

# 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)



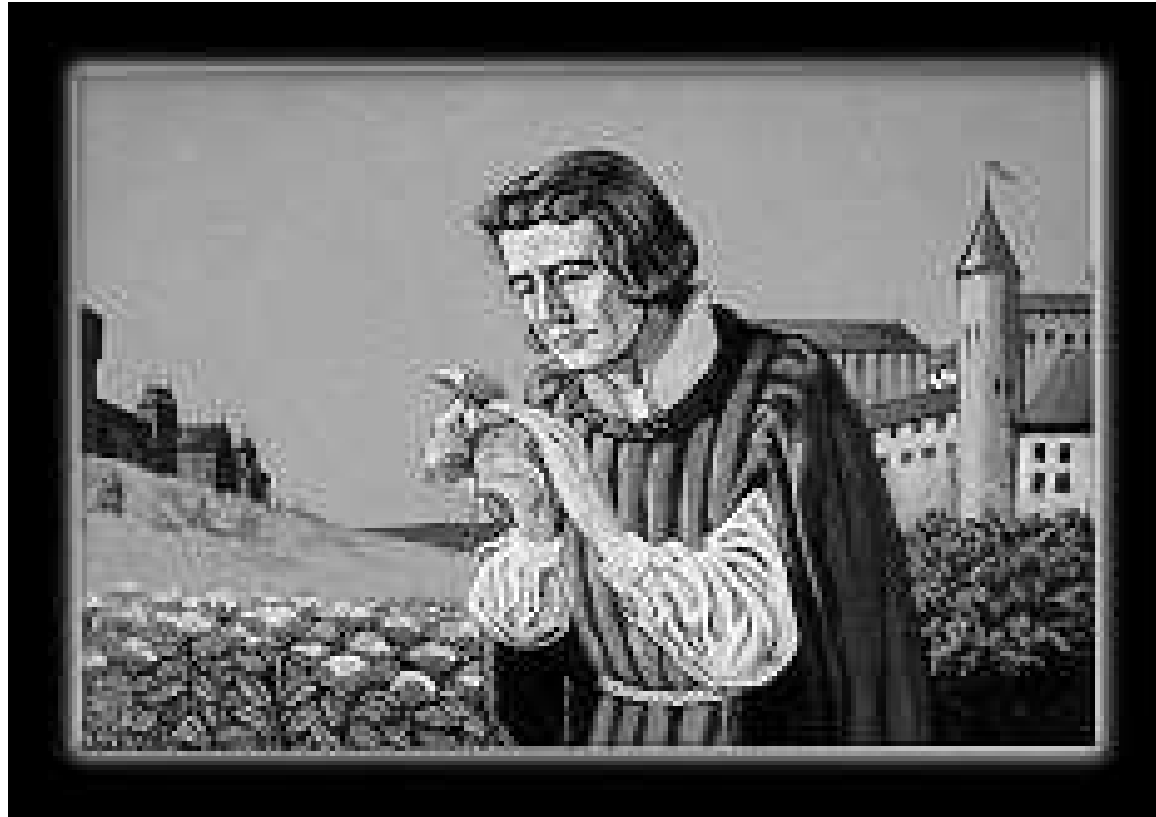
## Složený mikroskop

více čoček nebo více systémů čoček



# **Světelná mikroskopie a kontrastní metody**

## **Historie světelného mikroskopu**

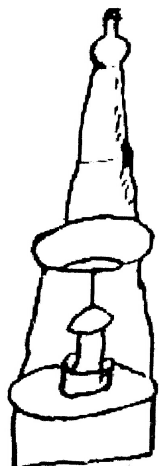
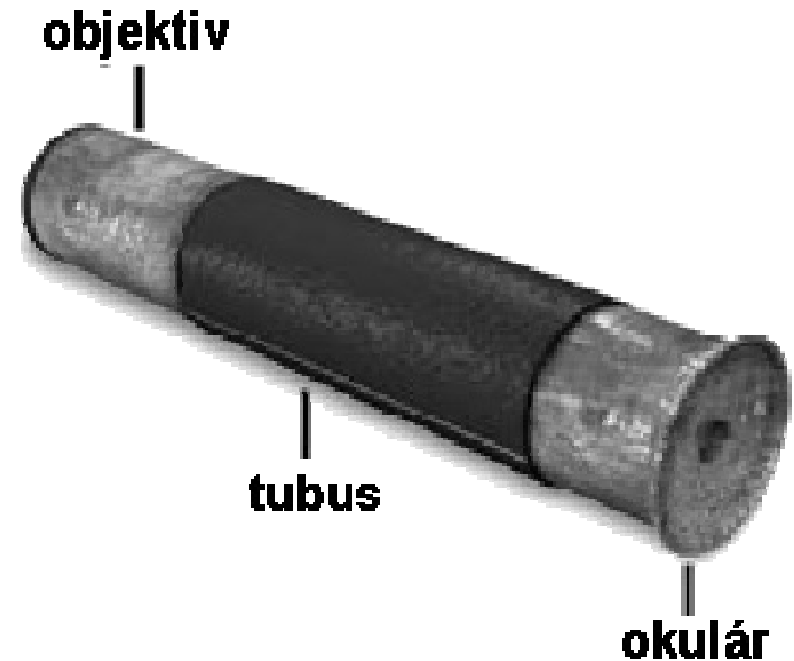


