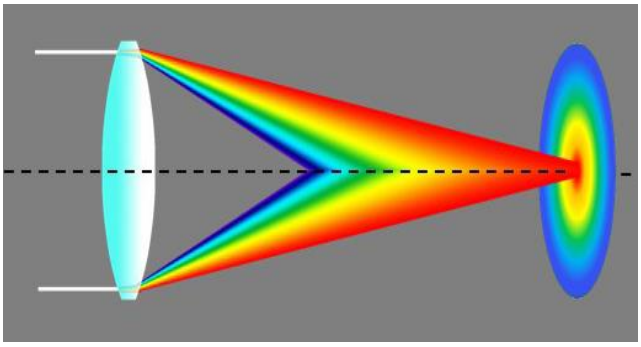


Рис. 11. Схема хроматической аберрации (хроматизм положения). Свет с большей длиной волны преломляется слабее, чем коротковолновый, в результате чего появляются цветные ореолы.

5. ДИФРАКЦИОННЫЙ ПРЕДЕЛ

Поскольку дифракция размывает границы объекта, то объекты, размеры которых меньше определенной величины (или **дифракционного предела**), нельзя зарегистрировать в оптическом микроскопе. Таким образом, дифракционный предел — это минимальный размер объекта, который можно зарегистрировать в виде пятна, или минимальное расстояние между двумя объектами, при котором они регистрируются как два пятна.

Дифракционный предел для оптической системы микроскопа был открыт в 1873 году немецким физиком Эрнстом Аббе и определяется формулой:

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

где d – разрешение объектива, λ - длина световой волны, Ri – показатель оптического преломления среды, α – **апертурный угол** (угол между лучом, идущим из осевой точки в плоскости фокуса через край входного зрачка объектива, и оптической осью, Рис. 12). Обратите внимание, что в формулу не входит увеличение объектива. То-есть, и это надо хорошо понимать, разрешающая способность объектива микроскопа не зависит от его увеличения.

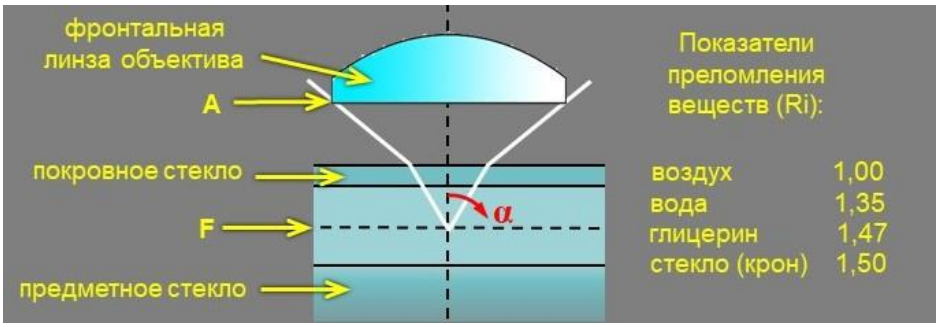


Рис.12. Схема, показывающая, что такое апертурный угол. Угол α теоретически не может быть больше 90° (это значение достигается, если плоскость фокуса **F** совпадет с плоскостью входного зрачка объектива **A**). Если взять синий свет с длиной волны 450 нм (фиолетовый свет, конечно, имеет меньшую длину волны, но наши глаза и сенсоры регистрирующих камер к нему мало чувствительны), оптическое стекло крон с коэффициентом преломления 1,50, угол α равный 90° и подставить эти значения в формулу Аббе, получим разрешение d = 150 нм. Если угол α равен 30° (как на рисунке), то d = 300 нм.

На практике это означает, что объекты, размеры которых меньше дифракционного предела, видны не будут. Для примера возьмем пластиковые микросферы диаметром 200 нм (такие микросферы выпускаются специально для тестирования микроскопов) и попробуем сфотографировать их при максимальном разрешении. Результат показан на рисунке 13. Вот, во что дифракция превращает изображения маленьких шариков. Микросферы диаметром 100-150 нм различить вообще невозможно.

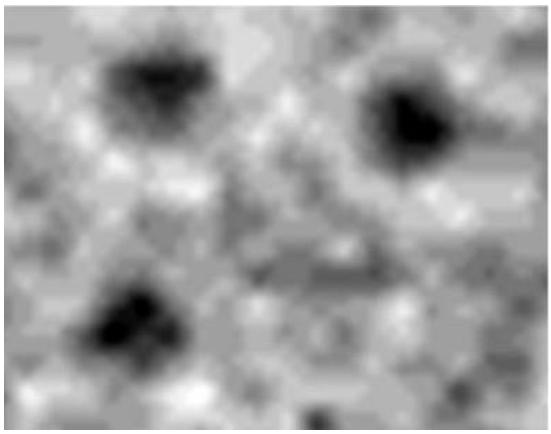


Рис. 13. Изображение пластиковых микросфер диаметром 200 нм, полученное в оптическом микроскопе с максимально возможным разрешением (микроскоп Zeiss Axio Imager M1, объектив Plan-APOCHROMAT 100x/1,46). Микросферы предстают в виде размытых пятен.

Итак, объект, размеры которого сравнимы с величиной дифракционного предела для данного объектива, будет превращен объективом в размытое пятно, называемое «пятно, ограниченное дифракцией» (Diffraction Limited Spot). Размер и форма пятна, в которое объектив преобразует объект с предельно малыми размерами, называется «функция рассеяния точки» (Point Spread Function) (Рис. 14).

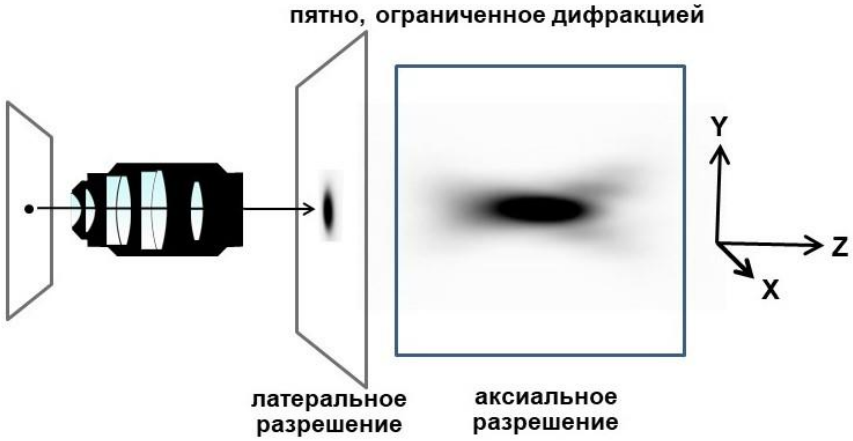


Рис. 14. Функция рассеяния точки. В плоскости изображений (латеральной плоскости) функция рассеяния точки представляет собой округлое пятно. Вдоль оптической оси (в аксиальной плоскости пятно превращается в овал с расходящимися от его концов конусами. То-есть, **аксиальное разрешение объектива** (разрешение в аксиальной плоскости) в 3-4 раза хуже, чем **латеральное разрешение** (в латеральной плоскости). Об этом надо помнить, изучая толстые препараты.

6. ОПТИЧЕСКАЯ СХЕМА МИКРОСКОПА

Микроскоп проходящего света представляет собой систему из источника света, конденсора, объектива и окуляра (Рис. 15). До 80-х годов XX века микроскопы конструировались по следующей схеме: свет от источника собирается оптической системой, называемой **конденсором**, и проецируется в препарат. Прошедший сквозь препарат свет попадает в

объектив (микро-объектив), который проецирует увеличенное изображение плоскости резкости в другую плоскость (переднюю фокальную плоскость окуляра). **Окуляр** также увеличивает изображение и проецирует его в глаз наблюдателя или на сенсор регистрирующего устройства (Рис. 15А).

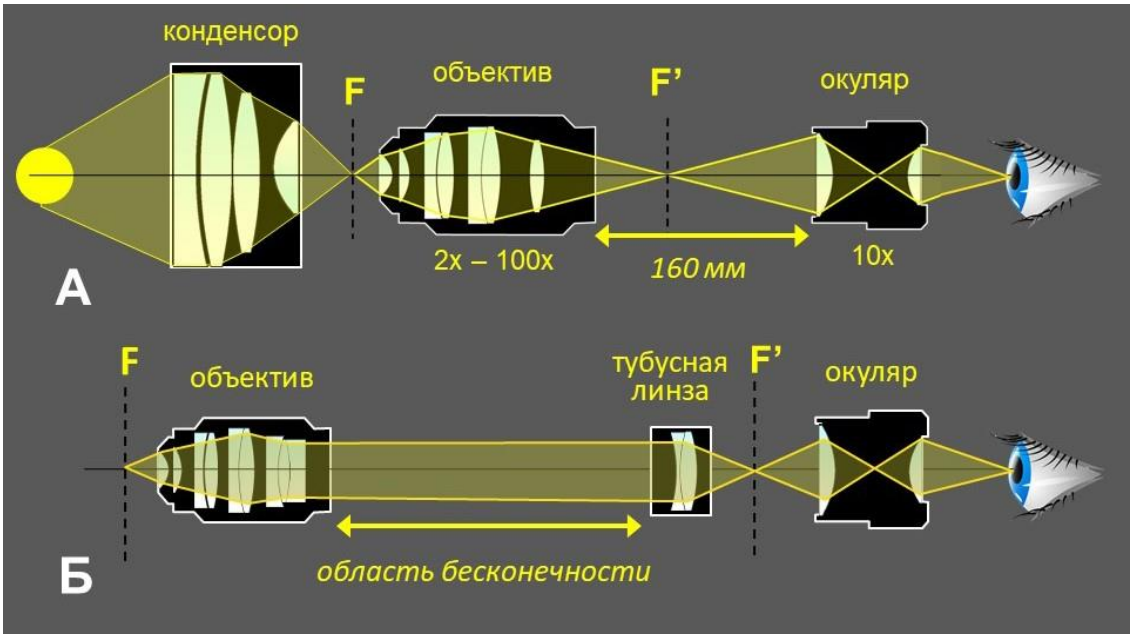


Рис. 15. Принципиальная оптическая схема микроскопа. А – Микроскоп, не скорректированный на бесконечность. Свет от источника проецируется конденсором в препарат (F). Прошедший сквозь препарат свет попадает в объектив, который проецирует увеличенное изображение плоскости резкости в переднюю фокальную плоскость окуляра. Окуляр также увеличивает изображение и проецирует его в глаз наблюдателя или на сенсор регистрирующего устройства. Б – Микроскоп, скорректированный на бесконечность. Объектив проецирует увеличенное изображение плоскости резкости в бесконечность (параллельные лучи), а затем тубусная линза фокусирует их в плоскость изображений.

Расстояние между задней частью объектива и окуляром называлось **длиной тубуса** (**tube length**) и было фиксированным (160 мм). Это создавало определенные неудобства при разработке новых моделей и методов. Поэтому производители начали выпускать микроскопы, **скорректированные на бесконечность** (**infinity corrected**). В них объектив посылает изображение в область бесконечности, а в любой точке этой области может быть помещена **тубусная линза** (**tube lens**), которая фокусирует лучи в плоскости изображений (Рис. 15Б). Таким образом, длина тубуса может произвольно меняться, и установка дополнительных элементов (поляризаторы, призмы, светоделители и т.д.) не требует дополнительных оптических элементов, корректирующих изменение длины тубуса.

Пользователи должны точно знать, с каким типом микроскопа и какими объективами они имеют дело. Установка объектива, скорректированного на бесконечность, в микроскоп,

не скорректированный на бесконечность, и наоборот, сделает работу невозможной – вы просто ничего не увидите.

Объективы микроскопов имеют увеличение от 0,5–250х, но обычно используются объективы 2–100х с окулярами от 8-15х. Таким образом, эффективное увеличение микроскопа – это примерно 1000-2000х. Большее увеличение не имеет смысла, поскольку дифракционный предел не позволит увидеть более мелкие объекты, а значит, получить дополнительную информацию.

7. ОБЪЕКТИВ

Главным элементом любого микроскопа является **объектив**. Разрешение всей системы определяется разрешением объектива, и производители выпускают огромное количество разнообразных объективов для разных целей. Важнейшей задачей для пользователя является правильный выбор объектива для конкретной задачи и четкое понимание того, чего ждать от объективов в микроскопе, на котором вы собираетесь работать. Вся необходимая пользователю информация размещена на объективах, поэтому очень важно понимать, что означают нанесенные на них обозначения. Пользователи должны максимально аккуратно обращаться с объективами. Если фронтальная линза воздушного объектива испачкана иммерсионной жидкостью, необходимо протереть ее мягкой салфеткой, смоченной спиртом. Использование влажных салфеток и растворителей не допускается.



Рис. 16. Внешний вид объектива (слева) и изображение объектива в продольном разрезе (справа). Пояснения в тексте.

Рассмотрим для примера объектив фирмы OLYMPUS (Рис. 16). На тыльной стороне объектива находится посадочная резьба, при помощи которой объектив вкручивается в револьвер микроскопа. Пользователь должен быть предельно осторожен, выкручивая и вкручивая объективы. При выкручивании объектив часто роняют, поскольку при малых размерах он имеет неожиданно большой вес, т.к. внутри он весь заполнен стеклом и металлом.

При вкручивании есть опасность начать вкручивать объектив косо и повредить резьбу. При этом нарушится юстировка и ухудшатся оптические характеристики микроскопа. Ни в коем случае нельзя применять силу и при вкручивании затягивать объектив, как болт или гайку. Если выкручивать и вкручивать объектив правильно, он легко идет по резьбе, не требуя усилий.

Далее на боковой поверхности объектива написаны все его характеристики, которые имеют значение для пользователя. Ниже может быть, а может и не быть, кольцо для корректировки параметров объектива (см. далее). Затем на объектив нанесены одно или два цветных кольца, кодирующие увеличение и тип применяемой иммерсии. Носик объективов большого увеличения обычно подпружинен, чтобы обезопасить фронтальную линзу, поскольку пользователи иногда, наводя на фокус, давят объективом препарат. Эта линза к тому же для большей безопасности окружена выступающим вперед стальным кольцом.

Теперь рассмотрим подробно характеристики, написанные на объективе. В верхней строчке указана фирма-изготовитель (не всегда). Далее обязательно указано, какие световые аберрации скорректированы в объективе. Если скорректирована сферическая аберрация «кривизна поля» (см. стр. 10), то это **планобъектив** и на нем будет написано **PLAN**.

Выпускается три типа объективов по степени коррекции хроматических аберраций (Рис. 17). **Ахромат** (обозначаются **ACHROMAT** или надпись отсутствует), в которых скорректированы красные и синие лучи (но не зеленые); **флюорит** (обозначаются **FLUOR** или **NEOFLUAR**), в которых скорректированы красные, синие и частично зеленые лучи, и **апохромат** (обозначается **APOCHROMAT** или **APO**), в которых скорректированы красные, синие и зеленые лучи. Таким образом, объектив с максимальной коррекцией аберраций света будет иметь обозначение **PLAN-APOCHROMAT** или **PLAN-APO.**

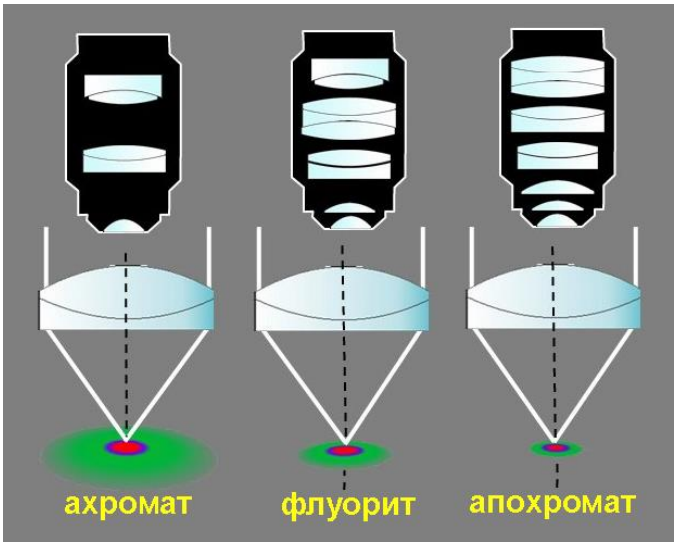


Рис. 17. Типы объективов по степени коррекции хроматических аберраций. **Ахромат** - сведены в одну точку синий и красный свет. **Флюорит** - сведены в одну точку синий, красный и частично зеленый свет. **Апохромат** - сведены в одну точку синий, красный и зеленый свет.

Пользователи должны учитывать, что при изучении монохромных препаратов степень коррекции хроматических аберраций не имеет никакого значения. Если вам необходима двухцветная окраска, а в вашем микроскопе стоят объективы **ACHROMAT**, выбирайте красители красного и синего цвета.

В следующей строчке указано увеличение объектива и через косую черту его числовая апертура. Затем указан тип необходимой иммерсии. По тому, в какой среде будет работать фронтальная линза объектива, объективы делятся на воздушные и иммерсионные. Иммерсионные объективы могут быть водные, глицериновые, масляные и универсальные. Соответственно они имеют обозначения **Oil** –иммерсионное масло; **Gly** – глицерин; **W** – вода; **Imm** – объектив может использоваться с любой из этих иммерсионных жидкостей. Далее обозначены особые условия использования объектива, например, **UV** означает, что это объектив для ультрафиолетового излучения, а **IR**, наоборот, для инфракрасного. **UV-VIS-IR** – объектив можно использовать в широком световом диапазоне от ультрафиолетового до инфракрасного. Если надписи нет, то это «обычный» объектив для работы в видимом свете.

Надпись **Korr** в этой строчке означает, что объектив имеет кольцо для корректировки толщины покровного стекла, типа иммерсии, или числовой апертуры. Так, объектив с обозначением **Imm** (Immersion) обязательно будет иметь корректировочное кольцо для установки используемой иммерсии (см. Рис. 23).

В следующей строчке стоит знак бесконечности ∞. Это означает, что объектив скорректирован на бесконечность и будет работать только в микроскопе, скорректированном на бесконечность (см. стр. 12). Затем через косую черту указана толщина покровного стекла, оптимальная для данного объектива (чаще всего это 0,17 мм). Если там стоит ноль или прочерк, то объектив надо использовать без покровного стекла. Толщина покровного стекла важна для получения максимального разрешения, на которое рассчитан объектив. Так, по словам инженеров фирмы Nikon, если при работе с объективом, рассчитанным на толщину покровного стекла 0,17 мм, использовать стекло 0,13 мм, то разрешение объектива ухудшится на 40%

На объективах бывают и другие обозначения. Важной для пользователя является аббревиатура **WD** (**Working Distance**) – это **рабочий отрезок объектива.** Поэтому, например, надпись **WD 0.13** означает, что рабочий отрезок объектива равен 0,13 мм. Многие пользователи считают, что это расстояние от переднего края фронтальной линзы до плоскости фокуса. Это не так! Рабочий отрезок (иногда называемый **Free Working Distance, FWD**) – это расстояние от передней кромки защитного металлического кольца вокруг фронтальной

линзы до поверхности покровного стекла при условии, что покровное стекло имеет толщину, указанную на объективе, фокус наведен на объект, а сам объект вплотную прижат снизу к покровному стеклу (Рис. 18). Это необходимо помнить, чтобы при работе не раздавить препарат и не повредить объектив.

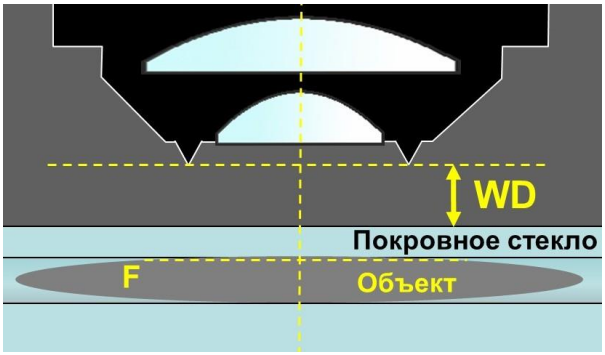


Рис. 18. Рабочий отрезок (WD) – это расстояние от передней кромки объектива до поверхности покровного стекла, при том, что объектив наведен на резкость в плоскости F.

Важно также помнить, что, чем больше числовая апертура и увеличение объектива, тем меньше его рабочий отрезок. Например, у объектива Zeiss PLAN-NEOFLUAR 10X/0.30 рабочий отрезок WD=5.2mm, а у объектива Zeiss PLAN-NEOFLUAR 100X/1.3 рабочий отрезок WD=0.2mm.

Из этого следует важный вывод. Даже если рабочий отрезок не обозначен на объективе, стоит уточнить его значение на сайте фирмы изготовителя. При работе с объективами с большим увеличением и числовой апертурой рабочий отрезок, как мы видим, составляет доли миллиметра! Надо использовать покровное стекло по возможности рекомендованной толщины и делать препарат максимально плоским. И надо быть очень внимательным, наводя на фокус, манипулируя с препаратом и меняя объективы.



Рис. 19. Объектив L Plan с увеличенным рабочим отрезком (WD 17,7 мм).

Для специальных задач выпускаются объективы с увеличенным рабочим отрезком (**Long Working Distance**). Чаще всего они имеют обозначение **LWD**, хотя некоторые производители обозначают их как **L, LL, LD, ELWD (extra-long working distance), SLWD (super-long working distance)** или **ULWD (ultra-long working distance)**. При этом, разумеется, численное значение рабочего отрезка будет указано (Рис. 19).

Встречающаяся на объективах аббревиатура **FN** (**Field Number**) означает «**номер поля**»: диаметр поля зрения после увеличения объективом. Реальное поле зрения можно определить, разделив Field Number на увеличение объектива. На рисунке 16 на объективе с увеличением 100x написано FN 26.5 (то есть, номер поля 26,5 мм). Таким образом, реальный диаметр его поля зрения составит 26.5/100 = 0.265 мм.

Логотип N на объективах фирмы Nikon означает, что эти объективы имеют запатентованное нано-кристаллическое покрытие (**Nikon Nano Crystal Coating**), которое обеспечивает высокую числовую апертуру, улучшенный коэффициент пропускания в длинноволновом диапазоне и коррекцию хроматической аберрации во всем видимом диапазоне. Выпускается две серии: **λS** и **λD**. λD более совершенны, они имеют более широкое поле зрения, у них улучшена свето- и цветопередача для более точного и надежного количественного анализа полученных результатов. Эти объективы максимально адаптированы как для световой, так и для флуоресцентной микроскопии.

Объективы компании Leica Microsystems могут иметь обозначение **HC** (**Harmonic Compound**). Harmonic Compound System включает в коррекцию оптических аберраций, кроме объектива, и другие элементы (окуляры, тубусную линзу, адаптер камеры). Поэтому объективы с маркировкой HC необходимо использовать только в микроскопах Harmonic Compound System. Обозначение на объективе **HCX** означает, что его можно использовать и в более старых микроскопах.

Объективы для работы методом фазового контраста имеют обозначения **Ph1, Ph2,** или **Ph3** и аббревиатуры **DLL**, **DL**, или **ADL** (см далее описание метода фазового контраста).

Обозначения специальных возможностей объективов приведены в таблице в **Приложении 1**. Разумеется, таблица не претендует на полноту.

