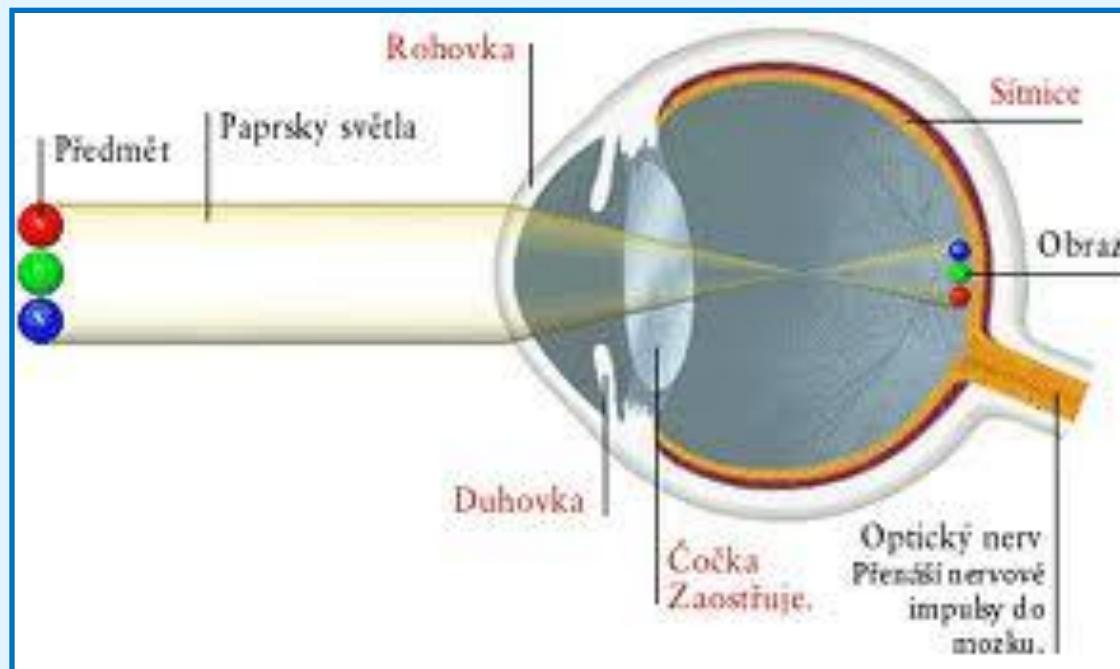


Přednáška 3

Stavba složeného světelného mikroskopu

Oko jako optická soustava



Oko jako optická soustava

Základní optické hodnoty:

- pracovní vzdálenost (normální zraková délka;
konvenční zraková vzdálenost) = **250 mm**
- nejmenší vzdálenost (rozlišovací schopnost lidského oka)
je **0,15 mm** (1' zorného úhlu)
- vzdálenost dvou bodů, které průměrně unavené oko
rozliší jako dva body z pracovní vzdálenosti
je **0,327 mm** (odpovídá **4,5'** zorného úhlu)

Základní části mikroskopu

■ Optické části mikroskopu

■ Osvětlovací zařízení

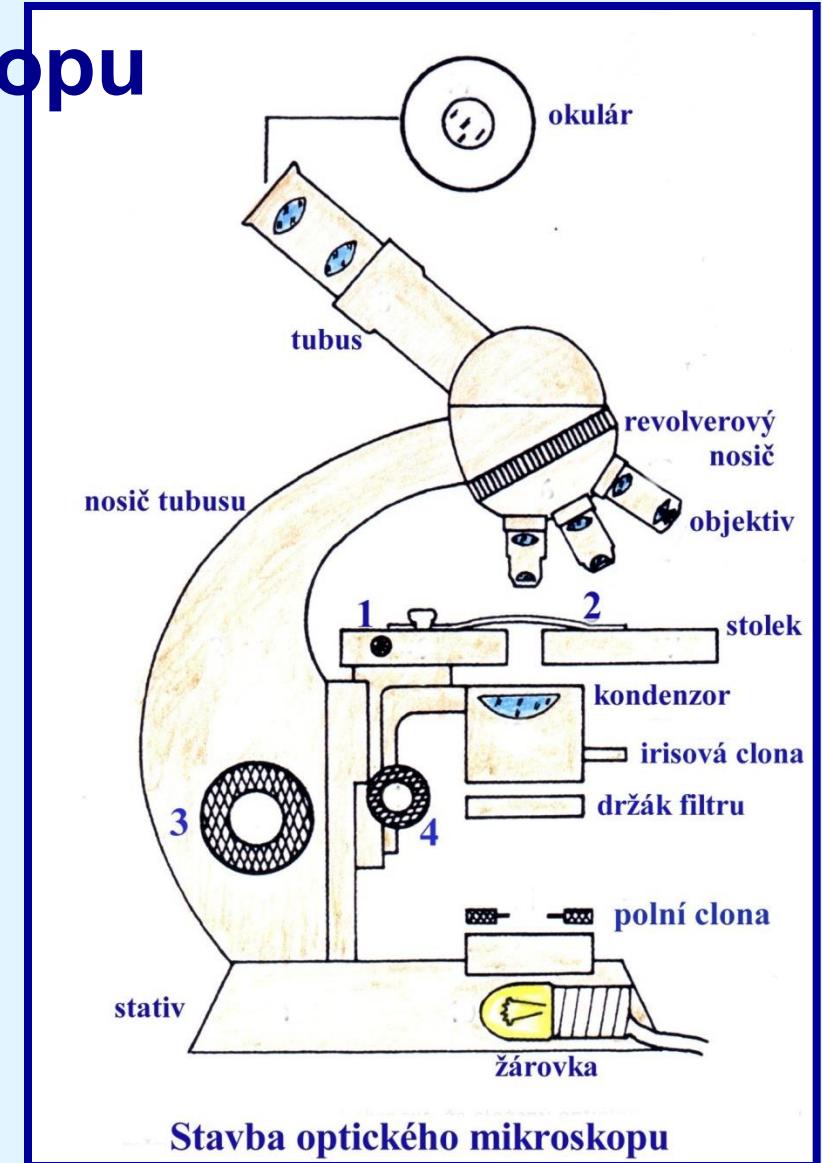
■ Mechanické části mikroskopu

1 - stolek

2 - držák preparátu

3 – makrošroub a mikrošroub

4 – posun kondenzoru



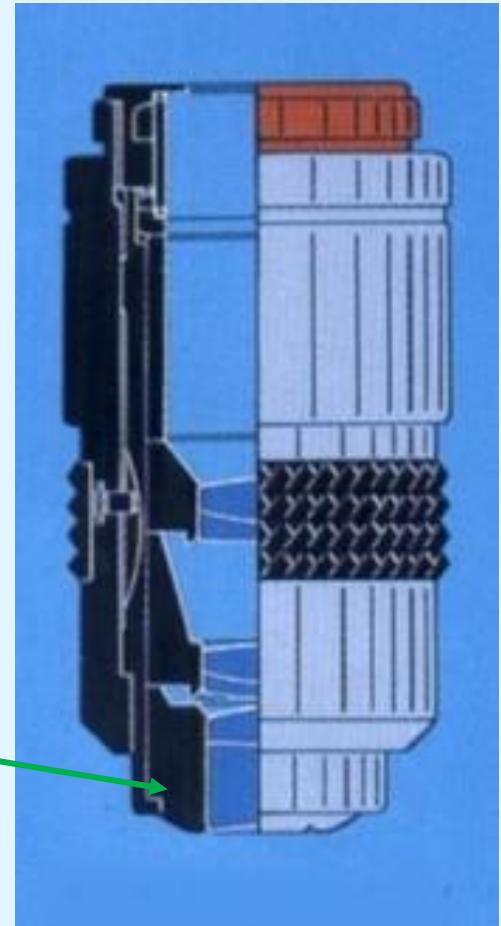
Optické části mikroskopu:

- objektiv
- okulár
- optické filtry
- hranoly

■ Objektiv

= čočka (soustava čoček)
nad pozorovaným
objektem

čelní čočka - nejblíže k objektu



Charakteristiky objektivu

- ohnisková vzdálenost
- vlastní zvětšení objektivu
- volná pracovní vzdálenost
- světlnost objektivu
- numerická (číselná) apertura
- rozlišovací schopnost objektivu
- hloubková ostrost
- parfokální vzdálenost

Charakteristiky objektivu:

- **Ohnisková vzdálenost (f)**
 - nad 20 mm – velmi slabé objektivy
 - 6 – 15 mm – střední
 - pod 5 mm – silné (u CHK-2 objektivy 20x, 40x, 100x - s imerzí)
- **Vlastní zvětšení objektivu**

$$M = 250 / f$$

- 250 = normální zraková vzdálenost v mm
- f = ohnisková vzdálenost

→ čím kratší ohnisková vzdálenost, tím větší zvětšení

- **Volná pracovní vzdálenost** (W.D. = working distance)
= vzdálenost krycího sklíčka od čelní čočky objektivu
 - čím silnější objektiv, tím menší W.D. (obj.100x W.D. = 0,20 mm)

Pozor při používání objektivu 40x (W.D. = 0,53 mm)
při práci s imerzním olejem !!!
- **Světelnost objektivu**
= schopnost zachytit co možná největší množství světla,
které se účastní tvorby reálného obrazu
 - světelnost objektivu je přímo úměrná NA^2
 - pro fluorescenci jsou vhodné objektivy s velkou světelností

• Numerická (číselná) apertura

(apertura = lat., otvor)

- jedná se o bezrozměrné číslo, které je číselným měřítkem pro schopnost mikroskopické optiky zachycovat informace, obsažené v pozorovaném objektu



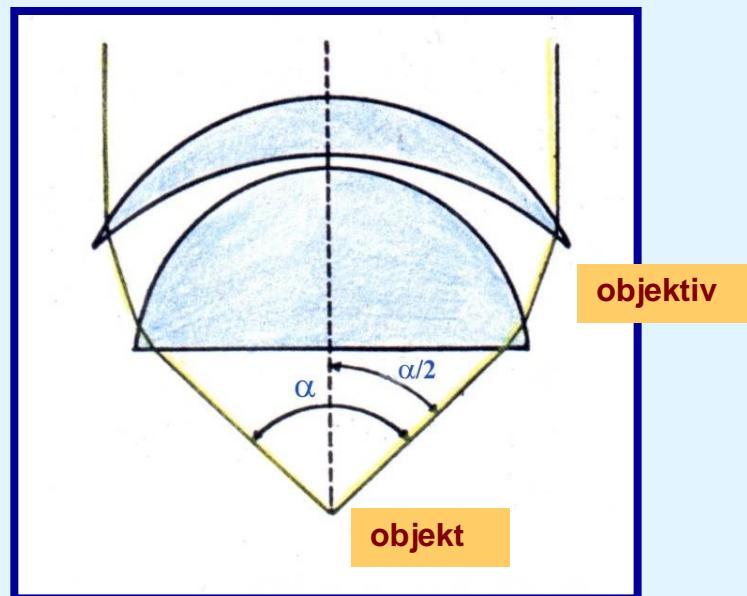
NA (N.A.) nebo také jen A

= vztah mezi otvorovým úhlem (α) a lomivostí prostředí (n)

$$\text{NA} = n \cdot \sin \alpha/2$$

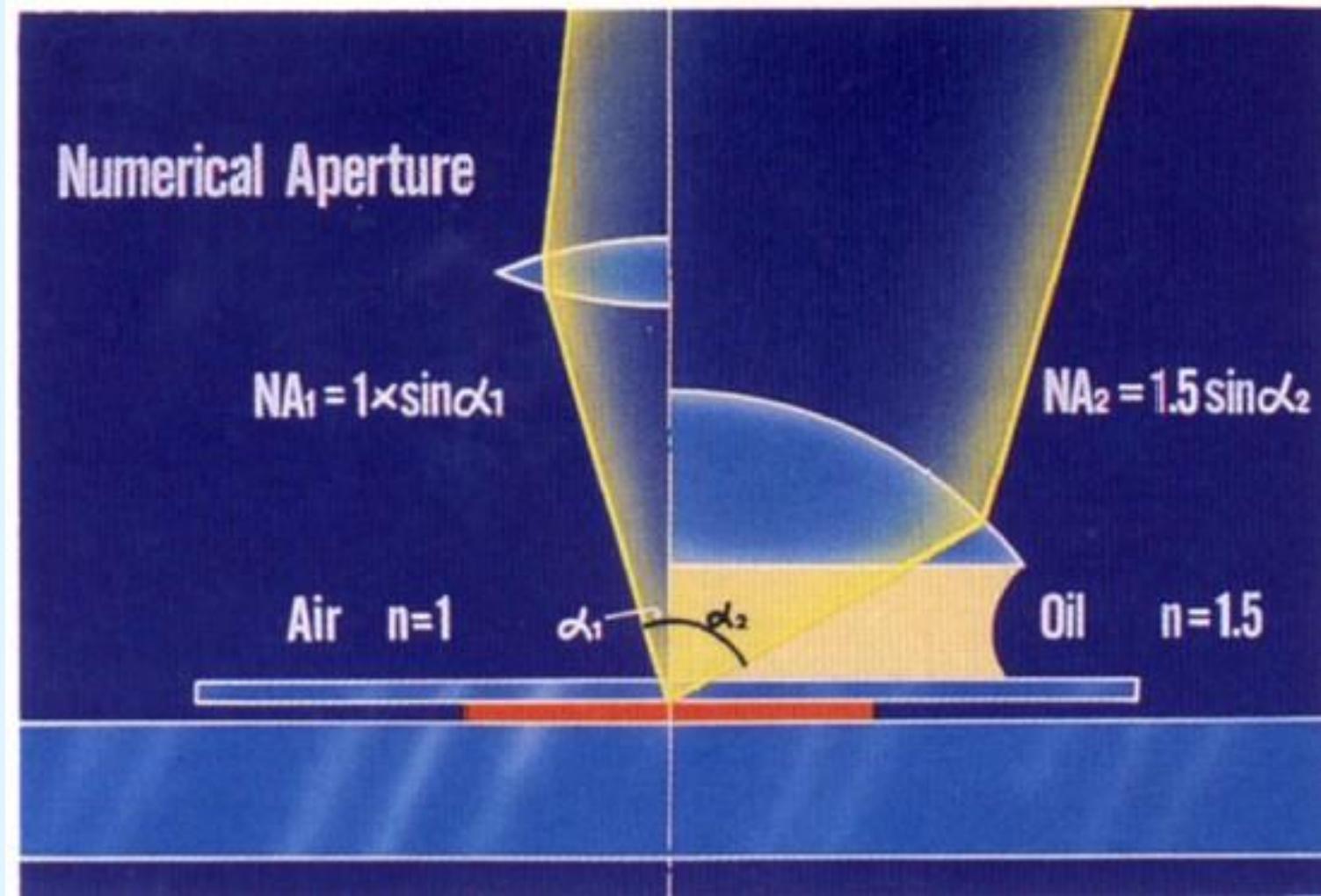
α = vstupní úhel paprsků do objektivu

n = index lomu prostředí mezi objektivem a preparátem



Obr. Pazourek, 1975

Numerická apertura objektivu



Obr. z Příručka Olympus

Numerická apertura objektivu

- α je vždy menší než 180° ($\alpha/2$ je menší než 90°)
- čím vyšší numerická apertura (NA), tím vyšší rozlišovací schopnost objektivu a větší zvětšení

Podle prostředí mezi KS a čelní čočkou objektivu rozlišujeme:

suché objektivy: $NA < 1$ (nejlepší NA = 0,85 - 0,94)

imerzní objektivy: $NA > 1$

(homogenní olejové imerze – časté označení HI nebo Oil.imerse)

Příklady imerzního prostředí:

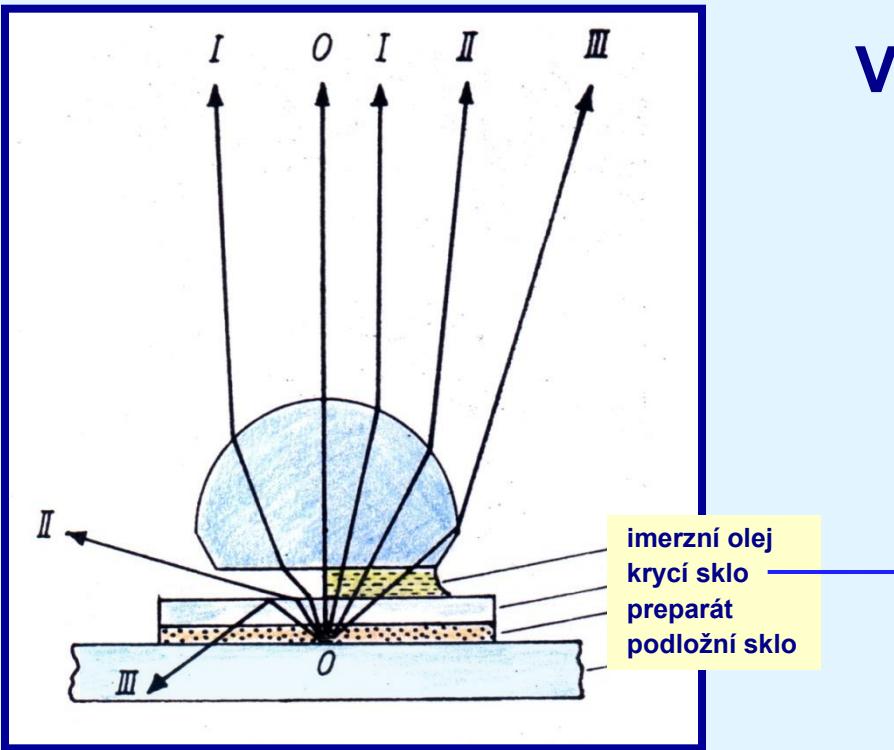
vodní imerze $n = 1,33$; olejová imerze $1,40$;

glycerolová $1,4$ (u křemenné optiky); bromnaftalénová $1,60$

Animace:

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

Vliv imerzního oleje

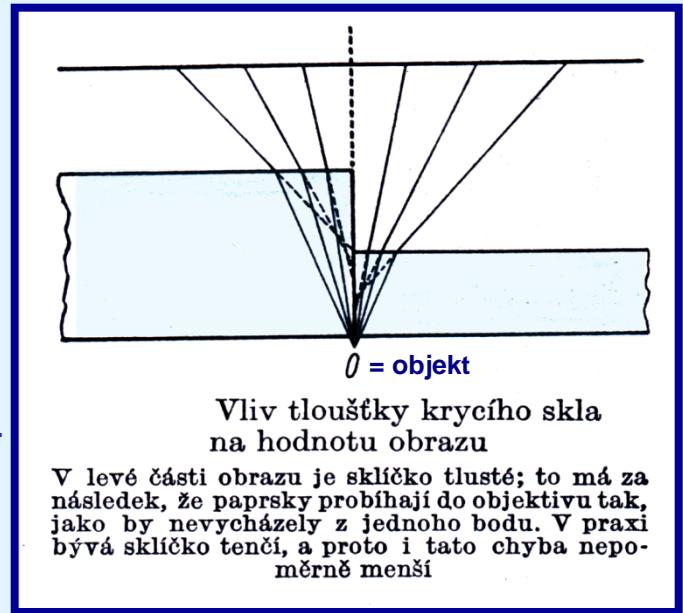


Použití imerzního oleje:

