

Indstilling af mikroskoper



Laboratoriekonsulentordningen
LKO Kursusdag September 2024

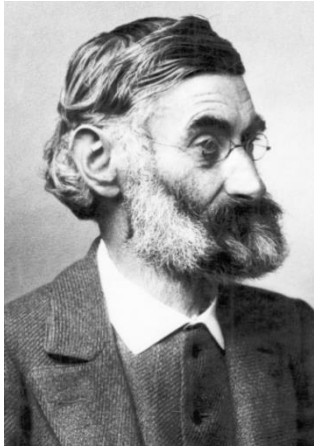
Dorthe Eva Tinch
Bioanalytikerunderviser
Blodprøver og Biokemi, OUH

Plan

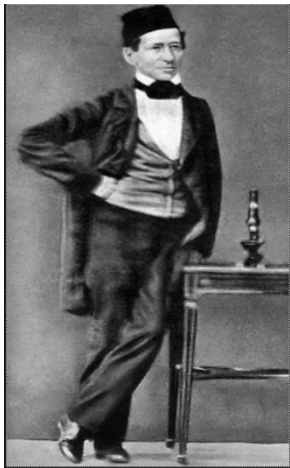
- Mikroskopets anvendelsesområde
- Mikroskopets opbygning
 - Objektiver
- Mikroskopi
 - Indstilling af mikroskop
 - Lysfeltbelysning
 - Fasekontrast
- Fejlfinding
- Skift af pære
- Vedligeholdelse af mikroskoper



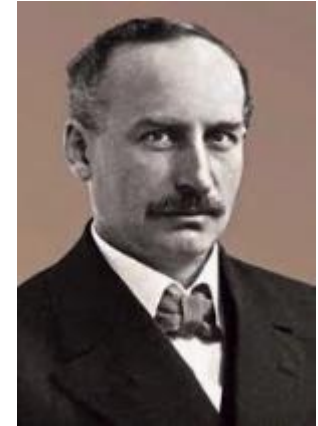
Mikroskopets historie – tyske fysikere og fotografer



Ernst Abbe (1840-1905)



Carl Zeiss(1816 -1888)

