

Téma: Světelná mikroskopie

Úvod:

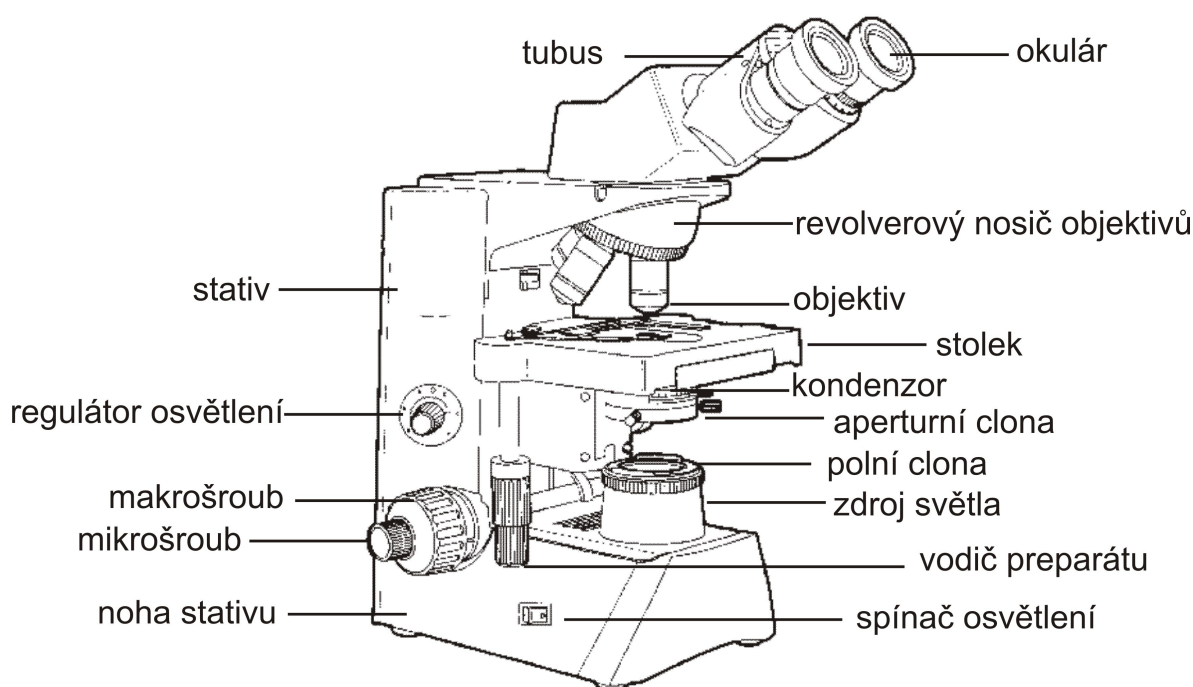
Světelná mikroskopie je základní metodou pozorování ve všech biologických oborech předmětem jejichž studia jsou buňky, tkáně, pletiva či mikroorganismy, protože rozlišovací schopnost světelného mikroskopu odpovídá právě velikosti buněk a některých buněčných organel. Maximální rozlišovací schopnost světelného mikroskopu neboli nejmenší vzdálenost, kdy lze od sebe odlišit dva objekty, je u světelného mikroskopu 0,2 nm. Světelná mikroskopie, jak již název napovídá, využívá ke zobrazení struktur světelných paprsků. Světlo lze definovat jako část oblasti elektromagnetického záření, kterou vnímáme zrakem. Základní charakteristikou světla je vlnová délka (λ), neboli vzdálenost dvou nejbližších bodů vlnění kmitajících ve stejné fázi, která určuje barvu světla. Pozorování objektů v mikroskopu se děje na základě jejich interakce s elektromagnetickým zářením (světlem), přičemž rozlišovací schopnost mikroskopu závisí na vlnové délce použitého záření. Pokud je vlnová délka příliš dlouhá a objekt velmi malý, nedojde k přerušení vln elektromagnetického záření a pozorovaný objekt zůstane neviditelný, nebude mikroskopem rozlišen. Rozlišovací schopnost světelného mikroskopu pak závisí především na rozlišovací schopnosti objektivu, protože světelný mikroskop zobrazuje dvoustupňově. Nejdříve je objektivem vytvářen obraz pozorovaného předmětu v horní ohniskové rovině okuláru, z něhož v druhém kroku vytváří okulárem výsledný obraz. Okulár však zvětšuje a přispívá k rozlišení pouze těch podrobností, které jsou obsaženy v obraze vytvořeném objektivem.

