



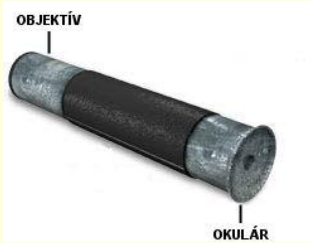
Cvičenie č. 3

MIKROSKOPICKÁ TECHNIKA

PRÁCA S MIKROSKOPOM

HISTÓRIA VÝVOJA MIKROSKOPICKEJ TECHNIKY

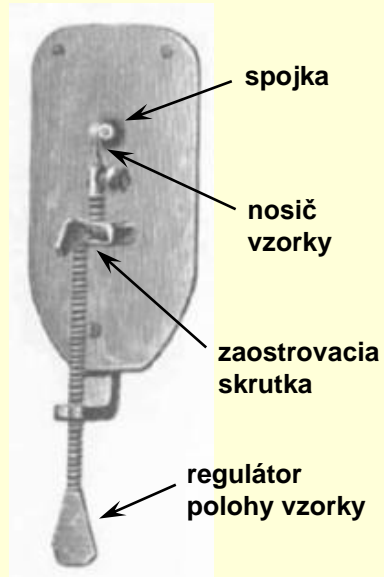
PRVÉ MIKROSKOPY



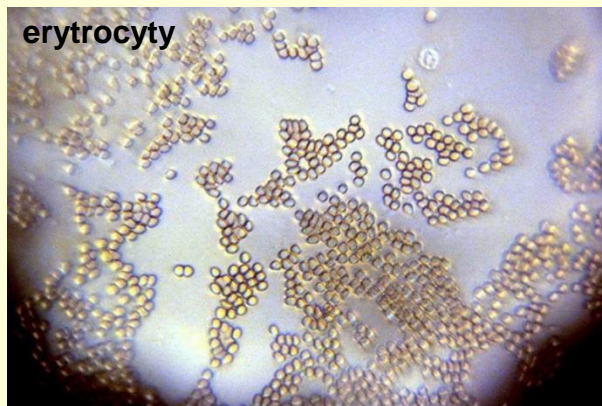
16. – 17. storočie
H. a Z. Janssen



17. storočie



17. storočie
A. van Leeuwenhoek



MIKROSKOPY 18. STOROČIA



MIKROSKOPY 19. STOROČIA



MIKROSKOPY 20. STOROČIA



ZLOŽENIE SVETELNÉHO MIKROSKOPU

Leica DM500

OPTICKÉ ČASTI

okulár
(10x)



objektív
(4x, 10x, 40x, 100x)



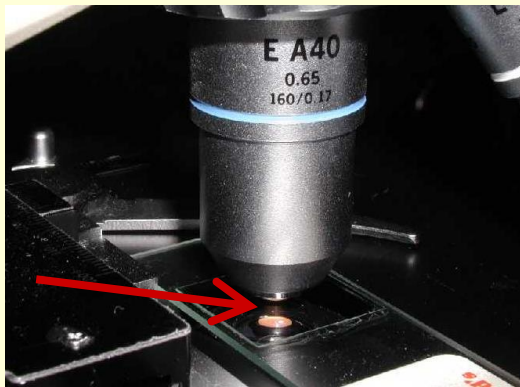
OPTICKÉ ČÁSTI MIKROSKOPU

OBJEKTÍV ➔ optická sústava, ktorá z pozorovaného predmetu vytvára zväčšený a skutočný obraz

→ pozostáva z niekoľkých **šošoviek** (najkvalitnejšie aj > 10)

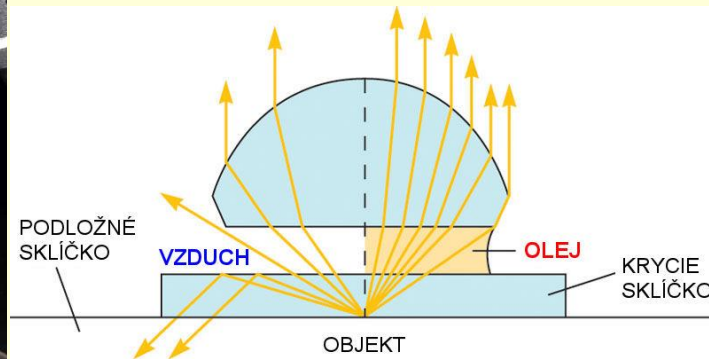
- veľmi malé, rôzne tvary, rôzne druhy skla
- presný tvar, vyleštený povrch s antireflexnou vrstvou
- **vycentrované**

→ v závislosti od prostredia, v ktorom pracujú:



„SUCHÝ“ objektív

→ vzduch



„IMERZNÝ“ objektív
(ponorný, olejový)

→ tekuté médium
(voda, **imerzný olej**)

OPTICKÉ ČASTI MIKROSKOPU

OBJEKTÍV

Vlastnosti objektívu:

1. **OHNISKOVÁ VZDIALENOSŤ = Ekvivalentná ohnisková vzdialenosť** [mm]
 - viacšošovkové objektívy – ohnisková vzdialenosť jednej šošovky, ktorá by mala rovnakú optickú mohutnosť ako celý systém šošoviek v objektíve (optická mohutnosť = vyjadruje zakrivenosť šošovky – ako láme šošovka lúče)
 - **čím nižšia ohnisková vzdialenosť, tým silnejší objektív** (väčšie zväčšenie)

2. **ZVÄČŠENIE OBJEKTÍVU**

- **vlastné** – pomer konvenčnej zrakovej vzdialenosti ($d = 250$ mm) a ekvivalentnej ohniskovej vzdialenosti objektívu
 - **vlastné zväčšenie pozorovaného predmetu**
- **užitočné** – tisícnásobok hodnoty numerickej apertúry objektívu
 - **limituje celkové zväčšenie** (zvýšené prostredníctvom okulára)



OPTICKÉ ČASTI MIKROSKOPU

OBJEKTÍV

Vlastnosti objektívu:

3. **PRACOVNÁ VZDIALENOSŤ** [mm]

→ kolmá vzdialenosť pozorovaného predmetu od frontálnej šošovky objektívu **zaostreného na pozorovaný predmet**

→ voľná – kolmá vzdialenosť frontálnej šošovky od povrchu krycieho sklíčka

4. **OTVOROVÝ UHOL = Angulárna apertúra**

→ uhol (α), ktorý zvierajú dva najkrajnejšie svetelné lúče, ktoré sa ešte dostanú **do vstupnej pupily objektívu**

- vstupná pupila („zrenica“, otvor) – priemer frontálnej šošovky, ktorý nie je obmedzený objímkami

→ **nepriamo úmerný ohniskovej vzdialenosti**



OPTICKÉ ČASTI MIKROSKOPU

OBJEKTÍV

Vlastnosti objektívu:

5. SVETELNOSŤ OBJEKTÍVU

- schopnosť objektívu zachytiť čo najviac svetelných lúčov prichádzajúcich od pozorovaného predmetu
- závisí od vstupnej pupily, no aj od indexu lomu prostredia, ktorým lúče prechádzajú

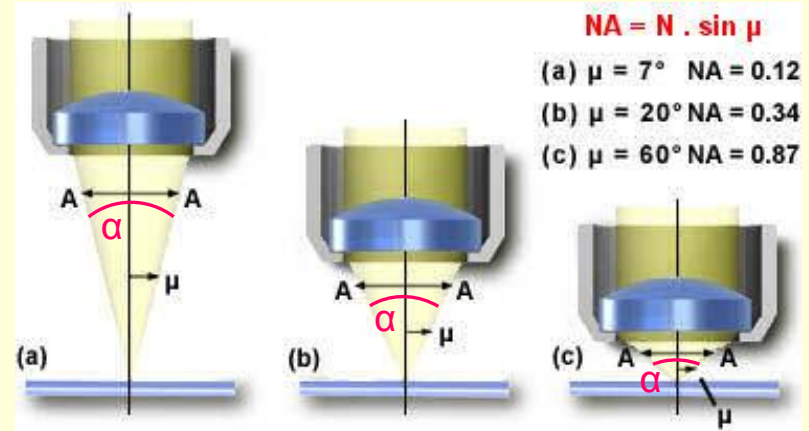


6. NUMERICKÁ APERTÚRA (NA) [bezrozmerná veličina]

- vyjadruje účinnú svetelnosť objektívu = číselné meradlo schopnosti objektívu zachytávať informácie obsiahnuté v pozorovanom objekte
- vzťah medzi otvorovým uhlom (α) a indexom lomu prostredia (N)

$$NA = N \cdot \sin \alpha/2 \Rightarrow NA = N \cdot \sin \mu$$
$$\mu = \alpha/2$$

- čím je vyššia NA, tým je vyššia rozlišovacia schopnosť objektívu



OPTICKÉ ČASTI MIKROSKOPU

OBJEKTÍV

Vlastnosti objektívu:

7. ROZLIŠOVACIA SCHOPNOSŤ

→ schopnosť rozlíšiť dva body nachádzajúce sa vedľa seba ešte ako dva samostatné body

