

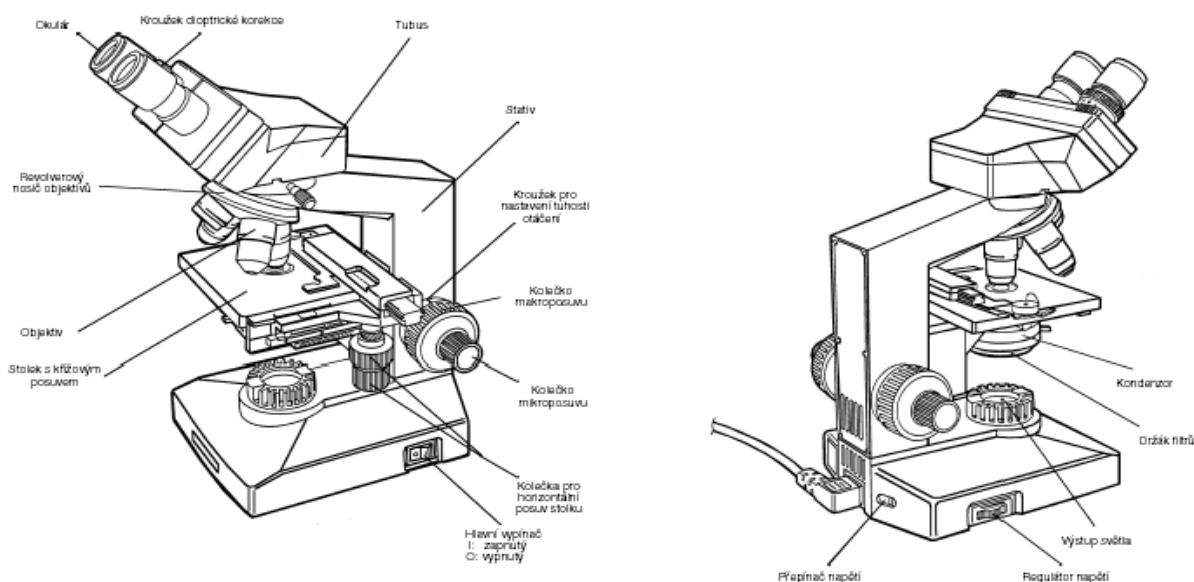
# Základy práce se světelným mikroskopem

## 1. Stavba světelného mikroskopu

Pro všechna základní mikroskopická pozorování buněk zůstává nejdůležitějším pracovním nástrojem **světelný mikroskop**. Tento nejvyužívanější přístroj, umožňující vidění předmětů pouhým okem neviditelných, je soustava čoček o jedné optické ose a skládá se z mechanických a optických částí.

Do **mechanických částí** náleží: **stativ** – zajišťuje stabilitu přístroje; **tubus** – do jeho horní části jsou vloženy jeden, nebo dva okuláry (monokulární tubus, nebo binokulární tubus); **stolek se svorkami** na přichycení preparátu a šrouby pro křížový posun stolku; **dva šrouby** - mikrometrický a makrometrický pro posun stolku ve směru optické osy; **revolverový nosič objektivů** – umožňuje výměnu objektivů

**Optická část** má zajistit nejen zvětšení, ale hlavně rozlišení jemných detailů objektu. Tento úkol je realizován třemi soustavami čoček: **okulár** – zajišťuje zvětšení; **objektiv** – zajišťuje zvětšení a rozlišení; **kondenzor** – zajišťuje maximální osvětlení objektu. Optická část je dále doplněna osvětlovacím zařízením (žárovka rozmanitého typu zabudovaná ve stativu mikroskopu).



Obr 1: Převzato z manuálu Nikon Eclipse E200

## Objektiv:

Závisí na něm jakost obrazu a je pro rozlišovací schopnost mikroskopu nejdůležitější. Na plášti objektivu jsou uvedeny parametry objektivu: zvětšení / numerická apertura (např. 100 / 1,4). Schopnost rozlišit co největší detaily závisí na schopnosti objektivu zachytit co nejširší kužel paprsků, které procházejí objektem. Tuto vlastnost vyjadřuje **numerická apertura NA**. Vztah mezi NA a indexem lomu prostředí lze vyjádřit:

$$NA = n \cdot \sin \alpha/2$$

$\alpha$  = úhel svíraný paprsky vycházejícími z objektu, které jsou zachyceny objektivem  
n = index lomu prostředí

