

# Světelný mikroskop - základní pracovní nástroj

## Tři cíle mikroskopie:

- zvětšit obraz
- rozlišit detaily v obraze
- popsat detaily viditelné okem nebo kamerou

## Jednoduchý mikroskop

jedna čočka nebo jeden systém čoček  
(lupa)



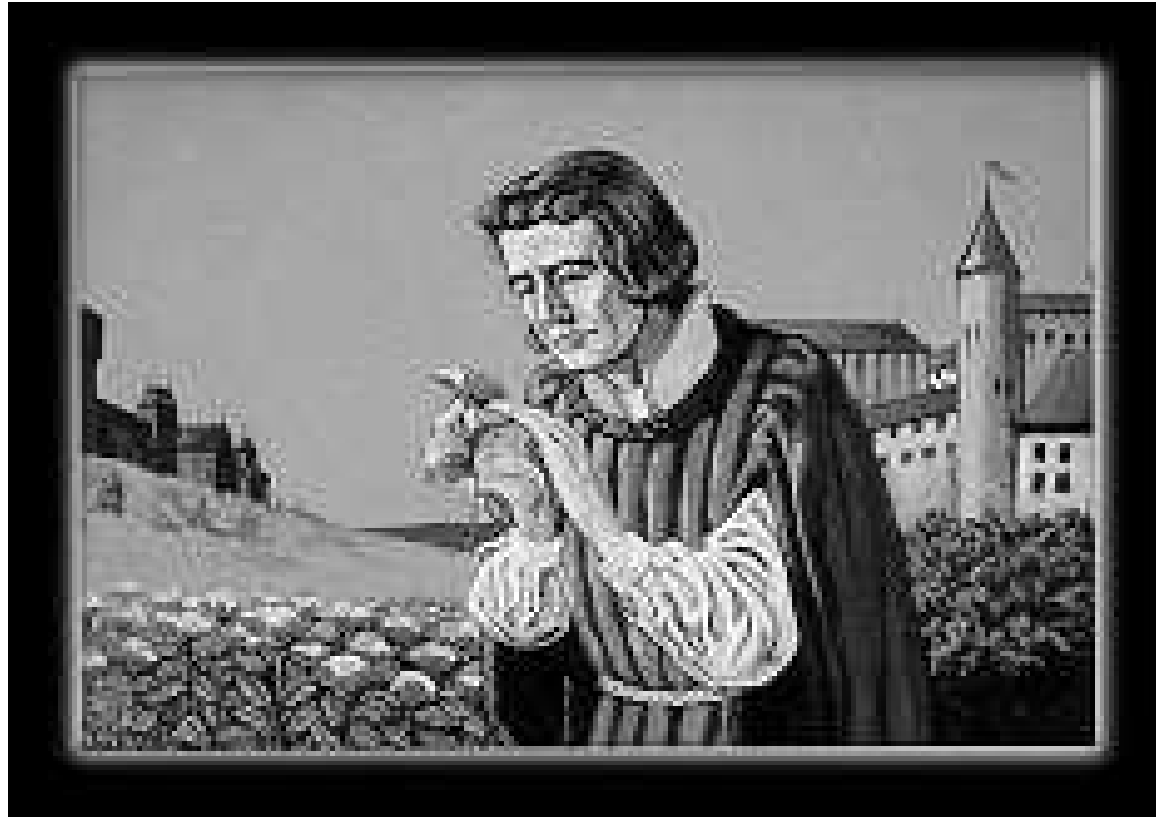
## Složený mikroskop

více čoček nebo více systémů čoček



# **Světelná mikroskopie a kontrastní metody**

## **Historie světelného mikroskopu**

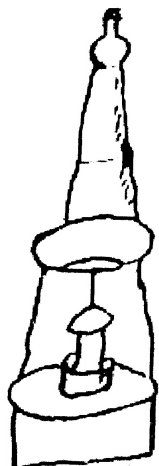
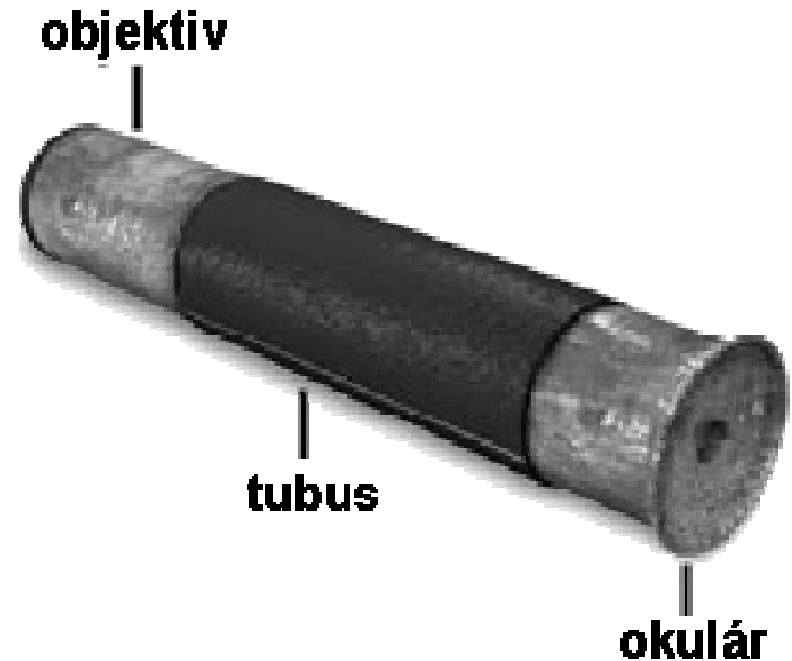


**Odjakživa chtěli lidé vidět věci mnohem menší, než mohli vnímat pouhým okem**

# Hans a Zacharias Janssenovi



Zacharias Janssen  
(1580-1638)