Rozlišovací schopnost objektivu je vyjádřena jeho numerickou aperturou (A). Numerická apertura je přímo závislá na indexu lomu prostředí a otvorovém úhlu objektivu. Index lomu (n) je optická hustota prostředí a jeho hodnota je vždy vyšší než 1,00. Index lomu se stanoví jako: $n = c/v$, kde n je rychlost světla ve vakuu (ta je stejná pro všechny λ) a v je rychlost světla o určité λ ve zkoumaném prostředí. Rozlišovací schopnost mikroskopu můžeme zvýšit použitím objektivu s větším zvětšením. V závislosti na indexu lomu prostředí však dochází při přechodu z jednoho prostředí do druhého k lomu paprsků. U suchých objektivů je mezi objektivem a preparátem vzduch s nižším indexem lomu než sklo, proto dochází na rozhraní sklo vzduch k lomu paprsků. Následkem čeho vstupuje do objektivu jen menší část světelných paprsků vytvořených kondenzorem. Numerická apertura suchých objektivů nemůže tedy přesáhnout 1. Proto se někdy využívá imerzních objektivů, u nichž je mezi objektivem a preparátem vrstva imerzního oleje, který má přibližně stejný index lomu jako sklo. Nedochází zde proto k lomu paprsků, následkem čeho vstupuje do objektivu větší část světla. Imerzní objektiv obvykle zvětšuje 100x a používáme jej tehdy, potřebujeme-li dosáhnout maximálního rozlišení s maximálním zvětšením. Údaje o použitém zvětšení je nutno udávat u každé fotografie či nákresu. Celkové zvětšení mikroskopu se stanoví jako násobek zvětšení objektivem a okulárem. Přičemž okulárové zvětšení je obvykle 10x, zvětšení objektivem závisí na zvoleném objektivu.

Dalším způsobem jak ovlivnit kvalitu pozorovaného obrazu je vhodné zaclonění. Clonění ovlivňuje tři vlastnosti mikroskopického obrazu určující jeho kvalitu: kontrast, hloubku ostrosti a rozlišení podrobností. Nejlepšího rozlišení se dosahuje, je-li $A_{\text{objektivu}}$ rovna $A_{\text{kondenzoru}}$. Hloubkou ostrosti se rozumí rozdíl mezi vzdálenostmi nejbližšího a nejvzdálenějšího místa zobrazeného předmětu od objektivu, která jsou zobrazena s ještě

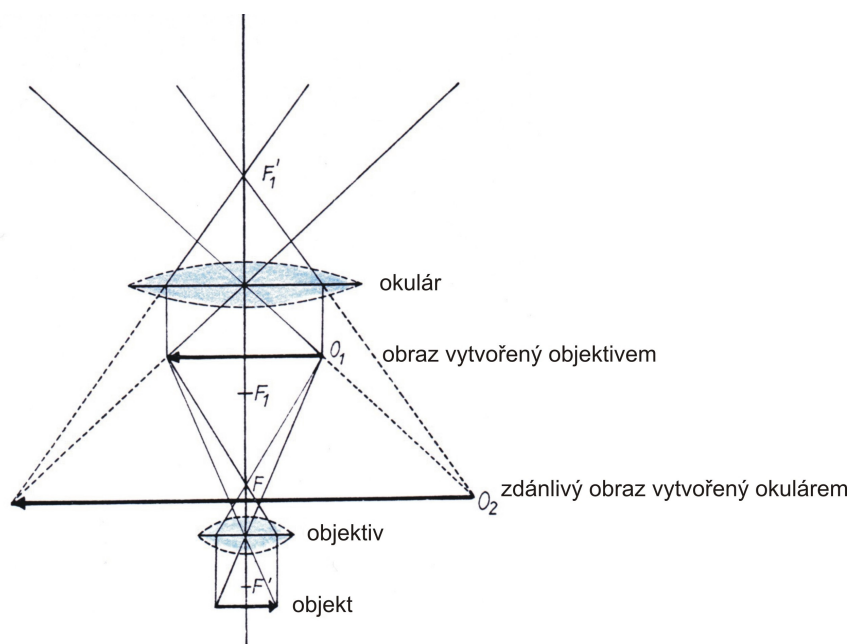
přijatelnou ostrostí. Objekty, které leží pod a nad touto vrstvou, jsou zobrazeny neostře nebo vůbec. Hloubka ostrosti se snižuje se zvyšující se aperturou. Při zaclonění se hloubka ostrosti zvětšuje, protože při zaclonění dochází ke snížení $A_{\text{objektivu}}$.

