

Základní metody světelné mikroskopie



Brno 2004
©

Předmluva

Předkládáme Vám pomocný text o světelných mikroskopech, abychom Vám umožnili alespoň částečně proniknout do tajů, kterými je obestřena funkce mikroskopů, se kterými pracujete. Neděláme si nárok na dokonalé vysvětlení všech fyzikálních zákonitostí a konstrukčních detailů. Aby text nebyl příliš rozsáhlý a nepotlačil Váš zájem hned při prvním pohledu na něj, pokusili jsme se vybrat z teorie jen to, co je nutné k pochopení popisované metody mikroskopování. Často je to však na úkor přesnosti, za to se Vám omlouváme a doporučujeme vzít k ruce literaturu, týkající se problému.

Text není hotový a bude – pokud se nám to podaří – dále doplňován. Prosíme Vás, máte-li jakékoliv připomínky ke zlepšení textu nebo výhrady k případným nedokonalostem, napište nám na adresu evzen.hruska@mikroskopy.cz.

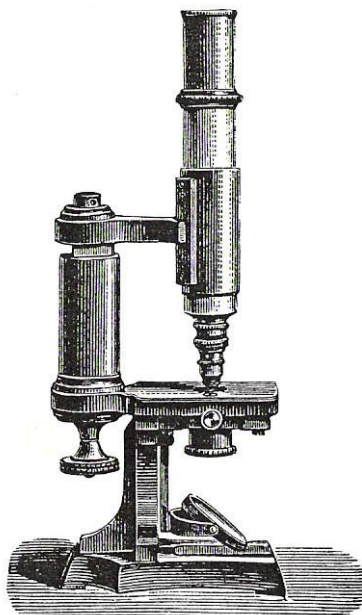
Text není určen k prodeji a je Vám k dispozici pouze v elektronické formě na adrese:

www.mikroskopy.cz

Nemáte-li přístup k Internetu, vyžádejte si text na CD-ROM, pošleme Vám jej zdarma. Naše adresa je uvedena v záhlaví textu.

Věříme, že Vám tento náš pokus pomůže při Vaší práci.

Ke zpracování textu byly použity firemní materiály **Nikon**.



Připravil **Optoteam**, s.r.o., Kyjevská 6, 160 00 Praha 6

Generální zastoupení mikroskopů **Nikon** v České republice

10-2004



Všechna práva autorská a distribuce jsou majetkem Optoteam, s.r.o., Praha

Obsah:

1	Nezbytný úvod	4
2	Základy geometrické optiky.....	9
3	Objektivy	11
	Světelný tok, jas a numerická apertura objektivu	12
4	Okuláry.....	16
	Dioptrie (D)	18
5	Tubus mikroskopu.....	18
	„Nekonečná optika“ mikroskopu (Nikon CFI60).....	20
6	Osvětlovací soustava mikroskopu.....	22
	Nastavení KÖHLEROVA osvětlení	23
	Konjugované (sdružené) roviny.....	24
7	Kondenzor.....	27
8	Vlnová optika	29
9	Rozlišovací schopnost	32
	Neostrost způsobená interferencí a ohybem (difrakcí) světla.....	35
	Ohybový obraz po průchodu světla	36
10	Kontrastovací metody v mikroskopii.....	38
	Pozorování v tmavém poli (v zástínu).....	39
	Fázový kontrast	41
	Hoffmanův modulační kontrast (HMC)	48
	Polarizační mikroskopie.....	49
	Dvojlom světla	52
	Kompenzátory.....	53
	Interferenční chromatičnosti.....	54
	Interferenční mikroskopie	56
	Diferenciální interferenční kontrast s de Sénarmontovou úpravou	58
10	Fluorescenční mikroskopie	60
	Výbava mikroskopu pro epifluorescenci:.....	61
	Stručný popis epifluorescenční mikroskopie:	62
	Příprava vzorku pro pozorování při fluorescenci:.....	62
	Zařízení k potlačení úrovně šumu (Noise Terminátor).....	63
	Zařízení pro vyrovnání excitace (Excitace Balancer) Nikon	64
	Imunofluorescence.....	65
	Fluorescence in Situ Hybridization (FISH)	65
	TIRF – Total Internal Reflexe Fluorescence	65

1 Nezbytný úvod

Mikroskop (dříve se říkalo „drobnohled“) je složitá optická soustava. Účelem mikroskopu je pozorování drobných předmětů (objektů) a jejich detailů při velkém zvětšení. Zvětšený obraz v mikroskopu vnímáme zrakem, musí tedy být vytvořen viditelným zářením (světlem).

Oko (receptor obrazu) je zatížené optickými vadami, podobně jako čočky mikroskopu. Navíc je výsledný vjem obrazu složitý psychofyzilogický proces, ovlivněný schopnostmi a kondicí pozorovatele. Je proto nutné smířit se s tím, že hodnocení kvality obrazu v mikroskopu zrakem je vždy z velké části subjektivní.

Oko vnímá elektromagnetické záření jako světlo v rozsahu vlnových délek přibližně 380 – 760 nm (1 nanometr = 1×10^{-9} m). Lidský zrak má rozdílnou citlivost na vlnovou délku záření. Nejcitlivější je oko na žlutozelené záření s vlnovou délkou kolem 500 nm, v krátkovlnné oblasti končí citlivost oka při vlnové délce 380 nm (ultrafialové záření) a v dlouhovlnné oblasti končí u 760 nm (infračervené záření). Tyto hodnoty se týkají tzv. denního vidění, v šeru se schopnost vnímat rozdílné chromatičnosti ztrácí. Proto hovoříme o světlené mikroskopii, na rozdíl od mikroskopie, kde se obraz vytváří krátkovlnným elektromagnetickým zářením. Viditelný obraz pak získáme teprve použitím obrazového měniče. Na tomto principu je založena elektronová mikroskopie, při které lze dosáhnout mnohem většího zvětšení. Vyspělá mikroskopie nahrazuje oko čidlem kamery a subjektivní hodnocení počítačovým systémem, který provádí kvalitativní nebo kvantitativní analýzu obrazu.

Několik slov k termínu „chromatičnost“: Tento výraz dovoluje kvantitativní vyjádření „barvy“ na základě srovnání s absolutní teplotou černého zářiče (v kelvinech, K). U záření tedy nemluvíme o jeho „barvě“, ale o teplotě chromatičnosti. Termín „barva“ je fyzikálně nejednoznačný. Má-li záření jen jednu vlnovou délku, jde o záření monochromatické. U takového záření je vztah mezi chromatičností a vlnovou délkou jednoduchý. Chromatičnost záření, složeného z několika vlnových délek, se hodnotí obtížněji, přesně je popisují jeho trichromatické souřadnice. Takové hodnocení může být v mikroskopii součástí obrazové analýzy, prováděné počítačovým programem.

U chromatičnosti je nutné rozlišovat, zda je detail sám zdrojem záření (v mikroskopii s procházejícím světlem), nebo zda jde o záření odražené (při mikroskopii neprůhledných předmětů).

Základem vnímání obrazu zrakem jsou rozdíly detailů, které se liší:

- a) velikostí
- b) tvarem
- c) jasem (kontrastem)
- d) chromatičností (barvou)
- e) hranovou ostrotí

Při tvorbě obrazu objektivem by byl v ideálním případě zobrazován bod v předmětovém prostoru jako bod v obrazovém prostoru. Ve skutečnosti nezobrazujeme jednotlivé body, ale objekty složené z větších nebo menších detailů. Obrazy těchto detailů nejsou nikdy zcela dokonalé, jsou zatíženy souborem různě

velkých chyb, které způsobují jejich zkreslení. Obrazem bodu už není bod, ale (co nejmenší) ploška, jejíž velikost závisí na dokonalosti optické soustavy mikroskopu.

Zvětšení ve světelném mikroskopu je omezené vlnovou délkou viditelného záření. Detaily, které se svojí velikostí dají srovnávat s vlnovou délkou světla, nelze vzájemně rozlišit. Tak zvané užitečné zvětšení končí, když dalším zvětšováním nedostaneme v obraze víc rozlišitelných detailů. Informační hodnota obrazu se za touto hranicí již nezvětšuje (vznikne prázdné zvětšení).

Mikroskopy můžeme dělit podle toho, k jakému pozorování je mikroskop určen.

Pozorujeme-li předměty v dopadajícím světle (vesměs neprůhledné předměty, minerály, materiál, drobné výrobky atd.), jde o pozorování při episkopickém osvětlení. Pozorujeme-li průhledné předměty v procházejícím světle, hovoříme o diaskopickém osvětlení. Tento způsob je nejčastější v biologii.

Pozorování při diaskopickém osvětlení můžeme dále dělit na pozorování ve světlém a v tmavém poli. Světlé pole je více rozšířeno, jak již název připomíná, jsou pozorované předměty od světlého pozadí rozlišeny optickou hustotou nebo/a chromatičností. Při pozorování v tmavém poli jsou naopak pozorované předměty jasnější než pozadí.

Důležitým případem pozorování ve světlém poli jsou metody, využívající fázový kontrast. Mikroskopie, využívající fluorescenčního záření, je zvláštním případem episkopického pozorování (epifluorescence – viz dále).

Další rozhodující okolností je, zda pozorujeme tak, že objektiv je nad preparátem (vzpřímené mikroskopy), nebo zda se díváme na předměty „zespodu“, pak je objektiv pod preparátem a jde o obrácený, invertovaný mikroskop. Optickou stavbou se tyto dva typy neliší, rozdíl je v mechanickém provedení.

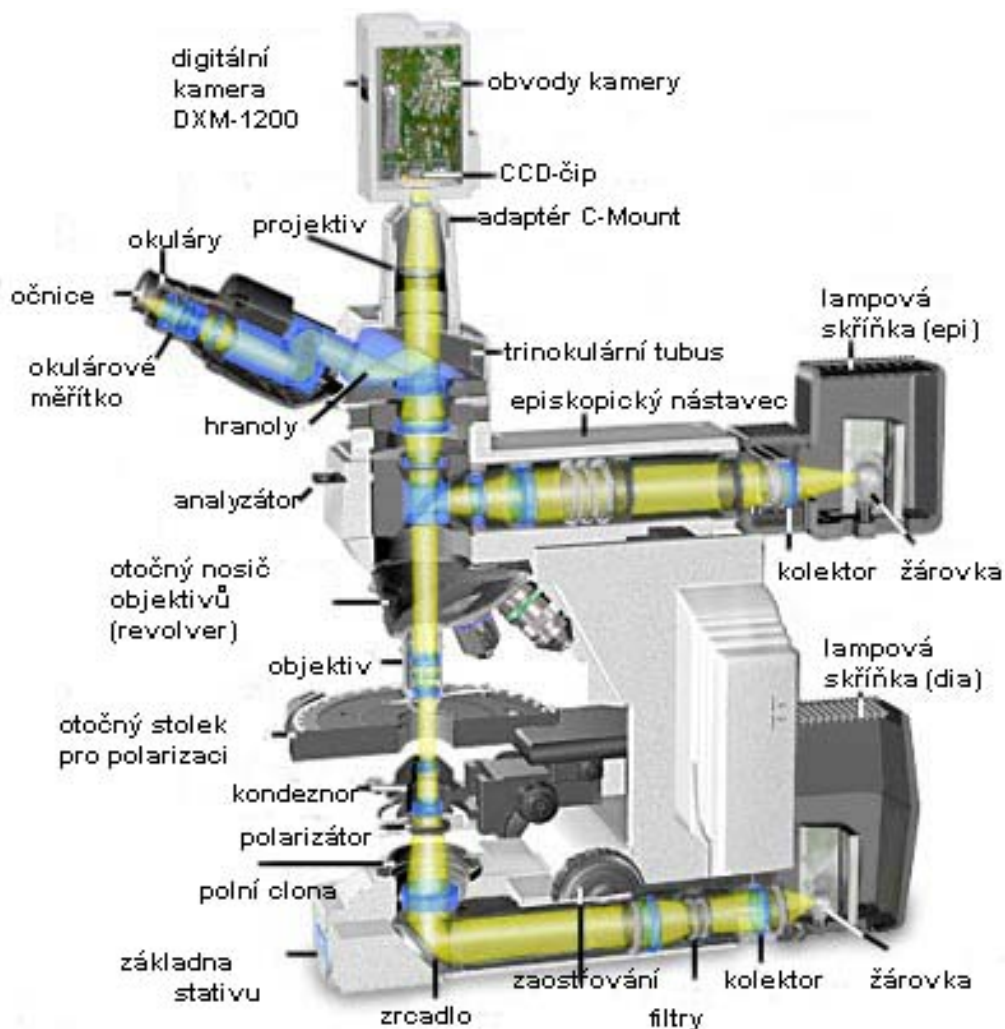
Vystačíme-li s „malým“ zvětšením (přibližně 5x–350x) a klademe-li u obrazu důraz na prostorový vjem, pak používáme stereomikroskopy, o kterých budeme mluvit zvlášť.

Základní typy mikroskopů (**Nikon**)

Následující obrázek ukazuje badatelský mikroskop **Nikon ECLIPSE E 600**

Je vybaven digitální kamerou DXM-1200, připojenou na trinokulárním tubusu pomocí adaptéru C-Mount, ve kterém je projekční okulár (projektiv). V pravém okuláru tubusu je vložena destička s okulárovým měřítkem.

Hranoly v trinokulárním tubusu dělí chod paprsků do okulárů nebo/a do výstupu pro kameru. Na stativu je osvětlovací nástavec s lampovou skříňkou pro episkopické osvětlení (osvětlení dopadajícím světlem). Mikroskop je vybaven pro polarizační měření, v optické ose je polarizační analyzátor a kondenzor s polarizátorem. Stolek je otočný se stupnicí v úhlové míře s noniem. Diaskopické osvětlení, vestavěné do stativu, je vybaveno kolektorem, filtry a polní clonou (Köhlerovo osvětlení). z pohledu je levý zaostřovací systém zakryt, vidíme jen jeho pravou část.



Nikon ECLIPSE E600

NIKON ECLIPSE E 200

je vzpřímený rutinní mikroskop s episkopickým osvětlením (pozorování ve světlém poli) pro biologické laboratoře.



Badatelský mikroskop **NIKON ECLIPSE 80i** s diaskopickým osvětlením v základní sestavě s trinokulárním tubusem a otočným kondenzorem

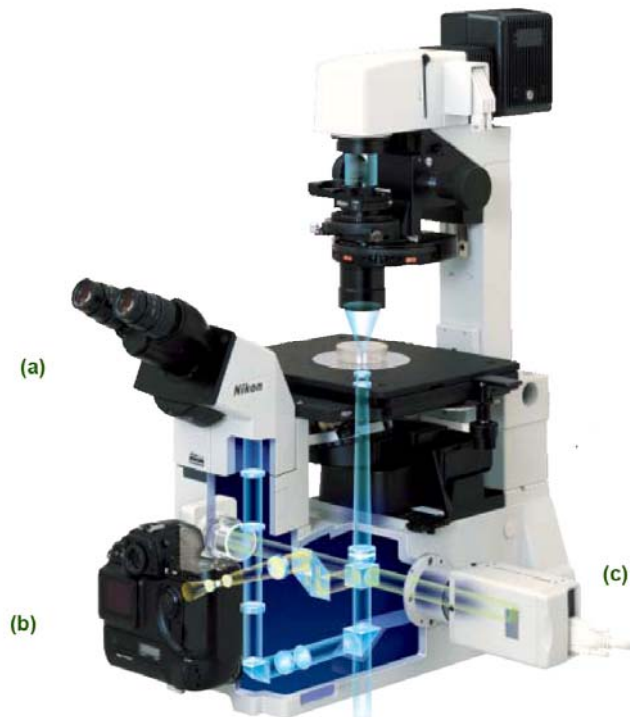


Velký inverzní mikroskop

NIKON ECLIPSE TE 2000

V částečném řezu je zakreslen chod paprsků

- a) do binokulárního tubusu
- b) do fotografického tělesa (čelní vstup)
- c) do CCD kamery (boční vstup vpravo)



Rutiní inverzní mikroskop

NIKON ECLIPSE TE 100

pro běžnou laboratorní práci. Stativ na obrázku nemá výstup pro připojení kamery, k tomu je určen typ TE 100 F s výstupem pro kameru



2 Základy geometrické optiky

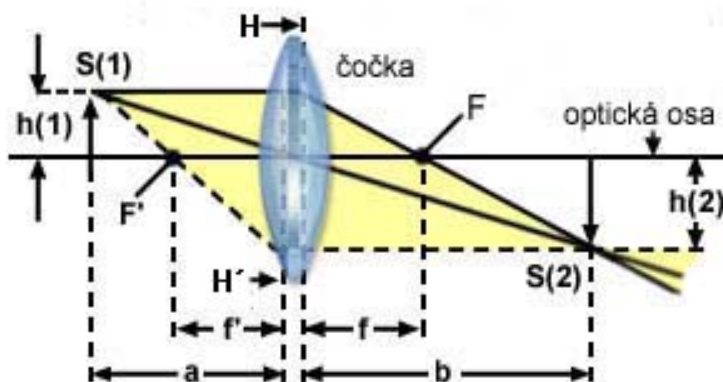
Fyzikální základy světlené mikroskopie jsou součástí optiky. K popisu funkce čoček a celého mikroskopu stačí jednoduché rovnice, případně geometrické konstrukce. Čtenáři, který se zajímá hlouběji o fyzikální základy optiky doporučujeme, aby se vrátil k učebnici fyziky pro střední školy. Pro naše účely si zopakujeme významy některých pojmů, které budeme dále potřebovat k vysvětlení funkce mikroskopu.

Základní optické prvky mikroskopu jsou objektiv a okulár. Jsou to centrované optické soustavy, vrcholy jejich čoček leží na společné přímce, která se nazývá optická osa. Na optické ose mikroskopu leží středy všech jeho optických soustav, kromě již zmíněných jsou to: kondenzor, tubusová čočka, osvětlovací soustava a případně další doplňky.

Pro zjednodušený výklad můžeme nahradit objektiv a okulár mikroskopu tenkými spojnými čočkami. Středem (tenké) čočky, kolmo na její optickou osu, probíhá hlavní rovina čočky. Hlavní rovina H odděluje předměťový a obrazový prostor. Souměrná a tenká spojná čočka má jednu hlavní rovinu, „tlustá“ spojná čočka nebo soustava čoček (objektiv) mají dvě hlavní roviny: jednu pro předměťový a druhou pro obrazový prostor, H' , H . Podle vžité dohody je kladný směr paprsků z předměťového do obrazového prostoru. Veličiny předměťového prostoru označujeme apostrofem (např. F' = ohnisko předměťového prostoru). Vzdálenost předmětu, ležícího na optické ose nebo v její těsné blízkosti, od hlavní roviny předměťového prostoru je „předmětová vzdálenost“ (v obrázku **a**).

S ní přímo souvisí podobná veličina objektivu mikroskopu, tzv. „pracovní vzdálenost“ (anglicky Working Distance, zkratka W.D.). Je to vzdálenost od povrchu krycího skla preparátu k čelní čočce objektivu. Užívá se též termín „pozorovací vzdálenost“, je shodná s předmětovou vzdáleností.

zobrazení spojnou čočkou

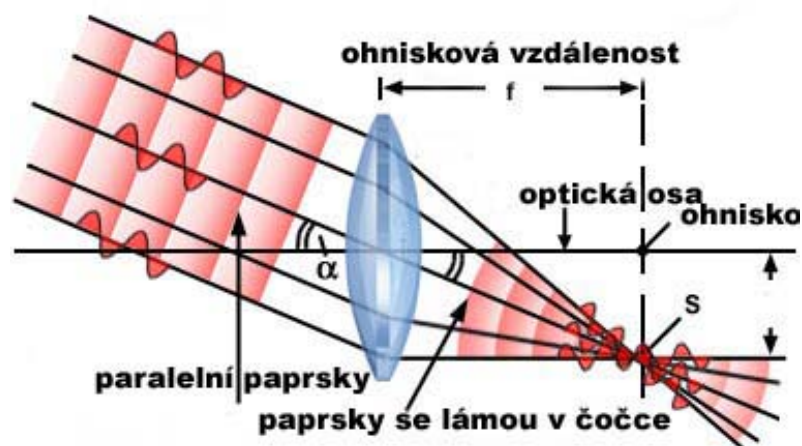


- F' ohnisko předměťového prostoru
- F ohnisko obrazového prostoru
- f' ohnisková vzdálenost předměťového prostoru od hlavní roviny

f	ohnisková vzdálenost obrazového prostoru od hlavní roviny
a	předmětová vzdálenost
b	obrazová vzdálenost
h_1	výška předmětu
h_2	výška obrazu
H, H'	hlavní roviny čočky
S_1, S_2	konjugované body

Paprsky, které dopadají (z nekonečna) rovnoběžně na vstupní plochu čočky se na její hlavní rovině lámou tak, že dopadají do jednoho bodu na optické ose v obrazovém prostoru. Tomuto bodu říkáme ohnisko **F** (obrazového prostoru). Kolmice na optickou osu v tomto bodě je ohnisková rovina Φ (obrazového prostoru), vzdálenost ohniska od hlavní roviny je ohnisková vzdálenost **f** (obrazového prostoru). Obdobné veličiny charakterizují čočku v jejím v předmětovém prostoru, který má svoje ohnisko **f'**, ohniskovou vzdálenost **F'** a ohniskovou rovinu předmětového prostoru Φ' . Ohniskové vzdálenosti objektivů k mikroskopu výrobce neudává, jejich velikost se pohybuje v milimetrech.

průchod paprsků (z nekonečna) čočkou



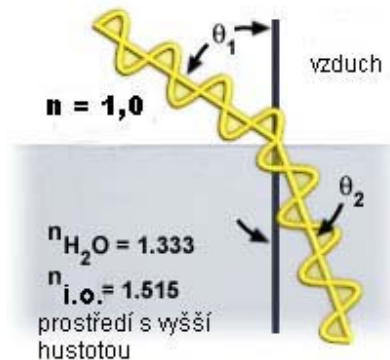
„Nekonečno“ – v optice je vzdálenost, která se u mikroskopu rovná přibližně desetinásobku ohniskové vzdálenosti objektivu mikroskopu. Paprsky dopadající z „nekonečna“, procházejí optickou soustavou rovnoběžně s její optickou osou. Všeobecně používaná značka pro nekonečno je ∞ .

Pro tvorbu obrazu čočkou musíme brát v úvahu vlastnosti prostředí, ve kterém se čočka nachází. Určující vlastností prostředí je v tom případě jeho index lomu **n**. Tato (bezrozměrná) veličina je dána poměrem mezi rychlostí světla (určité vlnové délky) ve vakuu (kde je rychlost světla maximální, $c_{\text{vakuum}} = 2,998 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$) a jeho rychlostí v daném prostředí.

$$n = c_{\text{vakuum}} / c_{\text{prostředí}}$$

Index lomu určuje „optickou lámavost prostředí“. Ve světlené mikroskopii jsou důležité indexy lomu vzduchu ($n_{\text{vzduch}} =$ přibližně 1,0), skla ($n_{\text{sklo}} =$ podle druhu skla 1,4–1,8; průměrná hodnota je 1,5), vody ($n_{\text{voda}} = 1,333$), imerzního oleje ($n_{\text{im.olej}} = 1,515$ podobně jako u skla).

lom paprsku při průchodu ze vzduchu do prostředí s vyšším indexem lomu



3 Objektivy

Pro konstrukci objektivů mikroskopu je důležité prostředí ve kterém pracuje. Rozlišujeme objektivy „suché“, pracující ve vzduchu a „imerzní“, kde vzduch nahrazuje imerzní olej, případně voda. Většina objektivů hraničí oběma koncovými skleněnými plochami se vzduchem. Index lomu skla a vzduchu jsou rozdílné, menší index lomu vzduchu omezuje numerickou aperturu objektivu (viz dále). Lepších výsledků dosáhneme, nahradíme-li vzduchovou vrstvu mezi objektivem a krycím sklíčkem preparátu imerzním olejem, jehož index lomu je (téměř) shodný s indexem lomu skla. Méně často se používají objektivy s vodní imerzí. Objektivy však musí být k tomu způsobu práce přizpůsobeny při výrobě.

objektiv a jeho části



Objektiv není schopen zobrazit detaily bez zkreslení, které je způsobeno jeho zobrazovacími vadami. Nejdůležitější zobrazovací vady objektivu jsou:

- a) sférická odchylka
- b) sinusová vada
- c) zklenuť obrazu
- d) deformace obrazu (soudečkové a polštářkové)
- e) chromatická odchylka

Objektivy se v průběhu vývoje neustále zlepšují tím, že se u nich stále více potlačují zobrazovací vady (zbytkové vady, aberace). Název objektivu naznačuje, kterou zobrazovací vadu objektiv významně potlačuje: achromáty potlačují chromatickou vadu pro dvě chromatičnosti (barvy) spektra, plan-objektivy se snaží o vyrovnání zklenutí obrazu do roviny, apochromáty jsou vybaveny korekcí pro tři základní chromatičnosti. Potlačování zbytkových vad se říká korekce.