Většina objektivů, jsou tzv. objektivy **suché**, u kterých je mezi objektivem a preparátem vzduch. Index lomu vzduchu je 1, numerická apertura tedy nemůže přesáhnout hodnotu 1 (prakticky 0,96). Zvýšit NA lze pouze tím, že se zvýší index lomu prostředí mezi objektivem a preparátem použitím tekutého prostředí, jehož index lomu je přibližně stejný jako index lomu skla (podložního, krycího i čoček). Touto imerzí může být voda, parafínový olej, glycerol, kanadský balzám, ale nejčastěji imersní olej (n = 1,51). NA se pak může zvýšit na 1,51 (prakticky na 1,4). Objektivy, u kterých používáme imersní olej se nazývají **imersní** a zvětšují 100x. Pomocí NA lze vypočítat tzv. **užitečné zvětšení mikroskopu** – je rovno 1000 násobné hodnotě NA.

Numerická apertura spolu s vlnovou délkou světla určuje **rozlišovací schopnost objektivu**. Ta vyjadřuje jaký nejmenší rozměr (velikost) lze ještě rozlišit:

$$a = 0,61 \cdot (\lambda / NA)$$

a = nejmenší rozměr, který lze rozlišit  
0,61=optická konstanta  
 $\lambda$  = vlnová délka  
NA = numerická apertura

Rozlišovací schopnost mikroskopu lze tedy zvětšit užitím světla o kratší vlnové délce, hlavně ale použitím objektivu s vyšší numerickou aperturou (imersní objektiv) a zvýšením lomu prostředí (imersní olej). Rozlišovací schopnost se v závislosti na uvedených faktorech pohybuje v rozsahu 0,4 – 0,7  $\mu\text{m}$ .

## Okuláry :

Zvětšují obraz vytvořený objektivem, skládají se ze dvou nebo více čoček. Na plášti je uvedeno zvětšení (5x – 20x) a typ okuláru. Při volbě okuláru bereme v úvahu pravidlo o užitečném zvětšení. **Celkové zvětšení mikroskopu** – vypočítá se vynásobením zvětšení objektivu zvětšením okuláru. Podle požadovaného zvětšení pak lze vybrat vhodný okulár tak, aby nedošlo k překročení užitečného zvětšení (např. imersní objektiv s NA = 1,25 má užitečné zvětšení 1250x, doplňkový okulár tedy bude 12,5x). Slabší okulár nedovolí plně využít rozlišovací schopnost objektivu, silnější okuláry dávají prázdné zvětšení, které nezobrazí více detailů a spíše snižuje ostrost obrazu.

## Kondenzor :

Je soustava dvou, nebo tří čoček. Úkolem kondenzoru je soustředit co největší část světelných paprsků ze světelného zdroje na preparát. U většiny kondenzorů lze nastavit numerickou aperturu, pomocí aperturní clony kondenzoru. Tato clona je připevněna k čočce kondenzoru a používá se k řízení rozlišení, kontrastu a hloubky ostrosti. Obecně lze říci, že optimální nastavení aperturní clony kondenzoru je 70-80% numerické apertury objektivu. Pokud je tato clona zacloněná více než na 70%, pak dochází ke snížení jasu a rozlišení. Současně se však zvětšuje kontrast a hloubka ostrosti.



## 2. Osvětlení a seřízení mikroskopu

Světelným zdrojem je zpravidla nízkovoltová žárovka s transformátorem pro regulaci intenzity osvětlení (zabudovaná do mikroskopu, nebo umístěná v samostatné lampě). Světlo je kolektorem a kolektorovou clonou usměřováno na zrcadlo mikroskopu, nebo přímo na kondenzor.