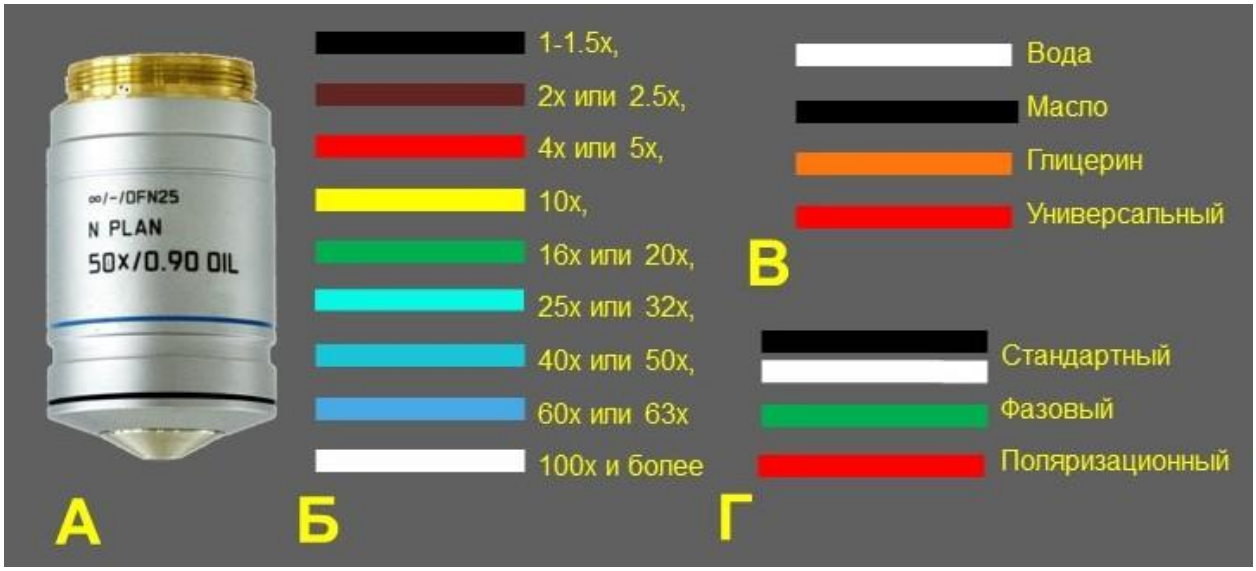


Рис. 20. Цветовая кодировка объективов. А – Объектив имеет два цветных кольца. **Б** – Верхнее кольцо кодирует увеличение объектива. **В** – Нижнее кольцо кодирует тип применяемой иммерсии. **Г** – Цвет надписей кодирует метод применения объектива.

Не всегда легко прочитать надписи на объективе, когда он ввернут в револьвер микроскопа. Чтобы облегчить пользователям жизнь, объективы имеют **цветовую кодировку** (Рис. 20). На объективе может быть одно или два кольца различных цветов. Верхнее (дальнее от носика объектива или единственное) кольцо кодирует увеличение. Нижнее, если оно есть, кодирует тип применяемой иммерсионной жидкости. Если второго кольца нет, значит это воздушный объектив и иммерсия не нужна. Имеет значение и цвет надписей на объективе. К сожалению, не все производители и не всегда соблюдают цветовую кодировку надписей.

Для примера рассмотрим подробно все обозначения, которые нанесены на объектив фирмы Zeiss (Рис. 21).



Рис. 21. Обозначения на объективе. Производитель - ZEISS, корректировка аберраций света - Plan-APOCHROMAT, увеличение - 40x, числовая апертура - 1,3, тип иммерсии - масляная иммерсия (Oil), скорректирован на бесконечность, рассчитан на покровное стекло толщиной 0,17 мм, особые условия использования – надпись DIC (UV)VIS-IR означает, что объектив подходит для дифференциально-интерференционного контраста (см. далее) и работает в диапазоне от ультрафиолетового до инфракрасного света. Голубое кольцо – увеличение 40x, черное кольцо – объектив предназначен для масляной иммерсии.

Выпускаются объективы для специальных задач. Например, у «погружных» объективов для работы с объектами в жидкой среде носовая часть покрыта силиконом, который



Рис. 22. Примеры погружных объективов с покрытым силиконом носиком. Объектив справа имеет корректировочное кольцо для выбора толщины покровного стекла от 0 (погружение) до 0,17 мм.

герметизирует объектив и защищает его от солевого раствора. Разумеется, такой объектив будет иметь обозначения W (водная иммерсия) и 0 (толщина покровного стекла) (Рис. 22).



Рис. 23. Примеры объективов с корректировочными кольцами. Слева направо: кольцо для коррекции толщины покровного стекла; кольцо для коррекции типа иммерсии; кольцо для коррекции числовой апертуры. Все Leica Microsystems.

Как уже было показано на рисунках 16 и 22, на объективах могут быть корректировочные кольца. Пользователь должен обязательно обратить внимание на то, есть ли такое кольцо на объективе, с которым он собирается работать. Если кольцо есть, надо обязательно выяснить, что именно оно корректирует, и установить его в оптимальное для данного препарата положение. Если этого не сделать, можно не только не увидеть то, что есть в препарате, но и увидеть то, чего там нет. На объективах могут быть кольца, корректирующие толщину покровного стекла, тип иммерсии и диаметр входного зрачка (числовую апертуру) (Рис. 23).

Необходимо заметить, что в последнее время появилось много производителей объективов для микроскопов (особенно в Китае), которые наносят на свои объективы еще и нестандартные обозначения, или вовсе не наносят стандартные, а расшифровка обозначений у них на сайтах отсутствует или ее очень трудно найти. По нашему мнению, это не более, чем маркетинговые трюки, и пользователю стоит ориентироваться, если возможно, на объективы известных производителей со стандартными обозначениями.

8. АПЕРТУРНЫЙ УГОЛ И ЧИСЛОВАЯ АПЕРТУРА ОБЪЕКТИВА

Как уже было написано ранее (см. рисунок 12), **апертурный угол** – это угол между лучом, идущим из осевой точки в плоскости фокуса через край входного зрачка объектива, и оптической осью. Чем он больше, тем выше разрешение объектива. Между тем, при использовании объективов без иммерсионной жидкости («воздушные или сухие» объективы)

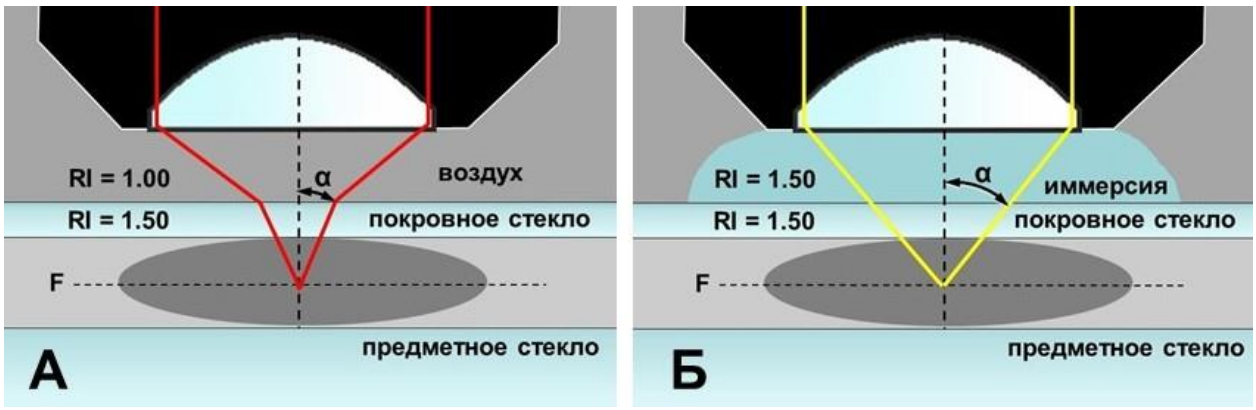


Рис. 24. Изменение апертурного угла **α** при использовании иммерсионного объектива. **А** – без иммерсии реальный апертурный угол уменьшается за счет преломления света на границе покровного стекла. **Б** – использование иммерсионной жидкости с коэффициентом преломления, близким к стеклу, уменьшает преломление, тем самым увеличивая апертурный угол.

апертурный угол будет уменьшаться из-за преломления света на внешней границе покровного стекла, а значит будет ухудшаться и разрешение. При использовании иммерсионного объектива и иммерсионной жидкости этого не происходит (Рис. 24).

То-есть, пользователь должен хорошо понимать, что, если необходимо высокое оптическое разрешение, то неизбежно надо использовать иммерсионные объективы с большим апертурным углом.

Чтобы пользователям не приходилось ломать себе голову, вспоминая формулу Аббе и разыскивая по справочникам значения апертурных углов для каждого объектива, произведение коэффициента преломления среды на синус апертурного угла называется числовой апертурой объектива (Numerical Aperture, NA) и обозначено на каждом объективе рядом с увеличением. Таким образом, формула Аббе будет выглядеть так:

$$d = \frac{\lambda}{2Ri\ sin\alpha} \rightarrow d = \frac{\lambda}{2NA}$$

Чем больше значение числовой апертуры, тем выше разрешение объектива. По числовой апертуре пользователь легко может определить латеральное разрешение объектива (разрешение в плоскости изображений). Например, на объективе мы читаем **20x/0.60**. Это означает, что объектив имеет увеличение 20 крат и его числовая апертура равна 0,60. Возьмем длину волны синего света 450 нм, подставим эти значения в формулу Аббе (450 нм / 2 x 0,60 = 375 нм. Это и есть латеральное разрешение данного объектива.

Таким образом, важно помнить, что разрешение объектива не зависит от увеличения, а зависит от числовой апертуры. У объектива OLYMPUS 60x/1.00 (Рис. 22) разрешение будет

выше, чем у объектива OLYMPUS 100x/0.95 (Рис. 16), а у объектива ZEISS 40x/1.3 (Рис. 21) оно еще выше.

9. УСТРОЙСТВО МИКРОСКОПА ПРОХОДЯЩЕГО СВЕТА

Несмотря на то, что существует множество моделей микроскопов, которые выпускаются различными фирмами под различные задачи, принципиальные схемы устройства микроскопа проходящего света во многом схожи (Рис. 25). Микроскоп собирается на массивном штативе (**станина**) – это мощная стальная конструкция, обеспечивающая жесткость и отсутствие вибраций. На задней стенке находится **домик**, в котором располагается **источник света** (лампа накаливания, галогенная лампа, или светодиоды). Здесь же находятся инструменты, необходимые для юстировки источника света.

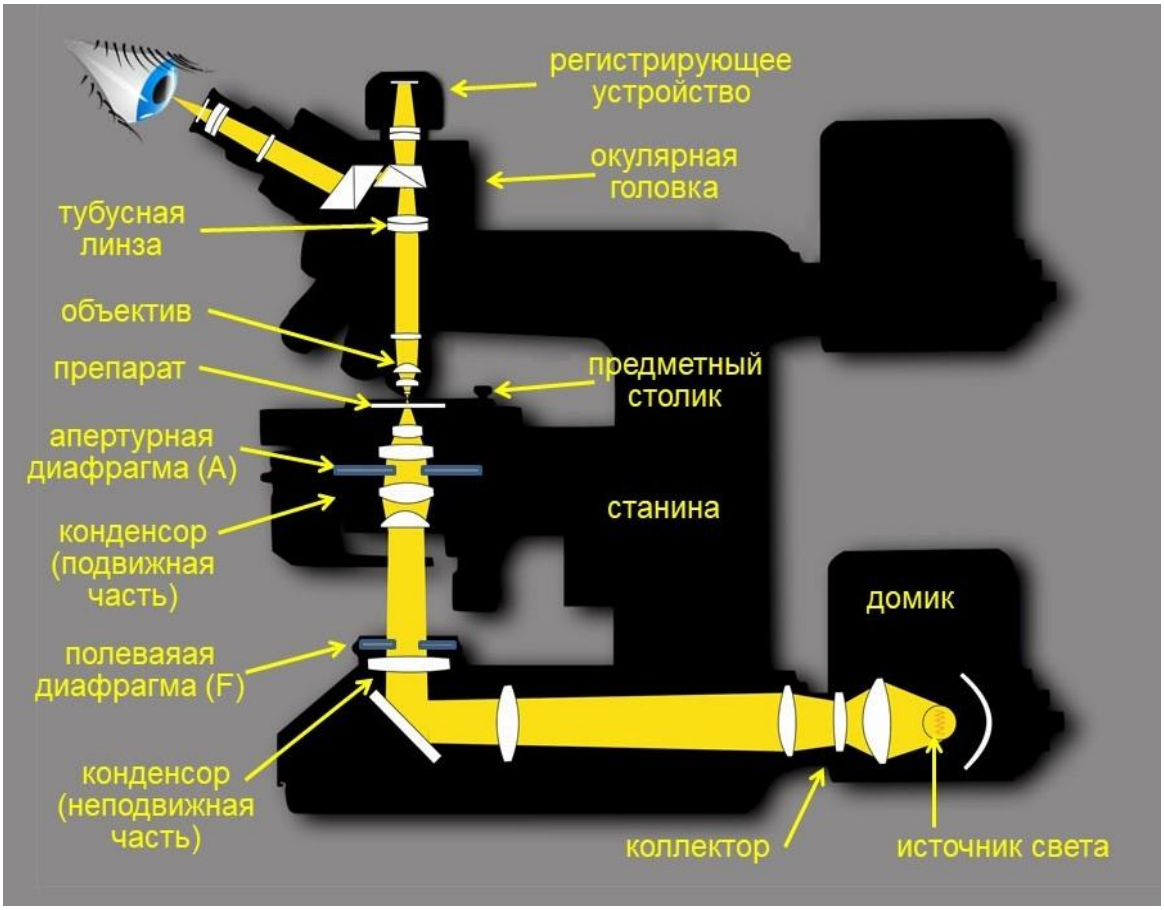


Рис. 25. Принципиальная схема скорректированного на бесконечность микроскопа проходящего света с конденсором Кёлера.

Далее располагаются оптические элементы, собирающие свет от источника и направляющие его на препарат – это **коллектор** и **конденсор**. Конденсор, обычно это конденсор Кёлера (см. далее), состоит из двух частей – неподвижной и подвижной – и обязательно

имеет две ирисовые **диафрагмы**. Одна из них, находящаяся в неподвижной части, называется **полевой** и обозначается буквой **F** (**Field**), а другая находится в подвижной части, называется **апертурной** и обозначается буквой **A** (**Aperture**). Конденсор формирует пучок света и проецирует его на **препарат**, который помещается в специальный держатель на **предметный столик**.

Далее располагается револьвер с набором объективов. О**бъектив** формирует увеличенное изображение и проецирует его на **тубусную линзу** в **окулярную головку**. Окулярная головка направляет изображение в окуляры или на **регистрирующее устройство** (Рис. 25).

Микроскопы комплектуются двумя принципиально разными типами конденсоров – это **конденсор Аббе** (конденсор критического освещения) и **конденсор Кёлера** (план-ахроматический конденсор) (Рис. 26). Конденсор Аббе состоит из двух линз и одной ирисовой диафрагмы, при этом, сферические и хроматические аберрации света в нем не исправлены.

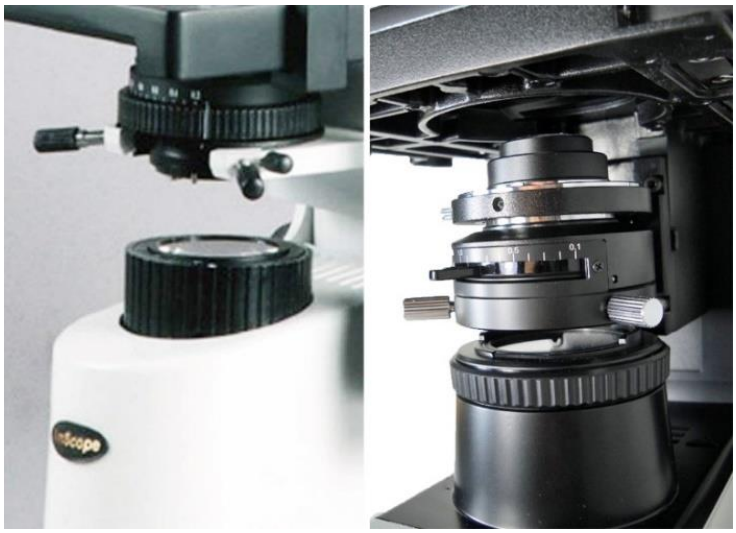


Рис. 26. Внешний вид одного из вариантов конденсора Аббе (слева) и конденсора Келера (справа).

Он намного проще по устройству и дешевле, но не обеспечивает качество освещения объекта, необходимое для получения удовлетворительного оптического разрешения. Конденсорами Аббе комплектуются только дешевые учебные и лабораторные микроскопы.

Немецкий биолог Август Кёлер, работая на микроскопах Zeiss, усовершенствовал конденсор системы освещения. Ахроматические конденсоры Кёлера гораздо сложнее, они имеют до восьми линз, в них исправлены сферические и хроматические аберрации, и в их составе две ирисовые диафрагмы (полевая и апертурная). Настройка этого конденсора «**настройка света по Кёлеру**» является важнейшим этапом при начале работы на микроскопе проходящего света (см. далее).

Для примера на рисунке 27 показаns управляющие элементы микроскопа проходящего света.

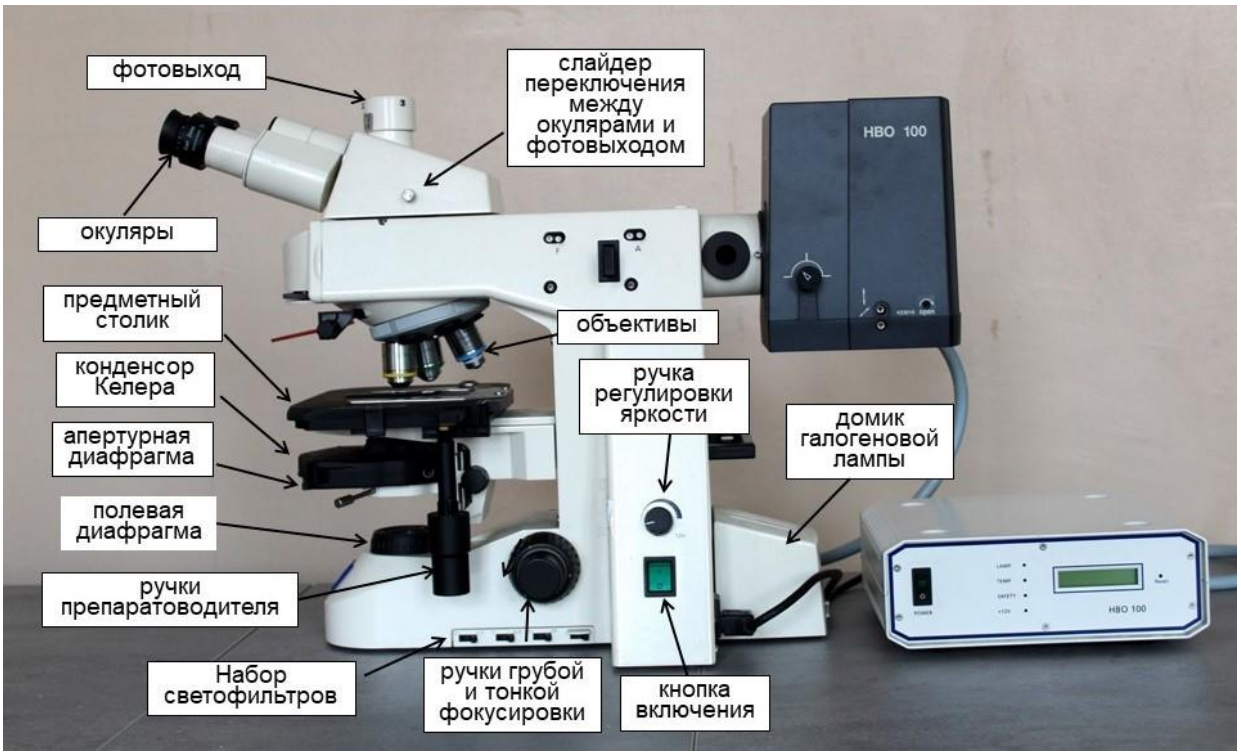


Рис. 27. Управляющие элементы микроскопа проходящего света с конденсором Кёлера на примере Zeiss Axioskop 40. Для начала работы необходимо включить галогеновую лампу, отрегулировать ее яркость, настроить освещение (см. далее) и можно приступить к работе.

10. СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ

10-1. Микроскопия светлого поля.

Это первый из разработанных методов; при его использовании свет от источника проходит сквозь микроскопический препарат и далее идет в объектив микроскопа. При этом важное значение имеют маленькая толщина препарата и его окраска, поскольку прозрачные биологические объекты будут плохо видны или не видны вовсе.

Поскольку все изображение объекта при работе по методу светлого поля формируется пучком света, прошедшим от источника света до регистрирующего прибора (глаз или камера), то важнейшей частью работы является правильная настройка системы освещения. Поэтому, начиная работу, необходимо предварительно выполнить «**настройку освещения по Кёлеру**», если, конечно, микроскоп оснащен конденсором Кёлера.

Дело в том, что любой источник света имеет свою структуру (например, нить накаливания, форма светодиода, или пылинки на колбе лампы), а значит идущий от него световой пучок будет неоднородным. После того, как световой пучок пройдет сквозь объект, информация о структуре источника смешается с информацией о структуре объекта, внося искажения, и отделить одно от другого будет невозможно. Значит, необходимо, чтобы свет от каждой точки источника равномерно заливал плоскость резкости. Это и делает конденсор Кёлера. Он позволяет равномерно осветить проходящим светом поле зрения микроскопа и обеспечить оптимальный контраст и разрешение. При неправильной его настройке неизбежно ухудшатся разрешение и контрастность изображения, а также появятся артефакты.

Для настройки освещения по Кёлеру конденсор должен иметь две настраиваемые ирисовые диафрагмы: апертурную диафрагму в конденсоре, который расположен под предметным столиком и может перемещаться вверх и вниз, и полевую диафрагму, расположенную в неподвижной части конденсора ближе к источнику света. Апертурная диафрагма изменяет апертурный угол выходящего из конденсора света, мы не увидим ее границы, глядя в микроскоп, но увидим их, если будем смотреть в тубус, убрав окуляр. Полевая диафрагма меняет площадь проходящего через препарат света, и мы видим ее границы. Если в конденсоре только одна диафрагма, то это конденсор Аббе и настройка света по Кёлеру невозможна.

Смысл работы конденсора Кёлера состоит в том, что, если поместить источник света в плоскость **переднего фокуса конденсора** (апертурная плоскость или плоскость апертурной диафрагмы, Aperture Plane), а объект исследования в **плоскость заднего фокуса конденсора** (полевая плоскость или плоскость полевой диафрагмы, Field Plane), то лучи от каждой точки источника будут проходить полевую плоскость параллельно (см. ранее свойства линз) и информация о его структуре в этой плоскости будет отсутствовать. Из информации об осветителе там будут только его цвет и яркость.

Для настройки освещения по Кёлеру необходимо перед началом работы идентифицировать управляющие элементы. Нам понадобятся управляющие элементы, показанные на рисунке 28. Затем необходимо произвести настройку, состоящую из пяти шагов (последовательность фиксированных действий), как показано на рисунке 29.

Пояснения к настройке: После того, как мы навели на резкость и, перемещая конденсор вверх и вниз, добились резкого изображения его полевой диафрагмы, мы совместили заднюю фокальную плоскость конденсора, в которой находится полевая диафрагма, с плоскостью резкости микроскопа. При этом передняя фокальная плоскость конденсора, в которой находится апертурная диафрагма, совместилась с задним фокусом объектива.

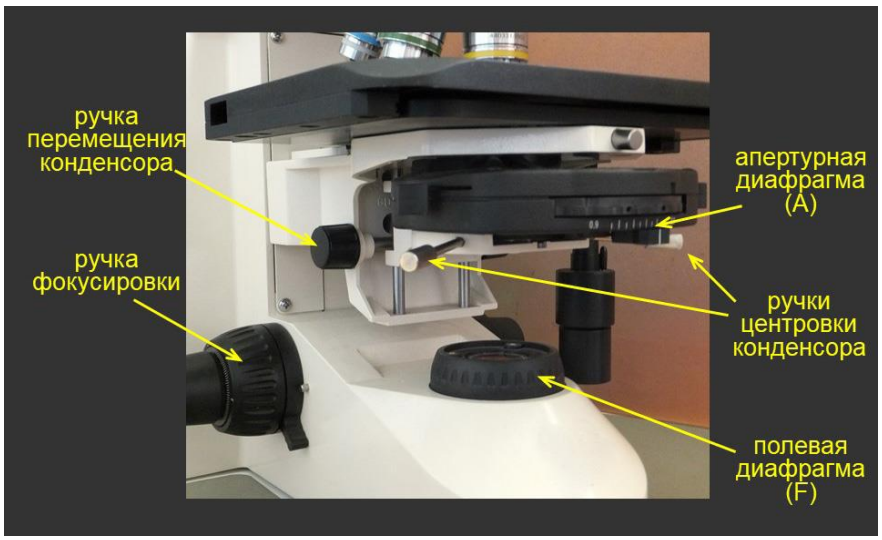
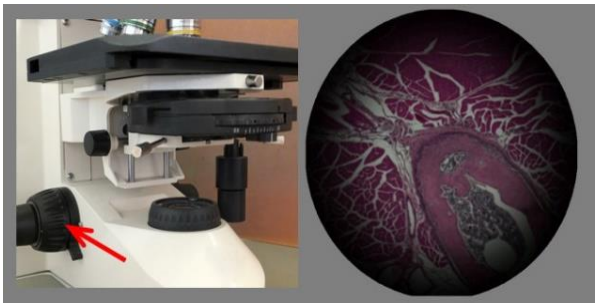
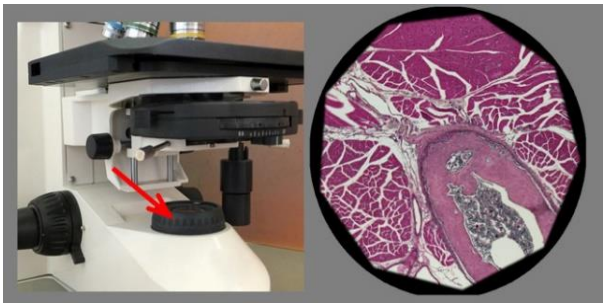


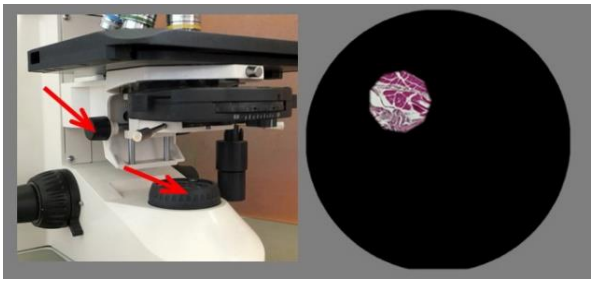
Рис. 28. Управляющие элементы микроскопа для настройки освещения по Кёлеру при работе в проходящем свете.



