

## Lupa

- Zvětšení 10-15x, obraz: přímý, zvětšený, neskutečný

Lupa je dvojbvypuklá, či ploskovypuklá čočka. Předmět, který pozorujeme lupou, klademe do vzdálenosti menší, než je ohnisková vzdálenost.

## Mikroskopie

Pro mikroskopii lze využít jakékoli vlnění s vlnovou délkou kratší než jsou rozměry objektu.

A) Optická - zobrazení struktur lišících se vzájemně absorbcí viditelného světla

- Max. zvětšení(objektiv+okulár) – 1000x, obraz: převrác., zvětšený, neskutečný
  - 1) Varianty optického mikroskopu – v temném poli (u silných preparátů, pozorování předmětu v odražených paprscích osvětlujících jej zboku)
  - 2) Speciální optické mikroskopy  
zobrazení struktur lišících se vzájemně absorbcí UV i IR světla

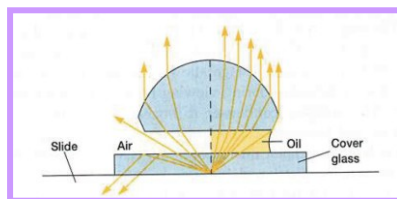
B) Elektronová

C) Akustická

### Optická (světelná) mikroskopie

#### Suchý objektiv:

Paprsek vystupující z preparátu pod úhlem  $\alpha$  se na rozhraní mezi krycím sklíčkem a vzduchem láme od kolmice a nemůže se již podílet na tvorbě obrazu.



#### Imerzní objektiv:

Paprsek přecházející ze skla do imerzního prostředí svůj směr nemění a může se podílet na tvorbě obrazu = více paprsků se podílí na vzniku obrazu.

Imerzní prostředí - kapalina o stejném  $n$  jako krycí sklíčko. Často cedrový olej ( $n = 1,52$ ).

### Speciální optické mikroskopy

#### Fázový kontrast

Různé části preparátu však vykazují různý index lomu – dochází k ohybu paprsků: při průchodu světelné vlny objekty s různě vysokým indexem lomu se tato vlna v závislosti na tomto indexu lomu zpozdí, nedochází ke změně její intenzity, ale k posunu její fáze, a to v závislosti na rozdílu indexu lomu dané struktury a okolí, na délce optické dráhy a na vlnové délce světla. Čím nižší index lomu části preparátu (nízká denzita) tím tmavší se tato část preparátu jeví. Čím vyšší denzita, tím je objekt světlejší (př: „zářící“ spory bacilů)

Výhoda: možnost pozorování živých objektů v nativním stavu bez barvení

□ rozdíly ve fázi světla jsou převedeny na pozorovatelné rozdíly kontrastu

#### Interferenční mikroskop – Nomarského kontrast

Pracuje se dvěma koherentními (interference schopnými) paprsky, jeden prochází objektem, druhý mimo objekt. Hranol dělí původně lineárně polarizované světlo na dvě vzájemně kolmo polarizované složky. Polarizátor srovnává vlny, jež jsou v různých rovinách; Nomarského destička v kondenzoru je hranol, jež zpracovává polarizované světlo tak, že na preparát jdou dva paprsky souběžně vedle sebe. V analyzátoru vidíme 3D obraz v závislosti na různém indexu lomu různých částí buňky. Zvýrazněním i malých rozdílů vznikne plastický obraz povrchu buňky.

## **POSTUP PŘI MIKROSKOPOVÁNÍ**

Zapneme zdroj světla a na stolek vsuneme preparát. Objekt hledáme pomocí makrošroubu a doostříme mikrošroubem. Potom postupně zvyšujeme zvětšení výměnou objektivů na revolveru. Dbáme na to, aby objektiv nenarazil na sklíčko preparátu. Objektivy na revolveru jsou obvykle parfokální. To znamená, že jsou zaostřeny na přibližně stejnou vzdálenost, takže po výměně objektivu nemusíme objekt znovu hledat, ale stačí lehce doostřit mikrošroubem. Kondenzor je v horní poloze, intenzitu světla regulujeme kondenzorovou clonou.