Měřítkem pro jakost objektivů jsou

- a) numerická apertura
- b) rozlišovací schopnost
- c) korekce zbytkových vad
- d) jas a kontrast obrazu

Jas a kontrast obrazu jsou důležitými kritérii pro jeho kvalitu. Obě veličiny jsou závislé na konstrukci objektivu a na druhu skla. Jas obrazu přímo závisí na průměru vstupní čočky. Protože účinný průměr vstupní čočky objektivu může být omezen objímkami (přírubami) čoček nebo proměnnou clonou, byl zaveden pojem „vstupní pupila D' “. Je to obraz nejmenší příruby nebo clony, promítnutý do čelní plochy objektivu při obráceném chodu paprsků. Vstupní pupila určuje (spolu s ohniskovou vzdáleností f') světelnost objektivu, která rozhoduje o jasu obrazu. Obrazem vstupní pupily v obrazovém prostoru je výstupní pupila D' .

Irisová clona v objektivu (zužující podle potřeby kruhový otvor), která ve fotografii nastavuje jeho světelnost, nemá v mikroskopickém objektivu takovou důležitost. Mikroskopické objektivy s proměnnou clonou jsou výjimečné.

Jas a kontrast obrazu spolu přímo souvisejí: kontrast (nepestrého objektu nebo obrazu) je roven rozdílu logaritmů detailů s největším a nejmenším jasnem. U průhledných objektů nahrazujeme jas optickou hustotou. O kontrastu můžeme mluvit také tehdy, jde-li o rozdíly v chromatičnosti detailů, objektivní posouzení kontrastu je však v tom případě obtížné. Obecně platí, že kvalita obrazu se až do určité hranice zvyšuje se stoupajícím kontrastem detailů. Po dosažení optimálního kontrastu jeho další zvyšování zhoršuje kvalitu obrazu.

Množství záření procházejícího objektivem je ovlivněno také (spektrální) propustností objektivu pro toto záření. Tato propustnost (viz dále) závisí na vlnové délce záření. Sklo částečně pohlcuje krátkovlnné (ultrafialové) záření, pro fluorescenční mikroskopii se kvalitní objektivy vyrábějí ze speciálních druhů skla, obsahujících fluorit (fluotary).

Světelný tok, jas a numerická apertura objektivu

Množství světla, které prochází optickou soustavou, nazýváme světelný tok Φ . z malé plošky $\Delta S'$ v předmětovém prostoru dopadá na vstupní čočku světelný tok $\Delta\Phi'$. Pokud by průchodem světla soustavou nevznikaly ztráty, byl by světelný tok $\Delta\Phi$ v obrazovém prostoru stejný, jako vstupující světelný tok $\Delta\Phi'$. Ve skutečnosti však vznikají při průchodu světla optickou soustavou ztráty, protože se část světla v čočkách pohltí a část se ztratí odrazem na lámavých plochách, hlavně na hranici

sklo/vzduch. Tyto ztráty se vyjadřují koeficientem τ , který se nazývá propustnost optického systému:

$$\Delta\Phi = \tau \Delta\Phi',$$

kde τ je vždy menší než 1.

Světelný tok nám umožní definovat jas L . Touto veličinou můžeme charakterizovat jak světelné vlastnosti (zářícího) předmětu L' , tak jas obrazu, vytvořeného optickou soustavou L . Protože je jas přímo úměrný světelnému toku, platí pro jas malé plošky ΔS v obrazovém prostoru:

$$\Delta L = \tau \Delta L'$$

Nyní jsme poznali optické veličiny, které určují jas L obrazu. Je to hlavně světelný tok Φ' , který dopadá na vstupní pupilu objektivu a propustnost objektivu τ .

Z hlediska konstrukce objektivu rozhoduje o velikosti světelného toku plocha jeho vstupní čočky. Největší užitečná plocha je udána průměrem tzv. vstupní pupily. Paprsky, které vychází z plošky $\Delta S'$ na optické ose, svírají s průměrem vstupní pupily vrcholový úhel 2α (někdy se nazývá otvorový úhel) a pro světelný tok, vstupující do optické soustavy platí

$$\Delta\Phi' = \pi L' \Delta S' (n \sin \alpha)^2$$

Tato rovnice obsahuje podmínky, které určují výsledný jas obrazu v mikroskopu a tím také kvalitu objektivu. Objektiv je tím lepší, je-li jeho

1. propustnost τ co nejbližší 1
2. jas L' plošky v předmětovém prostoru co největší
3. součin $n \sin \alpha$ co největší. Tento součin se podle E. Abbeho nazývá numerická apertura objektivu a závisí na otvorovém úhlu 2α a na indexu lomu prostředí n .

(Nepřihlížíme zde ke korekci zbytkových vad, o kterých jsme hovořili dříve).

První podmínku se výrobci snaží naplnit volbou co nejlepších druhů skla, použitím antireflexních vrstev a tmelením čoček, které se vzájemně dotýkají.

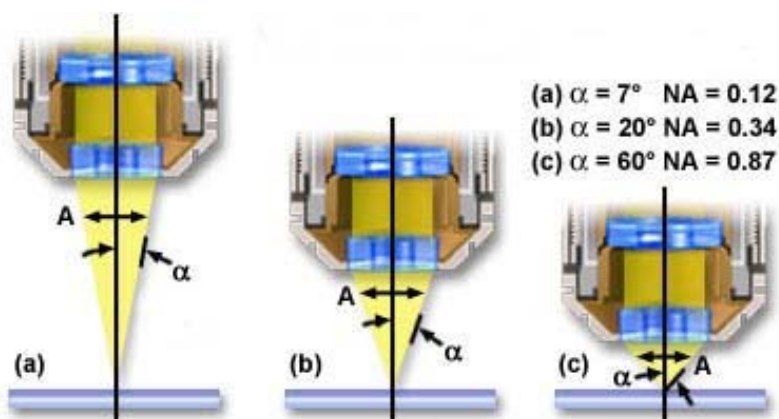
Druhá podmínka je důvodem pro snahu o co nejlepší vlastnosti osvětlovací soustavy mikroskopu.

Třetí podmínka vede ke konstrukci objektivů s co největší numerickou aperturou, případně k používání imerze.

Numerická apertura je nejvýznamnějším hlediskem pro srovnávání jakosti objektivů. v literatuře se zkracuje **N.A.** nebo **n.a.** (numerický = číselný, apertura = otvor). Je to číslo (bez rozměru), které vypočítáme z indexu lomu prostředí (mezi objektivem a preparátem) n a sinu polovičního úhlu 2α , který svírají paprsky vystupující z předmětu, ležícího v optické ose a které dopadají na vnější obvod vstupní pupily objektivu (a jsou ještě využitelné pro tvorbu obrazu, tzv. otvorový úhel 2α):

$$n.a. = n \sin \alpha$$

numerická apertura objektivů



v obrázku:

NA numerická apertura (n.a.)

A = 2 α otvorový úhel

(a) objektiv s malým zvětšením

(b) objektiv se středním zvětšením

(c) objektiv s velkým zvětšením

Je-li mezi preparátem a objektivem vzduch, který má index lomu přibližně 1,0, pak je numerická apertura (přibližně) rovna **$\sin \alpha$** .

Má-li objektiv CFI Plan Achromat 40x n.a. = 0,4, je otvorový úhel $2\alpha = 47,2^\circ$. Použijeme-li objektiv CFI Plan Apochromat 40x (n.a. = 1,0) pro imerzní olej a nahradíme vrstvu vzduchu mezi preparátem a objektivem imerzním olejem ($n = 1,55$), pak je otvorový úhel $2\alpha = 80,4^\circ$ a na vstupní čočku objektivu odpadne za jinak stejných poměrů více světla (zvýší se jas obrazu).

Numerická apertura je číselným měřítkem pro schopnost mikroskopické optiky zachycovat informace, obsažené v pozorovaném objektu. Obecně platí, že lepší kvalitu má ten objektiv se stejným zvětšením, který má vyšší numerickou aperturu. Numerická apertura pro „suché“ objektivy leží mezi 0,1 až 0,89, pro objektivy s olejovou imerzí dosahuje až 1,4.

Dalším důležitým měřítkem pro kvalitu objektivu je jeho rozlišovací schopnost **R**. Je to nejmenší vzdálenost mezi dvěma detaily (body) objektu, při které je ještě můžeme rozlišit. Čím je tato vzdálenost kratší, tím je objektiv kvalitnější. Rozlišovací schopnost **R** závisí na jeho numerické apertuře a vypočítá se podle vztahu

$$R = 0,61 (\lambda / n.a.)$$

kde λ je vlnová délka monochromatického záření (žlutozelené světlo má $\lambda = 0,55 \mu\text{m}$ nebo 550 nm), **n.a.** je numerická apertura objektivu a **0,61** je optická konstanta. Rozlišovací schopnost objektivu tedy závisí nejen na numerické apertuře, ale také na vlnové délce světla.

Tak má například objektiv s $n.a. = 1,4$ při pozorování v žlutozeleném světle ($\lambda = 550$ nm) rozlišovací schopnost $R = 0,61 (0,55 / 1,4) = 0,24 \mu\text{m}$. To je nejmenší vzdálenost dvou detailů, které tento objektiv ještě rozliší.

Rozlišovací schopnost při pozorování závisí ovšem také na rozlišovací schopnosti zraku. Jak jsme uvedli na začátku, jde o složitou psychofyziologickou činnost oka a mozku, která může u každého jedince vést k jinému subjektivnímu závěru.

Zdravé lidské oko pozoruje bez problémů předměty, které leží ve vzdálenosti od 25 cm do nekonečna. Blíže ležící předměty vyžadují, aby se oko této pozorovací vzdálenosti přizpůsobilo (zaostřilo), tomu říkáme akomodace. Předmětové vzdálenosti 25 cm se říká konvenční pozorovací vzdálenost.

Abychom nemuseli měřit velikost detailů, které zdravé oko může rozlišit, byl zaveden pojem „úhlová mez rozlišení“, Je to relativní veličina, která závisí na pozorovací vzdálenosti. Úhlová mez rozlišení při konvenční pozorovací vzdálenosti 25 cm je 1 až 2 úhlové minuty. z těchto hodnot plyne, že nejmenší rozlišitelný detail, pozorovaný z konvenční vzdálenosti, má velikost 0,07 až 0,15 mm.

Má-li objektiv rozlišovací schopnost $R = 0,24 \times 10^{-6}$ m, pak při celkovém zvětšení v mikroskopu 1000x a pozorovací vzdálenosti obrazu okulárem 25 cm, bude mít nejmenší detail obrazu velikost 0,24 mm, takže jej okem dobře rozeznáme.

Dalším parametrem mikroskopických objektivů je jejich parfokální vzdálenost. Je to vzdálenost v milimetrech od plochy, kterou dosedá objektiv do revolverového nosiče k povrchu preparátu, případně krycího skla. Je-li pro všechny objektivy mikroskopu stejná, odpadne dodatečné zaostřování při změně objektivu (zvětšení) otáčením revolverovým nosičem. U objektivů NIKON řady CFI60 je parfokální vzdálenost 60mm.

Mají-li objektivы stejnou parfokální vzdálenost (parfokality), nemění se při jejich výměně otočením revolveru zaostření obrazu.

Relativní jas obrazu **B** můžeme vypočítat ze vztahu

$$B = k (n.a. / \text{celkové zvětšení})^2$$

Pro srovnání položíme konstantu $k = 1$. Např. jas dvou objektivů se stejným zvětšením 40x při použití okuláru 10x je:

1) CFI Achromat 40x, $n.a. = 0,65$, okulár 10x, $B \approx 2,6 \cdot 10^{-6}$

2) CFI Plan Achromat 40x, $n.a. = 0,95$, okulár 10x, $B \approx 5,8 \cdot 10^{-6}$

Jas se tedy zvětšil při použití CFI Plan Achromátu přibližně 2x.

Poslední veličinou, která má význam pro kvalitu obrazu, je hloubka ostré kresby. Je to hloubka prostoru v rovině předmětu, ve které obraz předmětu vidíme ještě jako ostrý. Přitom si musíme uvědomit, že pojem „ostrost obrazu“ je subjektivní. Pro

hloubku ostré kresby (značíme podle anglického názvu $\text{DOF} = \text{Depth of Field}$) uvádí příručka NIKON výraz

$$\text{DOF} = \lambda / (\text{n.a.})^2$$

Použijeme k výpočtu objektivy z předchozího příkladu, vlnovou délku $\lambda = 550 \text{ nm}$ (žlutozelená):

1) CFI Achromat 40x, $\text{DOF} = (0,55 / 0,42) 10^{-6} \text{ m} = 1,3 10^{-6} \text{ m}$

2) CFI Plan Apochromat 40x, $\text{DOF} = (0,55 / 0,90) 10^{-6} \text{ m} = 0,61 10^{-6} \text{ m}$

Z příkladu vidíme, že hloubka ostré kresby klesá s numerickou aperturou a se zvětšením objektivu.

4 Okuláry

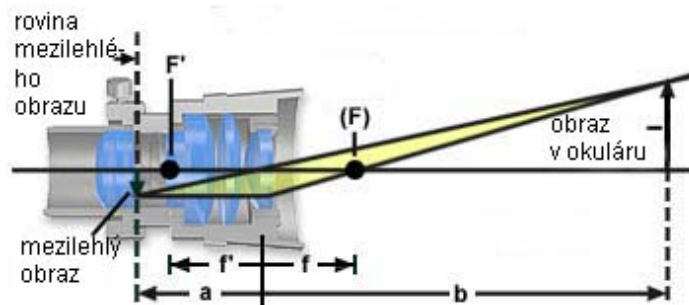


okuláry a projektivy (vzadu)

šipka ukazuje k údaji o zvětšení okulárem (15x)

Obraz v mikroskopu, vytvořený objektivem, pozorujeme další optickou soustavou, které říkáme okulár. Funkce okuláru je stejná, jako u lupy, tj. promítá do oka zvětšený obraz, který byl vytvořen objektivem v ohniskové rovině okuláru. Poněvadž paprsky, vycházející z ohniska, se v čočce (okuláru) lámou a pokračují paralelně s optickou osou, je splněna podmínka pro pozorování zvětšeného obrazu v konvenční pozorovací vzdálenosti.

chod paprsků okulárem



F' , F ohniska předmětového a obrazového prostoru

f' , f ohniskové vzdálenosti

a předmětová vzdálenost

b obrazová vzdálenost

Okuláry dělíme podle optické konstrukce, podle zvětšení a podle velikosti pozorovaného obrazového pole (které je kruhové). Okuláry mají mít schopnost odstranit (kompenzovat) zbytkové vady, které nebyly zcela potlačeny u objektivů. Hlavně jde o chromatickou vadu, zklenutí obrazu a astigmatismus. Takové okuláry se někdy nazývají kompenzační. Je nutné dbát na to, že kompenzační vlastnosti určitého typu okuláru se mohou vztahovat jen na určité objektivy.

Okuláry, určené pro snímání obrazu z mikroskopu kamerou, jsou konstruovány na dokonalé potlačení zklenutí obrazu (promítání obrazu do roviny čidla). Takovým okulárům se říká projektivy.

Běžné okuláry mají zvětšení 10x, jsou však okuláry se zvětšením 5x, 12,5x, 15x, 20x a jiné. Nikon má v současné době dva typy okulárů – okuláry CFI pro optiku CFI a okuláry CF pro starší optiku CF.

Průměr zorného pole okuláru se zmenšuje se stoupajícím zvětšením. Tato veličina, charakterizující okulár, se nazývá "číslo pole" – (anglicky "Field Number", zkratka "F.N."). v tabulkách se udává většinou bez rozměru, jde však o průměr zorného pole okuláru v milimetrech. Zorné pole okulárů má průměr mezi 18 a 25 mm.

Průměr zorného pole je závislý též na objektivu. Objektivy Nikon CFI Achromat vykreslí s okuláry 10x zorné pole o průměru 20mm, velmi kvalitní objektivy (NIKON CFI Plan Fluor, NIKON CFI Plan Achromát) vykreslí zorné pole 25mm. K zobrazení tak velkého zorného pole jsou nutné tzv. širokoúhlé okuláry (ozn. "UW").

Průměr kruhové plošky $\Phi\Delta S'$, kterou pozorujeme v předmětové rovině, vypočítáme, dělíme-li číslo pole zvětšením objektivu:

$$\Phi\Delta S' = \text{F.N.} / \text{zvětšení objektivu}$$

Pro objektiv se zvětšením 100x a okulár s F.N. = 20 dostaneme průměr plošky, pozorované na povrchu preparátu: $\Phi\Delta S = 0,2$ mm.

Dobré okuláry mají možnost nastavit dioptrickou korekci. Po nastavení korekce můžeme mikroskopem pozorovat bez brýlí, pokud náš zrak nošení brýlí vyžaduje. Dioptrická korekce upravuje pozorovací vzdálenost tak, abychom oběma očima viděli ostrý obraz. Korekci provádíme otáčením okuláru v přírubě, do které je vsazen v binokulárním tubusu. Na přírubě okuláru bývá stupnice, udávající velikost a znaménko dioptrické korekce. v každém případě je u okuláru zřejmá poloha, kdy je dioptrická korekce nulová (např. prstencem, vyrytým do okuláru).

Dioptrie (D)

je jednotka pro optickou mohutnost čočky. Měříme-li optickou mohutnost v dioptriích, je třeba měřit všechny vzdálenosti v metrech. Je-li ohnisková vzdálenost f' vyjádřena v cm, pak je optická mohutnost (v dioptriích) pro čočku ve vzduchu dána vztahem

$$D = 100 / f'$$

Dioptrická korekce na okuláru ovlivňuje zaostření mikrofotografického snímku, protože korekcí můžeme posunout rovinu ostrého obrazu mimo rovinu snímku, který nezávisle na korekci promítá projektiv. Je proto výhodné, má-li mikrofotografický systém samostatný zaostřovací dalekohled.

Do okuláru se někdy vkládá fotografická maska, ohraničující fotografované pole. Do okuláru lze také vložit na „okulárové destičce“ lineární měřítko nebo souřadnicovou síť, chceme-li pomocí mikroskopu provádět měření délek nebo velikostí detailů v pozorovaném objektu.

5 Tubus mikroskopu

Mezi objektivem a okulárem mikroskopu musí být určitá vzdálenost, aby okulár mohl pozorovat objektivem vykreslený primární obraz. Tuto vzdálenost získáme vložením tubusu, kterým procházejí paprsky od vstupu do objektivu do výstupu v okuláru.

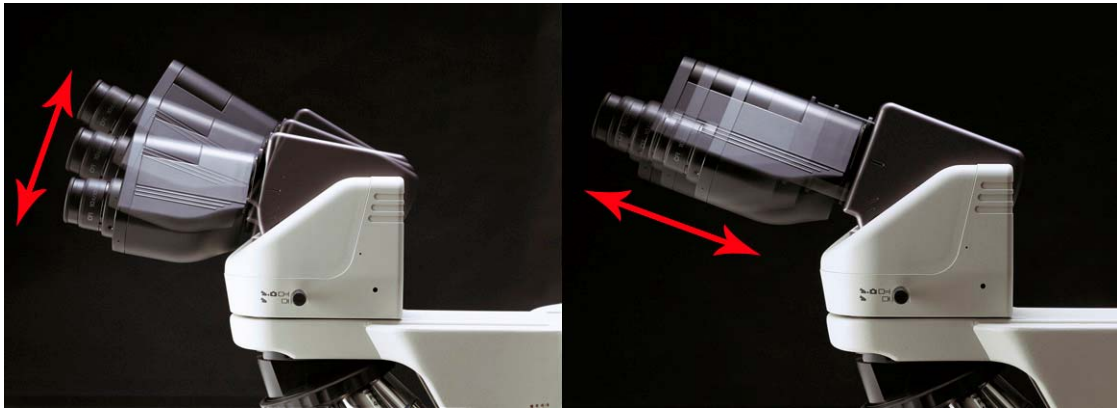
Starší typy mikroskopů byly vybaveny jen jedním okulárem, který byl nasazen na tubus mikroskopu. Novější stavebnicové mikroskopy mají část tubusu pevně spojenou se stativem mikroskopu, na ni navazuje výměnná část tubusu, do které se vkládají okuláry. Tato část je vybavena hranolem nebo zrcadlem, které dělí obraz do dvou okulárů (binokulární tubus, zkráceně binokulár), takže obraz pozorujeme současně oběma očima. Obraz však není stereoskopický, protože se díváme přes jeden, oběma okulárům společný objektiv.

Mikroskop může mít pro fotografický přístroj nebo CCD kameru další samostatný výstup. Takovým tubusům pak říkáme trinokulární tubusy. Poměr mezi množstvím světla, které je vedeno do okulárů a/nebo do třetího výstupu může být 100:0 % a naopak, u lepších trinokulárů kromě toho ještě 80:20 % nebo 50:50 %.

Binokulární i trinokulární tubusy mají vždy možnost nastavit podle tvaru hlavy uživatele vzdálenost očních pupil, měřenou od středů okulárů. To je nezbytné, mají-li se obrazy, pozorované každým okem zvlášť, spojit do jediného obrazu. Některým uživatelům to může činit počátku potíže.

Zvláštním řešením tubusu je ergonomický tubus. Je to binokulární tubus, u kterého se nosič okulárů může naklánět ve svislé rovině v rozmezí 30° , okuláry lze z nosiče vytáhnout nebo zasunout v rozmezí 40 mm. Umožňuje se tím pozorovateli přizpůsobit polohu vzhledu do mikroskopu tak, aby ho pozorování co nejméně namáhalo. Nový typ ergonomického tubusu Nikon dovoluje připojit výstup pro CCD-kameru, běžné ergonomické tubusy tuto možnost nemají.

ergonomický tubus Nikon

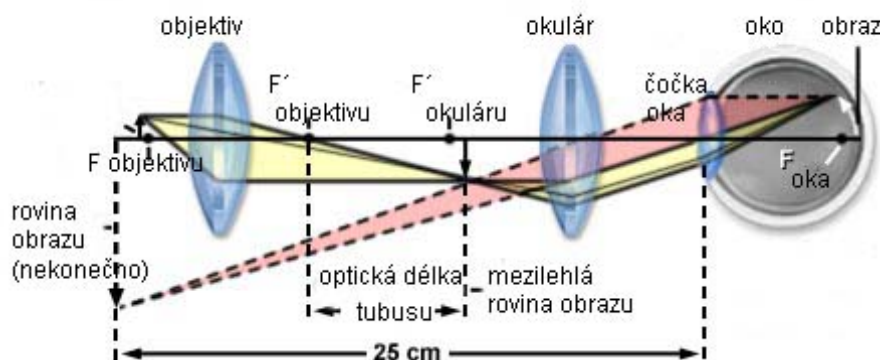


Tubus se tedy vkládá mezi objektiv a okulár, aby byly dodrženy vzdálenosti, potřebné pro vznik obrazu v mikroskopu. Základní vlastností tubusu je tzv. optická délka tubusu, je to vzdálenost od roviny zadní ohniskové vzdálenosti objektivu k přední ohniskové vzdálenosti okuláru. Tato vzdálenost je nesnadno měřitelná. Místo ní se používá příbuzná veličina, mechanická délka tubusu. Je to vzdálenost mezi horním okrajem tubusu a dosedací plochou objektivu v revolverovém nosiči. Objektivy musí být délce tubusu přizpůsobeny. Hodnota mechanické délky tubusu, pro kterou je objektiv korigován, je uvedena na tělese objektivu (např. 160, 200 – rozumí se milimetrů).