**Odjakživa chtěli lidé vidět věci mnohem menší, než mohli vnímat pouhým okem**

# 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

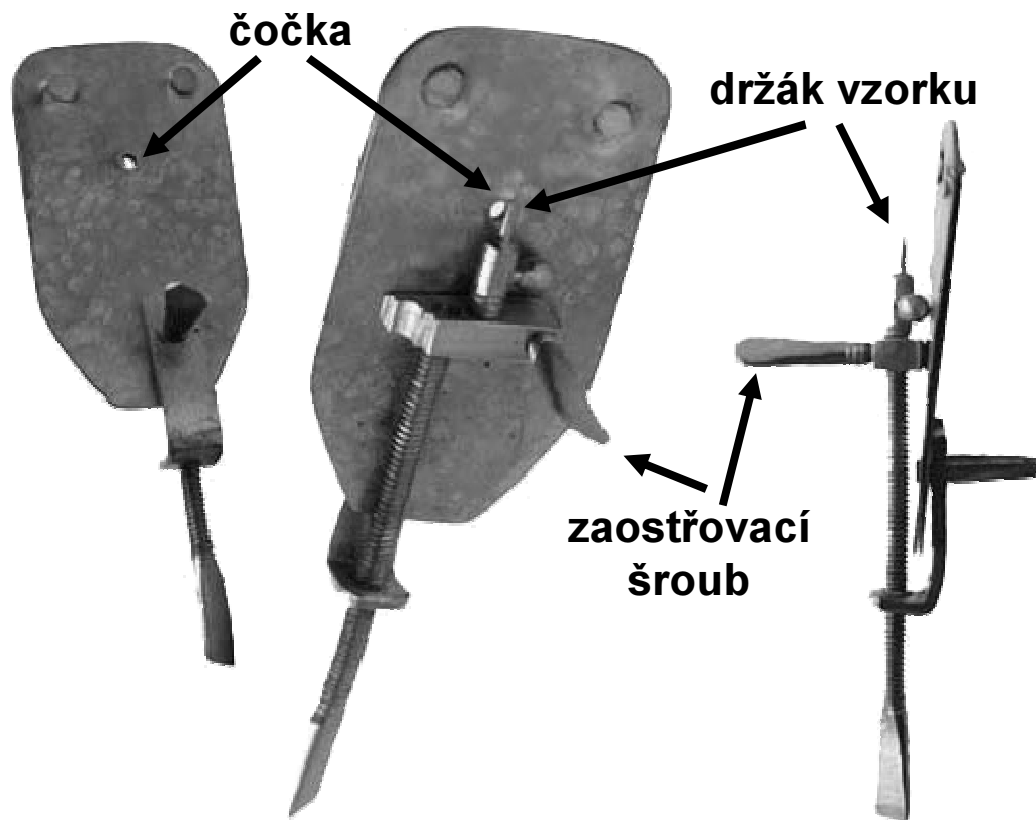
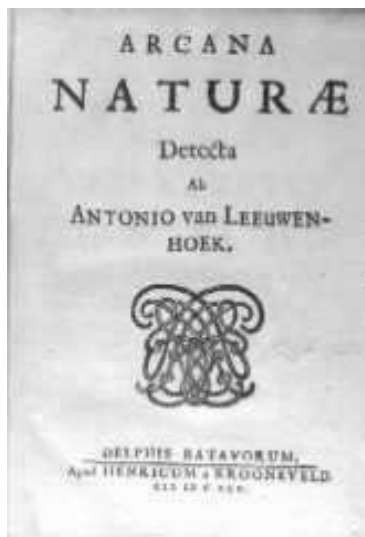


# Antony van Leeuwenhoek

(1632 - 1723)

## Jednoduchý mikroskop(1660)

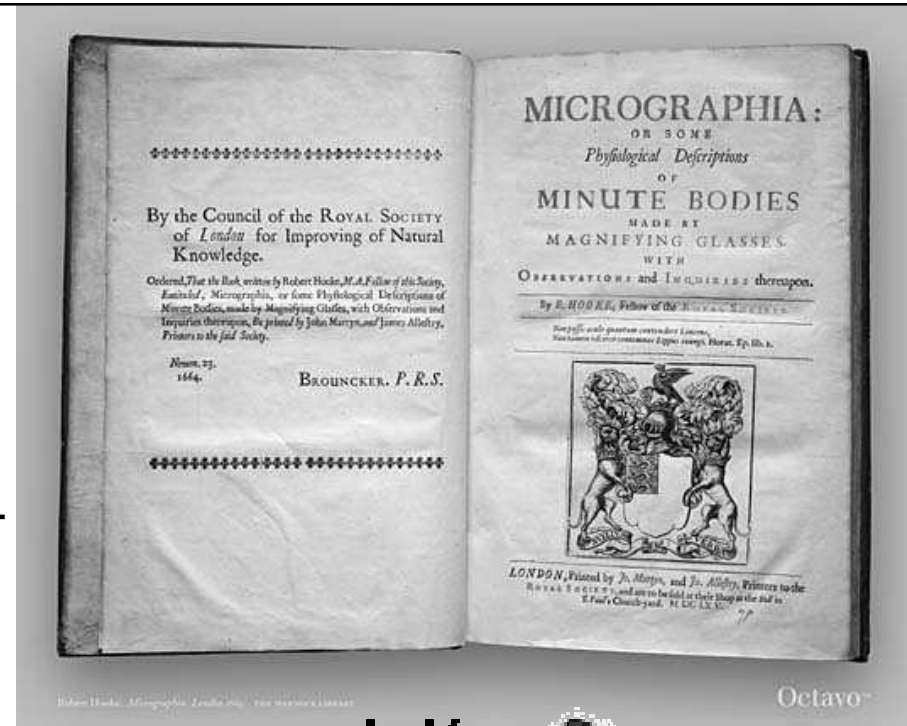
Konvexní skleněná čočka byla připevněna do kovového držáku a byla zaostřována pomocí šroubu.