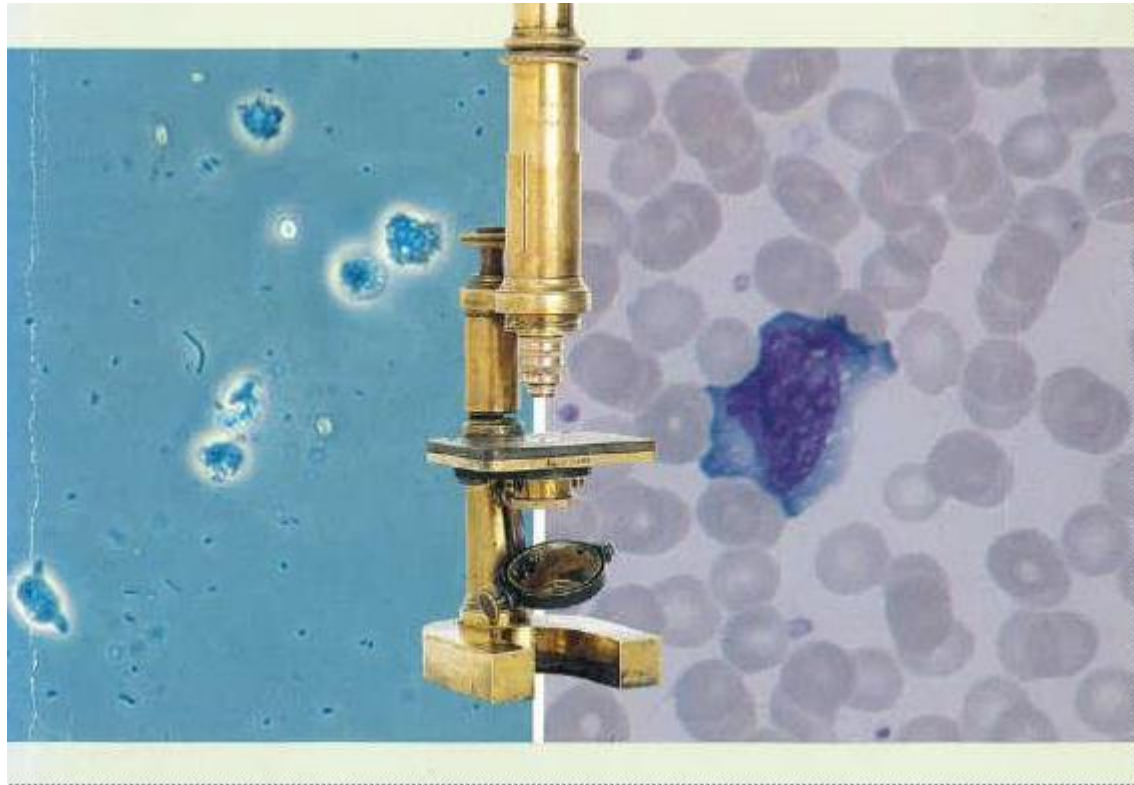


Ernst Leitz (1843-1920)
Leica



Anvendelsesområde

Mikroskopet anvendes ved betragtning af små objekter, for at man kan skelne detaljer, der ikke kan opfattes med øjet.



Mikroskopi

Lysfeltmikroskopi

- Lysfeltmikroskopi anvendes til farvede objekter.
- Objektiver mærket med Oil – kan kun anvendes med immersionsolie på objektglasset.
- Alle andre objektiver kan benyttes til lysfelt, også selv om der står PH på dem.
- Kondensoren sættes i lysfeltposition = BF (Bright Field).

Fasekontrast

- Fasekontrast anvendes til ufarvede objekter.
- Kun objektiver mærket med PH kan anvendes til fasekontrastmikroskopi.
- Kondensoren sættes i position, så fasekontrastring svarer til objektiv.
 - Objektiv mærket med PH1, sættes kondensoren på PH1,
 - Objektiv mærket med PH2, sættes kondensoren på PH2, osv.