- předejdeme ztrátám světla
- do objektu dopadne větší množství paprsků
- obraz obsahuje více detailů

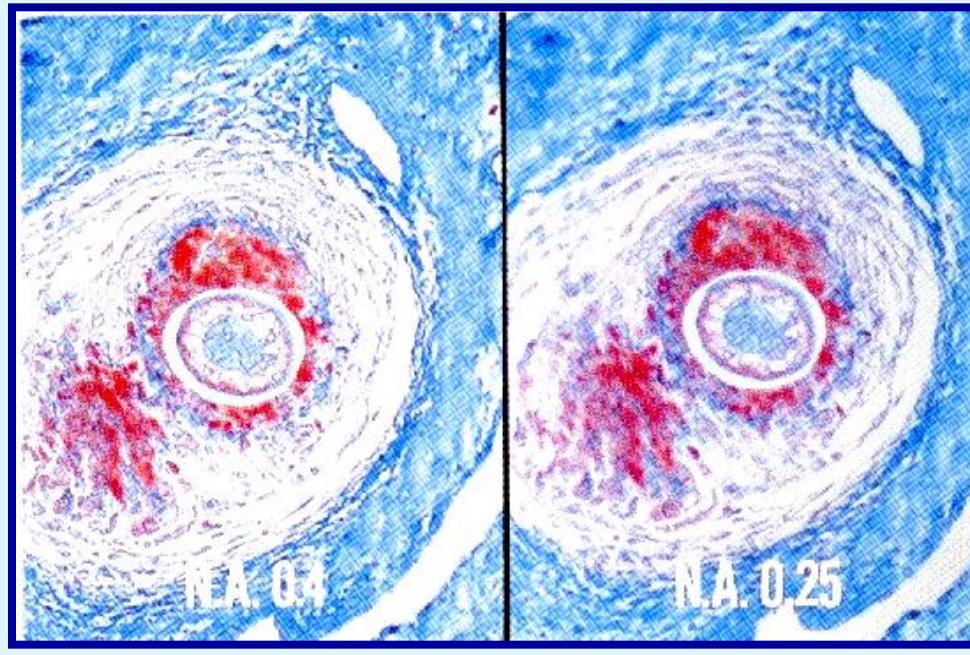
<http://www.olympusmicro.com/primer/java/microscopy/immersion/index.html>

Vliv tloušťky krycího skla



Obr. Pazourek, 1975

Vliv numerické apertury objektivu na ostrost obrazu



NA = 0,4

NA = 0,25

Obr. z Příručka Olympus

Praktický význam numerické apertury:



- 1. určuje rozlišovací schopnost a hranice užitečného zvětšení mikroskopu**

- 2. ovlivňuje světlost mikroskopického obrazu**

- 3. ovlivňuje hloubku ostrosti**

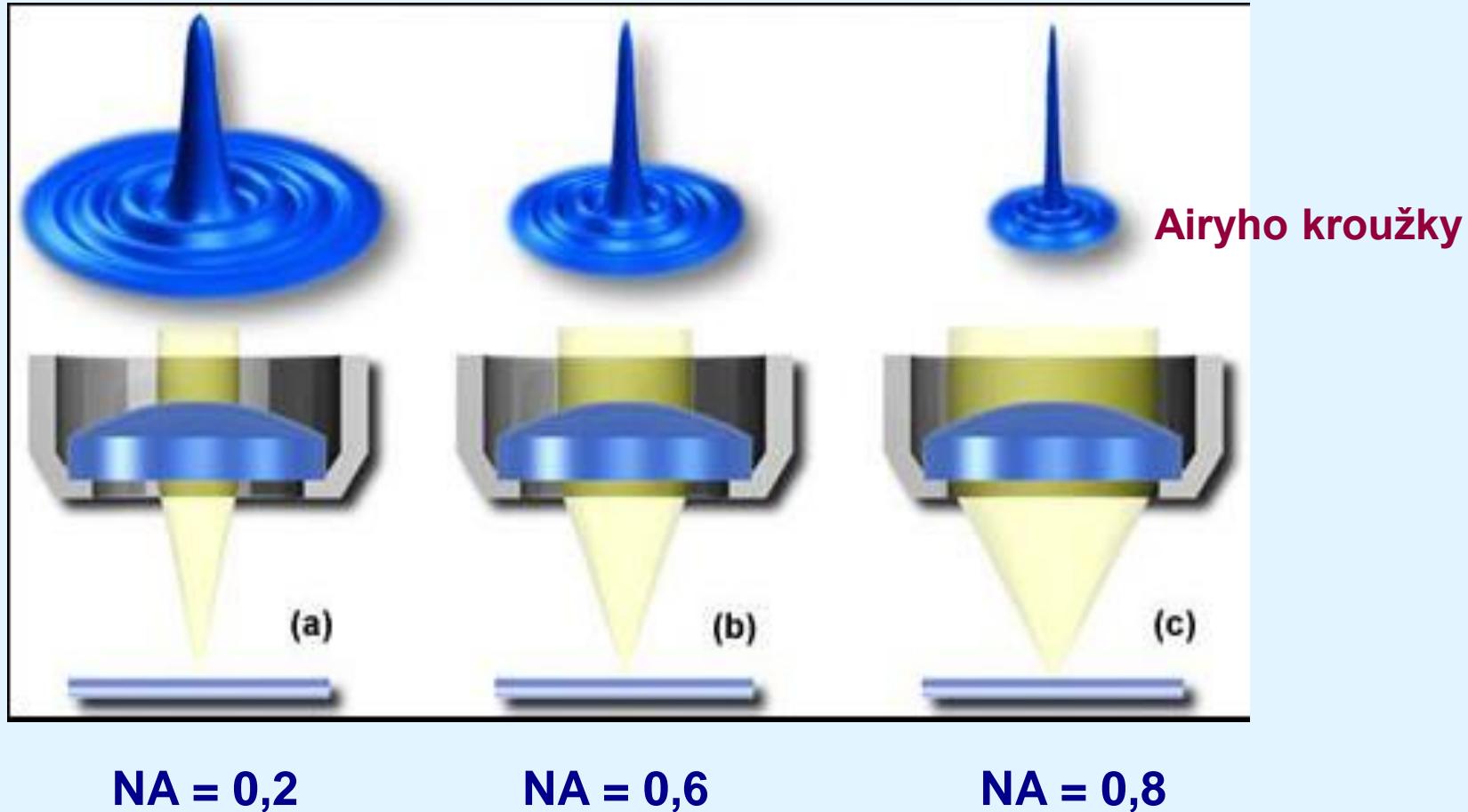
- **Rozlišovací schopnost objektivu**

= **schopnost rozlišit dva vedle sebe ležící body ještě jako body samostatné**

závisí na: **NA** (objektivu i kondenzoru)
vlnové délce (λ)

(nejmenší velikost předmětu, který ještě můžeme okem rozlišit je 0,15 mm; u unaveného oka 0,3 mm i více!)

Závislost velikosti Airyho kroužků na NA objektivů

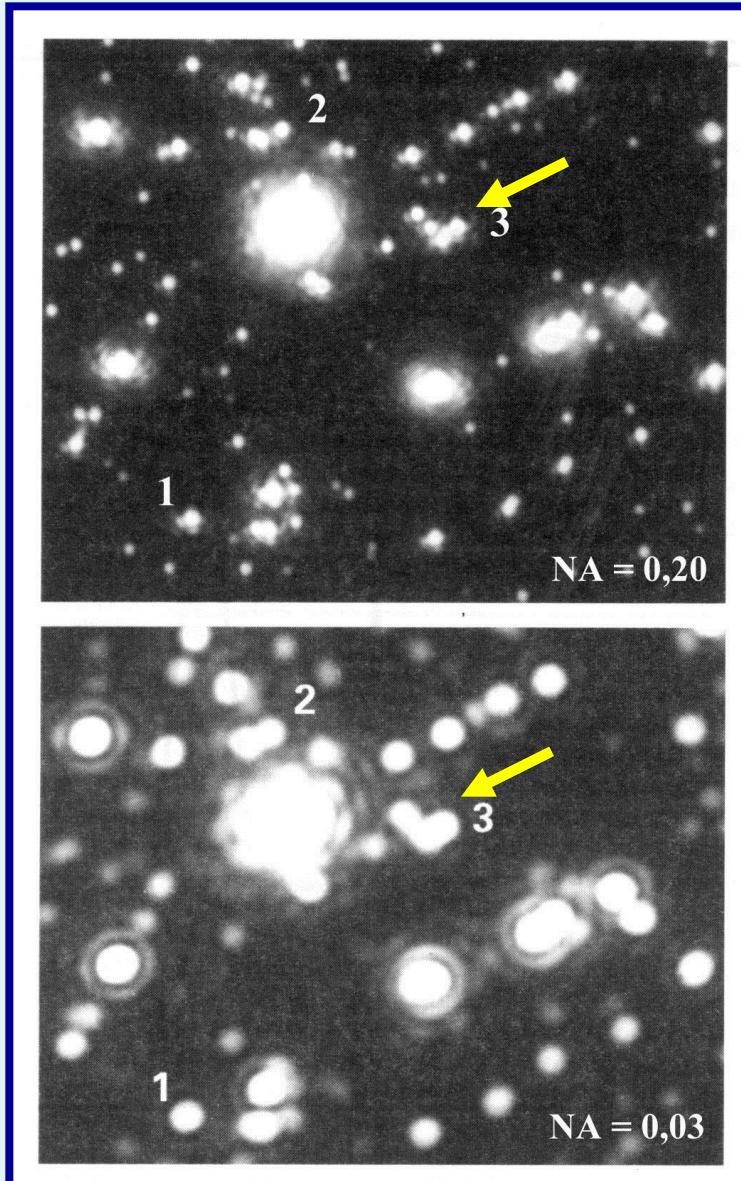


Vliv numerické apertury objektivu na rozlišovací schopnost objektivu

Zrnka mikromletého vápence pozorovaná v temném poli objektivy o různé numerické apertuře

NA = 0,20

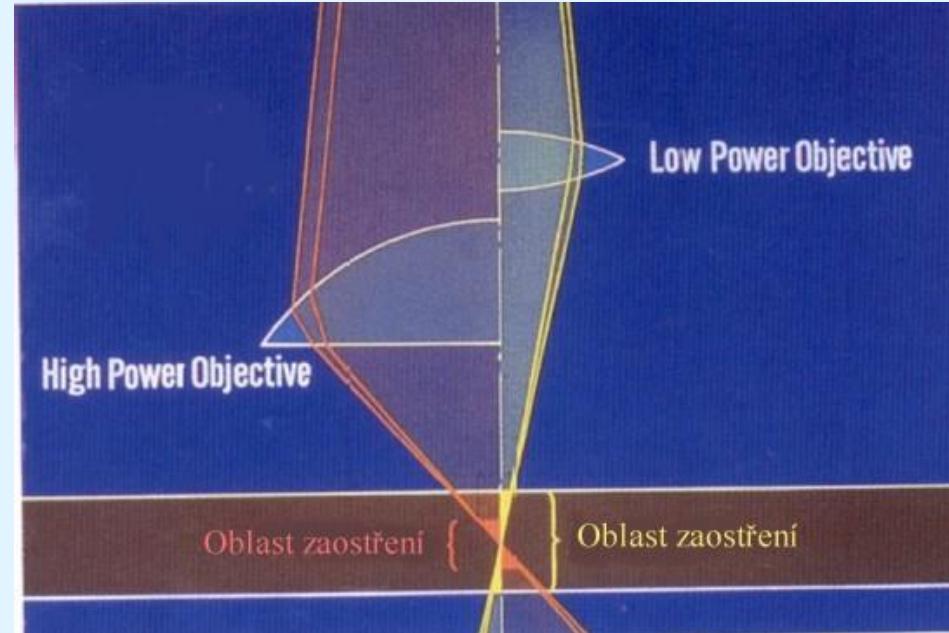
NA = 0,03



Obr. J. Plášek. Vesmír 74, 508, 1995/9.

- **Hloubková ostrost objektivu**
(penetrační schopnost)

= vzdálenost mezi nejbližším
a nejvzdálenějším místem
preparátu, který je zobrazen
ostře



Obr. z Příručka Olympus

- v obráceném poměru k NA
(slabší objektivy mají větší hloubku ostrosti než silnější)
- přicloněním se hloubka ostrosti zvětšuje (sníží se NA kondenzoru)

Důležitá při mikrofotografii

Objektiv - hloubková ostrost

Hadinec *Echium maculatum* (syn. *Echium russicum*); $2n = 24$

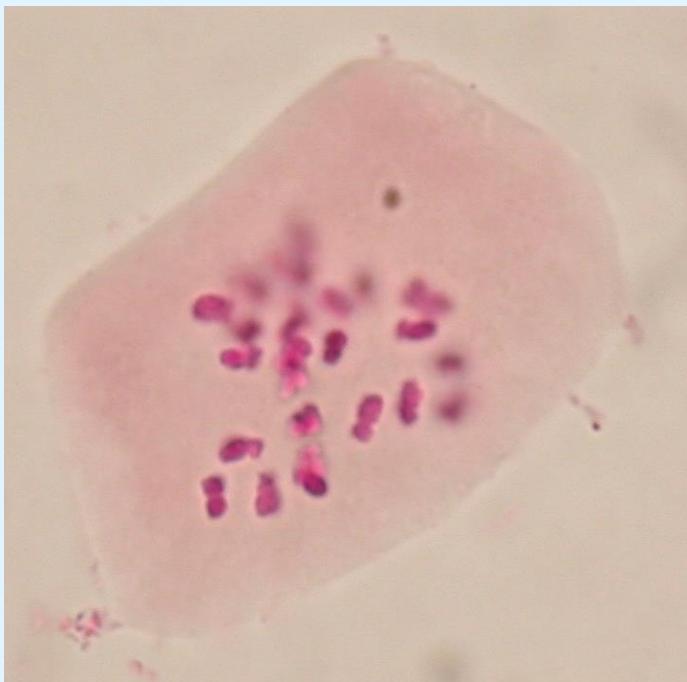


Foto Pavla Válová

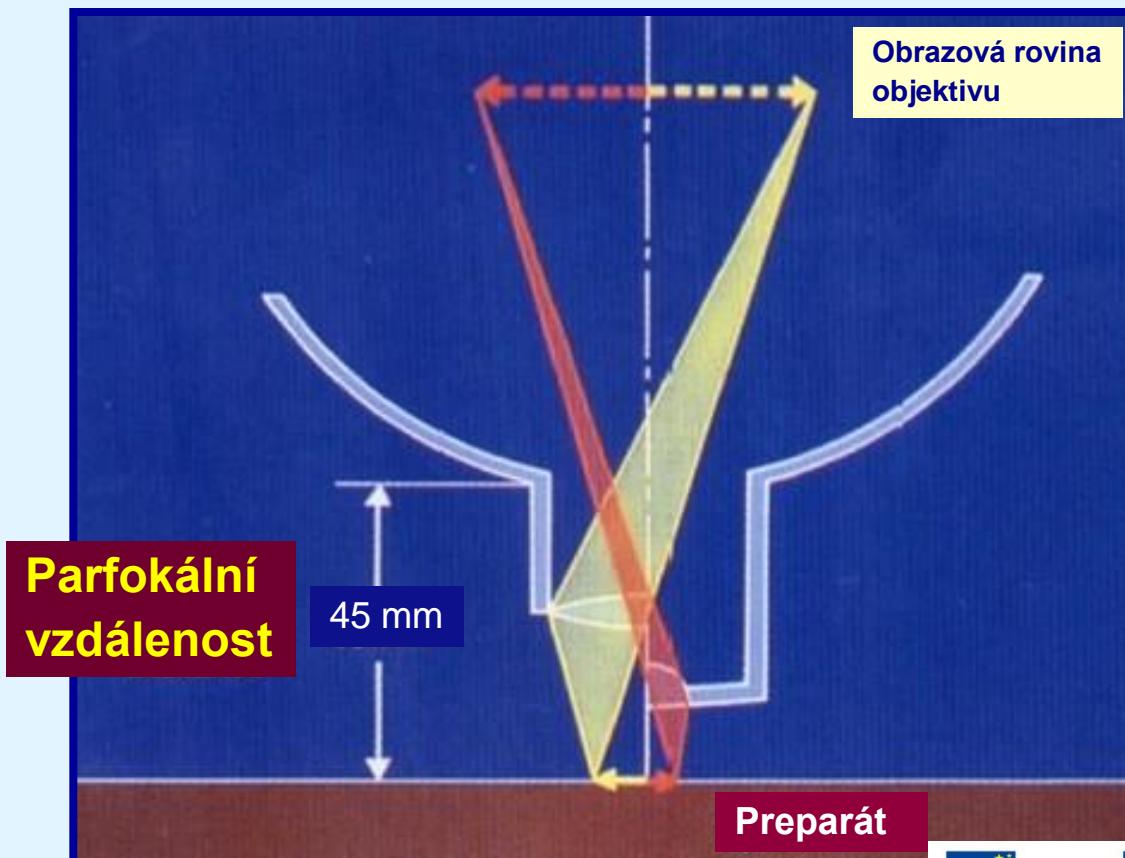
$Z = 1\ 000x$ (imerze); objektiv 100x, NA = 1,35

Při počítání jednotlivých chromozómů **musíme proostřovat** pomocí mikrošroubu.