# Robert Hook

## 1665 složený mikroskop

kniha Micrographia,  
sledování tenkých řezů korkem -  
pojem buňka



Robert Hooke  
(1635-1703)



# Mikroskopy 17. století

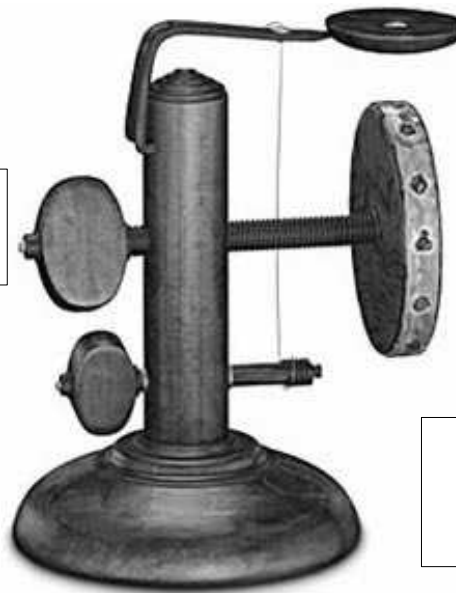


**Galileo Galilei**  
po roku 1600



**Itálie**

Giuseppe  
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



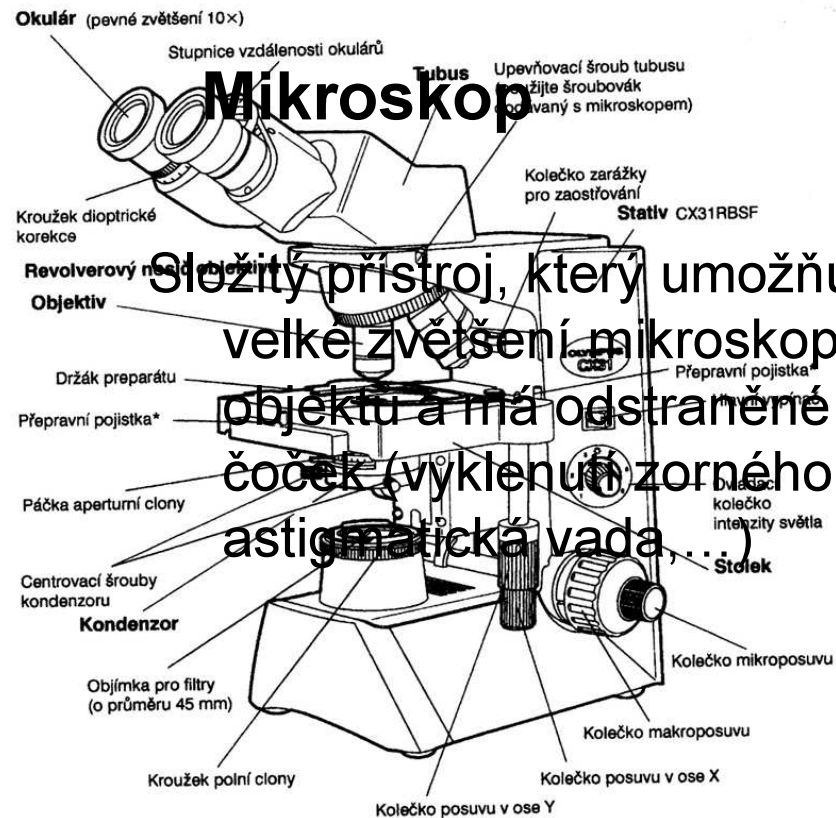
# Lupa

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

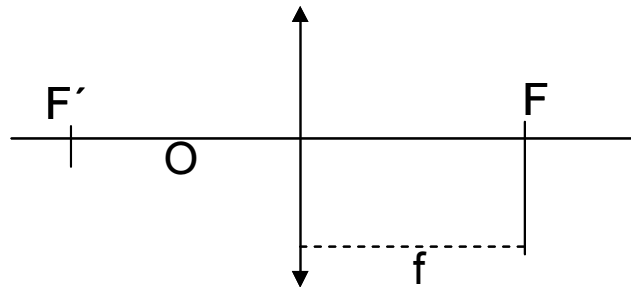
#### ČOČKY

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

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

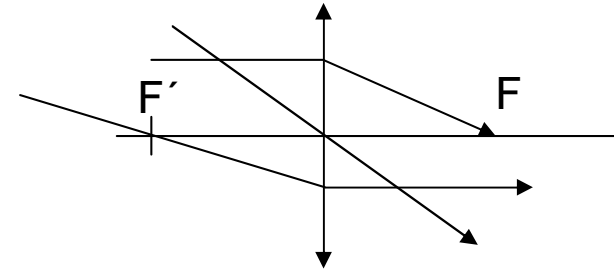
**Optická osa** (prochází středem čočky - O) a 2 ohniska (**obrazové** F - vzniká v něm obraz; **předmětové** F' - na straně předmětu)

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

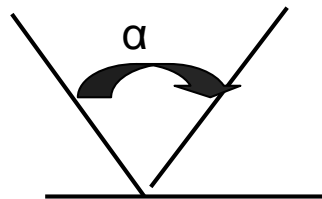
Vytváří zvětšený převrácený a skutečný obraz předmětu  
Čím je kratší ohnisková vzdálenost objektivu, tím je větší zvětšení.