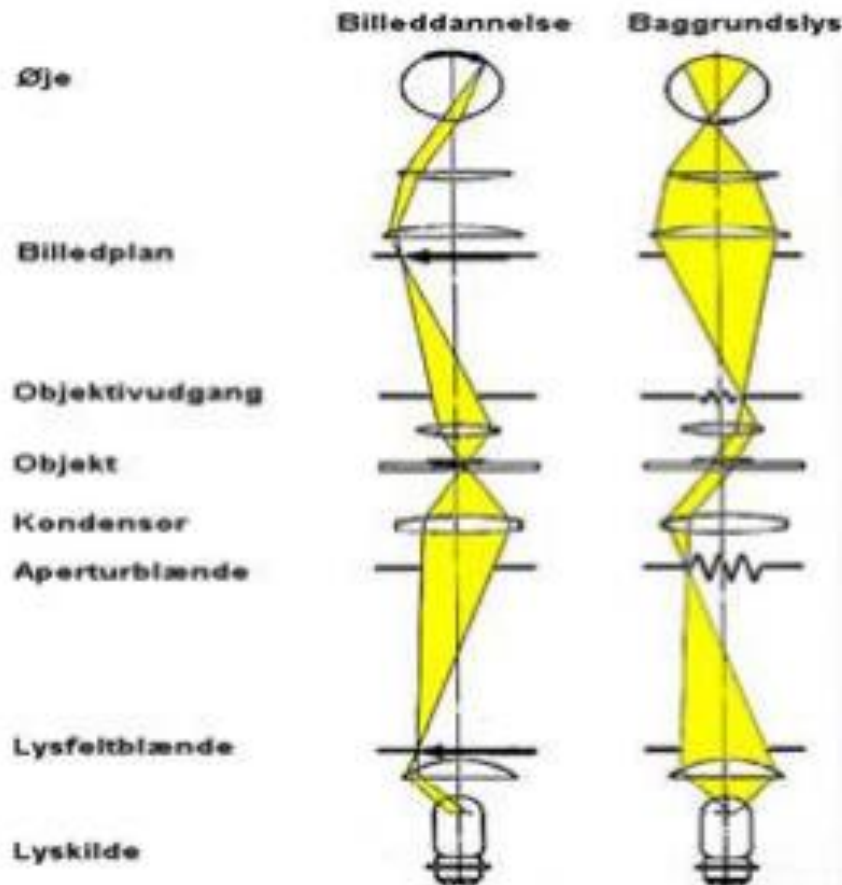


Hvorfor skal et mikroskop indstilles

Det er vigtigt at linserne i mikroskopet er centreret om den samme optiske akse, for at få den optimale opløsningsevne

Derfor skal mikroskopets indstilling kontrolleres og eventuelt justeres.

Mikroskopets lysvej



Kohlers indstilling af mikroskopet går ud på at kondensoren stilles i en position, så lyset stråler samles i objektets focusplan.

Optimal opløsningsevne opnås ved altid at kontrollere og eventuelt justere mikroskopet før brug.

Billedet viser lysvejen i mikroskopet.

Kondensoren fokuserer lyset

Lyset passerer objektivets linser

Danner et billede af objektet i mikroskopets **billedplan**.

Forstørres yderligere af okularets linser.

Noget lys fokuseres med brændpunkt i aperturblænden,

Dette lys danner **baggrundsliset**.

Lysfeltblænden indstilles, så den korrekte mængde lys rammer kondensoren, så kun den del af objektet, som fylder synsfeltet belyses.

