

# Biologická technika – zoologická část

Eva Řehulková



**!!! Bezpečnost práce !!!**

– ochranný oděv (plášť) + dlouhé vlasy do gumičky + přezůvky

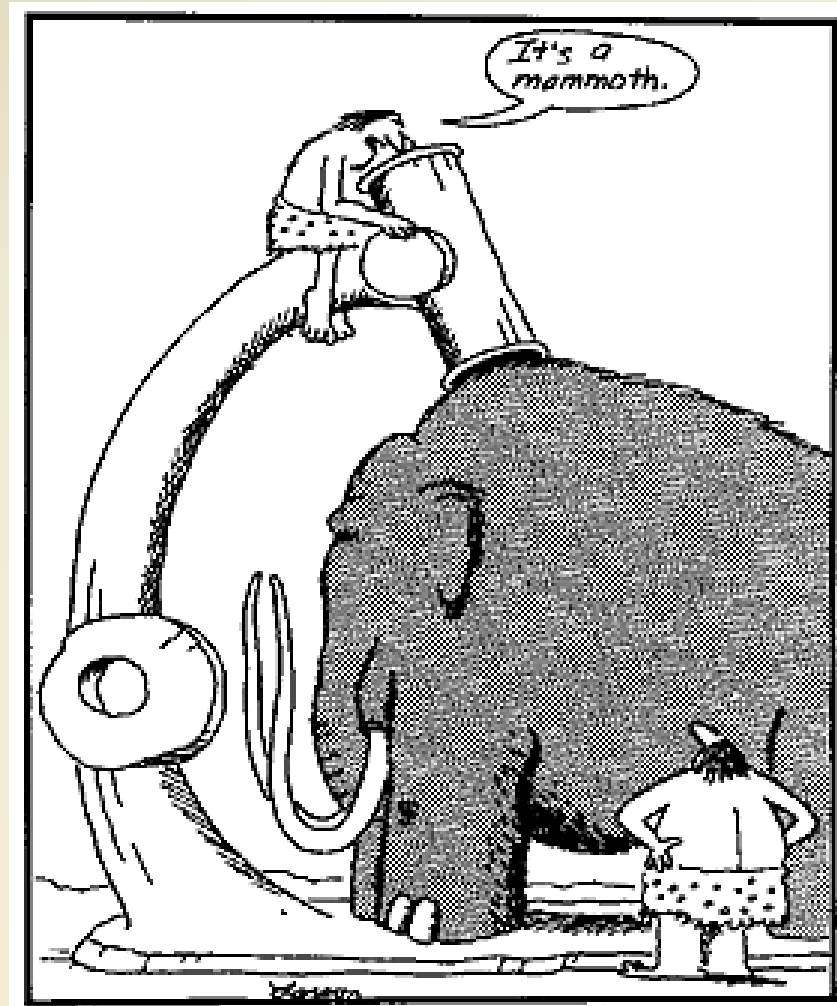
# Co potřebujete na **zápočet**?

- ✓ **100% účast** na praktiku (absence **→ nahrazení**)
- ✓ Odevzdání **protokolů** (v následujícím cvičení)
- ✓ **Test** (závěrečné cvičení)

## Struktura protokolu:

1. Teoretický úvod (vysvětlení základních pojmů)
2. Postup přípravy preparátů
3. Nákres preparátů měkkou tužkou
4. Popis nákresu – tužkou (velké, nestínovat, nešrafovat)

# Světelná mikroskopie - historie



# Čočky a brýle

**Nimrudská čočka** – 2000 př.n.l. krystal sloužící buď jako zvětšovací sklo nebo k podpalování ohňů, nebo součást teleskopu

Egypt – 8.stol. př.n.l. – hieroglyfy zobrazují používání čočky

Řecko 1.stol.n.l. – čočka použita pro koncentraci slunečních paprsků a zapálení ohně,

**smaragd císaře Nera** - korekční pomůcka/sluneční brýle - k pozorování gladiátorských zápasů

Kolem r. 1000 n.l. – tzv. „**čtecí kameny**“, sférické sklo, pokládaly se na text

První evropské "**prabrýle**" - čočky korigující vidění zasazené do obrouček - se objevily v Itálii v druhé části 13. stol. a jako vynálezce je uváděn **Alessandro de Spina** z Florencie. V té době se brýle již nějaký čas používaly nejen v Evropě, ale i v Číně, není však známo, na kterém kontinentu dřív.



Nero pozoroval gladiátory přes smaragdy (rok 64 n.l.)

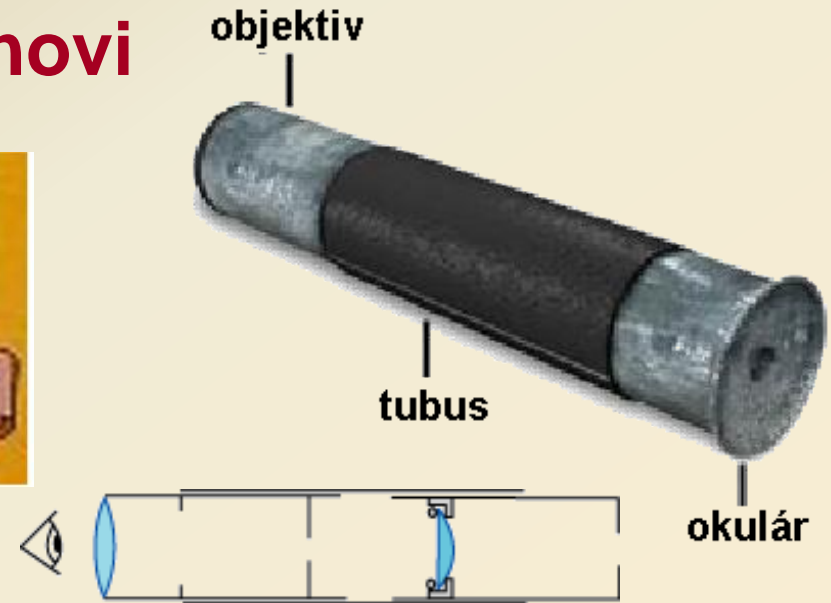


Vytvoření první čočky (13. století)



replika kostěných brýlí – 15 stol.

# Hans a Zacharias Janssenovi



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

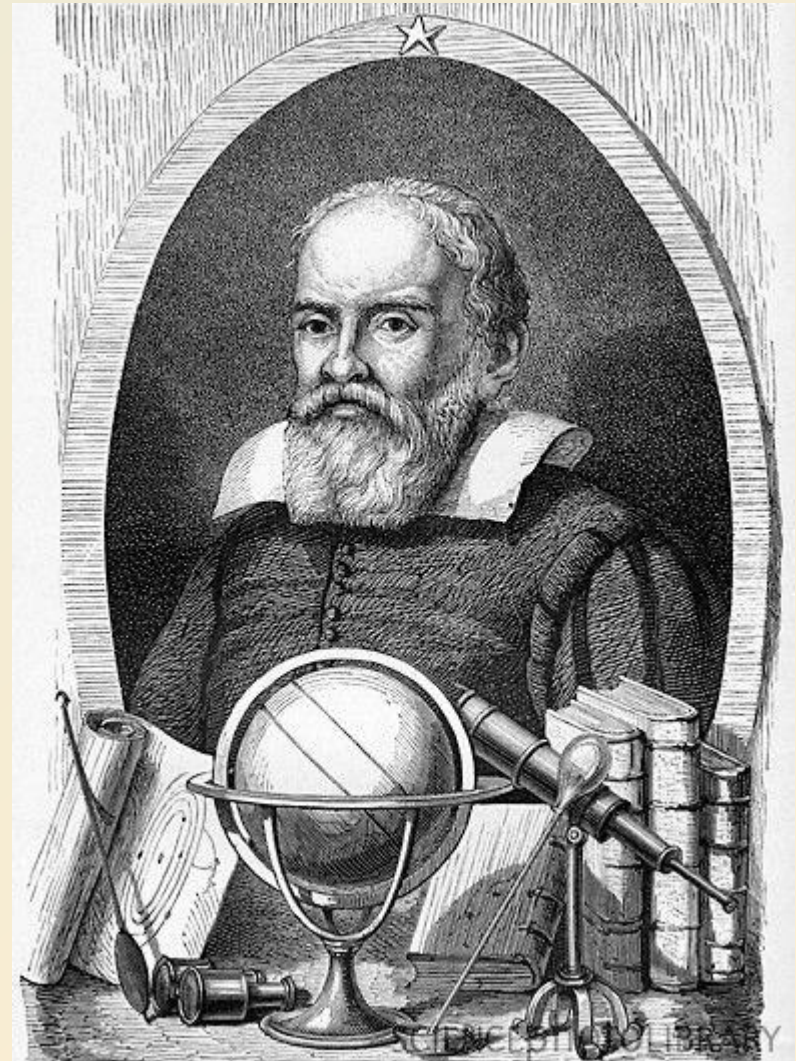
**1590**

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



1609

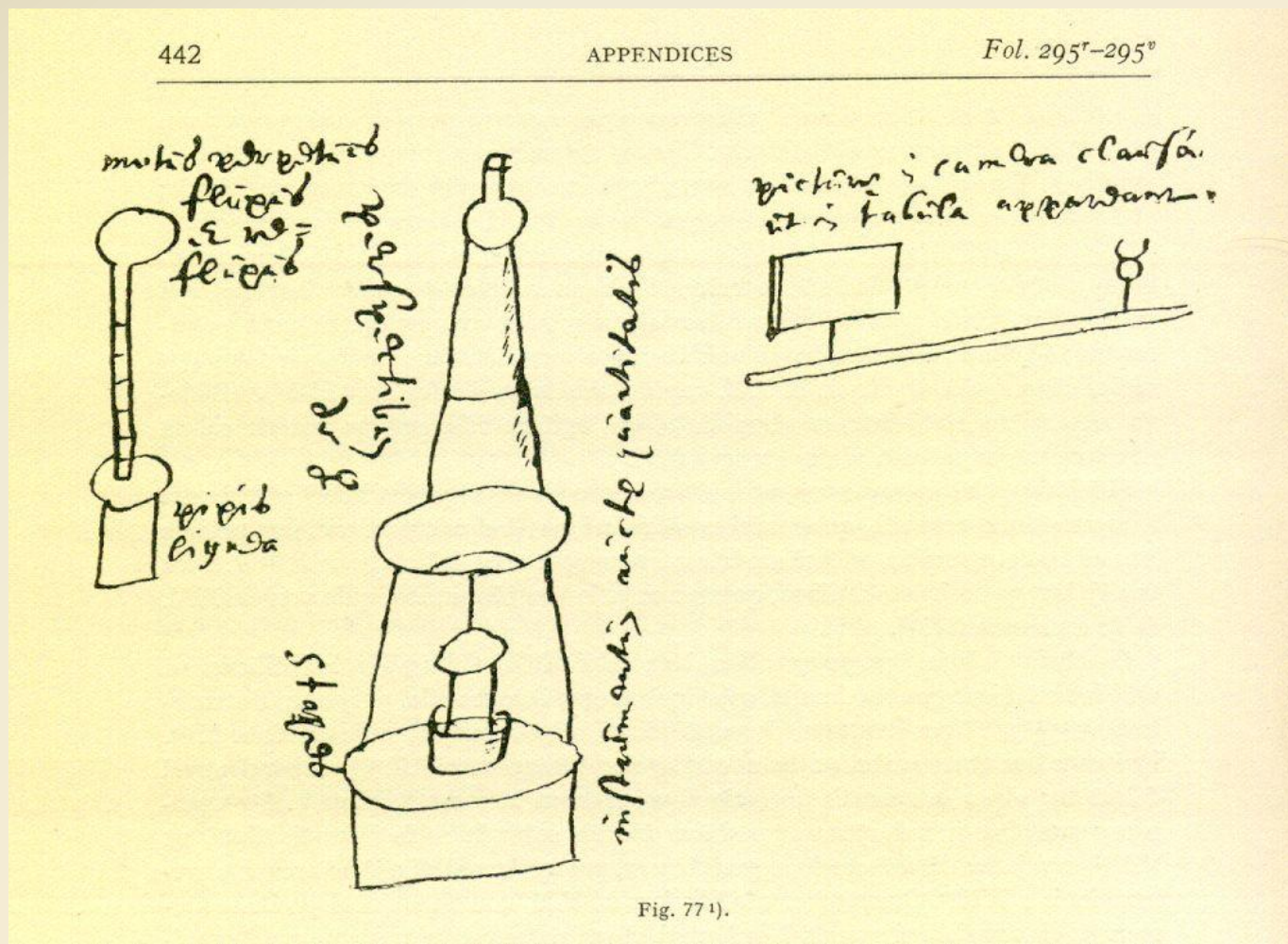
**Galileo Galilei** (1564-1642) zkonstruoval první mikroskop složený ze spojky a rozptylky, nazval ho *occholino*.



1619

**Cornelius Drebbel** (1572-1633) předvedl v Londýně mikroskop založený na dvou spojných čočkách.

Nákres mikroskopu se zachoval na zadní straně Drebbelova dopisu králi Jamesovi I.



1625

**Giovanni Faber** z Bambergu (1574 -1629)  
používá poprvé slovo *mikroskop* odvozené od  
slova teleskop.



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



1665

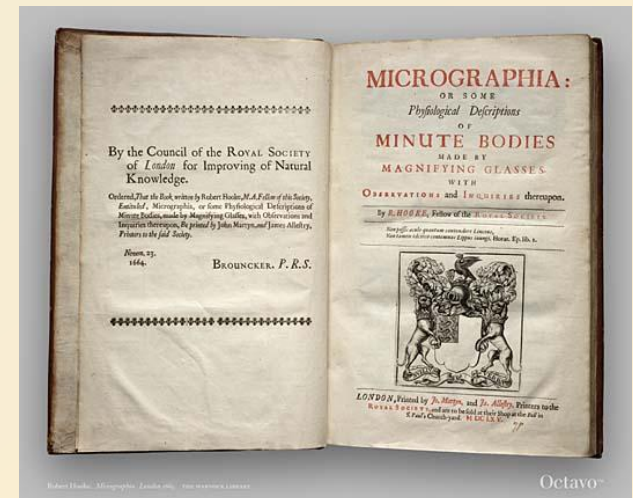
# Robert Hooke

- složený mikroskop



Micrographia

- sledování tenkých řezů korkem - pojem BUŇKA



Octavo

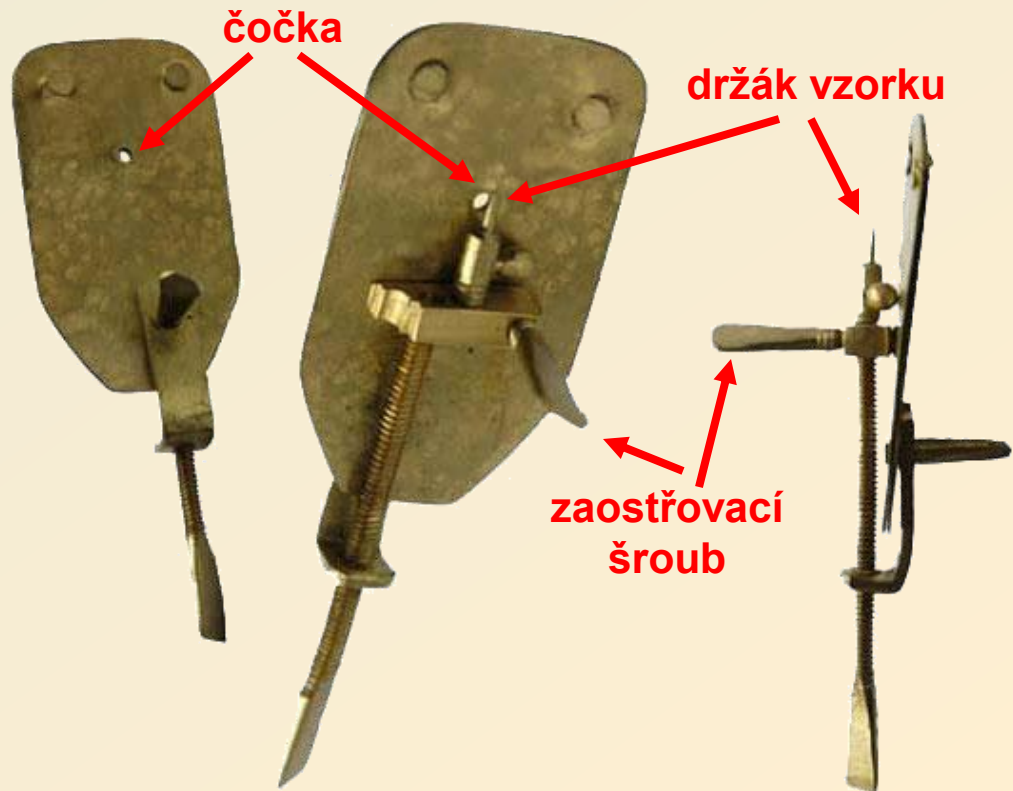
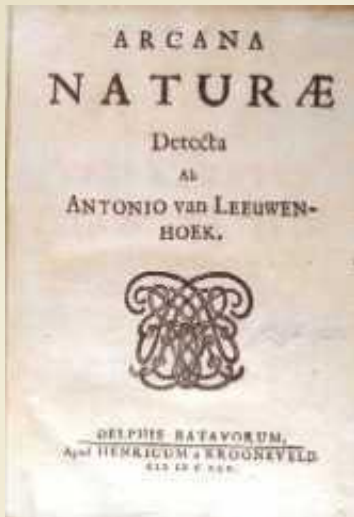