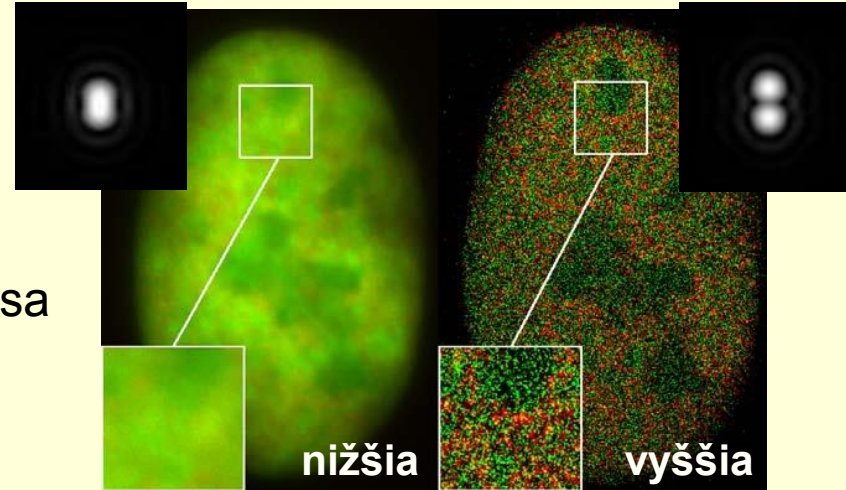
8. HĽBKOVÁ OSTROŠŤ =

= Penetračná schopnosť objektívu

→ schopnosť objektívu súčasne zobrazit' ostro väčší alebo menší počet rovinných vrstiev pozorovaného preparátu ➔ „hrúbka“ ostro zobrazenej vrstvy preparátu

- objekty nachádzajúce sa nad a pod touto vrstvou sa zobrazujú rozmazane alebo sa vôbec nezobrazujú

→ silné objektívy = malá hĺbka ostrosti
(zobrazujú ostro jednu optickú rovinu)
slabšie objektívy = vyššia hĺbka ostrosti

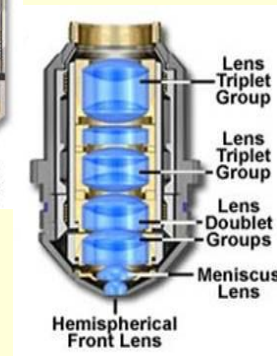
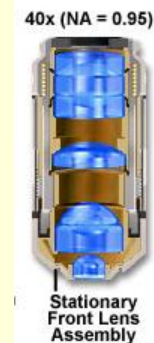
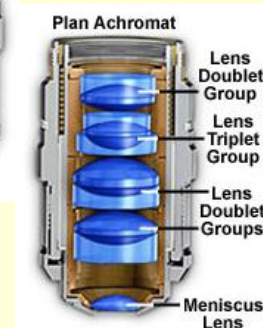
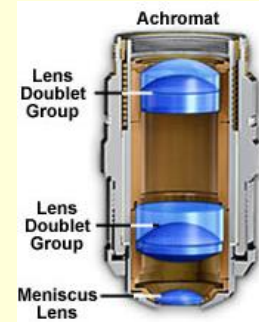


OPTICKÉ ČASTI MIKROSKOPU

OBJEKTÍV

Typy objektívov:

1. **Achromatické** ➡ odstránená (upravená) chromatická chyba pre červenú a modrú farbu v strede zorného poľa
- najjednoduchšie objektívy
2. **Planachromatické** ➡ odstránená (upravená) chromatická chyba pre červenú a modrú farbu aj sklenutie obrazu v celom zornom poli
3. **Apochromatické** ➡ odstránená (upravená) chromatická chyba pre celé viditeľné spektrum
- špeciálne sklá s nízkou disperziou svetla
4. **Planapochromatické** ➡ odstránená (upravená) chromatická chyba pre celé viditeľné spektrum aj sklenutie obrazového poľa
- najlepšie objektívy (takmer všetky moderné typy objektívov)
5. **Epifluorescenčné** ➡ určené na sledovanie fluorescencie v UV časti spektra – prepúšťajú UV svetlo
6. **Polarizačné**
7. **Pre fázový kontrast**



OPTICKÉ ČASTI MIKROSKOPU

OKULÁR ➔ optická sústava, ktorá zväčšuje obraz vytvorený objektívom

→ pozostáva z viacerých **vycentrovaných šošoviek** (min. 2 a viac)

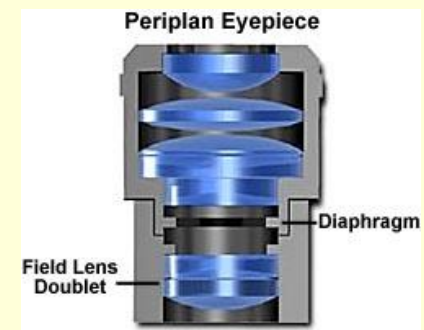
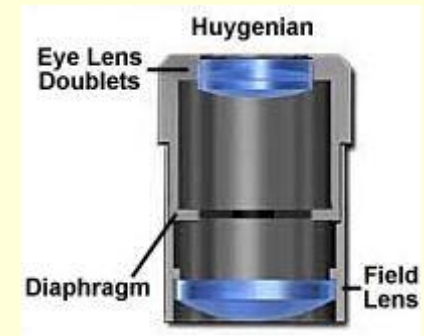
- očná šošovka (horná) → bližšie k oku
- kolektorová šošovka (zberná) → bližšie k predmetu

→ **zväčšenie okulárom** (**10x**, 6x, 12x, 15x, 20x, ...) → **PRÁZDNE** = nezobrazí viac detailov, ako bolo zobrazených objektívom

→ schopnosť **kompenzovať zostatkové optické chyby** (chromatická chyba, sklenutie, astigmatizmus)

Typy okulárov:

- **Huygensove** – nekorigujú žiadnu chybu, len zväčšujú obraz
- **Kompenzačné** – korigujú chromatickú chybu veľkosti
- **Periplanatické** – určené na prácu s planachromatickými objektívmi
- **Ortoskopické** – určené na prácu s planachromátmi a achromátmi
- **Meracie** – určené na meranie veľkosti objektov
- **Ukazovacie s vmontovanou ihlou** – určené na demonštračné účely



OPTICKÉ ČASTI MIKROSKOPU

VÝPOČET CELKOVÉHO ZVÄČŠENIA MIKROSKOPU

$$M = M_o \times M_e \text{ (x } M_i \text{)}$$

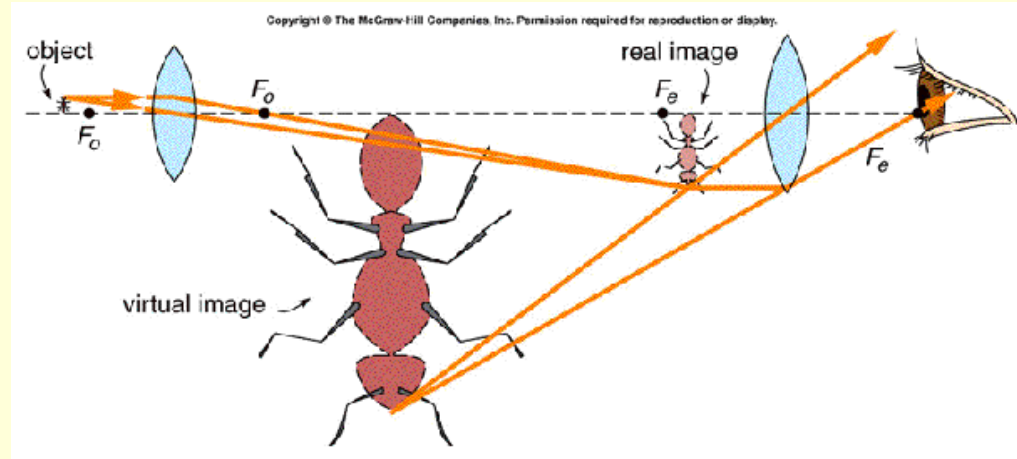
M → celkové zväčšenie

M_o → zväčšenie objektívu

M_e → zväčšenie okulára

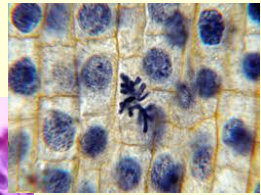
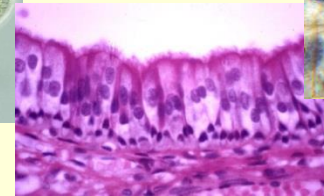
M_i → medzizväčšenie

M_i = 1 (pre prechádzajúce biele svetlo)



Celkové zväčšenie mikroskopu potrebné na pozorovanie:

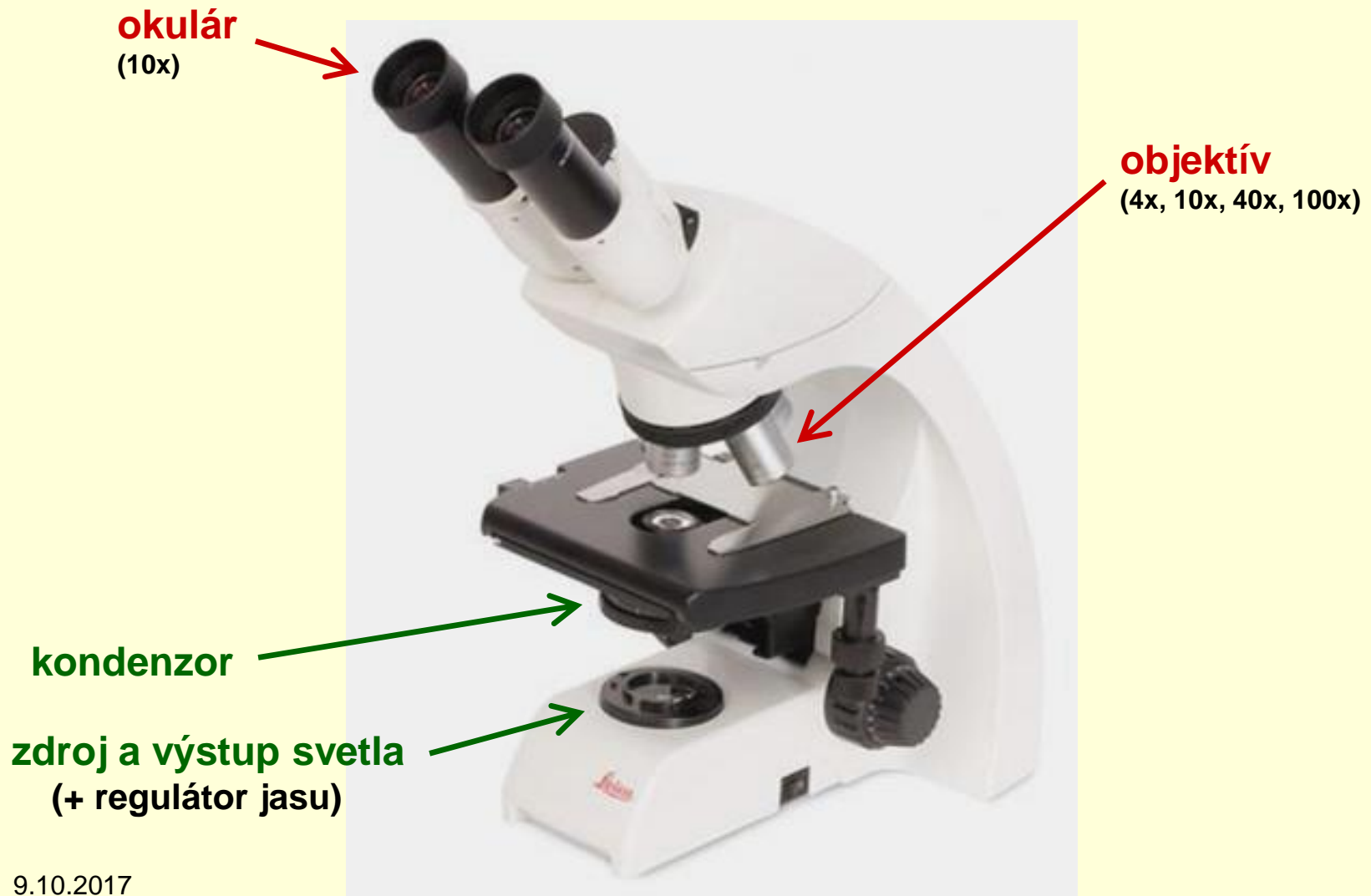
- **25x až 400x** → eukaryotické mikroorganizmy:
malé vodné živočíchy,
rastlinné pletivá a bunky,
živočíšne tkanivá a bunky; . . .
- **okolo 1000x** → prokaryotické mikroorganizmy (baktérie, sinice);
detaily eukaryotických buniek;
chromozómy;
krvné rozbory; . . .



ZLOŽENIE SVETELNÉHO MIKROSKOPU

Leica DM500

OSVETĽOVACIA SÚSTAVA



OSVETĽOVACIA SÚSTAVA MIKROSKOPU

Priamo sa nezúčastňuje na tvorbe obrazu, na jeho kvalitu má však veľmi výrazný vplyv !!!

ZDROJ SVETLA ➡ zabezpečuje **osvetlenie preparátu**, pozorovaného objektu

→ mikroskopické preparáty – transparentné, čiastočne transparentné ➡ pozorovanie v prechádzajúcom svetle

→ denné svetlo + duté zrkadlo, **žiarovka** (šiklová lampa, vstavaná do nohy statívu)

KONDENZOR ➡ **koncentruje svetelné lúče na pozorovaný objekt** ➡

➡ zabezpečuje rovnomerné osvetlenie celého zorného poľa

→ medzi zdrojom svetla a stolčekom (preparátom)

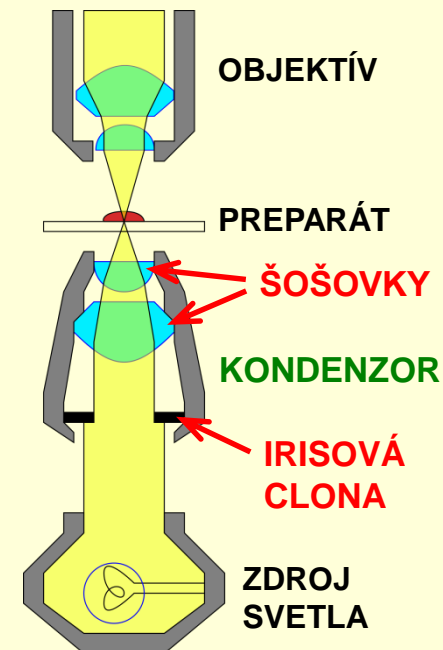
→ možnosť pohybu kolmo nahor ↔ nadol

→ zloženie:

➡ **šošovky** → zabezpečujú rovnomerný svetelný tok v celom zornom poli

➡ **irisová clona** → zabezpečuje reguláciu intenzity svetla dopadajúceho na preparát

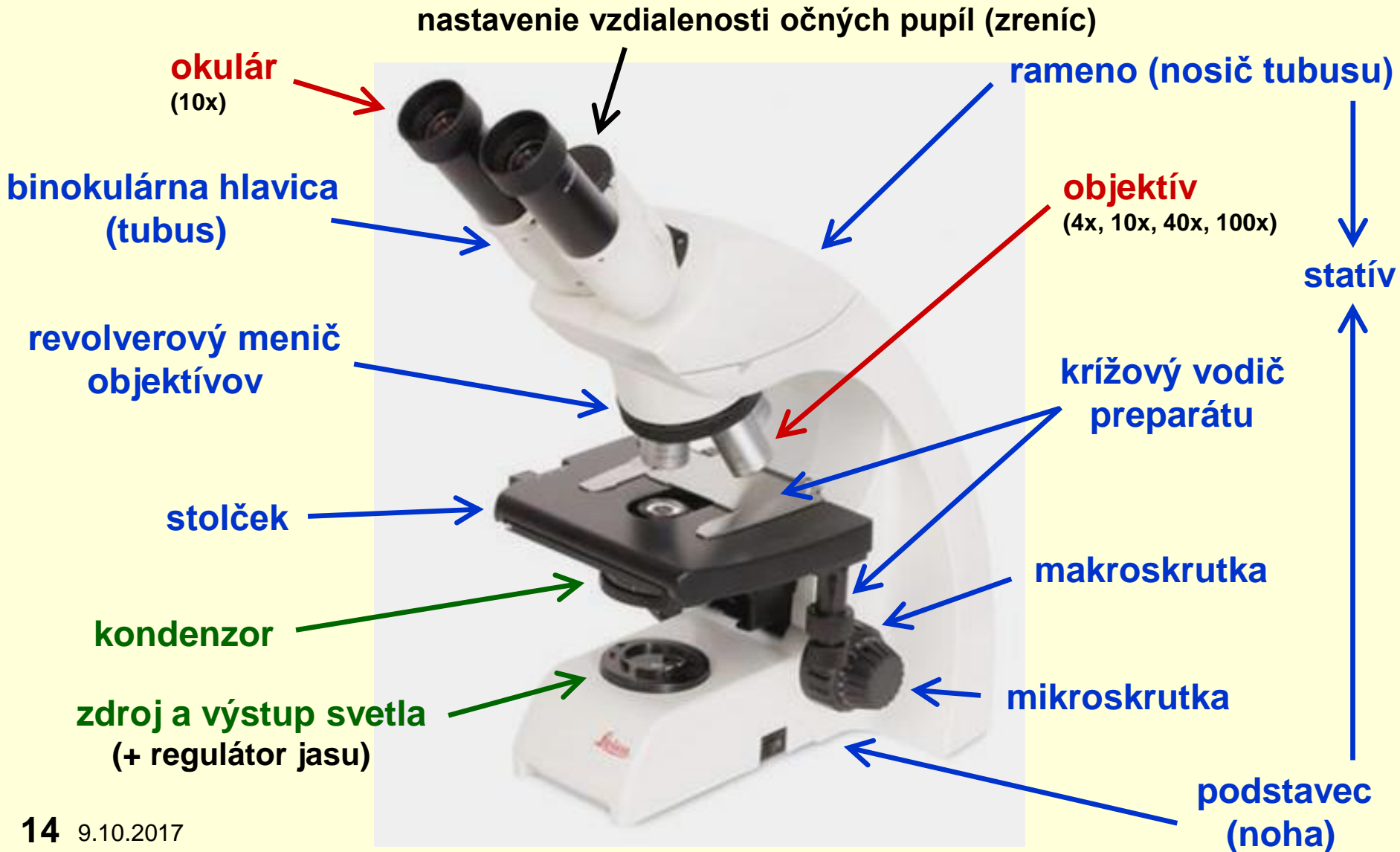
→ najčastejší - **Abbeho kondenzor**



ZLOŽENIE SVETELNÉHO MIKROSKOPU

Leica DM500

MECHANICKÉ ČASTI



MECHANICKÉ ČASTI MIKROSKOPU

TUBUS ➔ zabezpečuje vzdialenosť medzi objektívom a okulárom potrebnú pre vznik obrazu pozorovaného predmetu ➔ **okulár musí spracovať primárny obraz vytvorený objektívom**