Mikroskopy byly dříve konstruovány tak, že jejich mechanická délka tubusu byla 160 mm. (Na tuto délku byly korigovány objektivy a okuláry.) Ačkoliv byly tyto mikroskopy řešeny jako systémové a byly schopny doplňovat výbavu o další optické prvky (nástavce pro epifluorescenci, diferenciální nebo Hoffmannův kontrast, pro spolupozorovatele atd.), bylo třeba s každým optickým členem vkládat do tubusu další čočky, aby se optická délka tubusu přizpůsobila prodloužení jeho mechanické délky. To přinášelo zhoršení kvality výsledného obrazu.

Zopakujme si nyní **průběh pozorování v mikroskopu**: Pozorovaný předmět musí ležet v malé vzdálenosti před ohniskovou rovinou předmětového prostoru objektivu (pracovní vzdálenost). Objektiv vytvoří reálný, převrácený a zvětšený obraz v předmětové ohniskové vzdálenosti okuláru (ležící uvnitř tubusu!). Poněvadž okulár tvoří obraz jako lupa, musíme při pozorování přiblížit oko co nejvíc oční čočce okuláru (jako při pozorování lupou). Obraz leží „v nekonečnu“, pozorujeme jej neakomodovaným okem, které je přitom nejméně namáháno.

optická soustava mikroskopu a tvorba obrazu (zjednodušeno)



25 cm je konvenční pozorovací vzdálenost, pro mikroskop je to prakticky „nekonečno“

„Nekonečná optika“ mikroskopu (Nikon CFI60)

Zlepšení nastalo zavedením tzv. „nekonečné optiky“. Jak již víme, má pojem „nekonečno“ v optice zcela konkrétní význam. Zopakujme si, že šíří-li se v optické soustavě paprsky rovnoběžně s optickou osou (paralelní chod paprsků), říkáme o nich, že přicházejí z „nekonečna“. Mluví-li se tedy o „nekonečné délce tubusu“, znamená, že v něm, nebo v některé jeho části, paprsky procházejí paralelně s optickou osou. Využitím tohoto jevu při konstrukci mikroskopu bylo dosaženo podstatného pokroku. Mikroskop, který využívá „nekonečné délky tubusu“, není postižen zhoršením kvality obrazu, jsou-li do tubusu přidávány další optické systémy (nástavec pro epifluorescenci atd., viz nahoře). Současně s tím je možné u takového mikroskopu používat objektivy s větším průměrem vstupní pupily, s delší parfokální vzdáleností a tím s vyšší numerickou aperturou.

„Nekonečnou optiku“ (Infinity Optics) zavedl Nikon u svých mikroskopů řady ECLIPSE a nazval ji **CFI60**.

V mikroskopech, které nevyužívají tento optický systém (říkáme jim „konečné optické systémy“), se paprsky po průchodu objektivem lámou do mezilehlé obrazové roviny, ležící v ohnisku okuláru. Mechanická délka tubusu je konstantní a většinou 160 mm.

V systému s „nekonečnou optikou“ vycházejí paprsky z objektivu rovnoběžně s optickou osou. Teprve po průchodu tubusovou čočkou se lámou do ohniska tubusové čočky. Termín „nekonečná optika“ pouze znamená, že z objektivu vycházející paprsky jsou rovnoběžné s optickou osou (jako by jejich zdroj ležel v nekonečnu). Nesmíme z toho usuzovat, že by tubus mikroskopu měl „nekonečnou“ mechanickou délku. Přesto se mluví o objektivěch s korekcí na „nekonečnou délku tubusu“, což může být zavádějící. Mechanickou tubusovou délku však můžeme prodlužovat vkládáním dalších optických systémů do té části tubusu, ve které jsou paprsky rovnoběžné s optickou osou. Základní mechanická délka tubusu mikroskopů NIKON Eclipse je 200 mm.

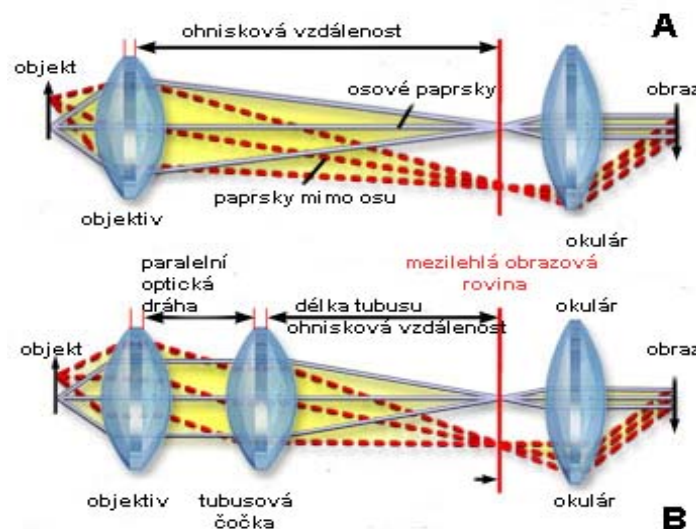
Zvětšení v objektivu M_o s „nekonečnou optikou“ dostaneme z rovnice

$$M_o = F_t / F_o$$

F_t je ohnisková vzdálenost tubusové čočky

F_o je ohnisková vzdálenost objektivu

chod paprsků v mikroskopu s „konečnou“ optikou (A) a v mikroskopu s „nekonečnou“ optikou (B)



(paralelní optická dráha mezi objektivem a tubusovou čočkou dovoluje prodloužení mechanické délky tubusu)

Má-li vzniknout obrázek detailu předmětu, ležícího mimo optickou osu, poskytuje „nekonečná optika“ další výhodu: paprsky svírají s optickou osou menší úhel, než v mikroskopu s konečnou optikou. Tím se omezí ztráty jasu obrazu, to je velmi výhodné hlavně při epifluorescenci, fázovém kontrastu a při použití diferenciatního interferenčního kontrastu (DIC).

Při ohniskové vzdálenosti tubusové čočky 200 mm je možné zvětšit parfokální vzdálenost objektivů z původních 45 mm na 60 mm. Prodloužením parfokální vzdálenosti umožnilo zavedení objektivů (např. CFI Plan Achromat 60x s olejovou imerzí) s vyšší optickou kvalitou.

Se vzrůstající parfokální vzdáleností roste pracovní vzdálenost (W.D.) objektivu. Delší pracovní vzdálenost znamená větší možnosti pro využití objektivu.

S parfokální vzdáleností 60 mm u objektivů NIKON CFI60 mohl být rovněž zvětšen průměr objektivového závitu na 25 mm. To umožnilo zvětšení průměru pupily objektivu, čímž objektiv získal větší numerickou aperturu. Jak závisí jakost objektivu na této veličině víme již z předchozích úvah. Nejvýrazněji se zvětšení průměru pupil projevuje u objektivů s malým zvětšením.

Zavedení „nekonečné optiky“ významně zdokonalilo mikroskopickou techniku. Mikroskopy Nikon ECLIPSE využily této příležitosti maximálním způsobem. Optika CF160 umožnila zlepšení mikroskopů Nikon zvětšením numerické apertury, prodloužením parfokální vzdálenosti, zvětšením průměru pupil. Zlepšila se možnost vkládat do mikroskopu další optické doplňky, zvýšil se jas a kontrast obrazu, zejména při epifluorescenčním pozorování. Prodloužení mechanické délky tubusu na 200 mm a parfokální vzdálenosti na 60 mm staví mikroskopy Nikon ECLIPSE do vedoucí pozice výrobců mikroskopů.

6 Osvětlovací soustava mikroskopu

Máme-li zcela využít optické vlastnosti mikroskopu, musíme zajistit, aby byl pozorovaný objekt dobře osvětlen. Záleží pak na tom, zda jde o pozorování průhledných nebo neprůhledných detailů, tj. o diaskopickou nebo episkopickou mikroskopovou metodu.

Biologické preparáty patří vesměs mezi ty, které pozorujeme v procházejícím světle, používáme tedy diaskopické mikroskopy. Pozorovat můžeme jak ve světlém poli, tak v tmavém poli, případně ve fázovém kontrastu. Pro všechny tyto způsoby pozorování potřebujeme zdroj světla, jehož paprsky musíme vhodně soustředit na pozorovaný preparát.

Nejprve se pro diaskopické pozorování používalo denní, případně sluneční světlo. Paprsky se koncentrovaly do roviny preparátu dutým zrcadlem, upevněným v základně stativu mikroskopu.

Brzy bylo denní světlo nahrazeno žárovkou, nejprve umístěnou v samostatném, od mikroskopu odděleném stojanu. Taková mikroskopová svítidla již byla vybavena kolektorovou čočkou.

Moderní mikroskopy mají zdroj světla vestavěný ve stativu, vláknová žárovka je většinou nahrazena halogenovou žárovkou. Jde o optickou soustavu, vybavenou zrcadlem, žárovkou, irisovou clonou a kolektorovou čočkou (případně korekčními filtry).

Dalším optickým prvkem osvětlovací soustavy diaskopického mikroskopu je kondenzor (viz dále). Úkolem kondenzoru je promítnout svítící plochu světelného zdroje do vstupní pupilu objektivu.

Dnešní mikroskopy mají osvětlovací soustavu splňující podmínky, stanovené německým fyzikem A. Köhlerem na sklonku 19. století. Tomuto optickému systému se říká běžně „Köhlerovo osvětlení“.

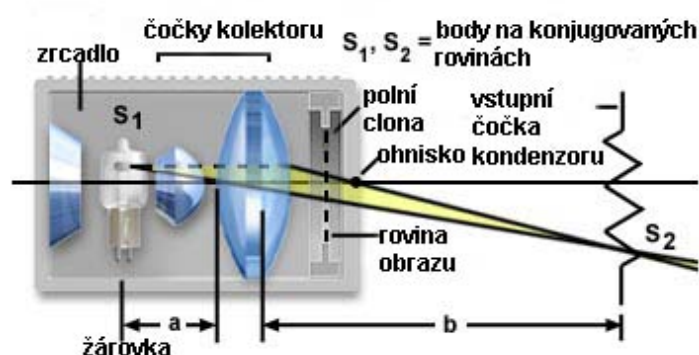


**první mikroskop
Nikon
(kolem r. 1900)**

Osvětlovací zdroj ani kondenzor se přímo nezúčastní tvorby obrazu, mají však na jeho vlastnosti (ostrot, jas, kontrast) podstatný vliv. Proto jim musíme věnovat dostatečnou pozornost, chceme-li využít všech možností mikroskopu.

Základní podmínkou pro správnou funkci osvětlovací soustavy je, že musí splňovat podmínku centrovaných systémů. Středů všech optických členů včetně zdroje světla musí ležet v optické ose mikroskopu. Pokud tato podmínka není splněna ve výrobě tím, že optické členy jsou pevně uloženy v optické ose, musíme toho dosáhnout „centrováním“. To znamená, že musíme nastavit polohu optického prvku tak, aby podmínka centrování byla splněna. To se týká jak světleného zdroje a jeho částí, tak kondenzoru.

osvětlovací systém mikroskopu s kolektorem a polní clonou



Nastavení KÖHLEROVA osvětlení

1. Umístíme preparát na stolek mikroskopu a zaostříme s objektivem 20x.
2. Uzavřeme polní clonu světelného pole
3. Kondenzor zvyšujeme nebo snižujeme tak dlouho, až vidíme obraz clony světelného pole ostře ohraničený. To nastává většinou v případě, když je kondenzor značně vysoko.
4. Clonu světelného pole pak otevřeme co nejvíc, aby se okraje jejího obrazu dotýkaly okraje zorného pole.
5. Pokud obraz clony neleží uprostřed světelného pole, posunujeme jej (centrovacími šrouby kondenzoru) do středu zorného pole tak dlouho, až se všemi svými vrcholy dotýká obvodu.
6. Vyjmeme z tubusu okulár. V otvoru vidíme osvětlenou výstupní pupilu objektivu. Uzavíráme aperturní clonu kondenzoru, aby zůstalo osvětleno ještě $\frac{2}{3}$ průměru výstupní pupily objektivu. Má-li kondenzor stupnici numerické apertury, nastavíme na ní hodnotu přibližně $\frac{3}{4}$ numerické apertury objektivu.

Výsledkem Köhlerova nastavení je rovnoměrné a maximální osvětlení průhledného preparátu, ležícího v předmětové rovině. Současně by měla být dosažena nejlepší kombinace mezi rozlišovací schopností a kontrastem. V každém případě doporučujeme ještě vyzkoušet optimální nastavení aperturní clony kondenzoru.

Pokroku v rovnoměrnosti osvětlení bylo dosaženo u posledních typů mikroskopů NIKON ECLIPSE řady „i“ s diaskopickým osvětlením. Do systému osvětlení bylo zařazeno „fly-eye“ - muší oko, které tvoří pole spojných čoček, připomínající složením oko hmyzu. Světlo prochází touto složenou soustavou čoček tak, že se obrazy světelného pole promítají mnohonásobně přes sebe a nenastává pokles intenzity osvětlení směrem k okraji obrazu.

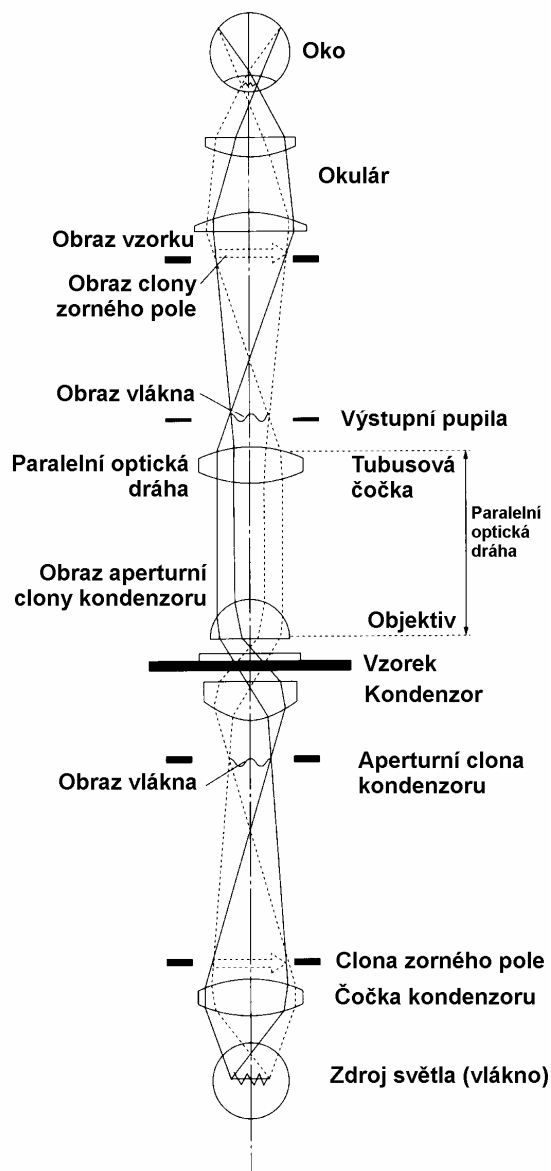


„fly-eye“

Při popisu osvětlovací soustavy se vícekrát setkáme s pojmem „pole“. Je to část některé z rovin, ležících kolmo na optickou osu, omezená co do velikosti a tvaru proměnnou nebo pevnou clonou. v této souvislosti se hovoří o „obrazovém poli“ (omezeném clonou okuláru), „světelném poli“ (omezeném aperturní clonou osvětlovací soustavy).

Konjugované (sdružené) roviny

V obrázku, znázorňujícím Köhlerovo osvětlení mikroskopu, je chod paprsků nakreslen vždy pro jeden bod světelného zdroje (vlákno žárovky), případně roviny clony světelného pole. v místech na optické ose, kde se obrazy těchto bodů promítají opět jako body, leží ostrý obraz celého otvoru polní clony osvětlovacího systému, případně obraz celého svítícího vlákna.



chod paprsků mikroskopem (konjugované roviny)

Z nákresu vidíme, že se tento ostrý obraz promítá do tří rovin, kolmých na optickou osu. Jsou to

- rovina aperturní clony kondenzoru
- zadní ohnisková rovina objektivu

- rovina těsně nad výstupní čočkou okuláru (výstupní pupilou)

Ostrý obraz polní clony světelného zdroje se rovněž promítá do různých rovin. První ostrý obraz vznikne v rovině preparátu, to je podmínka pro jeho maximální rovnoměrné osvětlení. Další obrazy této clony jsou shodné s obrazovými rovinami pozorovaného objektu a vznikají v rovině mezilehlého obrazu (tj. v předmětové ohniskové rovině okuláru), a konečně na sítnici oka.

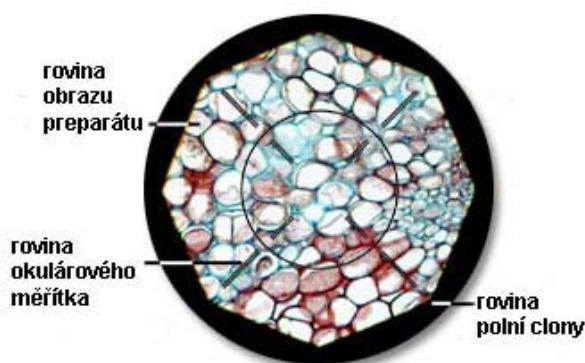
Při takovém sestavení mikroskopu najdeme tedy více rovin, ve kterých leží ostré obrazy polní clony osvětlovacího systému a současně roviny, do kterých se promítá ostrý obraz preparátu. Těmto rovinám říkáme konjugované (sdružené) roviny. Důležité pro mikroskopickou praxi je: leží-li objekt v některé z těchto konjugovaných rovin (nebo v její těsné blízkosti), pak se stane součástí obrazu, pozorovaného v okuláru mikroskopu.

Protože jednou z těchto rovin je (polní) clona okuláru, můžeme do této roviny v okuláru vkládat různé stupnice, měřítka, souřadnicové systémy atd. Zobrazí se ostře současně s vlastním mikroskopickým obrazem. Jsou to tzv. „okulárová měřítka“.

kde leží konjugované roviny obrazu v mikroskopu



sloučení konjugovaných rovin v okuláru



(na obrázku je okulárové měřítka se zaostřovací maskou, při dokonale ostrém obrazu jsou zřetelné dvojité čáry kříže, polní clonu vidíme jako osmiúhelný černý rámeček)

Konjugované roviny v mikroskopu

konjugované roviny aperturních clon a osvětlovacího systému	polní konjugované roviny konjugované roviny obrazu
výstupní pupila okuláru pevná aperturní clona okuláru (příruba)	oční rohovka nebo rovina obrazu v kameře
obrazová ohnisková rovina objektivu aperturní clona objektivu (příruba) v obrazovém prostoru	rovina mezilehlého obrazu (pevná clona – příruba – okuláru)
aperturní clona kondenzoru (předmětová ohnisková rovina kondenzoru)	rovina preparátu (předmětová rovina)
vláknó žárovky	polní clona Köhlerova osvětlení

Nečistoty, např. prachová zrna atd., ležící v konjugovaných rovinách (nebo v jejich těsné blízkosti), se rovněž zobrazí jako rušivé části obrazu. z předchozího plyne, že je musíme hledat v blízkosti polní clony osvětlovacího systému, na podložním a krycím skle preparátu nebo v blízkosti polní clony okuláru (tj. uvnitř okuláru v rovině okulárového měřítka. Otáčíme-li okulárem, nečistoty se otáčejí také a obraz preparátu je v klidu).

V terminologii mikroskopování se vyskytuje řada pojmů, jejichž přesný význam plyne teprve z dalšího textu. Příkladem je název „polní clona“. Pokud je vybavena irisovou clonou s proměnným otvorem, říká se jí často „aperturní clona“ (lat. apertus = otevřený) nebo otvorová clona. Máme tedy řadu podobných pojmů, které mohou mít různý význam:

polní clona
aperturní clona
otvorová clona
irisová clona

Musíme si vždy uvědomit, ke kterému dalšímu optickému prvku mikroskopu se tyto názvy vztahují. Nejproblematictější je pojem „světelné pole“ a k tomu se vztahující „clona světelného pole“, které se zkráceně říká „polní clona“. Je to proměnná (irisová, aperturní) clona, ovládaná mechanicky, ležící těsně před kolektorovou čočkou osvětlovací soustavy. „Polní clona“ omezuje průměr svazku paprsků, vycházejících z osvětlovací soustavy do kondenzoru. Podle názvu „polní clona“ dostal kolektor osvětlovací soustavy také název „polní čočka“.

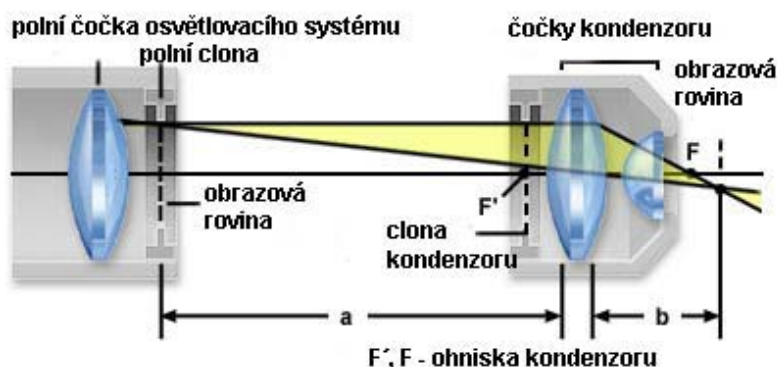
O polní cloně se mluví také v kondenzoru, případně v okuláru mikroskopu. v kondenzoru jde rovněž o irisovou aperturní clonu, ležící před vstupní čočkou kondenzoru. Zde má významnou funkci, protože ovládá velikost numerické apertury

kondenzoru (viz později). v okuláru je polní clona pevná a je tvořena objímkou, omezující chod paprsků okulárem (jeho vstupní pupilu).

7 Kondenzor

Kondenzor je důležitá část osvětlovací soustavy mikroskopu. Vlastní osvětlovací systém končí v rovině polní clony, ve které leží jeho světelné pole. Kondenzor promítá tuto plochu přes rovinu preparátu do vstupní pupily objektivu.

chod paprsků z polní clony do kondenzoru



Podle kvality a účelu se kondenzor skládá z jedné nebo z více čoček. Před vstupní čočkou kondenzoru leží irisová aperturní clona kondenzoru, spojená s ovládací páčkou a stupnicí na tělese kondenzoru.

Kondenzor je většinou výškově nastavitelný, jen u levných mikroskopů je pevnou součástí stativu. Je uložen ve stolku kondenzoru, se kterým se pohybuje nahoru nebo dolů, otáčíme-li vrubovaným kolečkem, ovládajícím jeho posun. Ve stolku je uložen tak, abychom jej mohli vyjmout a případně vyměnit. Upínací mechanismus je opatřen šrouby, kterými se kondenzor nastavuje do správné centrální polohy.

Nastavením velikosti aperturní clony kondenzoru měníme vrcholový úhel kužele paprsků, které kondenzor promítá do vstupní pupily objektivu. Jak jsme definovali dříve, je numerická apertura kondenzoru, podobně jako u objektivu, určena indexem lomu prostředí a polovinou tohoto vrcholového úhlu. Proměnná velikost numerické apertury kondenzoru je udána na stupnici, spojené s ovládáním irisové clony. Numerická apertura kondenzoru dosahuje velikosti 0,9.