# Antony van Leeuwenhoek

(1632 - 1723)

## Jednoduchý mikroskop (1660, 1674)

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





# Mikroskopy 17. století



Simple Sliding Rod Microscope (circa 1640s)



Giuseppe Campani Turned Ivory Monocular Microscope (circa 1662)



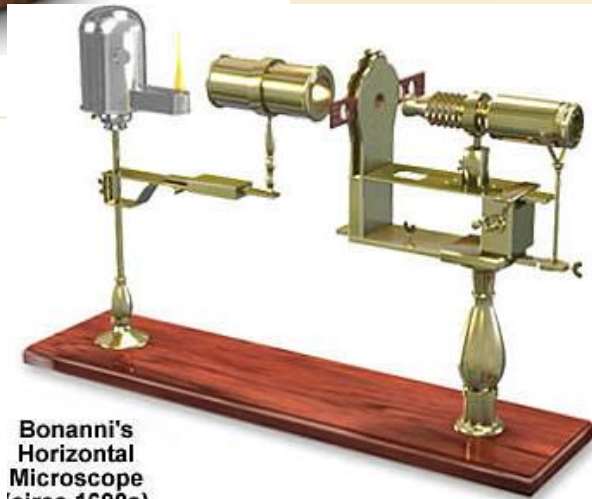
English Tripod Microscope by John Yarwell (circa 1680s)



Depovilly Simple Microscope (circa 1686)



Simple Italian Microscope (circa 1686)



Bonanni's Horizontal Microscope (circa 1690s)

# Mikroskopy 18. století

Simple Monocular  
Hand-Held  
Microscope  
(circa before 1738)



Bone "Flea"  
Microscope  
(circa early 1700s)



Culpeper's  
Microscope  
(circa 1730)



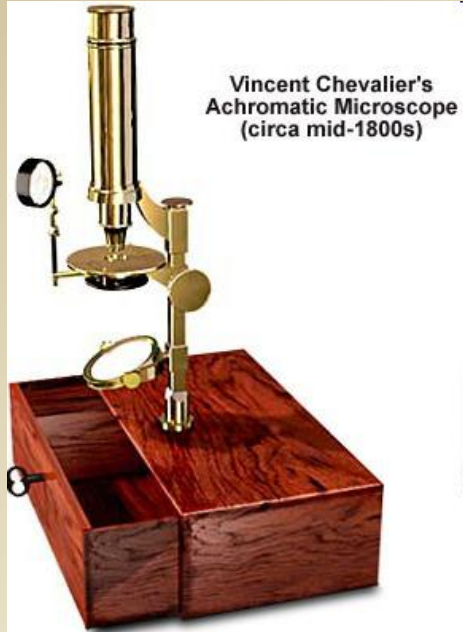
William Robertson's  
Culpeper-Style  
Microscope  
(circa 1749)



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



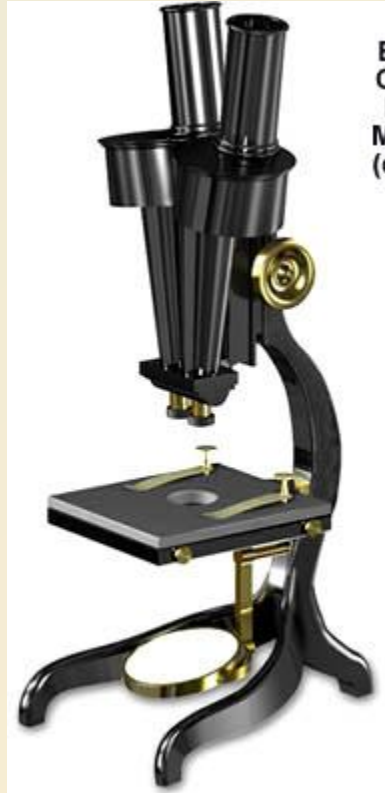
# Mikroskopy 19. století



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



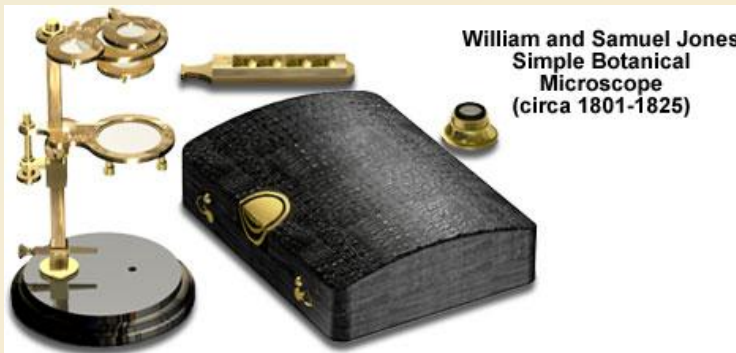
Carl Zeiss  
Simple Dissecting  
Microscope  
(circa 1865)



Ernst Leitz  
Compound  
Binocular  
Microscope  
(circa 1899)



Lister's  
Achromatic  
Microscope  
(circa 1826)



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



Thomas Winter  
Exhibition  
Microscope  
(circa 1810)

# Mikroskopy 20.století

**Nikon's First  
Microscope  
(circa early 1900s)**



**Leitz  
Photomicrographic  
Apparatus  
(circa 1910)**



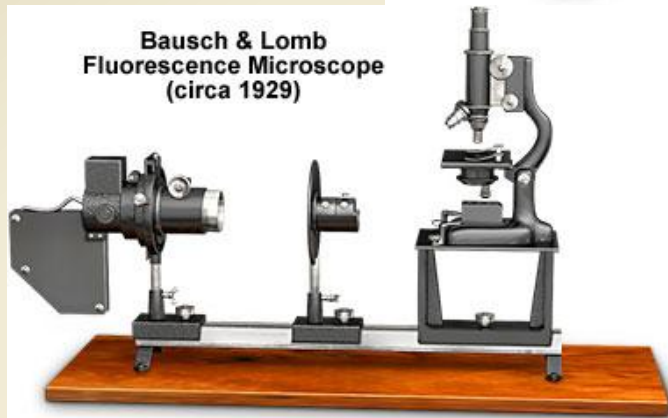
**Zeiss  
Laboratory  
Microscope  
(circa 1930)**



**Bausch & Lomb  
StereoZoom  
(circa 1959)**



**Bausch & Lomb  
Fluorescence Microscope  
(circa 1929)**



**Nikon Diaphot  
Inverted Tissue  
Culture Microscope  
(circa 1985)**



**The Olympus  
Provis AX-70  
(circa 1998)**





# Světelný mikroskop - základní pracovní nástroj

## Účel mikroskopu:

- zvětšení
- rozlišení detailů
- kontrast



Olympus BX 50: procházející světlo



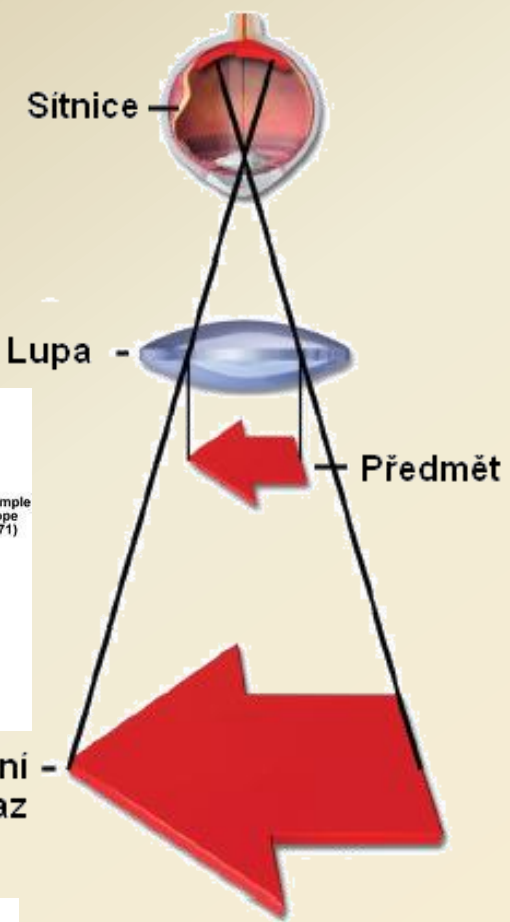
Olympus BX 50: Nomarského kontrast



Olympus BX 50: Fázový kontrast

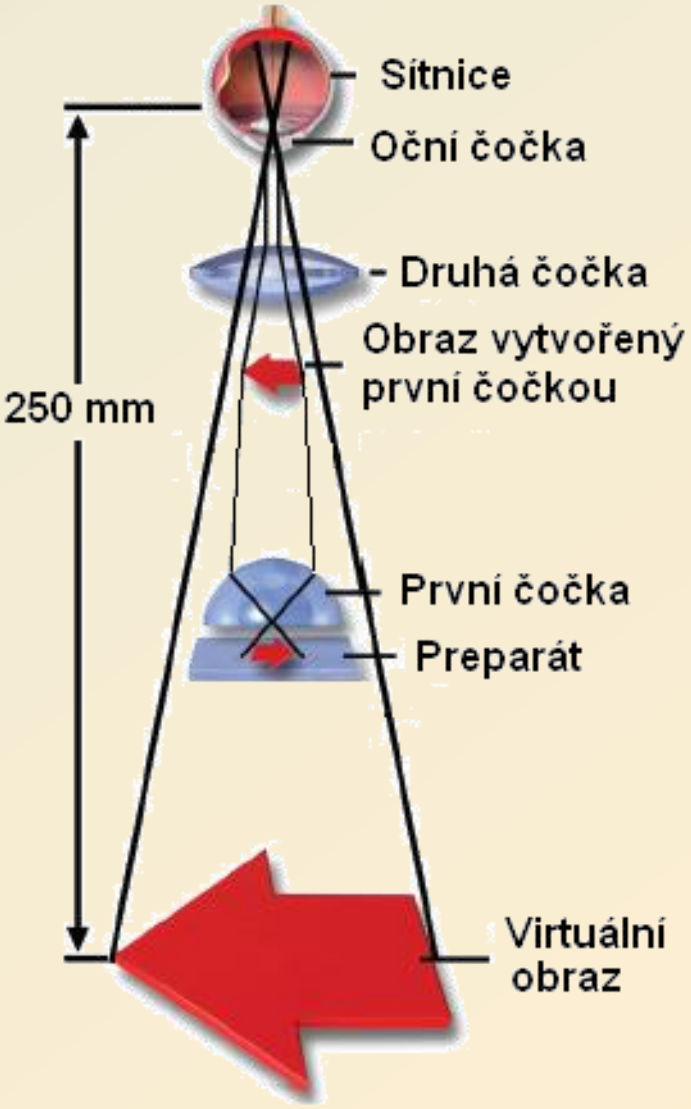
# Jednoduchý mikroskop

jedna čočka nebo jeden systém čoček (lupa)



# Složený mikroskop

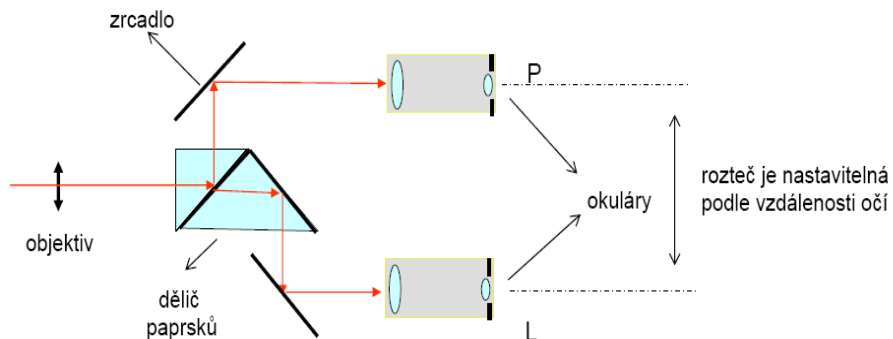
více systémů čoček





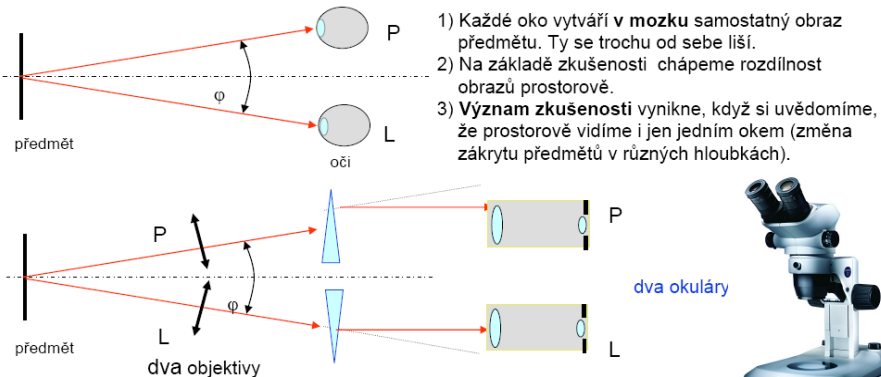
# Jaký je rozdíl mezi binokulárním mikroskopem a stereomikroskopem?

## Binokulární mikroskop



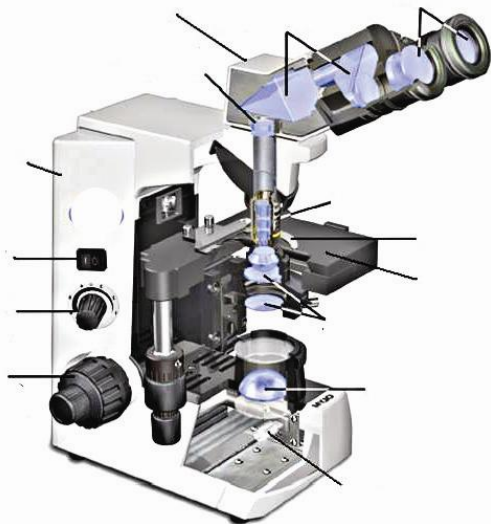
- 1) Binokulární mikroskop **není** stereo mikroskop.
- 2) Každé oko pozoruje svým okulárem meziobraz preparátu. Pozorování oběma očima je méně únavné než jedním okem.
- 3) Současnou **ostrost obou** dílčích obrazů je třeba postupně doladit jednotlivými okuláry.

