О.В. Егорова,
кандидат технических наук, эксперт Госстандарта РФ
Санкт-Петербург, Россия

Современное оборудование для микроскопических исследований. Инвертированные микроскопы

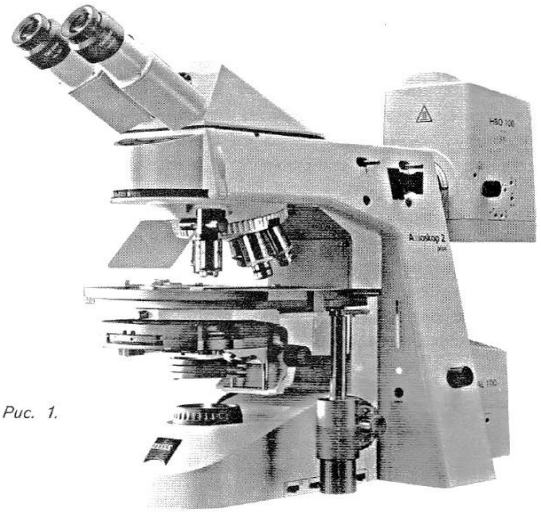

Рис. 1.

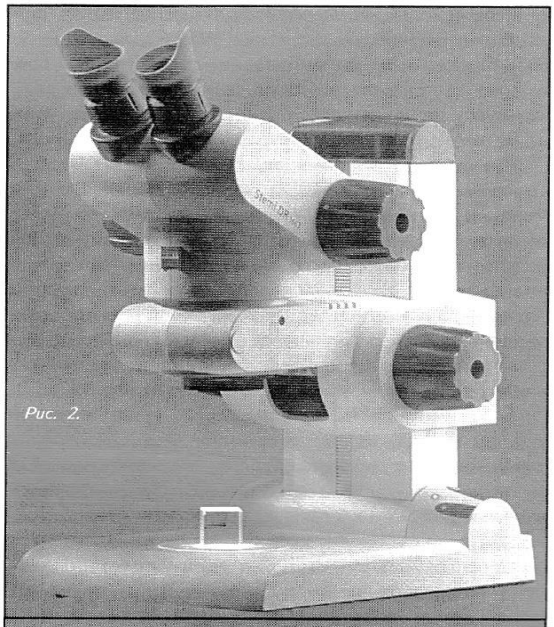

Рис. 2.

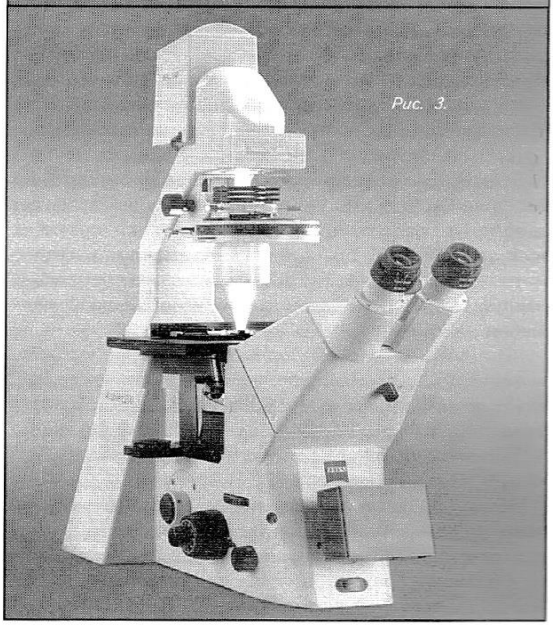

Рис. 3.

В конце прошлого века в журнале «Terra Medica nova» был начат цикл статей, посвященных применению современных микроскопов в медицине. Это было связано с внедрением микроскопов нового поколения с использованием современных принципов конструирования и технологии изготовления. За последние 10 лет разработаны новые методы контрастирования, позволяющие расширить представление о микромире, а также обеспечить различные биотехнологические процессы. Сегодня целесообразно продолжить этот цикл, поскольку в нашей стране наметился процесс как переоснащения, так и создания новых направлений в медицине.

В номерах 2 (1997) и 3 (1998) журнала «Terra Medica nova» были напечатаны первые статьи о новом поколении стереоскопических и операционных микроскопов. А в номере 2 приложения «Лабораторная диагностика» за 2003 г. были рассмотрены основные особенности нового поколения световых микроскопов для лабораторий.

Использование микроскопов в медико-биологической практике настолько разнообразно, что с конструкторско-технологической точки зрения требуется работа не только с микроскопами плоского поля (рис. 1) и трехмерного, объемного изображения (рис. 2), но и с микроскопами перевернутой (инвертированной) конструкции (рис. 3).

ОБОРУДОВАНИЕ

В данной статье на примере номенклатуры ведущих фирм будут рассмотрены основные особенности инвертированных микроскопов, их основных узлов, а также возможность наблюдения объектов с помощью хорошо известных и новых методов исследования и контрастирования.

Область применения

Область применения инвертированных микроскопов – бактериология, вирусология, репродукция, молекулярная биология и т.д.

