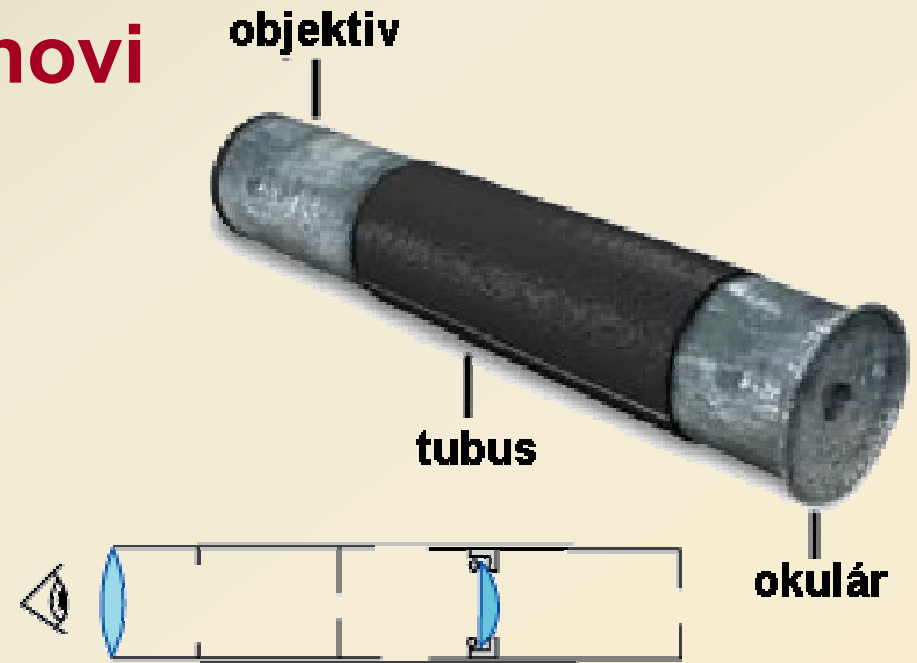


# Světelná mikroskopie a kontrastní metody



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

# Hans a Zacharias Janssenovi



První složený mikroskop  
zvětšoval 3x při zatažení tubusu a 9x  
při max. roztažení, měřil 1,2 m

**1590** - Holandský výrobce brýlí **Hans Janssen** se svým synem **Zachariasem Janssenem** údajně poprvé zkonstruovali mikroskop složený z více čoček. O vynálezu existuje pouze záznam z pozdější doby v dílech spisovatelů Pierre Borela (1620-1671) a Willema Boreela (1591-1668).



**1625**

Giovanni Faber z Bambergu (1574 -1629)

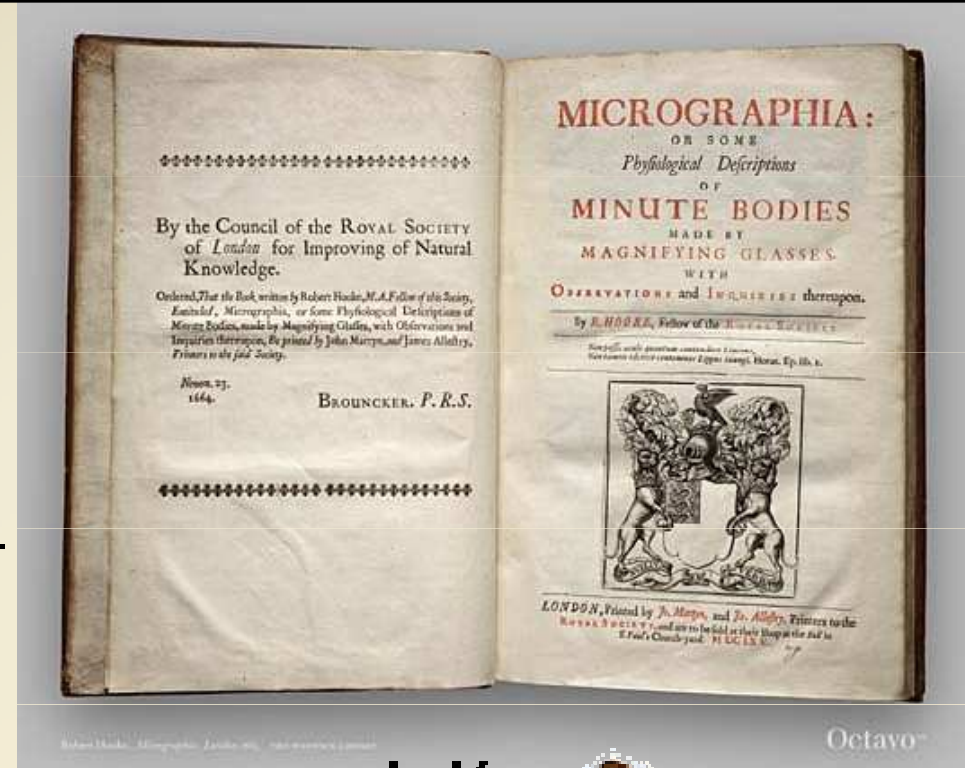
používá poprvé slovo *mikroskop* odvozené od slova teleskop

Řecky *Micron* = malý a *scopos* = cíl

# Robert Hook

## 1665 složený mikroskop

kniha Micrographia,  
sledování tenkých řezů korkem -  
pojem buňka



Robert Hooke  
(1635-1703)

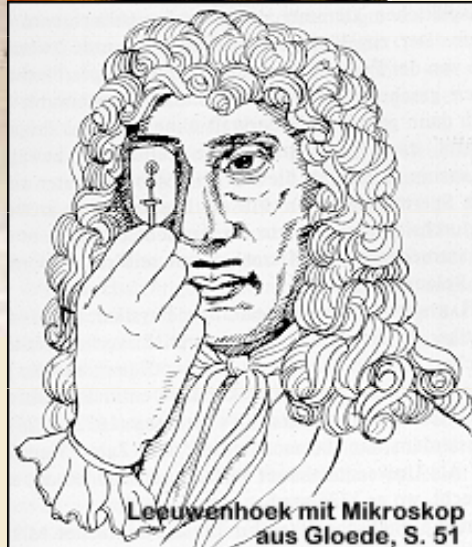
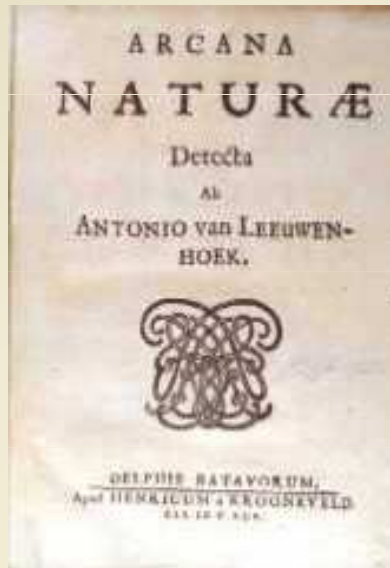