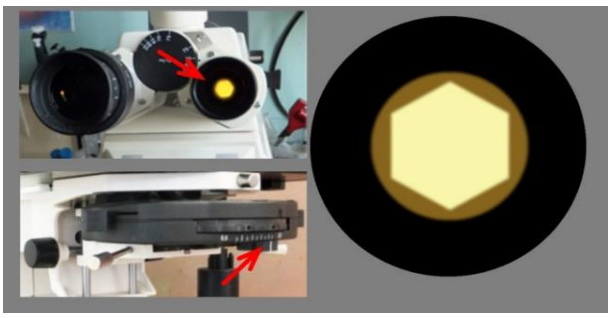
1. Поместить на предметный столик препарат, установить малое увеличение и навести на резкость.



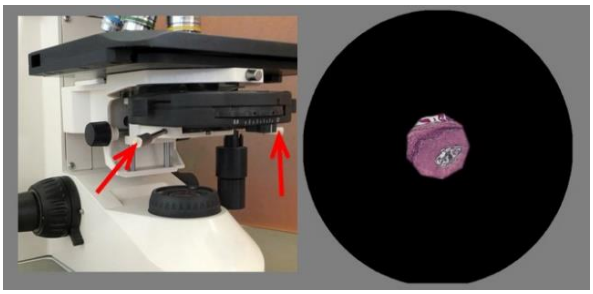
4. Глядя в окуляры, открыть полевую диафрагму по полю зрения или чуть меньше.



2. Прикрыть ирисовую полевую диафрагму конденсора и, перемещая конденсор вверх и вниз, добиться максимально резкого изображения ее границ.



5. Вынуть окуляр. Глядя в тубус без окуляра, открыть апертурную диафрагму конденсора приблизительно на 3/4 - 4/5 поля зрения.



3. При необходимости установить изображение полевой диафрагмы в центр поля зрения центровочными винтами.

Рис. 29. Последовательные стадии настройки освещения по Кёлеру при работе в проходящем свете. Слева красными стрелками указаны управляющие элементы. Справа то, что видно в микроскоп. Пояснения в тексте.

Вынув окуляр, мы видим задний фокус объектива и границы апертурной диафрагмы конденсора. Открыть апертурную диафрагму конденсора не полностью, а приблизительно на 3/4 - 4/5 поля зрения нужно для того, чтобы исключить из формирования изображения края линз объектива, которые вносят наибольшие искажения.

Теперь освещение настроено. Можно вставить на место окуляр и приступить к работе. При переходе на другое увеличение объектива желательно проверить настройку освещения. При переключении на большое увеличение необходимо прикрывать полевую диафрагму конденсора под размер поля зрения. Освещать объект вне поля зрения нежелательно, поскольку свет от находящихся там структур будет отражаться или преломляться и засвечивать структуры внутри поля зрения с боков, снижая контрастность изображения и разрешение по краям поля зрения.

Важно помнить, что при работе по методу светлого поля яркость освещения можно регулировать только, меняя яркость источника света или вводя в ход лучей нейтральные светофильтры. Регулировка яркости при помощи диафрагм конденсора не допускается.

10-2. Контрастирование неокрашенных биологических объектов.

Видимый свет имеет четыре основные характеристики: длина волны (цвет), амплитуда (яркость) фаза волны и плоскость поляризации. При этом, и наш глаз, и регистрирующие сенсоры фото и видеокамер видят только длину волны и амплитуду. Однако многие биологические объекты прозрачны, но изменяют фазу и/или плоскость поляризации проходящего сквозь них света, а также преломляют прошедший сквозь них свет или частично отражают его. Методы контрастирования призваны трансформировать перечисленные изменения в изменения амплитуды и частоты, то есть, сделать прозрачные биологические объекты хорошо видимыми. Таких методов известно довольно много. Самые распространенные из них - это микроскопия темного поля, фазово-контрастная микроскопия, поляризационная микроскопия, дифференциально-интерференционная микроскопия и модуляционный контраст Хоффмана. Рассмотрим их подробнее.

10-2-1. Микроскопия темного поля.

Принцип метода состоит в том, что объект освещается косым светом сверху через специальный объектив (**темное поле в отраженном свете)** или снизу через конденсор (**темное поле в проходящем свете**), и в объектив микроскопа попадает только свет, преломленный или отраженный объектом.

В первом случае для освещения объекта используется специальный осветитель (опак-иллюминатор) в комплекте с зеркально-линзовым **эпиобъективом**, который играет роль и объектива, и осветителя. Из цилиндра, окружающего линзовую систему эпиобъектива, выходит полый конус света, при этом, свет, отраженный от плоской поверхности, не попадает в объектив, а свет, отклоненный или рассеянный объектом, попадает (Рис. 30).

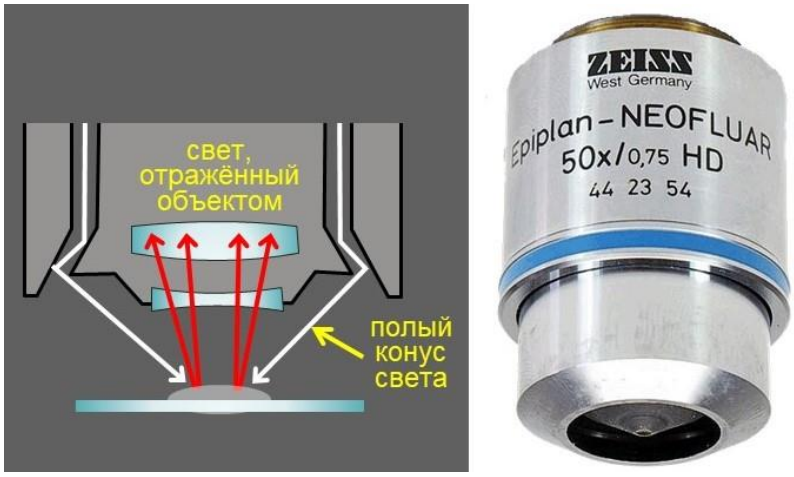


Рис. 30. Слева: принципиальная схема метода микроскопии темного поля в отраженном свете. Специальный эпиобъектив служит и для освещения объекта, и для регистрации изображения. Справа: эпиобъектив Zeiss Epiplan. Пояснения в тексте.

При работе методом темного поля в проходящем свете используются обычные объективы, но требуется специальная вставка в конденсор. После настройки освещения по Кёлеру в конденсор для работы методом светлого поля помещается заглушка, имеющая прорезь в виде круга (opaque disc). Прошедший сквозь эту прорезь свет имеет форму расходящегося полого конуса и проходит мимо объектива микроскопа. В объектив попадает только свет, преломленный или рассеянный объектом (Рис. 31).

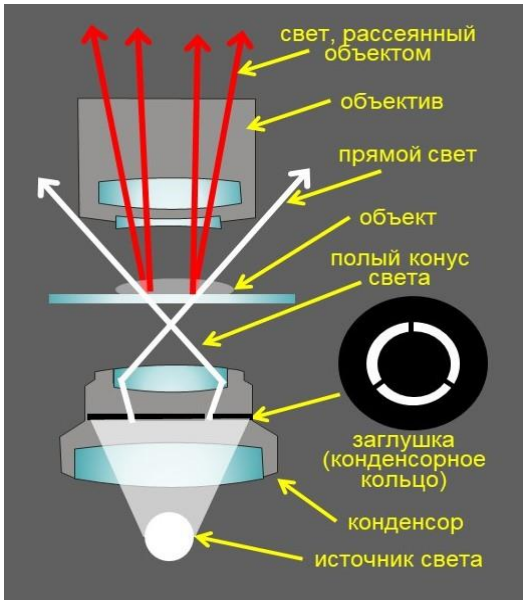


Рис. 31. Принципиальная схема метода микроскопии темного поля в проходящем свете. Пояснения в тексте.

При отсутствии специального эпиобъектива или заглушки в конденсор можно просто осветить объект косым направленным светом под углом к оптической оси микроскопа, например, используя осветитель для стереомикроскопа или обычный фонарик. Разумеется, надо учитывать, что оптическое разрешение при этом ухудшится. На рисунке 32 показан пример освещения по методу темного поля в отраженном свете.

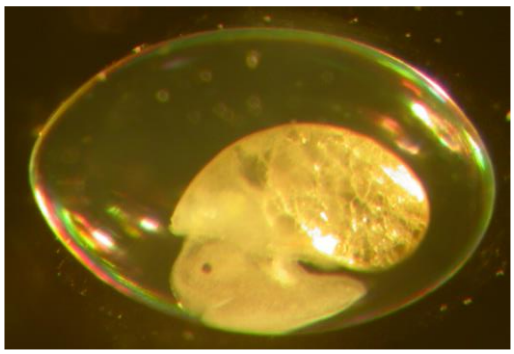


Рис. 32. Эмбрион большого прудовика *Lymnaea stagnalis*, сфотографированный в микроскопе методом темного поля в отраженном свете при косом освещении.

10-2-2. Фазовый контраст.

Фазово-контрастные микроскопы широко используются при работе с культурами клеток, поскольку позволяют наблюдать в микроскоп живые клетки непосредственно в пластиковых контейнерах или чашках Петри. За изобретение этого метода голландскому физику Фрицу Цернике в 1953 году была присуждена Нобелевская премия.

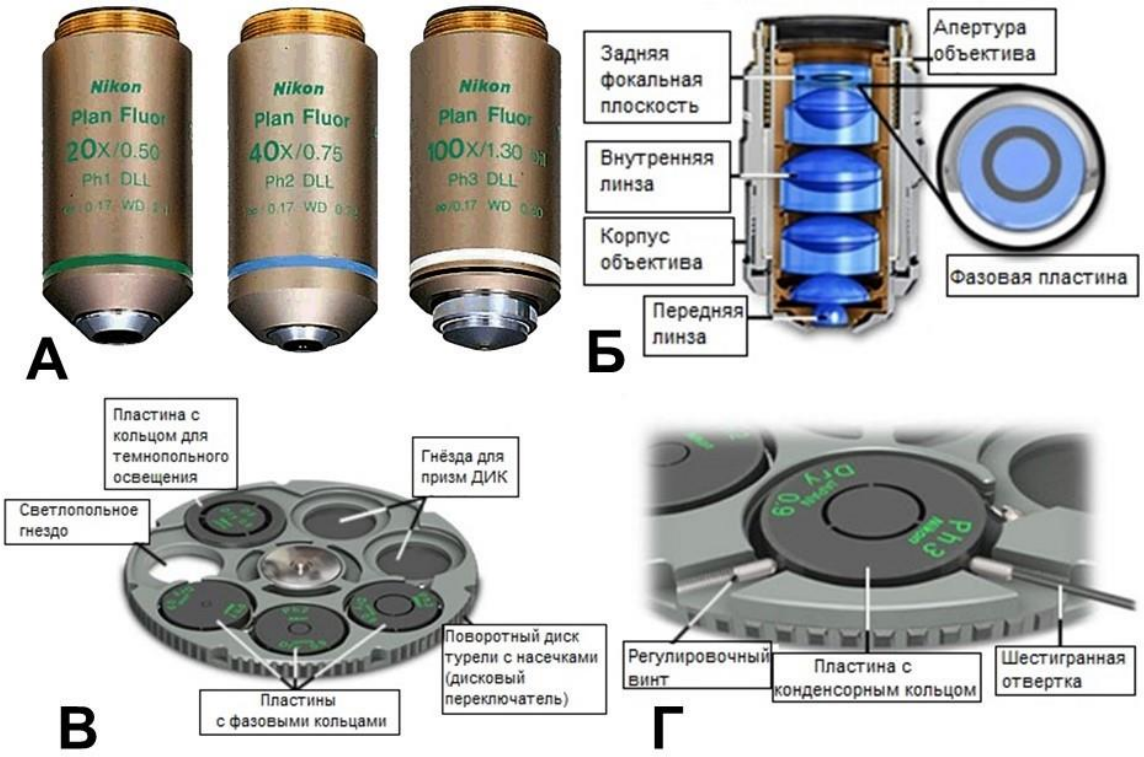


Рис. 33. Элементы микроскопа для работы методом фазового контраста. А – Объективы Ph1, Ph2 и Ph3). Б – Устройство фазово-контрастного объектива с фазовой пластинкой. В – Револьвер конденсора с фазовыми заглушками (металлические пластины с кольцевыми щелями). Г – Отдельная заглушка для объектива Ph3 с регулировочными винтами. Из stormoff.ru/mediacenter.

Для работы по методу фазового контраста нужны специальные объективы и заглушки в конденсор (Рис. 33). Производители выпускают множество различных объективов для фазового контраста, которые различаются по знаку (позитивный или негативный контраст) и степени контрастирования (от низкой до очень высокой). Чаще всего используется позитивный контраст, когда объекты видны на светлом фоне темными с более светлыми краями. При негативном контрасте объекты видны светлыми на темном фоне.

Объективы имеют надписи зеленого цвета и обозначения **Ph1**, **Ph2**, или **Ph3**, после которых идет аббревиатура, говорящая о степени контрастирования, например**, DL, DLL, ADL**, **DM** (dark low, dark low low, apodized dark low, dark medium) на объективах положительного контраста, или **NL**, **NM**, **BM**, **NH** (Negative Low, Negative Medium, Bright Medium, Negative High) на объективах отрицательного контраста. Подробно о технике фазового контраста можно прочитать на microscopyu.com/techniques/phase-contrast.

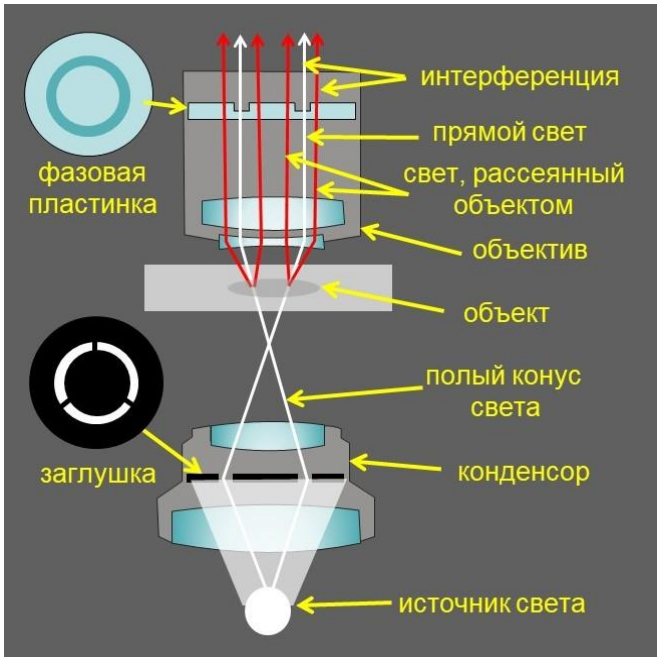


Рис. 34. Принципиальная схема метода фазового контраста. Пояснения в тексте.

Принцип работы фазово-контрастного микроскопа состоит в следующем (Рис. 34). В ход лучей вводится специальный объектив для фазового контраста, имеющий обозначение Ph1, Ph2, или Ph3. После настройки освещения проходящего света по Кёлеру мы поворачиваем револьвер заглушек в конденсоре и вводим в ход лучей **заглушку**, имеющую прорезь в виде кольца (аналогично заглушке для темного поля). Выходящий из конденсора свет имеет теперь форму полого конуса. Заглушки имеют прорези трех разных диаметров (1, 2 и 3) и каждая соответствует своему объективу Ph1, Ph2 и Ph3.

Объективы для фазового контраста имеют в плоскости заднего фокуса **фазовую пластинку**, которая представляет собой плоскую стеклянную пластину, в которой проточена кольцевая канавка (фазовое кольцо). Скорость света в стекле меньше, чем в воздухе, и глубина канавки рассчитана так, что свет, проходящий сквозь нее, опережает остальной свет по фазе на $\pi/2$ (или ¼ длины волны). Дно канавки покрыто алюминием и задерживает примерно 70% проходящего сквозь нее света.

Если на пути света нет объекта, то полый конус света, прошедший сквозь заглушку в конденсоре, попадает на фазовое кольцо, и все поле зрения будет равномерно серым. В случае, когда на пути света есть объект, свет, рассеянный объектом, частично проходит мимо фазового кольца, отставая по фазе на π/2, и на выходе происходит интерференция лучей, прошедших через фазовое кольцо и миновавших его, приводящая к изменению амплитуды.

Таким образом, для работы по методу фазового контраста необходимо:

1) ввести в ход лучей объектив, имеющий обозначение Ph1, Ph2, или Ph3;

2) настроить освещение по Кёлеру;

3) Поворачивая барабан конденсора, ввести в ход лучей заглушку, соответствующую выбранному объективу (номер 1, 2, или 3);

4) Вынуть окуляр и, глядя в тубус, убедиться, что светлое кольцо (прорезь в заглушке) и темное кольцо (фазовая пластинка) полностью перекрываются. Если светлое кольцо смещено, необходимо отцентрировать его винтами центровки конденсора (Рис. 35). Если светлое и темное кольцо имеют разный диаметр, значит выбрана заглушка, не соответствующая объективу.

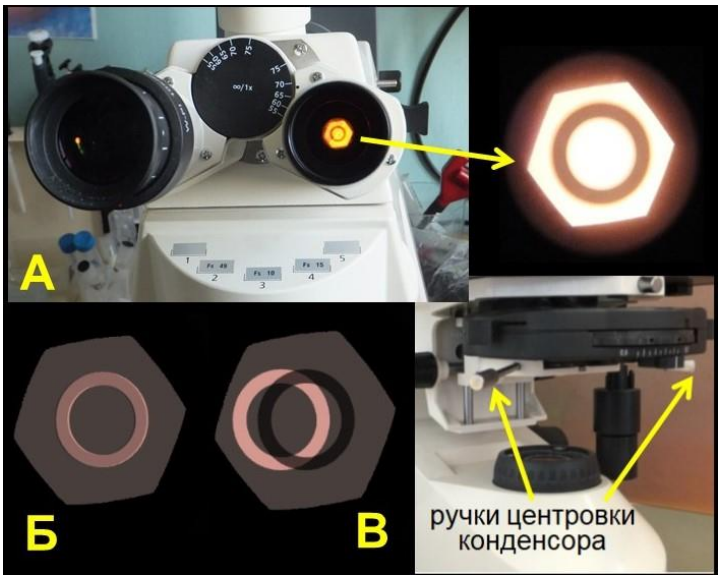


Рис. 35. Настройка микроскопа для работы методом фазового контраста. А – при вынутом окуляре видна фазовая пластинка в заднем фокусе объектива. Б. При введенной в ход лучей заглушке конденсора светлое и темное кольцо полностью перекрываются - фазовый контраст настроен. В – заглушка децентрирована, необходимо установить ее в центр ручками центровки конденсора.

В некоторых моделях микроскопов используются дополнительные оптические системы для точного совмещения прорези в заглушке конденсора и фазового кольца объектива. Это фазовый телескоп и линза Бертрана (последняя используется в основном в поля ризационных микроскопах). Фазовый телескоп вставляется в окулярное гнездо вместо окуляра и фокусируется на задний фокус (выходной зрачок) объектива, а значит в него будут четко видны фазовое кольцо и кольцо диафрагмы.

При правильно настроенном фазовом контрасте прозрачные объекты приобретают высокую контрастность, а мелкие детали становятся хорошо видны (Рис. 36). Однако, работая с фазово-контрастным микроскопом, пользователь должен учитывать тот факт, что фазово-контрастная оптика создает определенные искажения объекта (артефакты), которые могут затруднить интерпретацию изображений и привести к неверным выводам. Это эффекты **гало** и **перехода контраста**. Гало – это яркие ореолы вокруг объектов (клетки, ядра и т.д.), а переход контраста – это несоответствие наблюдаемой оптической плотности объекта его реальной плотности. Например, у больших протяженных объектов центральная часть приближается по плотности к фону, искажая восприятие наблюдателем формы объекта.

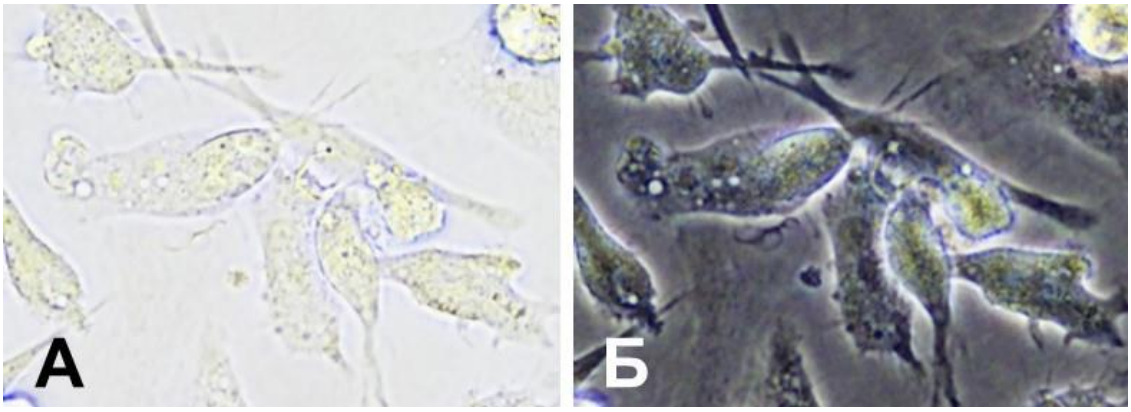


Рис. 36. Культура клеток в чашке Петри при работе методом светлого поля (А) и фазового контраста (Б).

Необходимо помнить, что фазовая пластинка в фазово-контрастном объективе ухудшает его разрешение, поэтому использование объективов с маркировкой Ph для других методов микроскопии нежелательно.

10-2-3. Поляризационный контраст.

Метод основан на том, что некоторые биологические структуры обладают способностью изменять **плоскость поляризации** проходящего сквозь них света (миофибриллы, волокна коллагена и др.). Существуют материалы, пропускающие световую волну, поляризованную лишь в определенной плоскости – **поляризационные фильтры**. Для поляризационного контраста необходимо включить в ход лучей два поляризационных фильтра, один из которых (**поляризатор**) установлен в конденсоре, а другой (**анализатор**) за объективом микроскопа (Рис. 37). При этом, анализатор поляризует свет в плоскости, перпендикулярной поляризатору (перекрест), а значит свет, прошедший через поляризатор, будет остановлен анализатором (Рис. 37, левый луч). Однако, если на пути поляризованного света окажется объект, который повернет плоскость поляризации части прошедшего сквозь него

света (правый луч), то этот свет пройдет сквозь анализатор. Пример изображения, полученного методом поляризационного контраста, приведен на рисунке 38.