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



preparát

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

$\alpha$  - otvorový úhel

N - index lomu prostředí mezi  
objektivem a preparátem

### 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

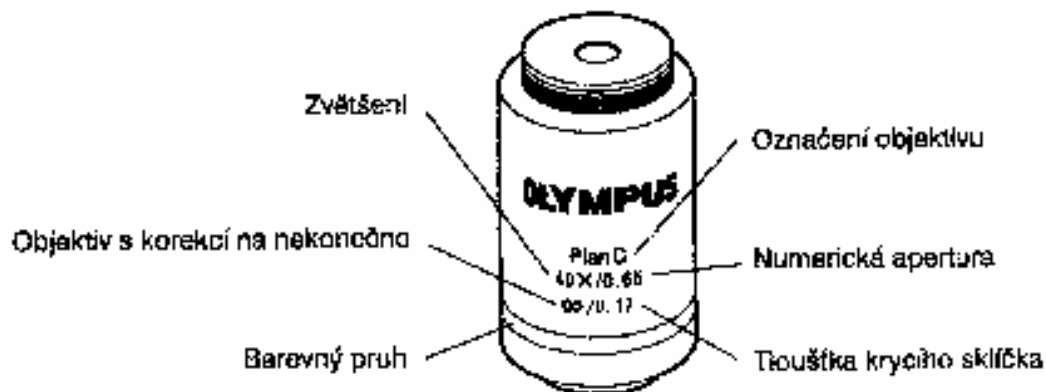
**Objektivy pro práci bez krycího skla** - NCG (no cover glass)-hematologie

**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**

**prázdné zvětšení**

## **Délková měření mikroskopických objektů**

**v horizontální rovině, kolmé na optickou osu, se provádí pomocí okulárového a objektivového mikrometru.**

### **Okulárový mikrometr**

Okulárový mikrometr je skleněná destička, opatřená měřicí stupnicí. Mikrometrická stupnice se umísťuje do roviny polní clony okuláru, tj. do přední ohniskové roviny očníce okuláru, takže se nezobrazuje celým mikroskopem, ale jen okulárem. Neměří se jím tedy vlastní objekt, ale jeho obraz, respektive meziobraz, vytvořený v rovině clony. Aby se z velikosti obrazu, vyjádřené určitým počtem dílků okulárového mikrometru, odvodila skutečná velikost měřeného objektu, musí se dotyčný počet dílků mikrometru znásobit mikrometrickou hodnotou. Tato hodnota, závislá na zvětšení a mechanické tubusové délce, se získává vzájemným pozorováním stupnic okulárového a objektivového mikrometru.

## Objektivový (předmětový) mikrometr

Objektivový mikrometr je destička formátu podložního skla, opatřená mikrometrickou stupnicí, kde 1 mm je rozdělený na 100 dílků, 1 dílek = 0,01 mm = 10 mikronů. Stupnice je chráněna krycím sklem. Objektivový mikrometr neslouží zpravidla k přímému měření objektu, ale převážně jen jako délkový standard pro cejchování stupnice okulárového mikrometru a k určení zvětšení mikroskopu, nebo k určení měřítka zobrazení objektu mikrofotografií nebo kresbou.

## Při cejchování a měření se postupuje takto:

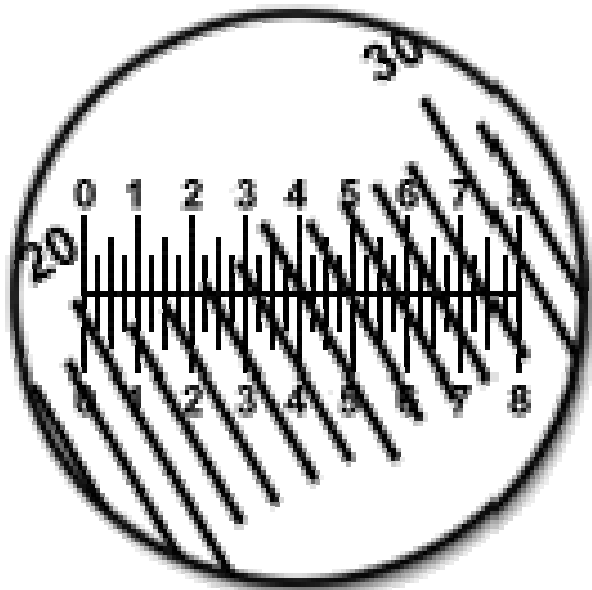
1. Objekt, který se má měřit, nahradíme objektivovým mikrometrem a používaný okulár okulárem měřícím u něhož otáčením objímky očné se jasně dioptricky zaostří stupnice mikrometru.
2. Mikroskopem se co nejpřesněji zaostří obraz stupnice objektivového mikrometru. Posouváním objektivového mikrometru (křížovým posuvem nebo rukou) a natáčením okuláru se oba nastaví do postavení, při kterém se obrazy jejich stupnic překrývají.
3. Zjistí se, kolika dílkům objektivového mikrometru odpovídá určitý počet dílků mikrometru okulárového. Z tohoto poměru se vypočítá, jaké délce odpovídá 1 dílek stupnice okulárového mikrometru ve skutečnosti.

### praktický příklad:

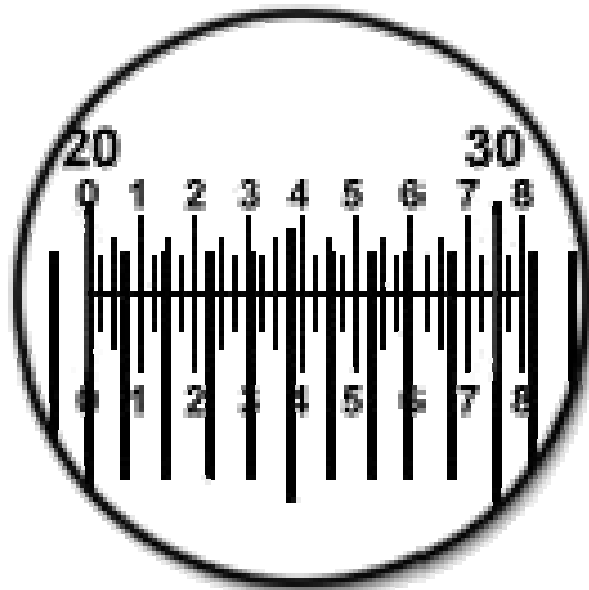
7 dílků, tj.  $70\ \mu\text{m}$  objektivového mikrometru se rovná (kryje) s 12 dílky okulárového mikrometru. Pak 1 dílek okulárového mikrometru má délkovou hodnotu  $70 : 12 = 5,8\ \mu\text{m}$ .