# Antony van Leeuwenhoek

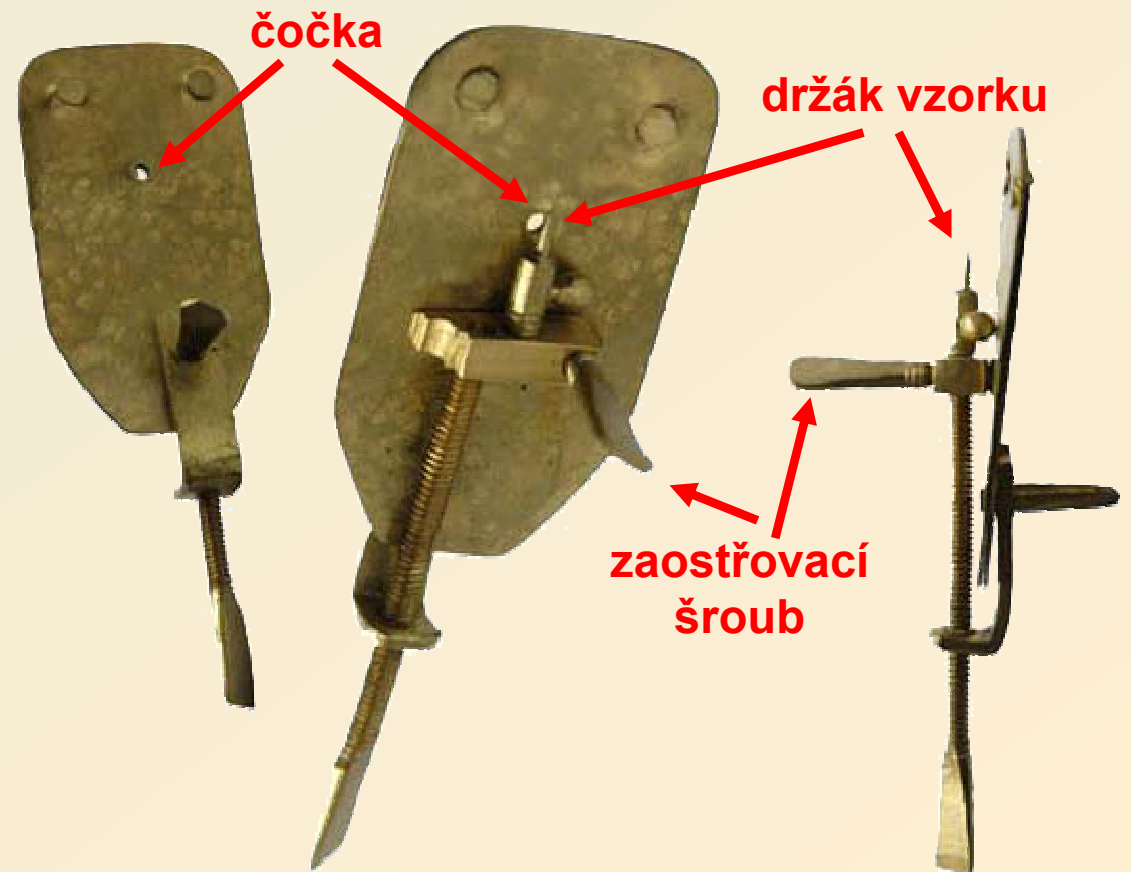
(1632 - 1723)

## Jednoduchý mikroskop (1660, 1674)

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



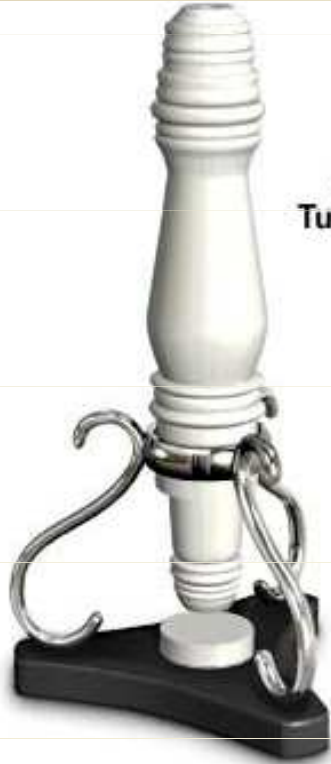
Leeuwenhoek mit Mikroskop aus Gloede, S. 51



# Mikroskopy 17. století



Simple Sliding Rod Microscope (circa 1640s)



Giuseppe Campani Turned Ivory Monocular Microscope (circa 1662)



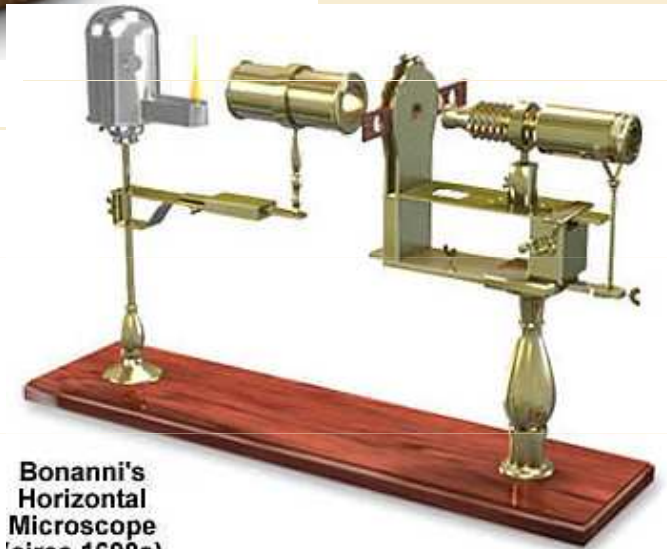
English Tripod Microscope by John Yarwell (circa 1680s)



Depovilly Simple Microscope (circa 1686)



Simple Italian Microscope (circa 1686)



Bonanni's Horizontal Microscope (circa 1690s)

# Mikroskopy 18. století



**Bone "Flea"  
Microscope**  
(circa early 1700s)



**Simple Monocular  
Hand-Held  
Microscope**  
(circa before 1738)



**Culpeper's  
Microscope**  
(circa 1730)

**William Robertson's  
Culpeper-Style  
Microscope**  
(circa 1749)



**King George III  
Silver Microscope  
by  
George Adams**  
(circa 1761)



# Mikroskopy 19. století



Vincent Chevalier's  
Achromatic Microscope  
(circa mid-1800s)



Carl Zeiss  
Simple Dissecting  
Microscope  
(circa 1865)



Ernst Leitz  
Compound  
Binocular  
Microscope  
(circa 1899)



Lister's  
Achromatic  
Microscope  
(circa 1826)



William and Samuel Jones  
Simple Botanical  
Microscope  
(circa 1801-1825)



Thomas Winter  
Exhibition  
Microscope  
(circa 1810)

# Mikroskopy 20.století

Nikon's First  
Microscope  
(circa early 1900s)



Leitz  
Photomicrographic  
Apparatus  
(circa 1910)



Zeiss  
Laboratory  
Microscope  
(circa 1930)