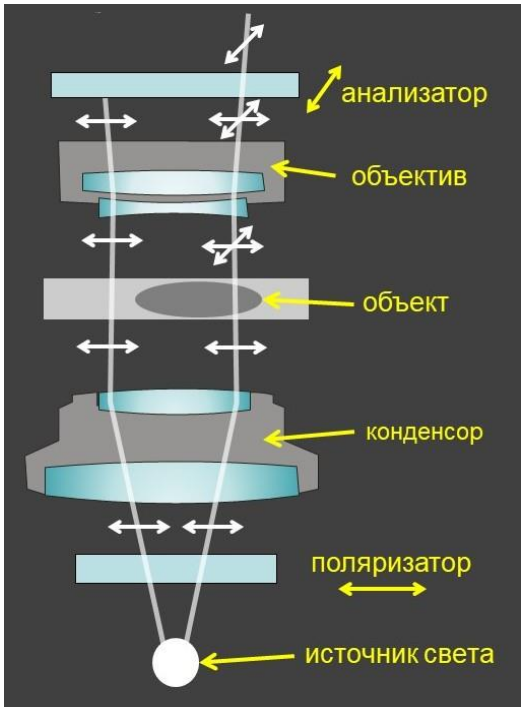


Рис. 37 (слева). Принципиальная схема работы поляризационного контраста. Пояснения в тексте.

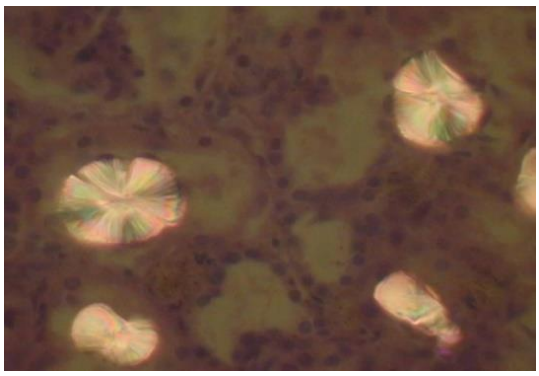


Рис. 38 (вверху). Кристаллы оксалатов при отравлении этиленгликолем, выявленные методом поляризационного контраста. Из: labx.narod.ru/documents/polarizing_microscope.html

Для работы по методу поляризационного контраста необходим микроскоп с поляризационным объективом (красные надписи и маркировка Pol), поляризатор, установленный в конденсоре, и анализатор, установленный за объективом. Вращение поляризатора или анализатора позволяет менять степень перекреста и подбирать оптимальные условия регистрации объектов.

10-2-4. Дифференциальный интерференционный контраст.

Метод дифференциального интерференционного контраста (**Differential Interference Contrast, DIC**) разработал в 1955 году Джордж Номарский. Этот метод позволяет представить прозрачные структуры в объемном изображении. Идея состоит в том, чтобы заставить интерферировать два луча, проходящие через близко расположенные точки препарата. Если между этими точками есть отличия в показателях преломления или скорости света, то создается разница в фазах. В результате интерференции этих лучей изменяется амплитуда результирующего луча.

Принцип работы DIC микроскопа показан на Рис. 39. Снизу-вверх: свет от источника линейно поляризуется поляризатором и проходит сквозь призму Волластона, иначе называемую **DIC призмой**. Она состоит из двух склеенных между собой прямоугольных призм, из кристаллов кварца, обладающего двойным лучепреломлением. DIC призма расщепляет

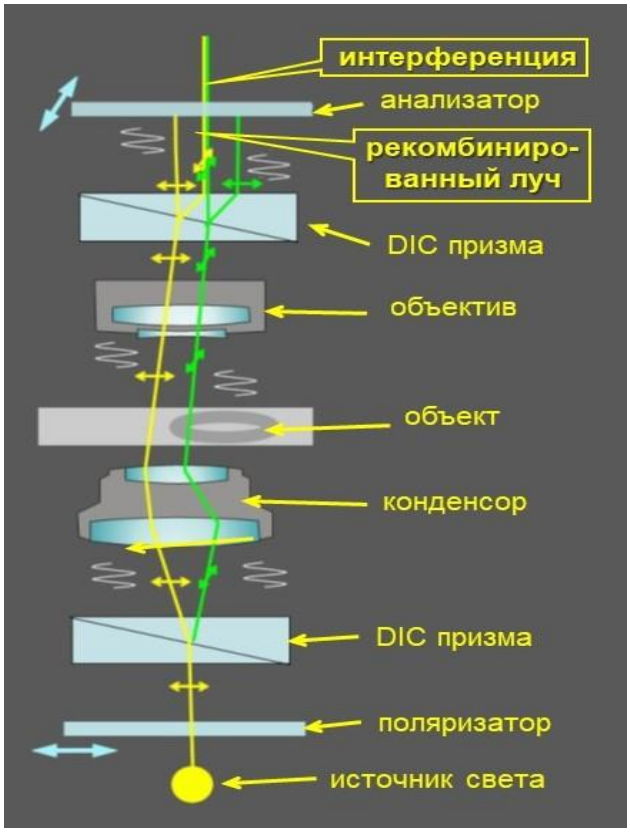


Рис. 39. Принципиальная схема работы дифференциально-интерференционного контраста. Пояснения в тексте.

луч на два (обыкновенный и необыкновенный), которые поляризованы в двух взаимно перпендикулярных плоскостях (желтый и зеленый на Рис. 39).

Проходя сквозь объект в близких друг от друга точках эти лучи могут получить различия по фазе. На Рис. 39 зеленый луч прошел сквозь мембрану клетки, скорость света в которой меньше, чем в окружающей жидкости, и отстал по фазе от желтого. За объективом микроскопа расположена вторая DIC призма, проходя через которую лучи снова расщепляются и соседние лучи совмещаются, образуя так называемый **рекомбинированный луч**. Пройдя через анализатор, они оказываются одинаково поляризованными и интерферируют, преобразуя разность фаз в изменения амплитуды.

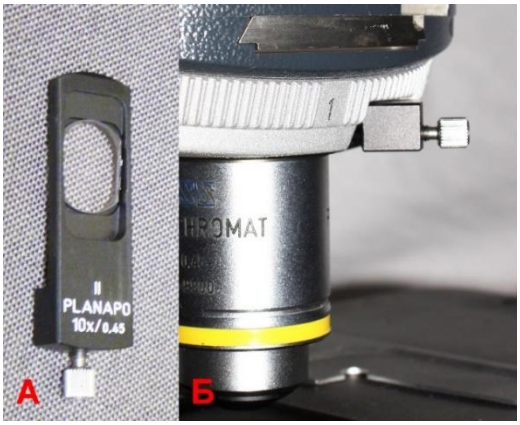


Рис. 40. А – DIC призма с регулировочным винтом для объектива PLANAPO 10x/0.45. Б – DIC призма, вставленная в пазы над объективом.

DIC призма над объективом имеет регулировочный винт (Рис. 40), который позволяет передвигать ее перпендикулярно оптической оси и тем самым изменять степень расщепления и рекомбинации лучей. Чтобы использовать объектив для других методов микроскопии необходимо вынуть DIC призму из пазов, иначе изображения будут двоиться.

Пример изображений, полученных в DIC микроскопе, показан на рисунке 41.

Недостатком DIC контраста является то, что этот метод не работает при использовании пластмассовой посуды для культивации клеток (чашки Петри, планшеты и т.д.), поскольку пластик обладает высокой степенью двойного лучепреломления, и оно вызывает артефакты, которые перекрывают слабые изменения поляризации, производимые самим объектом.

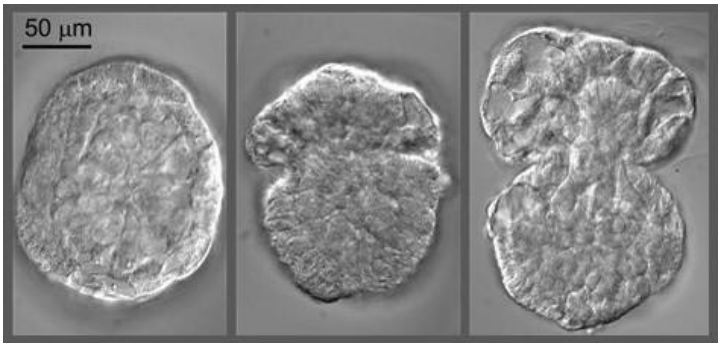


Рис. 41. Последовательные стадии экзогаструляции при нарушении эмбрионального развития у пресноводного моллюска большого прудовика. Съемка методом DIC.

10-2-5. ZEISS PlasDIC.

Чтобы иметь возможность контрастировать прозрачные объекты в пластмассовой посуде, компания ZEISS разработала метод **PlasDIC** как модификацию метода дифференциального интерференционного контраста DIC. Метод PlasDIC, как утверждают разработчики, не требует поляризатора и DIC призмы со стороны конденсора, то есть объект освещается обычным неполяризованным светом (Рис. 42).

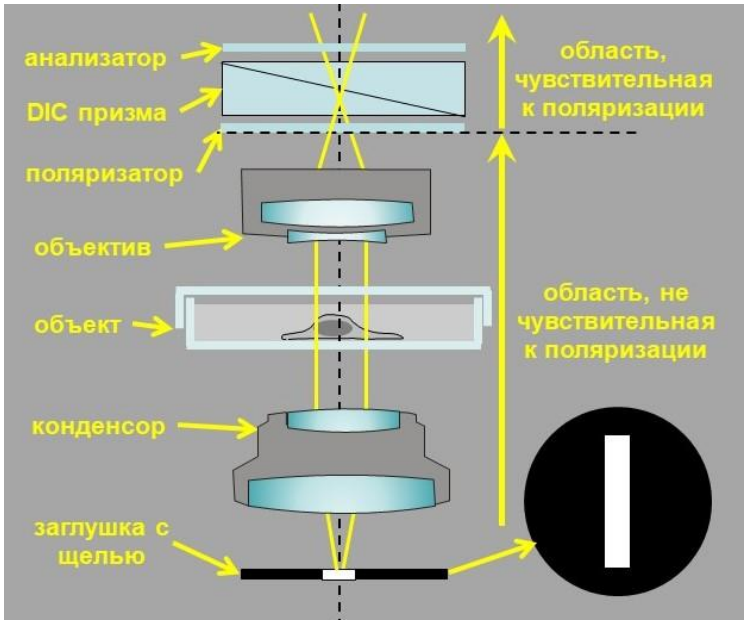


Рис. 42. Принципиальная схема метода PlasDIC. Пояснения в тексте. Область объекта не чувствительна к поляризации, а значит он может располагаться в пластмассовом контейнере.

В конденсоре находится щелевая диафрагма, ширина которой подобрана так, что, отклоняясь на ее краях, световая волна отстает от прямой волны на четверть длины волны. Только пройдя сквозь объект и объектив, свет линейно поляризуется непосредственно перед DIC призмой. Находящийся за DIC призмой анализатор пропускает свет, поляризованный в одной плоскости и поэтому способный к интерференции (Рис. 43). В результате образуется интерференционное изображение, при этом вся область объекта находится вне зоны, чувствительной к поляризации, а значит объекты могут находиться и в стеклянной, и в пластмассовой посуде. Пример изображения, полученного методом PlasDIC, показан на Рис. 44.

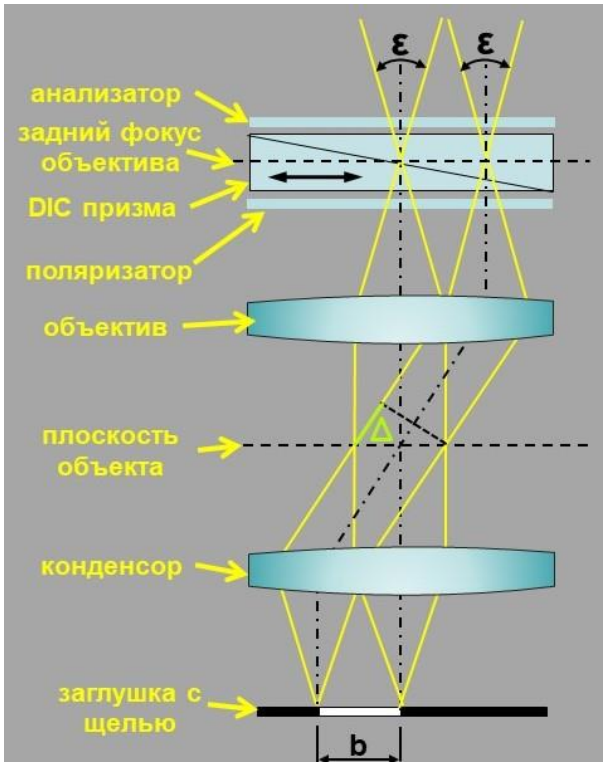


Рис. 43. Принцип работы метода PlasDIC. Неполяризованный свет проходит сквозь находящуюся в переднем фокусе конденсора заглушку с щелевой диафрагмой. Ширина щели (b) подобрана так, что преломленный ее краями свет, освещая объект под углом и проходя больший путь (Δ), отстает по фазе на четверть длины волны (условие λ/4). DIC призма расщепляет лучи на угол ε, и после прохождения анализатора когерентные лучи интерферируют, преобразуя изменения фазы в изменения амплитуды. Из :http://www.zeb-rasc.com/UpImages/200912/P20091224132510.pdf с изменениями.

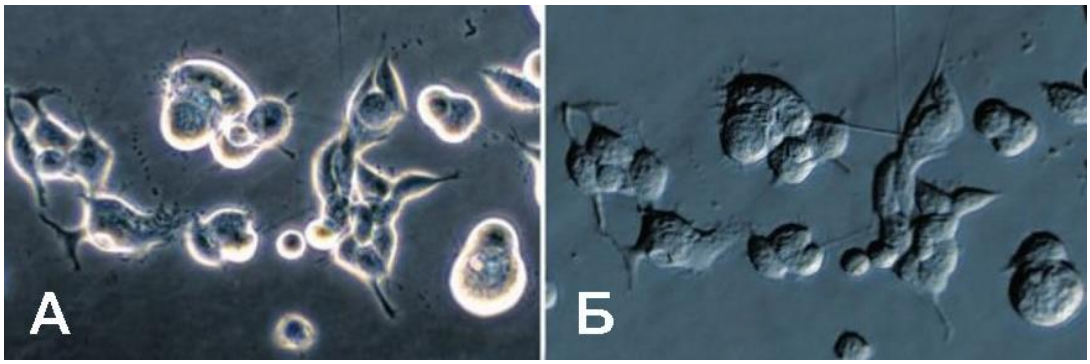


Рис. 44. Клетки HEK, контрастированные методом фазового контраста (А) и методом PlasDIC (Б). Из: https://focuspi.com/ products- solutions/ inverted-bio/plasdic-an-innovative-relief-contrast-for-routine-observation-in-cell-biology

10-2-6. Модуляционный контраст Хоффмана.

Модуляционный контраст был разработан Робертом Хоффманом в 1975 году. Главным его достоинством является то, что здесь не используется поляризованный свет, и этот метод работает и в стеклянной, и в пластиковой посуде. Метод Хоффмана усиливает контраст, преобразуя оптические градиенты рассеяния света в прозрачных не окрашенных объектах в ассиметричные изменения интенсивности света, и при этом создается рельефное псевдо-3D изображение. Принцип модуляционного контраста и пример трехмерного изображения показаны на рисунке 45.

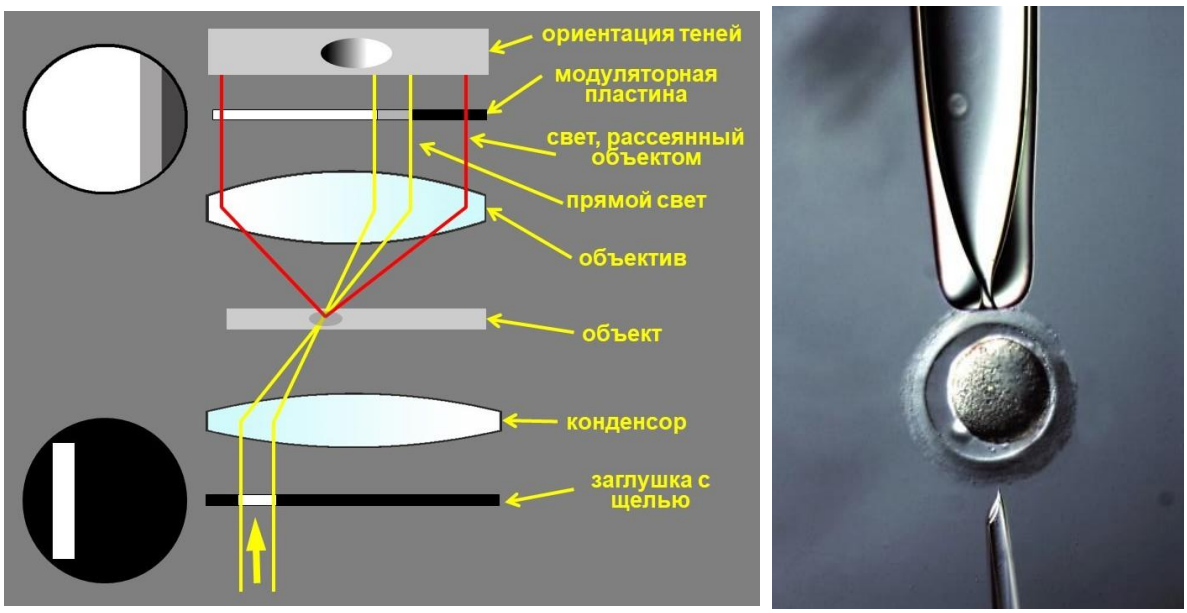


Рис. 45. Модуляционный контраст Хоффмана. А -Принцип работы модуляционного контраста. Пояснения в тексте. Б – пример 3D изображения. Из leica-microsystems.com/science-lab/microscopy-basics/integrated-modulation-contrast-imc/)

В передней фокальной плоскости конденсора располагается заглушка с прорезью в виде щели (щелевой фильтр), обеспечивающая косое и ассиметричное освещение объекта, а в задней фокальной плоскости объектива находится модуляторная пластина (модулятор). В модуляторе имеются три зоны с различной нейтральной оптической плотностью: пропускание 100%, 15% и 1%. Щелевой фильтр расположен так, что, если объекта нет, то весь прошедший сквозь него свет (лучи нулевого порядка) попадает на полосу модулятора с 15% пропусканием. В этом случае все поле зрения будет равномерно серым.

Если на пути света находится объект, то его части, имеющие различный оптический градиент, по-разному преломляют и рассеивают свет. Этот свет собирается объективом и проецируются на модуляторную пластину. Лучи, отклоненные на прозрачную часть пластины, пройдут сквозь нее, и их взаимодействие с прямыми лучами даст отрицательную интерференцию в виде теней. Лучи, попавшие на темную сторону фильтра, будут остановлены и не будут участвовать в построении изображения. В результате, структуры, которые рассеивали свет, получат ассиметричные тени и выглядят объемными.

Поскольку, благодаря косому освещению, объект выглядит объемным, модуляционный контраст используется в биологии и медицине в основном там, где нужны микроманипуляции с клетками, например, при экстракорпоральном оплодотворении или для инъекции пронуклеусов при создании трансгенных животных.

10-3. Флуоресцентная микроскопия.

В XVIII веке было открыто природное явление люминесценции - нетепловое свечение вещества, происходящее после поглощения им энергии возбуждения. Широко используемое в микроскопии явление **флуоресценции** – это частный случай люминесценции. Принцип флуоресцентной микроскопии состоит в том, что источником света является непосредственно сам объект и не просто объект, а определенные вещества или структуры в его составе (структуры интереса). И этот принцип в конце XX и начале XXI века дал мощнейший толчок появлению и развитию новых микроскопических техник, которые значительно расширили наши возможности изучения микромира.

10-3-1. Преимущества флуоресцентной микроскопии.

В чем же преимущества флуоресцентной микроскопии? Микроскопы проходящего и отраженного света способны видеть только структуры, которые имеют линейные размеры больше, чем дифракционный предел для данного объектива, поглощают или отражают свет, поворачивают плоскость поляризации (поляризационная микроскопия), или смещают свет по фазе (все методы фазового контраста). Ничего другого они увидеть не могут. Однако многие биологические структуры не удовлетворяют этим условиям.

Кроме этого к фундаментальным недостаткам микроскопии проходящего света можно отнести то, что красители в микроскопическом препарате, накладываясь, маскируют друг друга, и изображения различных структур перемешиваются. Чтобы этого избежать, необходимо делать серийные срезы толщиной 2-5 мкм и изучать их один за другим, что очень долго и утомительно.

Флуоресцентная микроскопия (окрашивание структур интереса светящимися красками) лишена этих недостатков. Во-первых, линейные размеры объекта могут быть любыми и, если он испускает достаточно света, микроскоп его зарегистрирует. Правда, дифракционный предел никуда не денется, поэтому все объекты, размеры которых меньше дифракционного предела для данного объектива, будут выглядеть равными дифракционному пределу. Но мы их увидим! Аналогично этому, если расстояние между двумя светящимися объектами меньше дифракционного предела, мы увидим их как один объект.

Во-вторых, объект, в котором различные структуры интереса покрашены несколькими разными светящимися красителями, остается прозрачным и их можно регистрировать, возбуждая свечение по очереди. Изображения не накладываются и не маскируют друг друга. Объект может быть толстым и вместо того, чтобы делать серийные срезы, можно делать оптические срезы, просто меняя плоскость фокуса.

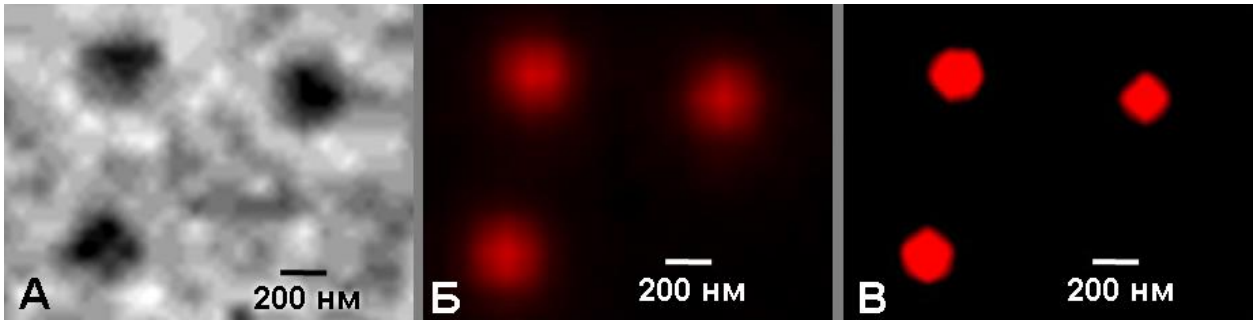


Рис. 46. Микросферы диаметром 200 нм. А - В микроскопе проходящего света. Б - При переключении в режим флуоресцентного микроскопа. В - Рендеринг 50% яркости. Пояснения в тексте.

В-третьих, при размерах объекта, близких к дифракционному пределу, высокая контрастность и то, что изображение строится монохромным свечением самого объекта, позволяет улучшать латеральное разрешение. Для примера рассмотрим изображения микросфер диаметром 200 нм, показанных на рисунке 13. Они способны светиться красным светом при возбуждении зеленым (Рис. 46). При переключении микроскопа с проходящего света (Рис. 46А) на флуоресценцию микросферы выглядят как размытые яркие пятна (Рис. 46Б). Однако, если компьютер обработает изображение, приняв яркость в центре пятна за 100%, а яркость фона за 0%, и удалит все яркости менее 50% от максимальной (рендеринг), то мы увидим изначальные микросферы диаметром 200 нм. Необходимо только помнить, что любая обработка светящихся структур, чьи размеры меньше дифракционного предела, даст размеры, равные дифракционному пределу.

10-3-2. Принцип флуоресцентной микроскопии.

Химические вещества, способные к флуоресценции, называются **флуорохромами** (название fluorochrome произошло от двух слов, fluorite - минерал, способный светиться, и chrome – по-гречески краска). Часть молекулы флуорохрома, непосредственно излучающая кванты света (фотоны), называется **флуорофором**.

Флуорфор способен поглощать кванты света (фотоны). Если поглощенный фотон имеет достаточную энергию, то электрон в флуорофоре переходит на более высокий энергетический уровень. Затем электрон совершает энергетические переходы, сопровождаемые выделением энергии в виде другого фотона, обладающего меньшей энергией (Рис. 47А), а значит большей длиной волны. Смещение длины волны излученного фотона называется смещением Стокса (Рис. 47Б) и именно оно позволяет различать свет, которым возбуждается свечение флуорофора, от испускаемого им света. Для пользователя важно точно знать это смещение, а также спектры возбуждения и испускания для тех флуоресцентных красителей (флуорохромов), с которыми он работает.