1625 - nejstarší známá kresba mikroskopu

**První složený mikroskop (kolem 1595)**

zvětšoval 3x při zatažení tubusu a více než 10x při max. roztažení, měřil 1,2 m

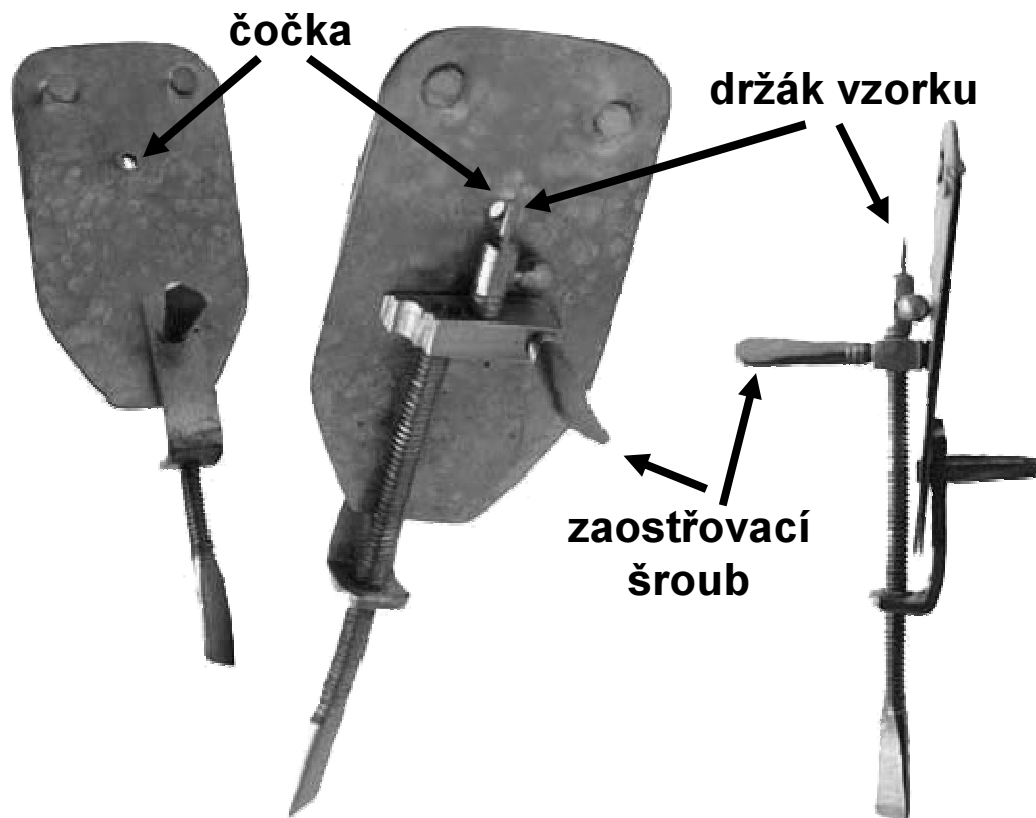
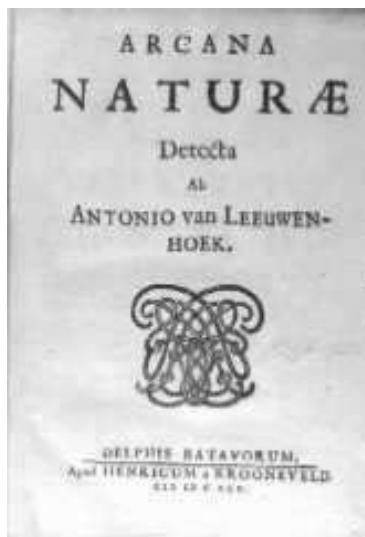


# Antony van Leeuwenhoek

(1632 - 1723)

## Jednoduchý mikroskop(1660)

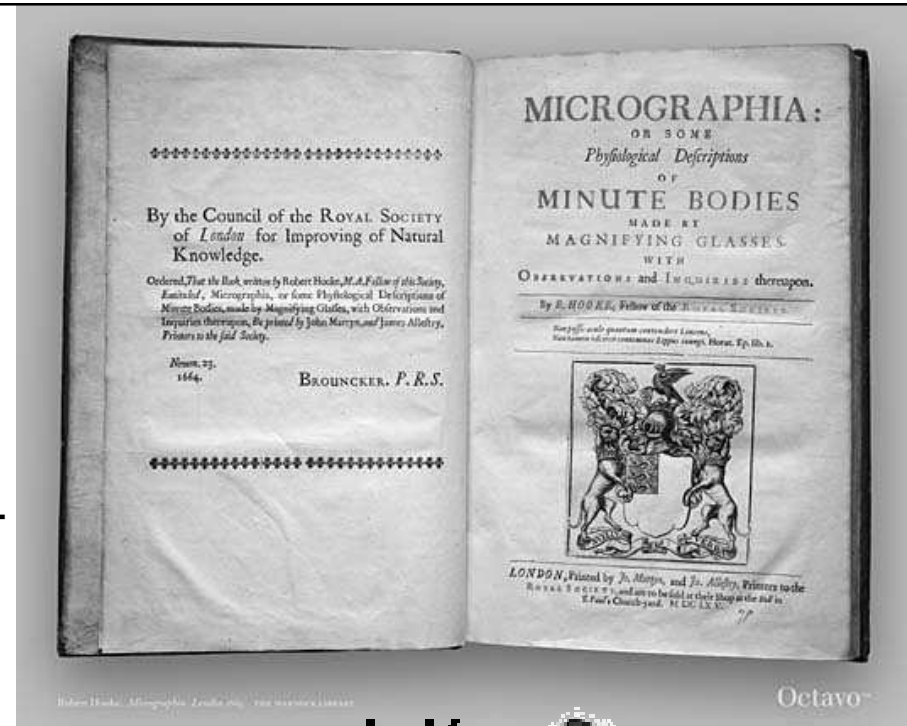
Konvexní skleněná čočka byla připevněna do kovového držáku a byla zaostřována pomocí šroubu.