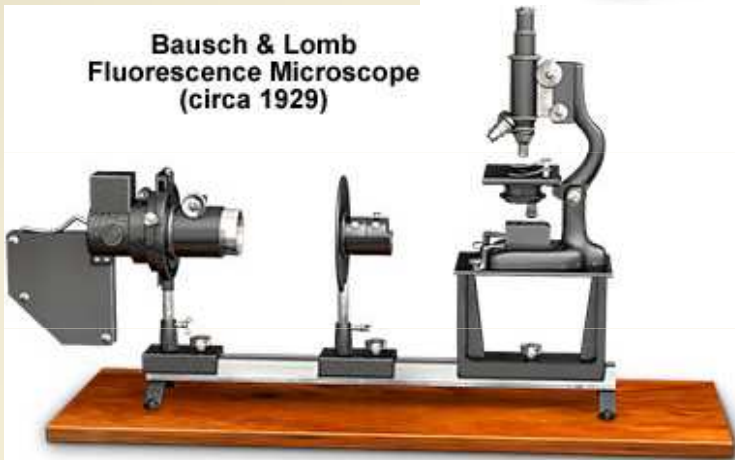
Bausch & Lomb  
StereoZoom  
(circa 1959)



The Olympus  
Provis AX-70  
(circa 1998)



Bausch & Lomb  
Fluorescence Microscope  
(circa 1929)



Nikon Diaphot  
Inverted Tissue  
Culture Microscope  
(circa 1985)



# Světelný mikroskop - základní pracovní nástroj

## Cíl mikroskopie:

- zvětšit obraz
- rozlišit detaily v obraze

## Jednoduchý mikroskop

jedna čočka nebo jeden systém čoček  
(lupa)



## Složený mikroskop

více čoček nebo více systémů čoček



# 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 (aperturní)** - 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

### ČOČKY

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

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

## **3. Část optická - čočky**

### **Hlavní vady čoček:**

**Vada barevná (chromatická)**

**Vada kulová (sférická)**

**Vyklenutí zorného pole**

**K odstranění uvedených vad se používají čočkové multiplety (dublety, triplety, ...), tj. několik čoček spojených dohromady. Tyto čočky jsou vytvořené ze speciálních materiálů a mají určité poloměry křivosti optických ploch, čímž vznikají takové zobrazovací vady, které se v multipletu vzájemně vykompenzují. Je dobré si uvědomit, že danou optickou mohutnost čočky lze dosáhnout různou volbou poloměrů křivosti optických ploch.**

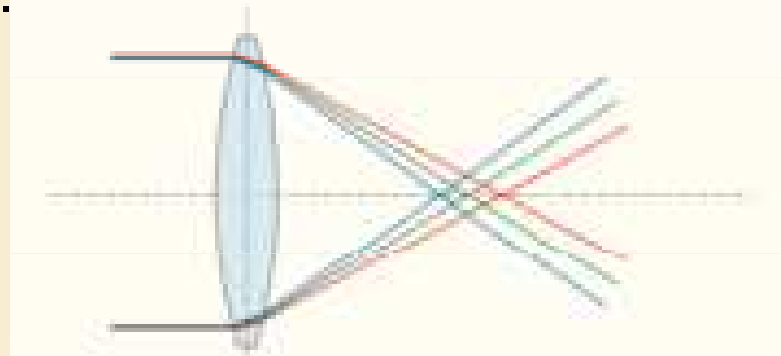


## Barevná vada neboli chromatická aberace

je vada, která souvisí s tím, že ohnisková vzdálenost čočky závisí na indexu lomu a ten se mění podle barvy použitého světla (tedy podle vlnové délky). Bílé světlo je však složeno z různých vlnových délek a každá jeho složka (tzn. každá barva) se při průchodu čočkou láme trochu jinak. Při průchodu čočkou s barevnou vadou tedy dochází k rozkladu světla.

V důsledku této vady je obrazem bodu bod určité barvy, který je obklopen mezikružím jiných barev.

Chromatickou vadu lze alespoň částečně odstranit vhodnou kombinací spojných a rozptylných čoček, což se nazývá **achromatizací** optické soustavy. Achromatizovanou soustavu nazýváme **achromát**.



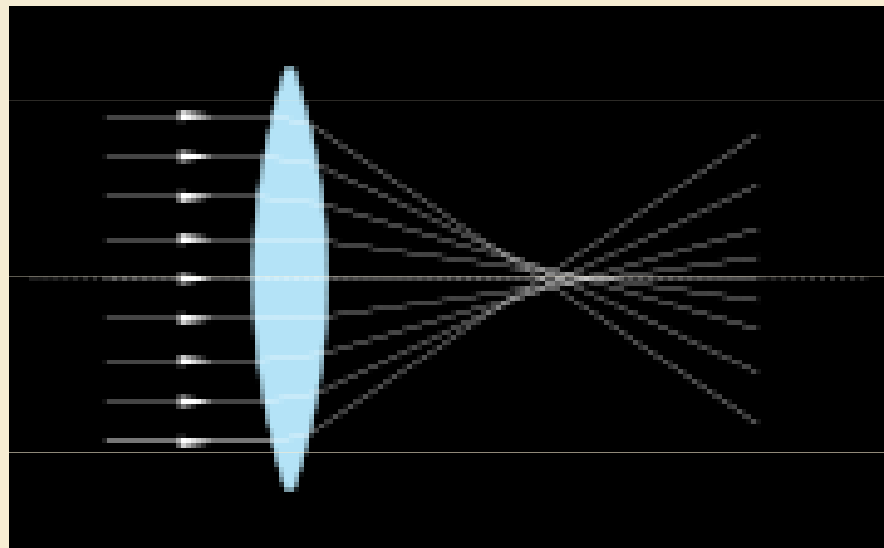
Barevná vada spojně čočky

## Kulová vada

**Sférická** (též **kulová** nebo **otvorová**) **vada** vzniká tehdy, pokud na čočku dopadá široký svazek paprsků, přičemž paraxiální paprsky se za čočkou setkávají v jiném bodě než okrajové paprsky širokého svazku.

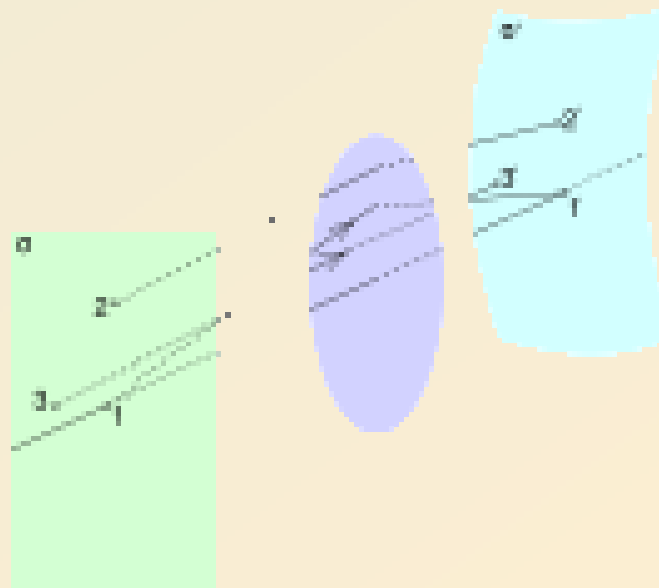
Tato vada způsobuje, že obrazem bodu není bod, ale rozmazaná kruhová ploška.