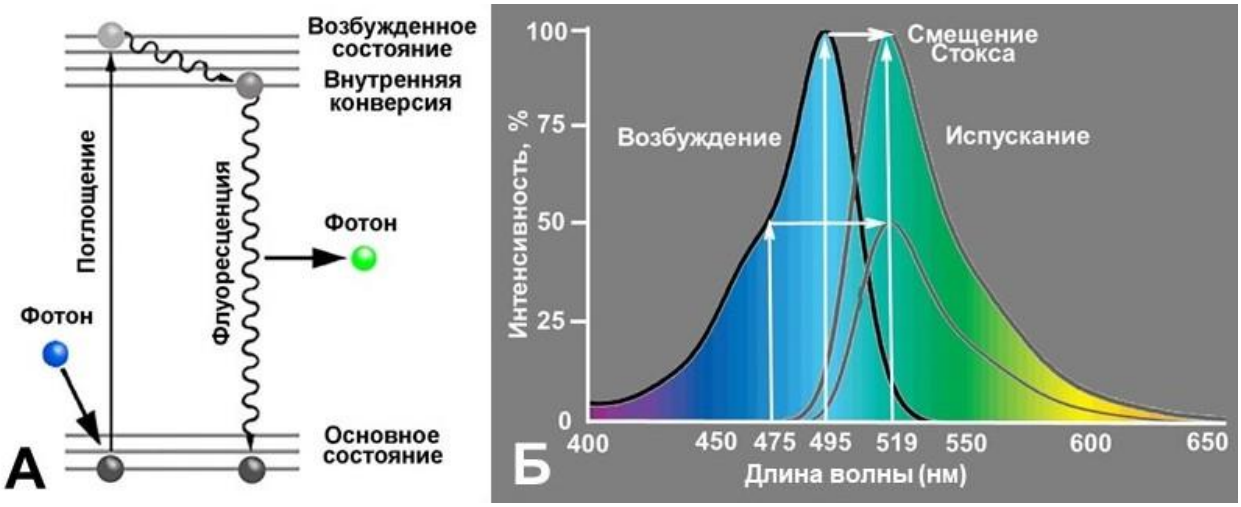


Рис. 47. Физико-химические свойства флуорохромов на примере флуоресцеина (Fluorescein isothiocyanate, FITC,). А - Энергетическая диаграмма Яблонского. Поглотив фотон синего цвета, электрон переходит в возбужденное состояние и возвращается обратно, испуская фотон зеленого света. Б – Спектры возбуждения и испускания флуоресцеина, смещение Стокса. Максимум возбуждения 495 нм лежит в синей области спектра, максимум испускания 519 нм в зеленой. Обратите внимание, что если возбуждать флуоресцеин светом с той же энергией (яркостью), но с длиной волны 474 нм, то интенсивность испускания (фотонный выход) уменьшится вдовое.

Итак, принцип флуоресцентной микроскопии состоит в том, что структуры интереса маркируются флуорохромом. Флуорохром, например, флуоресцеин, прозрачен, но при облучении синим светом начинает светиться зеленым (Рис. 48). Таким образом, поставив на пути белого света синий светофильтр (возбуждающий), и наблюдая свечение сквозь зеленый светофильтр (запирающий), чтобы отсечь отраженный синий свет и свечение любых других веществ, мы увидим только свечение флуоресцеина.

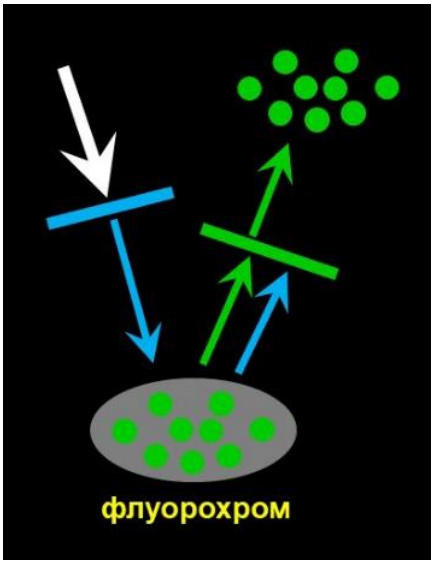


Рис. 48. Принцип визуализации флуорохрома на примере флуоресцеина. Пояснения в тексте.

Можно пометить разные структуры интереса разными флуорохромами, главное, чтобы они или возбуждались, или светились светом с различной длиной волны. Тогда, меняя пару возбуждающий и запирающий светофильтр, мы сможем регистрировать свечение каждого флуорохрома по очереди, и эти окраски не будут ни перекрываться, ни мешать друг другу.

Таким образом, главные преимущества флуоресцентной микроскопии – это повышение разрешения и отсутствие перекрывания красителей, поскольку источником света являются сами структуры интереса.

10-3-3. Осветители в флуоресцентной микроскопии.

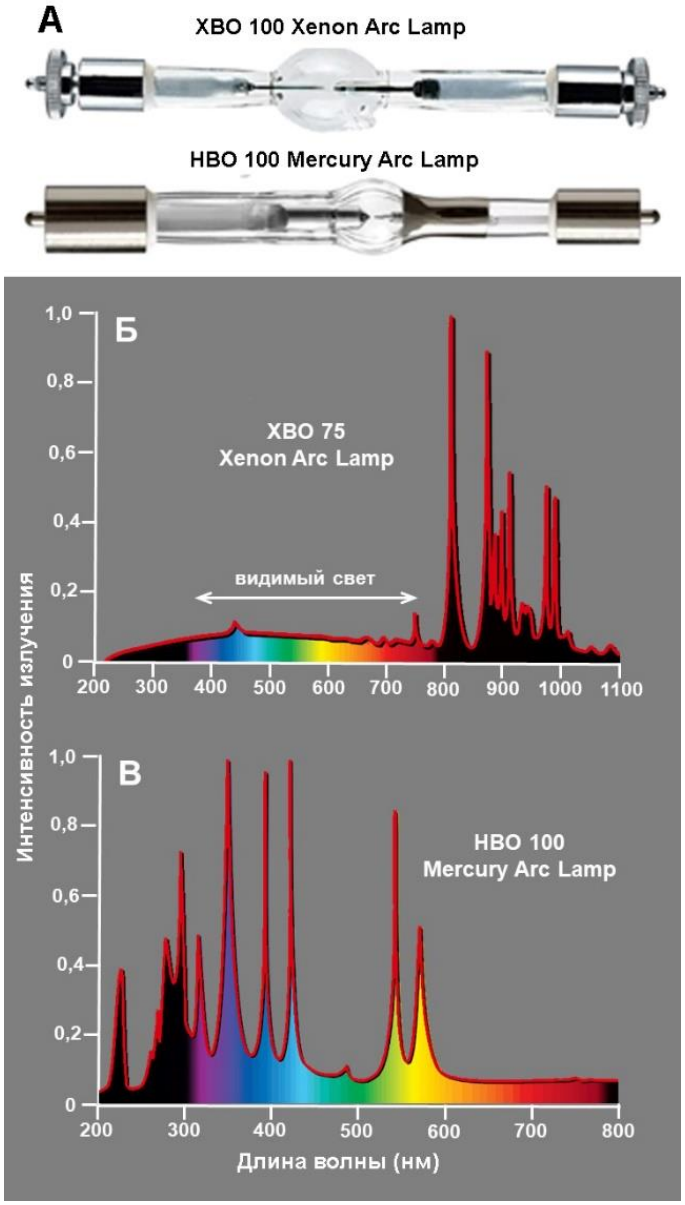


Рис. 49. Лампы для возбуждения флуоресценции. А – Внешний вид ксеноновой и ртутной лампы, используемых в флуоресцентных микроскопах. Б, В - Интенсивность излучения ксеноновой и ртутной ламп в различных областях спектра (из: zeiss-campus.magnet.fsu.edu).

В микроскопии используются тысячи флуорохромов, которые возбуждаются светом с длиной волны от ультрафиолетового до инфракрасного. Поэтому для их возбуждения надо иметь мощный источник света с очень широким спектральным диапазоном. В микроскопах чаще всего используются **ксеноновые** (Xenon) или **ртутные** (Mercury) **дуговые разрядные лампы** (Рис. 49).

И те, и другие представляют собой шарообразную колбу из особо прочного жаростойкого кварцевого стекла с двумя электродами (Рис. 49А). Для облегчения зажигания лампы сбоку в шар может быть впаян третий электрод поджога. В колбе находится или газ ксенон под высоким давлением, или аргон и капля ртути. При зажигании между электродами возникает электрическая дуга, колба раскаляется, и ксенон или пары ртути начинают светиться. Оба типа ламп имеют мощный световой поток, но ксеноновые лампы очень слабо излучают свет в коротковолновой области спектра, поэтому не пригодны для работы с флуорохромами, требующими для возбуждения UV, фиолетовое или синее излучение (Рис. 49Б).

Ртутные лампы наоборот имеют мощное излучение в UV области, но слабо светят в длинноволновой части спектра (Рис. 49В), поэтому непригодны для флуорохромов, которые возбуждаются в оранжево-красной части спектра. Сейчас, вместо ртутных ламп часто

используют **металл-галогенидные** (Metal Halide) лампы. Их внешний вид и характеристики схожи с ртутными лампами, но они имеют более высокую яркость и больший срок службы.

Спектр испускания лампы необходимо учитывать при выборе флуорохромов для приготовления препаратов. Несоответствие лампы и спектра возбуждения флуорохрома приведет к тому, что не удастся заставить его светиться.

Необходимо также помнить, что дуговые лампы имеют определенный срок службы, который обязательно указывается производителем. Ограничение срока службы связаны с тем, что в процессе работы при высокой температуре (до 600°C) стеклянная колба лампы постепенно становится хрупкой. Использовать лампы сверх этого срока категорически запрещается, поскольку возникает опасность ее взрыва. Ртуть очень ядовита! Если взорвется ртутная лампа, помещение будет загрязнено парами ртути, и необходимо будет немедленно эвакуировать персонал и проводить демеркуризацию (удаление ртути со всех поверхностей). Если нет возможности вызвать специальную службу для демеркуризации, необходимо, надев противогаз и защитную одежду, собрать и герметизировать все осколки и протереть все поверхности раствором хлорного железа.

Ксенон не ядовит, но давление в работающей ртутной или ксеноновой лампе очень велико (30 атмосфер и выше), поэтому при взрыве осколки неизбежно разобьют стеклянные элементы осветителя и коллектора. Ни в коем случае нельзя включать флуоресцентный осветитель при снятом кожухе, поскольку при взрыве ртутной или ксеноновой лампы осколки раскаленного стекла полетят в окружающих людей.

Современные флуоресцентные микроскопы имеют встроенный таймер, показывающий время работы лампы и в большинстве из них таймер не позволит включить лампу

Из этого следует важный вывод: не оставляйте лампу включенной без дела. Однако надо помнить, что после выключения лампа должна остыть, иначе она не включится (горячий проводник имеет более высокое сопротивление). То-есть, если вы прекращаете работу на 10-20 минут, то лампу надо оставить включенной, а если на большее время, то ее надо выключать.

Итак, дуговые разрядные лампы имеют ряд серьезных недостатков. Это в первую очередь спектр свечения, не покрывающий весь диапазон необходимый для возбуждения флуорохромов, короткий срок службы, нагрев колбы, опасность взрыва и т.д. В последние годы им на замену приходят **светоизлучающие диоды** (**Light Emitting Didoes, LEDs**).

Изначально их яркость была значительно слабее, чем яркость дуговых разрядных ламп, однако каждые два года она удваивалась и будет продолжать удваиваться в будущем. Уже сейчас яркость светодиодов достаточна для использования в флуоресцентной микроскопии. Такие осветители имеют ряд серьезных преимуществ по сравнению с дуговыми разрядными лампами. Включение и выключение светодиодов и контроль яркости свечения осуществляются электронно и с очень высокой скоростью (микросекунды), а значит отпадает необходимость в механических заслонках и револьверах с фильтрами. Электронное управление яркостью позволяет быстро менять интенсивность освещения для каждого диода и оптимизировать яркость свечения каждого флуорохрома для лучшего соответствия параметрам регистрирующей камеры.

Светодиоды имеют большой срок службы, энергетически эффективны, почти не нагреваются и имеют узкие спектры испускания, (Рис. 50). Отпадает необходимость в охлаждении, а раз нет движущихся заслонок и револьверов с фильтрами, то не нужно бороться с вибрациями. К тому же, светодиоды не взрываются, так что их использование несет меньше рисков.

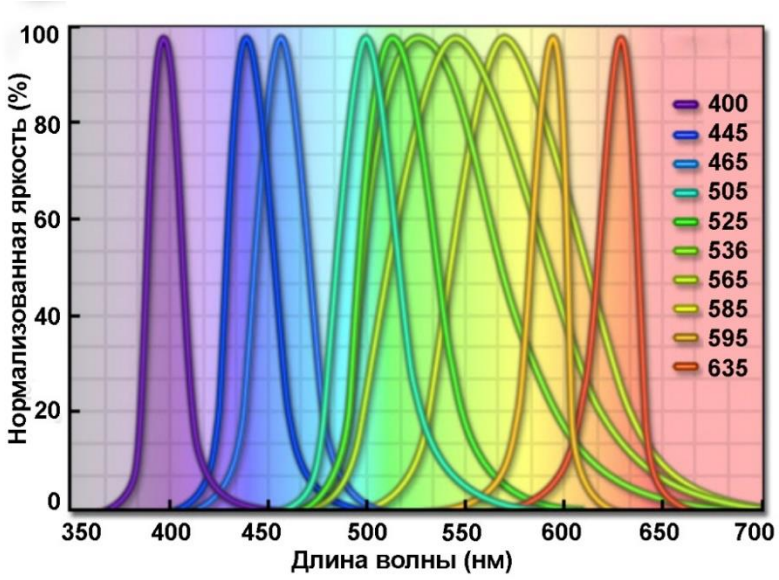


Рис. 50. Спектры испускания светоизлучающих диодов (LED), используемых в коммерческих светодиодных осветителях для флуоресцентной микроскопии (из: zeiss-campus. magnet. fsu. edu/mobile/ tutorials/ colibri/ indexmobile.html).

Рассмотрим светодиодный осветитель для флуоресцентного микроскопа на примере Colibri фирмы Zeiss. Он состоит из корпуса, в котором находятся светодиоды, контроллера и блока управления (Рис. 51А).

В зависимости от модели в корпусе располагаются от четырех до шести светодиодов. Их свечением управляют контроллер и находящийся в корпусе модулятор (Рис. 51Б). Излучение каждого светодиодного модуля фокусируется линзами и через систему объединителей лучей и зеркал направляется в микроскоп. Модули могут включаться одновременно или по очереди.

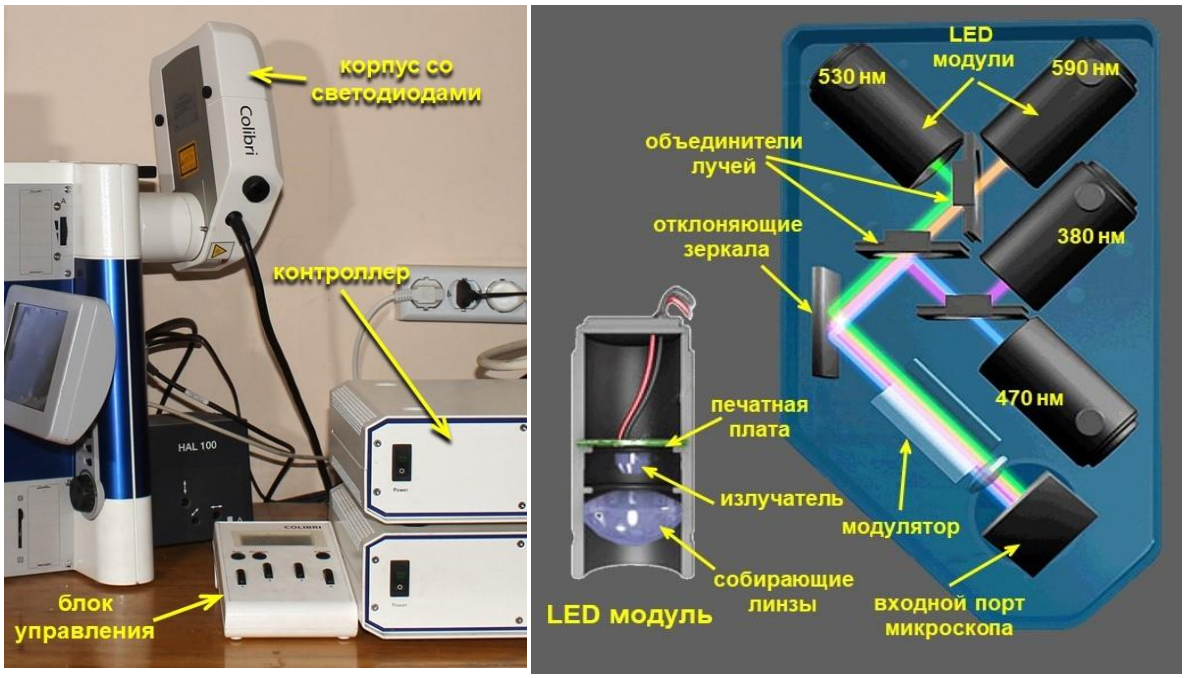


Рис. 51. А - Светодиодный осветитель Colibri 2 на универсальном исследовательском микроскопе ZEISS AXIO Imager M.1. Б – Схема строения осветителя и отдельного светодиодного (LED) модуля.

Аналогичные LED осветители выпускают и другие производители микроскопического оборудования (Рис. 52).



Рис. 52. Светодиодные осветители для флуоресцентной микроскопии ведущих производителей. А – Leica LED1, LED3, LED5 & LED8. Б –Nikon D-LED. В - B/G/UV LED for Olympus. Из https://www. leica-microsytems. com/products; https://www.microscope.healthcare.nikon.com/products; https://fsm-sz.en.made-in-china.com/product).

Однако поскольку абсолютное большинство флуоресцентных микроскопов в России оснащены газоразрядными лампами, далее будет подробно описано устройство и работа именно таких микроскопов.

Первые флуоресцентные микроскопы освещали объект снизу по принципу проходящего света, что создавало определенные неудобства. Современные флуоресцентные микроскопы работают по принципу отраженного света; в них объектив служит и для освещения

объекта возбуждающим светом, и для наблюдения его флуоресценции. Такие микроскопы называются **эпифлуоресцентными**. Принцип работы эпифлуоресцентного микроскопа показан на рисунке 53.

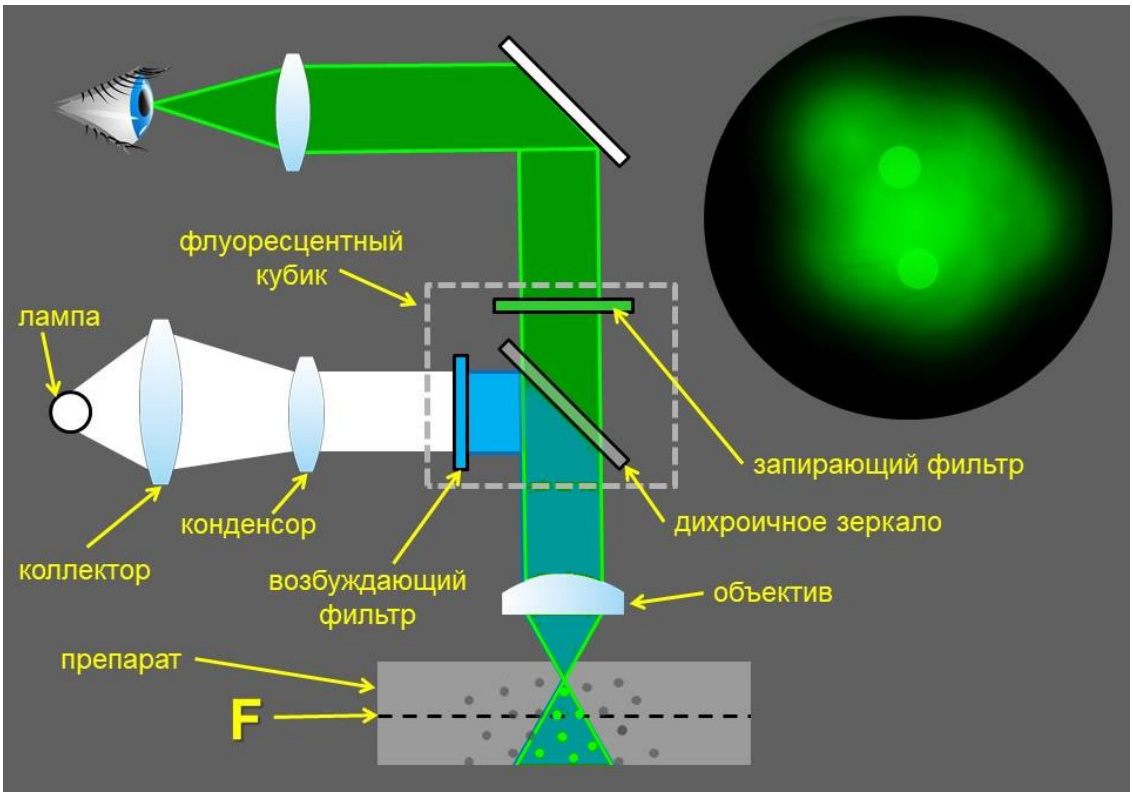


Рис. 53. Принципиальная схема работы эпифлуоресцентного микроскопа. Пояснения в тексте.

10-3-4. Флуоресцентный кубик.

Свет от ртутной или ксеноновой лампы собирается оптической системой коллектором и проходит сквозь конденсор, который направляет свет в **флуоресцентный кубик (Fluorescence Cube)** – главный элемент, согласующий оптическую систему микроскопа с конкретным флуорохромом. Кубик имеет три оптических элемента: **возбуждающий фильтр**, **дихроичное зеркало** и **запирающий фильтр**. Возбуждающий фильтр пропускает ту часть спектра, которая необходима для возбуждения флуоресценции данного флуорохрома (синий свет на рисунке 53), и этот свет попадает на расположенное под углом в 45° дихроичное зеркало (дихроик или светоделитель) Дихроичное зеркало – это стеклянная пластинка с многослойным напылением, которое за счет эффекта интерференции отражает одни длины волны и свободно пропускает другие.

Для работы на флуоресцентном микроскопе очень важно правильно считывать и понимать спектральные характеристики флуоресцентных кубиков. Несоответствие характеристик кубика и используемого флуорохрома приведет к тому, что маркированные структуры

будут не видны, а неизбежно присутствующие в препарате посторонние светящиеся структуры с другими спектральными характеристиками проявятся, и пользователь примет их за специфическое свечение флуорохрома.

Принцип работы флуоресцентного кубика показан на рисунке 54.

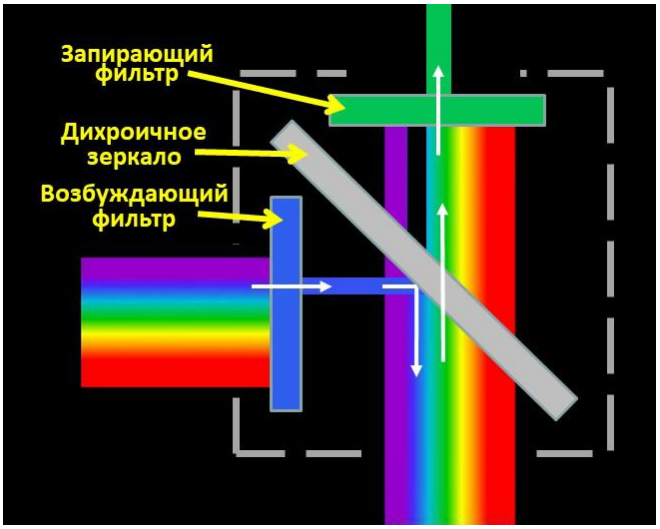


Рис. 54. Принципиальная схема работы флуоресцентного кубика. Возбуждающий фильтр пропускает синий свет, а дихроичное зеркало отражает синий свет в объектив. Возбужденная зеленая флуоресценция проходит сквозь дихроичное зеркало, а запирающий фильтр останавливает любой другой свет кроме зеленого.