→ vrchná časť – **okulár(e)**:



binokulárny tubus

→ 2 okuláre



trinokulárny tubus

→ 2 okuláre + výstup
pre fotoaparát / kameru



monokulárny tubus

→ 1 okulár

optický hranol / zrkadlo ➔ rozdelenie svetelných lúčov z 1 objektívu do 2 okulárov

nastavenie vzdialenosti očných pupíl ➔ spojenie obrazov oboch očí do jedného

MECHANICKÉ ČASTI MIKROSKOPU

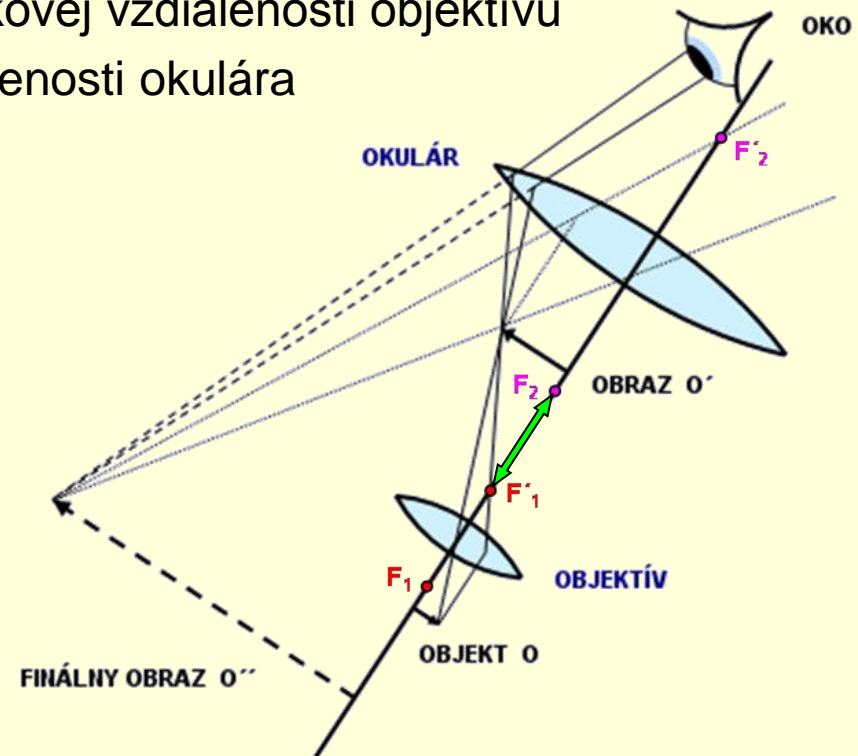
TUBUS

→ spodná časť – **revolverový menič objektívov**
- otáčavý kotúč na ľahkú výmenu objektívov

→ vlastnosti tubusu:

1. optická dĺžka tubusu

- ➡ vzdialenosť od roviny obrazovej ohniskovej vzdialenosti objektívu k rovine predmetovej ohniskovej vzdialenosti okulára
- ➡ obtiažne merateľná

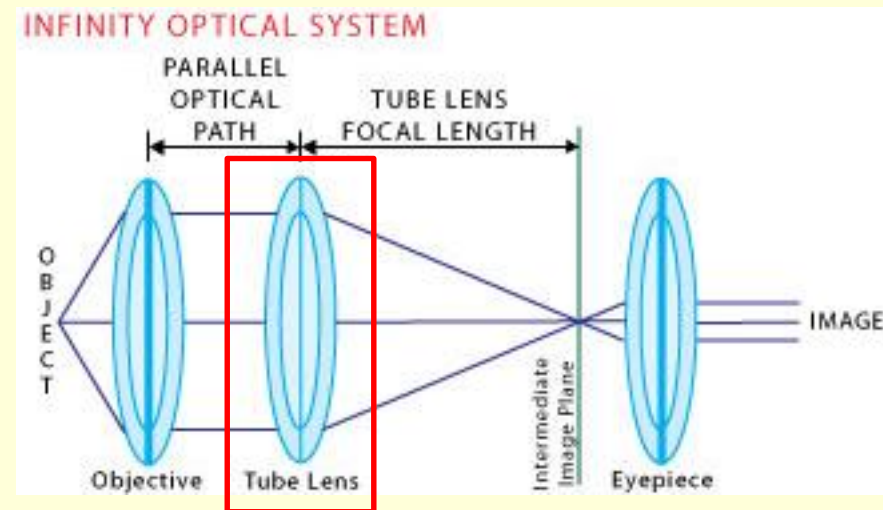
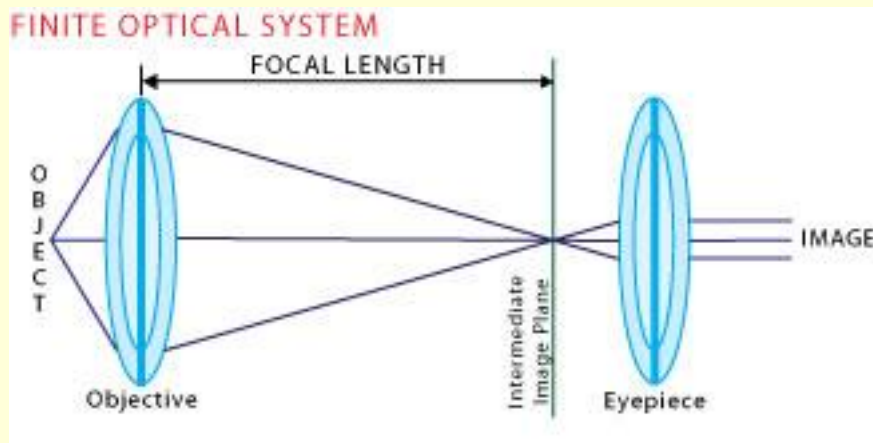


MECHANICKÉ ČASTI MIKROSKOPU

TUBUS

2. mechanická dĺžka tubusu

- ➔ vzdialenosť medzi horným a spodným okrajom tubusu
(od uchytenia okulára po uchytenie objektívu v revolverovej hlavici)
- ➔ objektívy – **vytvorenie skutočného obrazu vnútri tubusu !!!** ➔ musia byť prispôbolené dĺžke tubusu:
 - **korigované na konkrétnu dĺžku** (obraz v konečnej vzdialenosti 160 mm, 170 mm, 210 mm, ...)
 - **korigované na nekonečnú vzdialenosť** (∞ - dlhá pracovná vzdialenosť)



MECHANICKÉ ČASTI MIKROSKOPU

STATÍV ➡ z dvoch častí:

1. **Podstavec (noha)** → udržiavanie stability mikroskopu
→ tvar „U“, „V“, hranol so zabudovaným zdrojom svetla
→ **umiestniť mikroskop na pevnú, rovnú podložku**
2. **Nosič tubusu (rameno)** → zaostrovanie obrazu:
→ **makrometrická skrutka (makroskrutka)** ➡
➡ nájdanie roviny pozorovaného objektu
a hrubé zaostrenie
→ **mikrometrická skrutka (mikroskrutka)** ➡
➡ jemné doladenie ostrosti obrazu



PRACOVNÝ STOLČEK ➡ priestor na umiestnenie a prichytenie preparátu

- rôzny tvar (štvorhranný, kruhový), rôzny materiál (kov, plast)
- môže byť otáčavý, prípadne vyhrievaný
- prichytenie preparátu → pružinky (staršie mikroskopy)
 - **krížový vodič preparátu** – posúvanie preparátu (↑, ↓, ←, →)
 - môže byť vybavený **stupnicou**

TYPY MIKROSKOPOV

1. MONOKULÁRNY MIKROSKOP

➔ má monokulárny tubus → pre **jeden okulár**

2. BINOKULÁRNY MIKROSKOP

➔ má binokulárny tubus → pre **dva okuláre**

3. INVERTOVANÝ (OBRÁTENÝ) MIKROSKOP

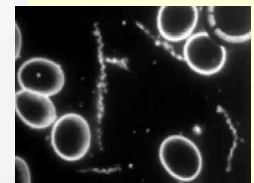
➔ umožňuje **pozorovanie predmetov „zospodu“**
→ **objektív sa nachádza pod pozorovaným objektom**
➔ práca s tkanivovými a bunkovými kultúrami

4. METALOGRAFICKÝ MIKROSKOP

➔ umožňuje zistenie **(mikro)štruktúry kovov a zliatin**
→ pozorovanie vzorky **v odrazenom svetle**

5. ULTRAMIKROSKOP

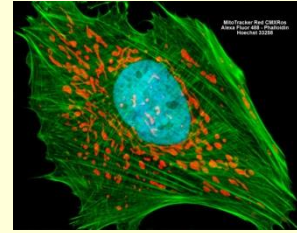
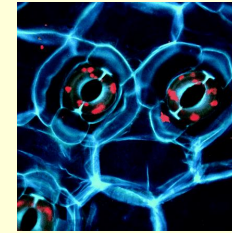
➔ umožňuje **pozorovanie preparátov v tmavom poli**
→ svetelné lúče dopadajú **kolmo na optickú os** mikroskopu
➔ možné zistiť prítomnosť objektu, ich počet a pohyb



TYPY MIKROSKOPOV

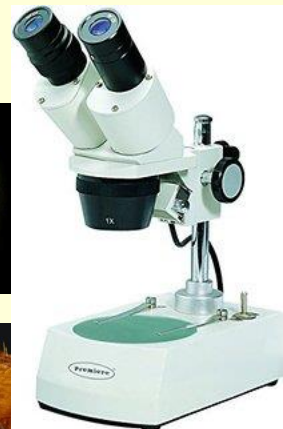
6. FLUORESCENČNÝ MIKROSKOP

- ➔ umožňuje sledovať **fluorescenciu** rôznych látok
 - látka **absorbuje svetlo** určitej vlnovej dĺžky ⇒ **excituje sa** ⇒
 - ⇒ **emituje svetlo** s vyššou vlnovou dĺžkou počas návratu do základného stavu
 - **prejavuje sa svetielkovaním látok po ich osvetlení**
- ➔ zdroje svetla → od UV po červenú oblasť spektra (ortuťové výbojky, LED diódy, lasere, oblúkové lampy)
- ➔ možné skúmať autofluorescenciu látok alebo objekty označené fluoreskujúcimi látkami