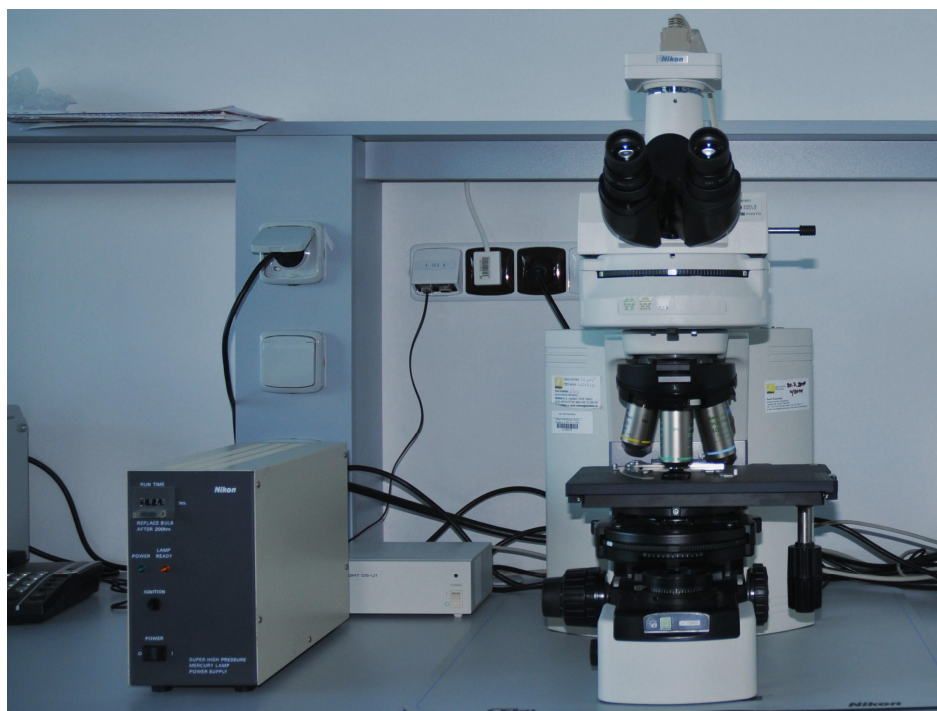
Seřízení mikroskopu je v podstatě seřízení jeho optické osy, tj. soustředění světelného zdroje a clon doprostřed zorného pole.

## 3. Udržování a čištění mikroskopu

Mikroskop udržujeme v čistotě, chráníme jej před prachem, nárazy, před stálým přímým slunečním světlem a před působením škodlivých výparů a chemických činidel. Objektivy a okuláry čistíme od prachu čistým měkkým štětečkem, případně čistým hadříkem. Znečištění okuláru poznáme tak, že jím otáčíme, díváme se přitom do mikroskopu – špína se otáčí s okulárem. Objektiv může být znečištěn imersním olejem, vyčistíme ho hadříkem namočeným v benzínu, případně v xylenu (časté namáčení objektivu do xylenu je spojeno s rizikem porušení tmelu jeho čoček).

Nikdy se nepokoušíme objektiv, nebo okulár rozebrat!

Po skončení a dobrém očištění mikroskopu přikryjeme mikroskop ochranným obalem, nebo ho uložíme do skříňky. Veškeré závady je nutné nahlásit vedoucímu cvičení.



Obr.2: Mikon Eclipse 80i – badatelský mikroskop

#### 4. Práce s mikroskopem

Mikroskopovat je vhodné na pevném stole, který se nechvěje. Před vlastní prací zkontrolujeme, zdali mechanické části mikroskopu nejsou poškozeny a zdali jsou optické části čisté.

1. Zvolíme objektiv, kterým budeme pozorovat a nastavíme jej pootočením revolveru. Rozsvítíme mikroskop.
2. Vložíme preparát na stolek mikroskopu. Dáme pozor, aby podložní sklo preparátu bylo dole. Makrometrickým šroubem vyjedeme stolkem těsně pod objektiv – díváme se přitom na preparát z boku mikroskopu (abychom delším objektivem nerozbili preparát a nepoškodili objektiv).
3. Upravíme si na tubusu rozteč očí a přiložíme oči k okulárům. Posunujeme stolkem směrem dolů do doby než se objeví obraz. Doostříme mikrometrickým šroubem.
4. Při volbě menšího, nebo většího zvětšení otáčíme pouze revolverovým nosičem objektivů. Zaostřujeme pouze mikrometrickým šroubem.
5. Při pozorování jemně pohybujeme mikrometrickým šroubem, čímž zaostřujeme na různé roviny studovaného objektu.
6. Po skončení práce vše uklidíme a revolverem nastavíme objektiv s nejmenším zvětšením. V případě znečištění mikroskop vyčistíme měkkým hadříkem. Mikroskop přikryjeme, aby se na něj neprašilo.

Při práci s imersním objektivem: preparát vložíme na stolek, tak aby pozorovaná část byla ve středu. Na preparát kápneme imersní olej. Makrometrickým šroubem vyjedeme se stolkem pod imersní objektiv tak, aby se čočka objektivu spojila s kapkou oleje. Doostříme stejně jako při práci bez imersního oleje. **Po skončeném pozorování sjedeme se stolkem dolů a očistíme objektiv.**