Микроскопы используются для исследования растительных и животных клеток и ткани. Для рутинного наблюдения и культивирования препарат чаще всего помещается в специальную посуду: пробирки для культур, специальная эмбриологическая посуда (чашки Петри), а также планшеты для микротитрования.

Инвертированные микроскопы по соотношению «цена–качество» и по классу сложности условно можно разделить на две группы: а) рабоче-лабораторные, предназначенные для рутинной практической работы в технологической цепочке исследований или производства; б) исследовательско-универсальные для научно-исследовательской и точной работы. Это разделение определяет класс оборудования как по сложности (т.е. по широте возможностей применения), так и по качеству создаваемого изображения.

Если рабочие и лабораторные микроскопы имеют простые конструкции с ограниченной возможностью ручной перенастройки, то современные исследовательские микроскопы являются как ручными, так и моторизованными системами, а также базовыми для нового типа микроскопов – лазерного сканирующего микроскопа.

Основными признаками необходимости применения микроскопов перевернутой конструкции являются:

1) работа с нестандартной по габаритным размерам посудой, в которой расположен исследуемый материал; это влечет за собой особые требования к оптике микроскопа, связанные с увеличением рабочих расстояний объективов (как воспроизводящей части микроскопа) и конденсоров (как осветительной части микроскопа);

2) манипуляция с препаратом, т.е. выполнение определенных операций с помощью микроманипуляторов или других инструментов, требующих большого свободного расстояния для их размещения; кроме того, должна быть обеспечена неподвижность предметного столика, на котором установлена специальная посуда, при настроечном (фокусировочном) движении микроскопа;

3) относительно небольшие увеличения по сравнению с обычным микроскопом (при рутинных работах – до 200х, максимум – 630х), но с большим разрешением, чем в стереомикроскопе (при увеличении 100х в обычном микроскопе разрешение равно 1,34 мкм, в стереомикроскопе – 6,71 мкм).

Итак, основные конструкторско-технологические отличительные особенности инвертированных микроскопов сводятся к следующему:

• большой предметный стол для установки различной по габаритам и форме посуды, а при необходимости работы с препаратоводителем – и для крепления различных по габаритам чашек Петри и планшет;

• объективы с большим рабочим расстоянием, скорректированные по качеству изображения на различную толщину покровного стекла, роль которого в данном случае играет дно посуды;

• конденсоры с таким большим рабочим расстоянием, которое позволяет размещать инструменты и руки над объектом для проведения работ.

Документирование

Одним из требований, предъявляемых к современному микроскопу, является документирование или, по крайней мере, вывод изображения на экран монитора. Существует несколько вариантов выполнения этого требования. Традиционный вариант с использованием тринокуляра (бинокулярной насадки с фотовидеовыходом) для инвертированных микроскопов несколько неудобен из-за того, что является помехой при работе с препаратом. Конструкции современных микроскопов позволяет решить эту проблему. Например, новая рабочая модель Аксиоверт 40 (Axiovert 40, фирма «Карл Цейсс», Германия) имеет самый экономичный вариант – фронтальный фотовидеовыход (рис. 4), в то время как исследовательская модель Аксиоверт 200 имеет уже 5 выходов.

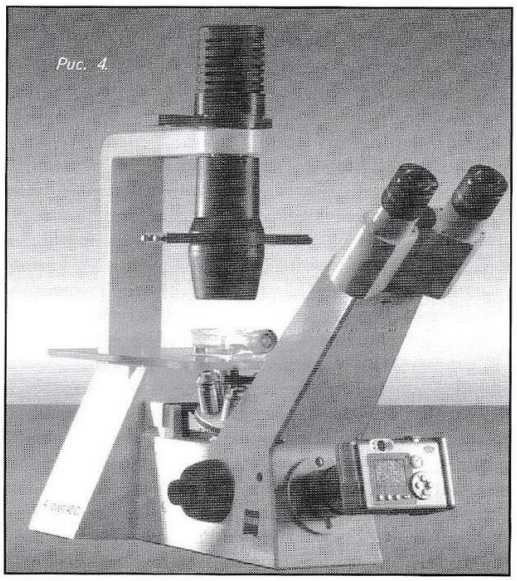
Рис. 4

Это вызвано тем, что Аксиоверт 200 является базовой моделью для лазерного сканирующего микроскопа, модуль которого может быть размещен сбоку или внизу штатива.

В процессе работы с различными по габаритам инкубаторами и микроманипуляторами пользователь сам выбирает способ крепления фотовидеосистемы.

В качестве системы документирования применяются видеосистемы и фотоаппараты (цифровые и пленочные). О них разговор пойдет в следующих публикациях.

WWW.TERRAMEDICA.SPB.RU

Методы исследования и контрастирования

Разнообразие современных способов микроскопирования приводит к усложнению конструкций микроскопов за счет реализации различных методов контрастирования.