# Robert Hook

## 1665 složený mikroskop

kniha Micrographia,  
sledování tenkých řezů korkem -  
pojem buňka

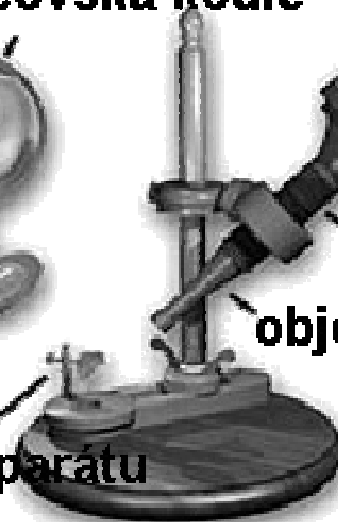


Robert Hooke  
(1635-1703)

olejová lampa  
ševcovská koule



držák preparátu



zaostřovací šroub  
objektiv

okulár



tubus

# Mikroskopy 17. století

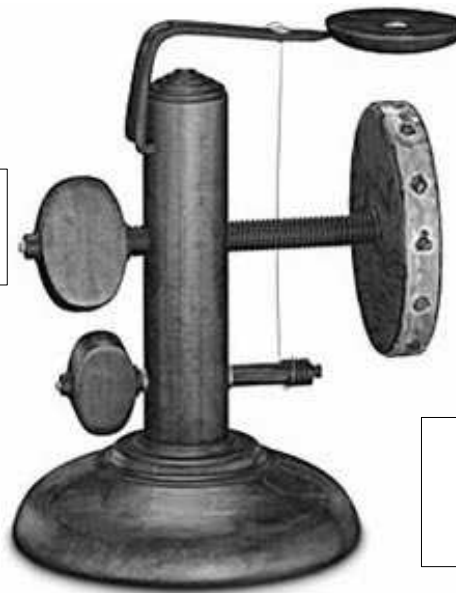


**Galileo Galilei**  
po roku 1600



**Itálie**

Guiseppe  
Campani,  
1662



Jednoduchý Italský  
mikroskop, 1686



**Anglie**

John  
Yarwell,  
1680

# Mikroskopy 18. století



1700



1730



1761

# Mikroskopy 19. století





# Mikroskopy 20.století

Nikon 1900



Olympus 1998



Leitz 1910



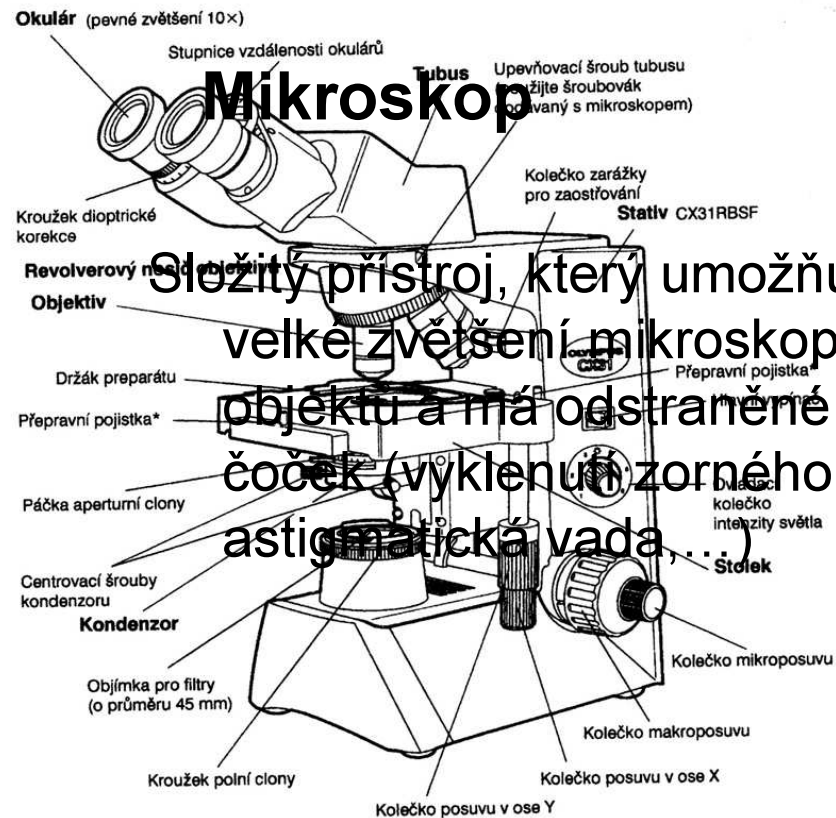
# Lupa

Skládá se z jedné čočky  
nebo z jediného systému  
čoček

Olympus CX31

## Složení mikroskopu

1. Část mechanická: stativ, noha stativu, tubus, revolverový měnič objektivů, stolek, makrošroub, mikrošroub
2. Část osvětlovací: zdroj světla, zrcátko, polní clona, kondenzor, irisová clona, objímka filtru
3. Část optická: objektivy, okuláry



# 1. Část mechanická

## Stativ

### Noha stativu

**Tubus** - spojuje okulár a objektiv

***Mechanická (optická) délka tubusu*** - vzdálenost mezi horním a dolním koncem tubusu, mění se vzájemným posunem dvou na sebe nasunutých částí, dána výrobcem (160 - 170 mm) a je nutno ji dodržovat - objektivy a okuláry konstrukčně přizpůsobeny

- nekonečná délka tubusu (vkládání modulů),  $\infty$

- monokulární přímý, šikmý, binokulární, trinokulární

## Revolverový měnič objektivů

**Stolek** - pohyblivý; s křížovým vodičem preparátu, který se ovládá dvěma šrouby

**Makrošroub** - pro hrubé ostření

**Mikrošroub** - pro jemné doostřování

## 2. Část osvětlovací

Pozorování ve světle **procházejícím x dopadajícím**

**Zdroj světla** - lampa v noze stativu s kolektorovou čočkou (fixně seřízená), kolektor spolu se **zrcátkem** soustřeďuje světlo do kondenzoru

**Polní clona** - používá se při malém zvětšení, viz práce s mikroskopem

**Irisová clona** - reguluje množství světla přicházejícího do mikroskopu, stupnice, podle které se nastavuje numerická apertura kondenzoru

**Kondenzor** - 2-3 spojky, objímka; *soustřeďuje paprsky pro dokonalé osvětlení zorného pole*, optická osa osvětlovací soustavy musí procházet středem kondenzoru

***Numerická apertura kondenzoru má být vždy menší než numerická apertura objektivu (70-80%)***

**Filtry** - modrý, šedý



### 3. Část optická - čočky

Zabezpečuje vhodnou kombinací čoček (kromě vytváření obrazu) také v různé míře odstraňování hlavních optických vad čoček