• Parfokální vzdálenost

= vzdálenost objektivu v mm – od závitu objektivu k povrchu preparátu (případně krycímu sklu)

- zaostření objektivů umístěných v revolverovém výměníku na přibližně stejnou vzdálenost



Typy objektivů

Podle prostředí mezi krycím sklem a čelní čočkou:

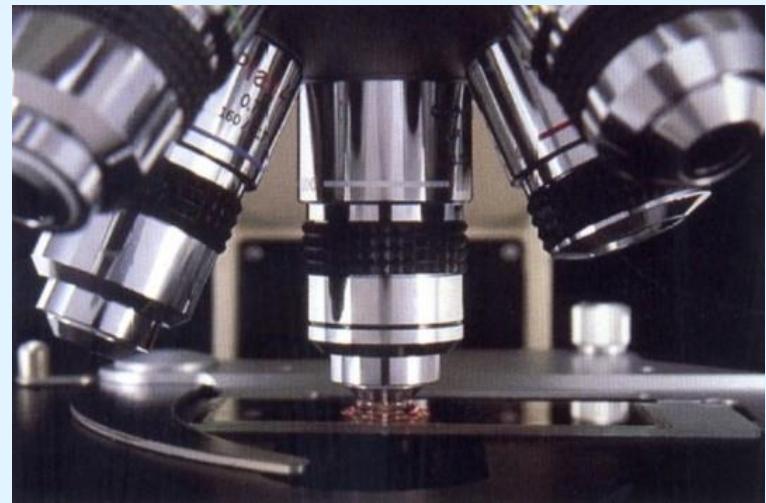
- **suché**
- **imerzní (ponorné)**

- objektivy korekční

(s korekčním kroužkem) pro
přizpůsobení se různé tloušťce
krycího skla

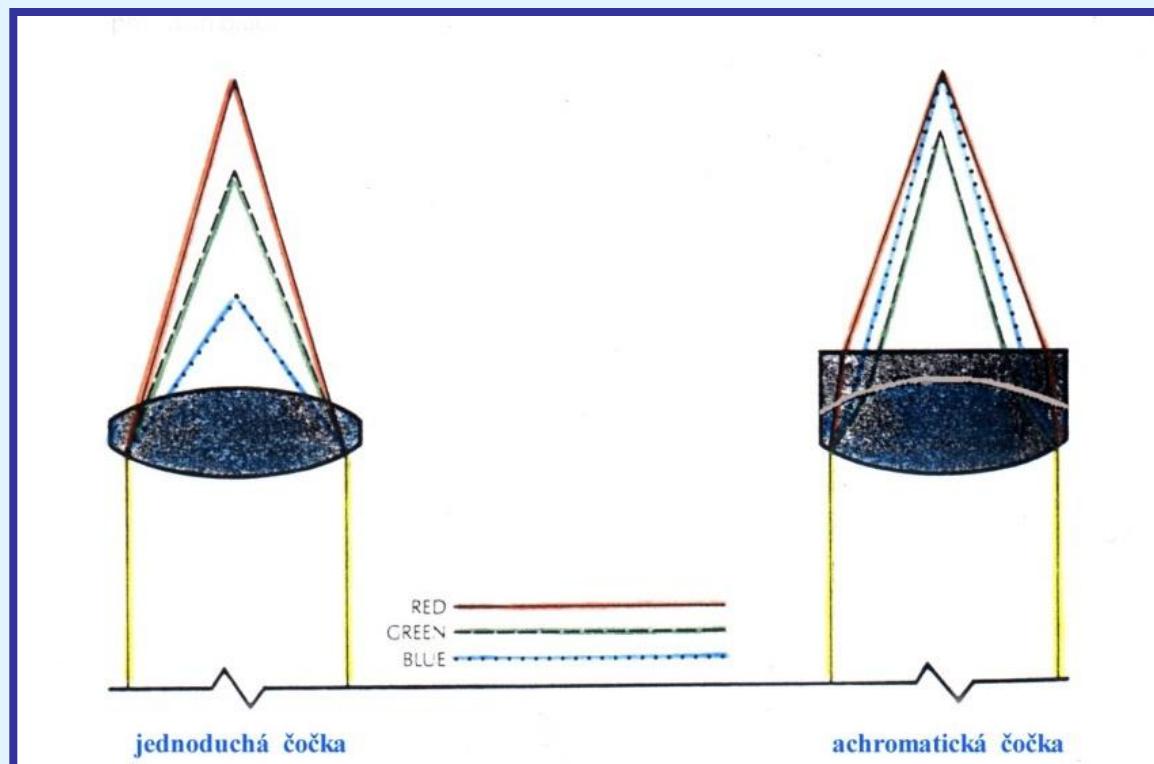
- objektivy s odpružením

(ochrana čelní čočky i preparátu)



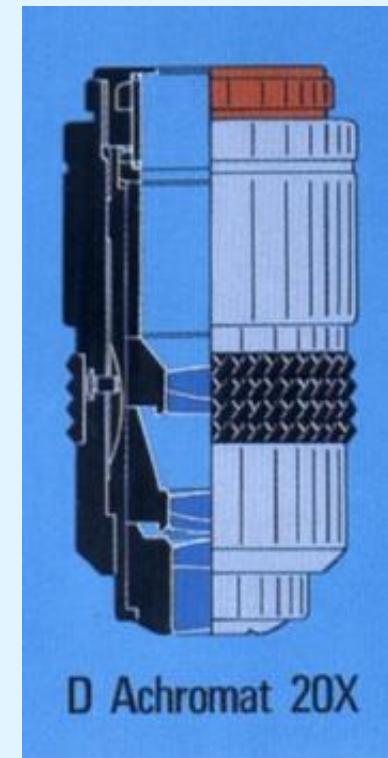
Typy objektivů z hlediska korekce vad:

Chromatická vada



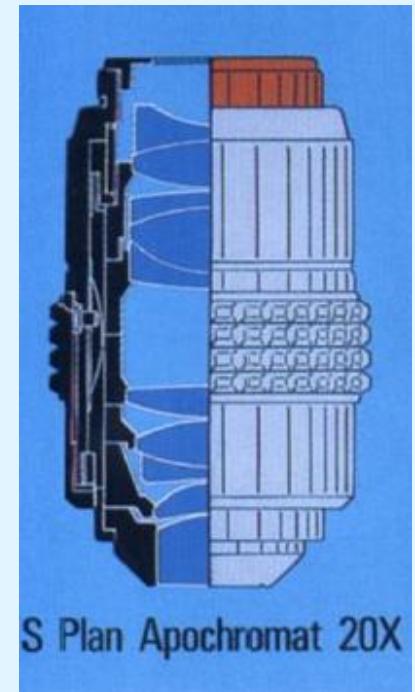
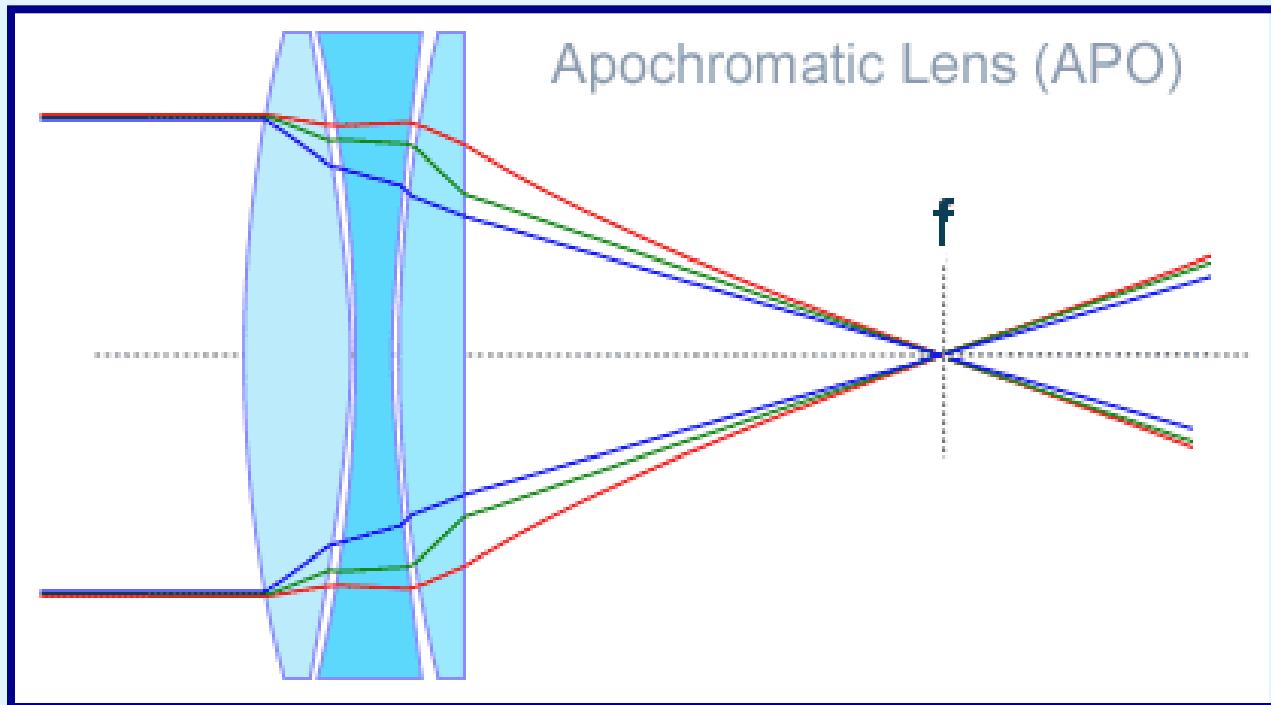
jednoduchá
čočka

achromaticická
čočka



Obr. z Příručka Olympus

Korekce chromatické vady u apochromatické čočky:

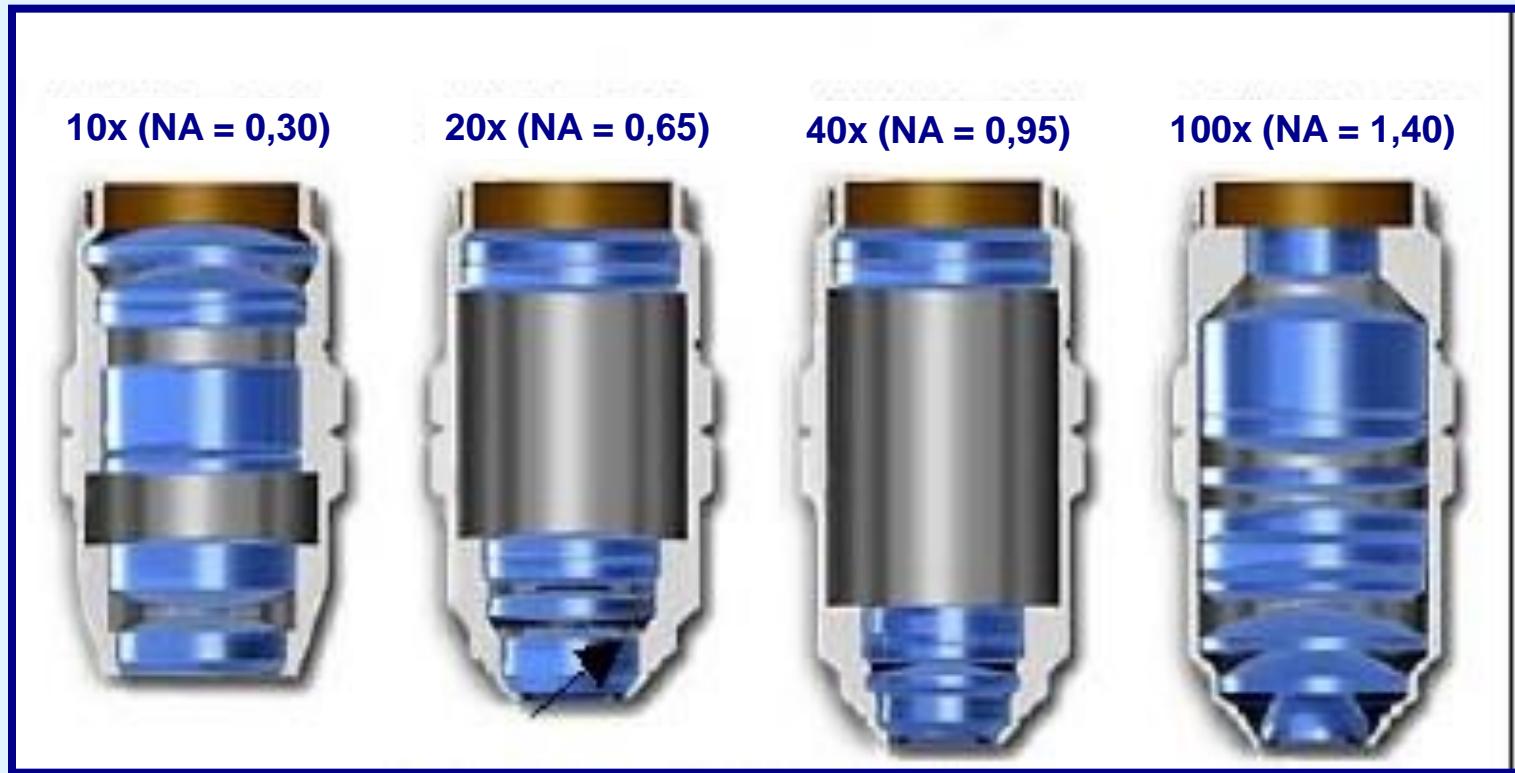


apochromatická
čočka

Převzato z prezentace:

http://old.vscht.cz/nmr/mol_model_bioinfo/lekce/mikroskopie1.pdf

Skladba čoček u apochromatických objektivů



apochromáty

Základní typy objektivů z hlediska korekce vad:

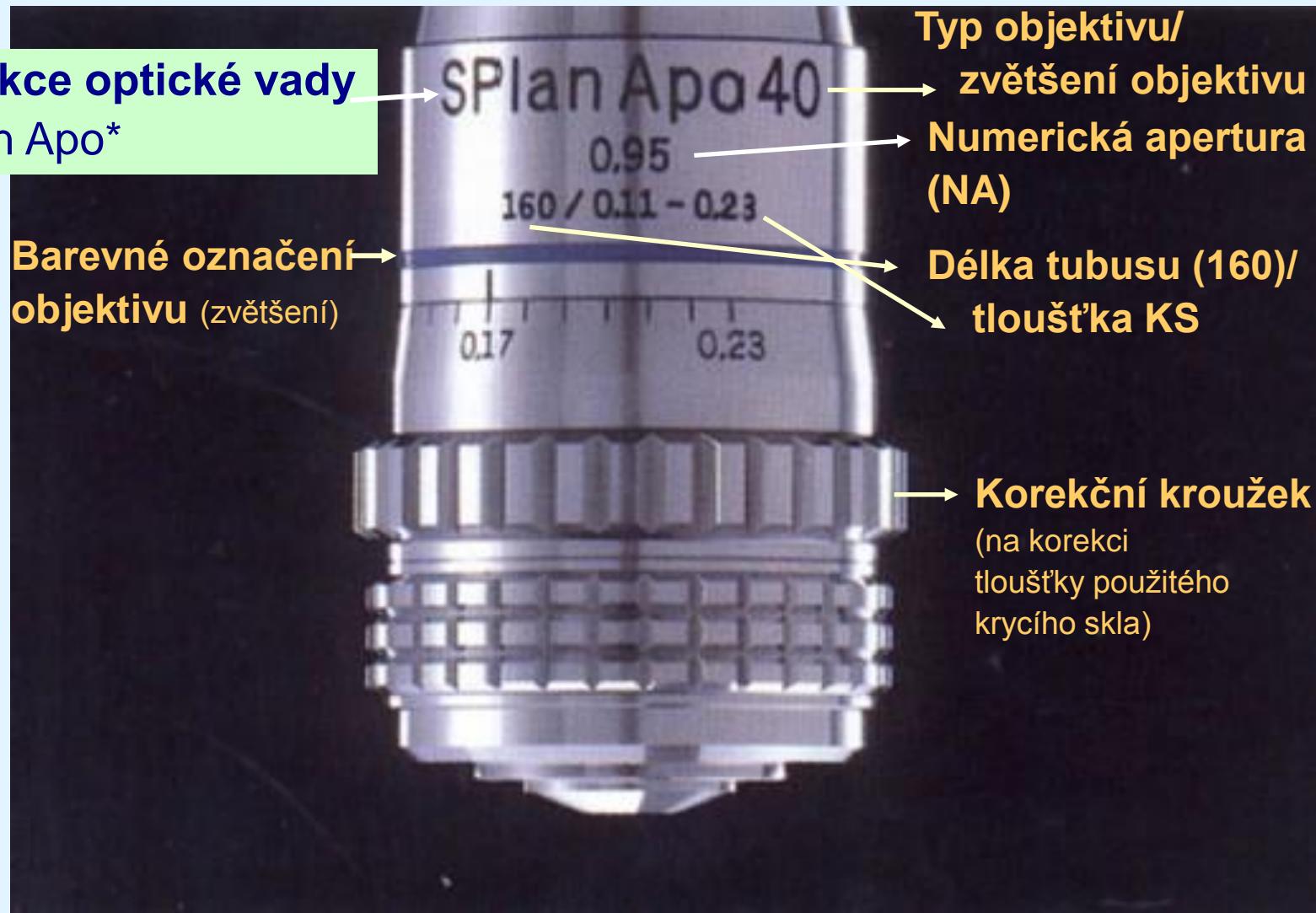
- **achromáty** (Achro; A) - korekce barevné chromatické vady pro světlo červené a modré
- **planachromáty** (Plan Achro; PlanA) – dtto* odstranění sférické vady (vhodné pro mikrofotografii)
- **apochromáty** (Apo) – korekce pro světlo žluté, zelené, modré a červené, zorné pole vyklenutější (nevhodné pro černobílé mikrofoto, ale vhodné pro barevnou mikrofotografii a pro infračervené světlo)
- **planapochromáty** (Plan Apo) – nejkvalitnější odstraněna chromatická vada + sférická + koma

* dtto – z lat. detto = totéž, to samé

Další typy objektivů

- **monochromáty** – pro použití světla o určité λ (např. vhodné pro fluorescenční mikroskopy - křemenné čočky)
- **reflexní objektivy** (zrcadlové) – vhodné pro UV pozorování (výhody: velká pracovní vzdálenost, odstraněná chromatická vada, nejsou omezeny λ světla)
- **CF-objektivy** – zobrazují bez barevné vady zvětšení (chromatical aberration free)
- **širokoúhlé objektivy** - označení **W** nebo **WE** (wide z angl.) nebo **GF** (Grossfeld z němčiny)
(achromáty, planachromáty nebo planapochromáty)