7. STEREOSKOPICKÝ (PREPARAČNÝ) MIKROSKOP

- ➔ umožňuje **priestorové pozorovanie väčších objektov**
 - **celkové zväčšenie nízke** (od 4x do 100x)
 - priestorový obraz – vďaka **dvom okulárom** a **dvom párovaným objektívom**
- ➔ lepšia manipulácia s predmetom → možné vďaka veľkej vzdialenosti medzi objektívom a pozorovaným predmetom
- ➔ pozorovanie väčších objektov, preparačné účely



TYPY MIKROSKOPOV

8. POROVNÁVACÍ (KOMPARAČNÝ) MIKROSKOP

- ➔ umožňuje pozorovanie **súčasne dvoch preparátov v jednom zornom poli**
- ➔ výsledný obraz → vzniká spojením obrazov z dvoch mikroskopov (ľavá polovica zorného poľa obraz z jedného, pravá polovica obraz z druhého mikroskopu)



9. DISKUSNÝ MIKROSKOP

- ➔ umožňuje **pozorovanie preparátu viacerými užívateľmi naraz**
→ tubus – **dve alebo viac binokulárnych hlavíc**



10. DEMONŠTRAČNÝ (PROJEKČNÝ) MIKROSKOP

- ➔ umožňuje **premietnutie obrazu pozorovaného predmetu**
- ➔ demonštrácia obrazu, počítanie a meranie štruktúr



11. LASEROVÝ MIKROSKOP

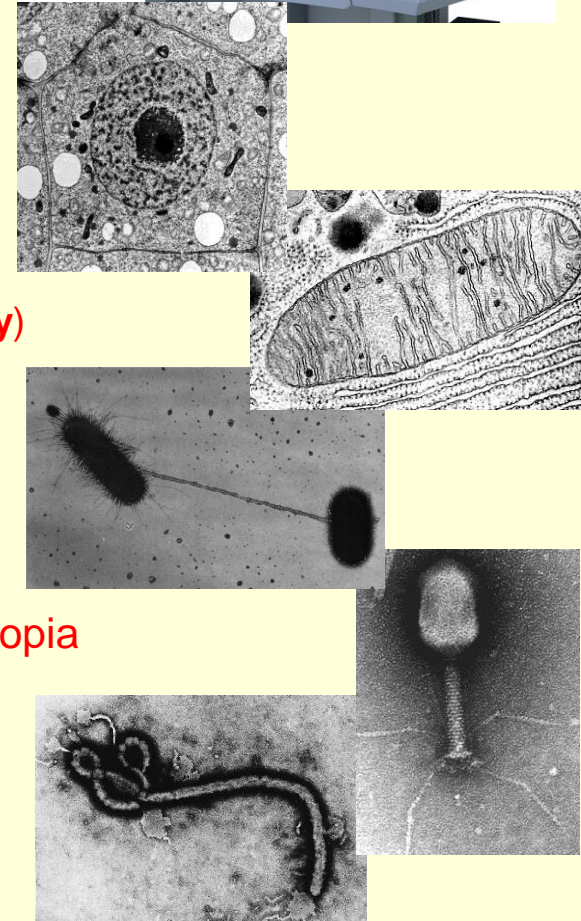
- ➔ umožňuje **sústrediť žiarenie na veľmi malú plochu** (rubínový laser)
- ➔ mikročirurgia bunky, očná chirurgia



TYPY MIKROSKOPOV

12. ELEKTRÓNOVÝ MIKROSKOP

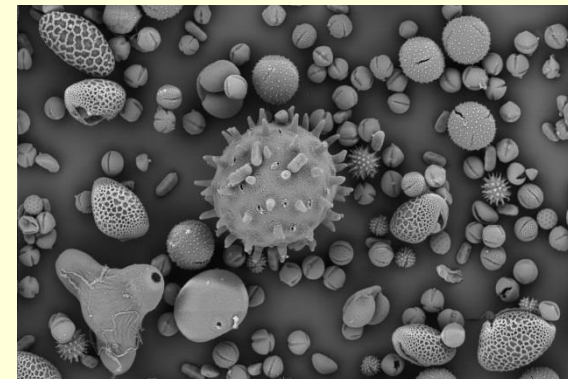
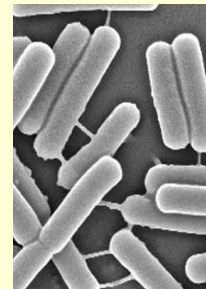
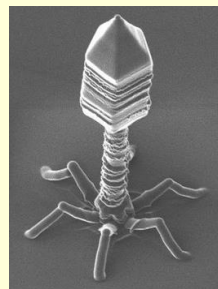
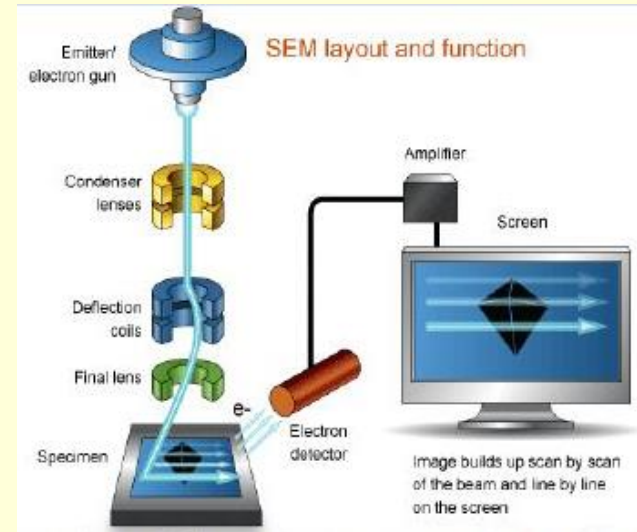
- ➔ umožňuje **dosiahnuť až 250 000-násobné zväčšenie** pozorovaného objektu
- ➔ nevyužíva svetlo, ale **prúd elektrónov (e^-) vo vákuu**
 - **e^- – nižšia λ ako viditeľné svetlo ➔ vyššia energia**
 - prúd e^- prechádzajúci elektromagnetickou alebo elektrostatickou šošovkou podlieha tým istým zákonom ako svetelný lúč prechádzajúci optickou šošovkou
- ➔ základné vybavenie:
 - **optická sústava (elektromagnetické / elektrostatické šošovky)**
 - **vákuová čerpacia sústava**
 - **zdroj stabilného prúdu** (elektromagnetické šošovky)
 - **zdroj vysokého napätia** (elektrostatické šošovky)
- ➔ obraz vzniká v dôsledku:
 - ♦ **prechodu e^- skúmaným predmetom = transmisná mikroskopia**
 - ♦ **odrazu e^- od povrchu predmetu = odrazová mikroskopia**
 - ♦ **emitovania e^- z povrchu predmetu = emisná mikroskopia**
- ➔ využitie v biológii, fyzike, chémii, metalurgii, ...



TYPY MIKROSKOPOV

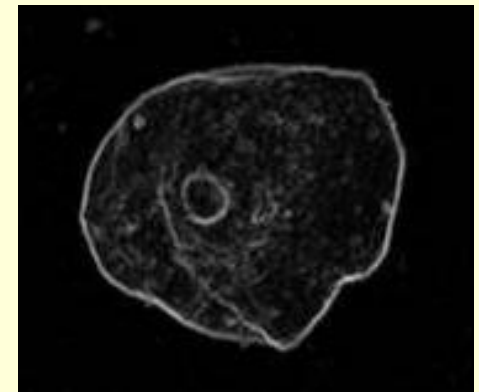
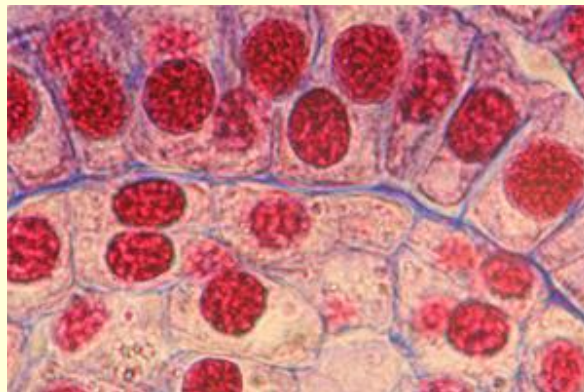
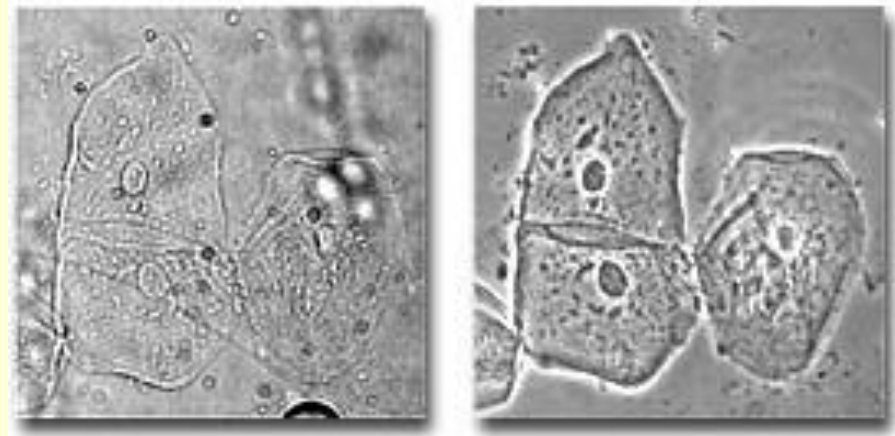
13. RASTROVACÍ ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP (SEM – Scanning Electron Microscope)