Дихроичные зеркала (дихроики или светоделители) являются наиболее важным компонентом в комбинации фильтров для флуоресцентной микроскопии. Они изготавливаются с расчетом отражения и пропускания длин волн с точно заданными границами и должны работать под углом 45 градусов по отношению к оптическим осям микроскопа и осветителя. Дихроичные зеркала располагаются так, чтобы эффективно отражать короткие волны возбуждения под углом 90 градусов к объекту и действовать как пропускающий фильтр для пропускания длинноволнового флуоресцентного излучения от объектива к плоскости изображения.

Дихроик на рисунках 53 и 54 отражает синий свет в объектив микроскопа. Возбужденная зеленая флуоресценция собирается объективом и проходит сквозь дихроик и запирающий фильтр, который остановит все длины волн кроме зеленых. Далее возбужденная флуоресценция проецируется в окуляры микроскопа (Рис. 53).

На корпусе флуоресцентного кубика указан его каталожный номер, по которому легко можно найти его характеристики на сайте фирмы изготовителя. Часто (но не всегда) на корпусе кубика указаны и его спектральные характеристики.

Вот, например, кубик фирмы Zeiss (Рис. 55). Его уникальный каталожный номер **424931**; **filter set 15** означает «стандартный набор фильтров номер 15» (этого уже достаточно для того, чтобы найти его характеристики на сайте производителя), но дальше при-

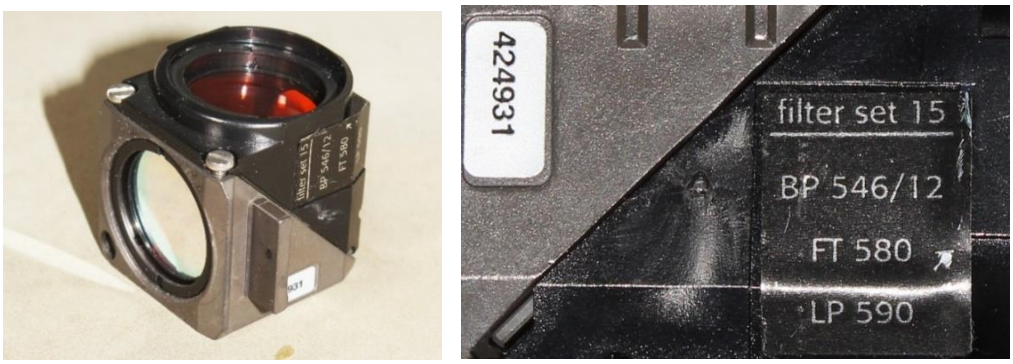


Рис.55. Флуоресцентный кубик Zeiss. Слева - внешний вид. Справа – характеристики на корпусе кубика. Пояснения в тексте.

водятся еще и его подробные спектральные характеристики. **BP 546/12** означает, что возбуждающий фильтр, узкополосный **(Band Pass)** и пропускает свет с длиной волны 546 +/- 12 нм (то есть зеленый). **FT 580** означает, что дихроичное зеркало (**Farb Teiler**, цветоделитель) отражает свет с длиной волны меньше 580 нм (желтый) и пропускает свет с большей длиной волны. **LP 590** означает, что запирающий фильтр широкополосный (**Long Pass**) и пропускает весь свет с длиной волны больше 590 нм.

На графике спектральные характеристики флуоресцентного кубика выглядят следующим образом. На рисунке 56А показаны характеристики кубика, изображенного на рисунке 54. Возбуждающий фильтр пропускает зеленый свет, а дихроичное зеркало и широкополосный запирающий фильтр пропускают более длинные волны. Однако запирающий фильтр может быть и узкополосным (**Band Pass**). Спектральные характеристики такого кубика (на примере кубика **Zeiss filter set 20**) показаны на рисунке 56Б. Запирающий фильтр в нем пропускает свет только в диапазоне 575-640 нм.

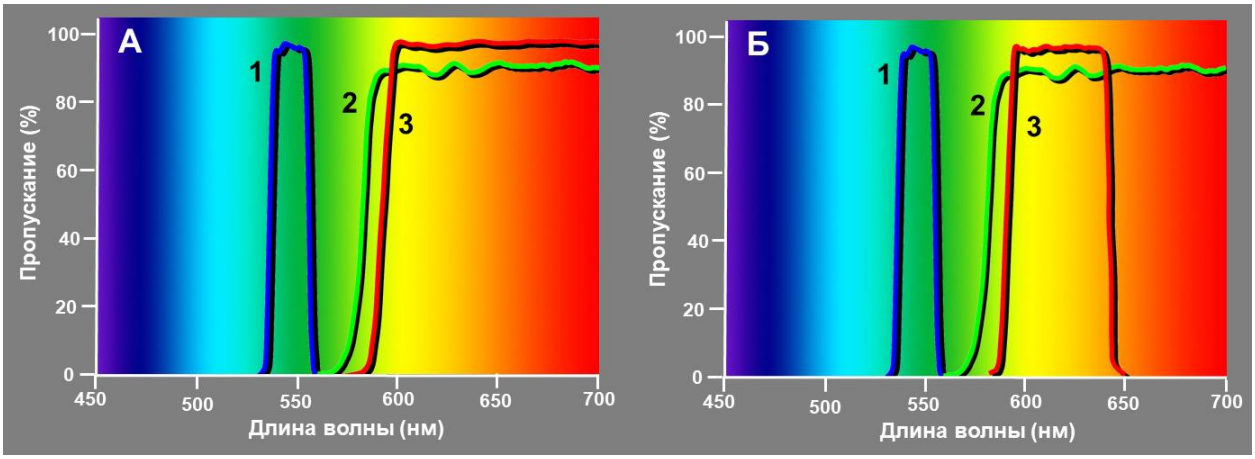


Рис. 56. Спектральные характеристики флуоресцентных кубиков (на примере кубиков Zeiss). А – Широкополосный кубик (Long Pass). Б – Узкополосный кубик (Band Pass). 1 – Возбуждающий фильтр. 2 – Дихроичное зеркало. 3 – Запирающий фильтр. Пояснения в тексте.

10-3-5. Устройство флуоресцентного микроскопа.

Итак, как устроен флуоресцентный микроскоп? Как видно из рисунка 57, (сравните с Рис. 25) флуоресцентная техника является дополнением к микроскопу проходящего света исследовательского уровня.

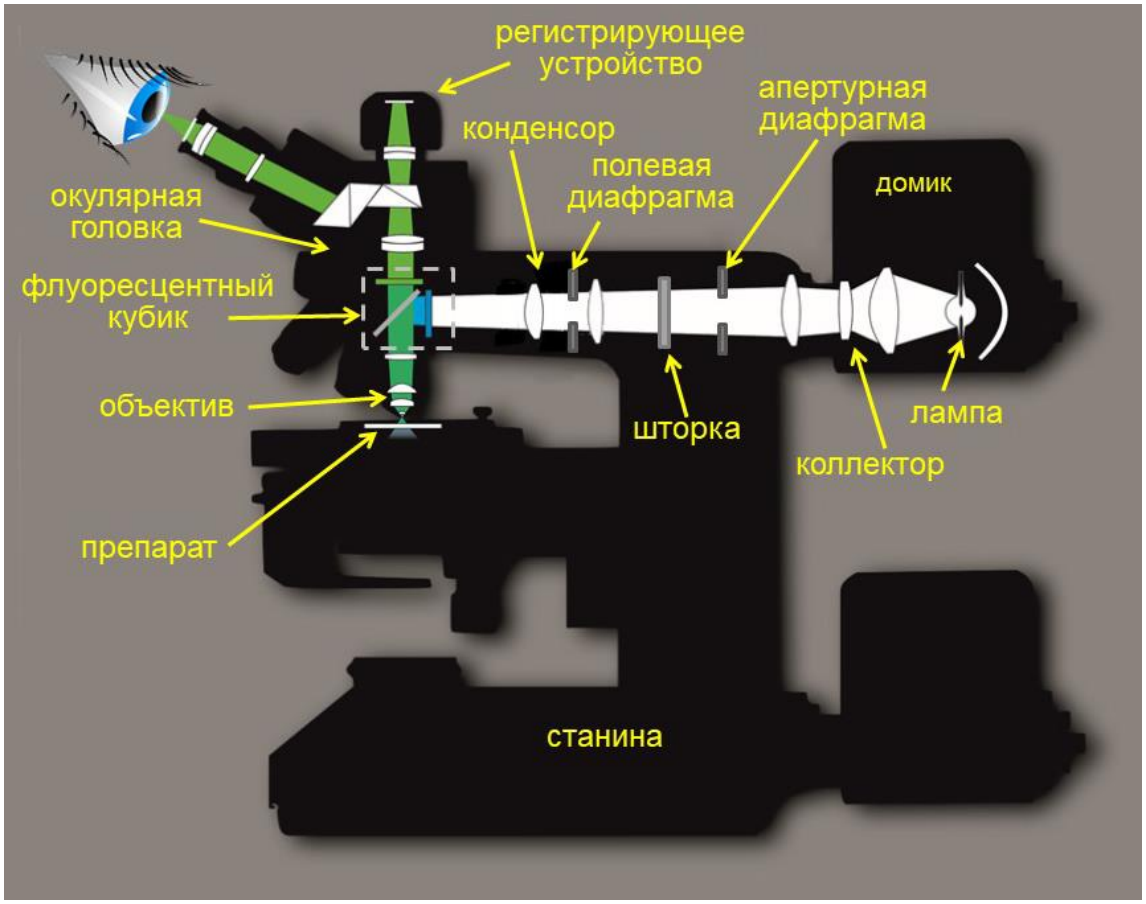


Рис. 57. Принципиальная схема флуоресцентного микроскопа. Возбуждающий свет от расположенной в верхнем домике ртутной или ксеноновой лампы при помощи коллектора и конденсора направляется на флуоресцентный кубик и далее через объектив на объект. Возбужденная флуоресценция (зеленый цвет на рисунке) проходит сквозь кубик и направляется в окулярную головку. На пути возбуждающего света находится металлическая шторка, перекрывающая освещение препарата, а также полевая и апертурная ирисовые диафрагмы, аналогичные диафрагмам в микроскопе проходящего света.

Настройка освещения здесь не имеет такого важного значения, как в микроскопии проходящего света. Важно только, чтобы возбуждающий свет равномерно освещал поле зрения. Апертурная диафрагма позволяет менять интенсивность возбуждающего света, а полевая диафрагма позволяет ограничивать поле освещения возбуждающим светом в поле зрения микроскопа.

Управляющие элементы флуоресцентного микроскопа показаны на рисунке 58.



Рис. 58. Управляющие элементы флуоресцентного микроскопа на примере универсального микроскопа Zeiss Axioskop 40. Для начала работы необходимо включить блок питания ртутной лампы, подождать несколько минут, чтобы лампа нагрелась и световой поток стабилизировался, открыть апертурную и полевую диафрагму, выдвинуть защитную шторку, опустить защитное стекло, поворотом револьвера ввести в ход лучей нужный флуоресцентный кубик, установить слайдер окулярной головки в положение «окуляры» и приступить к работе.

Важно помнить, что процесс флуоресценции сопровождается фотообесцвечиванием и деградацией флуорохромов. Кроме того, ультрафиолет от ртутной лампы со временем повреждает оптические элементы микроскопа. Поэтому металлическую шторку, перекрывающую возбуждающий свет, необходимо открывать только непосредственно при наблюдении или съемке флуоресценции, и закрывать, если вы прекращаете работу даже на короткое время.

Если лампа возбуждающего света не отъюстирована, и освещение, а значит и свечение флуорохромов в поле зрения неравномерно, необходимо произвести ее юстировку. Как это сделать, описывается в руководствах по эксплуатации конкретных микроскопов. Неопытные пользователи не должны пытаться самостоятельно отъюстировать лампу.

Помните, что даже слабый ультрафиолетовый свет может вызвать повреждение глаз. Для их защиты перед револьвером объективов имеется защитное стекло, блокирующее UV излучение. Начиная работу, его необходимо опускать. Ни в коем случае не следует открывать домик ртутной лампы, если она включена! Нельзя выкручивать объектив, вынимать из револьвера флуоресцентный кубик и т.д. при включенной лампе и открытой шторке.

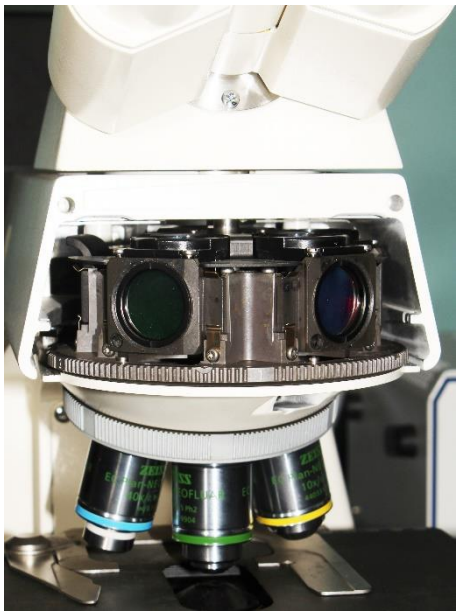


Рис. 59. Револьвер с флуоресцентными кубиками при снятой крышке, микроскоп Zeiss Axioskop 40.

Итак, включив флуоресцентный осветитель мы поворачиваем находящийся между объективами и окулярной головкой револьвер с флуоресцентными кубиками, чтобы ввести в ход лучей кубик, соответствующий используемому флуорохрому (Рис. 59). Можно приступить к работе. При многоцветном окрашивании двумя или больше флуорохромами для перехода от одного окрашивания к другому достаточно повернуть револьвер и ввести в ход лучей соответствующий флуоресцентный кубик. Револьвер закрыт крышкой, которая легко открывается, и, если нужно поставить кубик, которого нет в револьвере, пользователь просто снимает крышку, вынимает один кубик и вставляет другой.

Необходимо помнить, что после выключения ртутной лампе требуется 10-20 минут для охлаждения перед следующим включением. Поэтому не следует выключать осветитель, если вы прерываете работу на короткое время.

11. РЕГИСТРАЦИЯ МИКРОСКОПИЧСЕСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ.

Для регистрации изображений и процессов в микроскопах используются **цифровые фото/видео камеры**. Обычно пользователь работает с той камерой, которая уже стоит на микроскопе, а значит он должен только прочитать инструкцию. Однако кое-что о цифровых камерах все-таки следует знать.

Светочувствительные матрицы (сенсоры) цифровых камер бывают двух основных типов – **CCD** (ПЗС) и **CMOS** (КМОП). CCD (Charge-Coupled Device)– это светочувствительная матрица, изготовленная по технологии «приборов с зарядовой связью». CMOS (Complementary Metal-Oxide-Semiconductor)– это светочувствительная матрица, изготовленная по технологии «комплементарной металл-оксид-полупроводник структуры». Матрицы CMOS гораздо более дешевые по сравнению с CCD-матрицами. На основе технологии CMOS можно делать сенсоры с большим количеством мегапикселей, но шумы CMOS-матрицы пока не могут обеспечить изображение такого качества, которое наблюдается у CCD камер, хотя в последние годы характеристики CMOS сенсоров постепенно подтягиваются к CCD. Бытовые камеры имеют обычно CMOS сенсор, а камеры для микроскопов CCD

сенсор. В последнее время, поскольку качество CMOS матриц постепенно приближается к CCD матрицам, производители камер для микроскопов стали комплектовать их CMOS матрицами. Иногда в характеристиках камеры вообще не указывается тип матрицы. В этом случае, будьте уверены, там стоит дешевая CMOS матрица низкого качества.

Камеры бывают **цветные** и **монохромные** (мы почему-то называем их черно-белыми). Необходимо помнить, что для съемки флуоресценции надо использовать монохромную камеру, поскольку излучение любого флуорохрома по определению монохромное, а монохромные камеры, грубо говоря, втрое лучше цветных и по чувствительности, и по разрешению, поскольку там, где в монохромной матрице стоит три одинаковых светочувствительных пикселя, в цветной матрице стоит три пикселя, чувствительных к красному, зеленому, или синему свету – над каждым из них расположен соответствующий фильтр. Какого цвета ни была бы флуоресценция, цветная камера будет регистрировать ее, используя только треть имеющихся пикселей.

Неопытного пользователя может удивить, что на микроскопах стоят камеры с довольно низким **пиксельным разрешением**, обычно 5-8 мегапикселей, в то время, как даже полупрофессиональные фотокамеры имеют 18 и более мегапикселей. Причина этого (и пользователи должны это хорошо понимать) в том, что в случае микроскопа финальное разрешение определяется не количеством пикселей в камере, а разрешением объектива микроскопа.

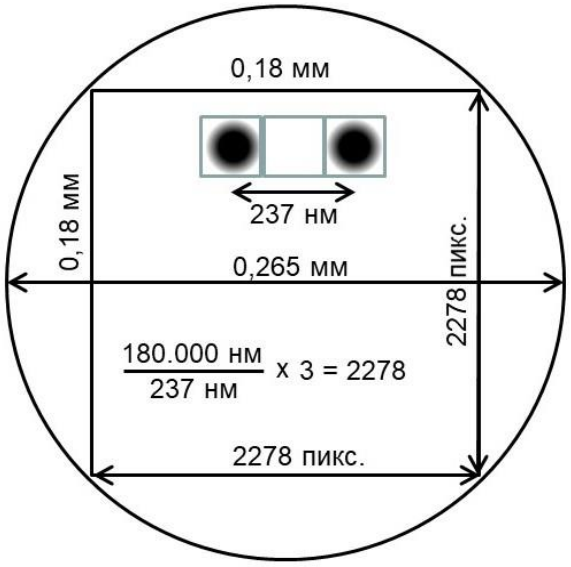


Рис. 60. Почему в микроскопах не используют камеры с большим количеством пикселей? Расчет количества пикселей, необходимого и достаточного для съемки микроскопического препарата. Пояснения в тексте.

Возьмем для примера объектив, изображенный на рисунке 16. Он имеет увеличение 100х, числовую апертуру 0,95 и диаметр поля зрения 0,265 мм. Допустим, мы хотим сфотографировать все поле зрения, то есть квадрат со стороной 0,18 мм или 180 мкм (Рис. 60). Разрешение этого объектива по формуле Аббе будет составлять 237 нм (450 / 2 х 0,95 = 237). То-есть, минимальное расстояние между двумя точками, на котором они видны как две равно 237 нм. Чтобы их зарегистрировать, **необходимо и достаточно** вписать в это расстояние три пикселя (точка-промежуток-точка). Таким образом, необходимый и достаточный размер пикселя равен 79 нм (237 / 3 = 79). Если сторону квадрата 180 мкм разделить

на 79 нм, получим 2278 пикселей. То-есть, для съемки без потери разрешения достаточно матрицы 2278 x 2278 пикселей. Получается 5 мегапикселей. И больше нам не нужно, поскольку, если мы возьмём матрицу 8, 12 и более мегапикселей, мы будем только увеличивать размер файла, не получая дополнительной информации. Это называется «получать пустые пиксели». Аналогичные расчеты для других объективов дадут схожие результаты. Очень редко при съемке больших площадей с использованием объективов с особо большим полем зрения расчет может дать примерно 12-15 мегапикселей, но это уже экстремальный случай.

Другой характеристикой цифровой камеры, о которой следует знать пользователям, является **динамический диапазон**. Это характеристика регистрирующего устройства, описывающая соотношение между максимальной и минимальной измеримой интенсивностью света (белым и чёрным, соответственно), которые устройство способно зарегистрировать. Графически динамический диапазон представлен на рисунке 61.

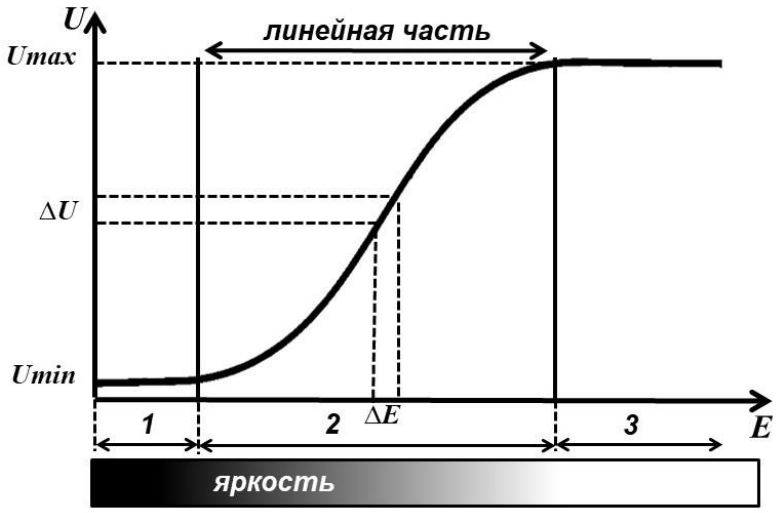


Рис. 61. Динамический диапазон светочувствительной матрицы. ***Umin*** – темновое напряжение (уровень шума). ***Umax*** – максимальное напряжение (уровень насыщения). В диапазоне яркостей ***1*** все пиксели будут абсолютно черными. В диапазоне яркостей ***2*** (линейная часть) изменению яркости ΔE соответствует изменение напряжения ΔU. В диапазоне яркостей ***3*** все пиксели будут абсолютно белыми.

CCD является аналоговым устройством. Когда свет попадает на матрицу (экспозиция), в каждом пикселе (фотодиоде) накапливается заряд, пропорциональный количеству попавшего на него света. По окончании этого времени электрические заряды, накопленные каждым пикселем, по очереди передаются на "выход" прибора, преобразующий заряд в напряжение, величина напряжения, пропорциональная количеству электронов, измеряется и оцифровывается. Даже при полном отсутствии света на пикселях будет определенное напряжение (темновое напряжение или шум). При слабой яркости падающего на них света оно не увеличивается – чувствительности матрицы не хватает. Затем, начиная с какого-то значения яркости, оно начинает увеличиваться и любому изменению яркости соответствует изменение напряжения (линейная

часть динамического диапазона). Оно увеличивается до тех пор, пока не достигает максимально возможного, и при дальнейшем увеличении яркости падающего света уже не меняется.

CMOS матрица является цифровым устройством с активными чувствительными элементами (Active Pixel Sensor). С каждым пикселем работает свой усилитель, преобразующий заряд чувствительного элемента в напряжение. Происходит оцифровывание каждого пикселя в отдельности, что дает возможность практически индивидуально управлять каждым пикселем. При этом, динамический диапазон CMOS-матриц принципиально не отличается от диапазона CCD матриц.

Таким образом, CCD и CMOS матрицы могут регистрировать изменения яркости падающего на их пиксели света только в определенном диапазоне. Более слабые яркости будут для них абсолютно черными пикселями, а более сильные абсолютно белыми, а значит яркость всех сюжетно важных объектов должна попасть на линейную часть динамического диапазона. Обычно на это можно не обращать внимания, поскольку современные матрицы имеют очень широкий динамический диапазон, однако при съемке, например, флуоресцентных препаратов, в которых присутствует и яркое, и очень слабое свечение, легко можно выйти за пределы линейной части динамического диапазона и потерять детали или в ярко, или в слабо светящихся областях (или и там, и там). В этой ситуации проще всего сфотографировать объект дважды, настроив экспозицию сначала на яркие участки, а потом на темные.

При съемке в проходящем свете надо следить, чтобы фон на снимках был слегка серым, а самые темные сюжетно важные участки не были абсолютно черными.

Програмное обеспечение камеры микроскопа обычно имеют опцию **цифровой зум** (**Digital Zoom**). Это увеличение размера кадра с помощью кадрирования полученного с матрицы изображения. Камера ничего не увеличивает, а только вырезает нужную часть изображения и растягивает ее до первоначального разрешения. Пользователь должен понимать, что при этом разрешение вырезанного участка не изменяется. С тем же успехом можно потом вырезать часть изображения в графическом редакторе.

Цифровые камеры имеют возможности для усиления чувствительности – это функции **Gain** и **Binning**. Gain – это усиление выходного сигнала при низкой яркости падающего на светочувствительные пиксели света, а Binning – это суммирование зарядов с нескольких соседних пикселей. Пользоваться этими опциями надо с осторожностью, поскольку усиление сигнала (Gain) неизбежно увеличивает и шум, а Binning, суммируя заряды с соседних

N пикселей матрицы, увеличивает чувствительность в N раз, но и ухудшает пространственное разрешение в N раз. В любом случае, менять Gain и Binning следует только если нет возможности ограничиться изменением яркости света или экспозиции.