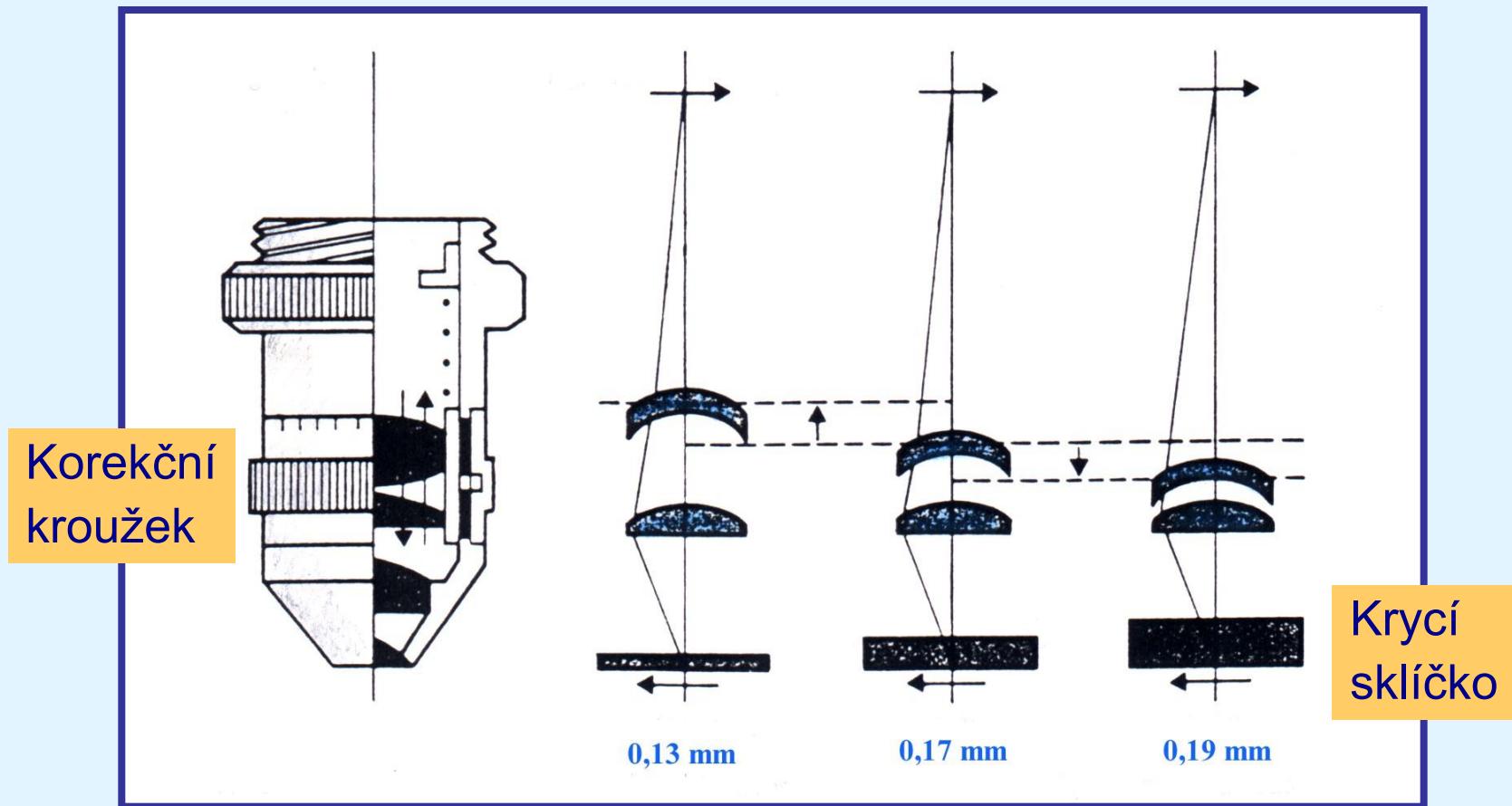
Důležité údaje na objektivu



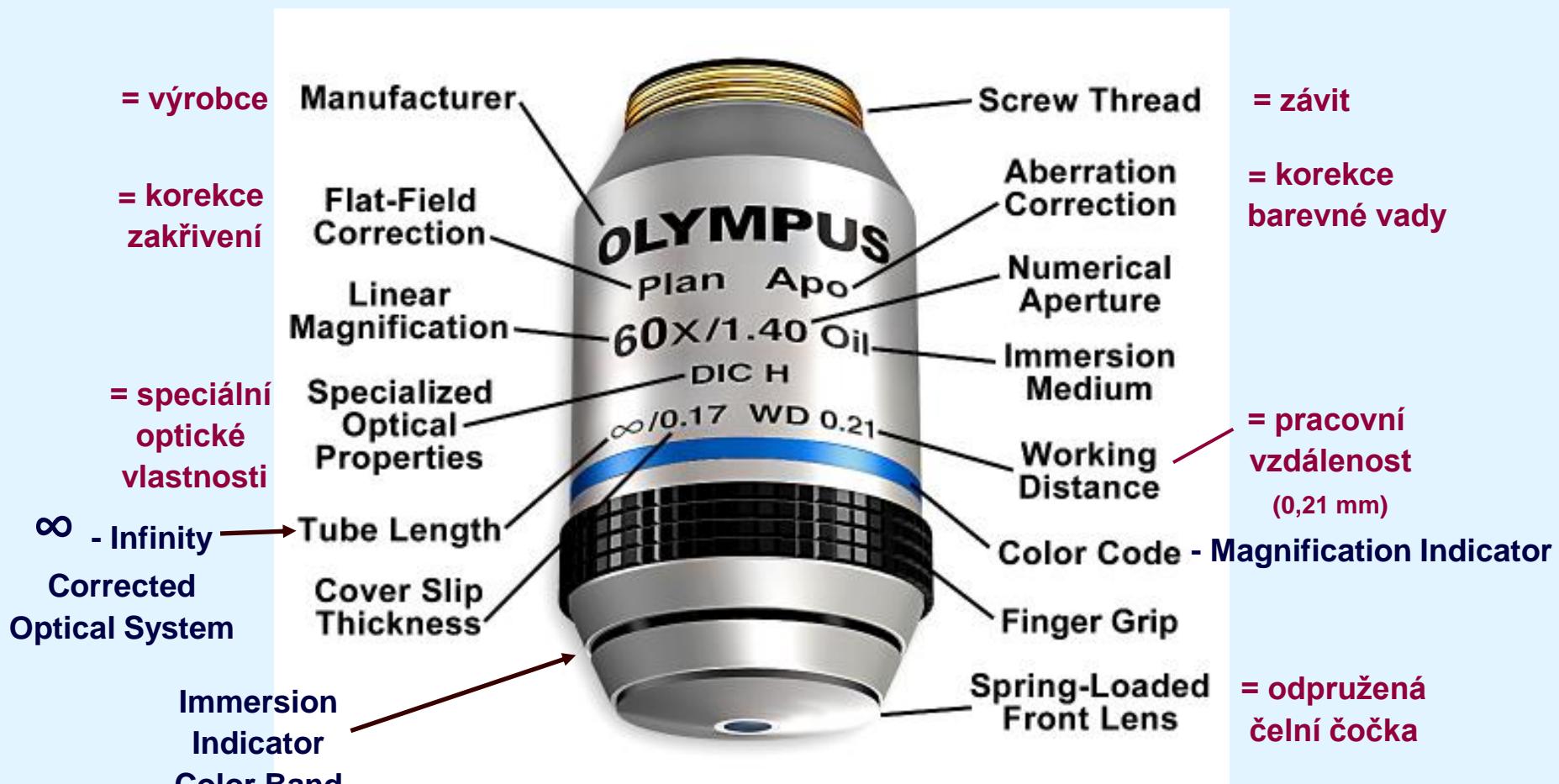
* S = super; Plan Apo = planapochromatický objektiv

Funkce objektivu s korekčním kroužkem

(korekce tloušťky použitého krycího skla)



Objektiv firmy Olympus



= barevný indikátorový kroužek
k použití imerze

Upraveno podle: <http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/opticalmicroscopy.html>

Specifikace objektivů viz i <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/specifications.html>

Objektivy u školního mikroskopu Olympus CHK2:

E A4	E A10	E A20	E A40	E A100
NA* 0,10 160/-	0,25 160/-	0,40 160/ 0,17	0,65 160/ 0,17	1,25 oil 160/-
d 3,4 µm	1,3 µm	0,82 µm	0,52 µm	0,26 µm
WD 29 mm	6,3 mm	± 0,86 mm	0,53 mm	0,20 mm

červený

žlutý

zelený

modrý

bílý

Barevný kroužek na objektivu

(k rychlé orientaci zvětšení)

* NA = numerická apertura

d = rozlišení objektivu

WD = pracovní vzdálenost

(= Working Distance)

U = ultraviolet

Parametry objektivu 100x u fluorescenčního mikroskopu BX60:

UPlanApo 100x/ 1,35 Oil Iris ∞/ 0,17

Označení na objektivu zvětšujícím 4x:

E	= enlarge (angl.) = zvětšení
A	= typ odstraněné vady, achromát
4	= zvětšení objektivu (M)
0,10	= NA objektivu
160/-	= délka tubusu 160 mm
/-	= preparát s krycím i bez krycího skla
∞/	= délka tubusu neomezena (optika s korekcí na nekonečno)
/0,17	= preparát s krycím sklem o předepsané tloušťce 0,17 mm
/0	= preparát bez krycího skla

Objektivy firmy Olympus:

UIS = objektivy s korekcí na nekonečno

PC = fázový kontrast

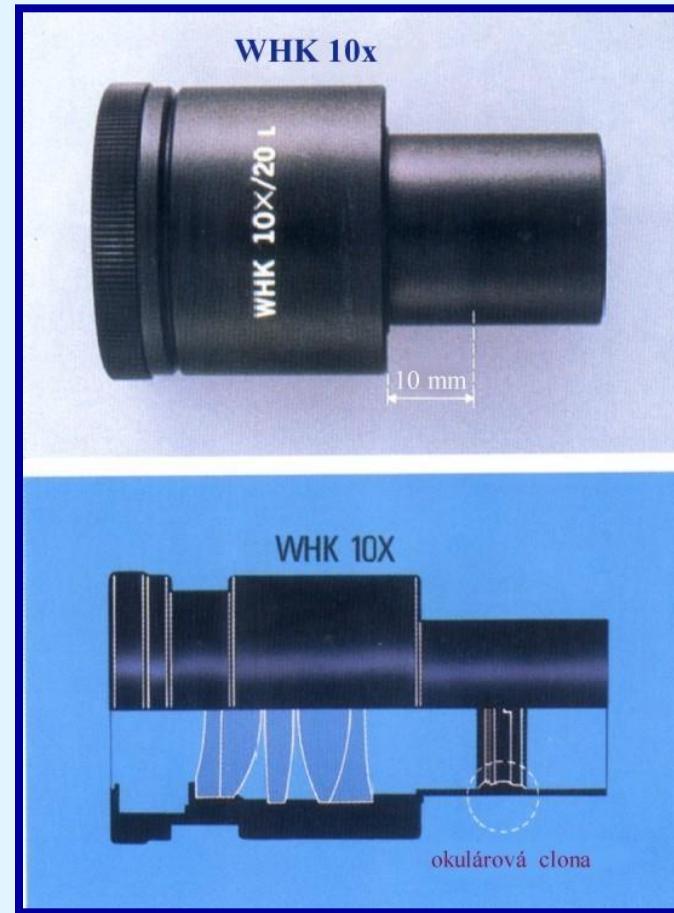
NC = No Cover – pro preparáty bez krycího skla

pol = polarizační objektiv

■ Okulář

(lat. *oculus* = oko)

= optická soustava,
která zvětšuje obraz
vytvořený objektivem



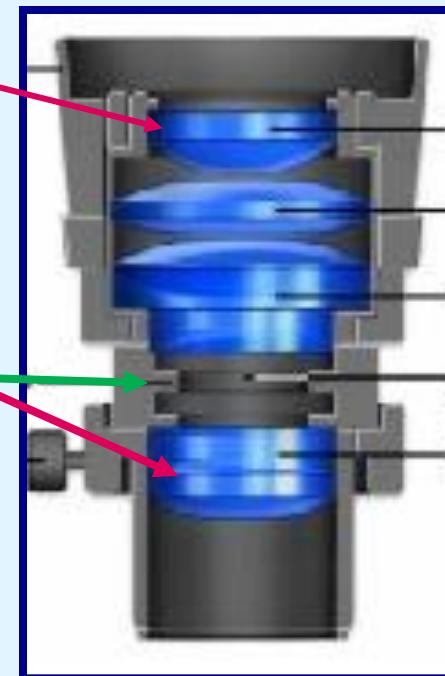
Okulár (OK):

oko v horním ohnisku OK

- čočka **očnicová (frontální)**
blíže k oku

- čočka **sběrná (kolektivní)**
blíže k objektu

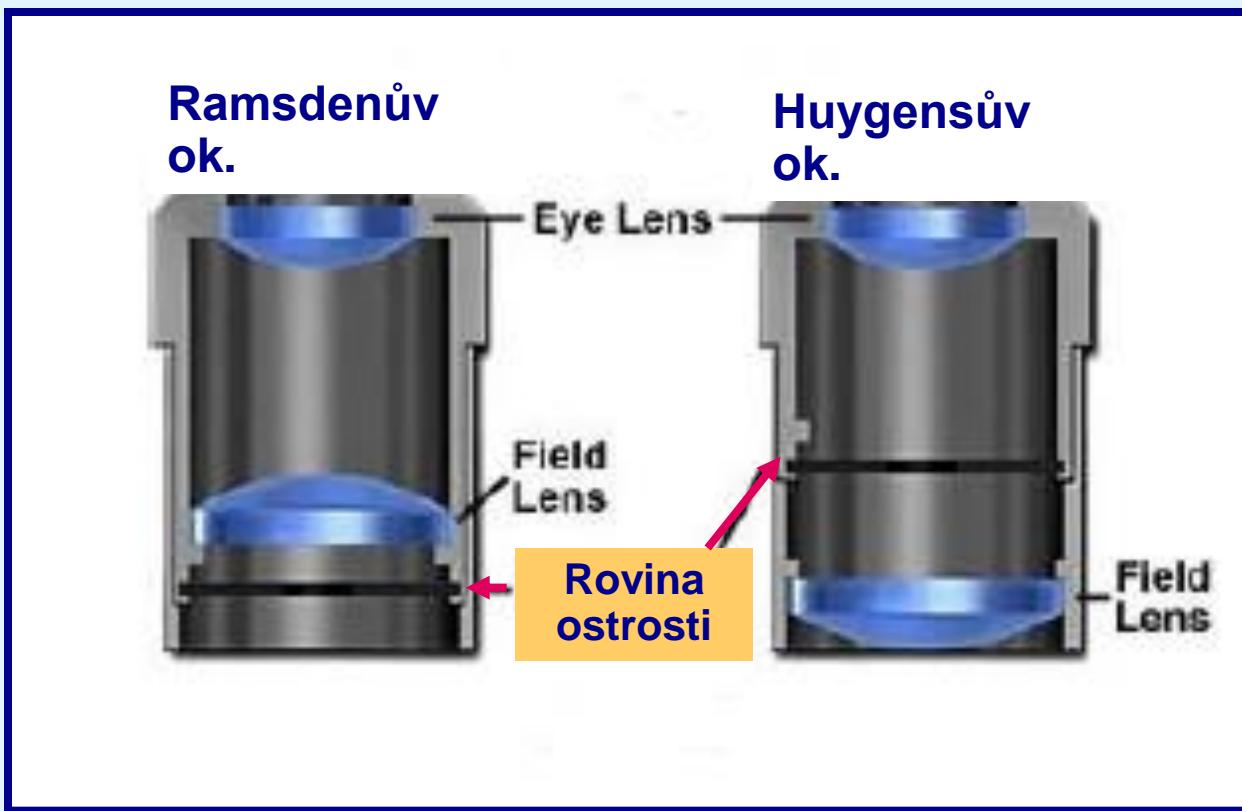
- kruhová clona mezi
čočkami



Zvětšení okuláru
(větš. 5 – 25x) je tzv. **prázdné**

Okuláry jednoduché

Liší se umístěním roviny ostrosti,
kde se tvoří obraz z objektivu



Dvě ploskovypuklé čočky

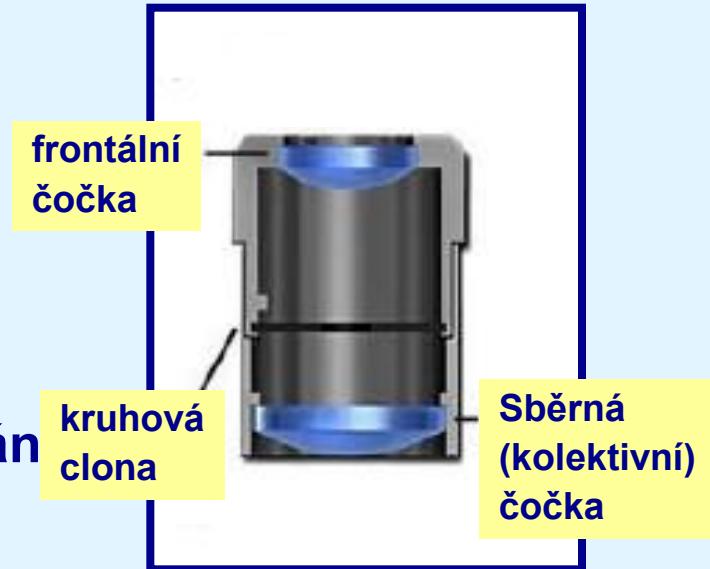


INVESTICE DO ROZVOJE VzděláVání

Typy okulárů

Huygensův okulár

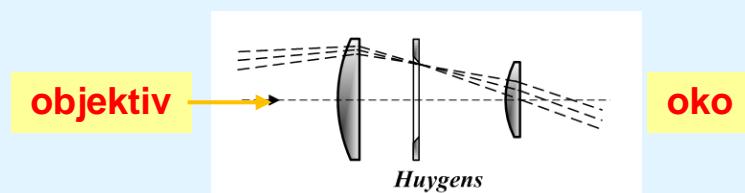
- obecný typ (levný)
- nekoriguje zvětšení
- obrazové pole vyklenuté
- vhodný pro práci se středně silnými achromáty při vizuálním pozorování
- nelze použít jako čočku
- nevhodný pro mikrofotografii



Christian Huygens (1629-1695)

dánský matematik a fyzik, současník Leeuwenhoeka

- zdokonalil čočky v dalekohledu (objevil Saturnovy prstence)
- formuloval vlnovou teorii světla
- objevil polarizaci světla