- ➡ umožňuje **vytvorenie obrazu** pozorovaného objektu **v trojrozmernom efekte**
 - **extrémne veľká hĺbka ostrosti**
 - **lepšia rozlišovacia schopnosť**
 - neporušenie sledovanej vzorky
- ➡ využíva **rastrovací** („skenovací“) **lúč elektrónov**
 - „skenuje“ pozorovaný predmet – vychyľovací systém mikroskopu pohybuje lúčom e^- v riadkoch bod za bodom
 - vzorka následne emituje tzv. sekundárne e^- , ktoré zachytáva detekčný systém a prevádza ich do elektrického signálu (výstup na obrazovke oscilografu)
- ➡ zväčšuje povrchové detaily v postupných obrazoch, pričom celkový obraz vyniká:
 - **ostrou kresbou**
 - **plastickosťou**



APLIKÁCIE SVETELNEJ MIKROSKOPIE

- živé neofarbené bunky → nízky prirodzený kontrast ich vnútorných štruktúr ➔ ➔ **obtiažne mikroskopické pozorovanie**
- **výsledný kontrast** → rozdiel medzi jasom pozadia a jasom sledovaného objektu
- pre výsledný kontrast, a teda kvalitné pozorovanie je dôležité:
 - vhodné zväčšenie
 - dostatočná rozlišovacia schopnosť mikroskopu
 - prípadné umelé zvýšenie prirodzeného kontrastu príslušných štruktúr
 - **využitím cytologických / histologických farbív alebo fyzikálnych javov**



APLIKÁCIE SVETELNEJ MIKROSKOPIE

SVETELNÁ MIKROSKOPIA ➔ pozorovanie objektov **vo viditeľnom svetle**

➔ najbežnejšie zobrazenie transparentných predmetov **v prechádzajúcom svetle**

Aplikácie svetelnej mikroskopie:

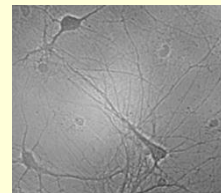
▪ STEREOSKOPICKÁ MIKROSKOPIA

- využíva stereoskopické (preparačné) mikroskopy (mikroskopy s malým zväčšením – od 4x do 100x)
- **priestorové zobrazovanie** väčších objektov



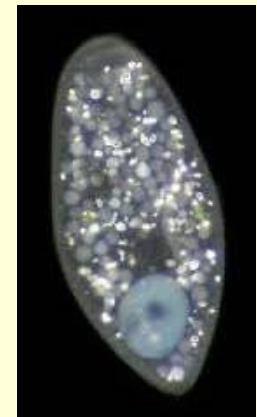
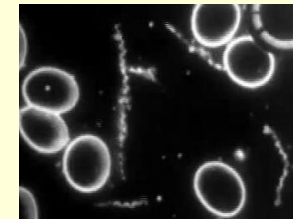
▪ MIKROSKOPIA V SVETLOM POLI („bright field“)

- zobrazovanie objektov **pomocou svetelných lúčov rovnobežných s optickou osou**



▪ MIKROSKOPIA V TMAVOM POLI („dark field“)

- využíva ultramikroskopy
- zobrazovanie objektov **pomocou bočného osvetlenia**
- do objektívu a do oka prechádza len svetlo, ktoré sa odrazilo od pozorovaného objektu (periférne lúče prichádzajúce zo strán nie) ➔ **pozorovaný objekt „svieti“ v tmavom zornom poli**



APLIKÁCIE SVETELNEJ MIKROSKOPIE

Aplikácie svetelnej mikroskopie:

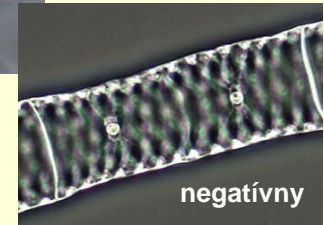
▪ MIKROSKOPIA V POLARIZOVANOM SVETLE

- využíva **polarizované svetlo** získané lomom bieleho svetla v dvojlomných (anizotropných) telesách - hranoloch (polarizované svetlo sa vlní iba v jednom smere – kolmom na smer šírenia)
- polarizačné mikroskopy – dva hranoly



▪ FÁZOVO-KONTRASTNÁ MIKROSKOPIA

- umožňuje pozorovať detailné, kontrastné štruktúry nefarbeného objektu **pomocou fázovo posunutých svetelných lúčov**
 - clona (apertúra) v objektíve mení fázu prechádzajúceho svetla
- vzniká „haló efekt“ (jasne žiariace rozhranie medzi objektom a prostredím)



▪ DIFERENCIÁLNY INTERFERENČNÝ KONTRAST (DIC)

- využíva **polarizáciu, interferenciu aj fázový posun svetla** (fázové posuny sú zobrazené v dôsledku interferencie dvoch vzniknutých laterálne posunutých obrazov)
- výsledné zobrazenia – bez „haló efektu“

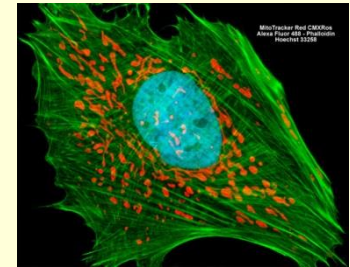
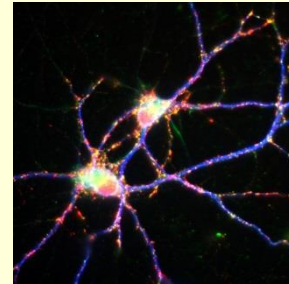
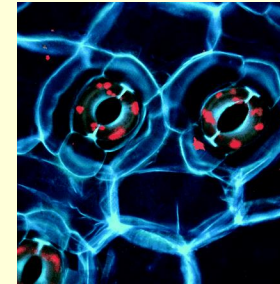


APLIKÁCIE SVETELNEJ MIKROSKOPIE

Aplikácie svetelnej mikroskopie:

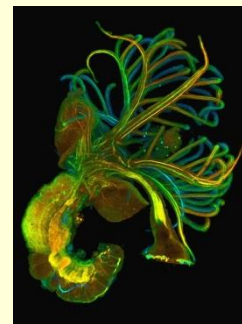
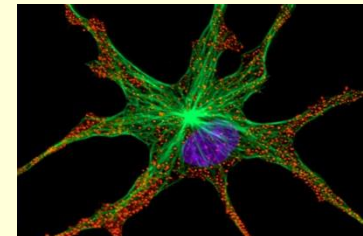
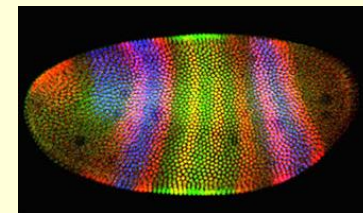
▪ FLUORESCENČNÁ MIKROSKOPIA

- založená na **fluorescencii látok** (fluorochrómy)
 - fluorochrómy absorbujú svetlo, excitujú sa a pri návrate do základného stavu emitujú svetlo s vyššou vlnovou dĺžkou
- fluorescenčné mikroskopy s objektívmi použiteľnými pre UV oblasť
- detekcia **autofluorescencie** alebo **sekundárnej fluorescence**



▪ KONFOKÁLNA MIKROSKOPIA

- založená na **fluorescencii látok** (fluorochrómy)
- konfokálny mikroskop – **schopnosť eliminovať svetlo** (fluorescenciu) **pochádzajúce z vrstiev preparátu, ktoré sa nenachádzajú v rovine poľa ostrosti objektívu**
 - **platnička s malým otvorom v strede** → zachytáva obraz z vrstiev nad a pod rovinou poľa ostrosti
- vznik ostrých a dobre analyzovateľných záberov



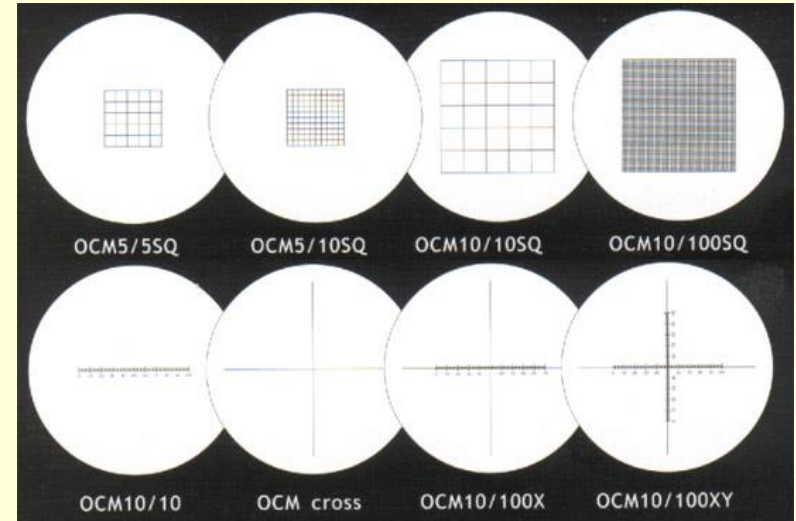
MIKROSKOPICKÉ MERACIE METÓDY

V mikroskope môžeme merať:

➔ Veľkosť objektu v horizontálnej rovine

(kolmá na optickú os)