Программное обеспечение камер для микроскопов чаще всего не определяет автоматически реальный размер регистрируемых объектов, поэтому перед началом использования камеры необходимо убедиться, что она откалибрована, то есть определено истинное увеличение попавшего на матрицу изображения для каждого объектива микроскопа. Если этого не сделано, то программа или не будет давать размеры объекта, или будет показывать их в пикселях матрицы. Для калибровки необходим объект-микрометр – микроскопический препарат, имеющий линейку с точными делениями (Рис. 62). Объект-микрометры могут быть с прозрачной вставкой для проходящего света (обозначаются ОМП) или с непрозрачной для отраженного света (обозначаются ОМО). Обычно для микроскопа используется шкала 100 делений / 1 мм, а для стереомикроскопа 100 делений / 10 мм.



Рис. 62. Объект-микрометр ОМП производства ЛОМО для микроскопа проходящего света. Вверху: внешний вид. Внизу: нанесенные на стеклянную вставку деления, 100 делений на 1 мм. Цена деления 10 мкм.

Чтобы откалибровать камеру микроскопа, помещаем объект-микрометр в микроскоп, наводим на резкость и следуем инструкции программного обеспечения. Эту операцию необходимо повторить для всех установленных объективов.

Если программное обеспечение камеры не имеет функции калибровки, то необходимо фотографировать объект-микрометр параллельно с препаратами и потом определять реальное увеличение.

При съемке микроскопических препаратов пользователи должны обязательно учитывать еще один неочевидный, но важный нюанс. В абсолютном большинстве микроскопов, даже производства всемирно известных брендов изображение расщепляется и проецируется одновременно и в окуляры, и на матрицу встроенной камеры. Иногда имеется переключатель между «только в окуляры» или «и в окуляры, и в камеру». Еще реже встречается трехпозиционный переключатель: «в окуляры», «в камеру», «и в окуляры, и в камеру».

Если свет от объектива идет одновременно и в окуляры, и в камеру, то свет, попавший в окуляры, тоже, разумеется, проецируются в камеру в виде артефактов. Для примера рассмотрим результаты фотографирования на инвертированном микроскопе для клеточных культур Zeiss Primovert, в котором идущий от объектива свет делится между окулярами и

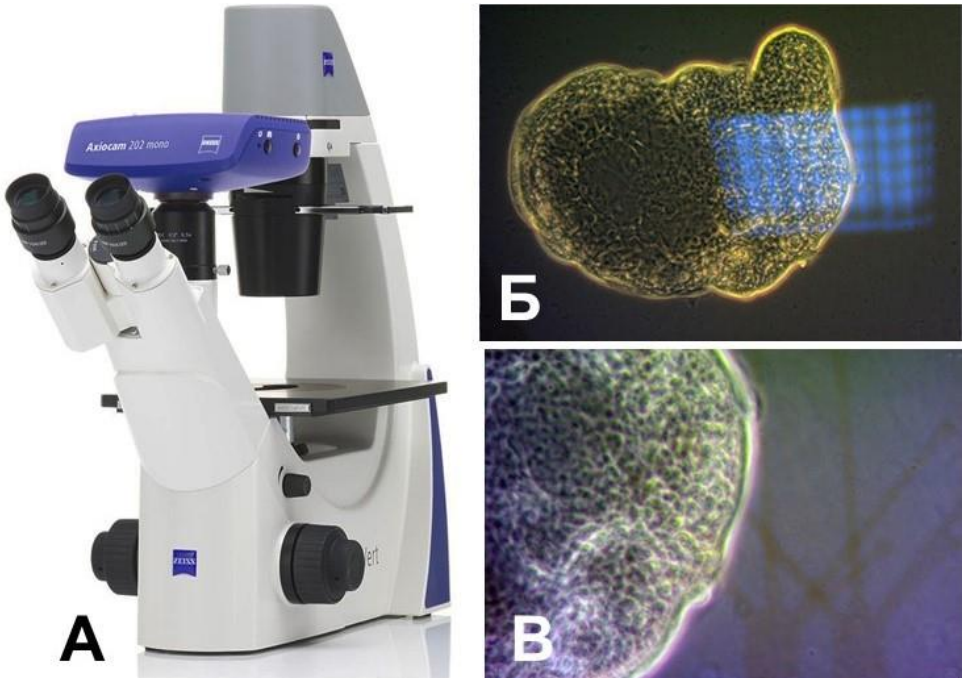


Рис. 63. Артефакты при съемке на инвертированный микроскоп для культур клеток Zeiss Primovert. А – внешний вид микроскопа. Идущий от объектива свет делится пополам между окулярами и камерой. Б - эмбрион большого прудовика, объектив 20х, фазовый контраст. Светлая структура в правой половине снимка - это изображение потолочного светильника над микроскопом. В - объектив 40х, фазовый контраст. Темные силуэты в правой половине снимка - это раздвоенное окулярами изображение вешалки для одежды, стоящей за спиной пользователя

камерой в соотношении 1:1. При съемке препарата на этом микроскопе в изображение впечатывается не только лампа на потолке, но и предметы интерьера, стоящие перед микроскопом (Рис. 63).

Таким образом, перед тем, как начать фотографировать на микроскопе, пользователь должен выяснить, перекрывается ли свет от окуляров при съемке. Если свет не перекрывается (что наиболее вероятно), то необходимо тщательно закрывать окуляры непрозрачными колпачками, хотя бы самодельными из алюминиевой фольги, чтобы исключить попадание света в окуляры. Или фотографировать в полной темноте.

12. ОСНОВНЫЕ КЛАССЫ ОПТИЧЕСКИХ МИКРОСКОПОВ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕТОДАМИ СВЕТОВОЙ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ.

1. Стереомикроскопы.

Микроскопия начинается не с микроскопов, а со стерео- или диссекционных микроскопов, которые в России почему-то называют бинокулярами (binocular по-английски бинокль). Препарирование объекта и изготовление препаратов для микроскопии обычно делают под стереомикроскопом, а поскольку 90% успеха в эксперименте с использованием микроскопического препарата зависит от того, насколько хорошо сделан сам препарат, то правильный выбор стереомикроскопа и освещения к нему играют огромную роль. На рынке стереомикроскопов есть бесчисленное множество разных моделей, и пользователи должны хорошо понимать их достоинства и недостатки, чтобы сделать правильный выбор.

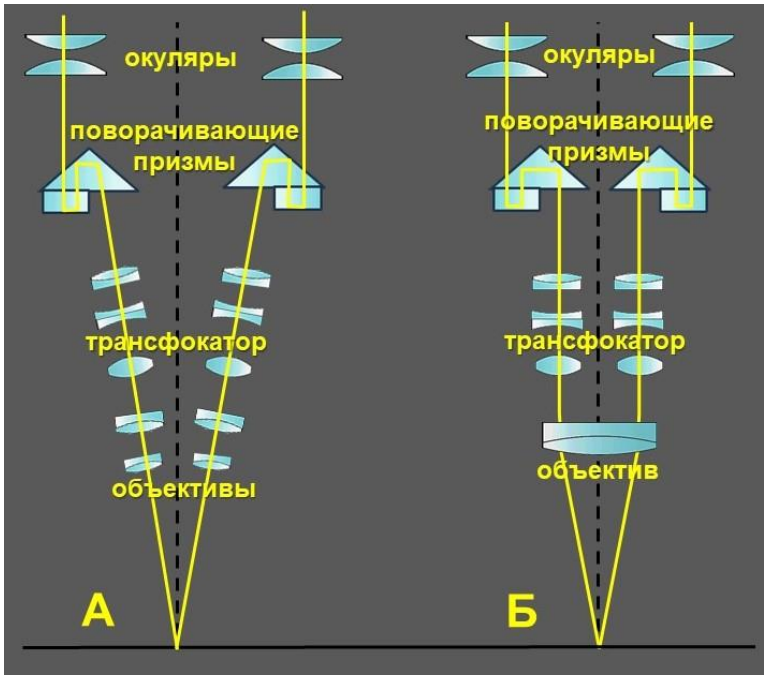


Рис. 64. Оптические схемы стереомикроскопов по схеме Грену (А) и Аббе (Б). Призмы разворачивают изображение, делая его прямым, и позволяют изменять межзрачковое расстояние окуляров в соответствии с базой глаз пользователя.

Все стереомикроскопы построены по двум оптическим схемам – **схема Грену** или **схема Аббе** (Рис. 64). Система Грену (Рис. 64А) более старая, в ней объект наблюдается под разными углами с помощью двух монокулярных микроскопов, наклоненных под углом 12°-17° друг к другу, и изображение для правого и левого глаза строится двумя раздельными оптическими путями. За объективами имеется панкратическая система (трансфокатор), позволяющая плавно изменять увеличение. Достоинством этой схемы является высокая глубина резкости, отличное стереоскопическое изображение, компактность и меньшая цена. Основной недостаток состоит в том, что оптическая ось каждого из двух объективов наклонена относительно объекта. Это вносит в изображение искажения.

В системе параллельной оптики Аббе (Рис. 64Б) имеется один главный объектив большого диаметра, расположенный строго перпендикулярно оптической оси. Достоинствами

являются большое поле зрения, большее максимальное увеличение и отсутствие искажений. В объективе исправлены хроматические аберрации и кривизна поля, а значит можно получать изображения высокого качества. За объективом имеется трансфокатор, позволяющий плавно изменять увеличение. За трансфокатором можно расположить канал фото- или видеокамеры соосно с объективом и получать строго вертикальное изображение без искажений. Основным недостатком является более высокая цена. Примеры стереомикроскопов, построенных по схемам Грену и Аббе, показаны на рисунке 65.



Рис. 65. Стереомикроскопы. Слева: Nikon SMZ 460 (схема Грену). Справа: ZEISS Stemi 305 (схема Аббе) с цифровой камерой Axiocam 208 Color.

Разрешающая способность стереомикроскопа определяется исключительно числовой апертурой его объективов, которая у разных моделей меняется от 0,05 до 0,8. При этом, производители часто вообще не указывают ни числовую апертуру, ни разрешение объектива. Если все же в описании указывается разрешение, то в виде количества циклов – пар линий на миллиметр, которые можно увидеть в микроскоп. Обычно хороший дорогой стереомикроскоп, сделанный по схеме Аббе имеет разрешение 500-1000 пар линий на мм. Окуляры с большим увеличением не улучшат разрешение, однако это не значит, что они не нужны. В ряде случаев бывает полезно заменить окуляры на более мощные. При этом, хотя разрешение и не улучшится, но можно будет увидеть мелкие детали объекта. Так отечественный стереомикроскоп МБС-10 комплектуется окулярами 8х и 14х.

При работе со стереомикроскопами важно хорошее освещение объектов. Импортные стереомикроскопы обычно комплектуются светодиодными осветителями, заливающими поле зрения равномерным светом. Это или одиночный источник света, расположенный под острым углом к оптической оси, или кольцевой бестеневой осветитель вокруг объектива (Рис. 66). И те, и другие жестко вмонтированы в конструкцию и отлично подходят для работы, например, с насекомыми, ювелирными изделиями, или микроэлектроникой, но

крайне неудобны для работы с влажными биологическими препаратами, особенно находящимися в жидкости.

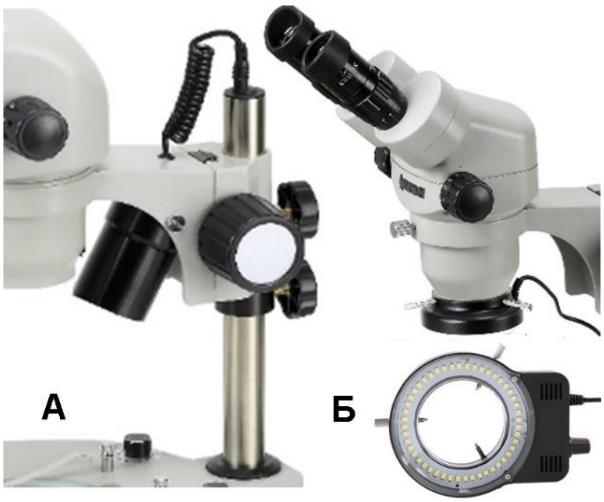


Рис. 66. Светодиодные осветители стереомикроскопов. А – Жестко вмонтированный осветитель направленного света. Б – Кольцевой бестеневой осветитель заливающего света.

В России Лыткаринский завод оптического стекла (ЛЗОС) выпускает популярный стереомикроскоп МБС-10 (Рис. 67), построенный по схеме Аббе, но вместо трансфокатора снабженный револьвером с оптическими системами Галилея, которые поочередно включаются в ход лучей и позволяют выбрать одно из пяти фиксированных увеличений (четыре с системами Галилея плюс одно без них). По своему функционалу и оптическим характеристикам это вполне конкурентоспособный стереомикроскоп, если бы не система освещения.



Рис. 67. Стереомикроскоп МБС-10 со штатным осветителем.

Штатный осветитель микроскопа МБС-10 не только очень неудобен в работе, но и опасен для пользователя, поскольку представляет собой лампу накаливания, заключенную в узкий металлический корпус. Осветитель даже на максимальной мощности слабо освещает препарат, но его корпус нагревается так, что любая попытка настроить освещение неминуемо приведет к серьезным ожогам. Препарат естественно тоже неконтролируемо нагревается.

Хорошее освещение объектов очень важно для работы со стереомикроскопом, поэтому при необходимости следует доукомплектовать его подходящей системой освещения. Что касается стереомикроскопа МБС-10, то, прежде чем начать работу с ним, необходимо отсоединить и выкинуть штатный осветитель и купить другой. Сейчас на рынке представлено множество недорогих универсальных осветителей, оптимизированных для работы со стереомикроскопами. Также, осветитель несложно сделать самостоятельно, купив необходимые детали на интернет-площадках. Оптимальный осветитель - это два светодиодных источника света на гибких ножках типа «гусиная шея», которые позволяют настраивать освещение, меняя яркость, расстояние источников до объекта и угол освещения (Рис. 68).

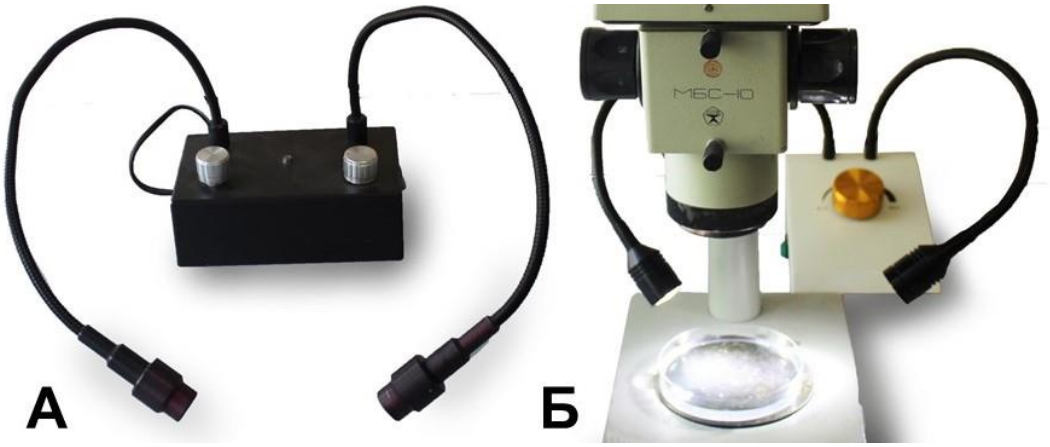


Рис. 68. Удобные для работы с биологическими объектами светодиодные осветители на штативах типа «гусиная шея», купленные на интернет-площадках. А – Осветитель с независимой регулировкой яркости двух источников света. Б – Осветитель с синхронной регулировкой яркости. Показано оптимальное расположение источников света для работы правши с объектами, находящимися в жидкости.

Для большинства биологических объектов оптимальным является освещение с двух сторон. Слева, если вы правша, объект освещается более ярким светом (называется «основной направленный»), а справа менее ярким (дополнительный). Для левши основной направленный свет должен светить справа, а дополнительный слева. Такое освещение создает достаточно резкие тени, позволяющие видеть трехмерную структуру объекта, и в то же время хорошо видеть детали и в ярких, и в темных участках препарата. Освещение под острым углом к плоскости резкости позволяет удалить блики на поверхности жидкости из поля зрения.

2. Учебные микроскопы.



Рис. 69. Микромед, ЛОМО.

Низкая цена и низкое качество изображения. Функционал таких микроскопов невелик и обычно они позволяют только рассматривать и фотографировать гистологические препараты в проходящим свете с невысоким увеличением и разрешением. Обычно их комплектуют воздушными объективами с увеличением 5х - 40х, которые имеют небольшую числовую апертуру и не позволяют добиться высокого разрешения. Для примера слева на рисунке 69 показан микроскоп Микромед производства ЛОМО, Россия.

3. Лабораторные микроскопы.



Рис. 70. I350B, ADF.

Предназначены для работы с живыми клетками в чашках Петри, многолуночных планшетах, бутылях и различной лабораторной посуде. Инвертированные, обычно комплектуются конденсорами для работы в проходящем свете и методом фазового контраста, и воздушными объективами для фазового контраста увеличением от 5х до 40х. Имеют тринокулярную оптическую головку и комплектуются цифровыми камерами. Слева на рисунке 70 показан микроскоп ADF I350B с цифровой камерой ADF Live 4K компании ADF, Китай.

4. Прямые универсальные исследовательские микроскопы.



Рис. 71. Прямой универсальный микроскоп Axio-Imager Z2, с двумя цифровыми камерами: AxioCam MRm (монохромная) и AxioCam MRc5 (цветная).

Позволяют (в зависимости от комплектации) работать методами проходящего света в светлом и темном поле, методом фазового и дифференциального интерференционного контраста, а также флуоресценции. Могут быть с механическим управлением (например, Zeiss Axioskop 40, показанный на рисунке 48) или автоматизированные. Обычно комплектуются воздушными и иммерсионными объективами с увеличением от 2х до 100х. Позволяют получить наилучшее оптическое разрешение. Слева на рисунке 71 показан автоматизированный микроскоп AxioImager Z2 компании Zeiss, Германия.

5. Инвертированные универсальные исследовательские микроскопы.



Рис. 72. Инвертированный универсальный микроскоп Axiovert 5, Zeiss с цифровой камерой AxioCam 305 color.

Позволяют (в зависимости от комплектации) работать методами проходящего света в светлом и темном поле, методом фазового и дифференциального интерференционного контраста, а также флуоресценции. Комплектуются воздушными и иммерсионными объективами с увеличением от 2х до 100х. Позволяют получить наилучшее оптическое разрешение. Их возможности шире, чем у прямых исследовательских микроскопов. Слева на рисунке 72 показан автоматизированный микроскоп Axiovert 5 компании Zeiss, Германия.

6. Цифровые микроскопы.

Цифровыми микроскопами называют любые устройства, состоящие из объектива, осветителя и цифровой камеры, выводящей изображение на монитор компьютера в реальном времени. Они варьируют от простых устройств с ручным управлением до высокотехнологичных сложных систем, использующих искусственный интеллект и предлагающих широкий набор микроскопических методов наблюдения, регистрации и обработки полученной информации. Все цифровые микроскопы объединяет то, что управление, наблюдение за объектом и регистрация изображений осуществляется только через компьютер.

Цифровой микроскоп исследовательского уровня решает те же задачи, что и оптический микроскоп, но при этом он имеет ряд преимуществ. Главное – это то, что объектив проецирует изображение непосредственно на камеру, что значительно уменьшает искажения, неизбежно присутствующие в оптическом пути классического микроскопа. Кроме того, компьютерное управление всегда обеспечивает оптимальную настройку цифрового микроскопа, а переключение режимов работы осуществляется несколькими кликами мышкой.

Цифровые микроскопы для медико-биологических исследований и диагностики условно подразделяются на слайд-сканеры, станции для имиджинга клеток и универсальные исследовательские микроскопы формата «все-в-одном».

Слайд-сканеры

Слайд-сканеры используются в патологии и гистологии. Они дали толчок к развитию цифровой патологии (Digital pathology), которая включает в себя получение, обработку, обсуждение и интерпретацию информации о патологиях в цифровой форме. Сканеры создают «цифровые препараты» высокого разрешения, которые затем можно рассматривать на экране компьютера или мобильного устройства. Они позволяют в автоматическом режиме фотографировать методами микроскопии проходящего света и флуоресценции большое количество предметных стекол с гистологическими срезами, могут фотографировать каждое стекло на большом увеличении по частям с последующей сшивкой в одно изображение. Могут фотографировать препараты, меняя плоскость фокуса (сканирование по Z). Полученные изображения автоматически отсылаются на соответствующий сервер для изучения специаличтами. Примеры слайд-сканеров показаны на Рис. 73.



Рис. 73. Слайд сканеры. Слева: Aperio AT2 Leica Biosystems. Справа: PANNORAMIC 250 ZEISS, Германия.

Станции для имиджинга клеток (Cell Imaging Stations).

Станции имиджинга клеток предназначены для автоматизированного долговременного наблюдения и регистрации процессов в живых клетках (в культуре или переживающих срезах). Они могут быть с механическим, моторизованным и автоматизированным управлением. Позволяют работать в режиме проходящего света, фазового контраста и флуоресценции. Оборудованы климатическими камерами для длительной культивации живых клеток. Комплектуются воздушными и иммерсионными объективами с увеличением до 100х. Время работы в автоматическом режиме ограничено только объемом памяти компьютера. Показаны примеры станций разной степени сложности и универсальности (Рис. 74).



Рис. 74. Станции для имиджинга клеток семейства EVOS компании Life Technologies, США. Слева направо: XL Core Cell Imaging System, FLoid Cell Imaging Station, FL Auto Imaging System.

Универсальные микроскопы формата «все-в-одном» (All-In-One).

Полностью автоматизированные микроскопы, позволяющие автоматический многоканальный захват изображений и видео в режимах проходящего света, падающего света, фазового контраста и флуоресценции (Рис. 75). Позволяют съемку больших препаратов по частям с последующей сшивкой изображений, могут следить за движущимися объектами, отфильтровывать не резкие структуры, сканировать препараты, меняя плоскость фокуса, с последующим построением трехмерных изображений, проводить анализ изображений на лету и многое другое. Оборудованы климатическими камерами для длительной культивации живых клеток. Комплектуются воздушными и иммерсионными объективами с увеличением от 2х до 100х и позволяют получать изображения с максимально возможным разрешением.

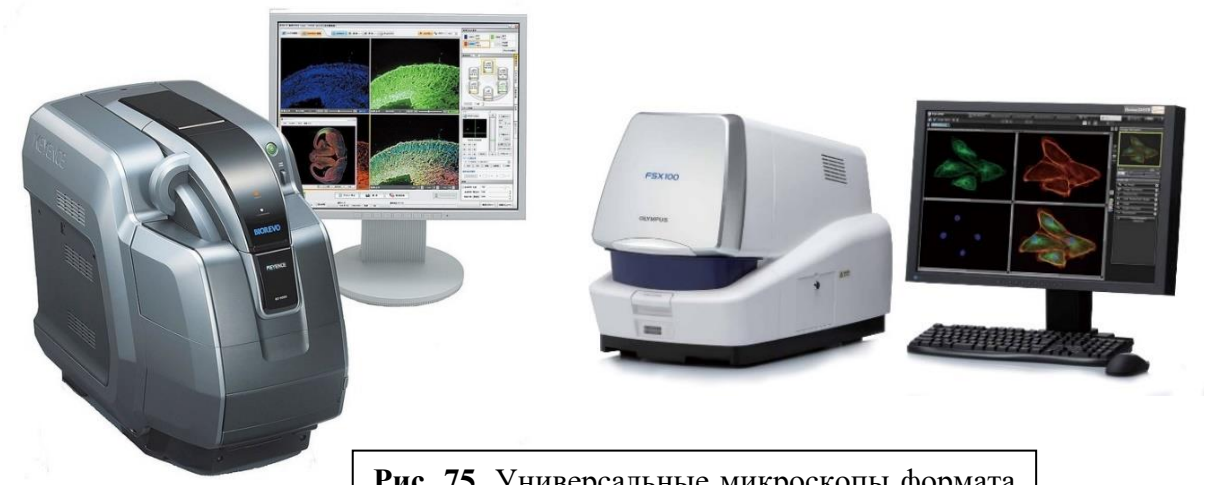


Рис. 75. Универсальные микроскопы формата «все-в-одном». Слева: KEYENCE BIOREVO BZ-9000; справа: OLYMPUS FSX100, Япония.