Tuto vadu lze také částečně kompenzovat kombinací čoček.

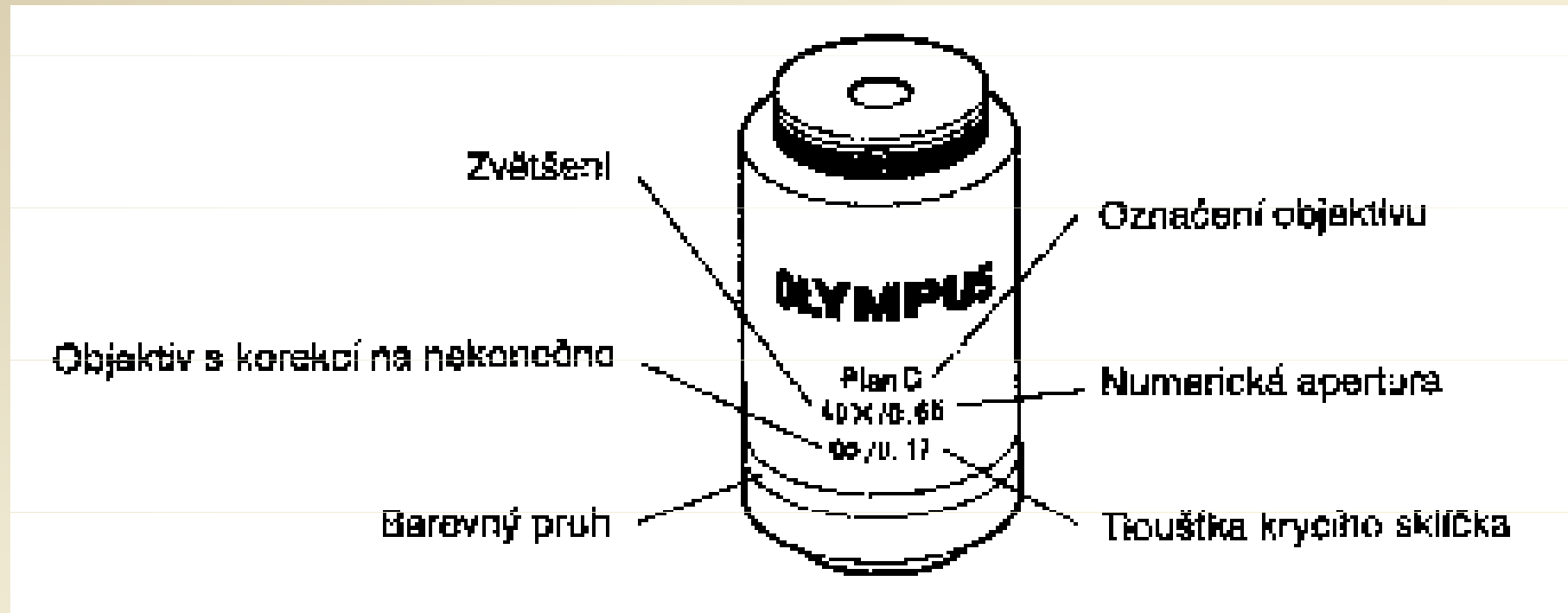


## Zklenutí obrazu

**Zklenutí (sklenutí)** zorného pole je vada, která spočívá ve skutečnosti, že body ležící v rovině kolmé k optické ose se nezobrazují v rovině kolmé k ose, ale na zakřivené ploše. V rovině kolmé k optické ose tak nelze získat obraz, který by byl v celém rozsahu stejně ostrý. Tato vada souvisí s astigmatismem a bývá u anastigmatů odstraněna současně s astigmatismem.



### 3. Část optická - objektiv



Barevné označení objektivů – 4x **červená**, 10x **žlutá**, 20x **zelená**,  
40x **světle modrá**, 60x **tmavě modrá**, 100x **černá**

### 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

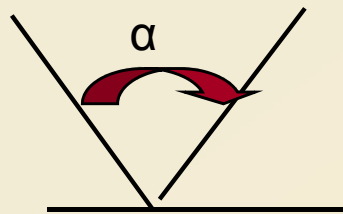
objektiv

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

$\alpha$  - otvorový úhel

N - index lomu prostředí mezi  
objektivem a preparátem

preparát



**Pracovní vzdálenost:** Vzdálenost mezi preparátem a nejnižším bodem objektivu

**Rozlišovací schopnost:** Schopnost rozlišit dva body, tzn. že vyjadřuje minimální vzdálenost dvou objektů tak, aby byly vnímány jako dva jednotlivé objekty

**Hloubka ostrosti:** Hloubka obrazu, v níž bude zaostřený obraz rovnoměrně ostrý. Hloubka ostrosti se zvětšuje se zavíráním aperturní clony. S rostoucí numerickou aperturou objektivu hloubka ostrosti klesá

**Číslo pole:** Číselná hodnota, která ovlivňuje velikost zorného pole

**Průměr zorného pole:** Skutečný průměr pozorovaného pole v milimetrech

**Celkové zvětšení:** Součin zvětšení objektivu a zvětšení okuláru

### 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

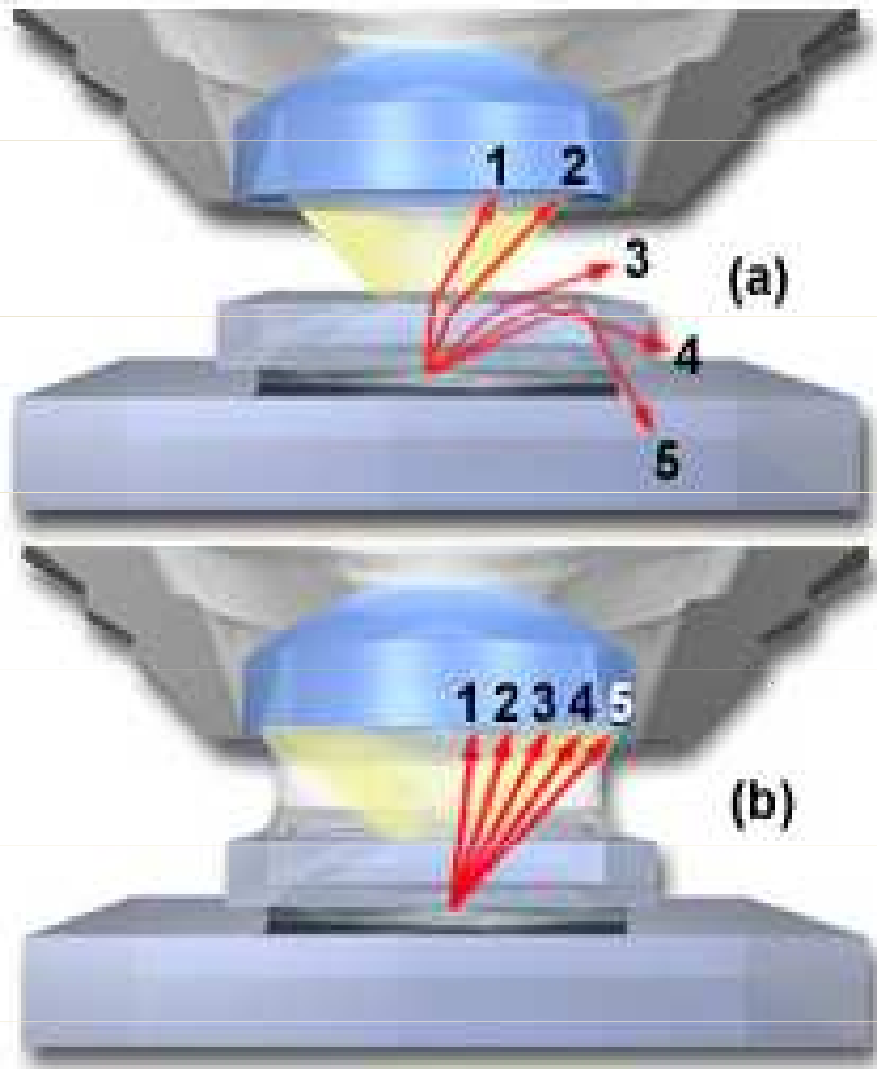
**Suché objektivy** - mezi objektivem a krycím sklem je vzduch