Toto číslo je tzv. mikrometrická hodnota pro použitý objektiv a příslušnou mechanickou tubusovou délku mikroskopu.

\_\_\_\_\_

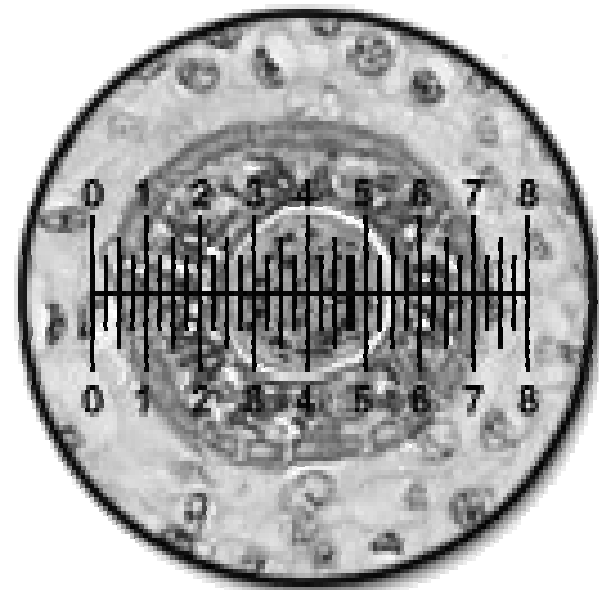


(a)



(b)

\_\_\_\_\_



(c)