## Stereomikroskop



- 1) Každé oko vytváří v **mozku** samostatný obraz předmětu. Ty se trochu od sebe liší.
- 2) Na základě zkušenosti chápeme rozdílnost obrazů prostorově.
- 3) **Význam zkušenosti** vynikne, když si uvědomíme, že prostorově vidíme i jen jedním okem (změna zákrytu předmětů v různých hloubkách).

- 1) Stereomikroskop se skládá ze dvou samostatných mikroskopů, jeden pro levé a druhý pro pravé oko.
- 2) Čím větší je úhel  $\phi$ , tím výraznější je stereovjem.



**Stereomikroskop** má dvě samostatné optické dráhy – pro pravé a levé oko zvlášť. Toto uspořádání poskytuje prostorové vidění, trojrozměrný pohled a přímý obraz. Čím je větší úhel  $\phi$  tím je výraznější stereovjem



# Složení mikroskopu CX 31

## ČÁST MECHANICKÁ:

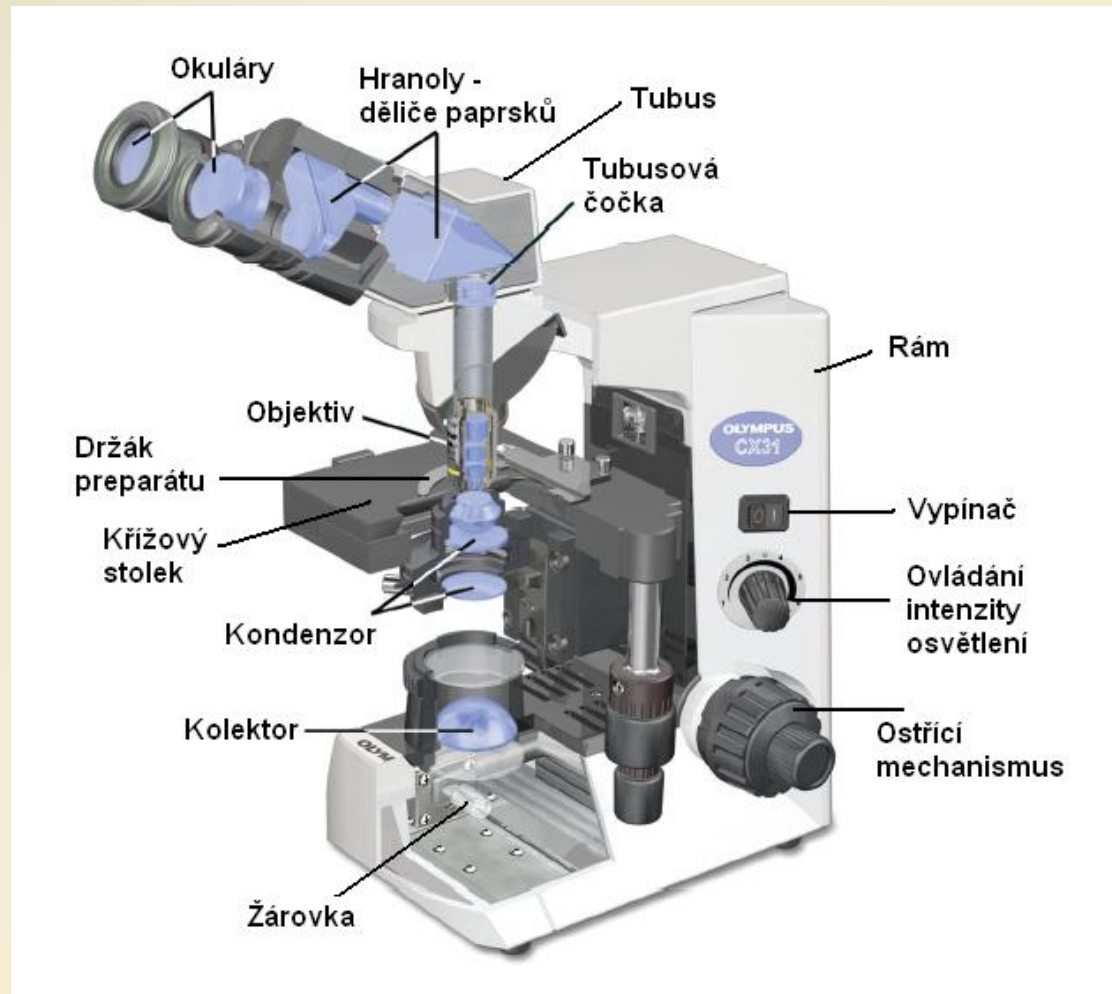
stativ, tubus, revolverový měnič objektivů, stolek, makrošroub, mikrošroub, vypínač, ovládání intenzity světla

## ČÁST OSVĚTLOVACÍ:

zdroj světla, zrcátko, polní clona, kondenzor, aperturní clona

## ČÁST OPTICKÁ:

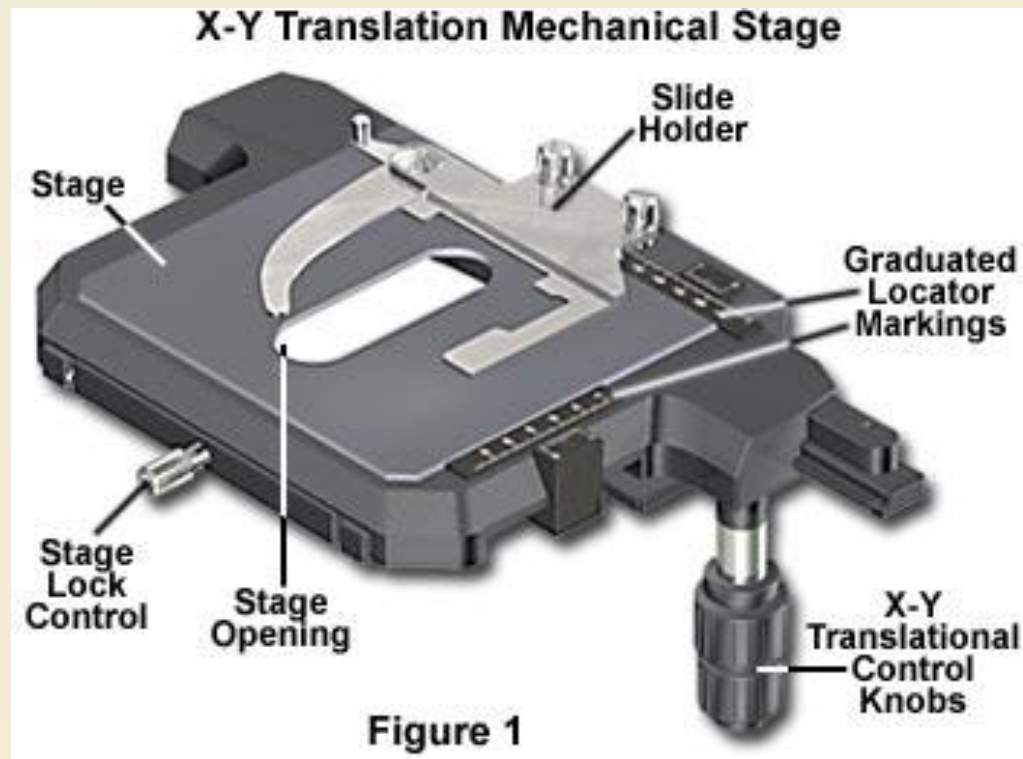
objektivy, okuláry



# Část mechanická

**Stativ** - tvoří pevnou dolní část mikroskopu. Někdy se ještě rozlišuje na nohu a pevné rameno (zejména u starších typů mikroskopů). Do stativu je zabudováno u moderních mikroskopů osvětlení, u starších typů se prosvětlení preparátu provádělo pomocí zrcátka, které odráželo denní světlo nebo světlo z nezávislé lampy.

**Stolek** - je u běžných mikroskopů tzv. křížový, což znamená, že umožňuje pohyb preparátu v pravoúhlém systému souřadnic, takže je možné si zaznamenat polohu nalezeného objektu a později se k němu vrátit. Pohyb stolku je ovládán dvěma šrouby, jedním pro pohyb podle x-ové souřadnice, druhý pro y-ovou souřadnici. Podložní sklo s preparátem se vkládá do držáku neboli vodiče preparátu a je přidržováno ramínkem s pružinou.



# Část mechanická

**Revolverový měnič objektivů** - umožňuje plynulou výměnu jednotlivých objektivů při zachování optické osy a hrubého zaostření bez pohybu stolku (tj. zachovává nalezenou pozici na preparátu)

**Tubus** - trubice spojující objektiv s okulárem, která zabraňuje vstupu rušivého světla z okolí. U moderních mikroskopů jsou uvnitř tubusu hranoly rozdělující světelný paprsek přicházející z objektivu do dvou svazků, nasměřovaných do dvou okulárů (binokulární mikroskop), případně se odděluje část paprsků pro snímání obrazu kamerou (trinokulární uspořádání). Binokulární nástavec umožňuje nastavení vzdálenosti okulárů dle vzdálenosti očí pozorovatele a nezávislé zaostření obrazu v každém okuláru (viz dále okuláry).

***Mechanická (optická) délka tubusu*** - vzdálenost mezi horním a dolním koncem tubusu, mění se vzájemným posunem dvou na sebe nasunutých částí,

1. dána výrobcem (160 - 170 mm) a je nutno ji dodržovat - objektivy a okuláry konstrukčně přizpůsobeny
2. nekonečná délka tubusu (vkládání modulů),  $\infty$ , objektivy s korekcí na nekonečno (soustava čoček)

**Zaostřovací šrouby** (makro- na hrubé ostření a mikro- na jemné doostření), které ovládají svislý pohyb rampy, na kterou je připojen jednak vlastní stolek, na nějž se umísťuje preparát, jednak nosič kondenzoru.

**Vypínač, ovládání intenzity světla**



# ČÁST OSVĚTLOVACÍ

Pozorování ve světle **procházejícím x dopadajícím**

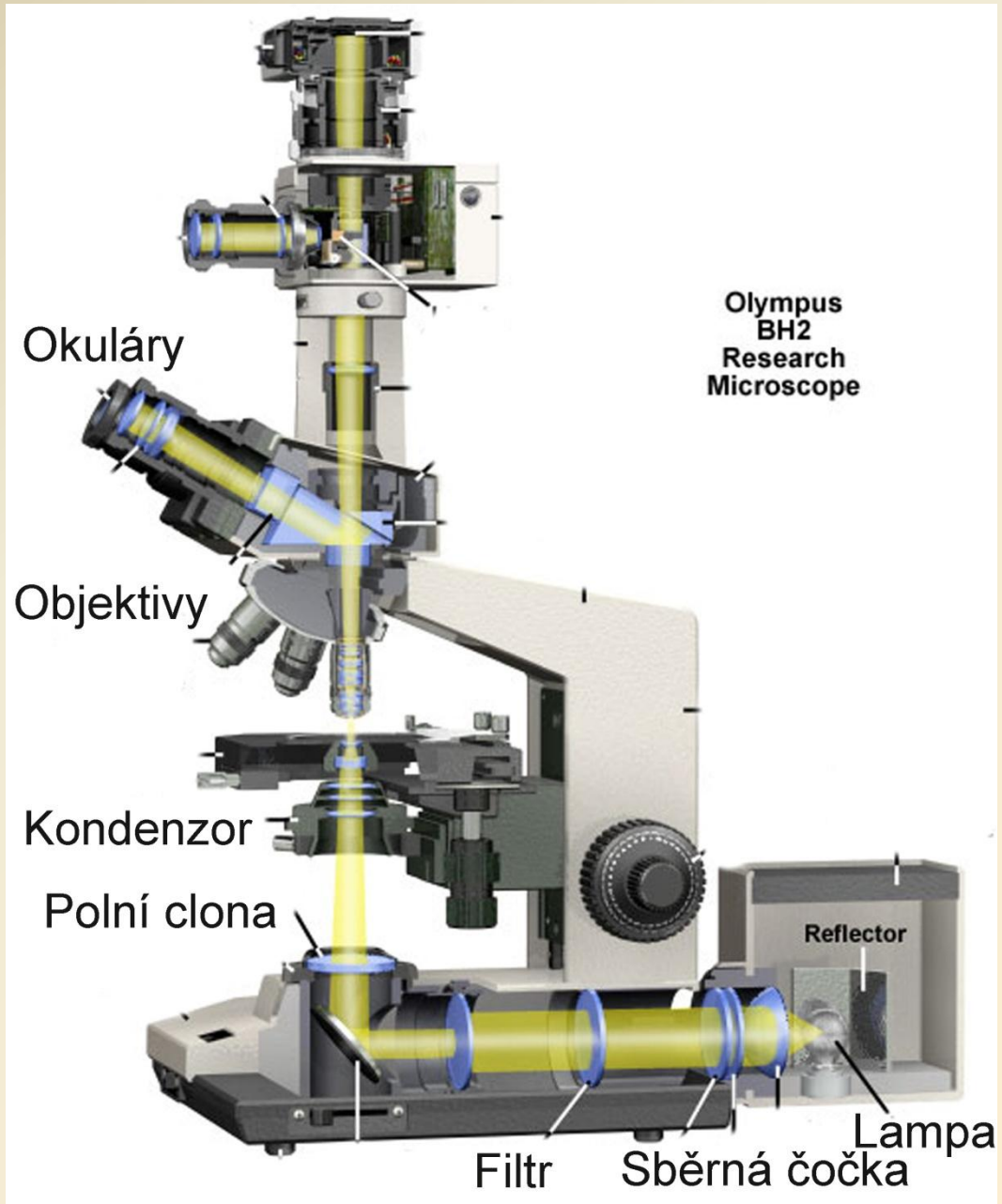
**Zdroj světla** - lampa v noze stativu s kolektorovou čočkou (fixně seřízená), kolektor spolu se **zrcátkem** soustřeďuje světlo do kondenzoru

V dnešní době se pro běžnou světelnou mikroskopii používají nejčastěji **wolfram-halogenové lampy**, které se umisťují do osvětlovací komůrky zabudované do spodní části stativu. Při výměně lampy je třeba dodržovat dvě zásady:

1. zahřátou lampu nechat vždy dostatečně vychladnout (20 min.), protože se při práci zahřívá na velmi vysokou teplotu
2. nikdy nesahat na sklo lampy, protože otisky prstů se vpálí během používání do skla a zkracují životnost lampy; při výměně proto držíme novou lampu přes vnější obal.

Proud světla vycházející z lampy bývá usměrněn **sběrnou čočkou** do světelného kanálu ukončeného **polní clonou**, která vymezuje maximální velikost osvětleného pole (používá se při malém zvětšení, viz práce s mikroskopem). Mezi sběrnou čočku a polní clonu se mohou umisťovat speciální **filtry** (pro vyvážení barev, pro specifickou absorpci určité barvy) zlepšující kontrast.

# ČÁST OSVĚTLOVACÍ



# ČÁST OSVĚTLOVACÍ

**Kondenzor** - soustřeďuje světlo ze světelného zdroje do kužele, který

*1. rovnoměrně osvětluje preparát*

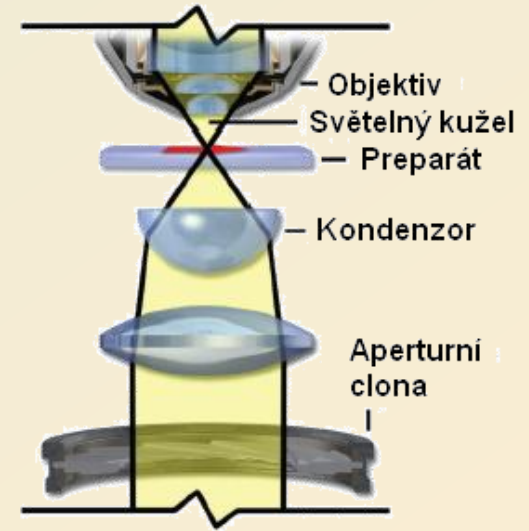
*2. odpovídá numerické apertuře objektivu*

**Při změně objektivu je vhodné upravit N.A. kondenzoru aperturní clonou**

**N.A. kondenzoru = 80% N.A. objektivu**

**Aperturní clona (kondenzorová, irisová)** - umístěna před vlastní soustavu kondenzorových čoček a vymezuje šířku proudu světla, který prochází kondenzorovými čočkami.