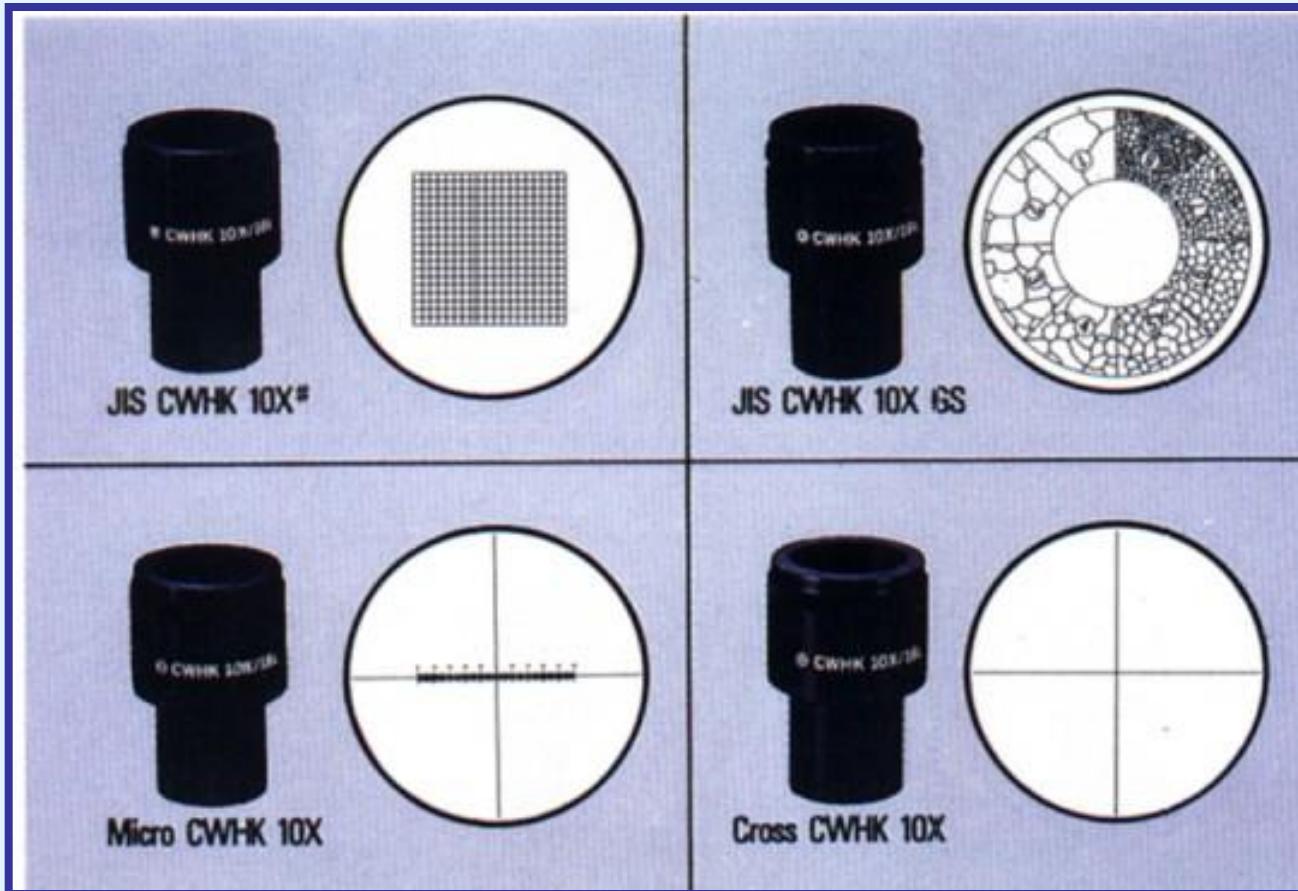


https://cs.wikipedia.org/wiki/Okul%C3%A1r#/media/File:Huygens_1703.png

Typy okulárů:

- **kompenzační okuláry** - konstrukce okulárů tak, aby korigovaly vady objektivů
- **periskopické** (periplanatické, orthoskopické) zorné pole téměř rovné
- speciální okuláry - **polarizační, spektroskopické, projekční ...**
- **pankratický** okulárový systém
 - plynulé zvětšování objektivního obrazu
- **ukazovací okulár** (označení U)
- **měřicí okulár** (M) - se zabudovaným okulárovým měřítkem mezi sběrnou a oční čočkou
- okulár s **kroužkem dioptrické korekce**

Různé typy okulárů s vloženými měřícími rastry (umístěné v rovině ostrosti okulárů)



Označení okulárů:

školní mikroskop Olympus CHK2: **WHK 10x -T/18 L**

fluorescenční mikroskop BX60: **WH10x/22**

A = obecný okulár bez barevné vady velikosti

K, C = okulár s kompenzačním účinkem

(má opačnou barevnou vadu velikosti než objektiv, takže ji vyrovnává)

P = planokulár bez barevné vady velikosti, širokoúhlý

Pk = planokulár s kompenzačním účinkem

W n. WE n. WF = wide field = širokoúhlý

H = high point – tzv. vysoký oční bod

(výhodné pro lidi s brýlemi, ale brýle nejsou nutné)



■ Objektivy a okuláry
od různých výrobců
nekomбинujeme !!!

Zvětšení mikroskopu (M)

$$M = \frac{D \cdot 250}{f_1 + f_2}$$

D = optická délka tubusu (často Δ)

(tj. vzdálenost zadního ohniska objektivu od předního ohniska okuláru; tzv. optický interval)

250 = normální zraková délka (250 mm)

f₁ = ohnisková vzdálenost objektivu (v mm)

f₂ = ohnisková vzdálenost okuláru (v mm)

V praxi: celkové zvětšení mikroskopu:

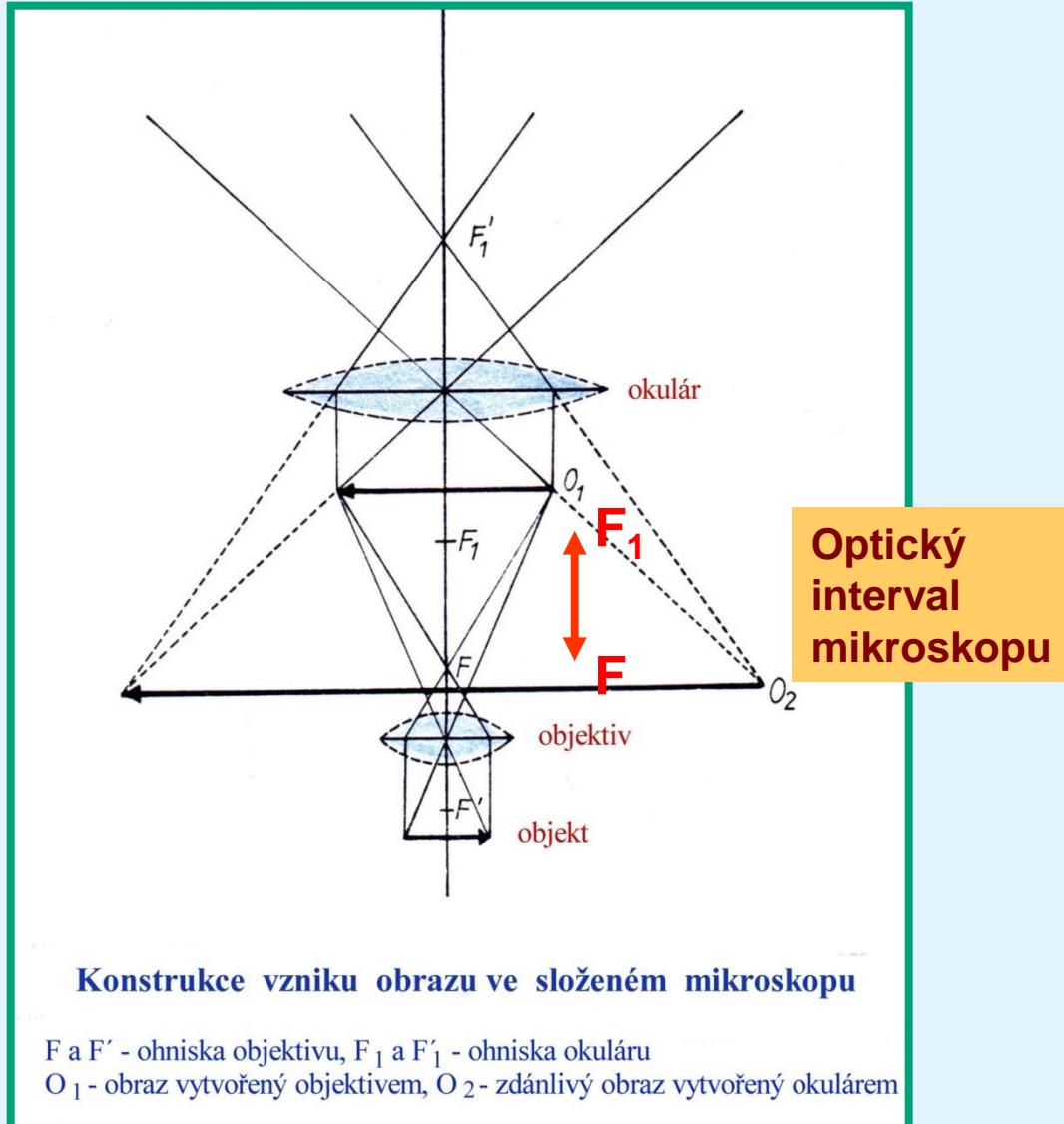
M = zvětšení okuláru . zvětšení objektivu



INVESTICE DO ROZVOJE VzděláVání

Optický interval mikroskopu (D; Δ)

= vzdálenost zadního ohniska objektivu (F) od předního ohniska okuláru (F_1')



Optický
interval
mikroskopu

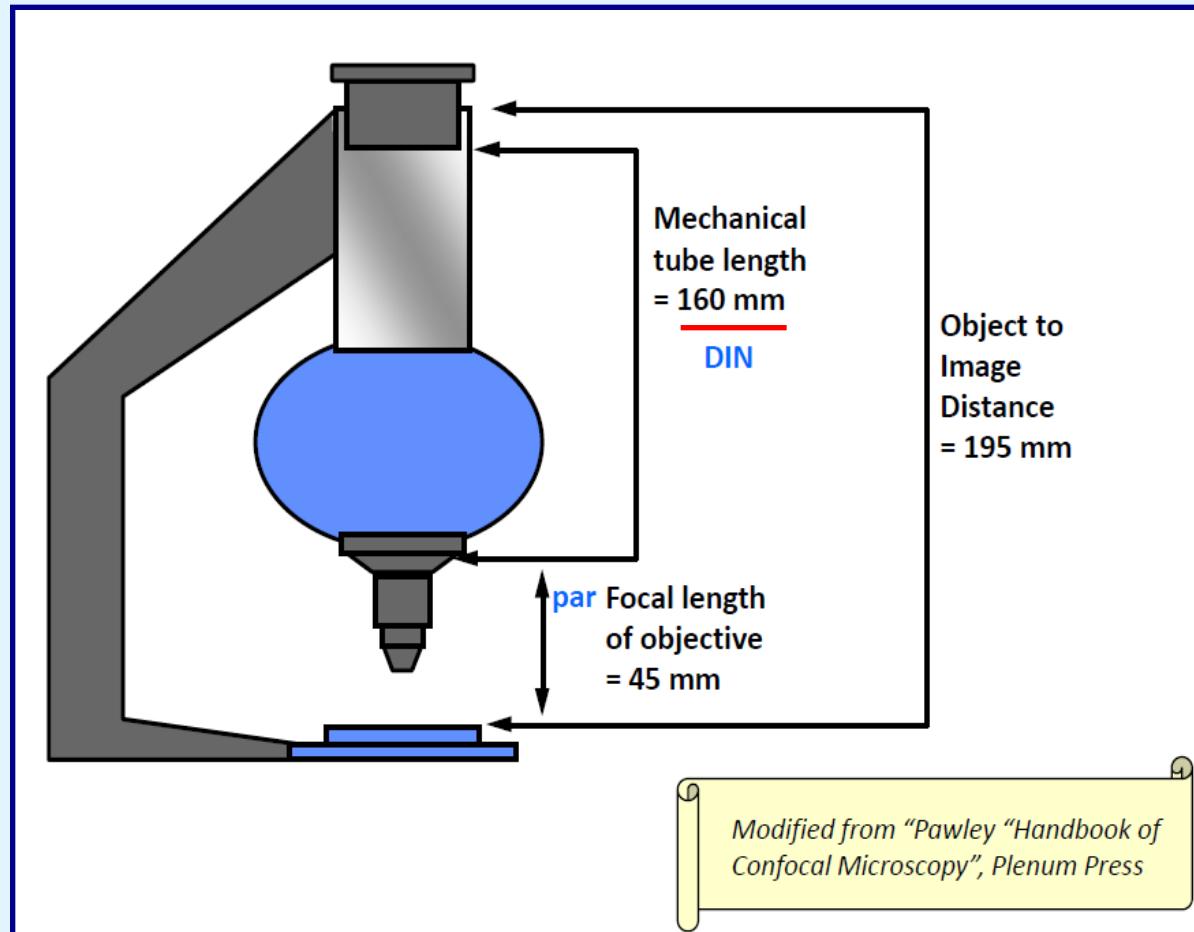
Konstrukce vzniku obrazu ve složeném mikroskopu

F a F' - ohniska objektivu, F_1 a F_1' - ohniska okuláru
 O_1 - obraz vytvořený objektivem, O_2 - zdánlivý obraz vytvořený okulárem

Pozn.: neplést s mechanickou
délkou tubusu (viz dále)

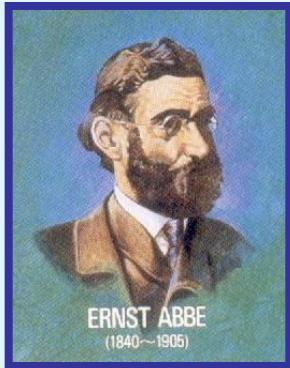
Mechanická délka tubusu

= vzdálenost dosedací plochy objektivu od dosedací plochy okuláru



Užitečné zvětšení mikroskopu (Z)

- souvisí s rozlišovací schopností oka (tj. $d = 0,15 \text{ mm}$) a odvozuje se od hodnoty numerické apertury objektivu, platí:



$$Z = 500 \cdot NA_{\text{obj}} \text{ až } 1\,000 \cdot NA_{\text{obj}}$$

Příklad: u obj. 100x s imerzí o $NA = 1,25$

$$Z = 625x - 1\,250x$$

Praxe:

- pro objekty se středním kontrastem $Z = 500 \cdot NA_{\text{obj}}$

- u vysoko kontrastních objektů $Z = \text{až } 1\,000 \cdot NA_{\text{obj}}$

(např. ve zbarvených preparátech)

Odvození užitečného zvětšení (Z):

(Protože lidské oko má omezenou rozlišovací schopnost, zvětšení by mělo být zvoleno tak, aby detaily obrazu byly stále okem rozlišitelné.)

$$Z = \frac{0,15 \text{ mm}}{d} = \frac{0,15}{\lambda}$$
$$0,61 \cdot \frac{0,15}{NA}$$

$$Z = \frac{0,15 \text{ mm}}{d} = \frac{NA \cdot 0,15}{0,61 \cdot \lambda}$$

λ = pro bílé světlo
je 0,00055 mm

$$Z = 447 \cdot NA$$

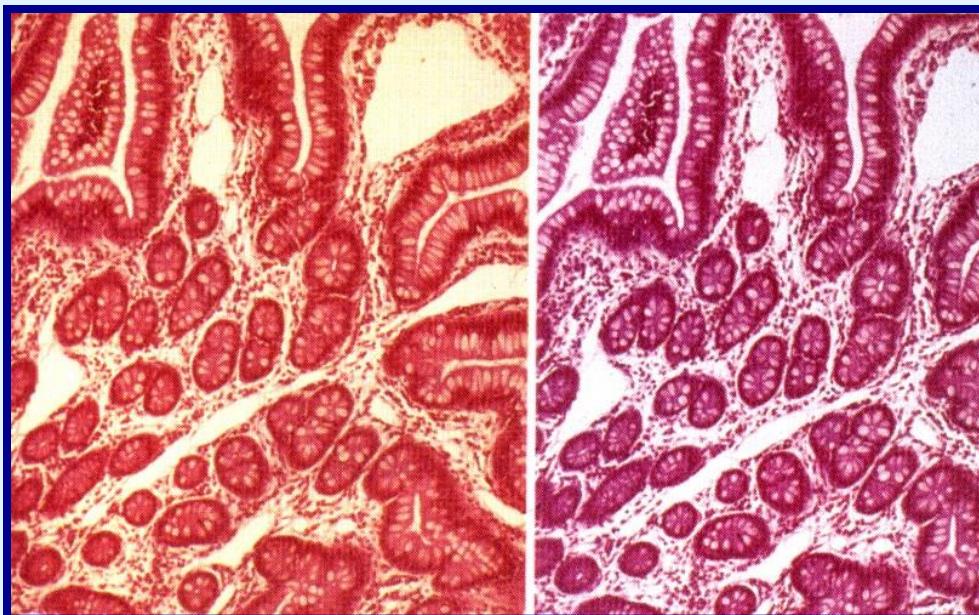
■ Optické filtry

matné skleněné filtry různé hustoty

→ rovnoměrně osvětlené zorné pole o vhodné světelnosti

neutrální filtr: snižuje intenzitu světla, spektrum nemění

světle modrý filtr: žárovkové světlo → denní (bílé)



**Světle modrý
filtr**

■ Optické filtry

žlutozelený filtr – použití s achromáty

- interferenční žlutozelený filtr propouští jen světlo těch vlnových délek (červené, modré), pro kterou jsou objektivy korigovány

filtry pro fluorescenci – excitační a bariérové, dichroické (jiná barva pro odražené a propuštěné světlo)

polarizační filtr → polarizace světla

filtry v mikrofotografii - zlepšení kvality černobílých snímků



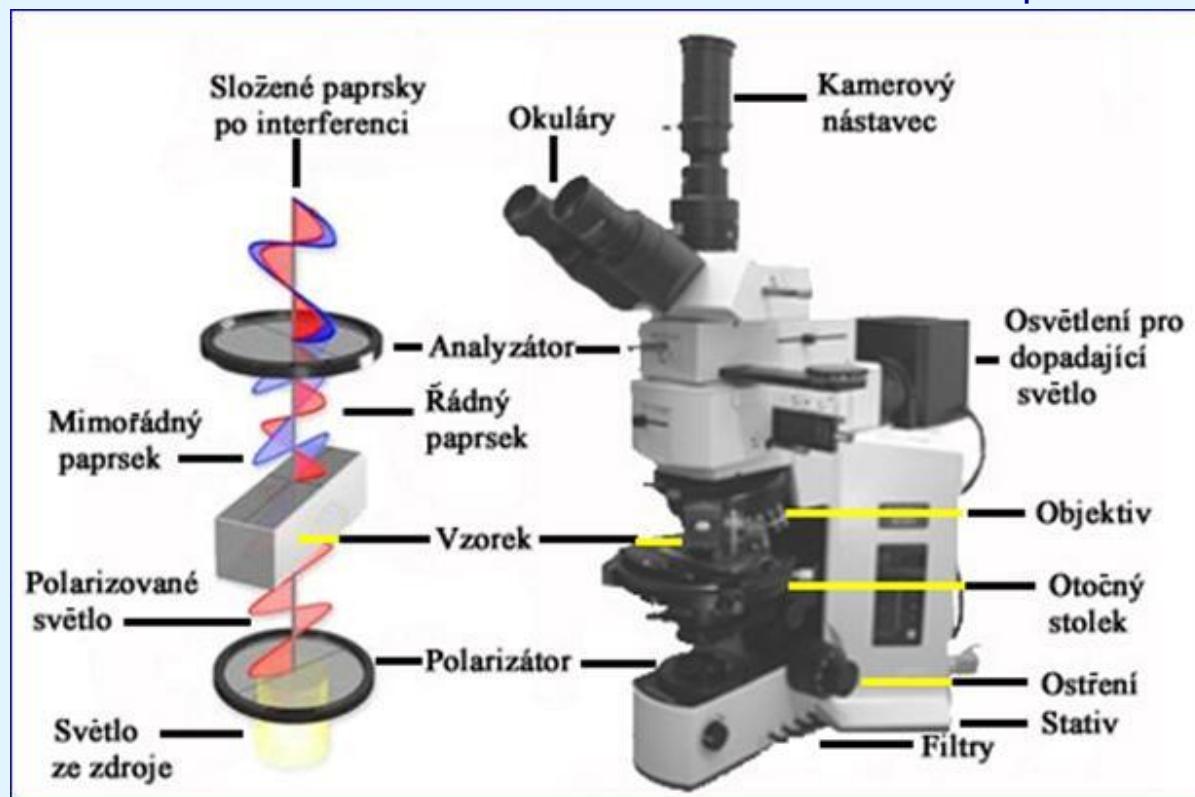
[http://www.dalekohledy-mikroskopy.cz/
produkt/mikroskopy/polarizacni-filtr-2](http://www.dalekohledy-mikroskopy.cz/produkt/mikroskopy/polarizacni-filtr-2)