# 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

# 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**

## 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

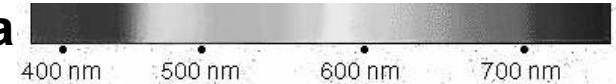
Frits Zernike, 1934

Nobelova cena

Zeiss, Jena

amplituda - intenzita světla

vlnová délka - barva



fázový posun - neviditelný pro lidské oko

Nebarvené objekty

různá optická hustota

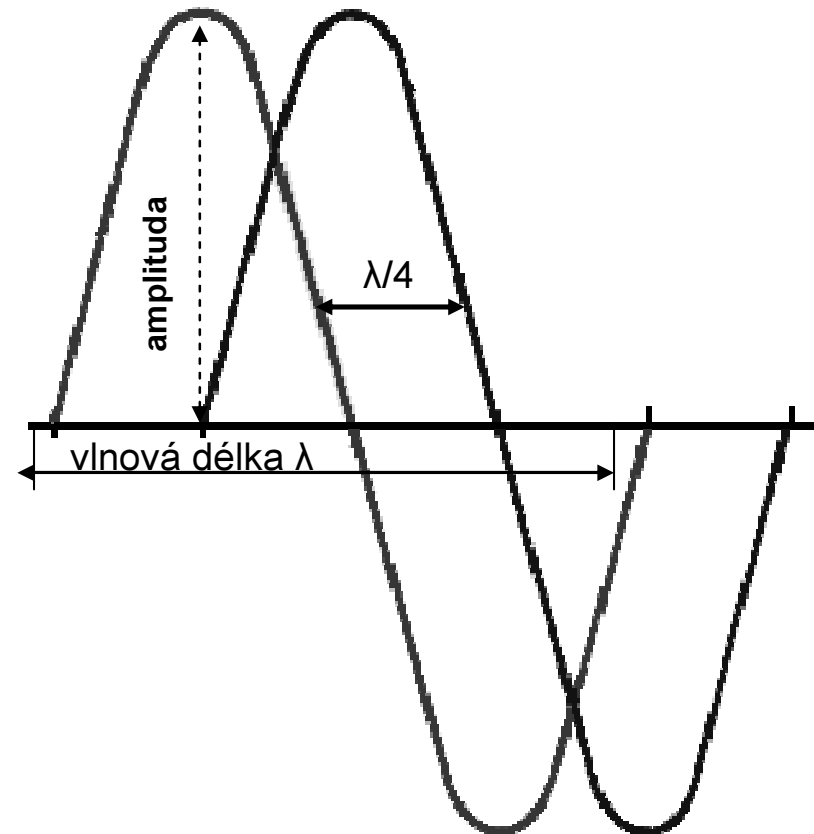
změna fáze

**ZAŘÍZENÍ PRO FÁZOVÝ KONTRAST**

změna fáze vlnění na změnu amplitudy

=

viditelné pro člověka



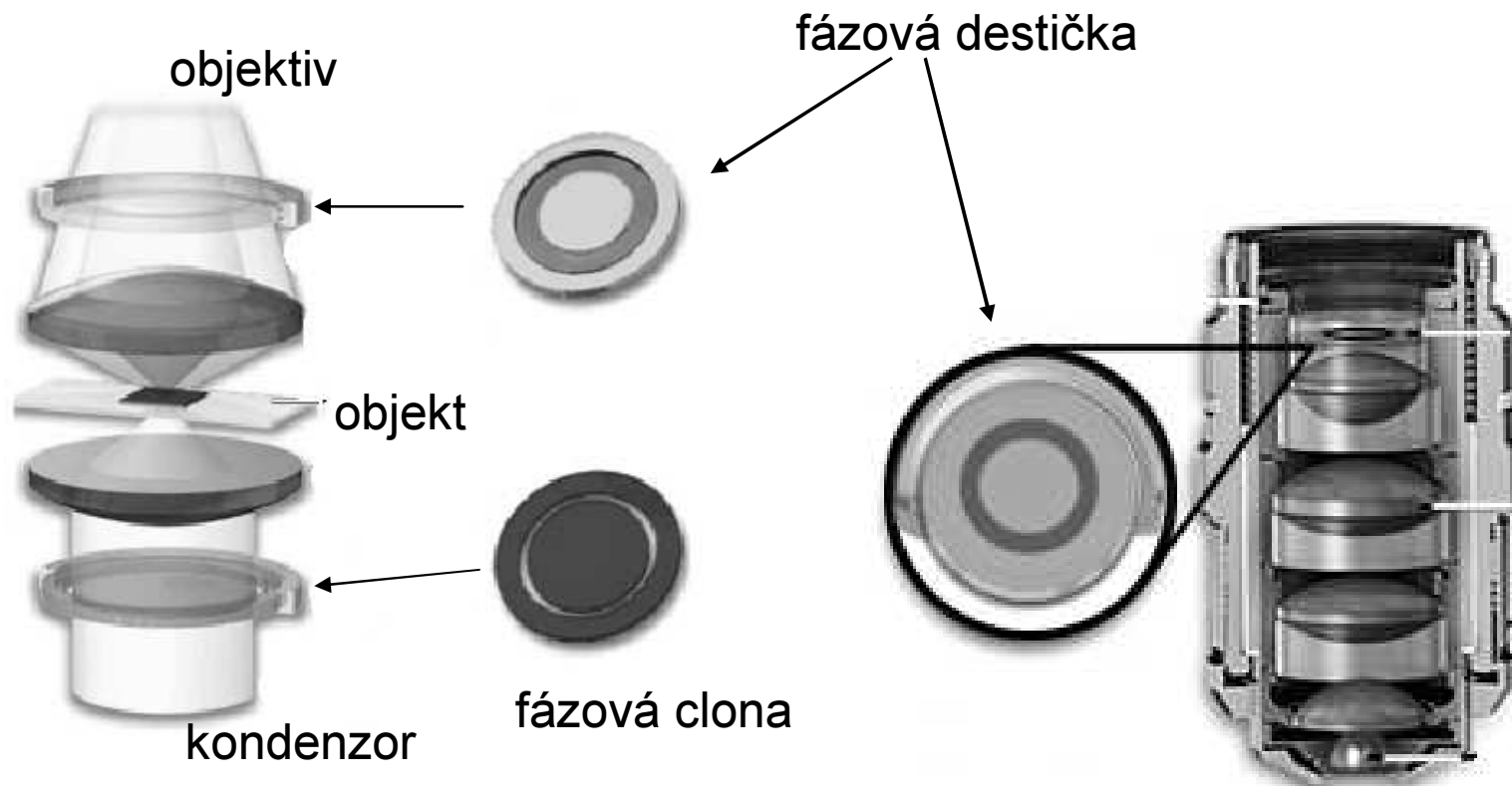
# Objektivy pro fázový kontrast - fázový prsteneček

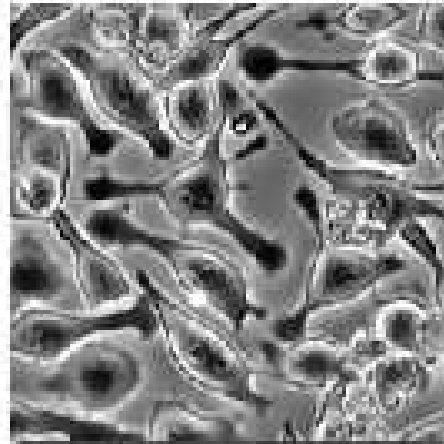
(převádí neviditelné fázové rozdíly na rozdíly amplitudové)

Kondenzor - aperturní kroužek pro různé zvětšení

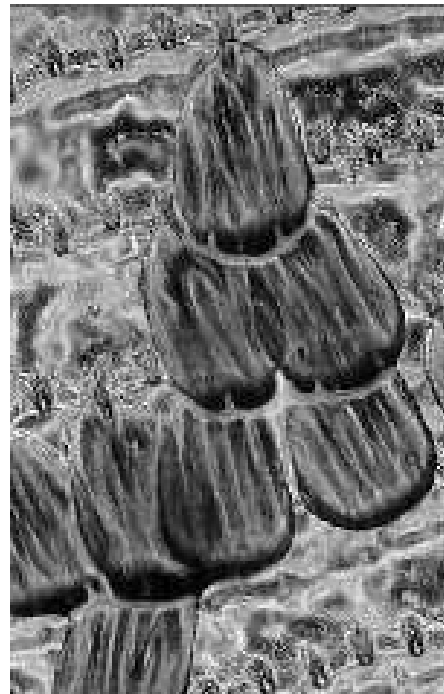
Centrovací dalekohled - seřízení fázových prstenců

Zelený filtr- 540 nm





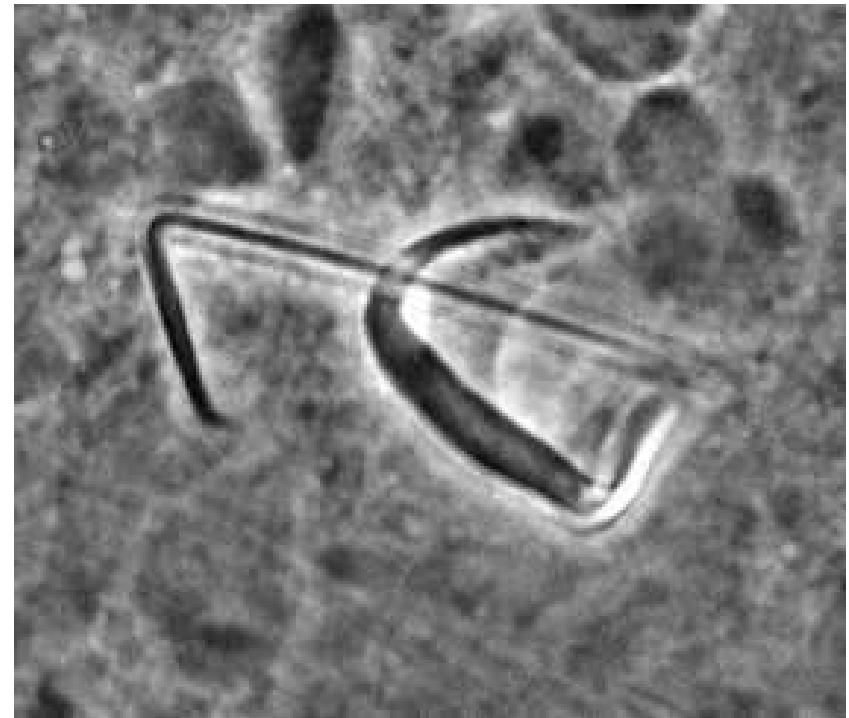
**procházející světlo x fázový kontrast**