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



## Typy kondenzorů

**Abbeův** - nejjednodušší, N.A. = 1,25

- není korigován chromaticky ani sféricky, vhodný pro jednoduché objektivy

**Aplanatický** – korekce sférické vady

**Achromatický** – korekce chromatické vady

**Aplanaticko-apochromatický** – korigován pro obě vady



Abbeův



Aplanaticko-achromatický

# VADY OPTICKÉHO ZOBRAZOVÁNÍ

Vady čoček jsou způsobeny jednak vlastním materiálem čoček (vada sférická, astigmatická, koma, vyklenutí zorného pole a distorze), jednak nehomogenním charakterem bílého světla (chromatická vada).

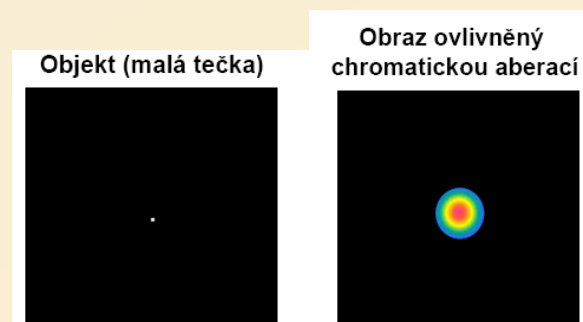
## Chromatická vada

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

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

Chromatickou vadu lze alespoň částečně odstranit vhodnou kombinací spojných a rozptylných čoček (achromatický doublet), což se nazývá **achromatizací** optické soustavy

<http://www.olympusmi-cro.com/primer/java/aberrations/chromatic/index.html>





# VADY OPTICKÉHO ZOBRAZOVÁNÍ

<http://www.olympusmicro.com/primer/java/aberrations/spherical/index.html>

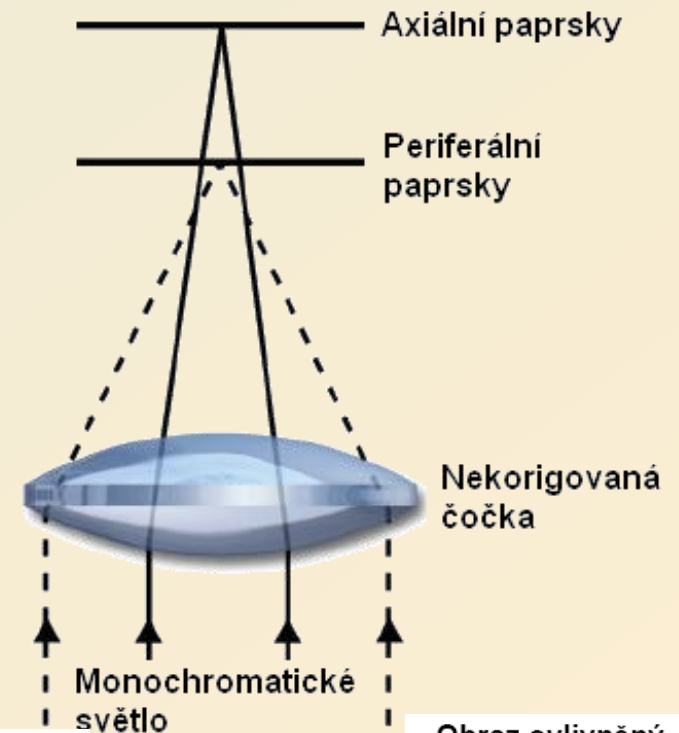
## Sférická vada

Její příčinou je odlišná ohnisková vzdálenost pro různě vzdálené paprsky od optické osy.

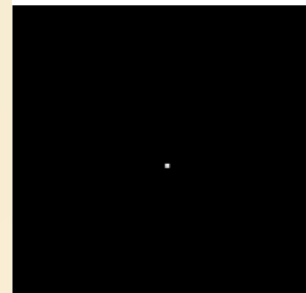
**Sférická** (též **kulová** nebo **otvorová**) **vada** vzniká tehdy, pokud na čočku dopadá široký svazek paprsků rovnoběžných s osou, přičemž paraxiální paprsky se za čočkou setkávají v jiném bodě než okrajové paprsky širokého svazku. (Jako paraxiální paprsky označujeme paprsky v blízkosti optické osy přístroje, které s touto osou svírají jen malý úhel, jsou s ní tedy téměř rovnoběžné)

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

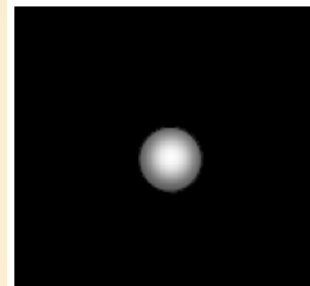
Tuto vadu lze také částečně kompenzovat kombinací čoček.



Objekt (malá tečka)



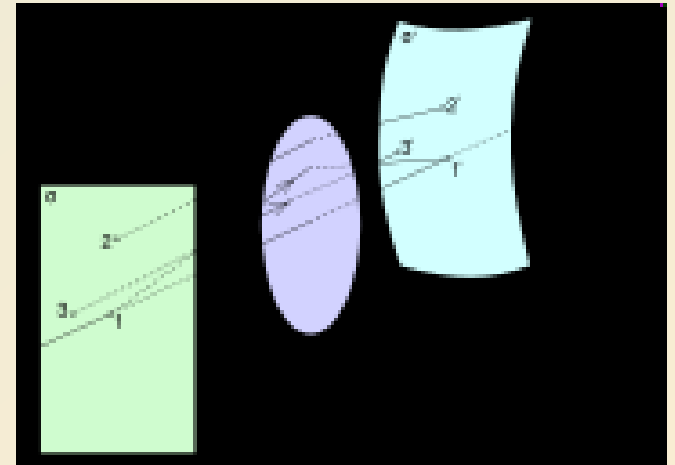
Obraz ovlivněný sférickou aberací



# VADY OPTICKÉHO ZOBRAZOVÁNÍ

## Vyklenutí (rovinnost) zorného pole

Vada souvisí s tím, že body ležící v rovině rovnoběžné s ohniskovou rovinou nevytvoří ostrý obraz na rovinu snímače, ale na zakřivenou plochu, a to vypuklou nebo vydutou. Obraz roviny kolmé k optické ose se tak zobrazí na zakřivené ploše, čímž dochází k rozmazání a neostrosti. Znamená to, **že můžeme zaostřit buď na kraj nebo na střed pole.**



<http://www.olympusmicro.com/primer/java/aberrations/curvatureoffield/index.html>

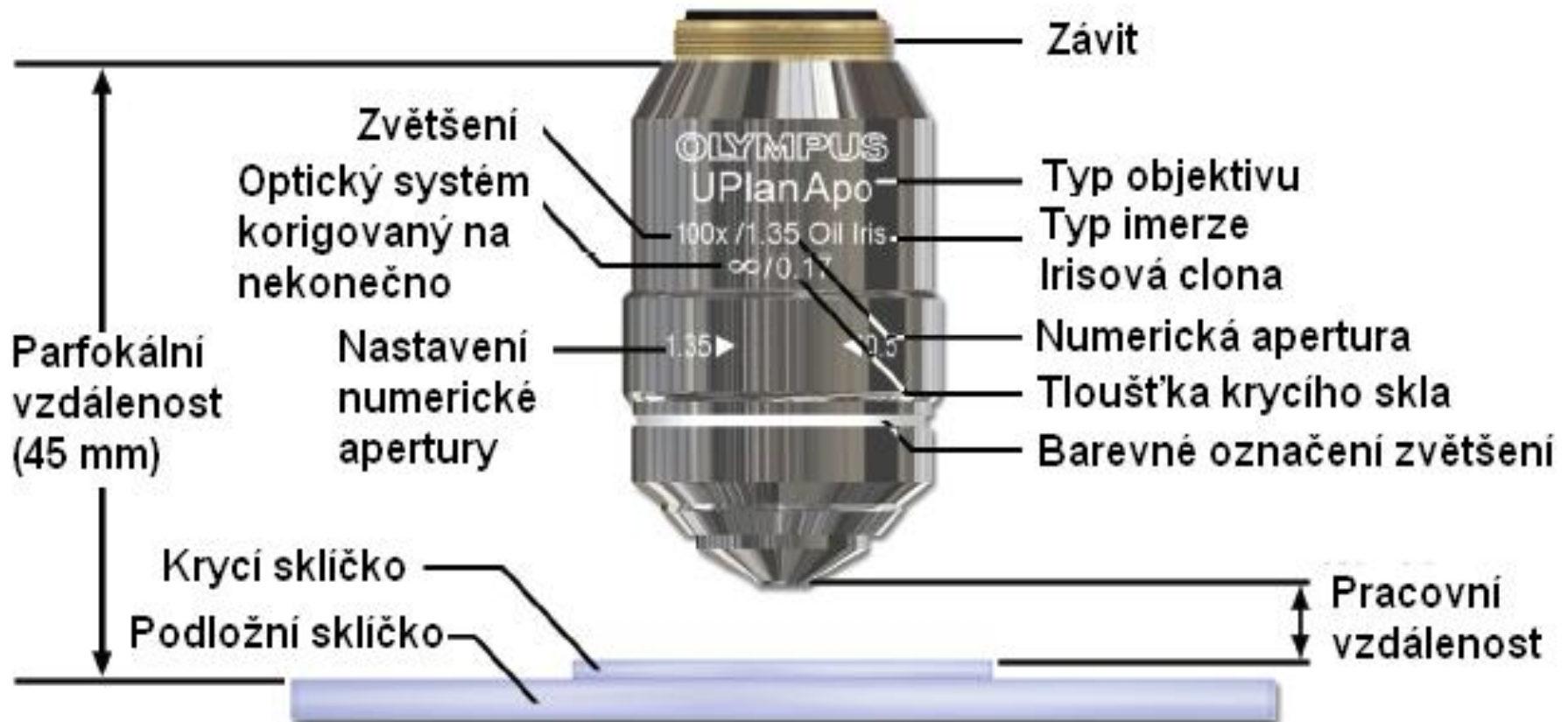
# ČÁST OPTICKÁ

## Objektivy - Nejdůležitější optická součást mikroskopu

Vytváří zvětšený převrácený a skutečný obraz předmětu

Čím je kratší ohnisková vzdálenost objektivu, tím je větší zvětšení

## Značení objektivů



# ČÁST OPTICKÁ

## Zvětšení objektivů

0.5 ×

1- 1.25 ×



2 – 2,5 ×



4 ×, 5 ×



10 ×



20 ×



40 ×, 50 ×



60 ×



100 ×



150 ×, 250 ×

Typy imerze

(proužek blíže k preparátu)

Olej



Voda



Glycerol





# ČÁST OPTICKÁ

## Korekce objektivů

**Achromáty** - korigována chromatickou vadu pro dvě vlnové délky (červené a modré světlo) a sférickou vadu pro zelené světlo. Nejlepších výsledků dosahují při použití zeleného filtru a černobílých filmů pro mikrofotografii.

## Fluority (semi-apochromáty)

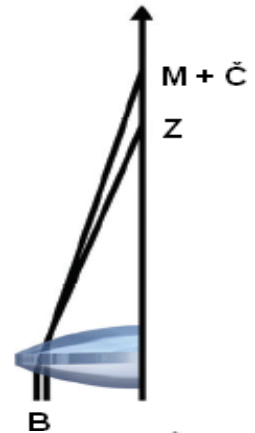
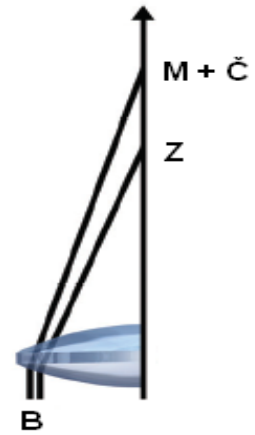
- chromaticky pro modré, zelené a červené světlo
- sférická vada pro modré a zelené světlo
- vhodné pro barevné zobrazení

jejich název vychází z historického postupu výroby - dělaly se z kazivcového (fluoritového) skla. Nyní již tomu tak není, ale protože jsou objektivy určeny hlavně pro fluorescenční aplikace (vynikající optické vlastnosti, dobře propouští UV záření), a jejich název fluorescenci evokuje, není důvod jej měnit. Jsou vhodné i pro pozorování ve světlém poli.

**Apochromáty** - chromaticky pro krátkovlnné modré, zelené a červené světlo

- sférická vada pro krátkovlnné modré a zelené světlo
- nejvyšší kvalita barevného zobrazení

**Plan-** korigováno vyklenutí zorného pole

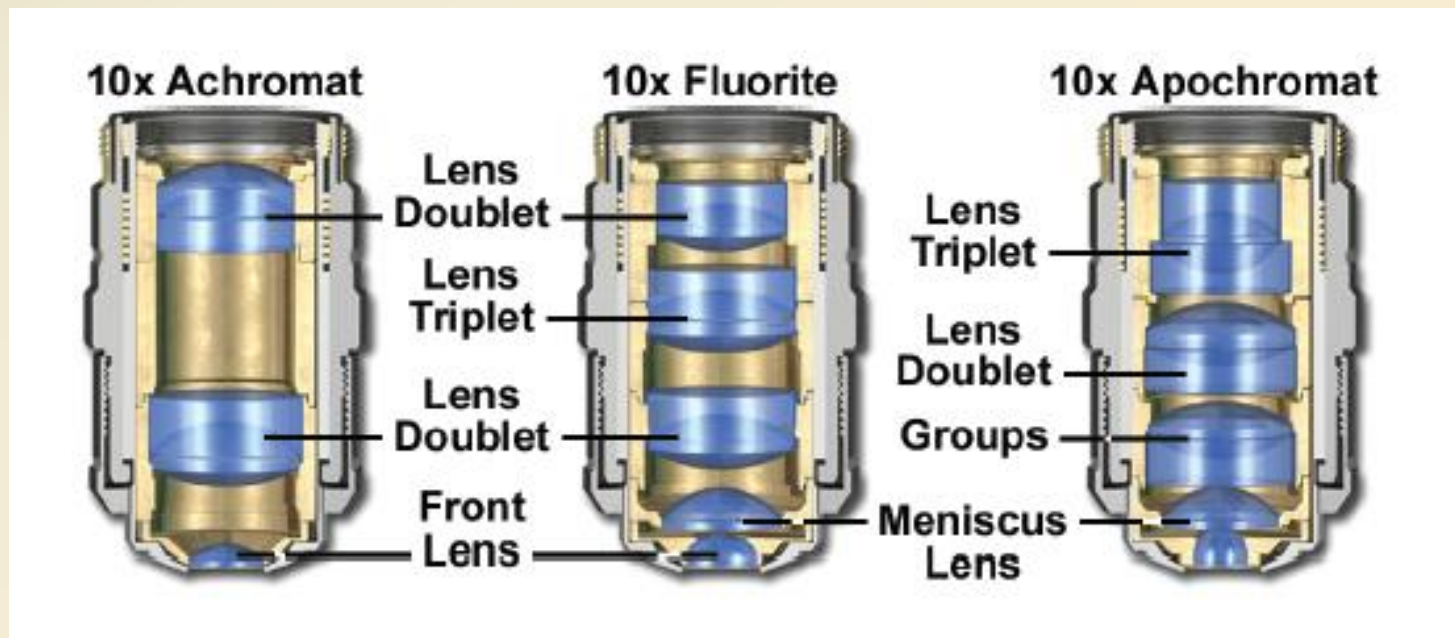
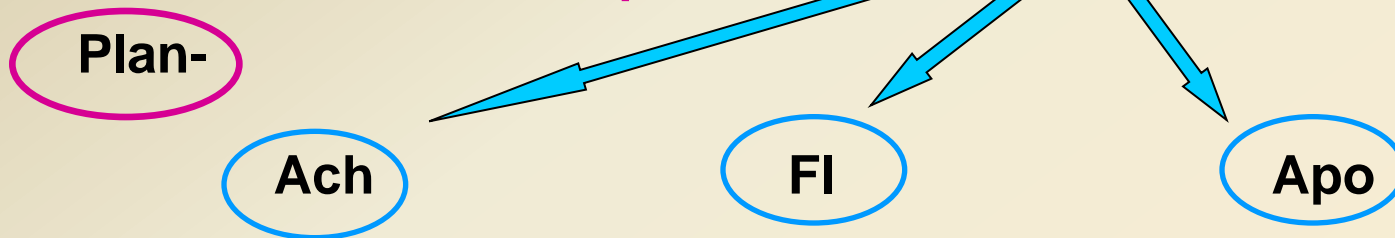