Není účelné omezovat světelný tok irisovou clonou kondenzoru, je-li osvětlení příliš intenzivní. Protože se tím zmenšuje osvětlená plocha vstupní pupily objektivu (zmenšuje se vrcholový úhel), klesá jeho rozlišovací schopnost. Výhodnější je omezení světelného toku snížením výkonu žárovky nebo zařazením neutrálně šedých filtrů potřebné optické hustoty (tím zachováme teplotu chromatičnosti záření, která se jinak se změnou žhavení vlákna žárovky může měnit). Filtry klademe na výstup z osvětlovací soustavy. U výkonných mikroskopů jsou filtry vestavěné ve stativu a jejich vkládání ovládáme páčkami ze základny stativu.

Při otevírání clony kondenzoru se zvětšuje využití rozlišovací schopnosti objektivu, avšak současně se zhoršuje kontrast obrazu. Pozorujeme to hlavně tehdy, je-li

numerická apertura kondenzoru větší, než numerická apertura objektivu. Avšak také v případě, když jsou obě numerické apertury stejné, je obraz často mdlý a drobné detaily splynou. Teprve dalším zmenšováním numerické apertury kondenzoru dospějeme ke kompromisu mezi rozlišovací schopností a kontrastem.

Zkušenost vede k poznatku, že optimální obraz v mikroskopu vznikne, je-li numerická apertura kondenzoru přibližně $2/3$ n.a. objektivu.

Při pozorování velmi málo kontrastních objektů (hlavně živých organizmů) musíme clonu kondenzoru ještě víc uzavřít abychom zvýšili kontrast i za cenu ztráty rozlišení. Nedosáhneme-li žádoucího účinku, musíme použít některý z fázových kontrastů.

Rozsah zvětšení dnešních výkonných objektivů mikroskopu je od 0,5x až do 100x, jejich numerická apertura leží v rozsahu 0,025 (Nikon CFI Macro Plan Apochromat UW 0,5x) až do 1,4 (Nikon CFI Plan Apochromat 100x s olejovou imerzí). z konstrukčních důvodů není možné tento rozsah obsáhnout jedním kondenzorem. Proto je nutné, abychom k velmi kvalitním objektivům používali kondenzory odpovídající numerické apertury. Jen tak lze bez ztrát využít schopnosti kvalitních objektivů. z toho důvodu jsou kondenzory výměnné.





Aperturu kondenzoru lze zvětšit až na hodnotu 1,4, použijeme-li imerzní olej také na vyplnění vzduchové mezery mezi kondenzorem a spodní stranou sklíčka, nesoucího preparát. Pak má celá dráha paprsků od vstupní čočky kondenzoru až po vstupní čočku objektivu stejný index lomu, což vede k zvětšení vrcholového úhlu a tím k zvětšení numerické apertury. Je však nutné dobře uvážit, zda toto zvětšení prakticky využijeme, hlavně vzhledem k tomu, že n.a. kondenzoru má být menší, než n.a. objektivu. Přesto jsou v prodeji tzv. „imerzní kondenzory“, které mají hodnotu n.a. 1,4. Práce s těmito kondenzory však není snadná.

Nejčastěji se používá tzv. Abbeho kondenzor s maximální n.a. 0,9. Tento kondenzor navrhl německý optik Ernst Abbe (1840–1905). Tento kondenzor je vhodný pro objektivu se zvětšením od 4x do 100x.

Kondenzory se vyznačují obdobnými zbytkovými vadami, jaké jsem poznali u objektivů. Hlavně se nepříjemně projevuje chromatická vada, která je příčinou červeného nebo modrého okraje zorného pole, není-li výšková poloha kondenzoru nastavena zcela optimálně. Tato vada může být nepříjemnou překážkou dokonalé barevné fotografie. Většinou ji lze přesným nastavením polohy kondenzoru přijatelně potlačit.

Pro velmi kvalitní objektivy byly sestrojeny kondenzory, u kterých jsou zbytkové vady maximálně potlačeny. Jsou to např. achromatické kondenzory. Velmi dokonalý je achromaticko/aplanatický kondenzor Nikon s numerickou aperturou 1,4, je určen pro objektivu od zvětšení 10x (do 100x). Pro objektivu s velmi malým zvětšením 1x nebo 2x vyvinul Nikon dva kondenzory, které jsou opatřené výklopnou předsádkovou čočkou („swing-out condenser“), snižující numerickou aperturu kondenzoru pro objektiv 1x na 0,12, pro objektiv 2x na 0,22. Není-li předsádková čočka v optické ose, lze tento kondenzor použít pro objektivu se zvětšením až 100x. Pro náročnou práci při malém zvětšení je určen výměnný kondenzor pro objektivu 1x–4x, který má numerickou aperturu 0,13.

některé typy kondenzorů pro diaskopické osvětlení (Nikon)

		Numerická apertura	Vzdálenost od vzorku (mm)	Poznámka
	Abbeho kondenzor	0,90	1,9	Pro 4x až 100x
	Výklopný achromatický kondenzor	0,90/0,22	1,8	Pro 2x až 100x
	Achromatický kondenzor	0,80	4,2	Pro 4x až 100x
	Achromaticko/aplanatický kondenzor (AA)	1,4	1,6	Pro 10x až 100x

Zvláštním typem je kondenzor pro pozorování v tmavém poli. Je možné upravit běžný kondenzor (Abbeho typ) nasazením prstence pro tmavé pole, musíme se však smířit s významnou ztrátou intenzity osvětlení. Kondenzory, určené pouze pro tmavé pole jsou výhodnější. Bližší u popisu mikroskopování v tmavém poli.

Samostatnou konstrukční skupinou jsou univerzální otočné kondenzory, opatřené karuselem s výměnnými moduly. Tyto kondenzory se používají při práci s fázovým kontrastem, DIC a Hoffmanovým kontrastem. Obsahují většinou také modul pro tmavé pole.

Pro invertované mikroskopy se dodává celá řada kondenzorů, které se vyznačují prodlouženou pracovní vzdáleností, prostor mezi výstupní čočkou kondenzoru a preparátem se využívá pro práci s mikromanipulátory. Tyto kondenzory jsou označeny „LWD“ (Long Working Distance, dlouhá pracovní vzdálenost).

8 Vlnová optika

V předchozích kapitolách jsme vystačili s představou, že se paprsky světla šíří přímočaře a znázorňovali jsme je přímkami. S tímto zjednodušením však vystačíme jen v geometrické optice. Podstatu optických jevů můžeme vysvětlit teprve tehdy, když se obrátíme k fyzikální podstatě světla, o kterém již víme, že je viditelnou částí elektromagnetického vlnění. Touto vlastností světla se zabývá vlnová optika.

Světlená vlna vzniká ve zdroji, který vyvolává toto vlnění a dodává mu energii. Ve vakuu se šíří elektromagnetické (světlené) vlnění z místa zdroje všemi směry konstantní maximální rychlostí $c = 2,9979 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$, v jiných prostředích závisí tato

rychlost na jeho vlastnostech a je vždy menší. Jen v suchém vzduchu je tato rychlost přibližně stejná, jako ve vakuu.

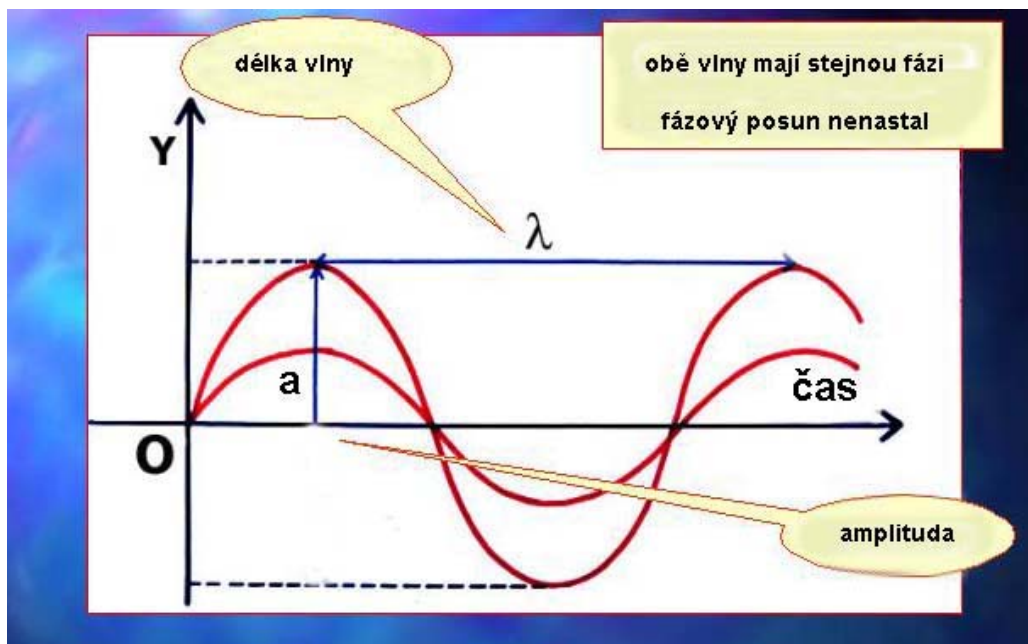
Srovnávací veličinou pro vlastnosti prostředí je jeho index lomu n , který jsme poznali již dříve.

Chování světla nelze zcela vysvětlit ani vlnovou optikou. Někdy světlo musíme považovat za proud částic – fotonů –, nesoucích nepatrná množství – kvanta – světelné energie. Částicovými vlastnostmi světla se zabývá kvantová optika. Dosud se fyzikům nepodařilo sjednotit oba pohledy na podstatu světla, vlnová i kvantová teorie světla existují vedle sebe.

Abychom pochopili některé metody mikroskopie, musíme se zjednodušeně zmínit o vlnových vlastnostech světla.

Fyzikální popis vlnění vychází z mechanického modelu (rovnoměrný pohyb kruhový). Světelná vlna se ve stejnorodém (izotropním) prostředí šíří z bodového zdroje periodicky všemi směry stejnou rychlostí v kulových vlnoplochách. Vybereme-li si jeden směr, šíří se světelná vlna přímočaře (světelný paprsek) a má pak tvar periodické funkce – sinusoidy. Jednoduchá rovnice popisuje sinusovou funkci s periodou kmitu T

$$y = a \sin \left[\left(\frac{2\pi}{T} \right) \tau + y_0 \right]$$



dvě sinusové vlny ve stejné fázi

Z rovnice a z obrázku můžeme definovat důležité vlastnosti vlnění:

y je okamžitá vzdálenost vlny od osy x , jestliže začalo vlnění v čase $\tau = 0$

fázový posun y_0 znamená, že v čase $\tau = 0$ měla už vlna od osy x vzdálenost y_0

amplituda a je největší vzdálenost vlny od osy x

perioda (doba kmitu) T , za tuto dobu urazí vlna vzdálenost λ (jeden kmit)

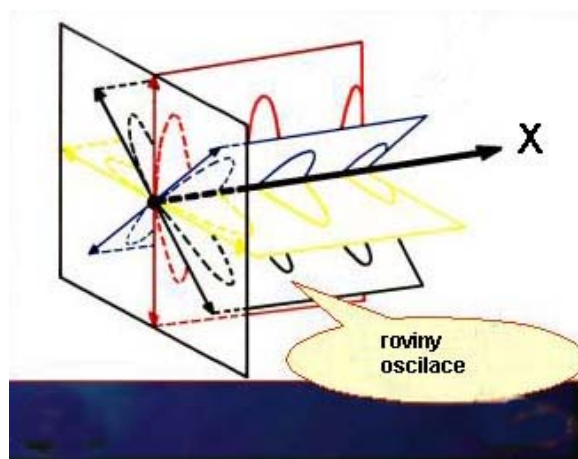
frekvence (kmitočet) f je převrácená doba periody, $f = 1/T$

čas τ (nezávisle proměnná v rovnici pro y , v obrázku se čas měří podél osy x)

vlnová délka λ je vzdálenost dvou nejbližších bodů, které mají stejnou vzdálenost od osy x (včetně znaménka)

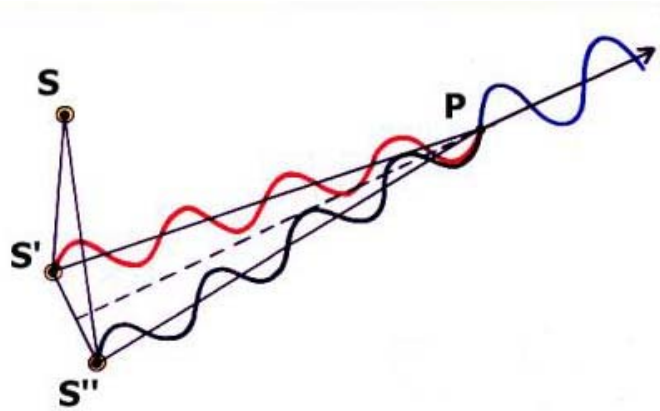
Oko jako receptor rozlišuje změny jedné nebo více vlastností světla, které jsou pak základem pro zrakové vjemy. Změny mohou nastat buď průchodem světla opticky průhledným prostředím nebo odrazem od neprůhledného prostředí.

Světelná vlna kmitá ve vzduchu ve všech rovinách, kolmých na směr paprsku. Průchodem některými látkami (kterým říkáme opticky aktivní látky) nebo odrazem od lesklých povrchů se některé roviny kmitání potlačí a světlo po průchodu takovou látkou (nebo po odrazu z lesklého povrchu) kmitá jen v jedné rovině. Tomuto jevu říkáme polarizace světla. Polarizací světla se budeme dále zabývat v kapitole o polarizační mikroskopii.



šíření vln v rovinách kolmých na osu X

Setkají-li se v jednom bodě dvě nebo více vln, nastane mezi nimi „spolupráce“ a budou se skládat do nového výsledného vlnění – tomu se říká interference vlnění. Interference může způsobit nejrůznější změny takto vzniklého vlnění: může být zesíleno, zeslabeno (až úplně zrušeno). Nejsou-li vlny ve stejné fázi, vzniknou interferenční maxima a interferenční minima.



**dvě vlny (S' a S'') se stejnou fází a se stejnou amplitudou
při setkání v bodě P
vytvoří interferenci novou vlnu s dvojnásobnou
amplitudou**

Průchodem světla opticky aktivní látkou nebo odrazem od lesklého povrchu nastávají změny amplitudy, změny frekvence a případně změny fáze. Vznikne-li změna tvaru (změna amplitudy) vlnění nebo se změní jeho kmitočet, jde o tzv. modulaci vlnění. Rozeznáváme amplitudovou a/nebo frekvenční modulaci. Může také nastat pouze posun fáze světelné vlny, tuto změnu však lidský zrak nevnímá. Fázový posun je v mikroskopii důležitý, protože řada biologických objektů se touto vlastností vyznačuje a jejich zviditelnění je pro mikroskopii významný úkol.

9 Rozlišovací schopnost

Všechny stručně zmíněné jevy mohou mít v mikroskopii záporný vliv na výslednou jakost obrazu, naopak jsou však také využívány v některých vyspělých metodách. Nejprve se budeme zabývat těmi vlivy interference, které zhoršují mikroskopický obraz.

Jak jsme již dříve poznali, rozhodujícím hlediskem pro jakost obrazu v mikroskopu je numerická apertura objektivu a s ní související rozlišovací schopnost. Interferenční jevy mají na obě hlediska zásadní vliv. Pochopitelně se tyto vlivy skládají s aberacemi, které jsme poznali v geometrické optice.

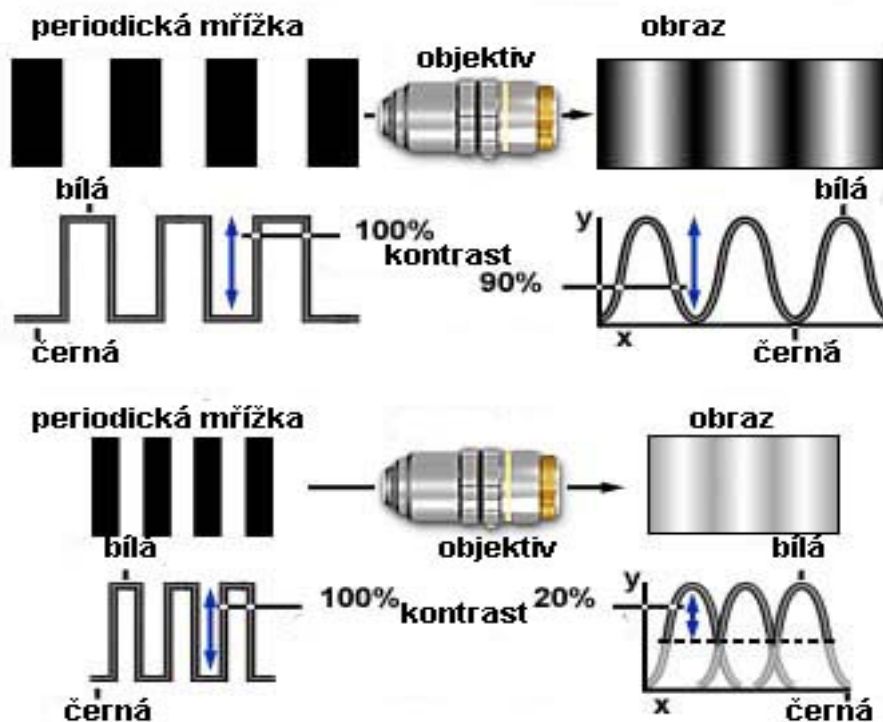
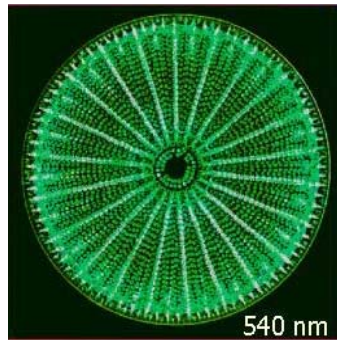
Dopadem světla na hranu nebo průchodem světla malým otvorem nastává interference světelného vlnění a v důsledku toho ohyb (změna směru) světelných paprsků. Tento jev snižuje rozlišovací schopnost objektivu dvěma způsoby: zhoršuje kontrast a hranovou ostrost detailů obrazu. Od určitého maximálního zvětšení již nemůžeme detaily obrazu od sebe rozlišit.

Komplexní hodnocení optického obrazu z hlediska přenosu informací o detailech objektu přináší funkce přenosu modulace (angl. Modulation Transfer Funktion, MTF). Nejnázornějším příkladem průběhu MTF je hodnocení obrazu jednoduchého geometrického útvaru, mřížky. Při průchodu vstupního signálu objektivem nastane jeho modulace, pravoúhlý tvar se změní na sinusový s menší amplitudou. To má za

následek zhoršení hranové ostrosti a kontrastu. Se vzrůstající prostorovou frekvencí se tyto jevy stupňují.

Kvantitativní průběh funkce MTF lze provádět jen na složitých zařízeních. Pro praktické ověření kvality objektivu slouží pozorování vhodných objektů – na příklad rozsivky (diatomena).

Na obrázku je rozsivka pozorovaná v monochromatickém světle vlnové délky 540 nm pravidelná struktura je vhodná pro posouzení rozlišovací schopnosti objektivu



prostorová frekvence (perioda) mřížky a modulace po průchodu objektivem

Mřížka je tvořena vedle sebe ležícími černými čarami na bílém pozadí s mezerami stejné tloušťky. Prostorová frekvence mřížky je počet čar na jednotku délky (obvykle 1 mm). Při prostorové frekvenci černých a bílých čar stejné tloušťky 1 mikrometr ($1\mu\text{m} = 1 \times 10^{-6}\text{m}$) se dvojice na délku 1 mm opakují pravidelně 1000x, prostorová

frekvence je v tomto příkladu 1000 čar na milimetr. Převrácená hodnota prostorové frekvence je prostorová perioda.

V našem obrázku má vstupní signál podle tvaru mřížky pravoúhlou modulaci, odpovídající zcela neprůhledným čarám a zcela průhledným mezerám s relativním kontrastem 100 %. Při průchodu objektivem je modulace ovlivněna vlnovými vlastnostmi světla (a pochopitelně také zbytkovými vadami objektivu), takže se tvar obdélníkové modulace změní na sinusovou za současného poklesu amplitudy a kontrastu. Tím se také zmenší schopnost rozlišit detaily obrazu.

Velmi kvalitní objektiv s numerickou aperturou 1,40 s vhodně nastaveným kondenzorem a za použití imerzního oleje poskytne obraz vzorku s prostorovou periodou $1\ \mu\text{m}$ s dobrým rozlišením. Obraz však není dokonalou reprodukcí dvojic čar, má snížený kontrast mezi černými a bílými čarami a jejich hrany nejsou zcela ostré. Snížíme-li prostorovou periodu na $0,5\ \mu\text{m}$ (prostorová frekvence vzroste na 2000 čar na 1 mm), kontrast a rozlišení se ještě více zmenší. Naopak vzestup prostorové periody na 2 mikrometry (frekvence klesne na 500 čar na 1 mm) způsobí jejich zvýšení.

Meze reprodukční (rozlišovací) schopnosti světelného mikroskopu při použití monochromatického světla $\lambda = 500\ \text{nm}$ a numerické apertuře objektivu 1,40 leží přibližně u prostorové frekvence 5000 čar na 1 mm (prostorová perioda je $0,2\ \mu\text{m}$). v tomto případě je kontrast už téměř nezatelný a obraz se zdá být neutrálně šedý.

U skutečných vzorků závisí kontrast také na velikosti detailů, na jejich jasu a chromatičnosti. Lidský zrak ztrácí schopnost rozlišovat periodicitu mřížky v důsledku nízké úrovně kontrastu při prostorové periodě kolem $0,25\ \mu\text{m}$ (méně než 5000 čar na 1 mm).

Souvislost mezi numerickou aperturou a rozlišovací schopností některých typů objektivů Nikon ukazuje následující tabulka:

zvětšení, numerická apertura a rozlišení některých objektivů Nikon

zvětšení	typ objektivu					
	Plan Achromat		Plan Fluor		Plan Apochromat	
	n.a.	rozlišení μm	n.a.	rozlišení μm	n.a.	rozlišení μm
4x	0,10	2,75	0,13	2,12	0,20	1,375
10x	0,25	1,10	0,30	0,92	0,45	0,61
20x	0,40	0,69	0,50	0,55	0,75	0,37
40x	0,65	0,42	0,75	0,37	0,95	0,29
60x	0,75	0,37	0,85	0,32	0,95	0,29
100x	1,25	0,22	1,30	0,21	1,40	0,20

O rozlišovací schopnosti určitého typu objektivu rozhoduje jeho numerická apertura a vlnová délka použitého světla. Vlnová délka λ má podstatný vliv na rozlišení detailů, čím je kratší, tím je rozlišovací schopnost lepší. Celková rozlišovací schopnost při diaskopickém zobrazování mikroskopem však závisí také na numerické apertuře kondenzoru, který je důležitou částí nejen osvětlovacího

systemu, ale celé zobrazovací soustavy mikroskopu. Chceme-li tedy získat co nejlepší obraz, musíme dbát na optimální nastavení všech jeho optických a mechanických dílů.

Kondenzor musí být nastaven tak, aby co nejlépe koncentroval světelný tok do roviny preparátu a do vstupní pupily objektivu. Toho dosáhneme jednak vhodným výškovým nastavením kondenzorového stolku, jednak vhodným nastavením jeho numerické apertury, kterou ovládáme aperturní clonou kondenzoru.

Vyjádříme-li rozlišovací schopnost optické soustavy mikroskopu prostorovou periodou mřížky r , pak platí pro soustavu objektiv s $n.a.$ _{obj.} a kondenzor s $n.a.$ _{kond.} empirická rovnice

$$\text{rozlišení } (r) = 1,22 \lambda / (n.a. \text{ obj.} + n.a. \text{ kond.})$$

Z této rovnice znovu vidíme, že rozlišení není určeno zvětšením, ale numerickou aperturou a vlnovou délkou použitého světla. Je ovšem zřejmé, že mezi zvětšením a numerickou aperturou objektivu je přímá úměrnost, závislá na jeho konstrukci (typu).