**křídlo motýla**

## **Problém halace**

apodizovaný fázový kontrast



**Malformovaný střední háček diplozoona**

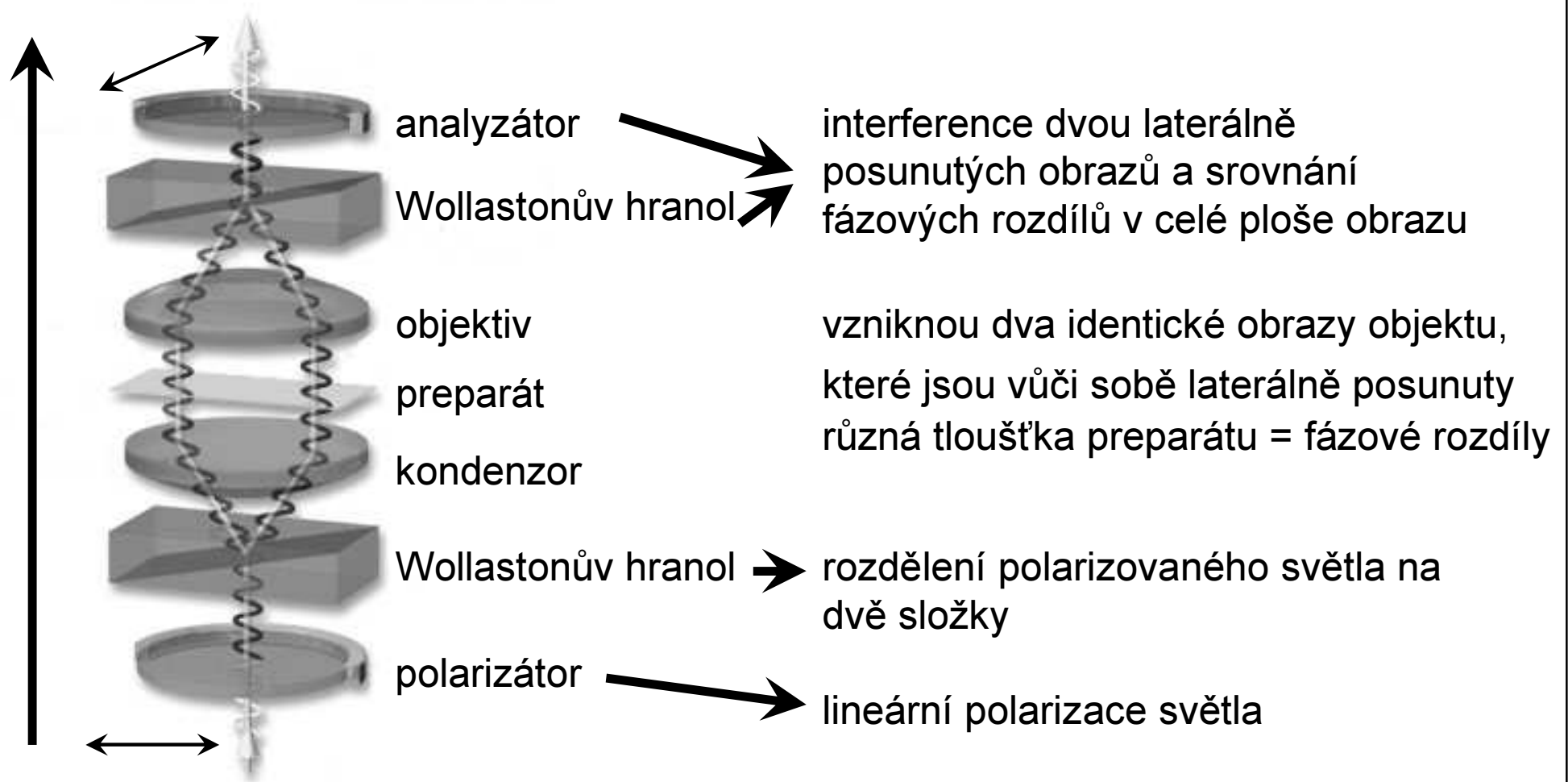


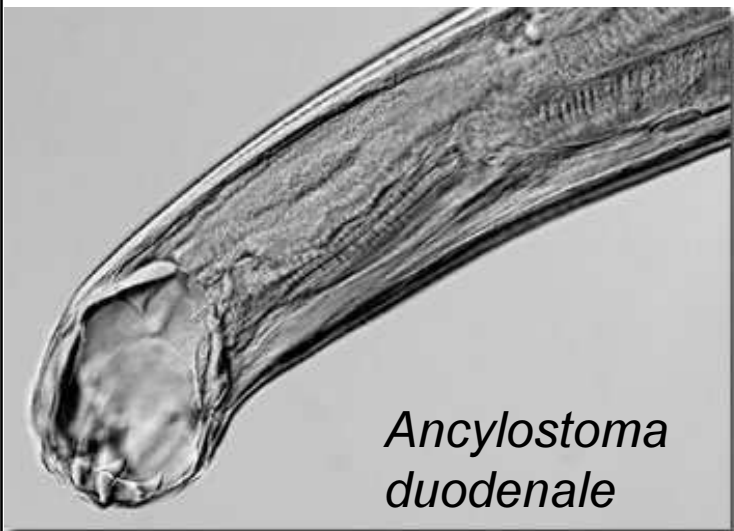
# Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC)