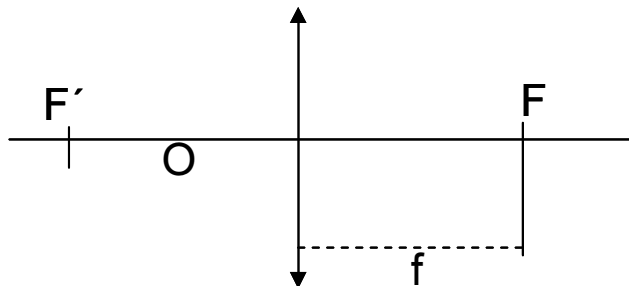
#### ČOČKY

Průhledné těleso omezené vypuklými (konvexními) a vydutými (konkávními) plochami

Z funkčního hlediska rozlišujeme: **spojky** a **rozptylky**

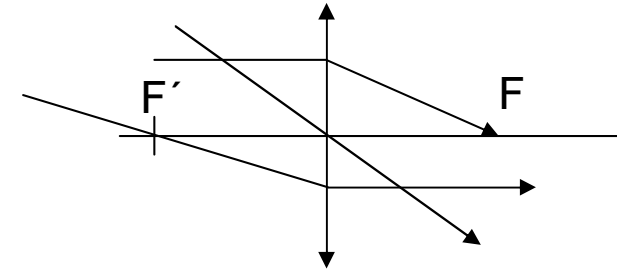
**Optická osa** (prochází středem čočky - O) a 2 ohniska (**obrazové** F - vzniká v něm obraz; **předmětové** F' - na straně předmětu)

Středem čočky proložíme hlavní rovinu a vzdálenost ohniska od hlavní roviny se nazývá **ohniskovou vzdáleností** (f)



### 3. Část optická - čočky

Geometrické zobrazování spojnou čočkou (viz obr.) - paprsek rovnoběžný s optickou osou se na povrchu čočky láme do  $F$ ; paprsek procházející středem čočky se neláme; paprsek procházející  $F'$  se láme rovnoběžně s optickou osou



Zobrazování předmětu mikroskopem: preparát umístěn mezi dvojnásobnou ohniskovou vzdálenost a ohnisko objektivu - skutečný, zvětšený, převrácený obraz

#### Hlavní vady čoček:

**Vada barevná** (chromatická) - způsobená různým lomem světla o různé vlnové délce  
odstranění pomocí soustavy dalších čoček (achromáty)

**Vada kulová** (sférická) - vzniká tím, že paprsky rovnoběžné s osou se lámou různě podle jejich vzdálenosti od středu čočky

**Vada astigmatická** - paprsky dopadající na čočku ze strany se neprotnou v jednom bodě

**Vyklenutí zorného pole** - paprsky dopadající na čočku šikmo mají jiné ohnisko než rovnoběžné paprsky přímé; nelze zaostřit na celé zorné pole

### 3. Část optická - objektiv

Vytváří zvětšený převrácený a skutečný obraz předmětu  
Čím je kratší ohnisková vzdálenost objektivu, tím je větší zvětšení.

Zvětšení objektivu - je vyznačeno (10x, 20x, 30x); dá se vypočítat z ohniskové vzdálenosti podle vzorce

$$Z = 250 / f \quad 250\text{mm je tzv. normální zraková délka}$$

Numerická apertura (A) - vyjadřuje vztah mezi otvorovým úhlem (úhel, který svírají dva nejkrajnější paprsky, které se ještě dostanou do otvoru objektivu) a lomivostí prostředí

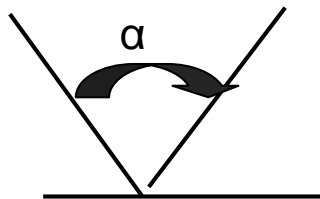
objektiv

$$A = N * \sin \alpha/2$$

$\alpha$  - otvorový úhel

N - index lomu prostředí mezi  
objektivem a preparátem

preparát



### 3. Část optická - objektiv

Čím je větší numerická apertura,

- tím je vyšší **rozlišovací schopnost objektivu** (schopnost rozlišit dva vedle sebe ležící body jako samostatné).

- tím menší **hloubková ostrost** (schopnost současně ostře zobrazit větší nebo menší počet rovinných vrstev předmětu).

Světelnost objektivu je přímo úměrná  $A^2$

Krycí sklíčko  $N=1,51$ , vzdušné prostředí  $N=1$  → 2 úhly (menší ve skle, větší ve vzduchu), pod nímž vstupují paprsky do objektivu → do objektivu se dostane menší množství paprsků (použití imerzního oleje  $N=1,5$ )

Pozorovací (pracovní) vzdálenost - vzdálenost čelní čočky objektivu od krycího skla preparátu

Velikost zorného pole - větší, čím menší zvětšení objektiv má (čím větší  $f$ , tím větší zorné pole)

Světelnost objektivu - intenzita osvětlení zorného pole, závislá na numerické apertuře (viz výše)



### 3. Část optická - objektiv

Typy objektivů

**Achromáty** - jednoduché, složené ze 2 až 6 čoček; je u nich korigovaná chromatická vada, a to pro žlutou až zelenou oblast spektra

**Apochromáty** - korekce barevné vady pro tři základní barvy spektra, vyšší numerická apertura a lepší rozlišení detailů

**Planachromáty** - barevně korigovány jako achromáty a korigováno i vyklenutí zorného pole (mikrofotografie)

**Planapochromáty** - zcela odstraněno vyklenutí zorného pole i chromatická vada, patří k nejlepším a nejdražším objektivům

**Fluoritové objektivy** - z fluoritového skla (vynikající optické vlastnosti), dobře propouští UV záření, vhodné pro fluorescenci ale i pro pozorování ve světlém poli

### 3. Část optická - objektiv

**Suché objektivy** - mezi objektivem a krycím sklem je vzduch

**Imerzní objektivy** - imerzní olej (mezi objektiv a krycí sklo, mezi přední čočku kondenzoru a podložní sklo)

- vodní imerze

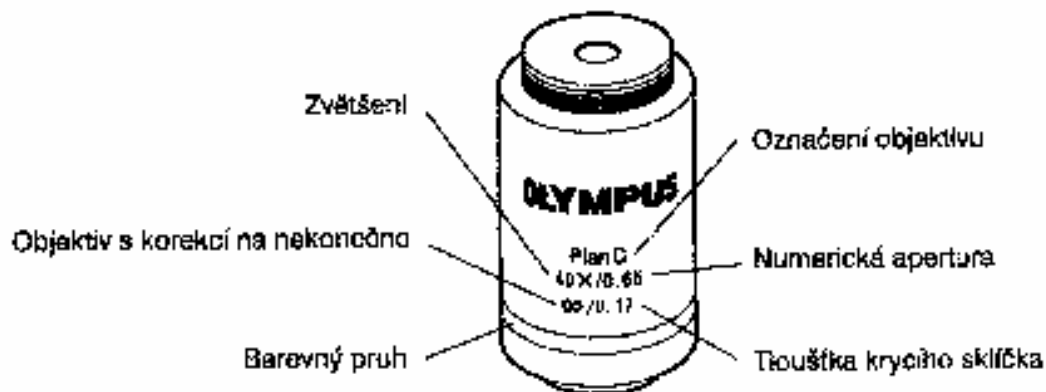
**Objektivy pro práci bez krycího skla** - NCG (no cover glass)-hematologie