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

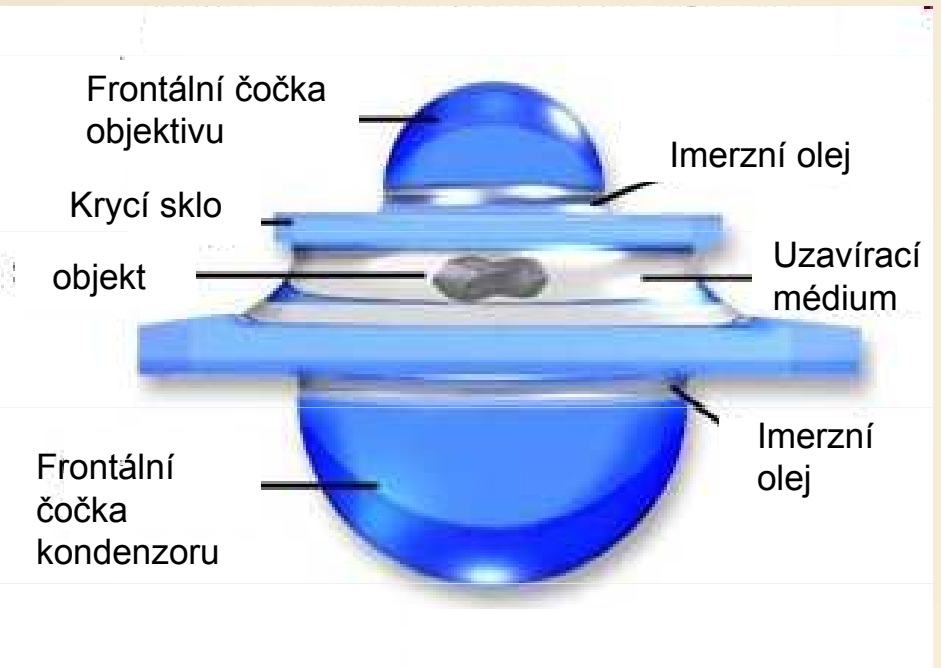
$$NA > 1$$



## Význam použití imerze



## Homogenní imerzní systém



Imerzní média index lomu

materiál	Index lomu
vzduch	1,0003
voda	1,333
glycerin	1,4695
Parafinový olej	1,480
Cedrový olej	1,515
Syntetický olej	1,515
anisol	1,5178
bromonaftalen	1,6585
metylenjodid	1,740

**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**

### 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** - nezkracují 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

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

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

**Projektivy** - okulár používaný při mikrofotografii

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

## 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 očnice 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.

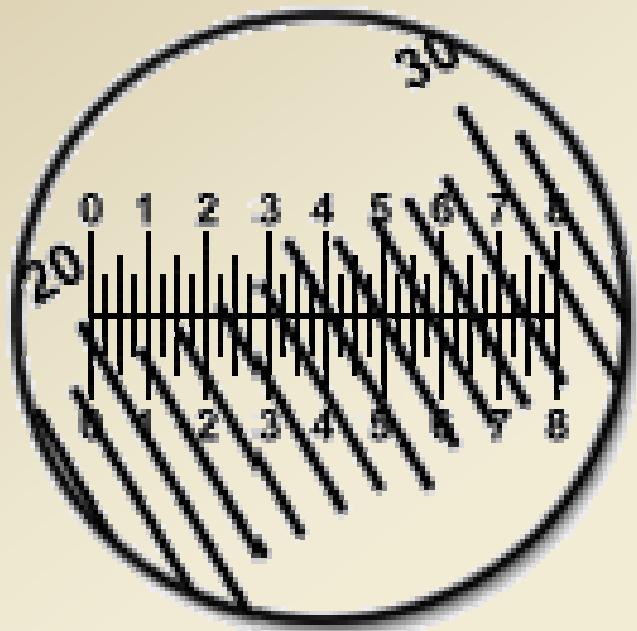
## Při cejchování a měření se postupuje takto:

1. Objekt, který se má měřit, nahradíme **objektivovým mikrometrem** a používaný okulár **okulárem měřícím** u něhož otáčením objímky očnice 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**.

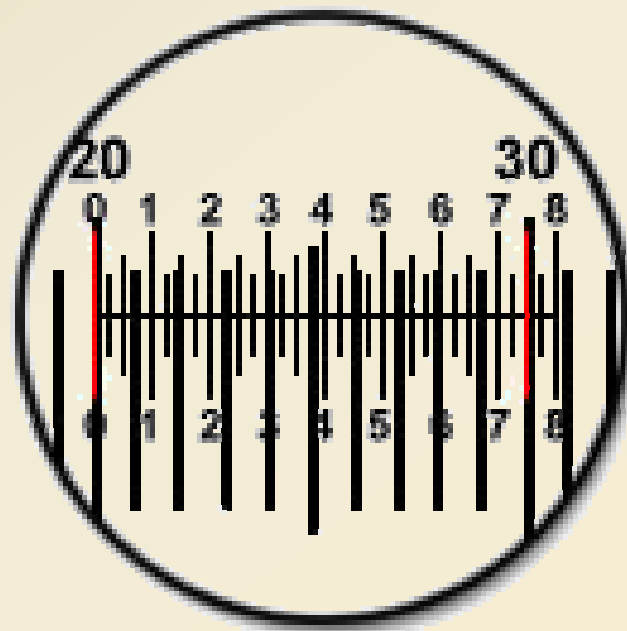
### praktický příklad:

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  $70 : 12 = 5,8 \mu\text{m}$ .