# ČÁST OPTICKÁ

## Typy objektivů

Objektiv by měl poskytovat co nejkvalitnější zobrazení

Kvalita objektivu je určena **stupněm korekce optických aberací a rovinností obrazového pole**

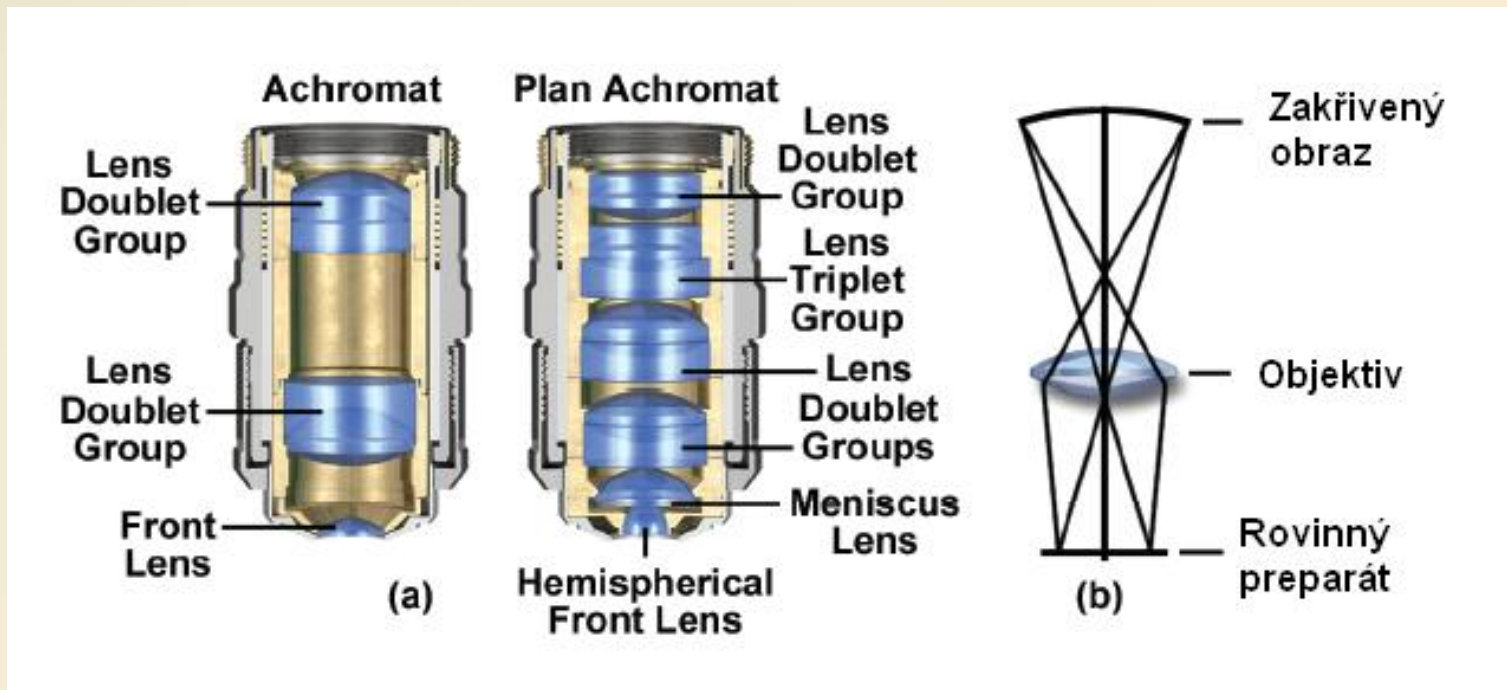


# ČÁST OPTICKÁ

## Korekce vady zklenutí zorného pole - PLAN

Důležitá zejména pro záznam obrazu

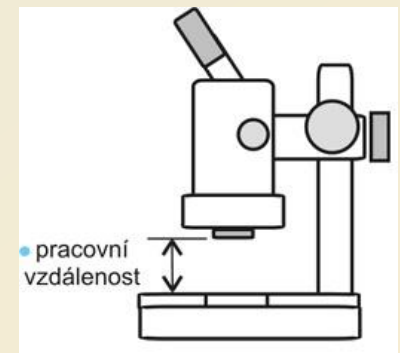
### Rozdíl mezi Ach a Plan Ach



# ČÁST OPTICKÁ

## Další charakteristiky objektivu

**Pracovní vzdálenost:** Vzdálenost mezi preparátem a nejnižším bodem objektivu (větší zvětšení – menší PV)



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

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

**Číslo pole:** Průměr zorného pole okuláru (v mm)

**Průměr zorného pole:** Skutečný průměr pozorovaného pole v mikroskopu (v milimetrech)

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

**Numerická apertura:** Numerická apertura je číselná hodnota. S rostoucí numerickou aperturou roste i rozlišovací schopnost objektivu



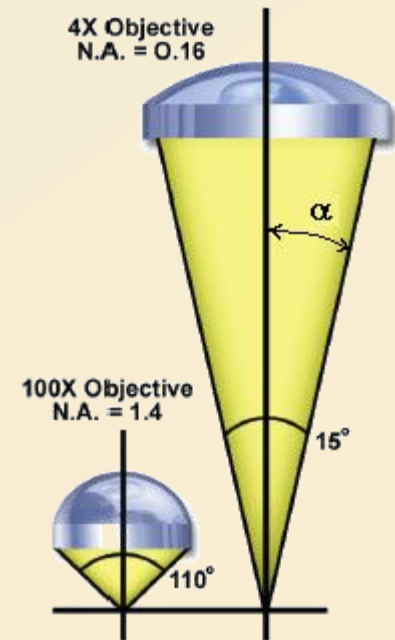
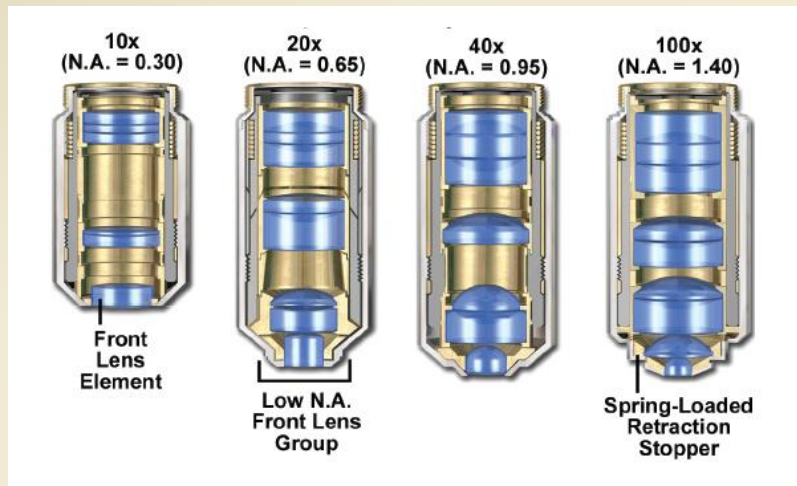
# ČÁST OPTICKÁ

## Numerická apertura objektivu

Numerická apertura (N.A.) =  $n \times \sin\alpha$

N.A.  $\geq 1$  nelze dosáhnout bez imerze

Se zvětšením roste numerická apertura objektivu



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

# ČÁST OPTICKÁ

[http://www.olympusmicro.com/primer/java/aberrations/slip\\_correction2/index.html](http://www.olympusmicro.com/primer/java/aberrations/slip_correction2/index.html)

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

**Objektivy s dlouhou nebo ultradlouhou pracovní vzdáleností**

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

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

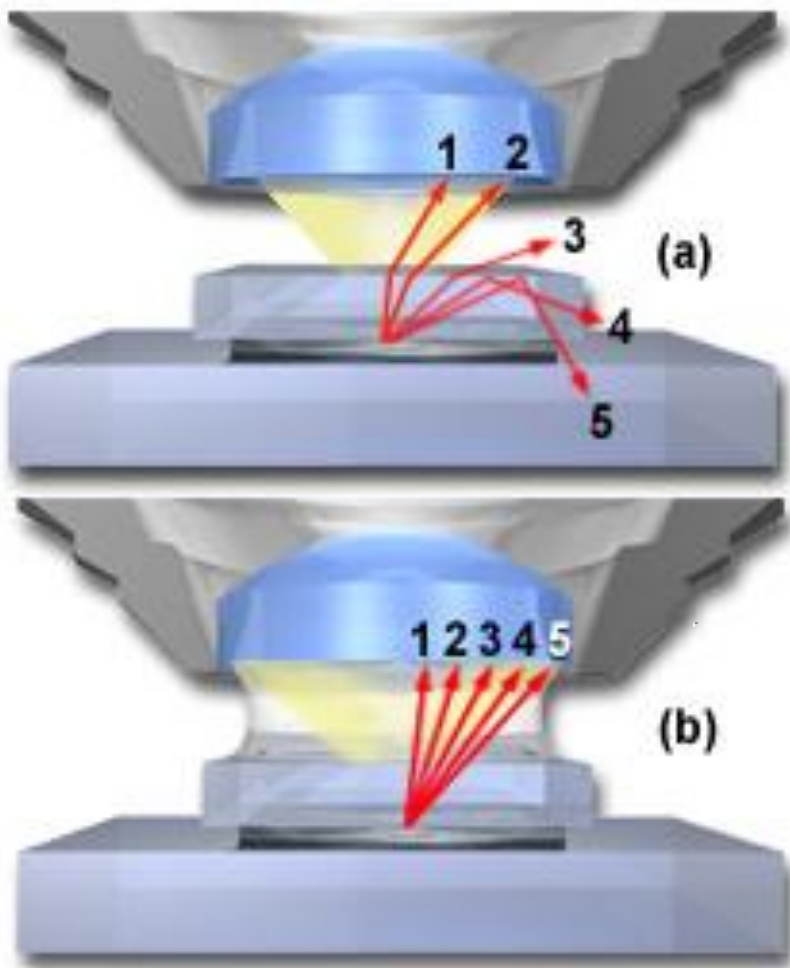
**Odpružené objektivy - zamezení mechanickému doteku čočky**

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

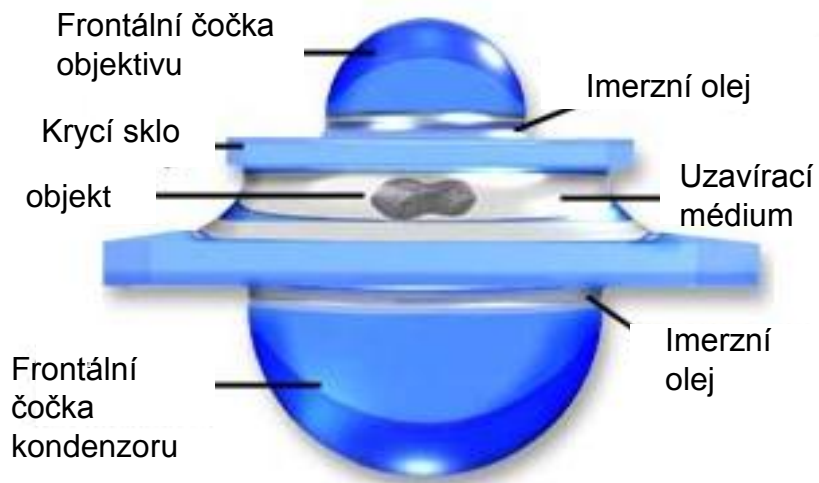
**Suché objektivy - mezi objektivem a krycím sklem je vzduch**

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

## Význam použití imerze



## Homogenní imerzní systém



Imerzní média index lomu

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



# ČÁST OPTICKÁ

## Okulár

Pro optimalizaci výsledků je potřeba vybírat okuláry odpovídající použitým objektivům (jejich typu a korekci vad).

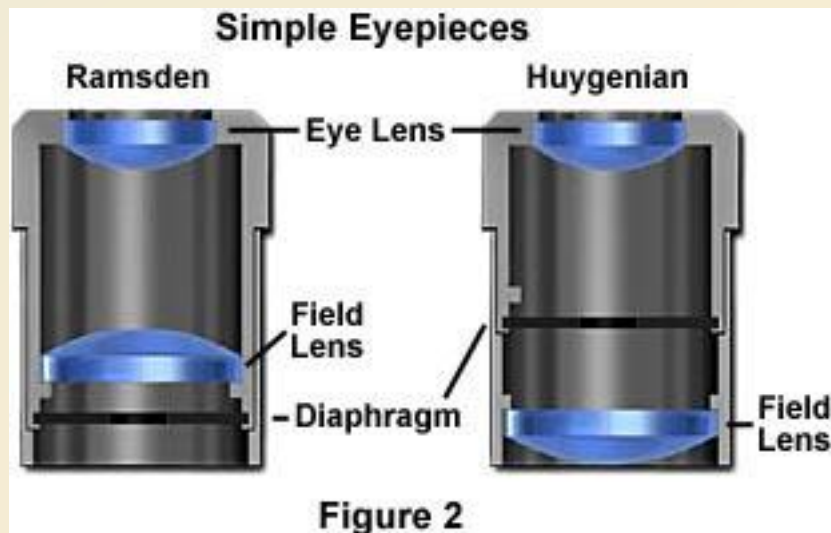
Zvětšuje obraz vytvořený objektivem

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

Podle uspořádání čoček a pevné clony se okuláry dělí na:

negativní (Huygensovy)

pozitivní (Ramsdenovy) - umožňuje snadnou montáž měřítka – pozor na prach



# ČÁST OPTICKÁ

## Okulár

### Typy okulárů

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

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

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

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

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

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

**Projektivy** - okulár používaný při mikrofotografii

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

# Zvětšení mikroskopu

Zvětšení obrazu mikroskopem je dáno zvětšením okulárů a zvětšením objektivu.

## **Užitečné zvětšení mikroskopu:**

- Minimální – numerická apertura objektivu x 500
- Maximální – numerická apertura objektivu x 1000

**Maximální užitečné zvětšení mikroskopu** je však určeno i rozlišovací schopností objektivu. Za podmínek, kdy je minimální vzdálenost dvou rozlišitelných bodů srovnatelná s rozlišovací schopností lidského oka, obraz se nezlepší ani při použití silně zvětšujících okulárů, kdy dostaneme jen rozměrnější obraz bez nových detailů.



# Užitečné zvětšení mikroskopu

**Celkové zvětšení  $\leq 1000 \times \text{N.A. objektivu}$**

**Příklad 1:**

**Objektiv 40  $\times$ , N.A. = 0,65**

Okuláry 15  $\times$                       40  $\times$  15 = 600  $\leq$  650                      O.K.

**Příklad 2:**

**Objektiv 100  $\times$ , N.A. = 1,3**

prázdné zvětšení !!!