**Objektivy s korekcí na tloušťku krycího skla** - korekční prstenec

**Objektivy s irisovou clonou** - omezení světelného toku objektivem, vliv na hloubku ostrosti

**Odpružené objektivy** - zamezení mechanickému doteku čočky

**Objektivy pro speciální pracovní postupy** - např. fázový kontrast, DIC



Barevné označení objektivů - červená, žlutá, zelená, světle modrá,  
tmavě modrá, černá

### 3. Část optická - okulár

Zvětšuje obraz vytvořený objektivem

Zvětšení okuláru je prázdné - nezobrazuje více detailů, než bylo zobrazeno objektivem

#### Typy okulárů

**Huygensův okulár H** - skládá se ze 2 čoček, v kombinaci se slabými objektivy (achromáty)

**Ortoskopické okuláry O** - nezkreslují zorné pole, v kombinaci s objektivy achromatickými a planachromatickými

**Kompenzační okuláry K** - kompenzují chromatickou vadu objektivů, jsou určeny pro práci s apochromáty

**Periplanatické okuláry P** - kompenzují chromatické vady a částečně i vyklenutí zorného pole, v kombinaci s planachromatickými objektivy

**Brill okuláry** - umožňují pozorování a kompenzaci pro dioptrické oko, **dioptrická korekce, manžety**

**Průměr zorného pole (FN - field number)** - 18 - 22 mm,

**širokoúhlé okuláry (UW)** - až 25 mm

**Projektivy** - okulár používaný při mikrofotografii

## **užitečné zvětšení mikroskopu -**

**minimální - numerická apertura objektivu x 500**

**maximální - numerická apertura objektivu x 1000**

**objektiv 100x, NA 1,3**

**= okulár 13x**

**= okulár 6,5x**

## **měření pomocí mikroskopu**

do okuláru se vkládá destička s pomocnou sítí nebo měřítkem - 1 mm  
rozdělený na 100 dílků

-objektivové měřítko, kterým pro danou soustavu objektiv-okulár  
vypočítáme tzv. kalibrační faktor (číslo, kterým musíme násobit počet dílků  
okulárového měřítka, abychom dostali měřenou vzdálenost v jednotkách  
délky (mm, mikrometry)

zjišťujeme, které dílky okulárového a objektivového. měřítka se překrývají a  
trojčlenkou vypočítáme hodnotu 1 dílku okulárového měřítka pro použitý  
objektiv

# Úplné Köhlerovo osvětlení

**skládá se ze**

- **zdroje světla**
- **kolektorové čočky**
- **irisové clony**

**nastavujeme do optimální polohy**

- **clonu osvětlovacího systému**
- **clonu kondenzoru**
- **polohu kondenzoru**

1. **Umístíme preparát a zaostříme s objektivem 10x**
2. **Uzavřeme polní clonu**
3. **Kondenzor snižujeme nebo zvyšujeme tak dlouho, až je obraz svítícího pole ostře ohraničený**
4. **Polní clonu otevřeme tak, aby se dotýkala okrajů zorného pole.**
5. **Obraz svítícího pole posuneme centrovacími šrouby kondenzoru do středu zorného pole**

# Postup práce s mikroskopem

Mikroskop přenášíme oběma rukama (kapotáž)

Manipulujeme pouze pomocí **vroubkovaných** částí

1. Zapneme mikroskop, nastavíme osvětlení, vložíme preparát, zařadíme objektiv 10x, zaostříme na preparát
2. Nastavíme vzdálenost okulárů a provedeme dioptrickou korekci (okulár bez dioptru zaostříme na objekt mikrošroubem, zavřeme oko; okulár s dioptrou doostříme podle svého oka).  
Použití manžet: při pozorování s brýlemi ponechte manžety ohrnuté, nikdy manžety neodstraňovat z hygienických důvodů !!!!!!!
3. Nastavíme aperturní clonu
4. Zařadíme požadovaný objektiv a doostříme mikrošroubem.
5. Zařadíme filtr, přizpůsobíme osvětlení a pozorujeme

## Potřeby pro mikroskopování

Krycí skla -různá tloušťka (0,08; 0,11; 0,13;0,17;0,20 mm)

- velikost (mm) a tvar

Podložní skla - různá tloušťka (1; 1,2 mm) velikost (26 x 70 mm)

- zabroušené hrany, matované

Preparační soustavy - pinzeta, skalpel, nůžky, preparační jehly, štětec,  
pipeta

Laboratorní sklo - Petriho miska, hodinové sklo, kádinka atd.

Krabice na preparáty

Slohy na preparáty

# Kontrastní metody

kvalita zobrazení biologických objektů závisí na

1. dostatečném zvětšení obrazu

(maximální užitečné zvětšení =

numerická apertura objektivu x 1000)

2. rozlišovací schopnosti mikroskopu (numerická  
apertura objektivu a kondenzoru, kvalita  
osvětlení preparátu - Koehlerovo osvětlení)

3. kontrastu obrazu (cytologická a histologická  
barviva, **optické metody**)



- **Fázový kontrast**
- **Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC)**
- **Hoffmanův modulační kontrast (HMC)**
- **Dotův infračervený gradientový kontrast (DGC)**
- **Fluorescence**
- **Konfokální laserová skanovací mikroskopie**

