

Mikroskopie s fázovým kontrastem

Charakteristika

Většina světelných mikroskopů, které se používají pro zkoumání nejen biologických preparátů, umožňuje pozorování jen takových objektů, které v různé míře pohlcují procházející světlo – mění tedy amplitudu procházejícího elektromagnetického vlnění. Tyto objekty se nazývají **amplitudové**.

Existuje ale mnoho objektů, které po průchodu světla poskytují velmi malé nebo žádné rozdíly v absorpci světelného záření a jsou tedy pro pozorování v procházejícím světle nevhodné. Tyto preparáty ale kvůli různému indexu lomu v různých bodech mění fázi procházejícího světelného vlnění. Paprsky procházející preparátem se tedy liší fází světelné vlny. Takovéto objekty nazýváme **fázové**. Patří mezi ně většina nebarvených biologických preparátů.

Malé fázové rozdíly však naše oko není schopno rozeznat, a proto se nám fázové objekty jeví jako bezstrukturní a průhledné. Proto k jejich pozorování není běžný mikroskop vhodný. Pro jejich pozorování byl tedy vynalezen tzv. **fázový mikroskop**, který je schopen převést fázové změny na amplitudové, a tedy na změny lidským okem pozorovatelné. Umožňuje tak pozorování mnohých buněčných struktur, které byly před vynalezením fázového mikroskopu pozorovatelné až na mrtvých a nabarvených buňkách.

Fázový posuv závisí na vlnové délce záření zdroje, indexu lomu pozorovaného objektu, délce optické dráhy světla v pozorovaném objektu (tloušťka objektu).

Princip funkce

Obraz objektu v obrazovém ohnisku vzniká interferencí dvou vlnění. **Vlnění přímého**, které prochází preparátem beze změny, a **vlnění difrakčního**, které je fázovým objektem posunuté. Fázový posun těchto dvou vln je ale poměrně malý.

Přímé a difrakční vlnění můžeme oddělit tak, že do obrazového ohniska objektivu umístíme tzv. **fázovou destičku**, která má tvar prstence. Ta posune fázi přímého vlnění o hodnotu odpovídající čtvrtině vlnové délky.

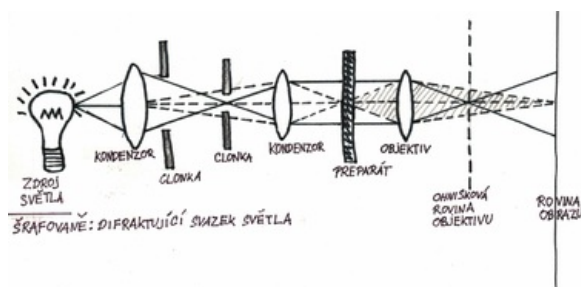


schéma stavby fázového mikroskopu

Podle použité fázové destičky nám mohou vzniknout dva interferenční obrazy.

- **Pozitivní fázový kontrast** – fázová destička o optické tloušťce $3/4$ vlnové délky posouvá fázi přímého vlnění o $+90^\circ$. Tlustší části preparátu se budou jevit *tmavé*, tenčí naopak *světlé*.
- **Negativní fázový kontrast** – fázová destička o optické tloušťce $1/4$ vlnové délky posouvá fázi přímého vlnění o -90° . Tlustší části preparátu se budou jevit *světlé*, tenčí naopak *tmavé*.

Význam

Používá se pro pozorování nezabarvených objektů, především struktur v živých buňkách, jako jsou **jádro, jadérko, chromozomy a vakuoly**. Může podstatně zvýšit kontrast také u slabě zabarvených a špatně rozlišitelných struktur histologických preparátů.

Historie

První fázový mikroskop vynalezl holandský fyzik Frederik Zernike roku 1935 a použil metodu fázového kontrastu.

Odkazy

Zdroj

- http://www.sci.muni.cz/kfar/html/fazovy_kontrast.pdf
- <http://xarquon.jcu.cz/edu/zbb/fazovyk.pdf>
- https://en.wikipedia.org/wiki/Phase_contrast_microscopy

Použitá literatura

- HEJTMÁNEK, Milan. *Úvod do světelné mikroskopie*. 3. vydání. Olomouc : Univerzita Palackého, 1993. ISBN 8070673087.
- PROSSER, Václav, et al. *Experimentální metody biofyziky*. 1. vydání. Praha : Academia, 1989. ISBN 80-200-0059-3.

- Smékal, Petr. Experimentální metody biofyziky II. Ostravská universita 1995, Nová Huť