■ Optické filtry

Polarizační filtry:

Slouží k polarizaci světla (polarizátor) a analýze (analyzátor)

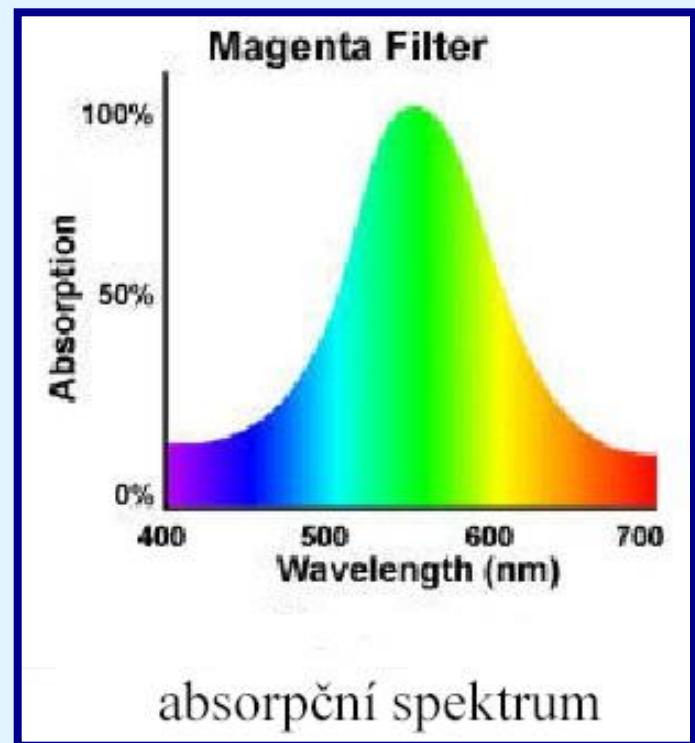
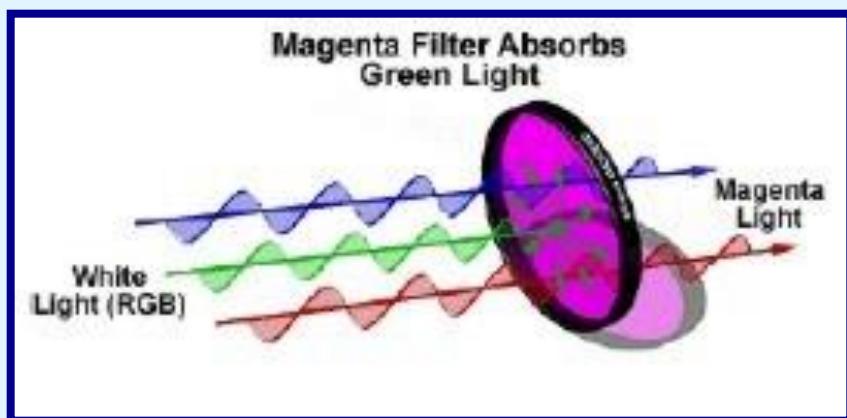
Polarizační mikroskop



■ Optické filtry

Absorpční filtry:

**purpurový (magenta *) – absorpcie zelené složky světla,
selektivní propustnost pro červené
a modré světlo → fialová barva**



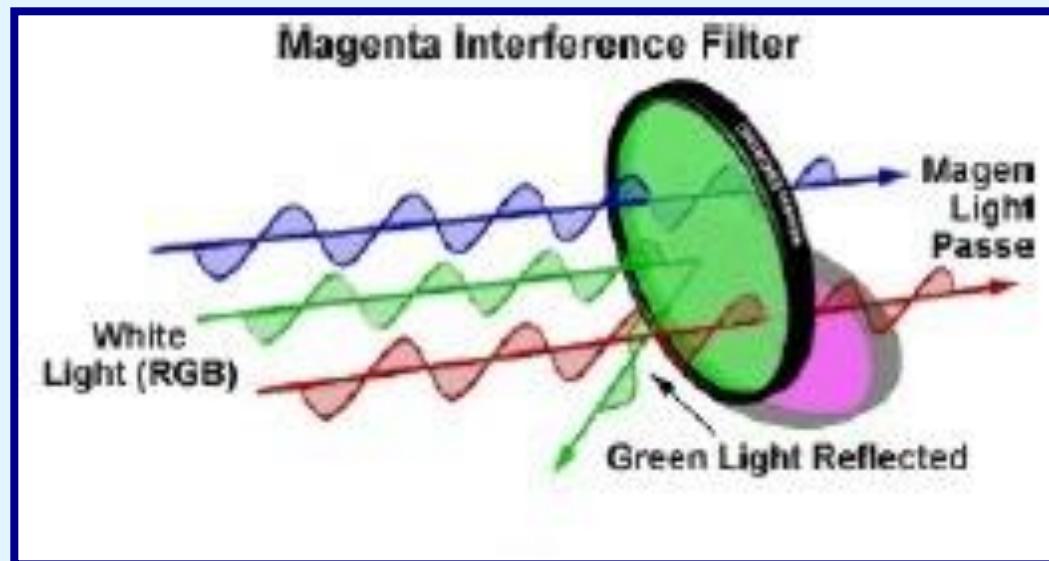
absorpční spektrum

* Magenta = purpurová barva; jedna ze složek při subtraktivním míšení barev při tisku (CMYK vs. RGB u monitorů, TV)

■ Optické filtry

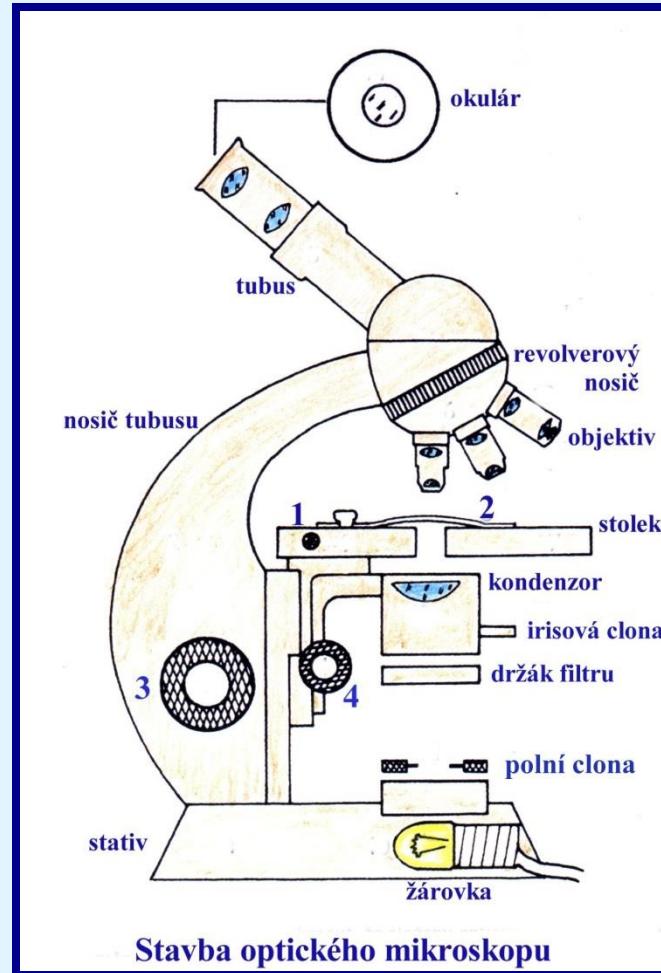
Interferenční filtry:

Odrazem a vícenásobnou interferencí
potlačují nežádoucí vlnovou délku



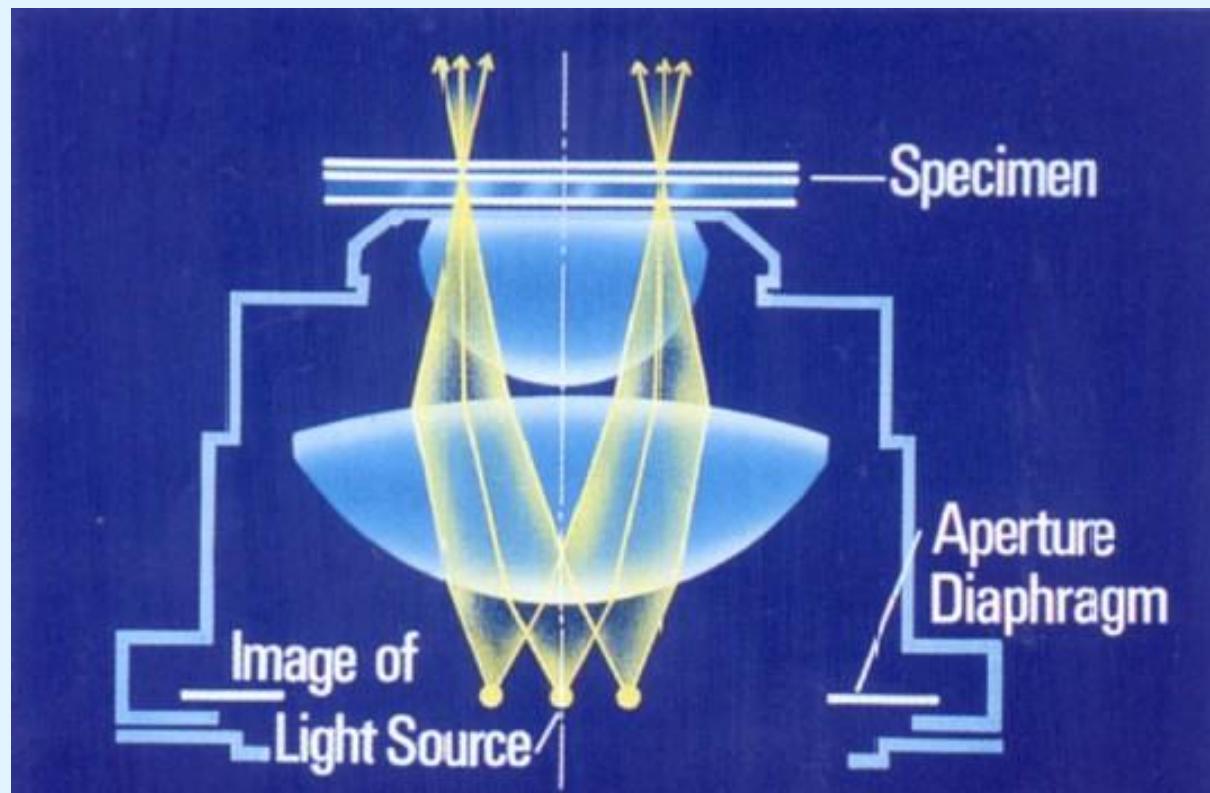
Osvětlovací zařízení:

- kondenzor
- zdroj světla



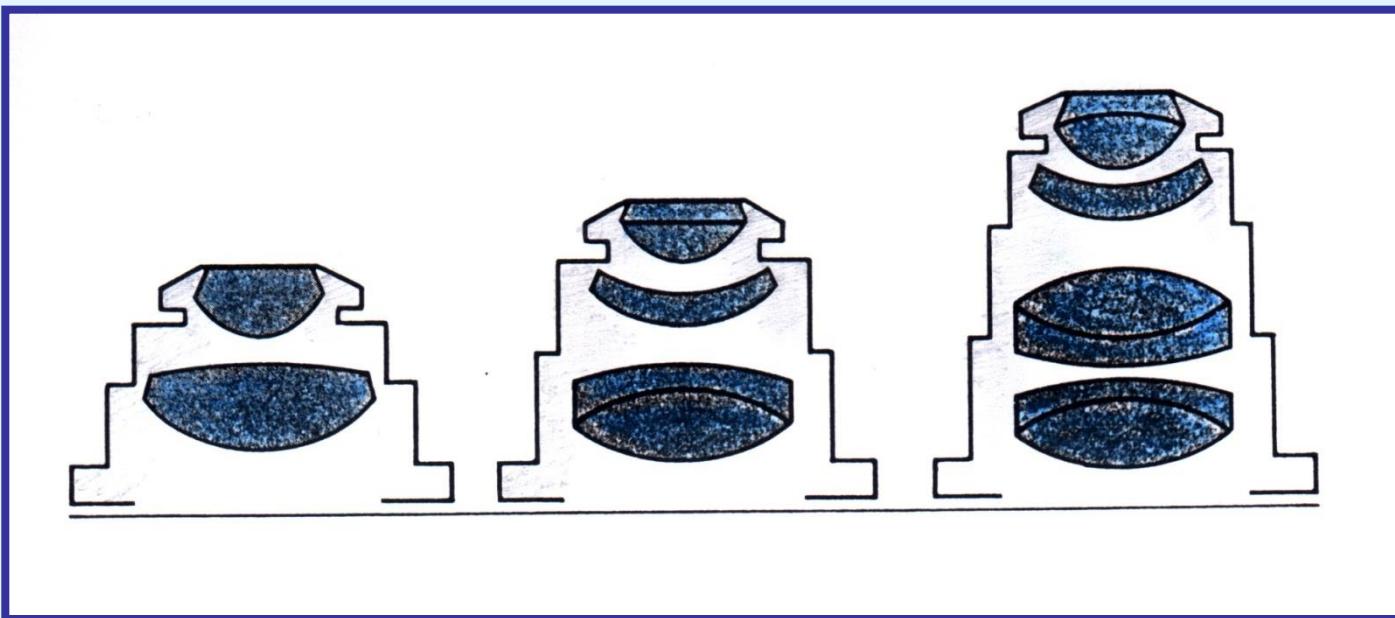
■ Kondenzor

- soustředí paprsky tak, aby bylo dokonale osvětleno celé zorné pole



Kondenzor

- soustava čoček s krátkou ohniskovou vzdáleností
(průměr čoček větší, barevná a sférická vada neodstraněna)
- v podstatě obrácený objektiv nahoře s plankonvexní čočkou



Abbeho
k.

Aplanatický
k.

Aplanatický
achromatický

Apertura kondenzoru

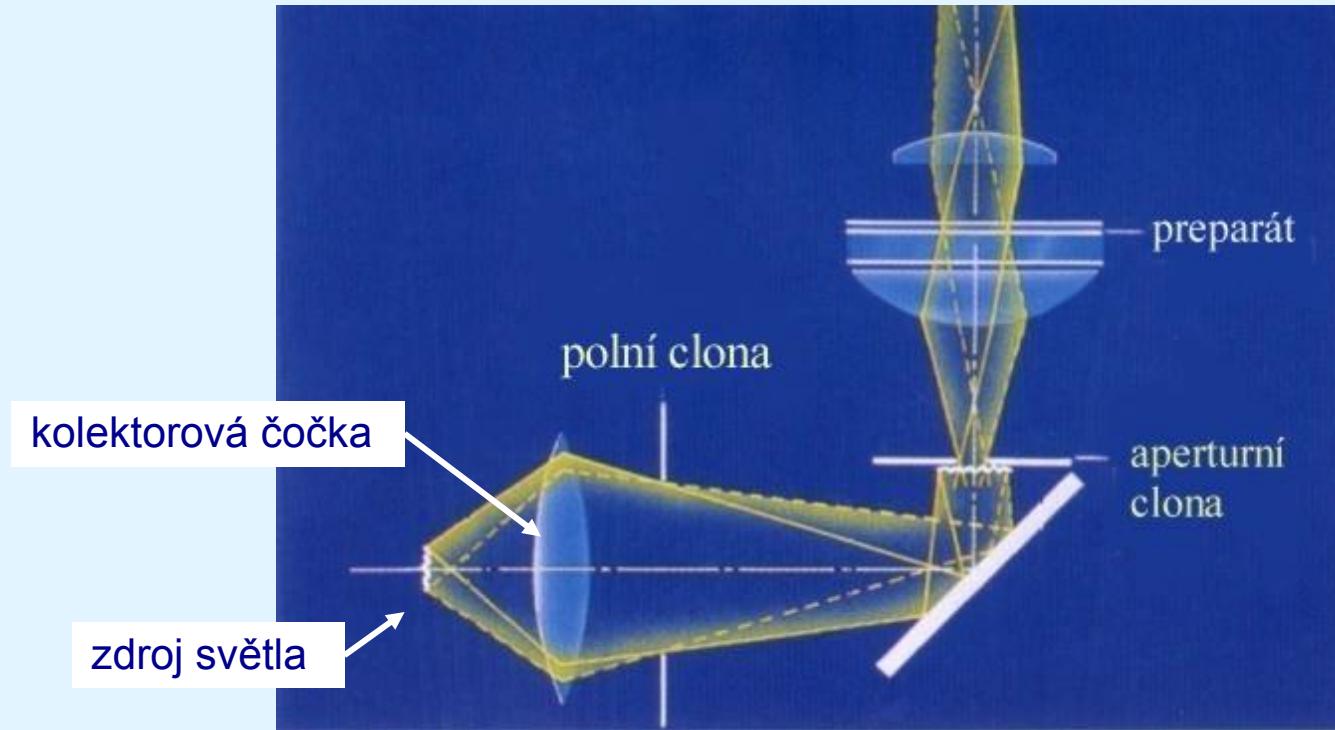
- Apertura (NA) kondenzoru má být shodná s aperturou objektivu
(pankratický kondenzor – plynulá změna apertury od 0,16 do 1,4 v souhlase s použitým objektivem)
- různé typy kondenzorů – revolverový úchyt
- speciální kondenzory (fázový kontrast, fluorescence, zástin, polarizace)

Clony u kondenzoru

**regulace množství světla,
přicházejícího do mikroskopu:**

polní clona — blíže zdroje světla

irisová (aperturní) clona — pod kondenzorem



Cloněním ovlivňujeme:

- kontrast
- hloubku ostrosti
- rozlišení podrobností
- jas

Jednotlivé parametry nelze nastavit nezávisle.