# Metoda fázového kontrastu

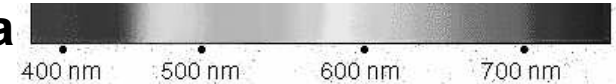
Frits Zernike, 1934

Nobelova cena

Zeiss, Jena

amplituda - intenzita světla

vlnová délka - barva



fázový posun - neviditelný pro lidské oko

Nebarvené objekty

různá optická hustota

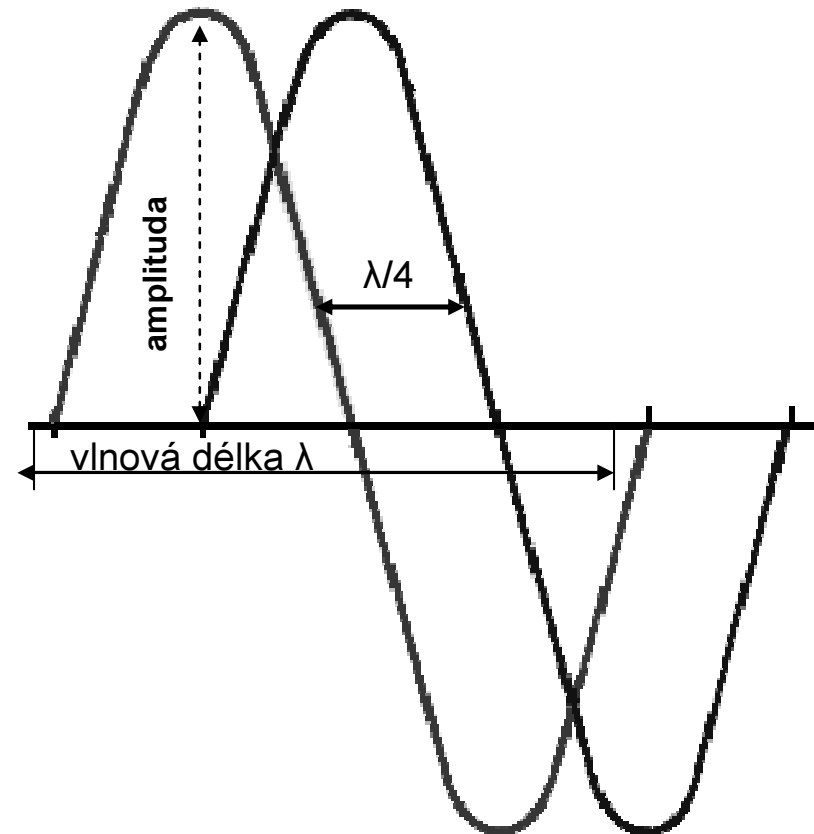
změna fáze

**ZAŘÍZENÍ PRO FÁZOVÝ KONTRAST**

změna fáze vlnění na změnu amplitudy

=

viditelné pro člověka



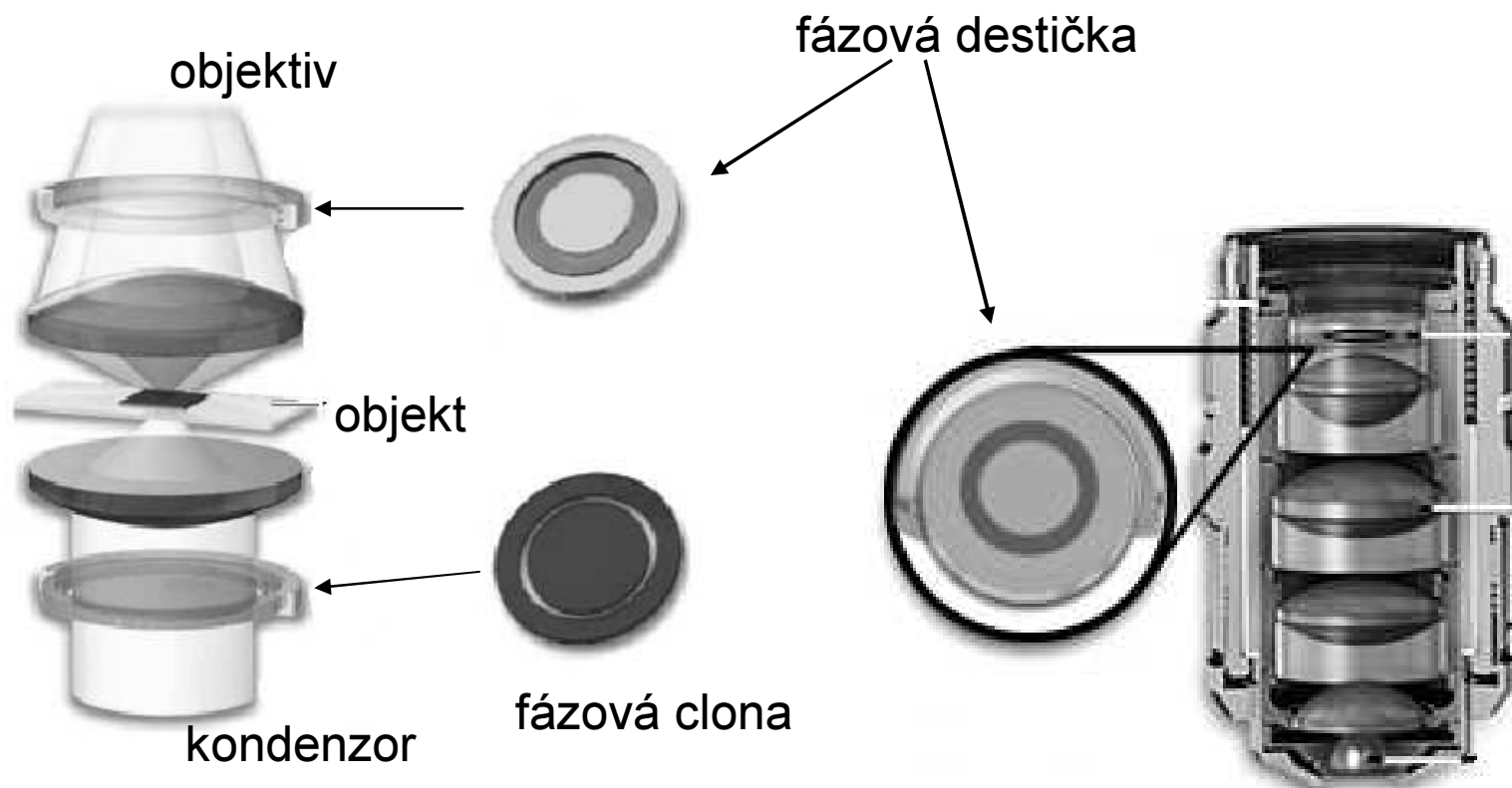
# Objektivy pro fázový kontrast - fázový prsteneček