В настоящее время являются наиболее современными микроскопами для рутинных медико-биологических исследований. Позволяют встроить микроскоп непосредственно в экспериментальный setup, причем компьютер микроскопа берет на себя запись и интеграцию получаемой информации, как микроскопических изображений, так и сопутствующих метаданных. Соединение с Интернетом позволяет контролировать эксперимент и вносить изменения из любой точки Земного шара. Микроскопы адаптированы для реализации наиболее сложных протоколов High Content Screening Automation (HCSA). На рисунке 75 показаны примеры таких микроскопов.

Последним словом в развитии концепции «все-в-одном» является система Mica компании Leica Microsystems, которую производители именуют уже не микроскоп «все-в-одном»,



Рис. 76. Микроскопический центр Mica, Германия.

а Microhub (Микроскопический центр, Рис. 76). Это первая система, интегрирующая широкопольную и лазерную сканирующую конфокальную микроскопию. Ее возможности включают микроскопию проходящего света, модуляционный контраст, широкопольную флуоресцентную микроскопию и лазерную сканирующую конфокальную микроскопию. Встроенный искусственный интеллект превращает использование любого из этих методов или их комбинаций в рутинную работу. Чтобы получить высококачественные изображения и дополнительные данные, достаточно установить препарат и несколько раз кликнуть мышкой - система автоматически оптимизирует параметры настройки микроскопа и захвата изображений.

13. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С момента его изобретения и до настоящего времени микроскоп является незаменимым инструментом в большинстве биомедицинских исследований. Не будет преувеличением сказать, что ни одно другое изобретение человечества не спасло столько жизней, сколько спас обычный микроскоп в руках микробиологов, открывших патогенные микроорганизмы и способы борьбы с ними. За прошедшее время микроскопы сильно изменились, появились новые методы и новые типы микроскопии. Например, появление флуоресцентной микроскопии не только дало колоссальный толчок развитию экспериментальной биологии и медицинской диагностики, но и привело к появлению микроскопов сверхвысокого разрешения (техника оптической наноскопии), позволивших преодолеть дифракционный предел.

Сейчас на мировом рынке представлены многочисленные модели микроскопов от простых, рассчитанных на один-два метода (например, проходящий свет и фазовый контраст), до очень сложных универсальных систем, в которые заложена возможность использования если не всех, то почти всех методов оптической микроскопии. Выбирая микроскоп для работы, пользователь должен ясно представлять себе, какие задачи он собирается решать, и какая модель микроскопа подходит для этого лучше всего.

В данном руководстве рассмотрены некоторые из наиболее востребованных в биомедицинских исследованиях методов и техник оптической микроскопии: микроскопия проходящего света, микроскопия отраженного света, методы контрастирования прозрачных биологических объектов и эпифлуоресцентная микроскопия. Также описаны типы оптических микроскопов, часто встречающихся в биологических и медицинских лабораториях. Желающим больше узнать про законы распространения света, устройство микроскопов и методы работы с ними автор рекомендует прежде всего книгу А.Р.Мухитова с соавторами и учебное пособие Г.Н.Виноградовой и В.В.Захарова (см. список литературы).

Адекватный выбор и использование методов оптической микроскопии предполагают хорошее знание имеющихся приборов и умение на них работать, то есть, высокую квалификацию экспериментатора. И дело здесь не только в том, что неумелый пользователь не получит достоверные результаты, но еще и в том, что при неправильном использовании микроскопической техники велик риск регистрации артефактов, которые пользователь примет за результаты эксперимента.

Современный микроскоп – это сложный прибор, сочетающий в себе последние достижения оптики, механики и автоматики. Однако даже суперсовременный компьютеризованный микроскоп при начале работы требует настройки под ваш конкретный микроскопический препарат. Без минимального знания того, как устроены микроскопы, и как формируется изображение при использовании различных методов, настроить микроскоп не удастся.

Не следует забывать и того, что основой микроскопического эксперимента является правильное изготовление микроскопического препарата, соответствующего тому микроскопу, на котором вы собираетесь его изучать. Даже самый продвинутый прибор не позволит вам получить результаты, если вы всего-навсего заключили препарат в жидкость, не соответствующую объективу, или не установили на нем корректировочное кольцо в правильное положение.

В данном пособии автор постарался кратко и в максимально доступной форме описать наиболее популярные типы оптических микроскопов и методы работы с ними. Также задачей автора было разъяснить читателям возможности и ограничения каждого из описанных микроскопов и методов. Если это руководство поможет пользователям, работая с микроскопами, лучше ориентироваться в многообразии микроскопов, техник и методов, автор будет считать свою задачу выполненной.

14. СПИСОК РЕКОМЕНДОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ И РЕСУРСЫ В ИНТЕРНЕТЕ

Основная литература

Виноградова Г.Н., Захаров В.В. Основы микроскопии. Часть 1: Учебное пособие. - Санкт-Петербург: Университет ИТМО, 2018

Виноградова Г.Н., Захаров В.В. Основы микроскопии. Часть 2: Учебное пособие. - Санкт-Петербург: Университет ИТМО, 2020.

Мухитов А.Р., Архипова С.С., Никольский Е.Е. Современная световая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях. Москва, Наука 2011.

Дополнительная литература

Колосов М.С. Основы применения широкопольной и лазерной сканирующей микроскопии в биомедицинских исследованиях. Учебное пособие. Ростов-на-Дону, ЮФУ, 2013.

Chandler D.E., Roberson R.W. Bioimaging. Current concepts in light and electron microscopy. J&B Publishers, Sudbury, Massachusetts, 2009.

Kamaraj S-K, Thirumurugan A., Dhanabalan S.S., SHevia S.A. (Editors). Microscopic Techniques for the Non-Expert. Springer, 2022.

Shapiro L. (Editor). Microscopy Techniques for Biomedical Education and Healthcare Practice. Principles in Light, Fluorescence, Super-Resolution and Digital Microscopy, and Medical Imaging. Springer Cham, 2023.

Singh D.R.. Principles and Techniques in Histology, Microscopy and Photomicrography. CBS Publishers, 2022

Yifrah K. Microcopy: The Complete Guide (2nd edition). Nemala, Israel, 2019.

Ресурсы в интернете

Leica Microsystems, Basics in Microscopy (https://www.leica-microsystems.com/science-lab/science-lab-home/tag/basics-in-microscopy/)

Nikon Microscopy, Interactive Tutorials (https://www.microscopyu.com/tutorials)

Stormoff, статьи специалистов (https://stormoff.ru/mediacenter/articles)

Zeiss Microscopy, Online Campus (https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu)

Приложение 1.

ЧТО ОЗНАЧАЮТ ОБОЗНАЧЕНИЯ НА ОБЪЕКТИВАХ.

Надпись	Что означает
Achro, Achromat	Коррекция хроматической аберрации. Объектив ахромат
Fluor, Fl, Fluar, Neofluar, Fluotar	Коррекция хроматической аберрации. Объектив флюорит
Ultrafluar	Флюорит со стеклом, прозрачным для ультрафиолетового света от 250 нм
Apo	Коррекция хроматической аберрации. Объектив апохромат
Plan, Pl, Achroplan, Plano	Коррекция кривизны поля изображения
EF, Acroplan	Увеличенное поле зрения (Extended Field), но меньше, чем у объективов Plan
N, NPL	Нормальное поле зрения, Plan
Plan Apo	Коррекция апохроматическая и кривизны поля зрения
UPLAN	Универсальный Plan объектив (Universal Plan) Olympus с плоским полем для методов светлое поле, темное поле, DIC и поляризационная микроскопия
XApo	Серия объективов Olympus X-Line с улучшенной числовой апертурой и широким спектром исправления хроматических аберраций
FLN	Серия универсальных объективов флюорит Olympus с мульти-покрытием и улучшенным пропусканием от ультрафиолетового до инфракрасного света
LU	Универсальный световой объектив (Luminous Universal) Nikon для методов светлое поле, темное поле, DIC и поляризационная микроскопия
WD, FWD	Рабочий отрезок объектива (Working Distance)
L, LL, LD, LWD	Увеличенный рабочий отрезок (Long Working Distance)
ELWD	Сверхдлинный рабочий отрезок (Extra-Long Working Distance)
SLWD	Сверхдлинный рабочий отрезок (Super-Long Working Distance)

ULWD	Сверхдлинный рабочий отрезок (Ultra-Long Working Distance)
FN	Номер поля (Field Number)
Corr, W/Corr, CR	Объектив имеет корректировочное кольцо
I, Iris, W/Iris	Объектив имеет корректировочное кольцо для настройки числовой апертуры
Oil, Oel	Объектив для масляной иммерсии
Water, WI, Wasser	Объектив для водной иммерсии
HI	Объектив для гомогенной иммерсии (Homogeneous Immersion)
Gly	Объектив для глицериновой иммерсии
DIC, NIC	Объектив для дифференциального интерференционного контраста Номарского.
CF, CFI	Скорректированы хроматические аберрации, (Chrome-Free), скорректирован на бесконечность (Chrome-Free-Infinity) (Nikon)
ICS	Скорректированная на бесконечность система цветовой коррекции (Infinity color-corrected system). Линейка улучшенных объективов Zeiss
UIS	Универсальная система бесконечности (Universal Infinity System). Линейка улучшенных объективов Olympus
RMS	Посадочная резьба объектива, установленная Королевским микроскопическим обществом (Royal Microscopical Society), диаметр 0.8″ и 36 витков/дюйм
M25, M32	Метрический диаметр посадочной резьбы объектива 25 мм или 32 мм
Phase, PHACO, PC	Объектив для фазового контраста (Phase Contrast)
Ph 1, 2, 3, и т.д.	Кольцо для фазового контраста 1, 2, 3, и т.д.
DL, DLL, ADL, DM	Фазовый контраст: темный низкий (dark low), темный низкий низкий (dark low low), окрашенный темный низкий (apodized dark low), темный средний (dark medium)
PLL, PL	Фазовый контраст: положительный низкий низкий (positive low low), положительный низкий (positive low)
λD, λS	Объективы с нано-кристаллическим покрытием (Nikon).

PM, PH	Фазовый контраст: положительный средний (positive medium), положительный высокий (positive high contrast). Участки с более высоким индексом преломления выглядят темнее.
NL, NM, NH, BM	Фазовый контраст: отрицательный низкий (negative low), отрицательный средний (negative medium), отрицательный высокий (negative high contrast), светлый средний (Bright Medium). Участки с более высоким индексом преломления выглядят светлее.
P, Po, Pol,	Объектив для поляризованного света
SF, LB	Объектив из ненапряженных материалов (Strain-Free) со слабым двойным лучепреломлением (Low Birefringence) для поляризованного света.
U, UV, Universal	Пропускает ультрафиолетовый свет (начиная от приблизительно 340 нм)
M	Металлографический объектив (Metallographic). Не предназначен для покровных стекол (no coverslip)
NC, NCG	Не предназначен для покровных стекол (No Coverslip)
Epi	Эпиобъектив для падающего освещения (Epi illumination)
TL	Для проходящего света (Transmitted Light)
BBD, HD, B/D	Для светлого или темного поля (Bright or Dark Field, Hell, Dunkel)
D	Для темного поля (Darkfield)
H	Для использования с нагревающимся предметным столиком (Heating)
U, UT	Для использования с универсальным предметным столиком (Universal)
DI, MI, TI	Для многолучевой интеферометрии (Interferometry, Noncontact, Multiple Beam, Tolanski Interferometry)
HC, HCX	Система корректировки аберраций Harmonic Compound System (Leica Microsystems)
EC	Серия объективов Zeiss с улучшенным контрастом (Enhanced Contrast)
Epiplan	Коррекция кривизны поля изображения и возможность работы в отраженном свете (эпиобъектив, Zeiss)

Приложение 2.

ТЕСТОВЫЕ ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

(ответы в конце таблицы с вопросами).

1	2	3
1		**Оптическое разрешение какого из этих объективов является наилучшим?**
	а	NPLAN 63x/0.80 0.25
	б	PLAN APO 40x/0.85 0.11
	в	NPLAN H 50x/0.50 1.8
2		**Синапсы на дендрите нейрона были промаркированы антителами против синаптического белка синаптофизина, помеченными пероксидазой хрена (синапсы окрашены в коричневый цвет). Известно, что размер синапса 50-80 нм, а расстояние между синапсами 400-500 нм. Какой из перечисленных методов микроскопирования можно использовать для подсчета синапсов?**
	а	микроскоп проходящего света
	б	фазовый контраст
	в	интерференционный контраст
	г	флуоресцентный микроскоп
	д	ничего из перечисленных
3		**Синапсы на дендрите нейрона были промаркированы антителами против синаптического белка синаптофизина, помеченными родамином. Известно, что размер синапса 50-80 нм, а расстояние между синапсами 400-500 нм. Какой из перечисленных методов микроскопирования можно использовать для подсчета синапсов?**
	а	микроскоп проходящего света
	б	фазовый контраст
	в	интерференционный контраст
	г	флуоресцентный микроскоп
	д	ничего из перечисленных
4		**Полевая диафрагма конденсора микроскопа ограничивает**
	а	поле зрения объектива
	б	поле освещения препарата
	в	поле безопасного перемещения конденсора

5		**В препарате находятся флуоресцирующие микросферы диаметром 50 нм. В каком микроскопе можно их зарегистрировать?**
	а	в микроскопе проходящего света
	б	в микроскопе интерференционного контраста
	в	в эпифлуоресцентном микроскопе
	г	во всех перечисленных
	д	ни в одном из перечисленных
6		**Что такое латеральное разрешение микроскопа?**
	а	разрешение по краям поля зрения
	б	разрешение в плоскости фокуса
	в	разрешение вдоль оптической оси
7		**Что из этого правильно?**
	а	аксиальное разрешение микроскопа равно латеральному
	б	аксиальное разрешение микроскопа лучше латерального
	в	аксиальное разрешение микроскопа хуже латерального
8		**Диаметр жгутика сперматозоида человека составляет 200-500 нм, а частота взмахов составляет10-30 взмахов в секунду. Какой микроскоп лучше всего использовать для регистрации движений жгутика (выберите один)?**
	а	микроскоп проходящего света
	б	микроскоп отраженного света
	в	фазовый контраст
	г	интерференционный контраст
	д	флуоресцентный микроскоп
9		**Что в флуоресцентной микроскопии означает выражение «максимум испускания»?**
	а	максимальная яркость флуорохрома
	б	время, когда свечение флуорохрома достигает максимума
	в	длина волны, на которой яркость флуорохрома максимальна

10		**Чем больше увеличение объектива, тем выше его разрешение. Верно ли это утверждение?**
	а	да
	б	да отчасти
	в	нет
11		**Необходимо окрасить препарат гематоксилином и изучить его в микроскопе проходящего света. Важны ли толщина и качество при выборе предметного и покровного стекла?**
	а	важно только для предметного
	б	важно только для покровного
	в	важно и для предметного, и для покровного
	г	не важно
12		**Необходимо окрасить препарат флуоресцеином и изучить его в эпифлуоресцентном микроскопе. Важны ли при выборе предметного и покровного стекла их толщина и качество?**
	а	важно только для предметного
	б	важно только для покровного
	в	важно и для предметного, и для покровного
	г	не важно
13		**На объективе нанесена маркировка 63x/1,3 Imm Korr UV-VIS-IR и имеется корректировочное кольцо. Что необходимо скорректировать, вращая это кольцо?**
	а	тип применяемой с этим объективом иммерсии
	б	диапазон световых волн, проходящих через объектив
	в	степень открытия апертурной диафрагмы объектива
14		**Что необходимо использовать для регулировки яркости возбуждающего света в флуоресцентном микроскопе, оснащенном ртутной лампой**
	а	полевая диафрагма микроскопа
	б	апертурная диафрагма микроскопа
	в	изменение яркости лампы
	г	замена флуоресцентного кубика

15		**Как повлияет на разрешение микроскопа проходящего света увеличение толщины исследуемого препарата?**
	а	не повлияет
	б	незначительно ухудшит
	в	значительно ухудшит
16		**Какой объектив лучше использовать в микроскопе для изучения препарата, в котором ядра клеток окрашены DAPI (максимум испускания 461 нм)?**
	а	монохромат
	б	ахромат
	в	апохромат
	г	любой из перечисленных
	д	ни один из перечисленных
17		**Какой объектив лучше использовать в микроскопе для изучения препарата, в котором ядра клеток окрашены DAPI, (максимум испускания 461 нм), цитоплазматические структуры окрашены флуоресцеином (максимум испускания 512 нм), а клеточные мембраны окрашены DiI (максимум испускания 565 нм)?**
	а	монохромат
	б	ахромат
	в	апохромат
	г	любой их перечисленных
	д	ни один из перечисленных
18		**Чем объектив Планахромат отличается от объектива Ахромат?**
	а	у него улучшена коррекция лучей разной длины волны
	б	у него улучшена коррекция по краям поля зрения
	в	у него исправлена кривизна изображения по полю зрения
	г	у него исправлена светосила по полю зрения
19		**На объективе нанесена маркировка 20x/0.95 WI ∞0.11-0.23 DIC. Что означает 0.11-0.23?**
	а	числовая апертура объектива
	б	рабочий отрезок объектива
	в	фокусное расстояние объектива

	г	светосила объектива
	д	диаметр входного зрачка
	е	оптимальная толщина покровного стекла
	ж	оптимальная толщина препарата
20		**На объективе нанесено одно цветное кольцо синего цвета. С каким типом иммерсии необходимо использовать этот объектив?**
	а	дистиллированная вода
	б	глицерин
	в	иммерсионное масло
	г	без иммерсии
21		**На объективе нанесена маркировка 20x/1.00 Glyc ∞/0 WD 8.2. Какую иммерсионную жидкость необходимо использовать?**
	а	вода
	б	глицерин
	в	иммерсионное масло
	г	любую из перечисленных
22		**На объективе нанесена маркировка 20x/1.00 Glyc ∞/0 WD 8.2. Можно ли использовать его без иммерсионной жидкости?**
	а	можно
	б	нельзя
	в	можно, но разрешение несколько ухудшится
23		**На объективе нанесена маркировка 20x/1.00 Glyc ∞/0 WD 8.2. Что означает ноль после знака бесконечности?**
	а	степень коррекции на бесконечность равна нолю
	б	объектив можно использовать с иммерсионными средами с коэффициентом преломления ноль
	в	объектив можно использовать с препаратами без покровного стекла
24		**На объективе нанесена маркировка 25x/1.05 SIL OFN25 DIC N2. Можно ли использовать его для интерференционного контраста?**
	а	можно
	б	нельзя

	в	можно, но разрешение несколько ухудшится
25		**На объективе нанесена маркировка 10x/0.25 WD 17.7. Каково его приблизительное оптическое разрешение?**
	а	100 нм
	б	250 нм
	в	500 нм
	г	1000 нм
26		**На объективе нанесена маркировка 25x/1.05 SIL OFN25 DIC N2. Что означают буквы SIL?**
	а	необходимо использовать силиконовое иммерсионное масло
	б	желательно использовать силиконовое иммерсионное масло
	в	объектив имеет водозащитное силиконовое покрытие
	г	объектив имеет силиконовое просветление линз
27		**На объективе нанесена маркировка 10x/0.25 Ph1 ADL ∞/1/2 WD 6.2. Что означает Ph1?**
	а	объектив для фазово-контрастной микроскопии по типу один
	б	объектив для фазово-контрастной микроскопии и номер соответствующей ему заглушки в конденсоре
	в	объектив для фазово-контрастной микроскопии и тип соответствующего конденсора
28		**Часть флуоресцентных микроскопов комплектуется ксеноновыми лампами, а часть ртутными. Почему?**
	а	у них разный срок службы
	б	ртутные лампы менее безопасны
	в	у них разный спектр испускания
	г	не везде разрешается использование ртутных ламп
	д	ртутные лампы более яркие
29		**Излучение какой длины волны (цвета) при одинаковой мощности наиболее опасно для человека?**
	а	ультрафиолетовый
	б	синий
	в	зеленый

	г	красный
	д	инфракрасный
30		**На объективе нанесена маркировка 10x/0.25 WD17.7 Что означают цифры 17.7?**
	а	числовая апертура объектива
	б	рабочий отрезок объектива
	в	фокусное расстояние объектива
	г	светосила объектива
	д	диаметр входного зрачка
	е	оптимальная толщина покровного стекла
	ж	оптимальная толщина препарата
31		**Методы фазового и интерференционного контраста используются для:**
	а	контрастирования слабоокрашенных препаратов
	б	контрастирования при недостаточном освещении
	в	контрастирования прозрачных неокрашенных препаратов
32		**Настройка освещения по Келеру применяется при работе с микроскопами:**
	а	проходящего света
	б	падающего света
	в	эпифлуоресцентными
	г	все перечисленные
	д	ничего из перечисленных
33		**Использование иммерсионного масла позволяет;**
	а	увеличить светосилу объектива
	б	увеличить поле зрения объектива
	в	увеличить разрешение объектива
	г	увеличить контрастность изображения
34		**На объективе нанесена маркировка ACS APO 40x/1/15 OIL ∞/0/17/P. Можно ли использовать его для фазово-контрастной микроскопии?**
	а	можно

	б	нельзя
	в	можно, но разрешение немного ухудшится
	г	можно, но разрешение сильно ухудшится
35		**Имеется флуоресцентный микроскоп, оснащенный ртутной лампой высокого давления. Можно ли изучать под ним препарат, окрашенный флуорохромом Alexa 644 (максимум возбуждения 647 нм, максимум испускания 680 нм)?**
	а	можно
	б	нельзя
	в	можно, но разрешение немного ухудшится
	г	можно, но разрешение сильно ухудшится
36		**Показатель преломления вещества тем больше, чем больше скорость света в этом веществе. Верно ли это утверждение?**
	а	верно
	б	отчасти верно
	в	неверно
37		**Повлияет ли на разрешение флуоресцентного микроскопа использование вместо предметного стекла пластмассовой чашки Петри?**
	а	не повлияет
	б	незначительно ухудшит
	в	значительно ухудшит
38		**Лучи каких цветов скорректированы в объективах флюорит?**
	а	красного и желтого
	б	красного и зеленого
	в	красного и синего
	г	синего и зеленого
39		**Что кодируют цветные кольца на объективах?**
	а	увеличение и толщину покровного стекла
	б	увеличение и корректировку аберраций
	в	увеличение и числовую апертуру
	г	увеличение и необходимую иммерсию

	д	увеличение и разрешение
40		**На объективе нанесена маркировка 100x/1.25 OIL. Что означает 1.25?**
	а	числовая апертура объектива
	б	рабочий отрезок объектива
	в	фокусное расстояние объектива
	г	светосила объектива
	д	диаметр входного зрачка
	е	оптимальная толщина покровного стекла
	ж	оптимальная толщина препарата
	з	длина совместимого тубуса
41		**Фронтальную линзу объектива, не предназначенного для иммерсии, испачкали иммерсионным маслом. Что нужно использовать для его удаления?**
	а	мягкую салфетку
	б	мягкую салфетку, смоченную спиртом
	в	мягкую салфетку, смоченную ксилолом
	г	мягкую салфетку, смоченную дистиллированной водой
	д	любое из вышеперечисленных
	е	ничего из вышеперечисленных
42		**Что необходимо сделать, начиная изучение образца в флуоресцентном микроскопе?**
	а	настроить освещение по Келеру
	б	установить флуоресцентный кубик, соответствующий используемому флуорохрому
	в	протереть фронтальную линзу объектива
	г	все вышеперечисленное
43		**На объективе нанесена маркировка 100x/1.25 oil ∞/0.17. Предметное стекло приблизительно какой толщины можно использовать для флуоресцентной микроскопии с этим объективом без ухудшения разрешения?**
	а	1 мм
	б	1,7 мм
	в	2,5 мм

	г	любое из перечисленных
	д	ни одно из перечисленных
44		**На объективе нанесена маркировка 10x/0.25 Ph1 ADL ∞/1/2 WD 6.2. Можно ли использовать его для флуоресцентной микроскопии?**
	а	можно
	б	нельзя
	в	можно, но разрешение немного ухудшится
	г	можно, но разрешение значительно ухудшится

Правильные ответы: 1(б); 2(д); 3(г); 4(б); 5(в); 6(б); 7(в); 8(г); 9(в); 10(в); 11(в); 12(б); 13(а); 14(б); 15(в); 16(г); 17(в); 18(в); 19(е); 20(г); 21(б); 22(б); 23(в); 24(а); 25(г); 26(а); 27(б); 28(в); 29(а); 30(б); 31(в); 32(а); 33(в); 34(б); 35(б); 36(в); 37(а); 38(в); 39(г); 40(а); 41(б); 42(б); 43(г); 44(в).