- **okulárový mikrometer** – okrúhle sklíčko s vyznačenými dielikmi, ktoré sa vkladá do okulára
- **objektívový mikrometer** – brúsené podložné sklíčko, ktorým zistíme hodnotu dielika okulárového mikrometra v μm



➔ Hrúbka objektu (v smere optickej osi)

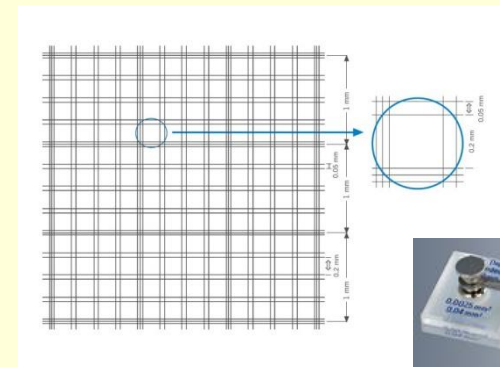
- **mikroskrutka s kalibrovanou hlavicou** – udáva, o koľko sa posunie objektív vo vertikálnom smere, ak pootočíme skrutkou o jeden dielik (najčastejšie $2\ \mu\text{m}$)

➔ Počet objektov v zornom poli

- **sieťový (mriežkový) okulárový mikrometer**

➔ Počet objektov v objeme suspenzie

- **počítacie komôrky** (Bürkerova komôrka)



PRÁCA S MIKROSKOPOM

Postup pri práci s mikroskopom:

1. Mikroskop odkryjeme a zapojíme ho do elektrickej siete.
2. Zapneme zdroj svetla a na stolček umiestnime a upevníme preparát.

Preparát má byť pripravený tak, aby sme neznečistili, resp. nepoškodili stolček a krížový vodič !!!

3. Na revolverovom meniči nastavíme objektív s najmenším zväčšením (4x).

Okuláre si nastavíme na vzdialenosť očných pupíl (binokulár → pozorujeme obidvoma očami).

Objekt **hľadáme pomocou makroskrutky**, následne **doostříme mikroskrutkou**.

→ objektív najbližšie k preparátu ➡ objekt hľadáme vzd'alovaním objektívu od preparátu (smerom od preparátu)

→ objektív najďalej od preparátu ➡ objekt hľadáme približovaním objektívu k preparátu (smerom k preparátu)

4. Otočením revolverového meniča vymeníme objektív za iný (10x, 40x) bez toho, aby sme pohli stolčekom – rozostřili obraz. Objekt už len **doostříme mikroskrutkou**.

→ objektívy od jedného výrobcu = **perfokálne** – zaostrené na približne rovnakú vzdialenosť

Pri väčších zväčšeniach pracujeme opatrne, aby sme nepoškodili preparát alebo frontálnu šošovku !!!

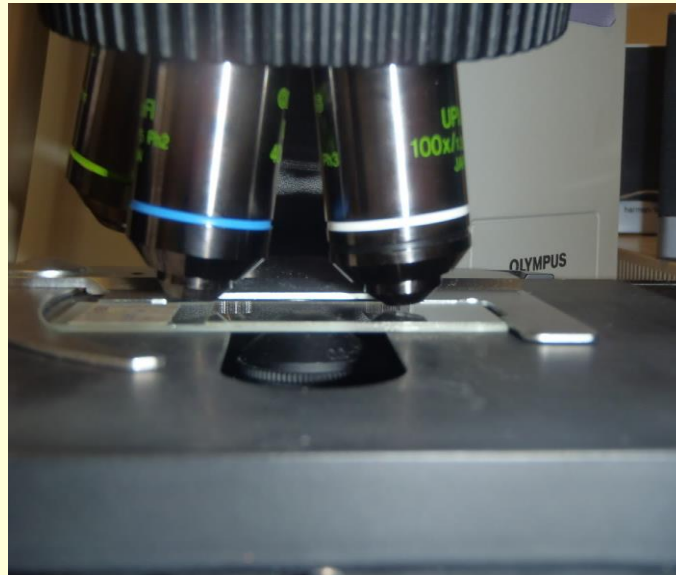
5. Prípadnú zmenu intenzity svetla regulujeme pomocou regulátora napätia (jasu) zdroja svetla, zmenou výšky kondenzora alebo kondenzorovou (irisovou) clonou.
6. Popri pozorovaní zakreslíme pozorovaný objekt a zaznačíme celkové zväčšenie.



PRÁCA S MIKROSKOPOM

Postup pri práci s imerzným objektívom (100x):

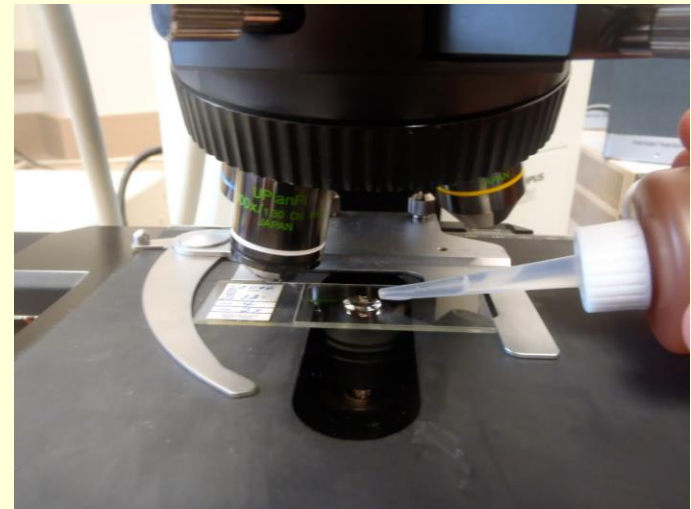
1. Objekt, ktorý chceme pozorovať detailnejšie, nájdeme a zaostríme pomocou objektívov s menším zväčšením (4x, 10x, 40x).
2. Revolverový menič vychýlime do polohy medzi klasický (40x) a imerzný objektív (100x) bez toho, aby sme pohli stolčekom – rozostřili obraz.



PRÁCA S MIKROSKOPOM

Postup pri práci s imerzným objektívom (100x):

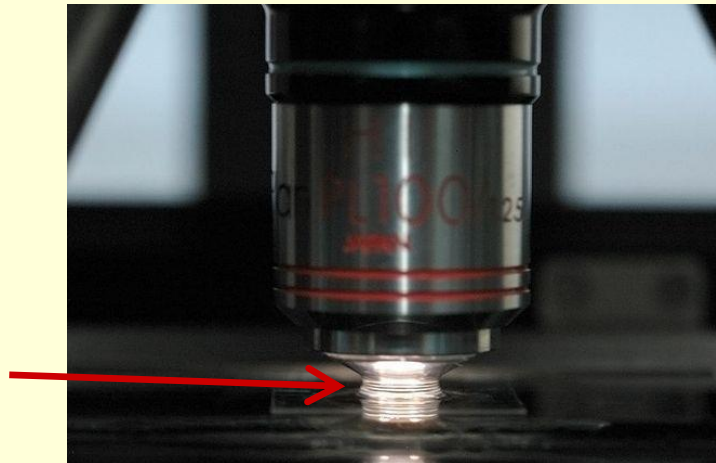
1. Objekt, ktorý chceme pozorovať detailnejšie, nájdeme a zaostríme pomocou objektívov s menším zväčšením (4x, 10x, 40x).
2. Revolverový menič vychýlime do polohy **medzi klasický (40x) a imerzný objektív (100x)** bez toho, aby sme pohli stolčekom – rozostřili obraz.
3. Na miesto preparátu, ktoré chceme pozorovať, kvapneme **1 kvapku imerzného oleja**.



PRÁCA S MIKROSKOPOM

Postup pri práci s imerzným objektívom (100x):

1. Objekt, ktorý chceme pozorovať detailnejšie, nájdeme a zaostríme pomocou objektívov s menším zväčšením (4x, 10x, 40x).
2. Revolverový menič vychýlime do polohy **medzi klasický (40x) a imerzný objektív (100x)** bez toho, aby sme pohli stolčekom – rozostřili obraz.
3. Na miesto preparátu, ktoré chceme pozorovať, kvapneme **1 kvapku imerzného oleja**.
4. Pootočením revolverového meniča **ponoríme imerzný objektív priamo do imerzného oleja**. Ak objekt vidíme, už len doostríme mikroskrutkou.



PRÁCA S MIKROSKOPOM

Postup pri práci s imerzným objektívom (100x):

1. Objekt, ktorý chceme pozorovať detailnejšie, nájdeme a zaostríme pomocou objektívov s menším zväčšením (4x, 10x, 40x).
2. Revolverový menič vychýlime do polohy **medzi klasický (40x) a imerzný objektív (100x)** bez toho, aby sme pohli stolčekom – rozostřili obraz.
3. Na miesto preparátu, ktoré chceme pozorovať, kvapneme **1 kvapku imerzného oleja**.
4. Pootočením revolverového meniča **ponoríme imerzný objektív priamo do imerzného oleja**. Ak objekt vidíme, už len doostríme mikroskrutkou.
5. Ak objekt nie je zreteľný: Opatrne posúvame imerzný objektív k preparátu (na objektív a stolček pozeráme z boku). Mikroskrutkou pohybujeme smerom od preparátu a pozorujeme cez okulár, kým nezaostříme na objekt.
6. Po ukončení pozorovania **ihneď** očistíme objektív (prípadne aj iné znečistené časti mikroskopu) **xylénom !!!**

PREVÁDZKA MIKROSKOPU

Pracovné podmienky pri práci s mikroskopom:

- ▶ vnútorný laboratórny priestor, teplota v rozmedzí od $+5^{\circ}\text{C}$ do $+35^{\circ}\text{C}$
- ▶ atmosféra bez agresívnych plynov alebo výparov (ortuťové)
- ▶ dôkladne čistenie a ochrana mikroskopu pred prachom, vlhkosťou, tepelným a slnečným žiarením, ...