Bylo by možné zvýšit rozlišovací schopnost použitím světla z krátkovlnné části spektra. Proti této tendenci však působí klesající citlivost oka, které je nejcitlivější na žlutozelené světlo o vlnové délce 550 nm. Nicméně vidíme ještě záření až do vlnové délky přibližně 360 nm (modrofialová chromatičnost) – této okolnosti lze za jistých okolností využít (fluorescence v blízké UV-oblasti). Tabulka nabízí srovnání vlnové délky světla, relativní citlivosti oka a rozlišení v mikrometrech (Plan Achromat 40x, $n.a.$ 1,40):

vlnová délka, relativní citlivost oka a rozlišení objektivů

vlnová délka v nm	relativní citlivost oka v %	rozlišení v μm
360	(0,004)	0,19
400	0,4	0,21
450	3,8	0,24
500	32,3	0,26
550	99,5	0,29
600	63,1	0,29
650	10,7	0,34
700	0,41	0,37
750	(0,012)	--

Neostrost způsobená interferencí a ohybem (difrakcí) světla

Dosud jsme si všímali neostrosti obrazu, kterou způsobují vlastnosti optických členů mikroskopu: objektivu, okulárů a způsobu osvětlení. Jsou však ještě důvody, které způsobují další neostrosti obrazu. Tyto důvody spočívají ve vlnových vlastnostech světla a vznikají při průchodu světla preparátem.

Již dříve jsme definovali rozlišovací schopnost (rozlišení) jako nejmenší vzdálenost dvou detailů na pozorovaném objektu, které ještě můžeme pozorovat odděleně. Nejvhodnější objekt pro tyto úvahy je periodická lineární mřížka (obr. na str. 32). Mají-li jednotlivé mřížky šířku **a** s mezerami o šířce **b**, je mřížková konstanta **c**

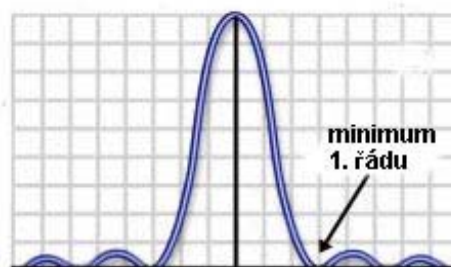
$$c = a + b$$

Mřížka může být založena na průchodu nebo na odrazu paprsků, vlastnosti obou možností jsou velmi podobné. Objekty, které mikroskopem pozorujeme, se zjednodušeně chovají jako mřížky nebo jako drobné otvory. Při zkoumání hranice rozlišovacích schopnosti nahrazujeme těmito jednoduchými tvary reálné detaily objektu s různým kontrastem.

Paprsky dopadají na mřížku rovnoběžně a jejich směr je kolmý na rovinu mřížky. Je-li mřížková konstanta (nebo malý otvor) dostatečně malá (úzká), nastane při průchodu paprsku štěrbinou (otvorem) interference světelných vln a částečně následný ohyb jejich směru. Maximální světelný tok sice prochází těmito překážkami hlavně v původním směru, ale v důsledku vlnových vlastností světla je v tomto směru částečně oslaben. V rovině kolmé na směr paprsku se světlo rozloží na střídaná maxima a minima, přitom intenzita maxim rychle klesá se vzrůstající vzdáleností od původního paprsku. Příklad ukazuje tabulka:

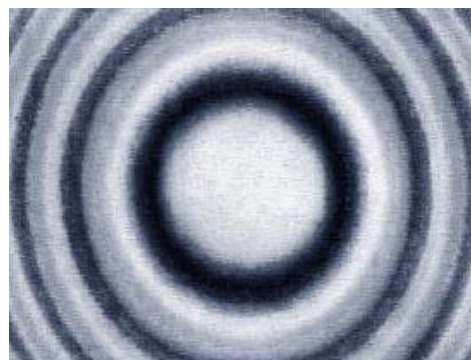
relativní světelný tok (původní světelný tok má intenzitu 100%)		
střed (původní paprsek)	83,8 %	maximum nultého řádu
1. minimum	0 %	minimum prvního řádu
1. maximum	7,2 %	maximum prvního řádu
2. minimum	0 %	minimum druhého řádu
2. maximum	2,8 %	maximum druhého řádu
(vyšší řády jsou bezvýznamně malé)		

Obrázek ukazuje **relativní rozložení** světelného toku po průchodu malým kulatým otvorem.



Výsledkem je, že po průchodu světelného paprsku mřížkou (nebo malým otvorem) pozorujeme tzv. ohybový obraz ve tvaru proužků nebo soustředných kruhů, který vznikne ohybem světla následkem interference.

Ohybový obraz po průchodu světla malým kulatým otvorem (střed je maximum nultého řádu, následuje minimum prvního řádu, maximum prvního řádu, minimum druhého řádu, maximum druhého řádu atd.) Maximum nultého řádu se nazývá Airyho disk.



Takto vzniklá neostrost nevznikla působením zbytkových vad optiky mikroskopu, je způsobena vlnovými vlastnostmi světla. Oba jevy se skládají, výsledná neostrost je součtem zbytkových vad a neostrotí, způsobených interferencí a ohybem.

Maximu prvního řádu přísluší úhel β_1 , který svírají příslušné paprsky po průchodu štěrbinou s původním směrem paprsku. Aby se rozptylový kroužek zobrazil, musí být tento úhel menší, než polovina otvorového úhlu objektivu, který jsme definovali v kapitole o numerické apertuře. Mřížku (otvor) tedy pozorujeme tehdy, dopadnou-li do objektivu paprsky, které se průchodem odchýlily o úhel, menší než α . Tato podmínka nám znovu zdůrazňuje, proč je pro kvalitu objektivu důležitá velikost jeho otvorového úhlu $A = 2\alpha$. Je tedy zřejmé, že jednotlivé členy mřížky můžeme rozlišit teprve tehdy, je-li úhel α nejméně stejně velký jako β_1 .

Má-li prostředí mezi preparátem a objektivem index lomu n , má v něm světlo vlnovou délku $\lambda = \lambda_0/n$ (kde λ_0 je vlnová délka světla ve vakuu). Dostaneme tak vztah (který odvodil Ernst Abbe) pro rozlišovací mez d , která určuje nejmenší rozlišitelnou vzdálenost dvou detailů v obrazu

$$d = \lambda_0 / n \sin \alpha$$

Jmenovatel zlomku $n \sin \alpha$ je numerická apertura **n.a.** Tento výraz však platí jen pro kolmé osvětlení, při pozorování se šikmým osvětlením a všeobecně při pozorování svítících bodových (nikoli lineárních) objektů lze rozlišit vzdálenost zhruba poloviční

$$d \sim \lambda_0 / 2n \sin \alpha$$

Tím jsme potvrdili, že zvětšení světelného mikroskopu je omezeno vlnovou délkou použitého světla. **Rozlišovací mez musí být nejméně stejně velká, jako poloviční vlnová délka světla, při kterém v mikroskopu pozorujeme.**

Shrnutí:

Rozlišovací schopnost optické soustavy mikroskopu je nejdůležitější kritérium pro jeho dokonalost, určuje jeho schopnost rozlišovat mezi dvěma detaily pozorovaného vzorku. Primárně závisí rozlišovací schopnost na numerické apertuře, ale také na vlastnostech vzorku, vlastnostech světla a dokonalosti osvětlení, stupni potlačení zbytkových vad (aberací) a na dalších faktorech, jako je např. zvolená metodika pozorování. Konečný výsledek určuje užitečné zvětšení mikroskopu, které závisí také na schopnosti zraku rozlišovat zobrazené detaily.

10 Kontrastovací metody v mikroskopii

Náš zrak vnímá elektromagnetické vlny v intervalu vlnových délek, který vymezuje spektrum viditelného světla. Světlo nám přináší informace o okolí, zrak je jedním ze smyslů, které podmiňují život nejen lidským organismům. z fyzikálního pohledu je světlo příčné vlnění, světelná vlna kmitá kolmo na směr, kterým se šíří. Základními vlastnostmi světla jsou rychlost šíření, vlnová délka (frekvence), amplituda vlnění. Vlastnosti světla se mění při průchodu prostředím nebo při odrazu od neprůhledných látek. Právě tyto změny jsou základem našeho vidění. Konečný vjem, který registrujeme v mozku, je do značné míry subjektivní, závisí na našich zrakových schopnostech a zkušenostech. Optika, která se zabývá fyzikálními podmínkami vzniku obrazu, je založena na objektivních zákonitostech přírody. Zrakový vjem v naší mysli je výsledek psychofyzilogického procesu, jehož zákonitostmi se zabývají neurofysiologové.

Změnám vlnových vlastností světla říkáme modulace. Lidský zrak vnímá přímo jenom některé změny vlnových vlastností světla, vzniklé jeho modulací. Amplitudová modulace je příčinou změny jasu (intenzity), případně změny optické hustoty, změny chromatičnosti způsobuje modulace frekvenční. Jiné způsoby modulace (polarizaci světla, fázový posun světelných vln) lidský zrak nevnímá. Avšak tyto modulace také přenášejí informace o kvalitativních a kvantitativních vlastnostech objektu, který je (při průchodu nebo odrazu) způsobil. Je tedy žádoucí, abychom mikroskop doplnili tak, aby pozorovaný obraz obsahoval také informace, které bychom zrakem přímo neviděli.

Přehled metod pro pozorování mikroskopem v procházejícím světle

způsob pozorování	charakteristika	některé příklady
základní pozorovací způsob		
světlé pole	amplitudová, případně frekvenční modulace světla	barvené tkáně přirozeně barvené objekty vlákna, chlupy, vlasy hmyz, mořské řasy
způsoby pozorování se zvýšením kontrastu		
tmavé pole (zástin)	objekty, rozptylující světlo	rozsivky, vlákna, chlupy, vlasy živé organismy ve vodě, radiolarie (mřížovky)
šikmé osvětlení ¹⁾	průhledné objekty s fázovou modulací, fázové objekty	bakterie, spermie, buňky, prvoci vlákna chemické sloučeniny minerální krystaly testování objektivů
Rheinbergovo osvětlení ¹⁾	objekty rozptylující světlo	rozsivky, vlákna, chlupy, vlasy živé organismy ve vodě, radiolarie (mřížovky)
fázový kontrast	průhledné objekty s fázovou modulací objekty rozptylující světlo anizotropní objekty	bakterie, spermie, buňky, prvoci vlákna rozsivky, vlákna, chlupy, vlasy živé organismy ve vodě, radiolarie (mřížovky) koloidní suspenze, prášky, roztoky minerálních látek
Hoffmanův kontrast	průhledné fázové objekty	bakterie, spermie, buňky, prvoci vlákna

diferenciální interferenční kontrast (Nomarski, DIC)	průhledné fázové objekty rozptylující světlo	bakterie, spermie, buňky, prvoci vlákna rozsivky, vlákna, chlupy, vlasy živé organizmy ve vodě, radiolarie (mřížovky) koloidní suspenze, prášky, roztoky minerálních látek
využití polarizovaného světla	polarizující a dvojlomné objekty anizotropní objekty	tenké řezy minerálů tekuté krystaly, rozpuštěné a rekrystalizované chemikálie chlupy a vlasy
fluorescenční osvětlení v procházejícím světle¹⁾	vlastní nebo vzbuzená fluorescence	buňky, tkáňové kultury a řezy, vybarvené fluorochrómy objekty s vlastní fluorescencí

1): méně běžné metody:

Šikmé osvětlení

Osa osvětlení svírá šikmý úhel s optickou osou mikroskopu, v pozorovaném objektu vznikne asymetrické odstínění.

Vhodné pro stanovení indexu lomu chemických sloučenin a minerálních krystalů imerzní metodou a pro testování vnějších zón objektivů.

Rheinbergovo osvětlení

Osvětlení má zvýšit kontrast a je založeno na optickém barvení. Centrálně uložený terčík a odlišně zbarvené mezikruží se připevní do čelní ohniskové roviny kondenzoru. Pozadí obrazu získá barvu terčíku a světlo, rozptýlené strukturou objektu, získá barvu mezikruží.

Fluorescence v procházejícím světle – v současné době se používá výjimečně.

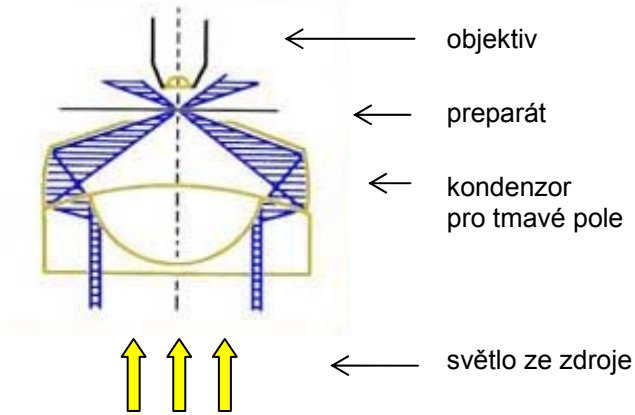
Pozorování v tmavém poli (v zástinu)

Úprava mikroskopu pro pozorování v tmavém poli není příliš náročná. Používáme stejné objektivy, jako pro světlé pole a úprava spočívá jen v přizpůsobení funkce kondenzoru. Zatímco při pozorování ve světlém poli se snažíme soustředit všechno světlo kondenzorem do roviny preparátu tak, aby na ni dopadalo kolmo, při pozorování v tmavém poli musíme upravit kondenzor, aby z obrazu bylo vyloučeno světlo, dopadající přímo do objektivu.

Při pozorování v tmavém poli je z obrazu vyloučeno světlo, které by dopadalo přímo do objektivu. Prázdné zorné pole je při tomto postupu tmavé. Teprve to světlo, které se rozptýlí při dopadu na preparát, prochází částečně objektivem a vytváří obraz objektu, složený ze zářících bodů. Pro suché objektivy s numerickou aperturou do 0,65 není třeba zvláštních kondenzorů pro tmavé pole, stačí zastínit výstupní čočku kondenzoru clonou pro tmavé pole, která je ve volitelné výbavě mikroskopu. Pro pozorování v tmavém poli při velkém zvětšení lze mikroskop doplnit speciálním kondenzorem pro tmavé pole, který se dodává jako volitelné příslušenství. Kromě „suchých“ kondenzorů pro tmavé pole jsou k dispozici také kondenzory pro tmavé pole s olejovou imerzí. Zvláštním druhem jsou kondenzory pro pozorování v tmavém poli při osvětlení dopadajícím světlem, které jsou založeny na odrazu světla od zrcadlové plochy v kondenzoru.

Protože se při tomto pozorování využívá jen zlomku světlené intenzity zdroje, má mít tento zdroj dostatečný výkon. Z hlediska světelné optiky je důležité, že při pozorování v tmavém poli září na tmavém podkladě ty části objektu, na kterých dochází u světelných vln při průchodu pozorovaným objektem k dostatečné modulaci, jako např. na hranách. Při tvorbě obrazu v tmavém poli nemají význam rozdíly v indexu lomu, které jsou podstatné při pozorování ve fázovém kontrastu.

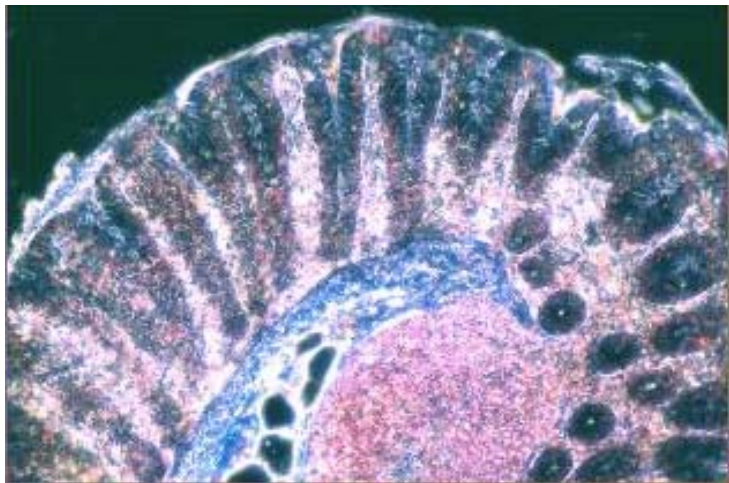
Obrázek ukazuje chod paprsků kondenzorem v úpravě pro pozorování v tmavém poli při osvětlení procházejícím světlem



Není-li v zorném poli objektivu vhodný objekt, je tmavé. Jen světlo, které se v preparátu rozptýlí, dopadne částečně do objektivu a vytvoří obraz objektu, složený ze zářících bodů. Protože je při tomto pozorování využito jen zlomku světlené intenzity zdroje, musí mít osvětlení dostatečný výkon.

Snímek zorného pole při **pozorování v tmavém poli**.

Můžeme pozorovat jen jas okrajů objektu, jeho vnitřní struktura je zobrazena deformovaně. Informace o maximálním lomu (difrakci) je také ovlivněna tloušťkou sklíčka a nosného média. Celkový nebo dílčí odraz paprsků prvního, druhého a třetího řádu pravděpodobně omezí nebo zamezí vzniku sekundárních obrazů.



Fázový kontrast

Mikroskopování ve světlém poli – které patří k základním postupům v biologii a příbuzných oborech – se používá k pozorování objektů, způsobujících amplitudovou modulaci procházejícího světla. Amplitudová modulace způsobuje změny, které náš zrak registruje jako různé hodnoty jasů nebo optické hustoty. Prochází-li však světlo průhledným preparátem, který se od okolního prostředí liší jen tím, že má vyšší index lomu, pak je modulováno fázově a tuto změnu náš zrak neregistruje. Tyto vlastnosti má však řada živých biologických objektů a je proto velmi žádoucí upravit mikroskop tak, aby tyto fázové objekty byly v mikroskopu viditelné.

Mikroskopie, zaměřená na zviditelnění fázových objektů, je náročná na technickou výbavu mikroskopu a její teoretický výklad je obtížný. Ani při stručném výkladu, o který se pokusíme, se neobejdeme bez fyzikálních zákonů z oboru vlnové optiky. Některé z těchto zákonů jsme poznali dříve, přesto si je zde zopakujeme a doplníme.

Vlnový model světla předpokládá, že se šíří ze zdroje (pro jednoduchost bodového) v soustředných kulových plochách rychlostí, která závisí na indexu lomu prostředí. To, čemu říkáme „světelná vlna“, je elektromagnetické vlnění. Světelná vlna má tvar sinusové funkce, odpovídá rovnici, která popisuje okamžitou výchylku bodu, konajícího kruhový pohyb úhlovou rychlostí ω na kružnici o poloměru A

$$y = A (\sin \omega t + \varphi_0)$$

V této rovnici je:

y	okamžitá výchylka, vzdálenost bodu na sinusoidě od osy x v čase t
A	amplituda, největší možná vzdálenost od osy x
$\omega t + \varphi_0$	fáze, určující úhel φ , o který se otočil průvodič bodu za čas t
ω	úhlová rychlost otáčení průvodiče ($\omega = d\varphi/dt$)
t	čas (nezávisle proměnná veličina), měříme jej ve směru osy x

Charakteristickou vlastností světlené vlny je její vlnová délka (označuje se řeckým písmenem λ lambda a měří se v nanometrech, $1 \text{ nm} = 1 \times 10^{-9} \text{ m}$), je to vzdálenost dvou bodů se stejnou fází. z vlnové délky vyplývá frekvence (označuje se ν nebo f), je to počet kmitů za 1 sekundu (v rovnici nahoře je to doba pro jeden oběh, tedy pro úhel $\varphi = 360^\circ$ nebo 2π radiánů). Převrácenou hodnotou frekvence je perioda T . Další charakteristickou vlastností světelné vlny je její amplituda. Světelná vlna může být polarizovaná.

Důležitou veličinou je fáze. Dvě jinak stejné světelné vlny mají stejnou fázi, je-li úhel φ roven násobku 2π (v radiánech, odpovídá 360°). Pokud tato shoda nenastává, jeví se mezi nimi fázový posun, který můžeme vyjádřit úhlem φ_0

Promítneme-li pro zjednodušení kulové plochy světelných vln do roviny, pak se z každého bodu objektu, na který vlny při svém postupu v určitém okamžiku narazí, šíří další kružnice, na jejichž obvodu je čelo světelné vlny (Hyughensův princip). Tečna k těmto kružnicím se nazývá vlnoplocha, do naší roviny se promítne jako přímka (nebo kružnice) – čelo vlny. Kolmice na tuto přímku (normála ke kružnici) je směr světelného „paprsku“, který jsme používali v geometrické optice.

Při průchodu světla objektem (nebo při odrazu světla od objektu) nastane tedy modulace světlených vln. Modulace světla přináší našemu zraku informace o objektu, který ji způsobil. Také již víme, že náš zrak nevnímá všechny druhy modulace světla. Vidíme jen ty změny, které způsobuje amplitudová modulace. Informace o objektu, který způsobuje změny fáze (fázová modulace) a/nebo polarizaci světla náš zrak nevnímá.

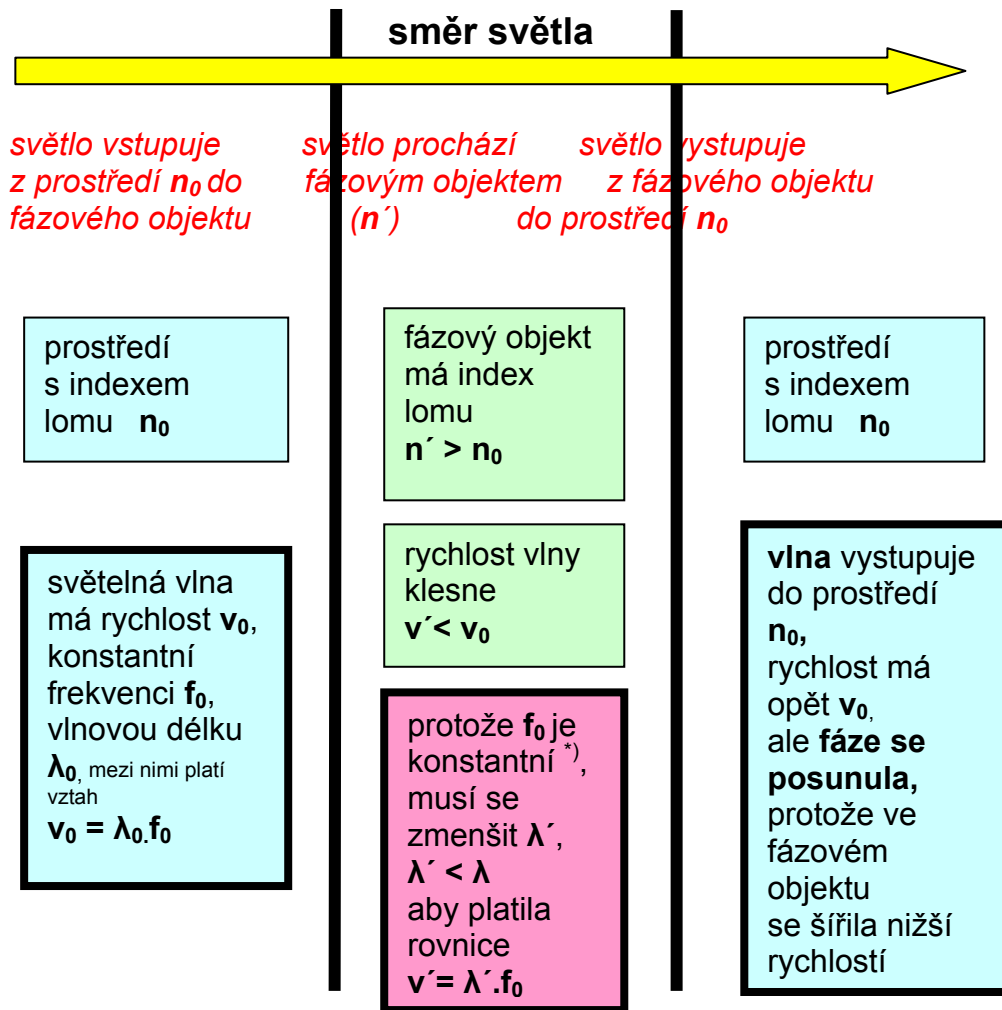
Zopakujme si, co vidíme při průchodu světla amplitudovým preparátem. Nejprve je nutné si uvědomit, že mikroskopické preparáty jsou převážně složeny z objektů malých (mikroskopických) rozměrů, na kterých nastává difrakce světla (zjednodušeně je považujeme za složené z malých otvorů nebo mřížek).