Okuláry 15  $\times$                       100  $\times$  15 = 1500  $>$  1300                       $\times$

Okuláry 12,5  $\times$                       100  $\times$  12,5 = 1250  $\leq$  1300                      O.K.

Pozor na další zvětšení při přenosu digitálního obrazu na monitor!

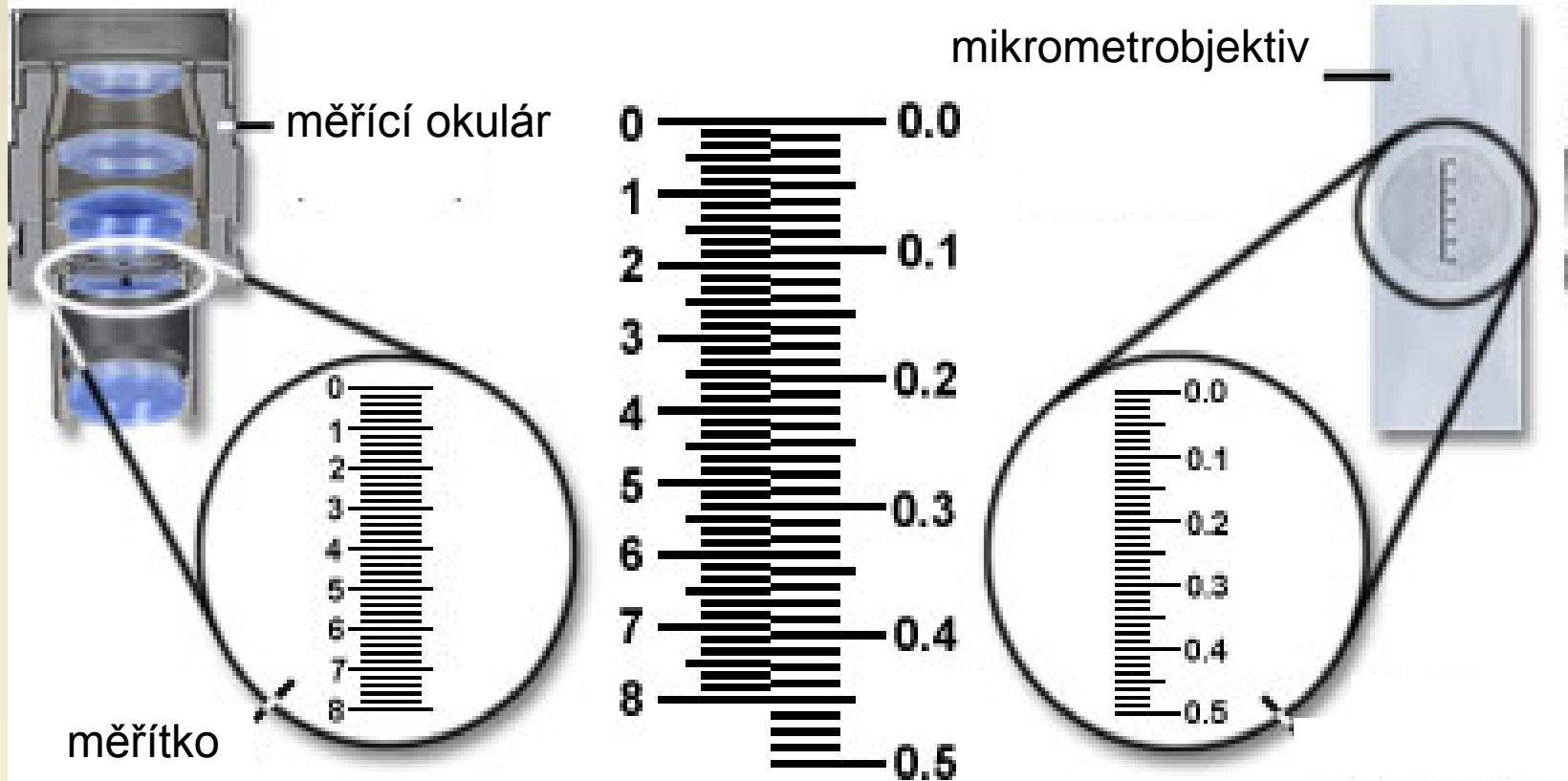
## Měření mikroskopických objektů

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

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



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



## Postup při měření délky, šířky či průměru mikroskopických objektů

**1. kalibrace:** místo obyčejného okuláru vložíme okulár s mikrometrem a místo preparátu objektivový mikrometr (1 mm je na něm rozdělen na 100 dílků, takže jeden dílek odpovídá 10  $\mu\text{m}$ ). Při použití určitého objektivu srovnáme obrazy obou mikrometrů tak, že se jejich stupnice kryjí a odečteme, kolika dílkům objektivového mikrometru odpovídá kolik dílků okulárového mikrometru. Vypočítáme tzv.

**mikrometrický koeficient** pro daný objektiv (tj. kolika mikrometrům odpovídá jeden dílek okulárového mikrometru při použití daného objektivu) vypočítáme jako

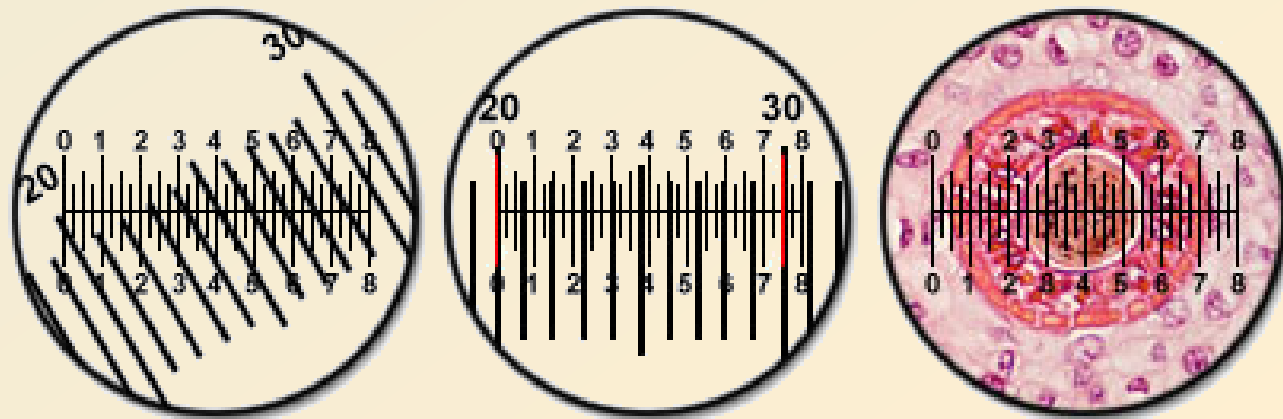
$$(a : b) \cdot 10 [\mu\text{m}]$$

10 dílků měřicího okuláru  
= 75 dílkům mikrometroobjektivu

tj. (750  $\mu\text{m}$ )

1 dílek MO = 75  $\mu\text{m}$

Průměr cévy na preparátu = 70 dílků  
MO = 70 x 75  $\mu\text{m}$



(a)

Figure 1

(c)



# Postup práce s mikroskopem

Mikroskop přenášíme **oběma rukama** (kapotáž) !!!

Manipulujeme pouze pomocí **vroubkovaných** částí !!!

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

## Köhlerovo osvětlení

nastavujeme do optimální polohy:

- clonu osvětlovacího systému
- clonu kondenzoru
- polohu kondenzoru

<http://www.olympusmicro.com/primer/java/microscopy/kohler/index.html>

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

Výsledkem Köhlerova nastavení je rovnoměrné a maximální osvětlení preparátu, ležícího v předmětové rovině. Současně by měla být dosažena nejlepší kombinace mezi rozlišovací schopností a kontrastem.

## Potřeby pro mikroskopování

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

- velikost (mm) a tvar

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

- zabroušené hrany, matované

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

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

Krabice na preparáty

Slohy na preparáty

# KVALITA ZOBRAZENÍ BIOLOGICKÝCH OBJEKTŮ ZÁVISÍ NA

- 1. dostatečném zvětšení obrazu (pozor na maximální užitečné zvětšení = numerická apertura objektivu x 1000)**
- 2. rozlišovací schopnosti mikroskopu (závisí na numerické apertuře objektivu a kondenzoru a kvalitě osvětlení preparátu , tj. optimálním nastavení Koehlerova osvětlení)**
- 3. kontrastu obrazu, který lze efektivně zvýšit pomocí**
  - a) cytologických a histologických barviv**
  - b) optických metod, které převádějí rozdíly v indexu lomu různě tlustých částí objektů na jasový kontrast obrazu**



## Kontrastní metody

Slouží k zvýšení kontrastu obrazu tak, aby byl dobře pozorovatelný.

Nejpoužívanější metody:

Temné pole

**Fázový kontrast**

Polarizované světlo

Reliéfní kontrast

Diferenciální interferenční kontrast

Fluorescence

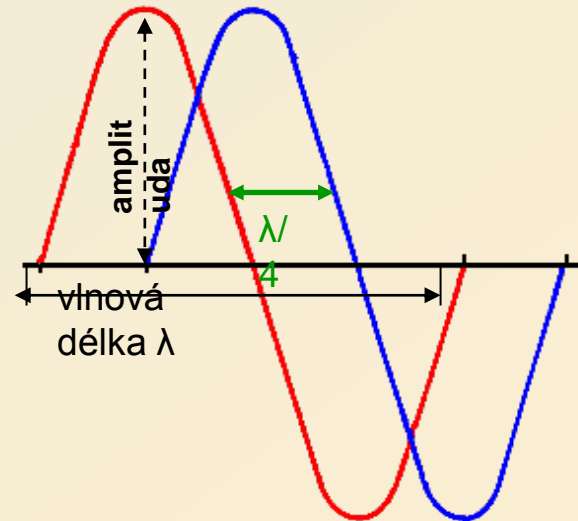
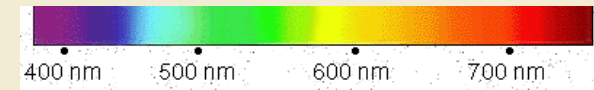
# Metoda fázového kontrastu

Fyzikální principy fázového kontrastu nejsou snadno přístupné. Naopak praktické používání fázového kontrastu ve světlené mikroskopii nečiní většinou žádné potíže. Stručně můžeme říci, že lidské oko je schopno vnímat rozdíly v amplitudě světelného vlnění jako rozdílnou intenzitu světla a rozdíly ve vlnové délce jako různou barvu světla. Nezbarvené (průhledné) objekty jsou pro světlo téměř všude stejně prostupné, ale protože jejich různé části mají různou optickou hustotu, lomí světlo každá z nich pod jiným úhlem. V důsledku toho se světelné paprsky vystupující z preparátu liší fází svého vlnění, amplituda zůstává nezměněna. Změna fáze světla, která nastává při průchodu objektem, není zrakem přímo viditelná. Nemá-li tedy objekt detaily, lišící se kontrastem, je pro lidský zrak průhledný, čirý. U řady biologických objektů tyto vlastnosti převažují a proto je zrakem obtížně identifikujeme. Mikroskop, vybavený pro pozorování ve fázovém kontrastu, nám umožňuje pozorovat i takové objekty, které způsobují jen fázový posun světla. Hlubší poznatky o tomto principu jsou součástí fyzikální optiky.

**amplituda - intenzita světla**

**vlnová délka - barva**

**fázový posun - neviditelný pro lidské oko**



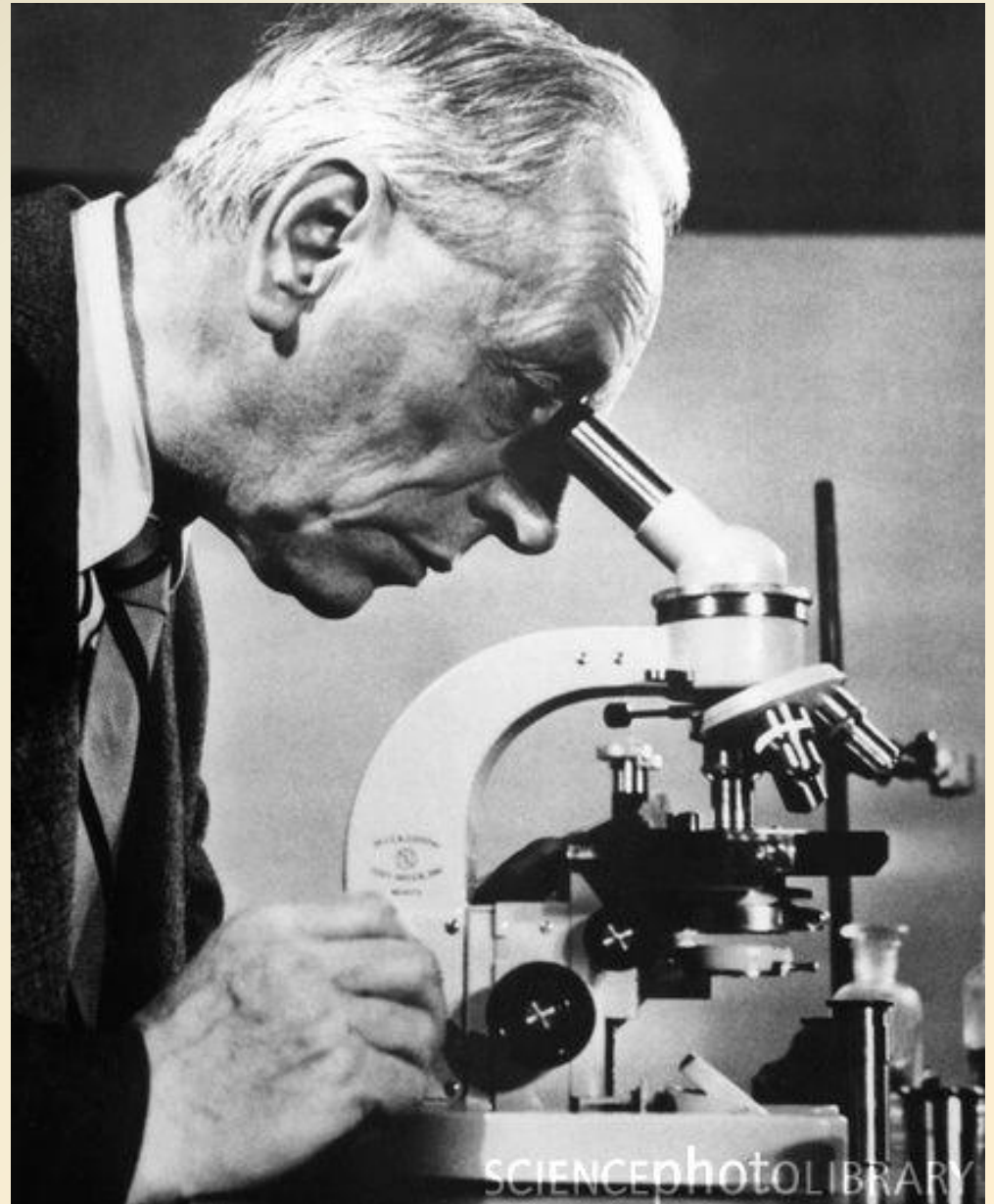
**!!Metoda převádí rozdíly fází na rozdíly intenzit.**

## Fázový kontrast

Na kondenzor se umístí maska s kruhovou štěrbinou, kterou proniká světlo do objektu. V objektivu, v místě obrazu kondenzorové masky, je umístěna fázová maska. V místě štěrbinu u kondenzorové masky je u masky fázové napařená polopropustná vrstva kovu, která mění fázi světla o čtvrtinu vlnové délky. Díky tomuto uspořádání prochází nedifraktované (neohnuté) záření ze zdroje (štěrbinu kondenzorové masky) tou částí fázové masky, která mění fázi světla. Ostatní vlnění, které se na objektu ohnulo a nebo zlomilo, projde beze změny. Při interferenci vln v obrazové rovině se části objektu, které různým způsobem mění fázi světla projeví různou intenzitou světla. **Tato technika tedy převádí rozdíly v posunu fáze světla procházejícího různými částmi objektu, které nevidíme, na rozdíly v intenzitě světla, kterou můžeme pozorovat.**