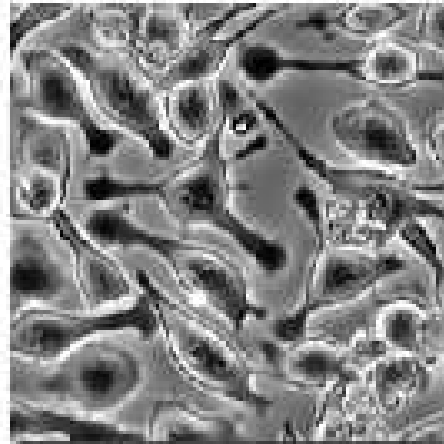
(převádí neviditelné fázové rozdíly na rozdíly amplitudové)

Kondenzor - aperturní kroužek pro různé zvětšení

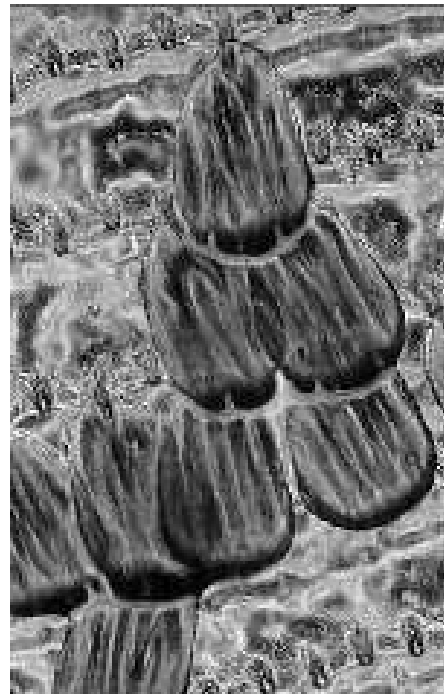
Centrovací dalekohled - seřízení fázových prstenců

Zelený filtr- 540 nm





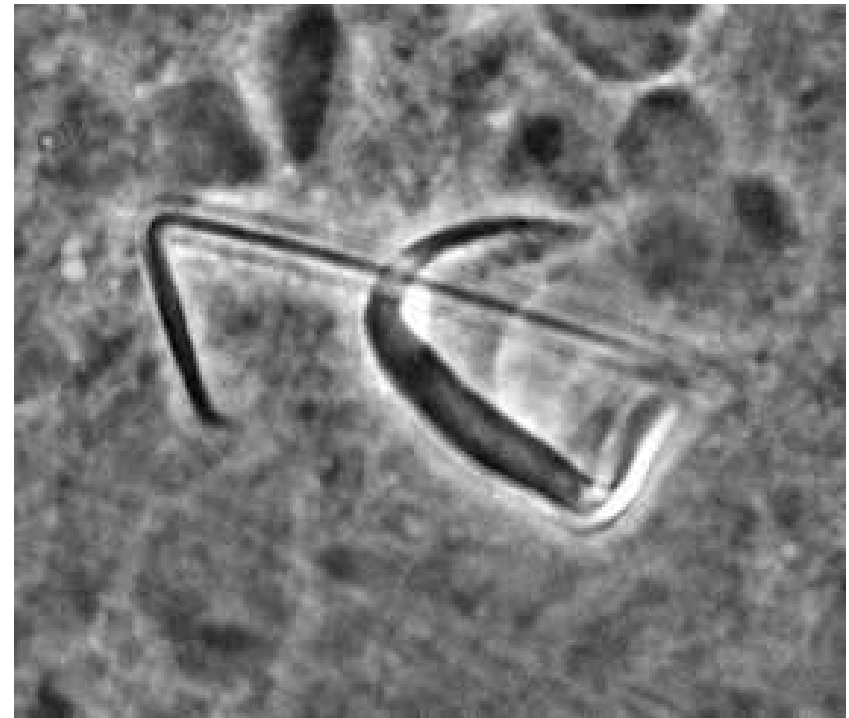
**procházející světlo x fázový kontrast**



**křídlo motýla**

## **Problém halace**

apodizovaný fázový kontrast



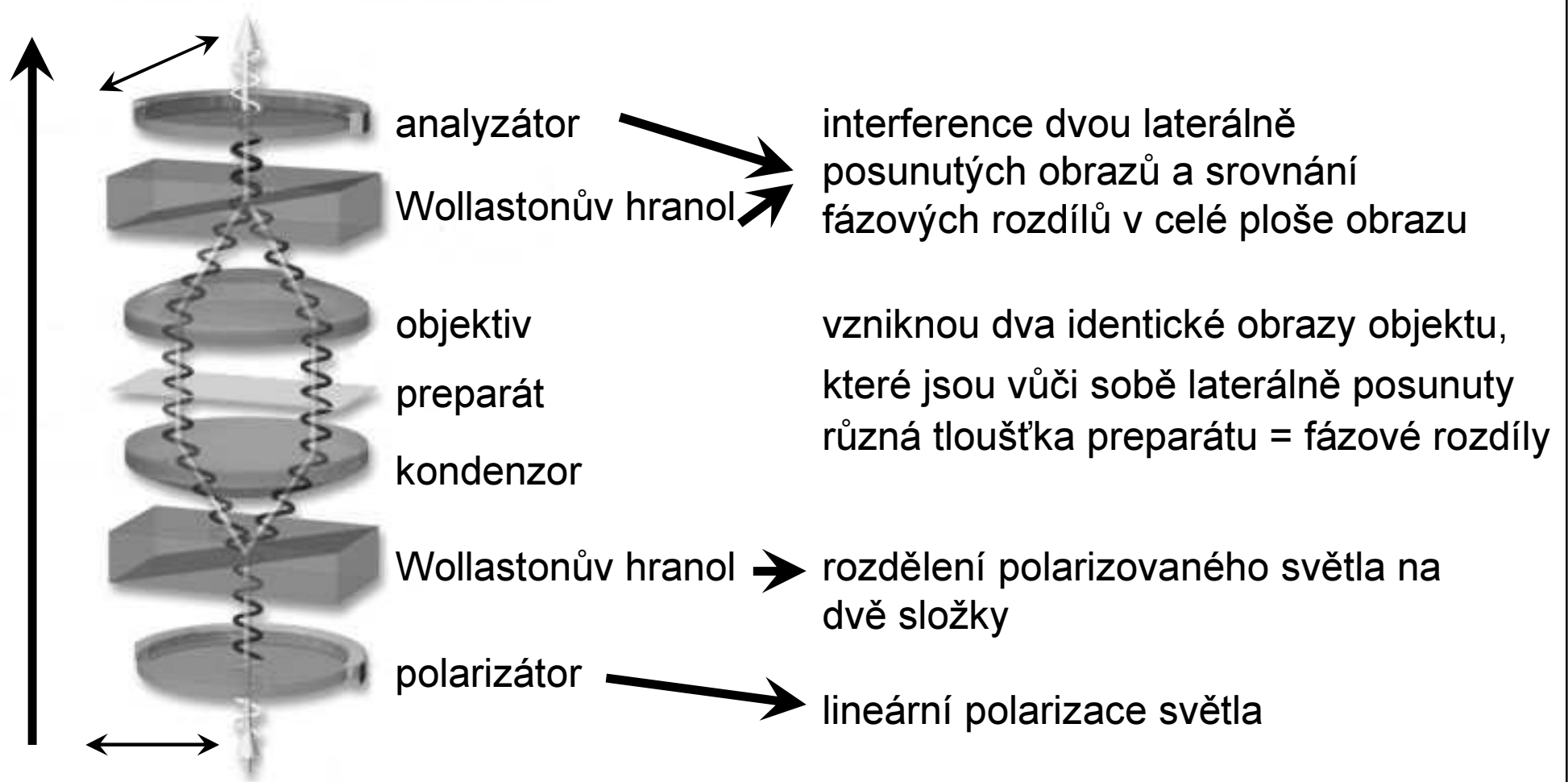
**Malformovaný střední háček diplozoona**