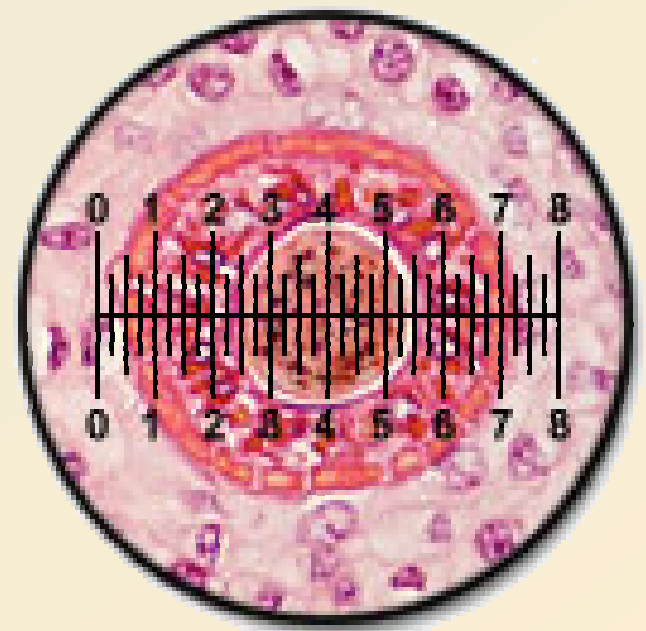
**Toto číslo je tzv. mikrometrická hodnota pro použitý objektiv a příslušnou mechanickou tubusovou délku mikroskopu.**



(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**

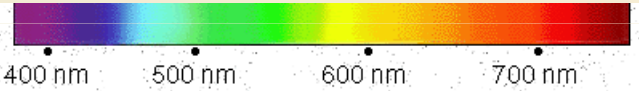
# Metoda fázového kontrastu

Frits Zernike, 1934

Nobelova cena

Karl Zeiss, Jena

**amplituda** - intenzita světla

**vlnová délka** - barva 

**fázový posun** - neviditelný pro lidské oko

Nebarvené objekty

různá optická hustota

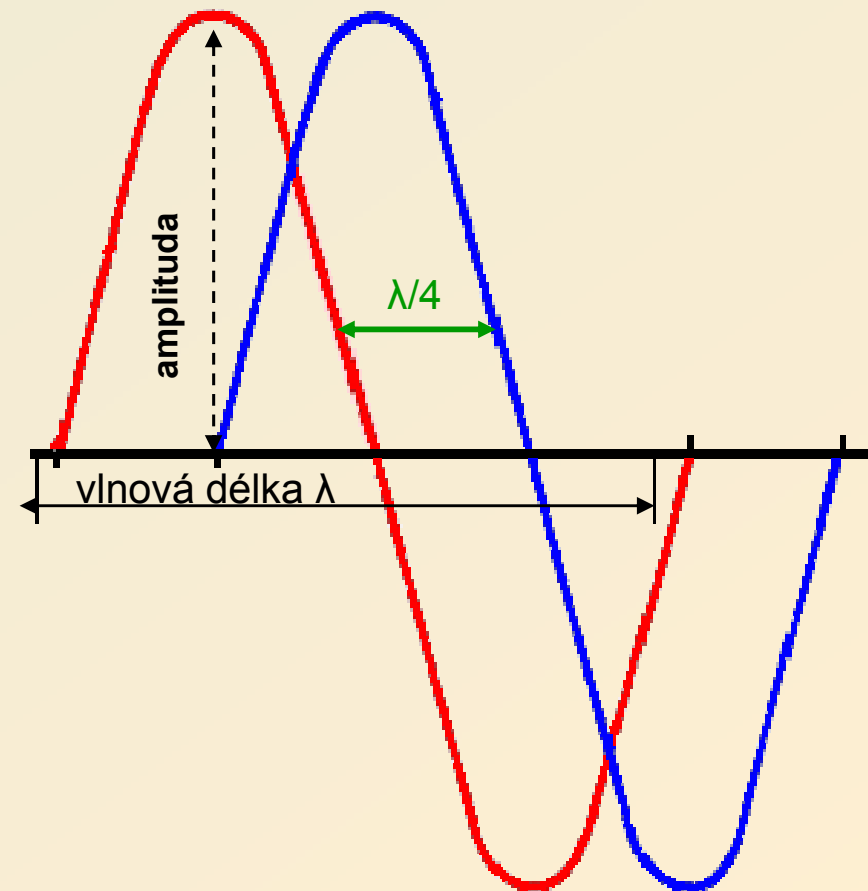
změna fáze

**ZAŘÍZENÍ PRO FÁZOVÝ KONTRAST**

změna fáze vlnění na změnu amplitudy

=

viditelné pro člověka



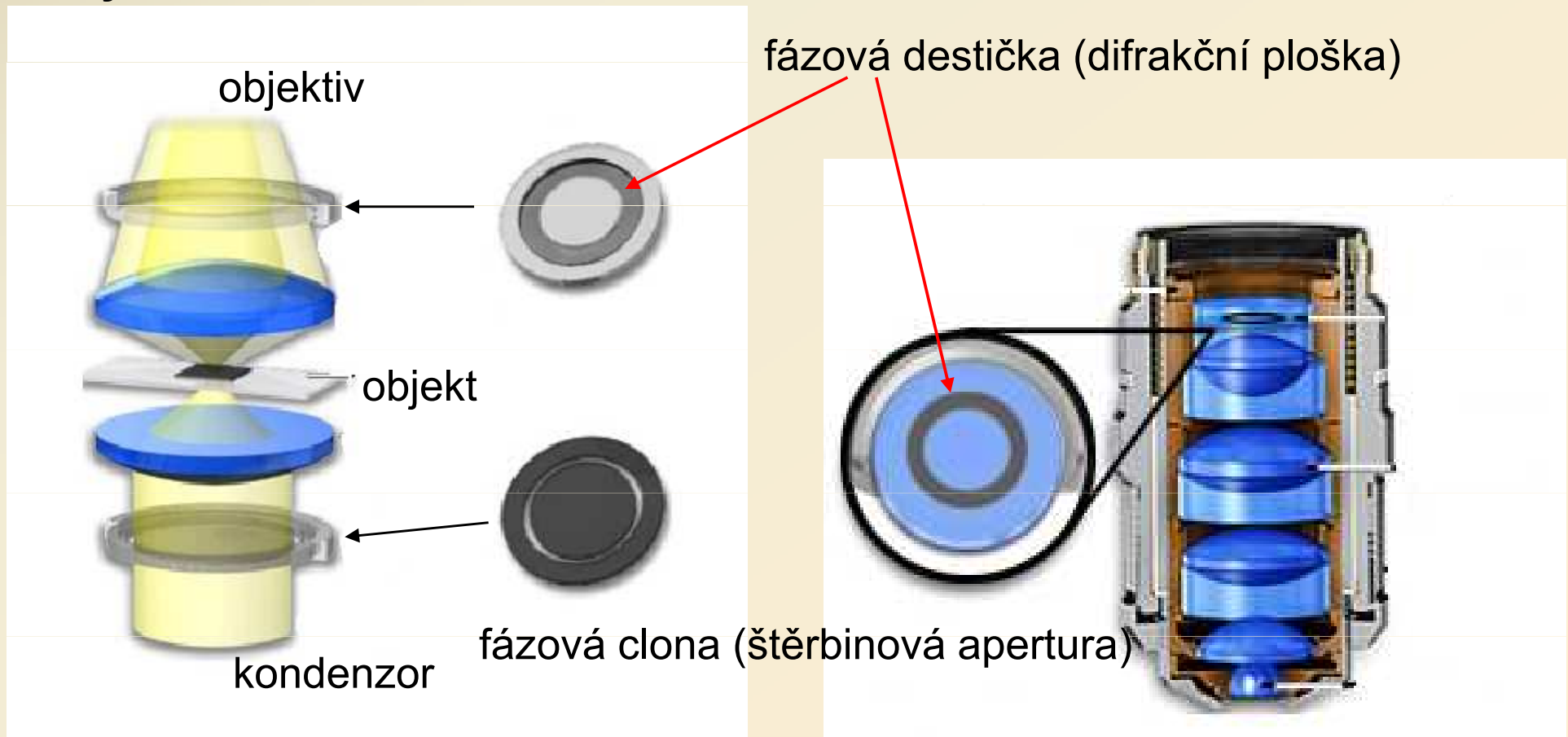
# Objektivy pro fázový kontrast - fázový prsteneček