- Velká část primárního (koherentního) světla z osvětlovací soustavy projde preparátem beze změny a tvoří v obraze hlavní maximum.
- Část světla narazí na hrany mikroskopických objektů a rozptýlí se difrakcí, při tom vytvoří vedlejší maxima. Interferencí mezi světelnými vlnami hlavního maxima a světelnými vlnami difrakcí (ohybem) modulovaného světla vzniknou v obraze kontrasty jasu, které zviditelňují jednotlivé struktury.

Největší rozdíl v kontrastu nastane tehdy, je-li mezi vlnou hlavního maxima a vlnou světla, prošlého preparátem, rozdíl $\frac{1}{2} \lambda$.

Abychom mohli v mikroskopu pozorovat objekty, způsobující fázovou modulaci světla (které jsou v tomto tvaru pro oko neviditelné), musíme dosáhnout toho, aby se fázová modulace světla při průchodu mikroskopem změnila na modulaci amplitudovou a objekt se tak stal viditelným stejně, jako při pozorování amplitudových objektů ve světlém nebo v tmavém poli. o uskutečnění tohoto cíle se zasloužil holandský fyzik **Fritz ZERNIKE** (1934).

Nejprve si musíme vysvětlit, co se stane se světelnou vlnou při průchodu fázovým objektem. Názorně to ukazuje následující schéma:



^{*)} poznámka: kdyby frekvence nezůstala konstantní, nastala by po průchodu objektem změna chromatičnosti (nebyl by to fázový objekt)

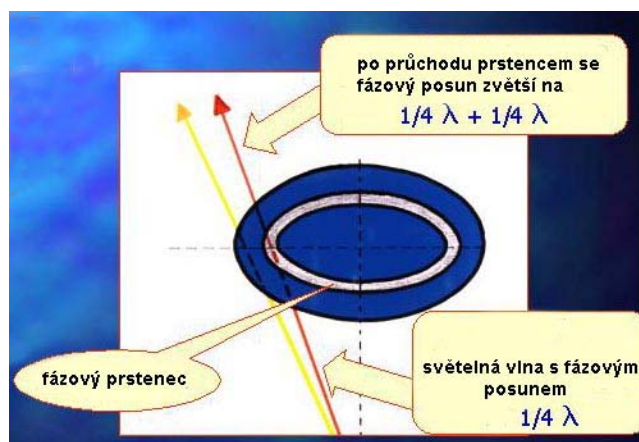
Ze schématu vyplynulo, že po průchodu světla fázovým objektem získala světelná vlna fázové zpoždění. Tak se původně převážně koherentní světlo ze zdroje v mikroskopu rozdělilo na původní světlo zdroje (které jde mimo fázový objekt) a světlo, které po průchodu fázovým objektem získalo fázový posun. Protože rozdíl fází obou světél nezpůsobuje zřetelnou změnu amplitudy, je fázový preparát velmi nekонтрастní a slabě viditelný.

Pro další zpracování fázově modulovaného světla je důležitá ta jeho část, která má fázový posun 90° ($\pi/2$ rad. nebo $\lambda/4$ vlnové délky). Takové světlo probíhá se zpožděním o $\lambda/4$ za vlnami hlavního maxima nemodulovaného světla. Aby tento vlnový obraz získal pro náš zrak stejný význam jako při pozorování amplitudového preparátu, je nutné provést dvě opatření:

- 1) mezi světlem hlavního maxima a fázově modulovaným světlem musí být dosaženo dodatečného fázového posunu o $\lambda/4$ (tj. 90°), takže celkový fázový posun je pak 180° ($1/2 \lambda$). Může proběhnout interference a výsledek je stejný jako při průchodu světla amplitudovým preparátem.

- 2) protože mezi jasným hlavním maxima a jasným fázově modulovaným světlem je příliš velký rozdíl, musí být jas hlavního maxima ztlumen. Toho dosáhneme např. zařazením neutrálně šedého filtru do chodu paprsků hlavního maxima, zatímco modulované světlo zůstane netlumené.

Technické prostředky, které způsobí změnu fázové modulace na amplitudovou, se vkládají do optické osy mikroskopu. Koherentní *) světlo z osvětlovacího systému je směřováno jeho kolektorovou čočkou do kondenzoru a zaostřeno na prstavec s mezikružím, který se vkládá do přední ohniskové roviny kondenzoru (tak vznikne „fázový kondenzor“). Světlo, procházející tímto prstencem osvětluje objekt (preparát) a projde jím buď částečně beze změny (hlavní maximum) nebo ve struktuře preparátu nastane modulace jeho fáze ohybem a následný fázový rozdíl.

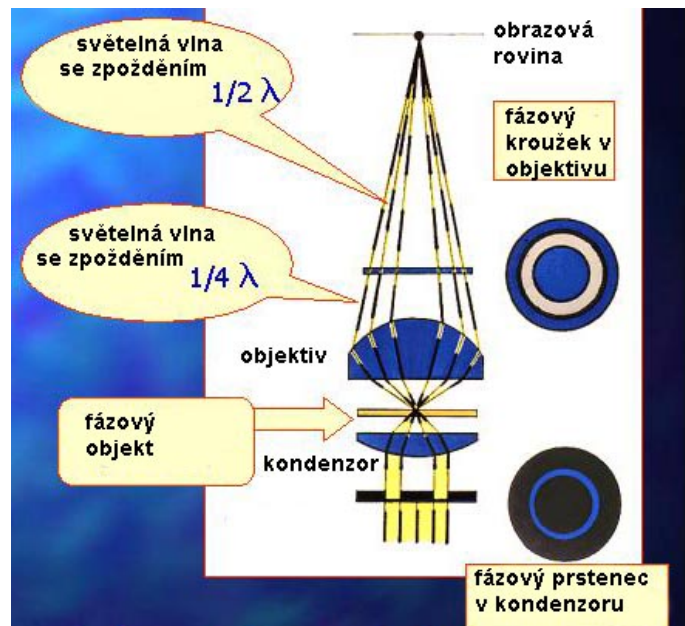


Obě světla dopadají do objektivu. v předmětové rovině objektivu je další „fázový“ prstavec, na kterém se vytvoří konečný fázový rozdíl, potřebný pro amplitudový kontrast, pozorovaný v okuláru. Objektivy s fázovým prstencem se nazývají „fázové objektivy“, pro pozorování amplitudových objektů ve světlém poli jsou jen omezeně použitelné (nastává v nich ztráta intenzity procházejícího světla).

*) Koherentní vlnění má stejnou frekvenci, stejný směr kmitání a stejnou fázi (nebo stejný rozdíl fází)

Tím byly splněny podmínky pro amplitudovou modulaci a pro vznik viditelného obrazu. Světlo, modulované strukturou fázového objektu má podstatně menší amplitudu než světlo hlavního maxima, takže pozorujeme tmavou strukturu objektu na světlém pozadí. Takto získaný obraz fázového objektu se nazývá pozitivní fázový kontrast.

Na dalším obrázku je schématicky znázorněna úprava mikroskopu pro zviditelnění fázového posunu, fázově modulovaná vlna získá při průchodu preparátem celkový posun o 180° (tj. $1/2\lambda$), takže obraz odpovídá podmínkám amplitudové modulace.



Je možné celý postup upravit tak, aby vznikl jasnější obraz struktury proti tmavém pozadí (podobně jako při pozorování v zástině). Tomu pak říkáme negativní fázový kontrast. Používá se však zřídka, potřebuje jinak upravený kondenzor a objektiv.



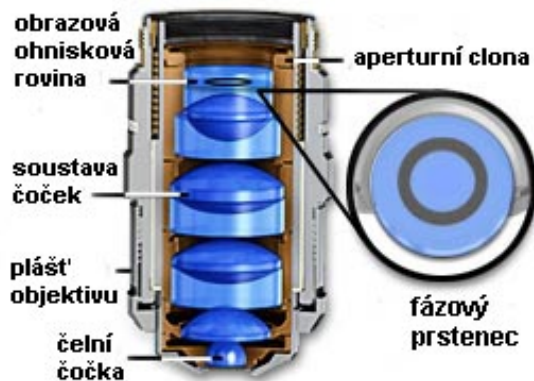
Na obrázku je fázový objekt, zobrazený mikroskopem s fázovým kontrastem při použití zeleného interferenčního filtru (GIF). Okraje kresby detailů mají pro fázový kontrast charakteristické halo, které ztěžuje přesnou specifikaci detailů. (Viz též fázový kontrast ADL, apodizovaný fázový kontrast).

Na další stránce je obrázek výbavy k doplnění mikroskopu pro pozorování fázových objektů. Centrovací pomůcka se nasadí přechodně místo okuláru. Usnadňuje uložení kondenzoru s fázovými vložkami přesně do optické osy mikroskopu. To je podmínkou pro dobrý obraz fázového preparátu. Odklopná čočka je nutná při používání objektivů s malým zvětšením ($< 4x$).

Výbava mikroskopu pro fázový kontrast



Objektiv pro fázový kontrast.



Pro fázový kontrast nabízí Nikon řadu objektivů, které jsou označeny podle toho, k čemu je výrobce doporučuje:

- **DL (Dark Low = hluboce tmavý)** – objektivy poskytují tmavý obraz na světle šedém pozadí. Tyto objektivy jsou určeny pro nejsilnější tmavý kontrast v objektech, které se vyznačují největšími rozdíly v indexu lomu. DL objektivy jsou nejužívanější při pozorování živých buněk a ostatního polopropustného živého biologického materiálu, jsou velmi vhodné pro mikrofotografii a digitální způsob zobrazování.
- **DLL (Dark Low Low = velmi hluboce tmavý)** – objektivy jsou podobné typu DL, objektivy DLL jsou vhodnější pro světlé pole a jsou často používány jako „univerzální“ objektivy v mikroskopech, využívajících více způsobů osvětlení jako např. fluorescence, DIC, světlé a/nebo tmavé pole.

- **ADL (Apodized Dark Low = apodizovaný kontrast hluboce tmavý)** tyto objektivy uvedl Nikon na trh v poslední době. Apodizovaný fázový kontrast používá na obou stranách fázového prstence sekundární prstence, ovlivňující optickou hustotu. Přidání sekundárních prstenců pomáhá při potlačování nežádoucího „halo“ – efektu. Často se tyto objektivy uplatňují pro dosažení lepšího výsledku při mikrofotografii s fázovým kontrastem.
- **DM (Dark Medium = středně tmavý)** DM objektivy poskytují tmavé obrysy objektů na středně šedém pozadí. Tyto objektivy jsou navrženy pro vysoký kontrast obrazu u objektů s malými hodnotami fázového posunu, jako jsou jemná vlákna, granule nebo částice.
- **BM (Bright Medium = středně jasný)**. Bývají často označovány jako objektivy pro negativní fázový kontrast. BM objektivy poskytují jasné obrysy objektu na středně šedém pozadí. Jsou ideální pro vizuální hodnocení bičíkovců, bakterií, malých globulí a pro počítání krevních buněk.

Objektivy NIKON ADL lze použít u mikroskopů NIKON ECLIPSE s optikou CFI60. v současné době dodává NIKON pro tuto metodu objektivy

CFI ACHROMAT **ADL** 10x, num. apertura 0,25, prac. vzdálenost 5,2mm, (Ph1)
 CFI ACHROMAT **LWD ADL** 20x F, n.a. 0,40, p.v. 3,0mm, (Ph1)
 CFI ACHROMAT **LWD ADL** 40x F, n.a. 0,55, p.v. 2,1mm, (Ph1)
 CFI ACHROMAT **LWD ADL** 40x C, n.a. 0,55, p.v. 2,7-1,8mm, (Ph2)
 s korekcí na krycí sklo 0-2,0mm

K objektivům **ADL** je nutné vložit do kondenzoru příslušné fázové prstence **Ph1** nebo **Ph2**.

Správná činnost mikroskopu s fázovým kontrastem závisí na přesném nastavení optických prvků, konkrétně na přesném umístění středu fázového prstence v kondenzoru do optické osy mikroskopu. K tomu je účelná pomůcka – **centrovací dalekohled** – který se nasadí do tubusu na místo jednoho z okulárů. Mikroskop může být vybaven Bertrandovou čočkou, která pak slouží ke stejnému účelu. Vkládá se obvykle otočným voličem v tubusu mikroskopu, pak není nutné vyjmát okulár. Nepostradatelným doplňkem pro fázový kontrast je interferenční žlutozelený filtr (označuje se obvykle zkratkou **GIF**), který propouští je úzké pásmo spektra s vlnovou délkou kolem 560 nm. Na tuto chromatičnost je oko maximálně citlivé.

Při nastavení mikroskopu s fázovým kontrastem postupujeme podle návodu, který je připojen k mikroskopu. Důležité je, aby bylo předem správně nastaveno "Köhlerovo osvětlení". Podstatou nastavení fázového kontrastu je umístění fázového prstence v kondenzoru tak, aby se kryl s prstencem v objektivu. Kondenzor se k tomuto účelu může nastavit do žádoucí polohy středícími šrouby v jeho objímce. Ke kontrole správného nastavení slouží centrovací dalekohled nebo Bertrandova čočka.

Moderní mikroskopy jsou sestavovány z jednotlivých modulů, takže mikroskop lze vybavit pro fázový kontrast dodatečně. Určitou potíž může způsobit požadavek, aby

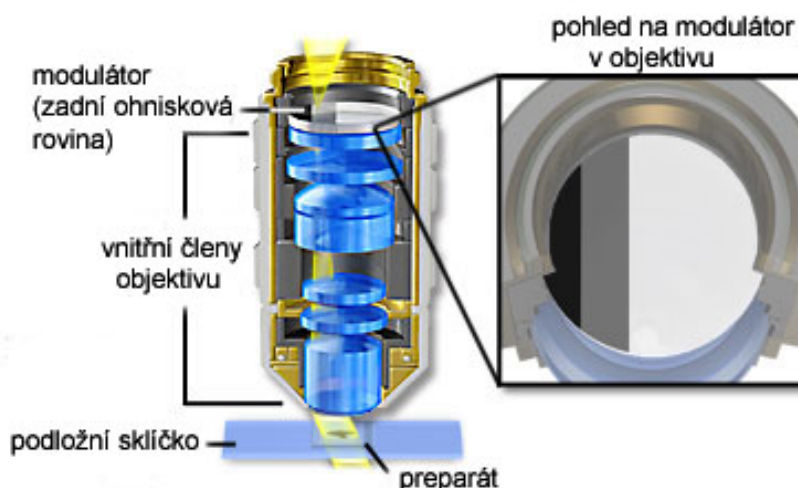
byl mikroskop vyzbrojen sadou objektivů pro světlé pole a sadou pro fázový kontrast. v tom případě je výhodné, má-li revolverový nosič objektivů 5 a více míst, případně může být tento nosič rovněž výměnný, což je běžné jen u velkých laboratorních a badatelských mikroskopů NIKON.

Hoffmanův modulační kontrast (HMC)

Rozšířenou metodou pro pozorování fázových objektů při zvýšeném kontrastu, používanou při fertilizaci in vitro (IVF), je Hoffmanův modulační kontrast. Tato metoda není založena na posunu fáze, ale na pozorování fázových objektů při šikmém osvětlení. HMC vyžaduje, aby do objektivu byl při výrobě vložen optický člen, kterému se říká modulátor a aby kondenzor byl vybaven štěrbinou. Pro zvýšení výsledného kontrastu je třeba na kondenzor nasadit otočný polarizační filtr. Chceme-li tedy využít HMC, musíme vybavit mikroskop speciálními objektivy s modulátorem a kondenzor upravit vložením štěrbinou, odpovídající tvarem zvolenému zvětšení v objektivu. Výsledný efekt spočívá v tom, že původní transparentní fázový objekt po nastavení HMC pozorujeme černobíle jako plastický, třírozměrný obraz. HMC mírně snižuje rozlišení, je však podstatně levnější, než diferenciální interferenční kontrast (DIC Normarski), který se používá k podobným účelům.

Modulátor je skleněný disk, zpracovaný fotografickou cestou, na kterém jsou rovnoběžné proužky s rozdílnou optickou propustností. Úzký proužek (jen asi 5 % plochy disku) je tmavý, propouští jen 1 % světla, které na něj dopadne. o něco širší (asi 14 % plochy disku) tvoří proužek, propouštějící kolem 15 % dopadajícího světla a zbytek plochy disku je zcela propustný (má 100% propustnost). Modulátor je uložen v zadní ohniskové rovině objektivu. Objektivy, vybavené modulátorem, jsou označeny HMC.

Objektiv HMC s modulátorem (Nikon)



Pro úpravu objektivu vložením modulátoru se užívají objektivy CFI Achromát nebo CFI Plan Achromát (Nikon).

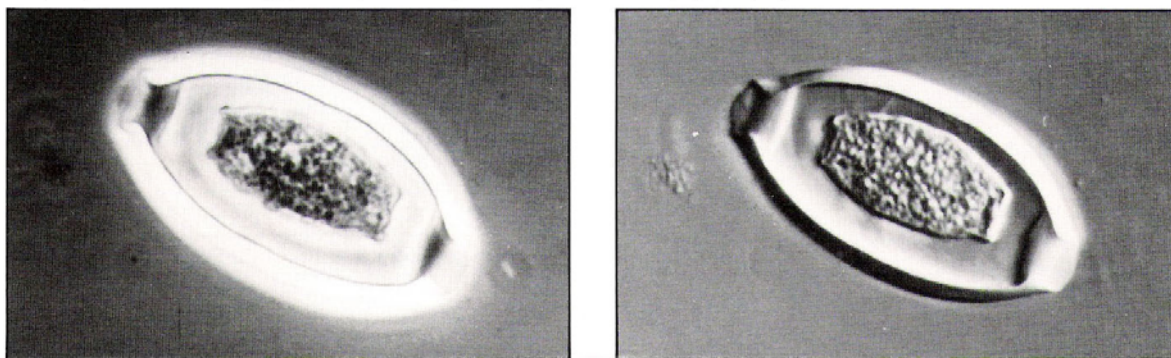
Funkce modulátoru spočívá v tom, že pro průchodu štěrbinou v kondenzoru a fázovým objektem se některé paprsky vlivem optického gradientu fázového objektu

odklánějí a procházejí mimo transparentní sektor. o tom, kterým směrem se paprsky odkloní, rozhoduje rozdíl v indexu lomu částí objektu a jeho okolí. z původně průhledného fázového objektu tak vznikne černobílý obraz s obohaceným kontrastem, který vzbuzuje silný dojem třírozměrného (plastického) objektu.

Hoffmanův modulační kontrast má ještě jednu výhodu: může být používán v případě, když preparát je v plastové Petriho misce (to bývá problém při použití DIC). Převážně se HMC užívá u invertovaných mikroskopů (Nikon TE2000 a podobně).

fázový objekt při pozorování v HMC

Objekt (*Trichuris trichiura* egg) vlevo pozorovaný s fázovým kontrastem, vpravo při použití HMC



Polarizační mikroskopie

Polarizační mikroskopie využívá vlastnosti světla, které říkáme polarizace. Tato mikroskopická technika má hlavní využití při pozorování neprůhledných objektů v mineralogii a geologii, avšak její aplikace najdeme přímo nebo nepřímo také v biologii, kde se užívají jako doplňky pro zvýšení kontrastu při pozorování v procházejícím světle.

V kapitole o vlnových vlastnostech světla jsme se stručně zmínili o vzniku a vlastnostech polarizovaného světla, nyní si musíme některé pojmy s tohoto oboru vyložit podrobněji.

Světlo jako příčné elektromagnetické vlnění kmitá (není-li nuceno chovat se jinak) ve všech rovinách, kolmých na směr paprsku, kterým se šíří. Tak se například chová bílé světlo z tepelného zdroje (svíčka, žárovka) při průchodu vzduchem. Obecně nezpůsobí změny v tomto chování světla látky, kterým říkáme izotropní. Tyto látky mají ve všech možných směrech stejné optické vlastnosti (např. propustnost, index lomu atd.). Typickými izotropními látkami jsou plyny, kapaliny, sklo (bez vnitřního pnutí), krystaly kubické soustavy atd. Lidský zrak nedovede rozlišit polarizované od nepolarizovaného světla.

U jiných látek se jejich optické vlastnosti se liší podle směru, kterým v nich světlo prochází. Tato látky se nazývají anizotropní. Prochází-li světelný paprsek anizotropní látkou, dochází u něho ke změně, které říkáme polarizace. Ze všech možných rovin, ve kterých světlo před průchodem anizotropní látkou kmitalo, převáží po průchodu jedna rovina, ostatní roviny jsou potlačeny. Takovému světlu říkáme lineárně polarizované světlo. Stupeň polarizace a směr roviny, ve které takové světlo kmitá, přináší často důležité informace o anizotropní látce, která tuto změnu způsobila. Další důležitou vlastností anizotropních látek je jejich schopnost rozdělit procházející paprsek na dvě části. Vznikne řádný paprsek (ve smyslu dodržování Snellova zákona o lomu) a mimořádný paprsek. Takovým látkám říkáme dvojlomné, jejich nejznámějším zástupcem je dvojlomný vápenec islandský.

Lineární polarizace není jediným způsobem polarizace. Obecně rozeznáváme světlo

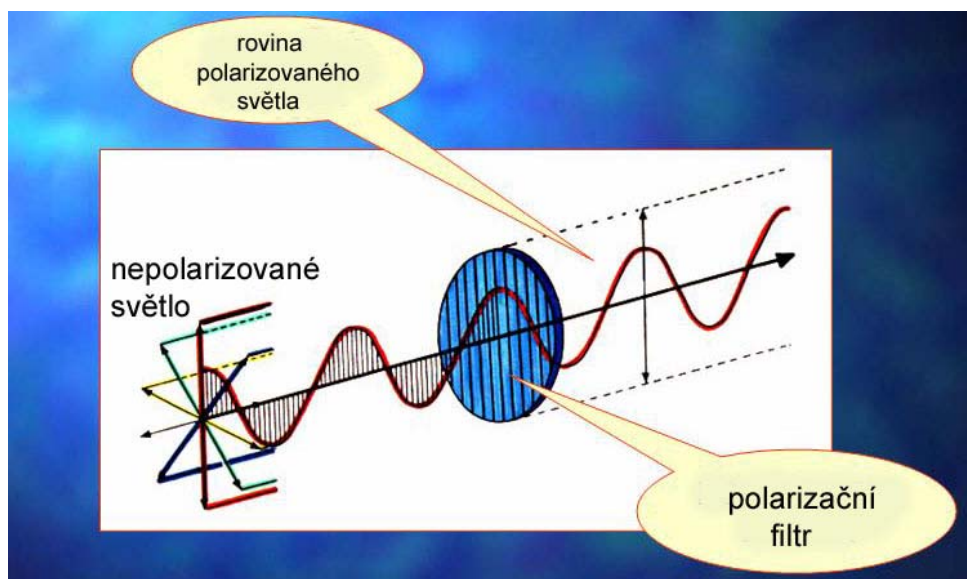
- a) nahodile polarizované
- b) lineárně polarizované
- c) elipticky polarizované

Kruhově polarizované světlo je zvláštním případem elipticky polarizovaného světla. Kruhově polarizované světlo na příklad vznikne, sloučí-li se dva paprsky se stejnou vlnovou délkou s fázovým posunem $\lambda/4$. Toho se dosáhne vložením fázové destičky (viz dále).

Rozdíl mezi lineárně a kruhově polarizovaným světlem spočívá v tom, že směr vektoru intenzity světla se u kruhově polarizovaného světla otáčí kolem osy, proložené paprskem, zatímco u lineárně polarizovaného světla má směr konstantní.