Sladíme si zaostření okulárů, aby odpovídalo našim očím. U jednoho okuláru je možné pootočením upravit zaostření. Zavřeme oko, kterým hledíme do ostřitelného okuláru a pozorujeme pouze skrze neostřitelný. Zaostříme mikrošroubem objekt. Poté vyměníme oči a pozorujeme pouze ostřitelným okulárem. Pootočením okuláru doostříme objekt.

### **Použití imerzního oleje**

Zaostříme objekt největším neimerzním objektivem (nejčastěji 40x). Pootočíme revolver do polohy mezi tento objektiv a imerzní objektiv a na místo preparátu, které pozorujeme, kápneme kapku imerzního oleje. Pootočíme revolver na imerzní objektiv, který se musí ponořit do oleje. Pokud vidíme objekt, lehce doostříme mikrošroubem. Pokud objekt nevidíme, sjedeme objektivem k preparátu, tak abychom do něj nenarazili. Přitom se díváme z boku na objektiv a stolek s preparátem. Pak pohybujeme objektivem směrem od preparátu a pozorujeme okuláry dokud nenarazíme na objektovou rovinu. Pokud ji nenalezneme sjedeme opět k preparátu a ostření opakujeme. Pokud se nám nadále nedaří objekt nalézt, opakujeme celý postup od začátku, přitom dbáme na to abychom do imerzního oleje nenamočili jiný objektiv než imerzní.

### **Köhlerův princip**

Nejlepší obraz v mikroskopu dosáhneme pokud si nastavíme osvětlení podle Köhlerova principu. Při tomto osvětlení zobrazuje kondenzor polní clonu zdroje světla do roviny objektu a kondenzorová clona reguluje světelný tok tak, že je osvětlené pouze zorné pole mikroskopu. Köhlerovo osvětlení není možno vytvořit na mikroskopech Olympus v praxi, protože nemají posuvné kondenzory ani clonu zdroje světla, přesto zde pro informaci uvádíme postup nastavení světla podle Köhlerova principu:

1. otevřít clonu zdroje světla i clonu kondenzoru
2. vložit preparát a zaostřit ho při zvětšení 10x a více
3. zavřít clonu zdroje světla
4. zaostřit clonu zdroje světla pohybem kondenzoru tak, aby byly její hrany ostré zároveň s preparátem
6. otevřít clonu zdroje světla, aby právě zmizela za obzorem
7. nastavit aperturní clonu (podle NA objektivu):

vyjmout okulár a při sledování aperturní clony pohledem do tubusu otevřít tak, aby plocha nezakrytá clonou pokrývala asi 80% (toto nastavení je variabilní podle povahy preparátu)

### **Doporučená literatura**

- Dušan Matis a kolektiv: Mikroskopická technika. Skriptum PřF Univerzity Komenského, 1993
- Jaromír Plášek: Nové metody optické mikroskopie. Skriptum Fyzikálního ústavu Univerzity Karlovy
- Hrazdira.I., Mornstein V. (2001): Lékařská biofyzika a přístrojová technika, Neptun, Brno

## SOUVISEJÍCÍ ODKAZY

<http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/svetelnamikroskopie.htm>

Virtuální mikroskopování [<http://www.olympusmicro.com/primer/virtual/virtual.htm>]

Optical microscopy primer introduction [<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/>]

Vlnová optika [<http://www.sweb.cz/radek.jandora/f11.htm>,  
<http://www.aldebaran.cz/studium/fyzika/vlny.html>]

Mikroskopie na Hamburgské univerzitě [<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e03/03.htm>]

Souhrnný článek v anglickém jazyce [[Optical microscopy.pdf](#)]