Světelný mikroskop je z optického hlediska dvoustupňová soustava tvořená objektivem a okulárem doplněná osvětlovací soustavou. Stavba světelného mikroskopu je znázorněna na obrázku číslo 1. Světelný mikroskop je složen jednak z mechanických dílů: stativ, noha stativu, makro a mikrošroub, stolek mikroskopu, vodič preparátu, revolverový měnič objektivů, objímka pro kondenzor a objímka pro filtr, ale především z optických dílů: objektivy, okuláry, kondenzor s aperturní irisovou clonou, a dále z osvětlovacího zařízení: lampa s kolektorovou čočkou (kolektor soustřeďuje světlo do kondenzoru) a aperturní irisová clona (pod kondenzorem) a polní clona.



Obr. č. 1: Stavba světelného mikroskopu

Mikroskopem pozorujeme obraz, který vytvořila optická soustava mikroskopu a který byl lidským okem a mozkem zpracován ve vjem. Množství a druh informací o pozorovaném objektu tedy závisí na vlastnostech použité optické soustavy a na individuálních vlastnostech pozorovatele. Objektivem vzniká skutečný, zvětšený a převrácený obraz pozorovaného objektu v přední ohniskové rovině okuláru. Vzniklý obraz je pak pozorován přes objektiv jako lupou. Výsledný obraz, který ve světelném mikroskopu pozorujeme je tedy neskutečný, převrácený a zvětšený (viz obrázek č. 2).



F a F' - ohniska objektivu
 F_1 a F'_1 - ohniska okuláru

Obr. č. 1: Konstrukce vzniku obrazu ve složeném mikroskopu

Nejzákladnější pravidla mikroskopování:

1. Do optické osy mikroskopu nastavit nejmenší objektiv (4x nebo 10x).
2. Pomocí makrošroubu umístit stolek "na doraz" nahoru.
3. Osvětlit zorné pole.
4. Zapnout žárovku a regulátorem osvětlení upravit intenzitu na přibližně na 1/2 výkonu.
5. Zkontrolovat čistotu optiky.
6. Na stolek položit preparát. Vyhledat a zaostřit obraz objektu.
7. Upravit rozestup okulárů.
8. Ověřit, zda vidíme oběma očima (okuláry) stejně dobře, případně vyrovnat dioptrickou vadu oka dioptrickým kroužkem v levém okuláru.
9. Pohybovat preparátem a vyhledat nejvhodnější místo pro pozorování. Toto místo umístit do středu zorného pole - vycentrovat objekt.
10. Pro vlastní pozorování vyměnit podle potřeby objektiv za jiný, a to posunem nosiče objektivů, nepohybovat stolkem mikroskopu nahoru nebo dolů došlo by k rozostření.
11. U mikroskopování nestát, ale sedět.

Časté chyby při mikroskopování:

1. Nedodržování sledu jednotlivých pravidel mikroskopování.
2. Použití nejprve silně zvětšujícího objektivu.
3. Nesprávné osvětlení a clonění.
4. Nevycentrování pozorovaného objektu v zorném poli.
5. Preparát umístěný na stolek mikroskopu krycím sklem dolů.
6. Neproostřování pozorovaného objektu pomocí mikrošroubu.

Úkol č. 1: Pozorování tištěného písmene

Pomůcky: světelný mikroskop a mikroskopické potřeby (podložní a krycí sklíčka); pinzeta; voda; proužky filtračního papíru; noviny; nůžky

Postup:

1. Z novin vystříhněte libovolné písmeno.
2. Písmeno vložte do kapky vody na podložním skle a překryjte krycím sklíčkem.
3. Písmeno pozorujte nejdříve pouhým okem a obraz zakreslete.
4. Vložte preparát pod mikroskop a pozorujte písmeno při malém zvětšení. Obraz zakreslete.
5. Oba pozorované obrazy porovnejte a pozorované skutečnosti vysvětlete. Poznamenejte si také hodnoty zvětšení objektivu a okuláru. Sledujte, jakým směrem se pohybuje obraz při posunu preparátem po stole mikroskopu.

Otázky:

1. Jaká je vlnová délka části spektra viditelného světla? A jaké jsou vlnové délky ultrafialového a infračerveného záření? Schematicky porovnej.

Použitá literatura:

Hejtmánek, M. (2001): Úvod do světelné mikroskopie, Olomouc.

Vymětalová, V. (2001): Laboratorní cvičení z biologie, Praha.

Klusoňová, H. *et* Lenčo, J. (2006): Praktická cvičení a otázky ze základů cytologie a genetiky, Praha.

<http://www.slideshare.net/medik.cz/biologie-pro-bakale-praktikum-2>