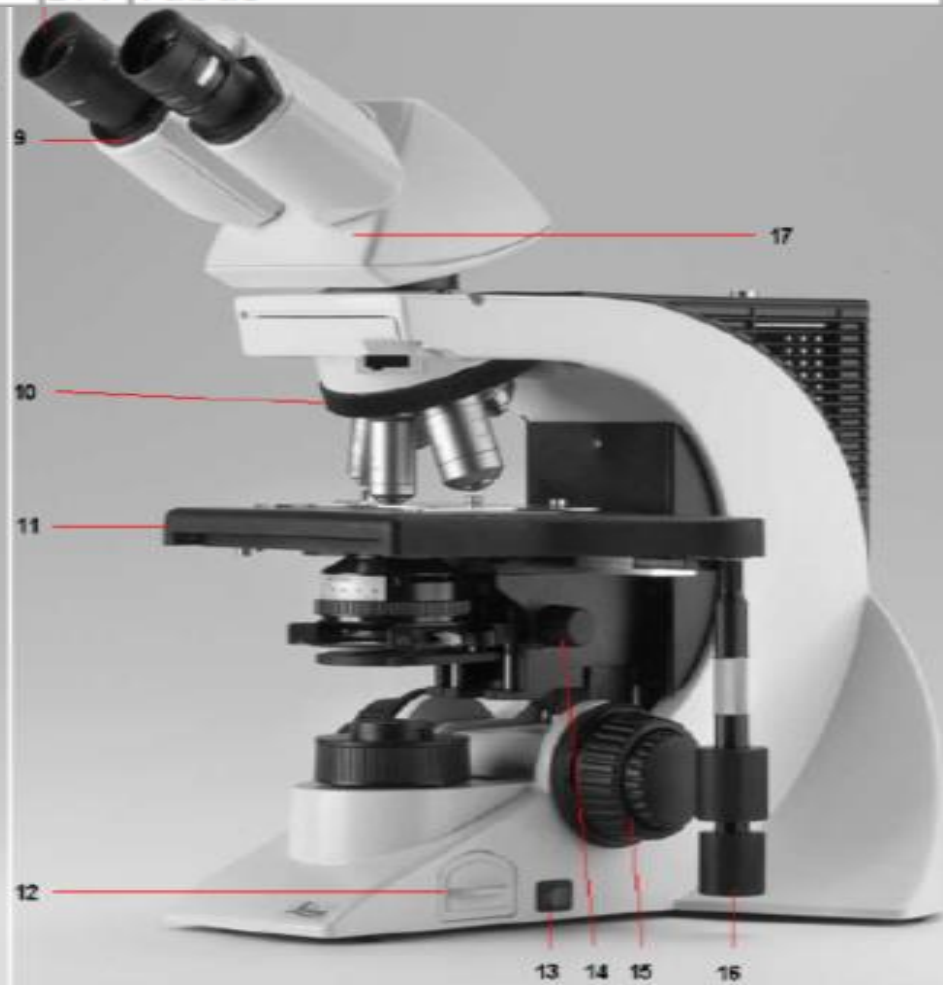
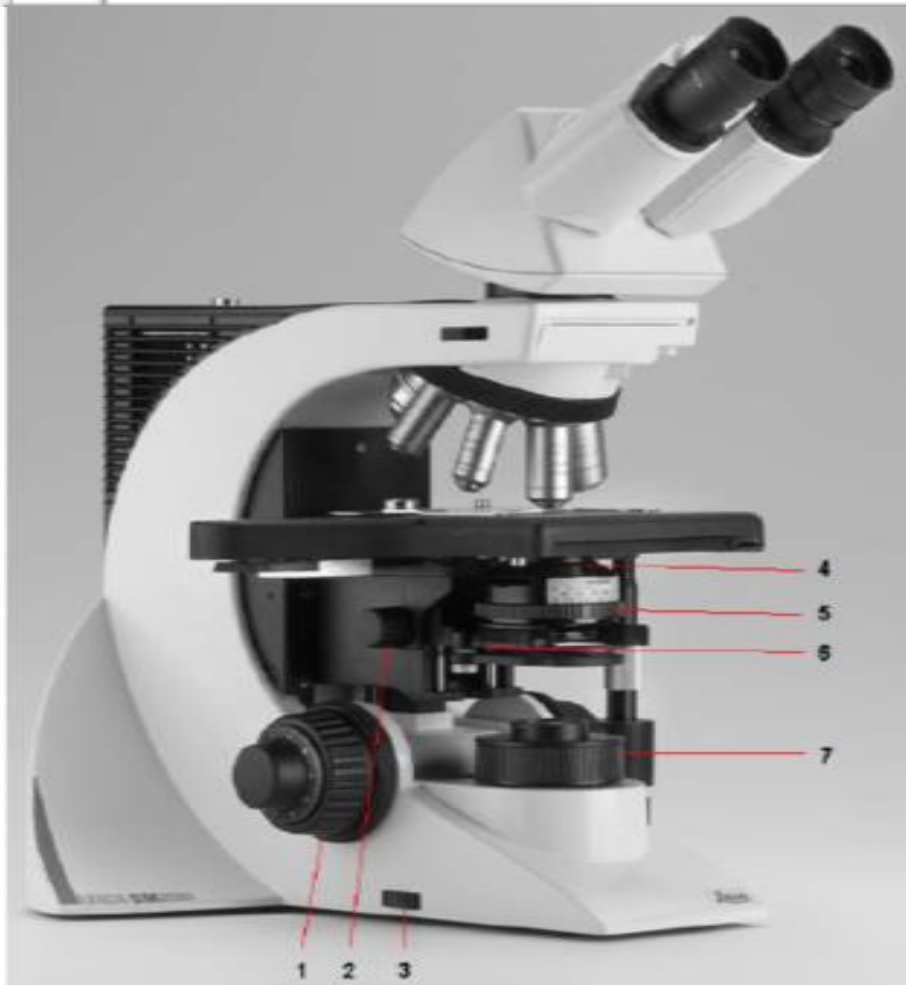
Er lysfeltblænden for åben, nedsættes kontrasten og billedet sløres.