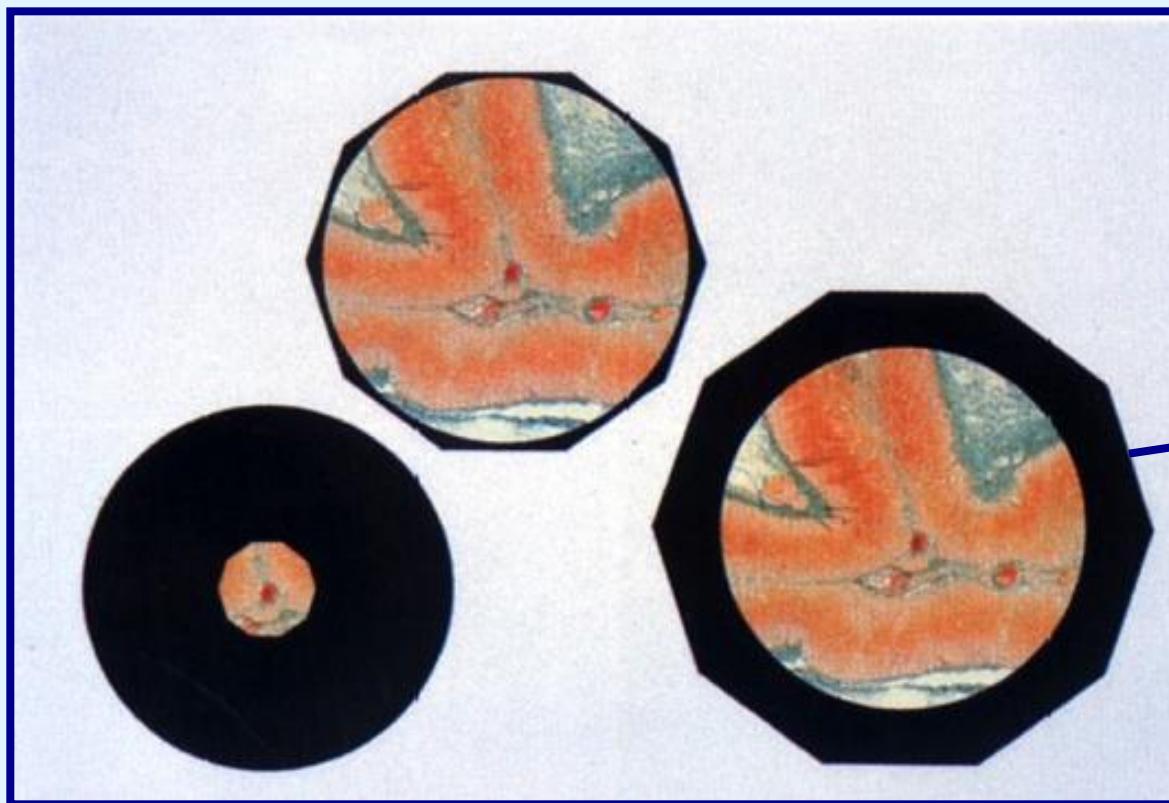
Parametry mikroskopického obrazu v závislosti na otevření aperturní clony:

Aperturní clona kondenzoru	Kontrast	Hloubka ostrosti	Rozlišení	Jas
zcela otevřená	malý	malá	velké	velký
zcela zacloněná	velký	velká	malé	malý

Světelnost (jas) regulujeme pomocí matných filtrů nebo snížením proudu v lampě (regulátorem osvětlení)

Nejlepší rozlišení – $NA_{\text{obj}} = NA_{\text{kond}}$

Pokud NA kondenzoru je nižší, tak zúžíme kužel světla vrhaného kondenzorem na objekt pomocí irisové clony kondenzoru



Optimální nastavení
aperturní clony:
70 - 80 % numerické
aperture objektivu

Význam clonění

Při nadměrném přiclonění:

- kolem struktur vznikají světlé **lemy** (výsledek ohybu světla) a jsou zobrazeny nečistoty v různých výškách média

Nedostatečné přiclonění:

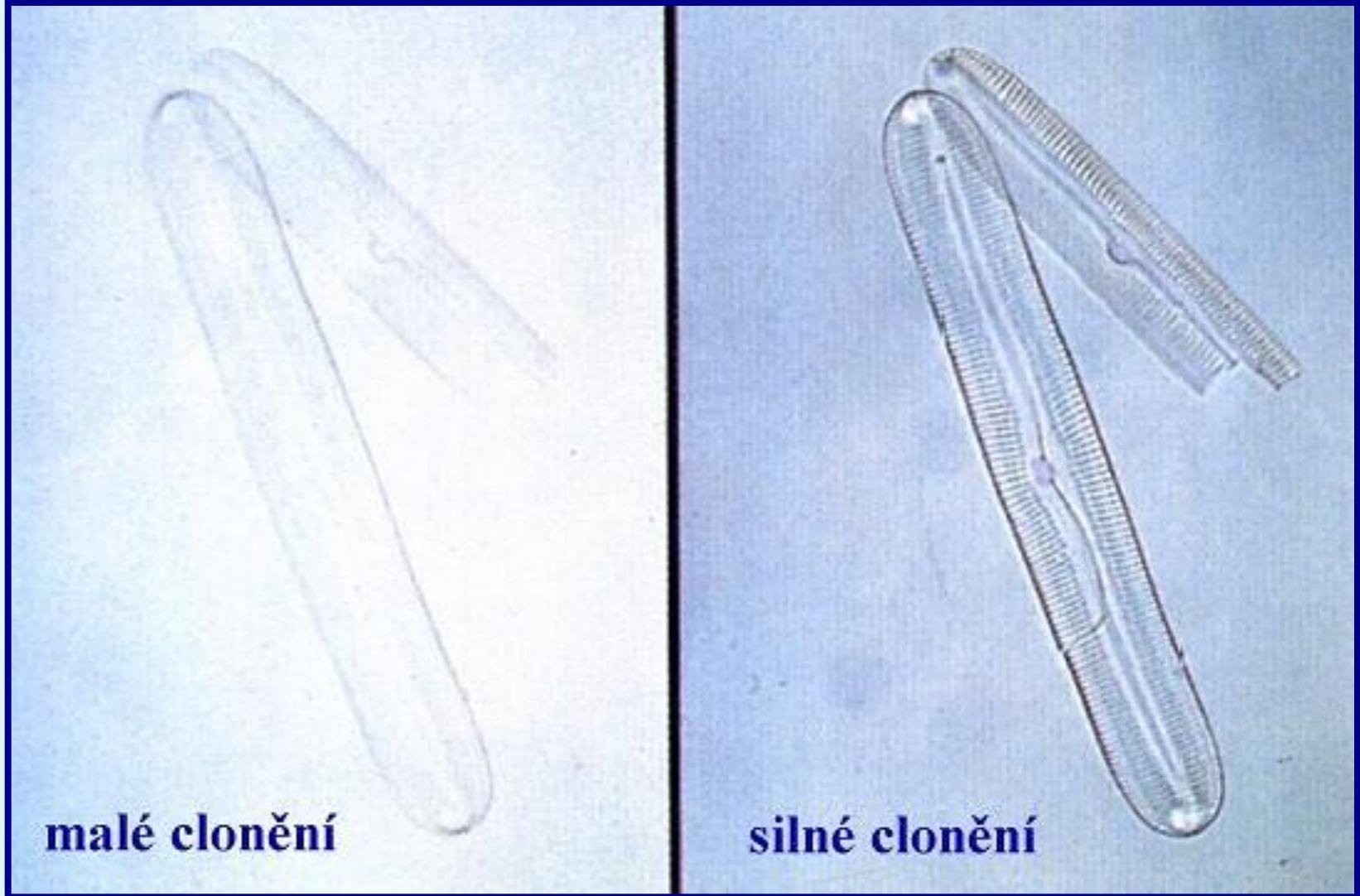
- **přesvětlení objektu** → zmenšení kontrastu a hloubky ostrosti
(při přesvětlení se objekt stává mnohdy neviditelným !!!)



**Pro každý objektiv upravujeme
aperturu (irisovou clonu)
kondenzoru zvlášť !!!**

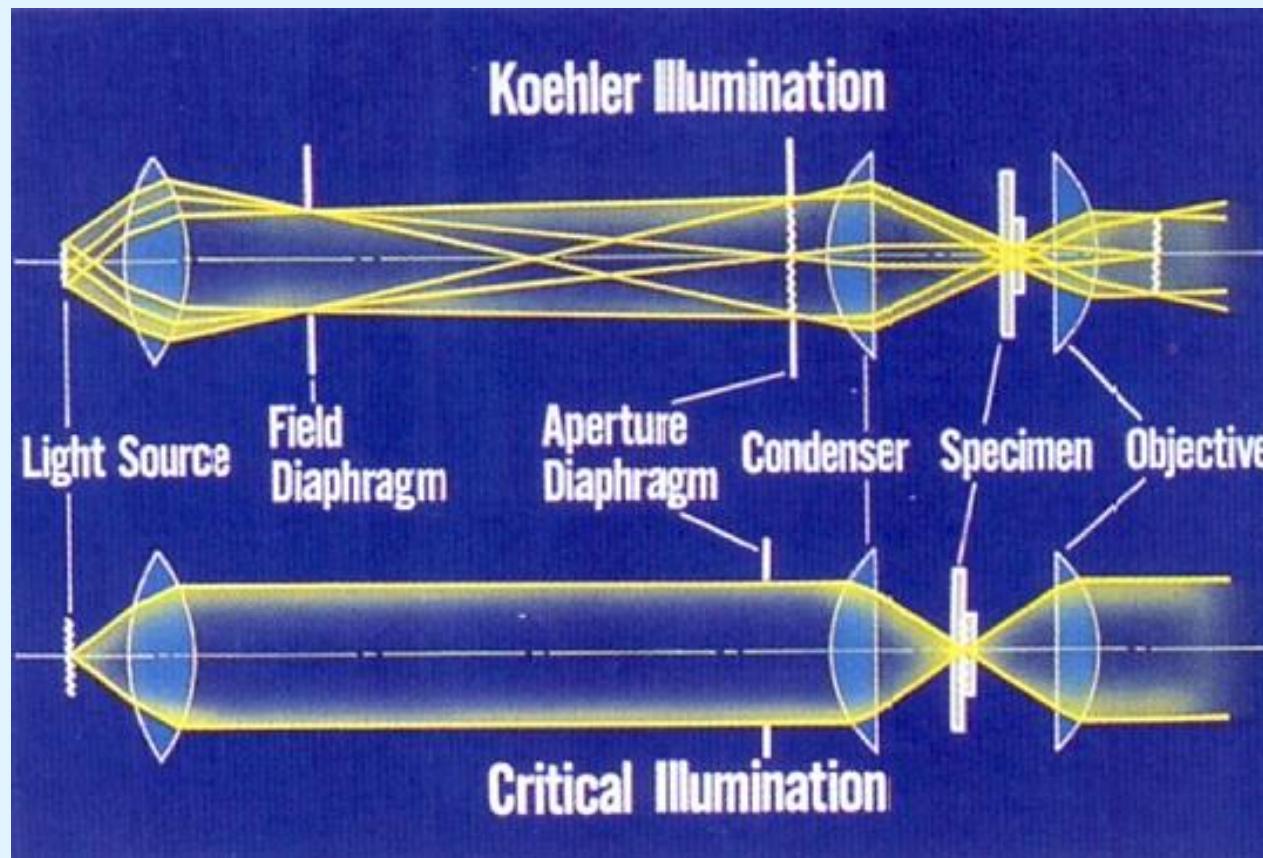
Příklad clonění

(rozšivka)



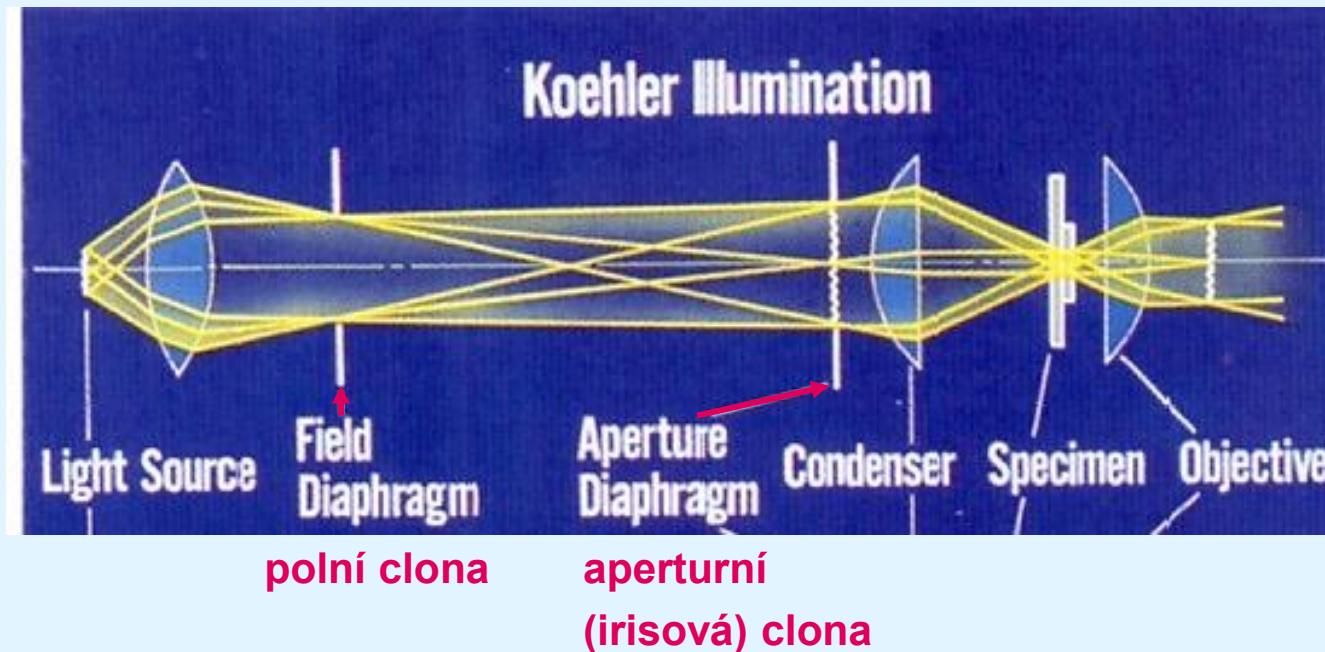
Köhlerovo osvětlení

= soustředění (centrace) světelného zdroje a clon doprostřed zorného pole

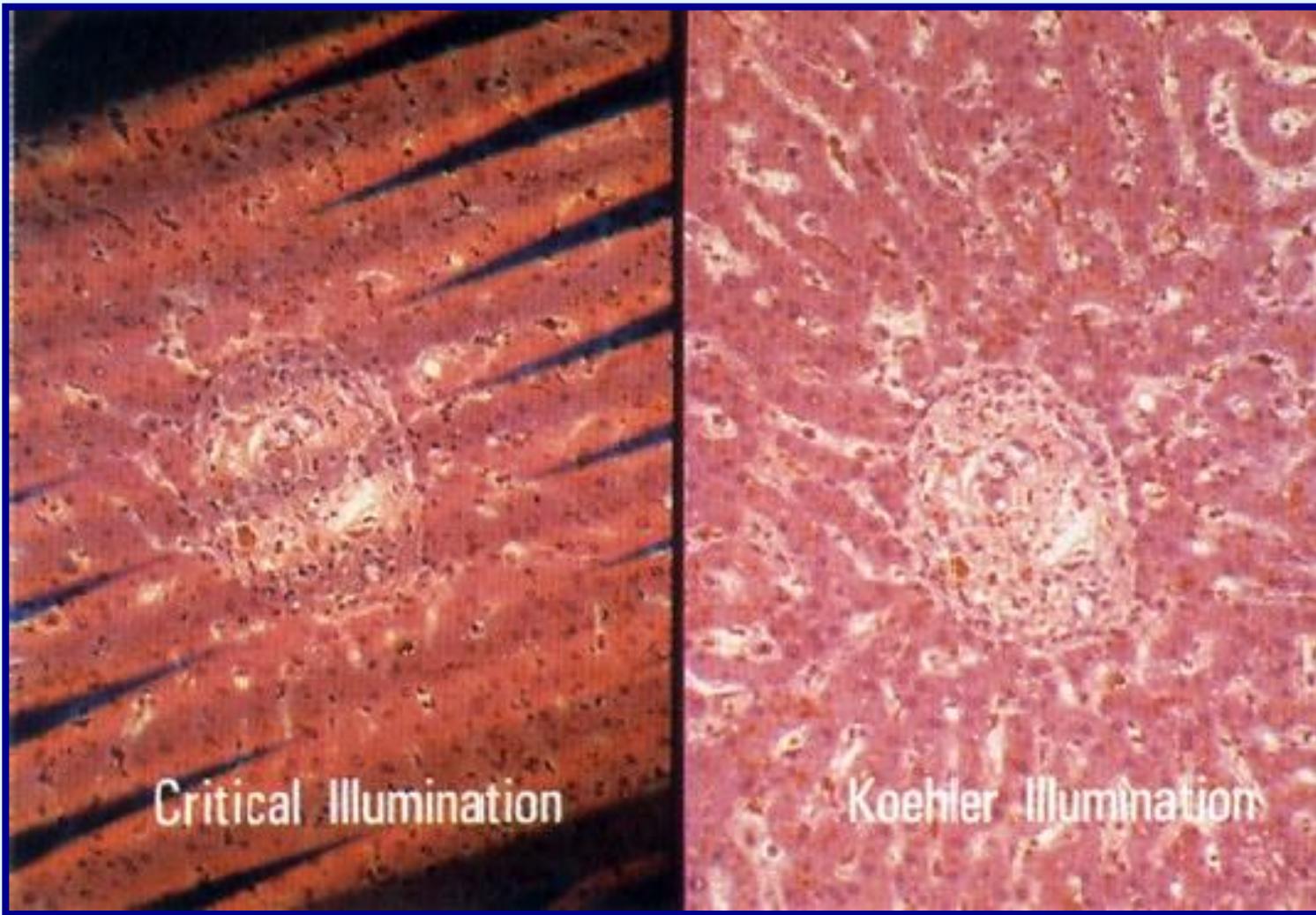


Kőhlerovo osvětlení

Při tomto osvětlení zobrazuje kondenzor clonu zdroje světla (polní clonu) do předmětové roviny objektivu a kondenzorová clona (irisová) reguluje světelný tok tak, že je osvětlené pouze zorné pole mikroskopu.