Chceme-li získat lineárně polarizované světlo, používáme obvykle polarizační filtry. Funkce polarizačního filtru spočívá v tom, že z „normálního“ nepolarizovaného světla propustí jen ty paprsky, které kmitají v jedné rovině (kolmé na směr paprsku).

Obrázek ukazuje funkci lineárně polarizujícího filtru



Polarizované světlo vznikne také při odrazu světelných paprsků od lesklých povrchů, jako jsou kovy, sklo, voda atd. Světlo oblohy je také částečně polarizované, jak se můžeme přesvědčit pozorováním přes polarizující filtr.

V polarizačním mikroskopu používáme obvykle dva polarizační filtry.

- první z nich, vložený do optické osy za polní čočku osvětlovací soustavu nazýváme polarizátor
- druhý, obvykle před okuláry, se nazývá analyzátor

Oba (nebo alespoň jeden z nich) lze otáčet kolem optické osy. Úhel, o který je otočíme, lze často odečíst na stupnici. Mezi tyto filtry vkládáme objekt, jehož polarizační vlastnosti nás zajímají.

Polarizační filtry v mikroskopu mají dvě základní polohy. Jsou-li roviny, do kterých se v nich stáčí světlo při polarizaci, rovnoběžné, pak jimi světelný paprsek prochází jen s nepatrným omezením, které způsobuje jejich optická hustota. Jsou-li obě roviny na sebe kolmé, žádné světlo neprojde (vidíme tmu). z předchozího výkladu plyne, že otáčíme-li jedním z filtrů o 360° , pak vidíme v průběhu otáčení 2x největší jas a 2x tmu.

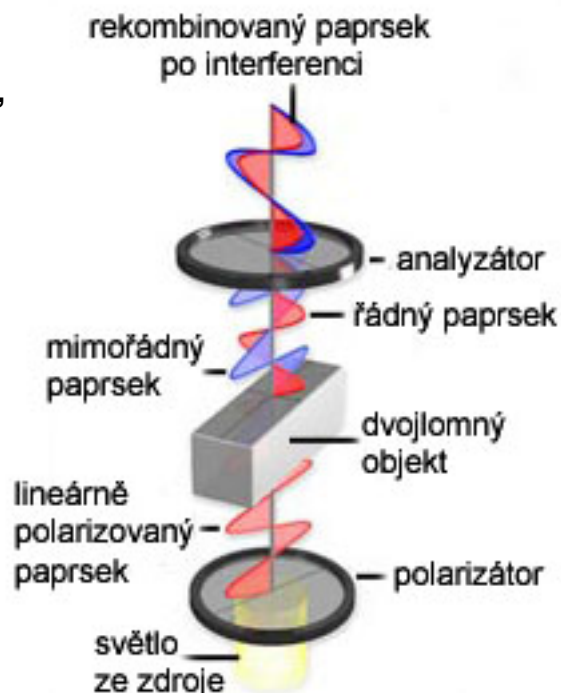
Nastavíme-li polarizátor a analyzátor na největší jas, pak po vložení anizotropního objektu mezi tyto filtry nastane zeslabení obrazu a změní se jeho chromatičnost. Na tomto základu je založena polarizační mikroskopie.

Pro správnou činnost polarizačního mikroskopu je podmínkou, že další optické členy mikroskopu (kondenzor, objektiv a okuláry) nesmí jevit vlastní polarizační aktivitu.

Polarizační mikroskopy pro mineralogii a geologii bývají vybaveny otáčivým stolcem se stupnicí a s noniemi, tedy s možností přesného odečtení úhlu otočení stolku s uloženým vzorkem. Jeden z okulárů bývá vybaven nitkovým křížem, aby bylo možné přesně určit, kde probíhá vzorkem optická osa mikroskopu.

Obrázek ukazuje uložení optických členů, které se účastní tvorby obrazu, v polarizačním mikroskopu.

Rekombinovaný paprsek má po interferenci jiné vlastnosti, závislé na optických vlastnostech dvojlomného objektu a na otočení analyzátoru.



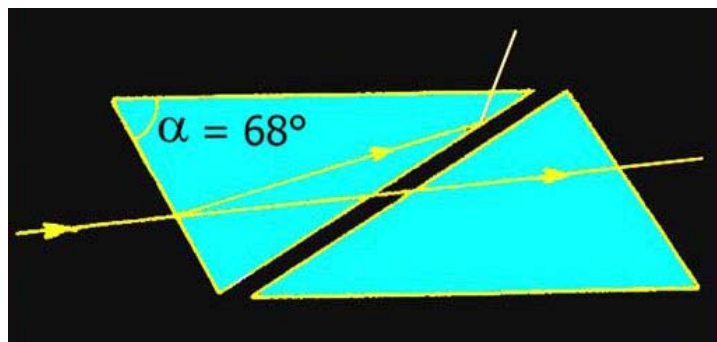
Dvojlom světla

Dvojlomné objekty jsou anizotropní a mají takové optické vlastnosti, že procházející světlo se v nich láme do dvou směrů a dochází přitom k polarizaci. v každém z obou paprsků kmitá světlo v navzájem kolmých rovinách. K dvojlomu může docházet různým způsobem, tři následující způsoby jsou významné pro polarizační mikroskopii:

- 1) V prvním případě jsou látky dvojlomné, protože mají určitou krystalickou strukturu. Tento jev nastává ve všech krystalických strukturách s výjimkou regulární soustavy (např. sůl kamenná). Hovoříme o vlastním dvojlomu.
- 2) Druhý případ dvojlomu nastává, působí-li na látky, které jinak nejeví dvojlom, určité síly (dvojlom způsobený napětím).
- 3) Třetí případ nastává, jde-li o soustavu částic, které jinak nejeví dvojlom, avšak je-li každá z nich alespoň v jednom směru výrazně menší, než je vlnová délka procházejícího světla. Podmínkou je, aby všechny částice byly stejně orientovány a byly v prostředí látky s odlišným indexem lomu. Zde se jedná o dvojlom, který je v polarizační mikroskopii biologických látek velmi důležitý – tzv. tvarový dvojlom. Tento druh dvojlomu může být překryt vlastním dvojlomem, vykazují-li stejně orientované částičky vlastní dvojlom. S tímto případem dvojlomu se v polarizační mikroskopii biologických objektů můžeme často setkat.

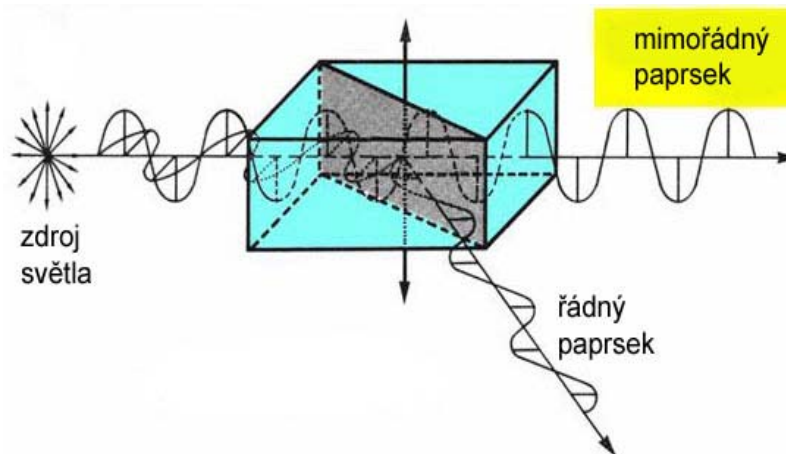
Významným optickým prvkem jsou dvojlomné hranoly. Skládají se obvykle ze dvou klínů s dvojlomného islandského vápence, které mají zcela určitý tvar. Jsou navzájem slepeny průhledným kanadským balzámem, takže výsledná tvar je hranol. Nejznámější dvojlomný hranol se jmenuje po svém objeviteli Nicolův hranol, krátce Nicol.

**Nicolův
hranol**



Obrázek znázorňuje dráhu paprsku, který se v něm dělí na dva – řádný a mimořádný. Při průchodu hranolem nastává lineární polarizace obou paprsků, jejich roviny polarizace se liší o 90° .

Průchod světla Nicolovým hranolem



Oběma rovinám, ve kterých dvojlomný objekt propouští světelný paprsek, přísluší různé indexy lomu. Jeden z těchto indexů lomu odpovídá zákonu o lomu paprsků (Snellův zákon). Paprsek, který se láme podle tohoto vztahu, označujeme jako řádný paprsek. Index lomu, měřený ve směru druhé roviny kmitajícího paprsku, není v žádném vztahu k zákonu o lomu paprsků. Tento index lomu není stálý, ale mění se podle úhlu, pod kterým dopadá světlo na dvojlomné těleso. Na základě tohoto jevu, pro který neplatí zákon o lomu, vzniká druhý, tzv. mimořádný paprsek, jehož rovina kmitání je kolmá k rovině řádného paprsku. Podle toho jsou (většinou) indexy lomu pro řádný a mimořádný paprsek různé.

Mikroskopické optice se používají modifikace Nikolova hranolu, které navrhl Wollaston a později Nomarski. Oba tyto hranoly jsou známé pod jménem svých objevitelů.

Kompensátory

Z úvah v předchozích odstavcích můžeme u dvojlomného objektu stanovit, který z jeho obou směrů kmitání (polarizovaného paprsku) přísluší většímu a který menšímu indexu lomu. Je pouze třeba vložit mezi zkřížené polarizační filtry do úhlopříčné polohy další, kladně dvojlomný pomocný objekt, jehož směr kmitání pro větší index lomu známe. Těmto pomocným objektům většinou říkáme kompenzátory.

Analyzátor propustí světlo s největší amplitudou tehdy, jsou-li roviny kmitání v dvojlomném materiálu orientovány v úhlu 45° k rovině, ve které analyzátor propouští (polarizovaný) paprsek. Tato sestava se nazývá „úhlopříčná poloha“. Anizotropní objekty se proto jeví střídavě tmavé a světlé, otáčíme-li jimi mezi dvěma polarizačními filtry (tj. v mikroskopu mezi polarizátorem a analyzátozem).

Zkoumaný objekt vložíme do dráhy paprsků a otočíme jej do úhlopříčné polohy, kdy nastane největší propustnost světla. Směry kmitání mezi objektem s větším indexem lomu a kompenzátozem jsou vzájemně rovnoběžné, jestliže zkoumaný objekt způsobí vznik interferenční chromatičnosti vyššího řádu, než jaká vznikne průchodem pomocným objektem. Při vzniku interferenční barvy nižšího řádu leží oba směry kmitání k sobě navzájem kolmo.

Interferenční chromatičnosti

Pro polarizační mikroskopii a následně pro mikroskopii využívající diferenciálního interferenčního kontrastu musíme popsat, jak se chová polarizované světlo v soustavě, která je složena z polarizátoru a analyzátoru, mezi které vložíme dvojlomný objekt. Nejprve se budeme zabývat případem, kdy použijeme monochromatického osvětlení, tedy světla s jedinou vlnovou délkou.

Po průchodu polarizátorem vznikne lineárně polarizované monochromatické světlo. To dopadne na dvojlomný objekt a v něm se rozdělí na dva paprsky, řádný a mimořádný. Oba paprsky projdou další polarizací v krystalu a kmitají nyní ve dvou, na sebe kolmých rovinách (což vede ke stejnému výsledku, jako kdyby byly kruhově polarizovány). Po průchodu analyzátozem bude mít paprsek amplitudu, závisící na rozdílu vlnových délek, na chromatičnosti obou paprsků a na tom, zda jsou průchozí směry analyzátoru a polarizátoru vzájemně rovnoběžné nebo na sebe kolmé. Kolmá vzájemná poloha je důležitá při zkoumání biologických objektů a říká se jí též „zkřížená poloha“. Je-li rozdíl vlnových délek, který paprsek získal při průchodu dvojlomným objektem roven nule nebo celému násobku λ , kmitá světlo ve stejné rovině, jako po průchodu polarizátorem. Protože je analyzátor ve zkřížené poloze, nepropustí žádné světlo a vidíme „tmu“.

Při vlnových rozdílech $\lambda/2$, $3\lambda/2$ atd. vznikne rovněž lineárně polarizované světlo, které nyní kmitá v kolmé rovině k polarizátoru, takže analyzátozem prochází bez potlačení intenzity. v této poloze se objekt jeví jako maximálně propustný. Při rozdílech mezi nulou a $\lambda/2$ vznikají různé odstíny jasu. Dostáváme tedy jiné výsledky, než jaké nastanou při interferenci, vzniklé následkem ohybu paprsků (viz dříve).

Prochází-li soustavou monochromatické světlo, pozorujeme za analyzátozem při plynulé změně rozdílu vlnových délek pravidelné střídání světlých a tmavých pruhů. Tmavé pruhy vznikají tehdy, způsobuje-li dvojlomný klín mezi polarizátorem a analyzátozem rozdíl vlnových délek, rovný celým násobkům λ . Nápadné je, že použijeme-li modrého monochromatického světla, jsou tmavé pruhy blíže, než použijeme-li světlo červené. Zřejmě je to důsledek vlnových délek, pro modrou je λ přibližně 400 nm, pro červenou 700 nm.

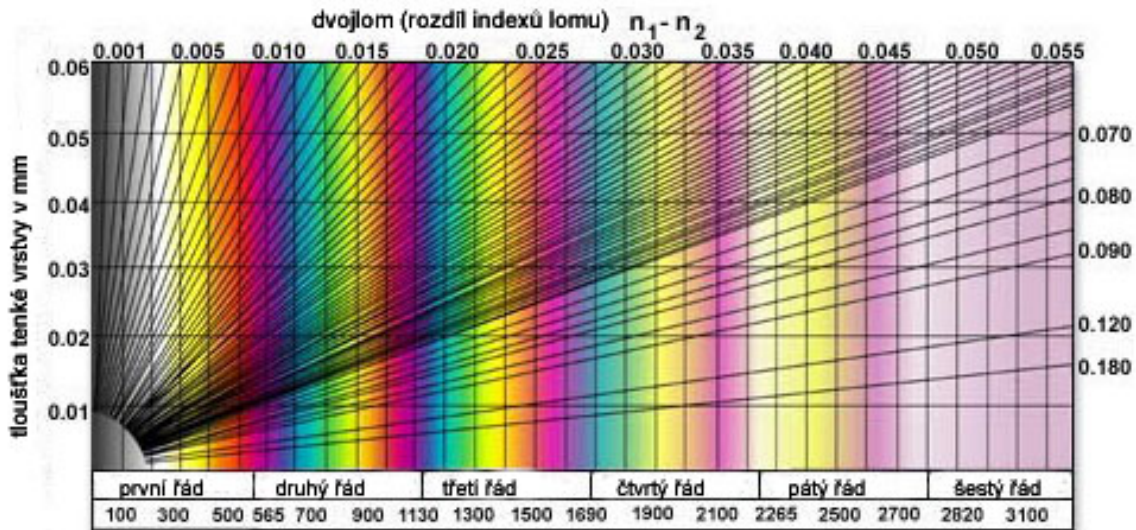
Použijeme nyní ve stejné soustavě bílé, nikoliv monochromatické světlo, které je plynulou směsí vlnových délek od 400 nm do 700 nm. Při všech polohách dvojlomného klínu, kdy byl při dopadu modrého světla výsledkem tmavý proužek, tento úkaz při použití bílého lineárně polarizovaného světla nenastane. Na jeho místě vznikne světelný proužek s chromatičností, smíšenou ze světla všech vlnových délek, které nebyly průchodem dvojlomným klínem potlačeny. Zvětšujeme-li tloušťku klínu, jsou ve výsledném spektru potlačovány vždy dlouhovlnější oblasti světla, takže vznikají další nové chromatičnosti.

Dosáhne-li klín určité tloušťky, bude rozdíl vlnových délek 800 nm, tedy dvojnásobek vlnové délky modrého světla. Od této polohy klínu se při dalším zvětšování jeho tloušťky situace opakuje, vlnové délky odpovídají dvojnásobkům délek původních chromatičností, následujících ve spektru po modré. Opakující se sekvence mají klesající intenzitu chromatičností, říkáme jim „řády“. Sled řádů chromatičností

znázorňuje tabulka, kterou sestavili Michel a Lévy. z rozdílů chromatičností lze odhadnout zpět rozdíl vlnových délek.

Až k prvnímu vzniku červené mluvíme o spektru prvního řádu, při vzniku další červené druhého řádu atd. U řádů s vysokým pořadovým číslem už nepozorujeme žádné chromatičnosti, obdržíme opět „bílou vyššího řádu“.

Tabulka Interferenčních chromatičností (podle Michel-Lévy)



V rozsahu červené prvního řádu způsobují malé změny v rozdílu průchodu zvláště jasné změny barevného posunu. Tyto jevy můžeme využít pro zkoumání objektů s malým dvojlomem, jaký nastává často v biologických preparátech. K tomu se kompenzátor, který sám způsobí mezi zkříženými polarizačními filtry v úhlopříčné poloze vznik červené prvního řádu. Na místech v preparátu, která v tomto případě získají modrý barevný tón, leží směry s větším indexem lomu paralelně ke směřům pomocného objektu. Svírají-li směry úhel 90° , pak získají stejné struktury žlutou interferenční barvu.

Představme si, že dvojlomný objekt, ležící v úhlopříčné poloze, způsobuje rozdíl v chodu (polarizovaného světla) o 550 nm, takže způsobí vznik červené interferenční barvy prvního řádu. Uložíme-li nyní nad tento objekt další, který vykazuje stejný rozdíl v chodu (paprsků polarizovaného světla), jako první objekt (tedy způsobí rovněž vznik červené prvního řádu) a natočíme-li jej tak, že leží vzhledem k prvnímu v adiční poloze, pak se rozdíl v chodu zdvojnásobí. Jako interferenční barva pak vznikne červená druhého řádu, jak to můžeme odečíst z barevné interferenční tabulky. Druhý objekt však můžeme otočit také do subtraktivní polohy. Rozdíl v chodu, způsobený prvním objektem, se nyní zmenší o rozdíl v chodu druhého objektu. Protože jsou oba rozdíly stejné, je rozdíl v chodu – způsobený prvním objektem – působením druhého objektu zrušen, tedy **kompenzován**.

Tak vzniká možnost pro měření rozdílu chodu paprsků, který vznikne v dvojlomném objektu mezi řádným a mimořádným paprskem. Musíme k tomu jen vložit do dráhy

paprsků pomocné objekty (kompenzátory), které způsobují známý rozdíl. Jeví-li se pak zkoumaný dvojlomný objekt tmavý, je jím způsobený rozdíl v chodu stejný, jako u pomocného objektu. Aby však nebylo třeba pro každý možný rozdíl v chodu používat vlastní pomocný objekt, používají se pomocné objekty, které umožňují plynulou změnu rozdílu chodu. To je možné například tak, že pomocný objekt nakláníme, čímž se vlastně index lomu pro mimořádný paprsek a tím též rozdíl chodu paprsku mění. Polohu tohoto pomocného objektu měníme tak dlouho, až se zkoumaný objekt jeví jako tmavý. Na těchto pomocných objektech – **kompenzátorech** – je stupnice, na které pak příslušný rozdíl chodu paprsků přečteme.

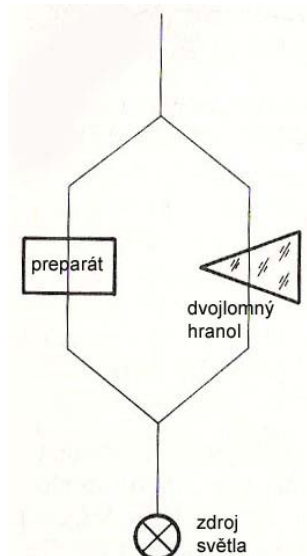
Nejpoužívanější je fázová destička, způsobující fázový posun π -rad nebo 180° mezi řádným a mimořádným paprskem. Tato destička se označuje běžně jako $\lambda/2$ kompenzátor. Destička $\lambda/2$ obrací smysl otáčení kruhově polarizovaného světla a otáčí rovinu lineárně polarizovaného světla. Fázová destička s posunem $\lambda/4$ způsobuje posun mezi řádným a mimořádným paprskem o 90° ($\pi/2$ rad) a mění kruhově polarizované světlo na lineárně polarizované a naopak.

Interferenční mikroskopie

Diferenciální interferenční kontrast (Nomarski-DIC)

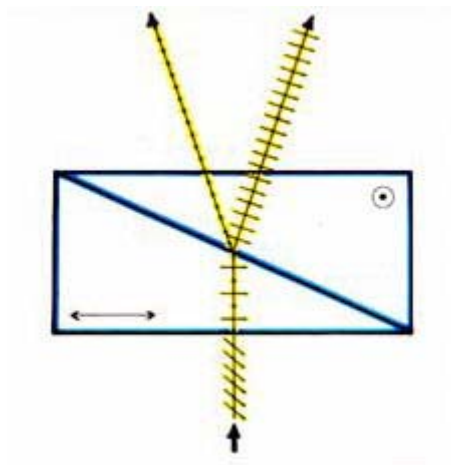
Interferenční mikroskopie je kontrastovací metoda, která slouží – podobně jako mikroskopie s fázovým kontrastem – ke zvyšování kontrastu při pozorování průhledných fázových objektů. Její aplikace je rozsáhlejší a účinnější, než fázový kontrast, je však mnohem složitější a náročnější na technické vybavení mikroskopu.

Základní **princip interferenční mikroskopie** znázorňuje obrázek:



Světlo, vycházející z osvětlovací soustavy mikroskopu, je rozděleno do dvou koherentních svazků paprsků. Po průchodu preparátem a objektivem se oba svazky opět spojí do jediného. Projdou-li paprsky preparátem (fázovým objektem) vznikne mezi oběma svazky rozdíl fáze, způsobený strukturou fázového objektu. Následkem toho nastane ve spojeném svazku interference světelných vln, která obecně způsobí

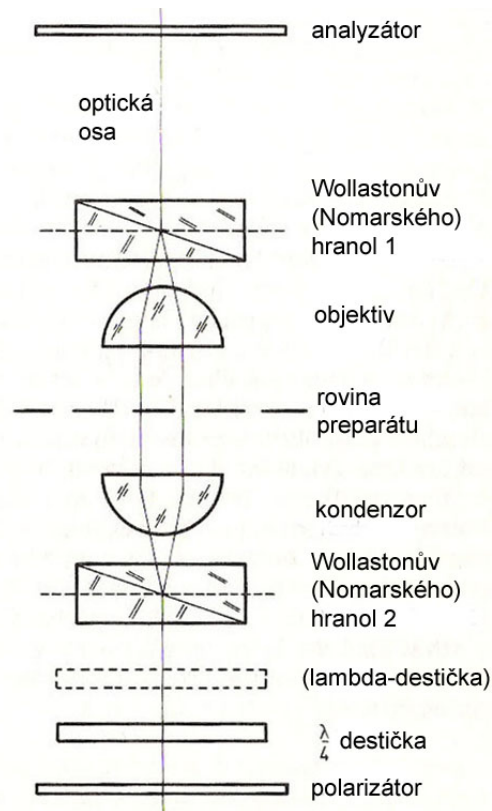
změny v amplitudě vlnění. Tak vzniknou kontrasty optické hustoty, což se projeví zviditelněním fázového objektu (který byl původně průhledný).



Obrázek ukazuje **Wollastonův hranol**. Tečky a úsečky na světelných paprscích naznačují směr polarizace světla.

Rozdvojení paprsků na dva svazky a jejich opětovné spojení se provádí vložením Wollastonových a v pozdější modifikaci Nomarského hranolů. Wollastonův hranol je složen ze dvou klínů dvojlomného islandského vápence v subtraktivní poloze, slepených kanadským balzámem. Jejich optická osa leží kolmo na směr dopadajícího světla, které před tím prošlo filtrem s lineárním polarizačním účinkem (polarizátor). Rovina tohoto polarizovaného světla svírá úhel 45° s rovinou, ve které světlo kmitá při průchodu hranolem. v prvním z obou klínů jsou paprsky rozděleny do dvou částí, které mají stejnou amplitudu. Nejsou sice ještě od sebe odděleny, ale v anizotropním prostředí krystalu se začnou lišit svojí rychlostí. Při vstupu do druhého krystalu se rozdělí na řádný a mimořádný paprsek. Řádný paprsek se po průchodu druhým krystalem změní na mimořádný, tím se pro něj sníží index lomu, takže se odkloní od kolmice (optické osy). Naopak mimořádný paprsek získá vlastnosti řádného paprsku a láme se ke kolmici. Nyní jsou oba paprsky od sebe odděleny, avšak úhel, který oba paprsky pro průchodu Wollastonovým hranolem svírají, je velmi malý.