# Fázový kontrast

**Frits Zernike, 1934 - Nobelova  
cena**





# Metoda fázového kontrastu

Frits Zernike, 1934 - Nobelova cena

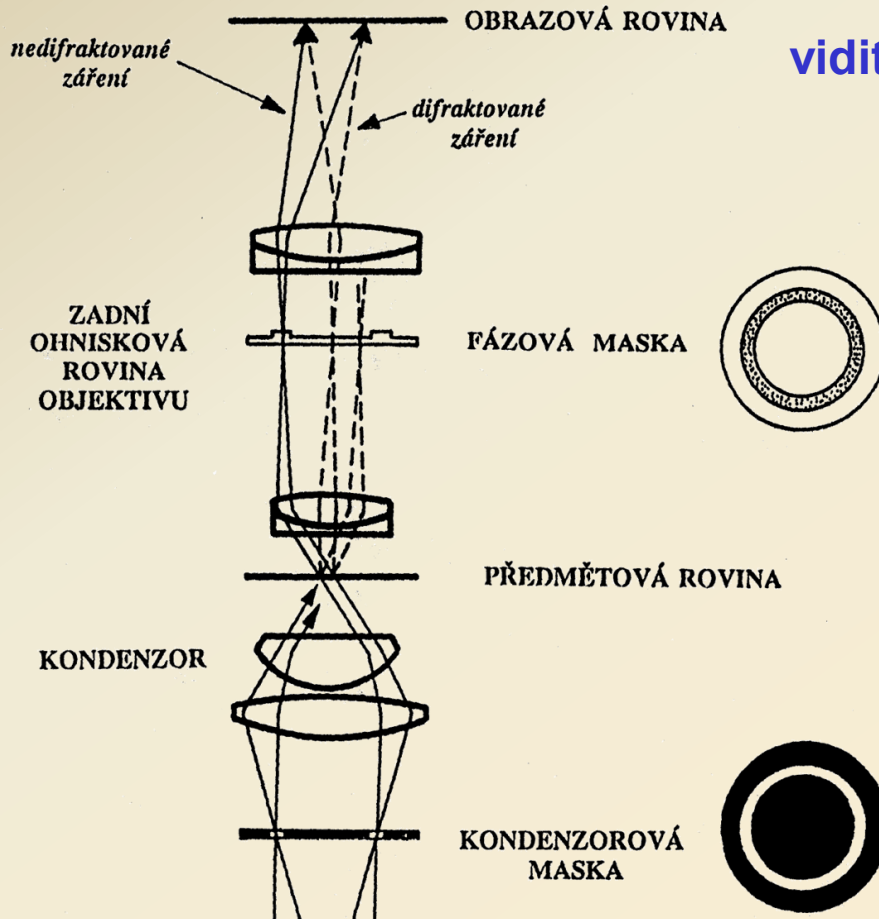
Karl Zeiss, Jena

## ZAŘÍZENÍ PRO FÁZOVÝ KONTRAST

změna fáze vlnění na změnu amplitudy

=

viditelné pro člověka



Průvodní jev fázového kontrastu:

„aureola“ (haló efekt) –  
světlý obrys

kolem objektu

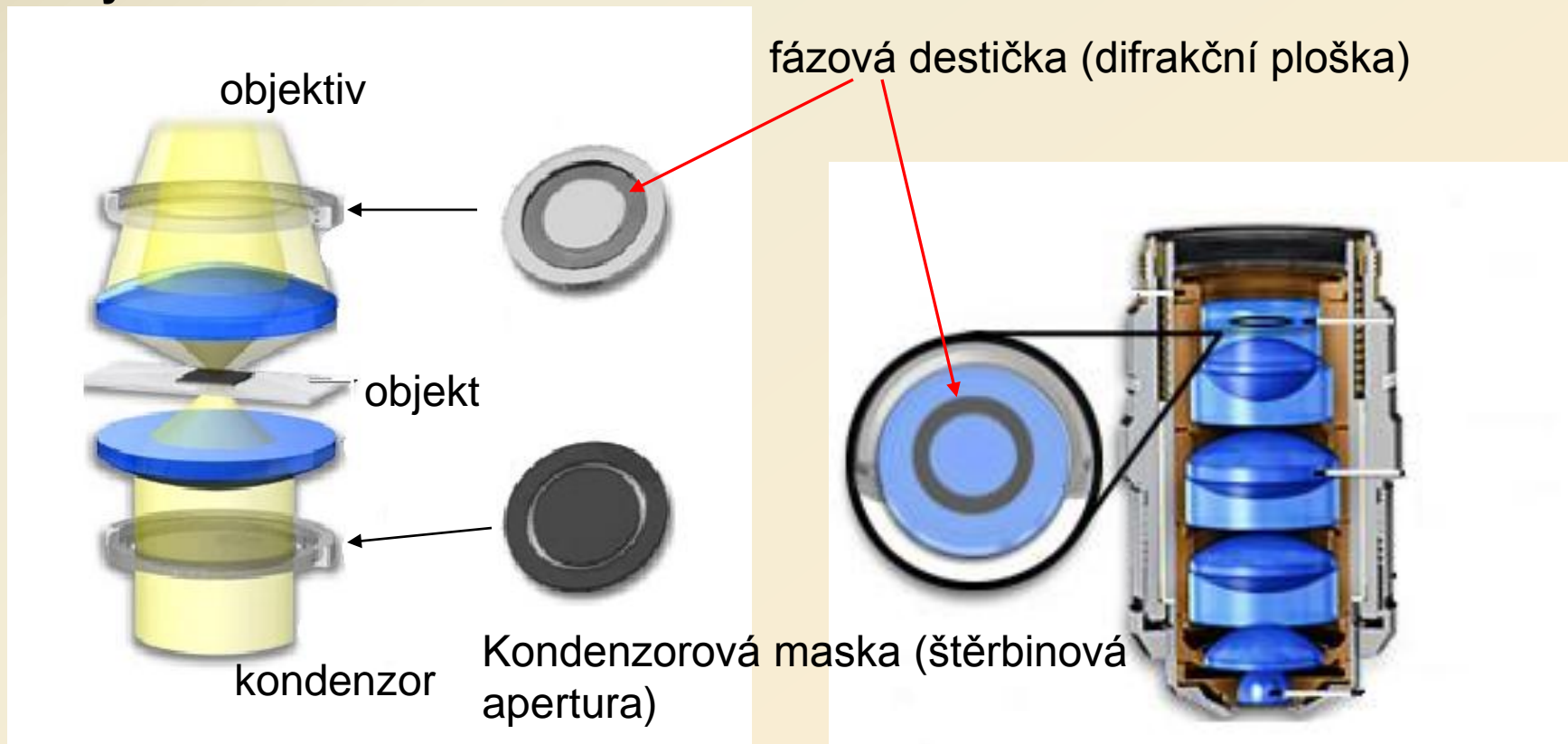
# Objektivy pro fázový kontrast - fázová destička

(převádí neviditelné fázové rozdíly na rozdíly amplitudové)

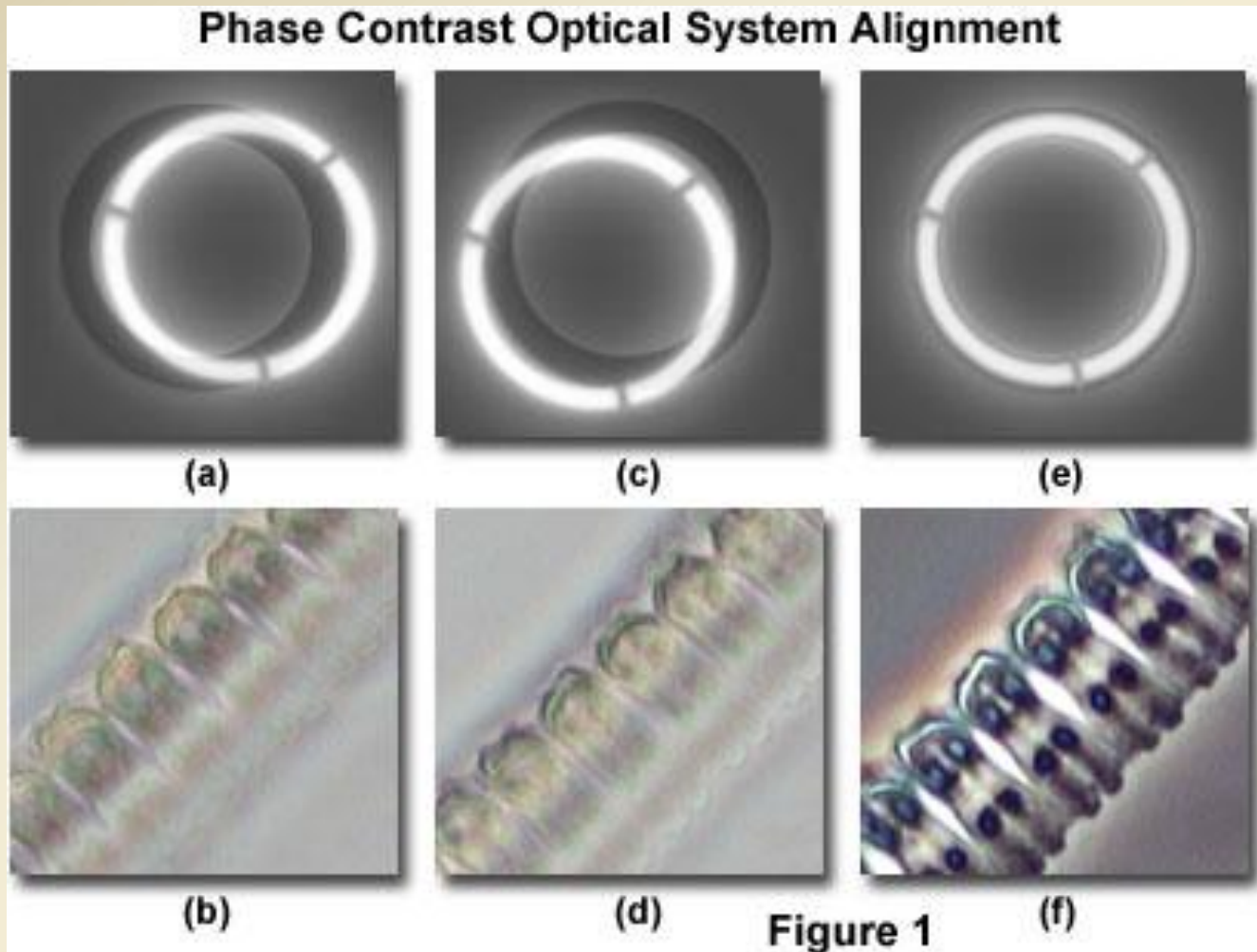
Kondenzor - aperturní kroužek pro různé zvětšení

Centrovací dalekohled - seřízení fázových prstenců

Zelený filtr- 540 nm

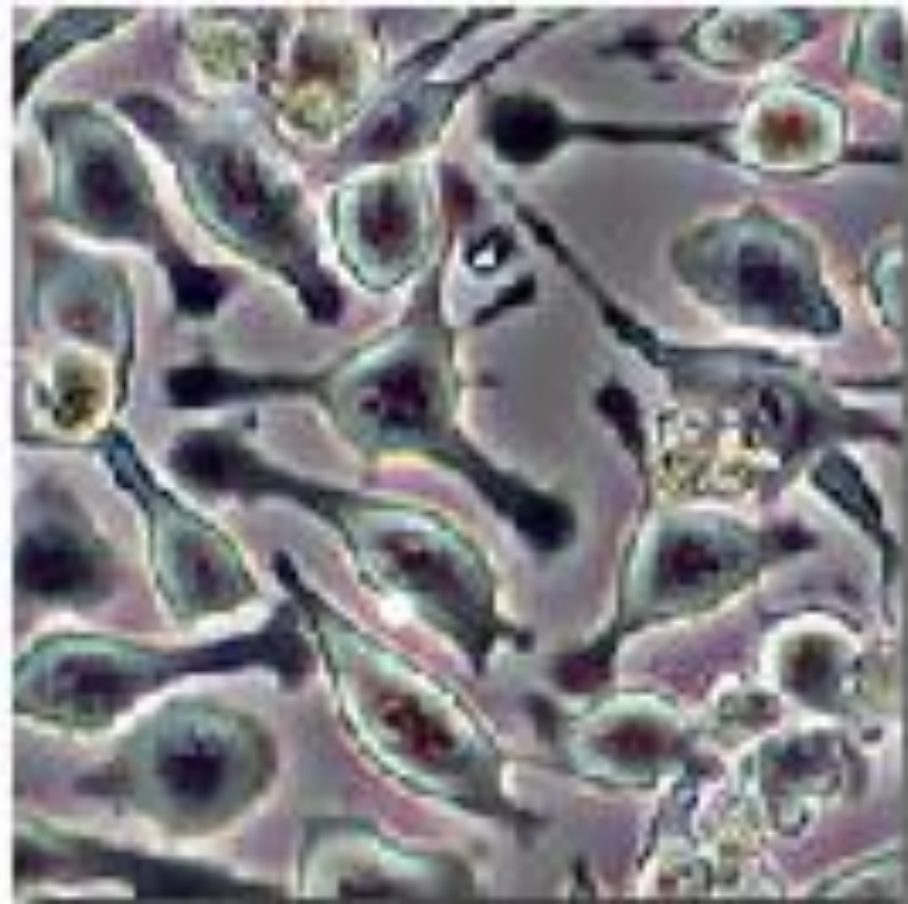


# Seřízení fázových destiček



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

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



**procházející světlo x fázový kontrast**



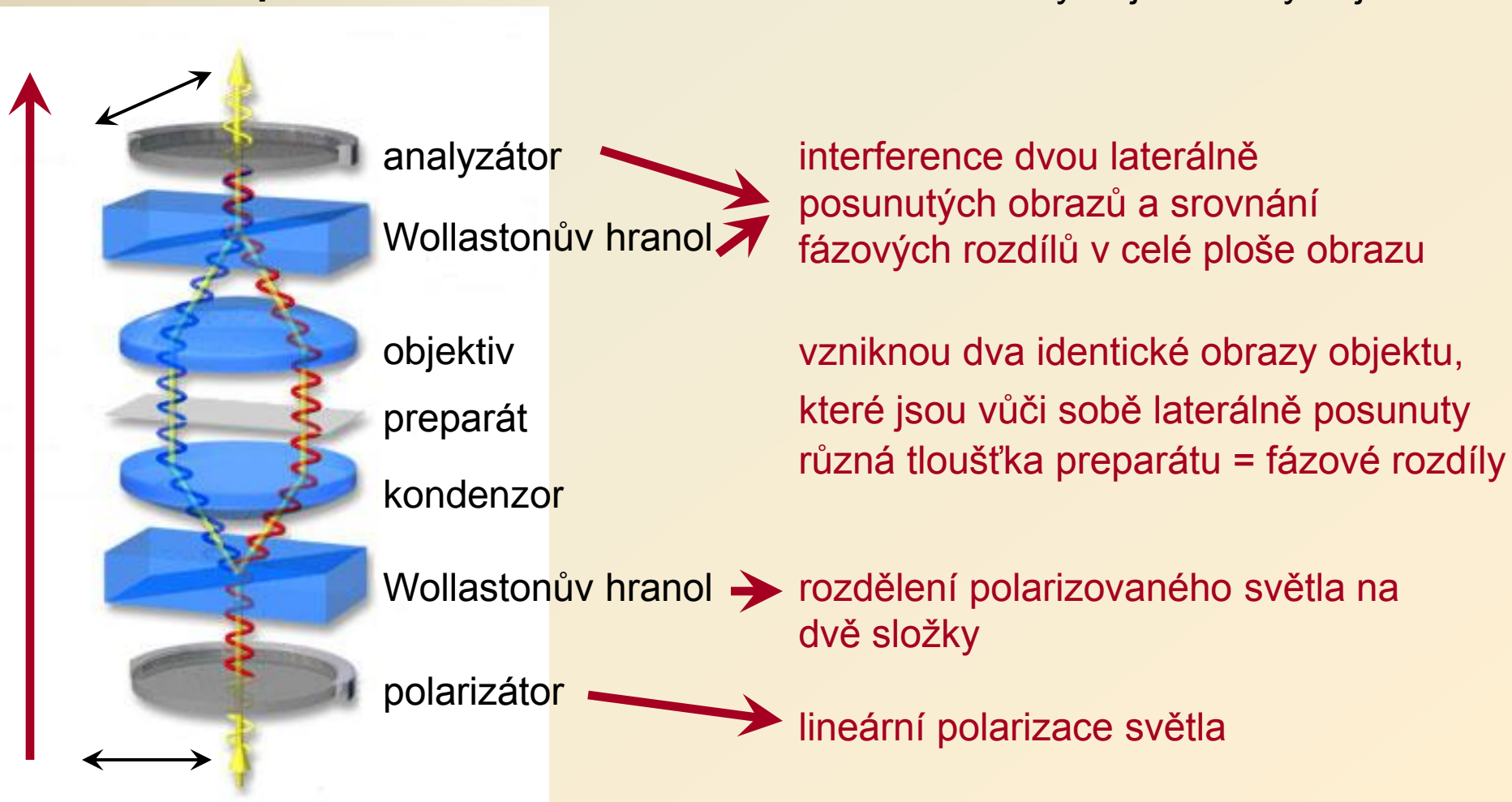
# Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC)