Инвертированные микроскопы позволяют осуществлять следующие методы исследования и контрастирования:

в проходящем свете:

- метод светлого поля;
- фазовый контраст;
- VAREL-контраст* (переменный контраст);
- косое освещение;
- метод темного поля;
- DIC-контраст (дифференциально-интерференционный контраст);
- PlasDIC-контраст* (пласДИК-контраст);
- Hoffman-контраст (Хоффман-контраст);
- поляризация.

в отраженном свете:

- люминесценция.

Известно, что для каждого метода контрастирования необходимы условия, связанные с изменением светового потока, прошедшего через объект, а также дополнительное изменение света при формировании собственно изображения. В связи с этим на первый план выходят два основных оптических компонента микроскопа — объектив и конденсор.

Особенности разработки и технологического исполнения объективов и конденсоров прежде всего связаны с необходимостью создания конструкций с большим рабочим расстоянием.

LD-объективы с большим рабочим расстоянием

Если увеличение объектива является стандартизованной величиной, то остальные параметры отличаются от параметров обычных объективов. К остальным параметрам следует отнести числовую апертуру объектива, его рабочее расстояние и возможность наблюдения через толстое дно посуды, т.е. корректировку оптической конструкции объектива на толщину покровного стекла с сохранением требуемого качества изображения.

Таблица 1

Обозначение объектива	Свободное рабочее расстояние без стекл. колпачка для толщины дна		
	D=0,17 [мм]	D=1 [мм]	D=1,2-1,8 [мм]
CP-Achromat 5x/0,12	10,9	10,4	10,2...9,8
CP-Achromat 10x/0,25	5,3	4,8	4,6...4,2
A-Plan 2,5x/0,06	9,4	8,9	8,7...8,3
A-Plan 5x/0,12	9,8	9,2	9,1...8,7
A-Plan 10x/0,25	4,4	3,9	3,7...3,3
LD A-Plan 20x/0,30 Ph 1	4,8	4,3	4,2...3,8
LD A-Plan 32x/0,40 Ph 1		3,2	3,1...2,7
LD A-Plan 40x/0,50 Ph 2		2,0	1,9...1,5
Pan-Neofluar 2,5x/0,075	9,55	9,0	8,9...8,5
Pan-Neofluar 5x/0,15	13,6	13,1	12,9...12,5
Pan-Neofluar 10x/0,30	5,58	5,0	4,9...4,5
Объективы с коррекцией на толщину дна посуды	**D = 0,17 - 1,5**		
LD Pan-Neofluar 20x/0,40 Korr Ph2			8,34...7,46
LD Pan-Neofluar 40x/0,60 Korr Ph2			3,27...2,57
LD Pan-Neofluar 63x/0,75 Korr Ph2			2,11...1,24

Обычно используемая посуда имеет толщину дна, значительно большую, чем привычная толщина покровного стекла 0,17 мм. Кроме того, материал, из которого сделана чашка Петри, не всегда является стеклом. Далее, высокое расчетное качество изображения объектива на дифракционном уровне достигается за счет учета всех физико-химических свойств материалов, расположенных на пути света от объекта до объектива. В данном случае у нас принимается во внимание только материал дна посуды. В прямом микроскопе приходится учитывать и питательную среду, в которой расположен объект (например, эмбрион).

Рабочие расстояния обычных объективов малого увеличения без труда обеспечивают требуемое расстояние с учетом дна посуды толщиной до 2 мм. Например, объективы с улучшенной коррекцией по полю CP-Achromat с параметрами 5x/0,12 имеют рабочее расстояние 10,9 мм, правда, с параметрами 10x/0,25 эта величина уже в 2 раза меньше (5,3 мм).

В среднем диапазоне увеличения рабочие расстояния уменьшаются чаще всего до значений менее 1,5 — 1 мм. Такие объективы уже нельзя применять для работы со специальной посудой на инвертированных микроскопах.

LD-объективы (***Long Distance — большое расстояние***) имеют относительно большое рабочее расстояние и в то же время сохраняют обычную для всех других объективов оптическую высоту 45 мм. Высота объектива является стандартизованным параметром и обозначает расстояние от места крепления объектива в револьверном устройстве до плоскости предмета при полученном резком изображении объекта. Этот параметр является постоянной величиной для всех объективов несмотря на разные габаритные размеры.

Следует отметить, что покровное стекло или дно посуды как плоскопараллельная пластинка, входящая в расчет, влияет на качество изображения в микроскопе. Если объектив рассчитан на определенную толщину, обозначенную на корпусе, то работа с большей или меньшей толщиной может приводить к возникновению сферической аберрации, т.е. к появлению вуали, снижению контраста, нечеткости контура. Причем эта зависимость тем сильнее, чем больше числовая апертура объектива. Вспомним, как сильно влияет на качество изображения отсутствие покровного стекла 0,17 мм при работе с объективом 40x0,65, в то время как при работе с объективом 20x0,40 это практически незаметно. Поэтому при настройке объективов фирмы «Карл Цейсс» с большим увеличением 32x или 40x на определенную толщину дна посуды на объектив надевается стеклянный колпачок, компенсирующий толщину дна посуды.

* Комплектуются только микроскопы фирмы «Карл Цейсс» (Германия).