Efter Kohlerindstillingen bruges aperturblænden til

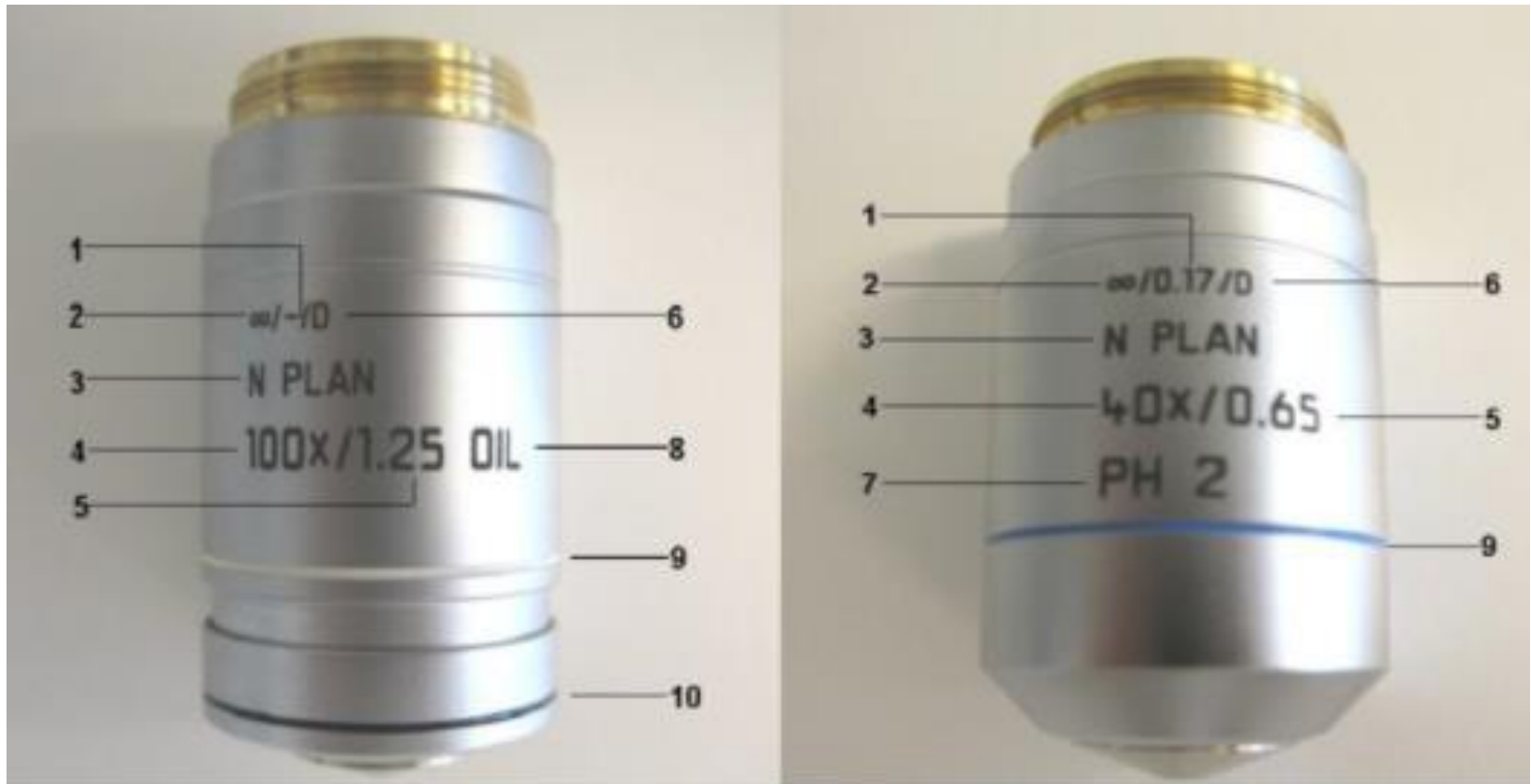
At ændre kontrasten i billedet.