Sestava mikroskopu s výbavou pro DIC:



Diferenciální interferenční kontrast s de Sénarmontovou úpravou

Diferenciální interferenční kontrast navrhl a použil jako první Francis SMITH v r. 1955, který sestavil modifikovaný polarizační mikroskop, obsahující Wollastonovy hranoly v přední ohniskové rovině kondenzoru a v zadní ohniskové rovině objektivu. Výrobním problémem mikroskopů, užívajících Wollastonovy hranoly, byla podmínka, že objektivový hranol musel být součástí tělesa objektivu, neboť musel ležet v jeho zadní ohniskové rovině.

Wollastonovy hranoly nahradil francouzský vědec Georges NOMARSKI modifikací, nazvanou jeho jménem. Nomarského hranoly mohou být umístěny v malé vzdálenosti od kondenzorové a objektivové apertury, takže je možno pro aplikaci systému DIC používat standardní mikroskopy. v dnešních mikroskopech, vybavených pro DIC, leží objektivový hranol v otočném nosiči objektivů a kondenzorový hranol v otočném nosiči kondenzorových modulů. Objektivy, používané pro DIC, nesmí způsobovat polarizaci (nesmí mít ve svých čočkách vnitřní pnutí). Obvykle se užívají společně pro polarizaci s označením DIC.

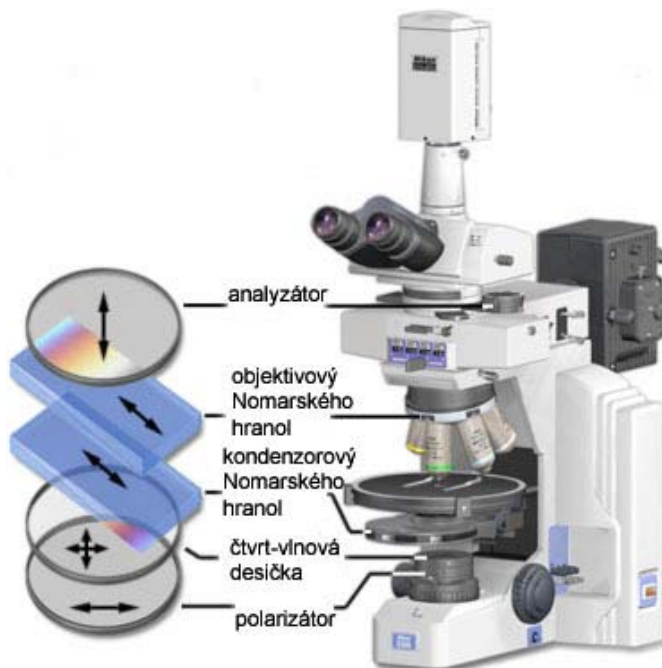
V tradiční sestavě DIC systému je dosaženo potřebného fázového posunu vložení dvou hranolů Wollastonova nebo Nomarského typu do optické osy mikroskopu nastavených v takové poloze, že vznikne konstantní optický rozdíl (diference) dvou optických drah. Stejný výsledek může být dosažen použitím pevného systému Nomarského hranolů a jednoduchého de Sénarmontova kompenzátoru, který tvoří čtvrt-vlnová destička ve spojení s polarizátorem nebo analyzátozem.

Základní de Sénarmontova úprava DIC se skládá z polarizátoru a čtvrt-vlnové destičky ve společné jednotce ve výstupu z osvětlovací soustavy, jejíž nastavitelná poloha je zajištěna vrubovým šroubem. Zatímco nastavená poloha destičky je pevná, polarizátorem lze v optické ose otáčet v rozmezí 90° (plus nebo minus 45°). S ohledem na polohu polarizátoru a v závislosti na poloze zpoždovací destičky prochází mikroskopem světlo s lineární, eliptickou nebo kruhovou polarizací.

Vlnoplocha polarizovaného světla dopadne nejprve na pevný Nomarského hranol, uložený v otočném nosiči kondenzoru, kde se následně rozdělí na dva paprsky (řádný a mimořádný), jejichž směr (polarizovaného) vlnění svírá úhel 45° vzhledem ke směru vlnění světla, vycházejícího z de Sénarmontova kompenzátoru. Optická soustava kondenzoru promítá rozdělené vlnění do dvou paralelních složek a promítá je do roviny preparátu. Světlo po průchodu preparátem projde objektivem do interferenční destičky druhého pevného Nomarského hranolu, umístěného nad objektivem v rámečku otočného nosiče objektivů. Objektivový Nomarského hranol, jehož poloha je sladěna s kondenzorovým hranolem (jsou obráceně orientovány), skládá zpět rozdvojené obrazové paprsky do sousého pravoúhlého systému. Ačkoliv je lineárně polarizované světlo, vycházející z objektivového Nomarského hranolu blokováno analyzátozem, elipticky a kruhově polarizované světlo touto složkou prochází a vytváří v okuláru obraz preparátu.

Podobně jako při používání fázového kontrastu je metoda DIC užitečná pro zviditelnění živých buněk nebo jiných průhledných, nebarvených vzorků, které jsou při běžném použití světlého pole obtížně pozorovatelné. Metoda DIC není zatížena tvorbou nepříjemného jevu „halo“, který provází klasický fázový kontrast a může být použita k pozorování relativně tlustých preparátů. Obrazy, získané metodou DIC, jsou velmi vhodné pro digitální snímací techniku, která umožňuje úpravy, vedoucí k dalšímu zvýšení kontrastu.

Mikroskop NIKON Eclipse E600 s fluorescencí, CCD kamerou, s kruhovým stolkem a s de Sénarmontovou soupravou diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC)



10 Fluorescenční mikroskopie

Emise světelného záření, vzbuzená v látce světlem, teplem, chemickou reakcí nebo mechanickým namáháním, se nazývá luminiscence. Protože není provázána tepelným zářením, je známá též jako "studené světlo". Pokud je luminiscence vzbuzena světelným zářením, mluvíme o fotoluminiscenci, která se opět dělí na **fluorescenci** a fosforescenci. Zatím co fosforescence přetrvává po jistou dobu po excitaci světelným zářením, **fluorescence** trvá jen po dobu ozařování. Charakteristickým znakem fluorescence je, že fluoreskující látka (vesměs organického původu) absorbuje ultrafialové záření nebo záření z krátkovlnné části viditelného spektra a emituje záření o vlnových délkách větších, než má pohlcované záření.

Důležité vlastnosti fluorescence:

(v dalším textu: *světlo* = budící, excitační záření, *fluorescence* = vzbuzené, emitované záření)

- 1) Aby látka mohla vyzařovat fluorescenci, musí pohlcovat světlo.
- 2) Vlnová délka fluorescence je všeobecně delší, než vlnová délka pohlceného světla. Čím má fluorescence delší vlnovou délku, tím je slabší. Energie vyzařované fluorescence je vždy slabší, než je energie pohlceného světla.
- 3) Intenzita fluorescence je mnohem menší, než intenzita pohlceného světla. Pro koeficient útlumu κ se udává řádová velikost 10^{-3} až 10^{-5} .
- 4) Intenzita fluorescence je úměrná intenzitě budícího světla (I_0), hustotě vzorku C a koeficientu κ .

$$I \approx I_0 C \kappa$$

- 5) Fluorescence se z látky vyzařuje do celého (kulového) prostoru, nezávisle na směru, ve kterém na ni dopadá excitační záření.
- 6) Fluorescence mnoha látek se vyznačuje postupným útlumem.
- 7) Fluorescence se pro každou látku vyznačuje charakteristickým spektrem vlnových délek.
- 8) Fluorescenční záření je vždy do určité míry polarizované.

Ačkoliv je možné provádět fluorescenční mikroskopii v procházejícím světle (diafluorescence) i v dopadajícím světle (epifluorescence), budeme dále popisovat jen epifluorescenci. Diafluorescence se prakticky přestala užívat.

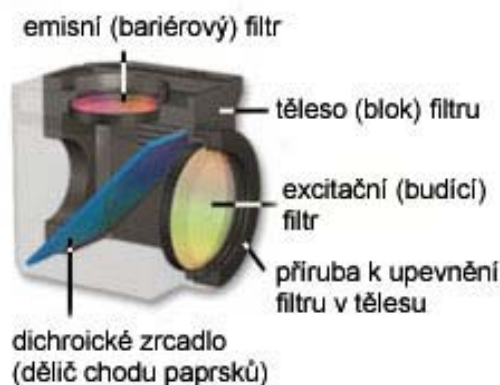
(Poznámka pro lepší orientaci čtenáře v cizojazyčných textech dáváme přednost názvům, převzatým z cizích jazyků: např. *bariérový filtr* – česky závěrný filtr, *excitace* – česky buzení atd.).

Výbava mikroskopu pro epifluorescenci:

Mikroskop musí být vybaven soupravou pro epifluorescenci, která obsahuje

1. zdroj záření, vyzařující světlo z krátkovlnného konce spektra (vysokotlakou rtuťovou nebo xenonovou výbojku v lampové skřínce)
2. excitační filtr (interferenční)
3. polopropustné dichroické zrcadlo
4. bariérový (závěrný) filtr

Díly 2) až 4) jsou vloženy do tělesa ve tvaru kostky a tvoří tzv. **fluorescenční filtr**, který se vkládá do optické osy mikroskopu. Setkáme se také s názvy jako „filtrblok“, blok fluorescenčního filtru apod.

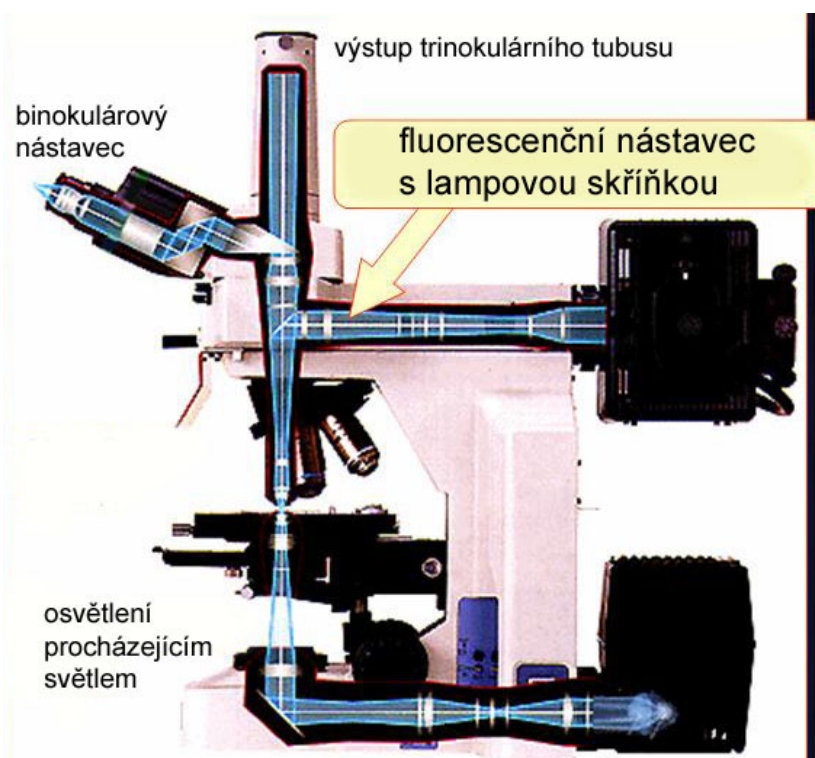


Na fluorescenční filtry jsou kladeny následující požadavky:

- mají propouštět směrem k pozorovanému vzorku záření pouze těch vlnových délek, které excitují nejintenzivnější fluorescenci.
- pro pozorování nebo některý druh záznamu (fotografie, CCTV-kamera atd.) má být využita jen ta část emitovaného záření (fluorescence), která je po průchodu dichroickým zrcadlem a bariérovým filtrem nutná pro tvorbu fluorescenčního obrazu. Většina filtrů je selektivní (pro jedno vlnové pásmo excitačního a fluorescenčního záření), vyrábějí se však i dvou- a tří-pásmové filtry.

Optické části mikroskopu (okuláry a objektivy) nesmí mít výraznou vlastní fluorescenci a nesmí podstatně pohlcovat fluorescenční záření. Pro běžné fluorescenční metody vystačíme s "normálními" objektivy, pro náročnou fluorescenci jsou určeny objektivy zvláštních vlastností (NIKON Plan Fluory, Plan Achromáty). Kondenzor ve stativu mikroskopu nemá při epifluorescenci žádnou funkci, jeho činnost vykonává objektiv.

Mikroskop, vybavený epi-fluorescenčním zařízením



Stručný popis epifluorescenční mikroskopie:

Záření vysokotlaké rtuťové výbojky (ve směru kolmém na optickou osu mikroskopu) prochází excitačním filtrem, který propouští jen světlo o vlnových délkách, které jsou potřebné k excitaci fluorescence v pozorovaném vzorku. Pak je excitační světlo odraženo polopropustným dichroickým zrcadlem do směru optické osy mikroskopu přes objektiv (který zastává funkci kondenzoru) na pozorovaný vzorek. v tomto vzorku, připraveném pro fluorescenci specifickým barvením nebo vykazujícím vlastní fluorescenci, vzbudí excitační světlo fluorescenci. Fluorescenční záření ze vzorku dopadá zpět do objektivu mikroskopu. Dichroické zrcadlo nyní propustí ve směru optické osy mikroskopu směrem k okulárům jen záření delší vlnové délky, než mělo excitační záření. Bariérový filtr (nad dichroickým zrcadlem) pohltí zcela zbytek excitačního záření, které nebylo pohlceno vzorkem a které z malé části dichroickým zrcadlem prošlo. v okulárech mikroskopu (nebo v záznamovém zařízení) je nyní jen fluorescenční obraz.

Příprava vzorku pro pozorování při fluorescenci:

Některé organické látky jeví vlastní fluorescenci – např. chlorofyl, kyselina pikrová atd. Většinu vzorků pro pozorování při fluorescenci je však třeba připravit specifickým barvením. Barviva pro fluorescenci musí mít tu vlastnost, že po ozáření excitačním světlem jeví fluorescenci a musí specificky barvit jen tu část vzorku, která je pro pozorování důležitá. Taková barviva se nazývají fluorochrómy.

Fluorescenční filtry se obvykle přiřazují k fluorochróům, kombinace filtr-fluorochróm jsou uváděny v tabulkách. Metodiky pro přípravu vzorků barvením pomocí fluorochrómů jsou často velmi složité a vyžadují značné zkušenosti.

Obsáhlý popis fluorescenční mikroskopie najdete na webové stránce www.mikroskopy.cz v kapitole Články, návody pod názvem „Fluorescenční mikroskopie – teorie a praxe“. Zde se jen stručně zmíníme o nových doplňcích, které uvedl v poslední době na trh **Nikon**.

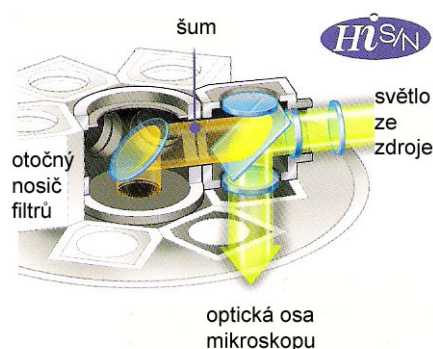
Zařízení k potlačení úrovně šumu (Noise Terminátor).

Poměr signál/šum je významným ukazatelem kvality přenosové soustavy při přenosu informací. To platí i pro fluorescenční mikroskopii, ve které se informace o vlastnostech vzorku přenáší optickou cestou. Je tedy žádoucí, aby tento poměr měl co největší číselnou hodnotu.

Šum vzniká v mikroskopu rozptýleným světlem, ve fluorescenční mikroskopii z velké části světlem, které se odráží od vnitřních stěn tělesa fluorescenčního filtru. Terminátor šumu odvádí toto rozptýlené světlo z dráhy v optické ose mikroskopu do lapače paprsků v otočném tělese nosiče filtrů. Tím se významně sníží hladina šumu a fluorescenční obraz získá další kontrast. Zařízení je využito v šestinásobném otočném nosiči fluorescenčních filtrů (Eclipse 80i a 90i).

Zařízení pro potlačení šumu **Nikon**

Rozptýlené světlo pokračuje do lapače v otočném nosiči filtrů.



Šestinásobný otočný nosič fluorescenčních filtrů
(ochranný kryt nosiče je sejmут)
(Eclipse 80i a 90i)



Zařízení pro vyrovnání excitace (Excitace Balancer) **Nikon**

(Volitelný doplněk k fluorescenčnímu nástavci)

V průběhu pozorování vícenásobně barvených fluorescenčních vzorků je pro pozorovatele výhodné, může-li snadno měnit vlnovou délku excitačního záření aniž by musel měnit fluorescenční filtr. Spektrální intenzita každé z vlnových délek excitačního záření při použití vícepásmového filtru se může plynule měnit nastavením polohy zařízení, které se nasazuje do optické dráhy excitačního záření.

Vyrovnávač excitace

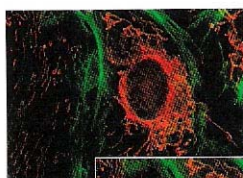
(Excitation Balancer)

volitelné příslušenství
pro fluorescenční nástavec
Eclipse 80i a 90i

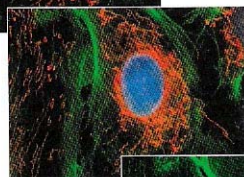
Nikon



obsluha
šoupátka
vyrovnávače



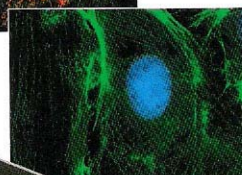
zdůrazněná
excitace B



standardní
excitace



šoupátko
vyrovnávače
excitace



zdůrazněná
UV-excitace

Fluorescenční mikroskopie zaznamenala v posledních letech obrovský rozmach a její metody se užívají v mnoha odvětvích biologie i při zkoumání neprůhledných materiálů. Zejména se osvědčila v kombinaci s DIC a při aplikacích konfokální mikroskopie.

V tomto přehledném materiálu nelze věnovat jednotlivým metodám fluorescence podrobnou pozornost. Zmíníme se jen velmi stručně o dvou fluorescenčních technikách, které fluorescenční mikroskopii zajistily popularitu.

Imunofluorescence

Je-li organismus napaden chorobou, kterou přežije, vytvoří se v těle protilátky. Ty pak brání organismus proti novému napadení stejnou chorobou. Tomu se říká imunita. Látka, která je příčinou imunity, se nazývá protilátka, chorobu způsobuje antigen. Reakce mezi antigenem a protilátkou (antibody) je specifická. Poznávání průběhu reakce antigen/protilátka je podstatou imunologie. **Imunofluorescence** je metoda, používající fluorochrómů k označení protilátek.

Fluorescence in Situ Hybridization (FISH)

FISH je specifická metoda fluorescenční mikroskopie, používaná v genetice. FISH identifikuje (nebo "barví") cílové sekvence genomu tak, aby mohlo být studováno jejich umístění a jejich velikost. Sekvence DNA a RNA z vhodného, chromozómově-specifického vzorku jsou nejprve označeny "zpravodajskými" molekulami a později identifikovány fluorescenční mikroskopii. Označená DNA a RNA je pak hybridizována na sklíčku na metafázové chromozómy nebo na interfázové nuklidy. Po vyprání a zesílení signálu je vzorek vytříděn pro zpravodajské molekuly fluorescenční mikroskopii.

Pomocí FISH je možné stanovit specifické základní sekvence chromozómů, buněk a tkáňových sekcí. Detekce hybridizovaného vzorku je umožněna pomocí fluorochrómu, který je zviditelněn fluorescenční mikroskopii.

Lze rozlišit dva typy FISH: nepřímou a přímou metodu. U přímé metody je fluorochróm přímo vázán na vzorek. U nepřímé metody obsahuje vzorek látku (např. biotin) se specifickou afinitou k specifické látce, která je konjugována s fluorochrómem (např. avidin – FITC).

První úspěšný postup FISH popsali RUDKIN a STOLLAR (1977), kteří vyvinuli nepřímou metodu. v dnešní době jsou mnohé postupy FISH komerčně dostupné.

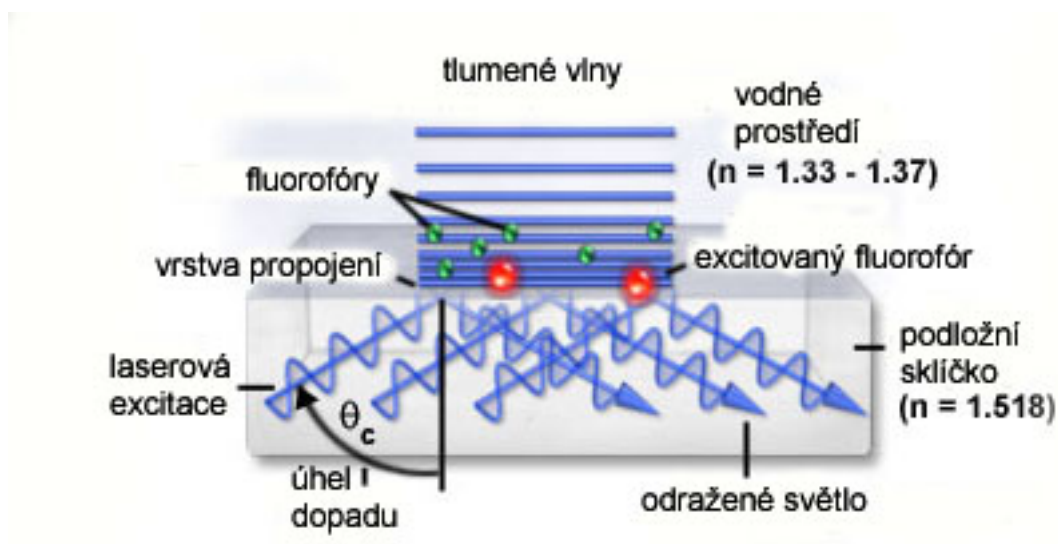
Úspěšná aplikace fluorescenční techniky pro metodu FISH znamená jeden z největších úspěchů moderní mikroskopie.

TIRF – Total Internal Reflexe Fluorescence Fluorescence s úplným vnitřním odrazem

Tento sofistikovaný postup při aplikaci fluorescenční mikroskopie slouží k excitaci a detekci fluorofórů v tenkých vrstvách vzorku. Je založen na potlačení fluorescence pozadí, kterou odklání mimo ohniskovou rovinu a tím podstatně zvyšuje poměr signál / šum a následně umožňuje prostorové rozlišení rovin ve vzorku, o které

máme zájem. TIRF využívá jedinečných vlastností indukovaných tlumených světelných vln v omezené vrstvě oblasti vzorku, přilehlé propojující vrstvě mezi dvěma prostředími, které se vyznačují rozdílným indexem lomu (na obrázku je to vodné prostředí a sklo). v praxi je nejčastějším používaným propojujícím prostředím kontakt mezi preparátem a krycím sklíčkem nebo kulturou v misce.

Princip TIRF



Princip TIRF není nový a byl již dříve středem zájmu, avšak teprve pokrok v mikroskopické technice umožnil jeho praktické využití. Přispěl k tomu také vývoj v technologii fluorofórů a nové metody v genetice.

Teoretické základy TIRF jsou natolik složité, že by jejich popis neúměrně zatížil rozsah této příručky. Zájemce odkazujeme na webovou stránku <http://www.microscopyu.com>, kde najdou odpovědi na další své otázky.