(převádí neviditelné fázové rozdíly na rozdíly amplitudové)

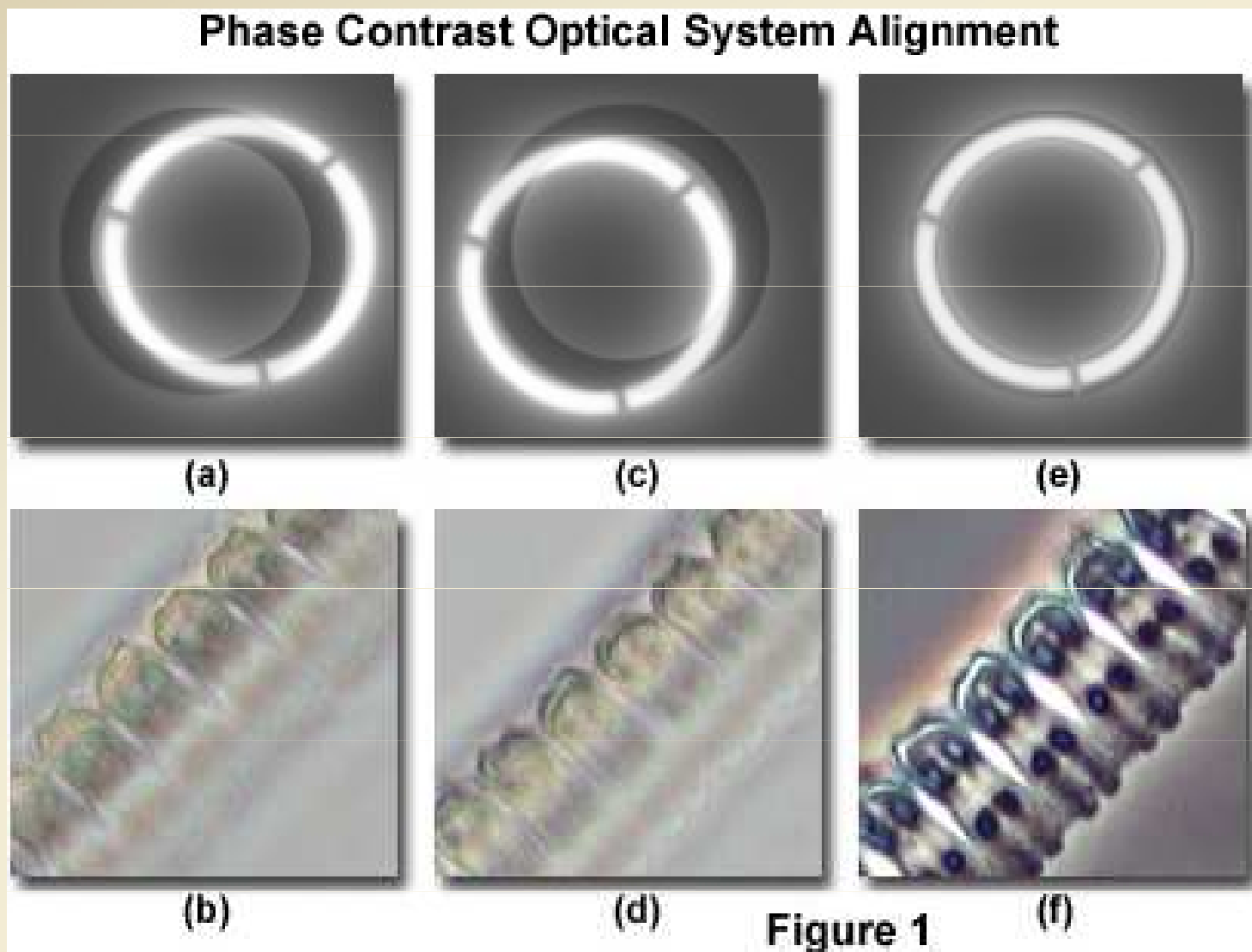
## Kondenzor - aperturní kroužek pro různé zvětšení

## Centrovací dalekohled - seřízení fázových prstenců

Zelený filtr- 540 nm



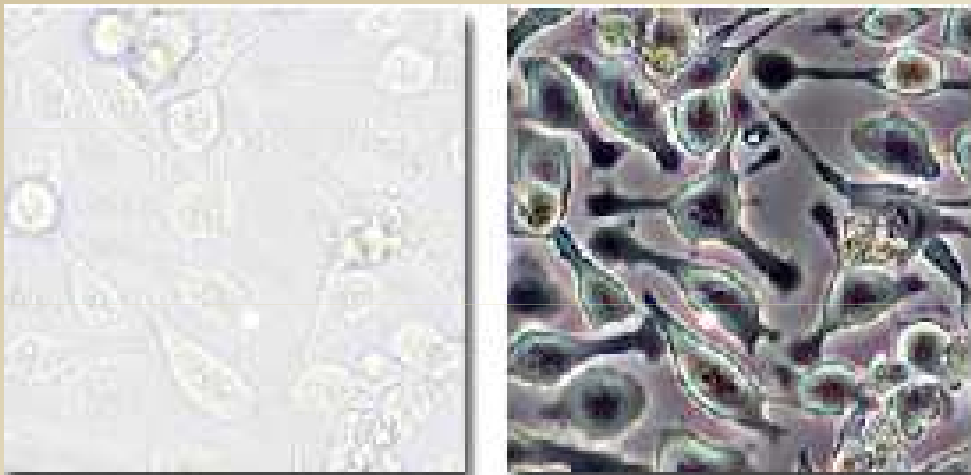
# Seřizení fázových destiček



<http://www.olympusmicro.com/primer/java/phasecontrast/phasemicroscope/index.html>

<http://www.microscopyu.com/tutorials/java/phasecontrast/microscopealignment/index.html>