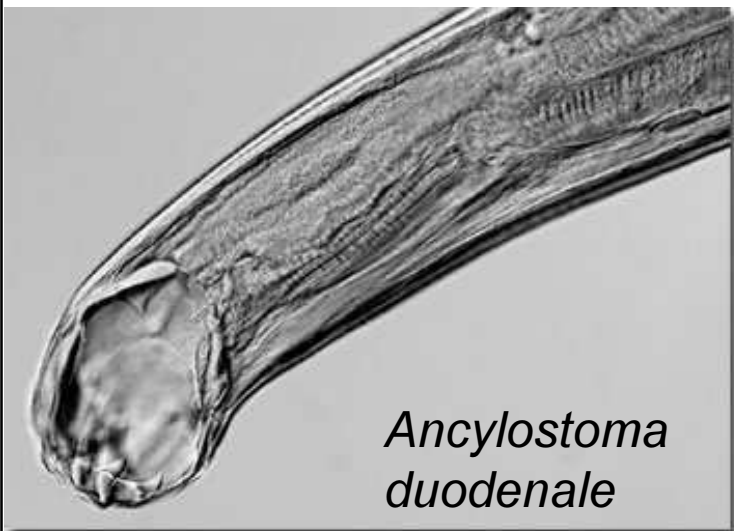
# Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC)

## - povrchová topologie objektu

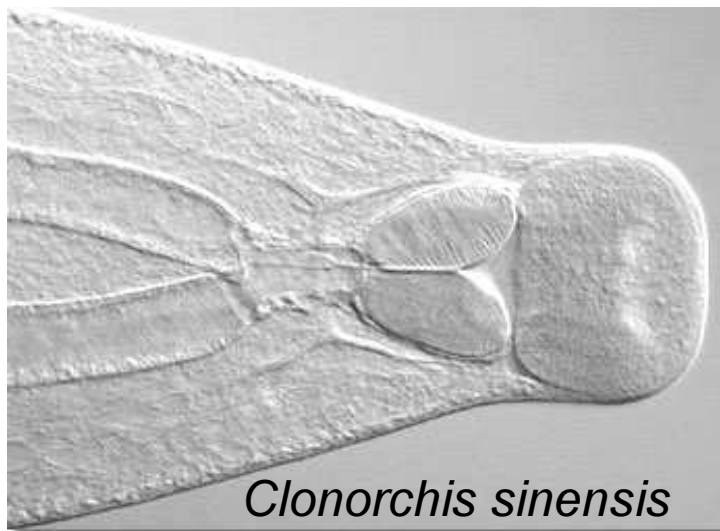
kolem 1950, Georges Nomarski  
mikroskop - 1959 Carl Zeiss

zvětšený obraz vzorku se jeví jako  
šikmo osvětlený trojrozměrný objekt





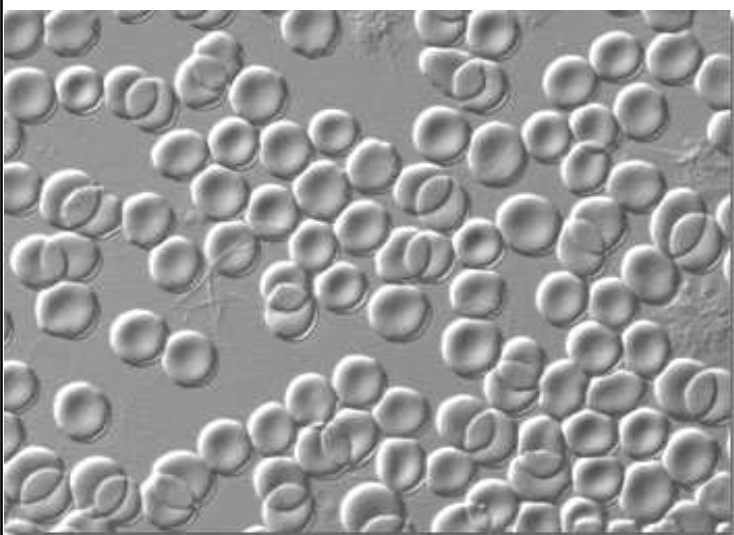
*Ancylostoma  
duodenale*



*Clonorchis sinensis*



pylové zrno borovice



červené krvinky



řez ledvinou myši



přichytné svorky diplozoona

## Nové technologie

- mikroskop s videokamerou
- spojení počítače s mikroskopem
- digitalizace a analýza obrazu



### **DIGITÁLNÍ MIKROSKOP Olympus MIC-D**

Místo klasického pozorování pomocí okulárů zobrazuje MIC-D na monitoru osobního počítače, který je s mikroskopem spojen USB kabelem. Protože se jedná o digitální obraz, jeho zpracování je velmi rychlé a snadné: uživatel jej může uložit, vymazat, upravit, vytisknout, umístit na web nebo poslat e-mailem.