Kritické a Kőhlerovo osvětlení



Critical Illumination

Koehler Illumination



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenční
schopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

■ Zdroje světla pro mikroskopii

- **denní světlo** (nestálá barva a intenzita)
- **60 až 100 W žárovky z mléčného skla**
 - většinou wolframové vlákno o barevné teplotě 3 200 K
(používání namodralého kobaltového filtru k přeměně na denní světlo)
- **halogenové žárovky nebo lampy**
 - wolfram s parami jodu; světelný výkon 4x větší než klasická žárovka
- **LED* diodové osvětlení** (životnost až 50 000 hod)
- **vysokotlaké rtut'ové výbojky** - pro UV (fluorescence)
 - zvláštní napájení
- **lasery**** (viz např. laserová konfokální mikroskopie)
- **vláknová optika** – viz „husí krky“ u stereolupy

* LED = zkratka z Light Emitting Diode

** LASER = Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

Zdroje světla pro mikroskopy



12 V

6 V

6-30 V

Halogenová
žárovka

Žárovka s
odrazným
zrcádkem



Led dioda

(Light Emitting Diode)



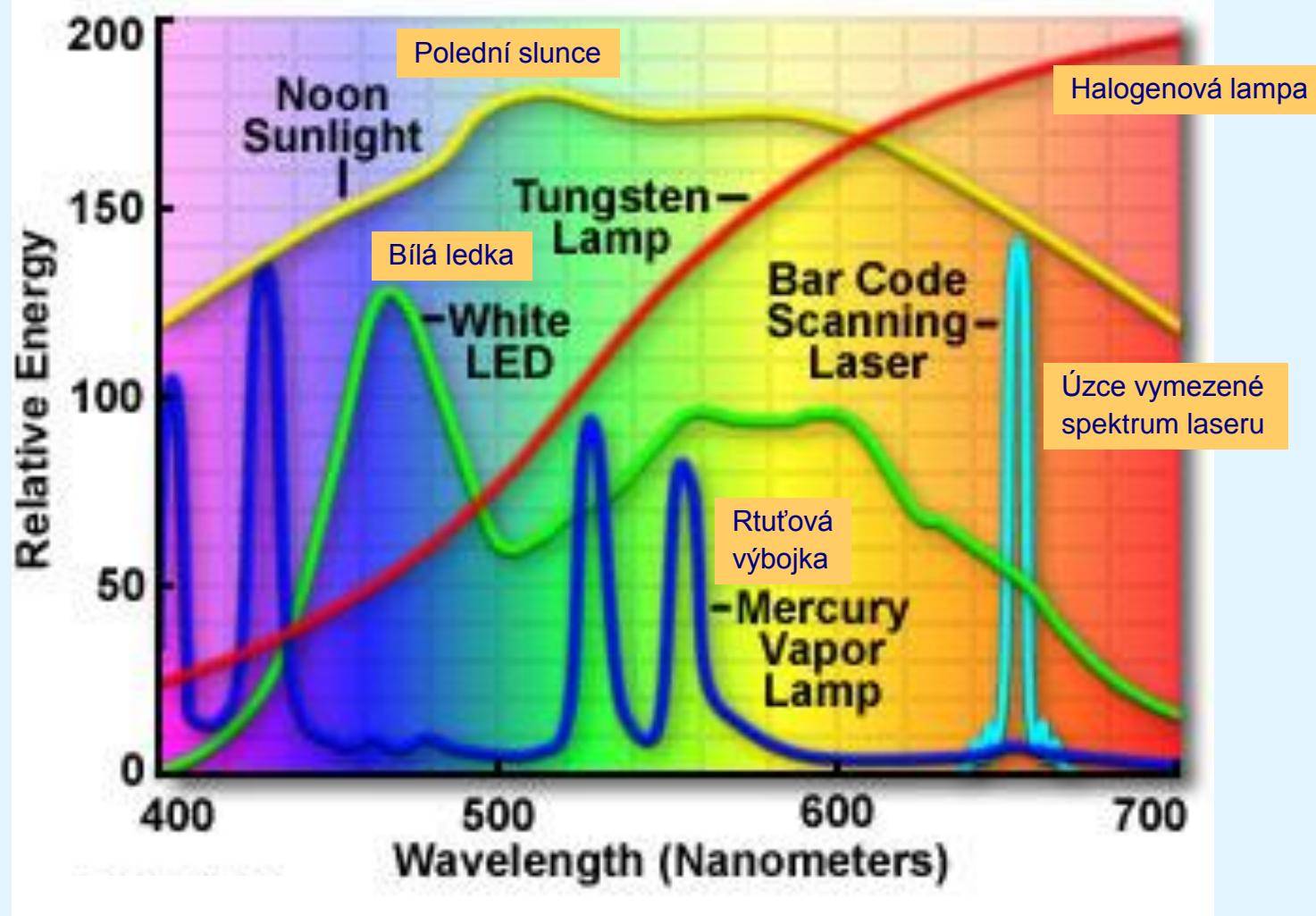
Vysokotlaková rtuťová výbojka



Laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation)

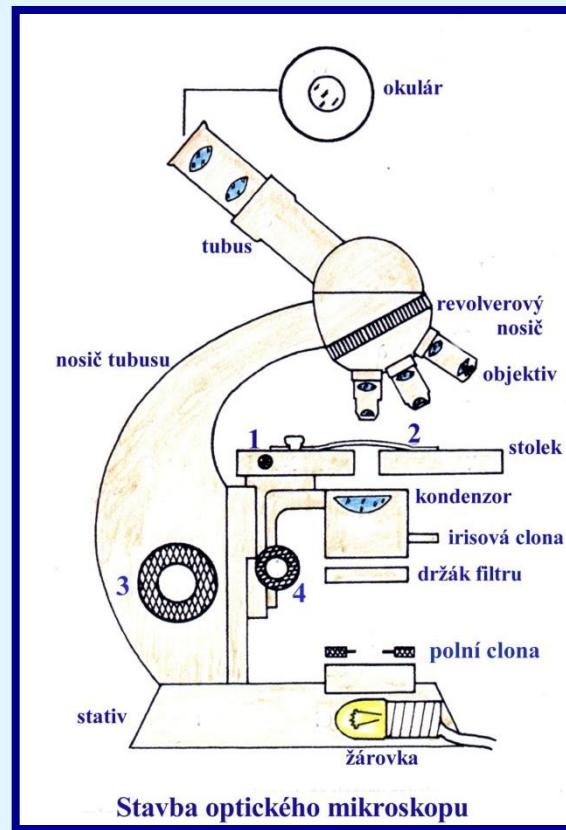
Spektra zdrojů světla pro mikroskopii

Spectra From Common Sources of Visible Light



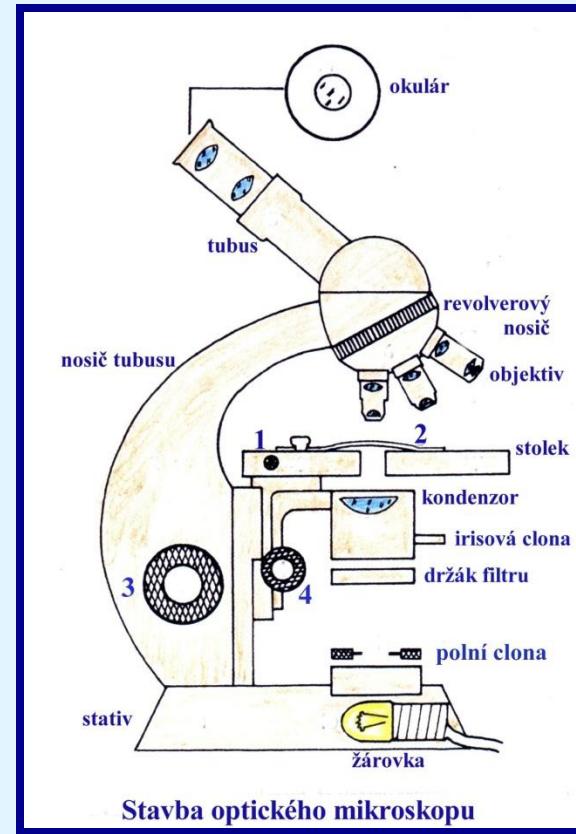
Mechanické části mikroskopu

- **stativ**
- **tubus**
- **zaostřovací zařízení**
- **stolek**



■ **Stativ**

- podstavec se zabudovaným osvětlením
- nosič tubusu
- ovládací šrouby posunů
- v noze různé filtry



■ **Tubus**

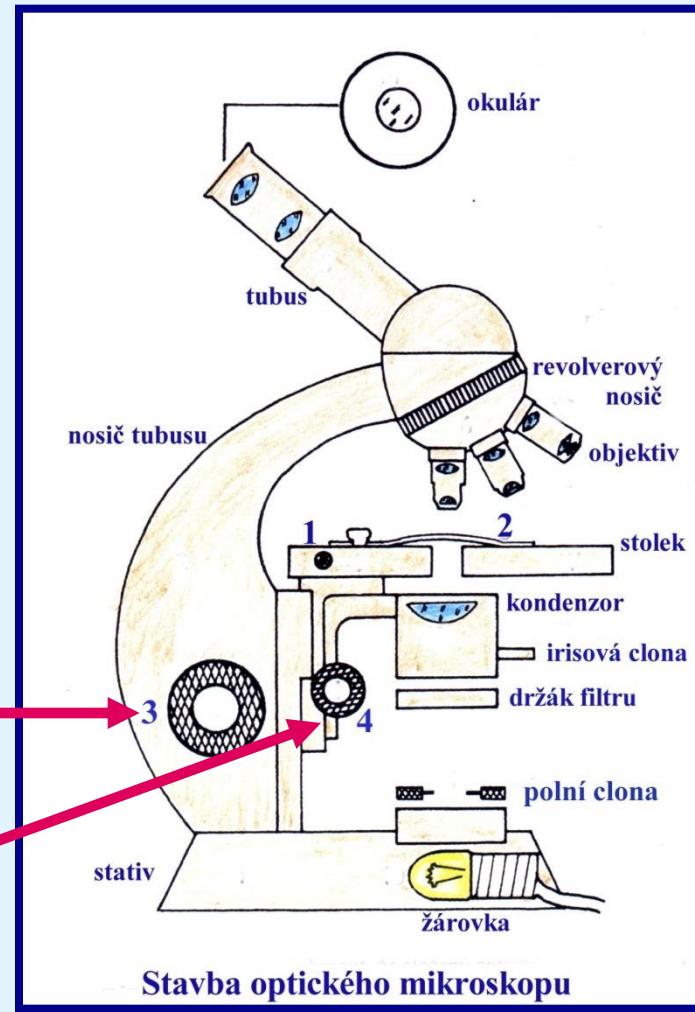
- trubice spojující objektiv a okulár
- normalizovaná mechanická délka je 160 mm nebo 170 mm (u anglických mikroskopů 250; délku tubusu je třeba dodržovat)
- různá délka tubusu mikroskopů s objektivy korigovanými na nekonečno (UIS, CFI60)
- revolverové zařízení (k rychlé výměně objektivů)
- sáňkové měniče objektivů (pro speciální účely a mikrofotografii)
- monokulární (přímý a nebo šikmý)
- binokulární (rozděluje svazek paprsků, stavitelný oční rozestup, dioptrické doostřování jedné okulárové hlavice)

■ Zaostřovací zařízení (viz 3, 4)

- šroub pro hrubý posun
- šroub pro jemný posun (mikrometrický)
- měřítko s údaji o velikosti posunu
- měření tloušťky preparátů

makrošroub

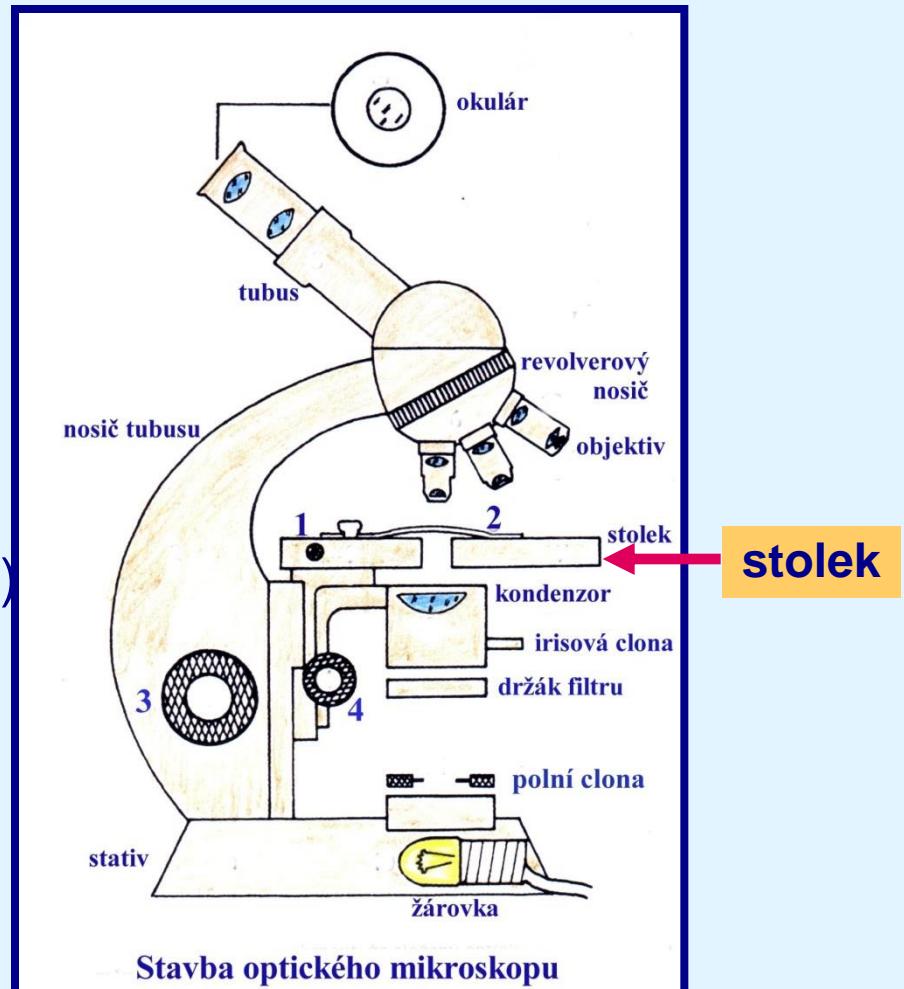
mikrošroub



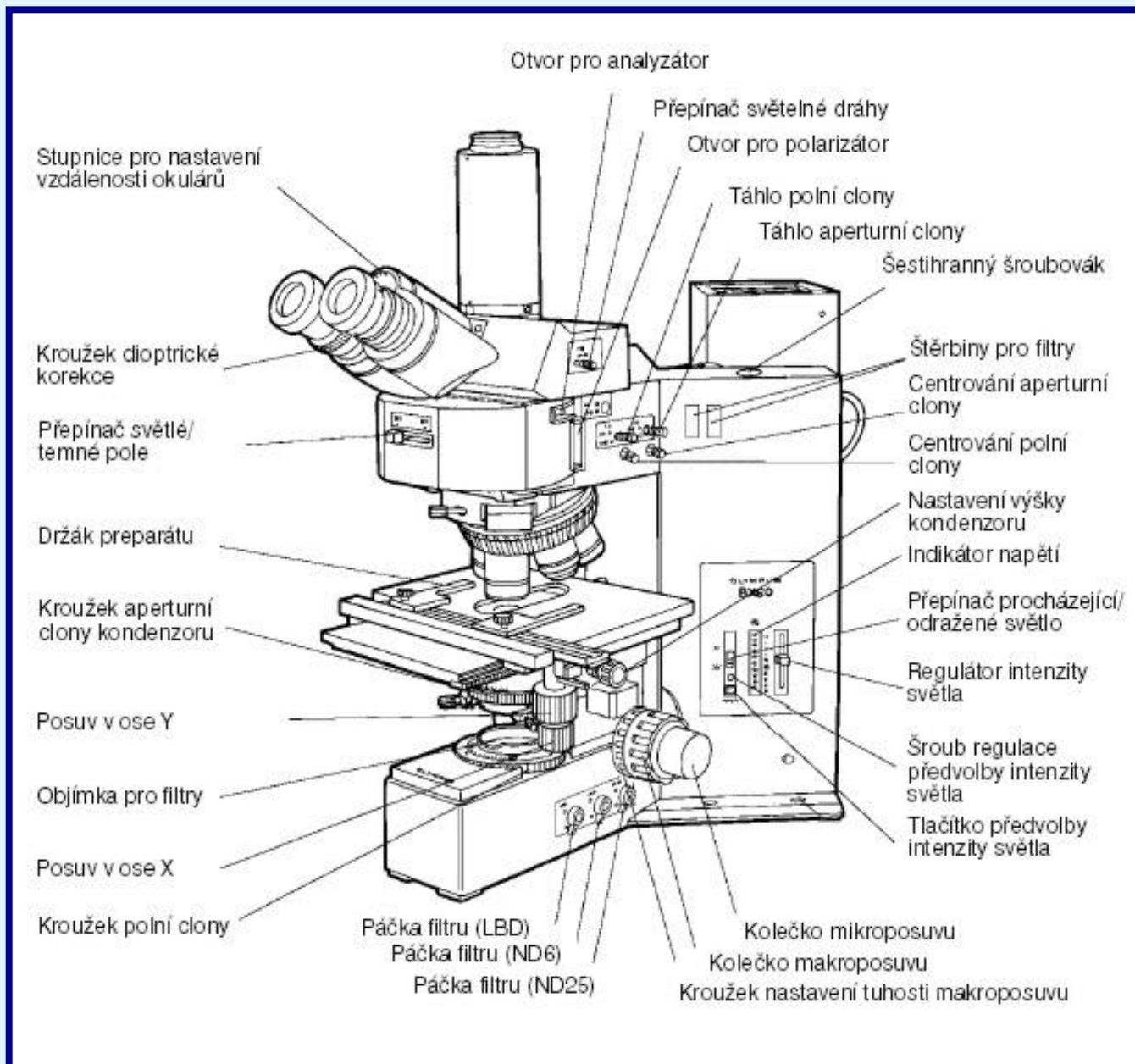
■ Stolek mikroskopu

- křížový stolek
+ vodič preparátů
měřítka

- kruhový stolek
otočný
(např. u geologických mikroskopů)



Olympus BX60 – popis mikroskopu



virtuální obrázky

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

<http://www.olympusmicro.com/primer/java/>