## - povrchová topologie objektu

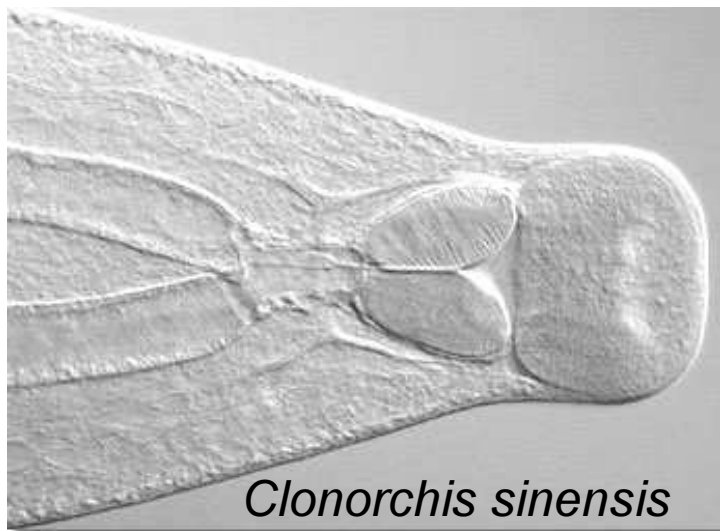
kolem 1950, Georges Nomarski  
mikroskop - 1959 Carl Zeiss

zvětšený obraz vzorku se jeví jako  
šikmo osvětlený trojrozměrný objekt





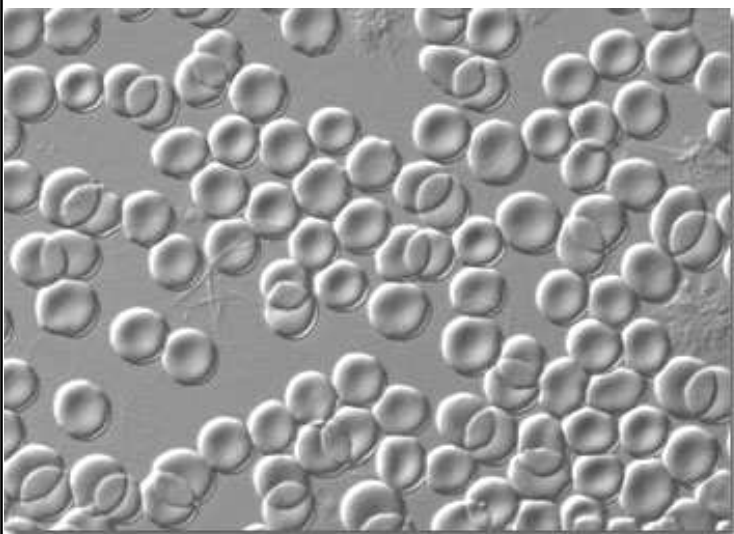
*Ancylostoma  
duodenale*



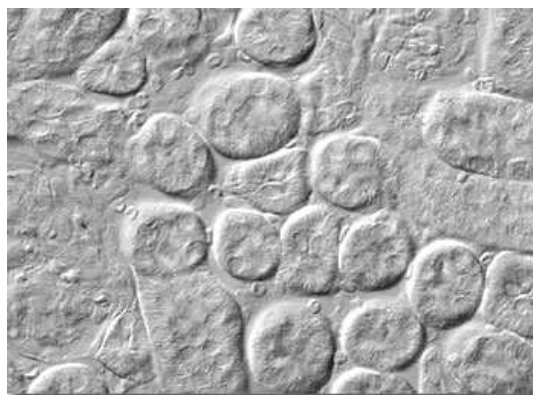
*Clonorchis sinensis*



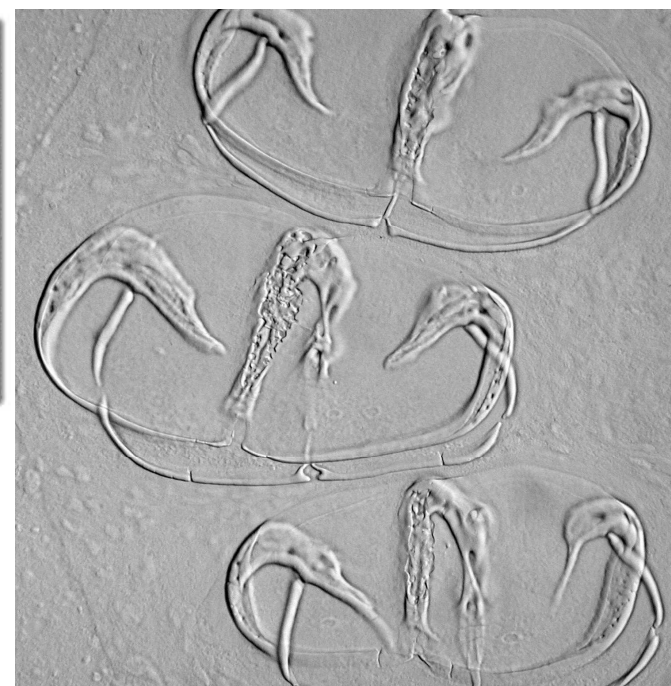
pylové zrno borovice



červené krvinky



řez ledvinou myši



přichytňové 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.