## - povrchová topologie objektu

kolem 1950, Georges Nomarski

mikroskop - 1959 Carl Zeiss

zvětšený obraz vzorku se jeví jako šikmo osvětlený trojrozměrný objekt



# Differential Interference Contrast Microscope Configuration

Olympus Digital BX61 Motorized Fluorescence and DIC Microscope

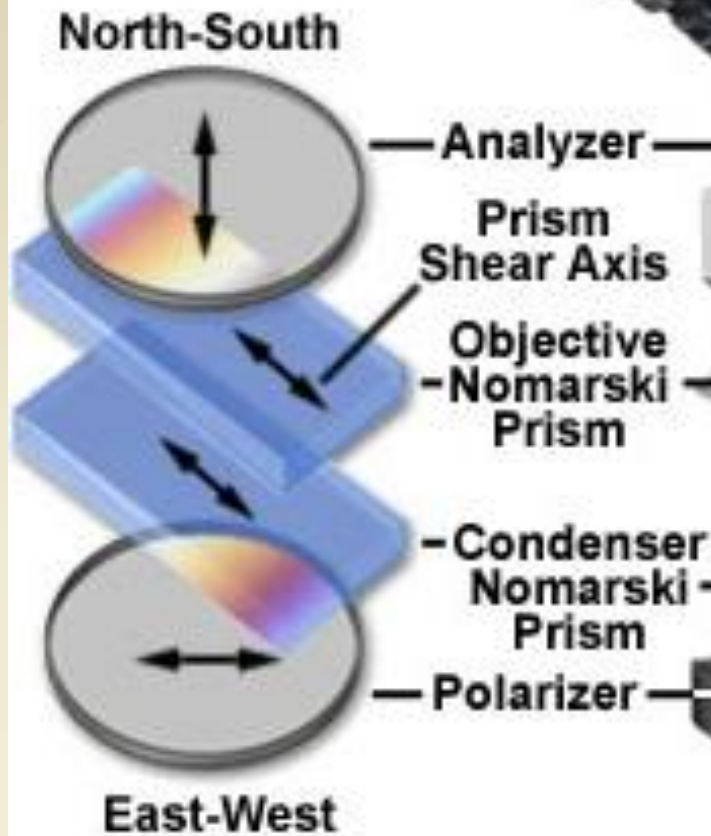


Figure 1



# Universal Condenser Turret DIC Configuration

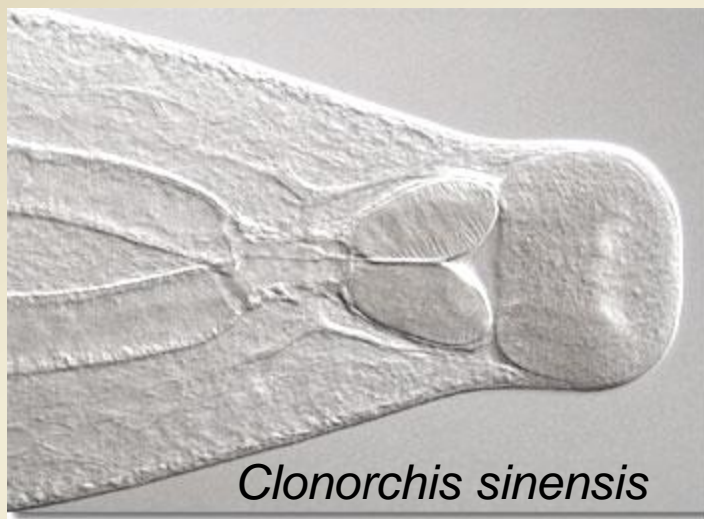
Figure 3







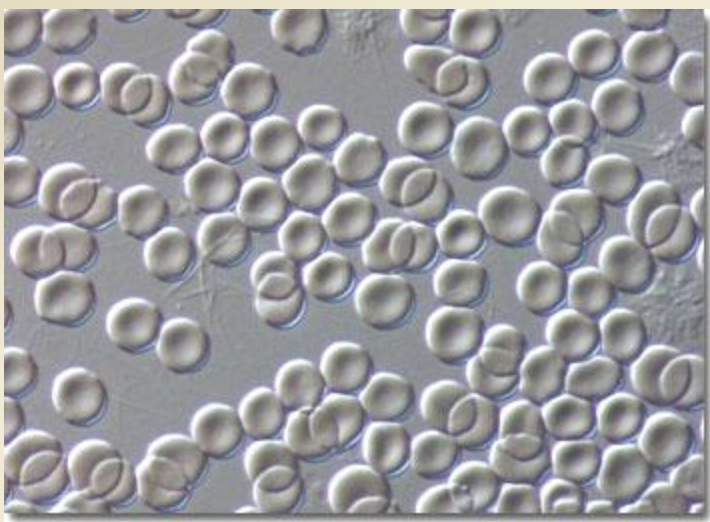
*Ancylostoma  
duodenale*



*Clonorchis sinensis*



pylové zrno borovice



červené krvinky

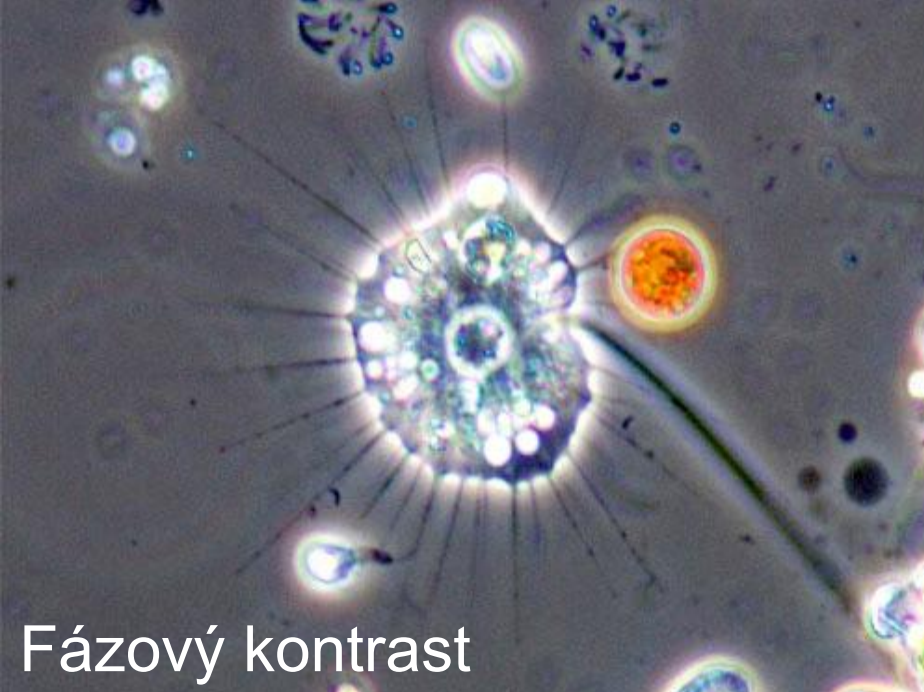


řez ledvinou myši



přichytné svorky diplozoona





Fázový kontrast



DIC





## Nové technologie

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



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

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

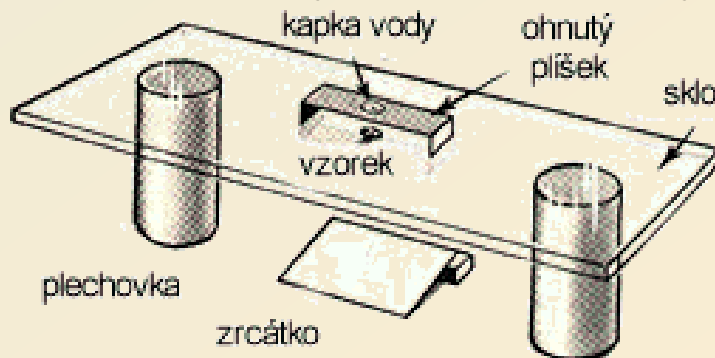
## Čočka z kapky vody

- Model na základě Leeuwenhoekova mikroskopu si můžete snadno sestavit. Jeden z nejjednodušších se dá vyrobit jen pomocí kancelářské svorky. Kleštěmi nejdřív svorku narovnejte (na to je lepší použít kleště s plochými čelistmi). Jeden konec zahněte do smyčky. Ta by měla mít průměr asi 1,5 mm a být co nejkulatější. Snažte se přitom moc nepoškrábat kov, ze kterého je smyčka vyrobena. Potom potřete smyčku trochou oleje nebo sádla, aby dostala jemný povlak. Ponořte ji do vody (nejlépe destilované) a pak ji pomalu vytáhněte ven. Kapka vody, která se na ní uchytlí, bude fungovat jako čočka. Není tak silná jako čočky z Leeuwenhoekova mikroskopu, ale má stejný sférický tvar a bude zvětšovat 2x nebo i vícekrát.

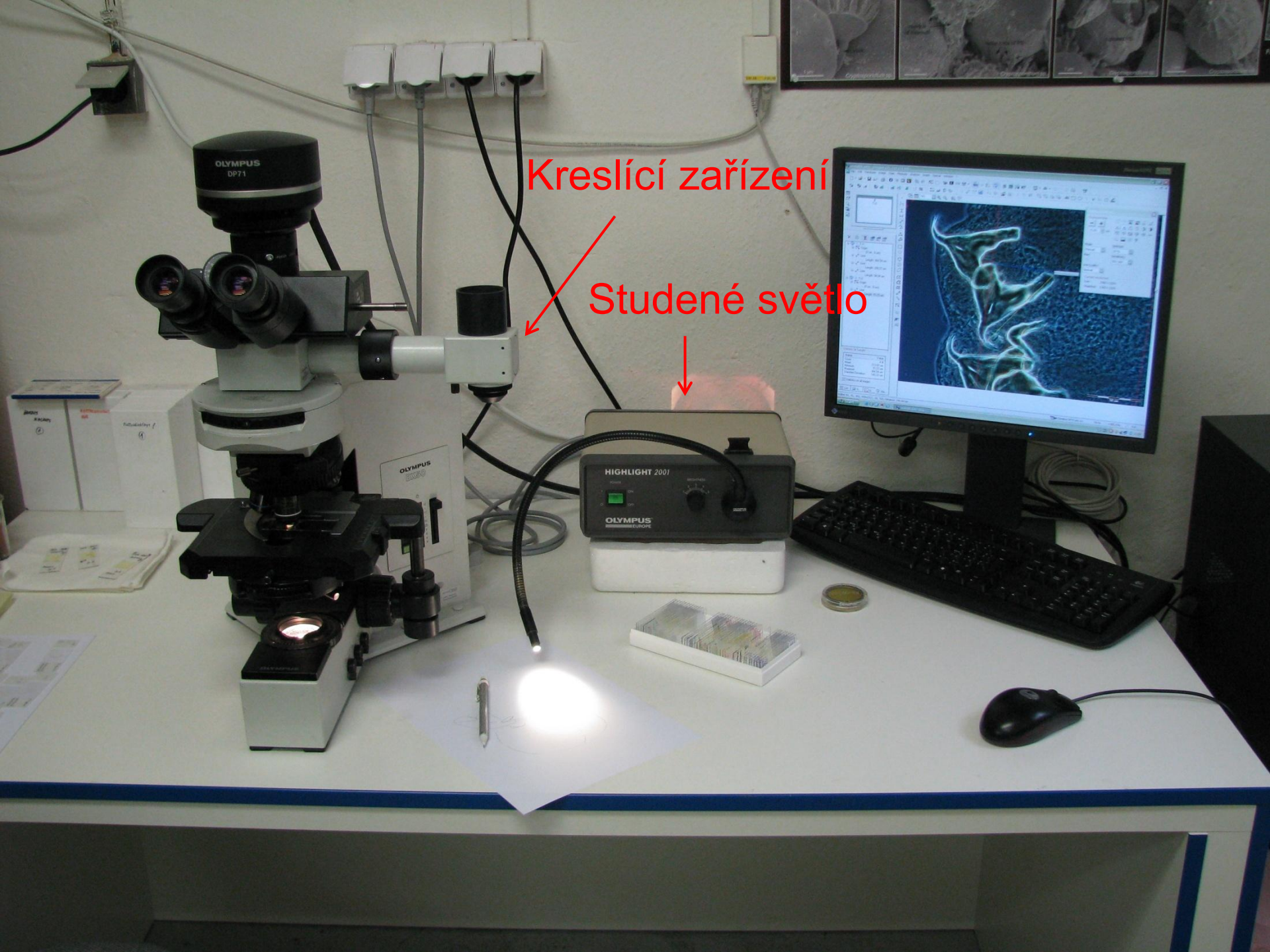


## Malý mikroskop

- Můžete si vyrobit i malý mikroskop, který se hodí na pozorování drobných vzorků. Ustříhnete plechový pásek o velikosti 10 cm \* 2,5 cm například z nějaké plechovky od jídla. Pokud jsou hrany ostré, zapilujte je. V kovovém pásku vyvrtejte uprostřed díрку o průměru 2,5 mm. Ať uděláte tuto díрку jakýmkoli způsobem, snažte se, aby byla co nejkulatější a byla bez otřepů. Pro očištění je dobré okolí dířky přešetřit smírkovým papírem. Potom odfoukněte případný prach, který tam zůstal.
- Ohněte konce kovového pásku dolů, aby jste ho mohli postavit (jako stoleček). Na pásek dejte, stejně jako v předcházejícím případě, olej nebo sádlo a tužkou pak přeneste na tuto dířku kapku vody tak, aby v ní zůstala. Na nějaké podložky (například plechovky) položte kus skla, jak je to ukázáno na obrázku. Opatrně pak pásek postavte do středu skla a dávejte pozor, ať nevylijete "čočku". Pod sklem podepřete malé zrcátko tak, aby se světlo z něho odráželo nahoru skrz čočku. Cokoli, co chcete prozkoumat (pyl, malý hmyz, zrnko soli nebo písku atd.), pak dejte pod čočku. Zaostřete jemným zatlačením na plíšek.



**Vyrobte si „mikroskop“**



Kreslicí zařízení

Studené světlo