**procházející světlo x fázový kontrast**



**křídlo motýla**

## **Problém halace**

apodizovaný fázový kontrast



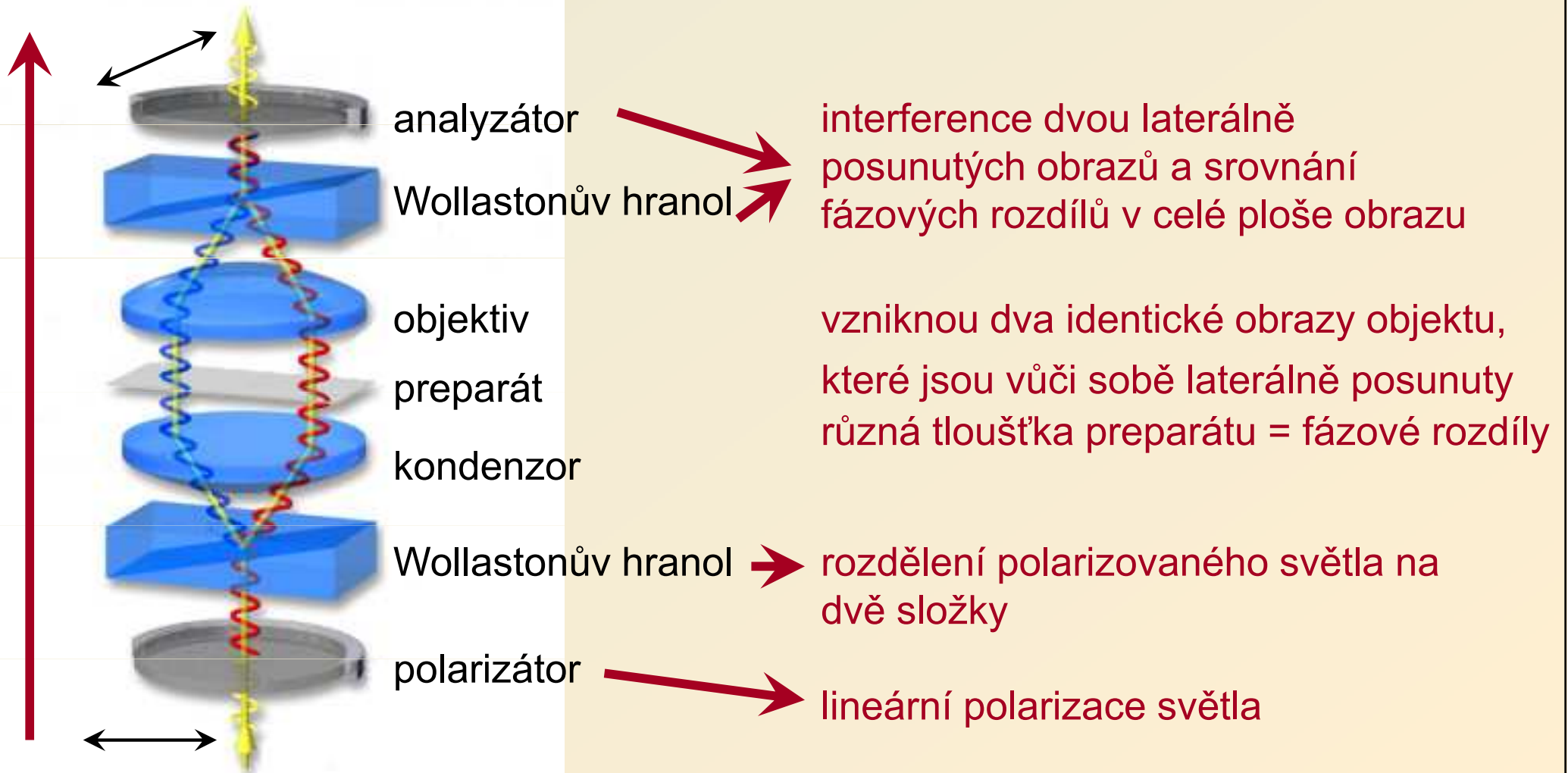
**Malformovaný střední  
háček diplozoona**

# Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC)

## - povrchová topologie objektu

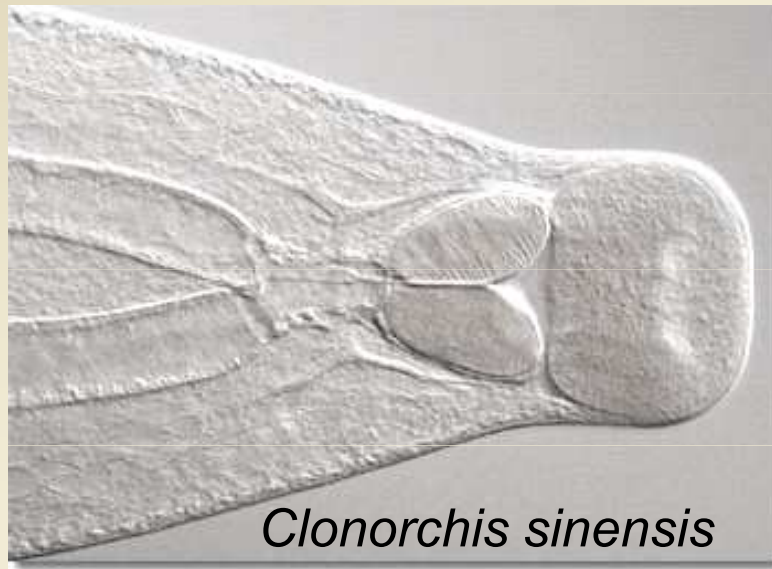
kolem 1950, Georges Nomarski  
mikroskop - 1959 Carl Zeiss

zvětšený obraz vzorku se jeví jako  
šikmo osvětlený trojrozměrný objekt





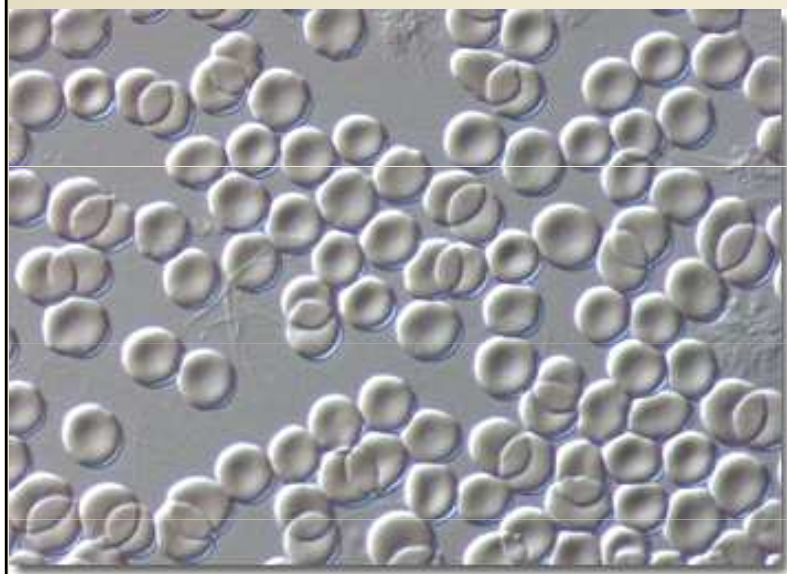
*Ancylostoma  
duodenale*



*Clonorchis sinensis*



pylové zrno borovice



červené krvinky



řez ledvinou myši



příchytné 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.