PRACH JE NAJVÄČŠÍ NEPRIATEĽ MIKROSKOPU !!!

Čistenie mikroskopu

- najviac dbáme o čistotu **optiky** (okuláre, objektívy), **pracovného stolčeka** a **zdroja svetla**
- mikroskop chránime nielen pred prachom, ale aj pred výparmi a chemickými činidlami
- čistiace pomôcky:
 - **alkohol** – šošovky, povrch filtrov
 - **benzínalkohol, xylén** – objektívy a kondenzory znečistené imerziou
 - **jemná handrička, mäkké štetce**, ...



MIKROSKOP DÔKLADNE OČISTÍME PO KAŽDEJ PRÁCI !!!

MIKROSKOPICKÉ PREPARÁTY

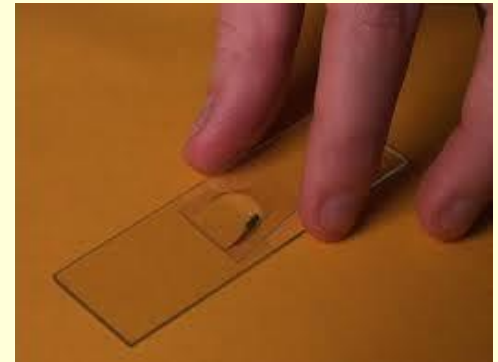
Mikroskopický preparát

- ➡ objekt mikrobiálneho, rastlinného alebo živočíšneho pôvodu
- ➡ uzavretý vo vhodnom médiu – voda, fyziologický roztok, alkohol, glycerín, ...
→ zvyčajne medzi podložným a krycím sklíčkom

Typy preparátov:

1. ČERSTVÉ (DOČASNÉ)

- **natívne preparáty** – pripravené zo živého materiálu, pričom počas pozorovania **je objekt ešte určitú dobu životaschopný**
- **+** jednoduchá a rýchla príprava; možnosť sledovať pohyb objektu; možnosť sledovať štruktúry objektu v nezmenenom stave
- **-** pozorovateľný iba relatívne krátky čas (rýchlo vysychá)



2. TRVALÉ

- **fixované preparáty** – pripravené zo živého materiálu, pričom počas pozorovania **nie je objekt životaschopný** (usmrtený v dôsledku jeho fixácie)
- **+** pozorovateľný aj po rokoch; fixácia bráni posmrtným zmenám buniek
- **-** zdĺhavá a náročnejšia príprava preparátu



MIKROSKOPICKÉ PREPARÁTY

Postup prípravy natívneho preparátu:

1. Do stredu čistého podložného sklíčka **kvapneme kvapku vody alebo fyziologického roztoku**.
2. Pomocou žiletky alebo skalpela **pripravíme tenkú vzorku** a pinzetou **ju umiestnime do stredu podložného sklíčka** (do kvapky média).
3. K podložnému sklíčku **priložíme krycie sklíčko** tak, aby sa jeden okraj krycieho sklíčka dotýkal podložného sklíčka pod ostrým uhlom. Krycie sklíčko posunieme smerom ku kvapke média, až kým sa jej dotkne - **kvapalina vyvzlína na dotkovú plochu sklíčka**.
 - pinzetou, preparačnou ihlou alebo len rukou



MIKROSKOPICKÉ PREPARÁTY

Postup prípravy natívneho preparátu:

1. Do stredu čistého podložného sklíčka **kvapneme kvapku vody alebo fyziologického roztoku**.
2. Pomocou žiletky alebo skalpela **pripravíme tenkú vzorku** a pinzetou **ju umiestnime do stredu podložného sklíčka** (do kvapky média).
3. K podložnému sklíčku **priložíme krycie sklíčko** tak, aby sa jeden okraj krycieho sklíčka dotýkal podložného sklíčka pod ostrým uhlom. Krycie sklíčko posunieme smerom ku kvapke média, až kým sa jej dotkne - **kvapalina vyvzlína na dotykovú plochu sklíčka**.
- pinzetou, preparačnou ihlou alebo len rukou
4. **Krycie sklíčko pomaly priložíme k podložnému** tak, aby sme zamedzili tvorbe vzduchových bublín. Prebytočnú kvapalinu odstránime tampónom.



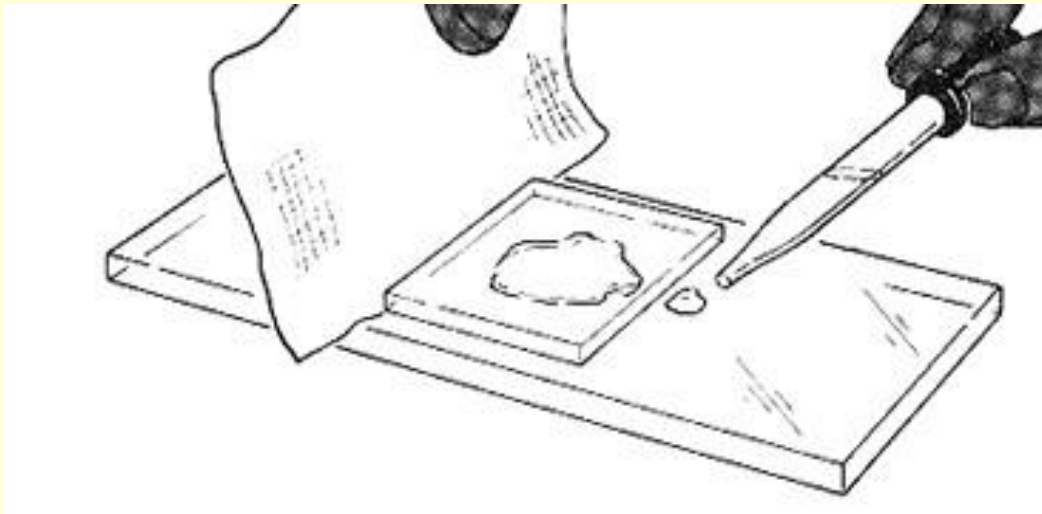
MIKROSKOPICKÉ PREPARÁTY

Postup prípravy natívneho preparátu:

- pozorovaný objekt je veľmi priehľadný ➔ **použijeme kontrastné farbivo**
 - natívny preparát sa ofarbí – **zvýraznenie jednotlivých častí buniek**
 - **metylénová modrá**, **eoín**, **Janusova zeleň**, ...
- preparát rýchlo vysychá ➔ **doplníme / vymeníme tekuté médium**



PRESÁVACIA TECHNIKA → k jednému okraju krycieho sklíčka prikvapávame médium, či zodpovedajúci roztok a k protiľahlému okraju priložíme filtračný papier



z preparátu sa tak odsaje pôvodná tekutina a súčasne sa nasaje nová

MIKROSKOPICKÉ PREPARÁTY

Postup prípravy trvalého preparátu:

- trvalé preparáty → **z rôznych typov tkanív** (organizmy, excízie orgánov, nátery izolovaných buniek)

1. Izolácia buniek, tkanív, orgánov vhodným spôsobom

2. Fixácia ➔ **okamžité, rýchle a násilné usmrtenie buniek denaturáciou proteínov**

→ zachováva pôvodnú štruktúru buniek a tkanív

→ bráni vzniku deštrukčných zmien v bunkách a tkanivách

→ fixačné prostriedky:

➔ **fyzikálne** – **vysoká teplota**, **vysušenie**, **nízka teplota** (tekutý dusík, suchý ľad)

➔ **chemické** – **organické kyseliny** (kys. octová, kys. pikrová)

– **anorganické kyseliny** (kys. osmičelá)

– **alkoholy** (metanol, etanol)

– **iné** (acetón, formaldehyd)

3. Príprava vzoriek na rezanie

→ **zalievanie do médií** – tkanivá sú príliš mäkké, nie je možné rezať ich priamo

➔ tkanivo sa odvodní, presýti xylénom a vloží **do roztopeného parafínu**

→ nie je potrebná, ak fixácia prebehla **zmrazením v tekutom dusíku**

MIKROSKOPICKÉ PREPARÁTY

Postup prípravy trvalého preparátu:

4. Rezanie ➔ príprava tenkých rezov na mikroskopické pozorovanie

→ **mikrotómy** – zariadenie schopné rezať objekty s hrúbkou niekoľko μm

5. Farbenie

→ rezy sa umiestnia na podložné sklíčko:

- **parafínové rezy** → **potrebné odparafínovať v xyléne**, aby farbivo preniklo do buniek

- **rezy zo zmrazených vzoriek** → **farbia sa priamo**

→ farbivá:

➔ **kyslé (plazmatické)** – farbia cytoplazmu buniek (**eoín, kyslý fuchsín, ...**)

➔ **zásadité (jadrové)** – farbia jadro buniek (**hematoxylín, metylová zeleň, ...**)

➔ **neutrálne (metylenová modrá)**

6. Zalievanie ➔ uzatváranie rezov na podložnom sklíčku vhodným zalievacím médiom

→ **chráni farbenie rezu a preparát pred vplyvmi prostredia**

→ zalievacie médiá:

➔ **nemiešateľné s vodou** (kanadský balzam, solakryl, ...)

➔ **miešateľné s vodou** (glycerín, Mowiol ...)