1. Grov- og finskrue til fokusering.
2. Skruer til justering af kondensorhøjde
3. Lysstyrke
4. Kondensator
5. Aperturblænde
6. Skruer til fiksering af kondensatorhøjde
7. Lysfeltblænde

8. Okular
9. Okularrør
10. Objektivrevolver
11. Objektivbord
12. Lampehus
13. Tænd/sluk
14. Skruer til justering af kondensatorhøjde
15. Grov- og finskrue til fokusering
16. Bevægelse af objektbord
17. Tubus



Objektiver



Olie-Objektiv

Fase/lysfelt Objektiv



Olie-Objektiv



Fase/lysfelt Objektiv



1. Dækglasspecifikation. (–) angiver, at objektivet kan anvendes både med og uden dækglass.

0.17 angiver, at der skal anvendes glas-dækglass med tykkelsen 0.17 mm.

1. Tubuslængden. (∞) angiver, at der er uendelig korrigeret optik.

2. Objektiv type. N PLAN angiver synsfelt 22mm.

3. Forstørrelse. Angiver objektivets forstørrelse. For at få den samlede forstørrelse skal multipliceres med okularforstørrelse

4. Numerisk Apertur (NA). Objektivets opløsningsevne, altså evnen til at skelne fine detaljer i en given prøve. Jo højere NA des bedre opløsningsevne.

5. Angiver typen af prisme, der skal anvendes til interferenskontrast (Ikke muligt på mikroskoperne i hæmatologien, OUH Nr. 62188, 62189, 107833).

6. PH angiver, at objektivet kan benyttes til fasekontrast. Tallet svarer til faseblændens størrelse. 2 angiver, at kondensoren skal stilles på fasering 2 (PH2). PH objektiver kan også anvendes til lysfeltmikroskopi, i så fald stilles kondensoren i BF-positionen.

7. OIL angiver, at objektivet kun kan benyttes med immersionsolie (f.eks. paraffinolie). Der må ikke blandes flere typer immersionsolier.

8. Farvekode svarende til forstørrelse.

9. Sort ring angiver, at det er et olieobjektiv.



Indstilling af mikroskop

Köhler-princip - lysfeltmikroskopi

- Kondensoren stilles i en position, så lysets stråler samles i objektets fokusplan
- Lysfeltblænden indstilles, så der kommer den korrekte mængde lys til kondensoren
så kun den del af objektet, som fylder synsfeltet belyses
- Er lysfeltblænden for åben, nedsættes kontrasten og billedet sløres
- Efter Köhlerindstillingen bruges aperturblænden til at ændre kontrasten i billedet

Indstilling af mikroskop

Köhler-princip - lysfeltmikroskopi

- Vælg det objektiv (10), som der skal indstilles på.
- Alle (tal) refererer til figurer på næste slide .
- Læg et præparat på objektbordet (11) og stil skarp med grov og fin skruen (1).
- Åben for aperturblænden (5). (Skal drejes helt til højre).
- Luk lysfeltblænden (7) så meget så den ses i lysfeltet.
 - Er den uskarp i kanten (Fig.2a), skal der stilles skarp på kanten vha. kondensordrevet (2 & 14). Det er ikke altid muligt at få kanten helt skarp – indstil kondensordrevet så det bliver bedst muligt, (Fig.2b).
 - Er den decentreret (Fig.2b), skal lysfeltblænden centrereres (Fig.2c) vha. de to centreringsskruetrækkere, der placeres på mikroskopet lige under aperturblænden (6).
- Åben lysfeltblænden (7) så den lige netop forsvinder ud af synsfeltet (Fig.2d).
- Indstil aperturblænden.
- Fjern det ene okular (8) og kig ned i tubus (17).
- Aperturblænden (5) lukkes, så kun ca. 2/3 de af det oprindelige synsfelt kan ses (ca. 1/3 skal være mørk). *Dette er vejledende, aperturblænden kan lukkes til det bedste billede opnås, når der kigges på præparatet.*
- Mikroskopet er klar til brug.
- Sæt okularet på plads.



Indstilling af mikroskop

Köhler-princip - lysfeltmikroskopi

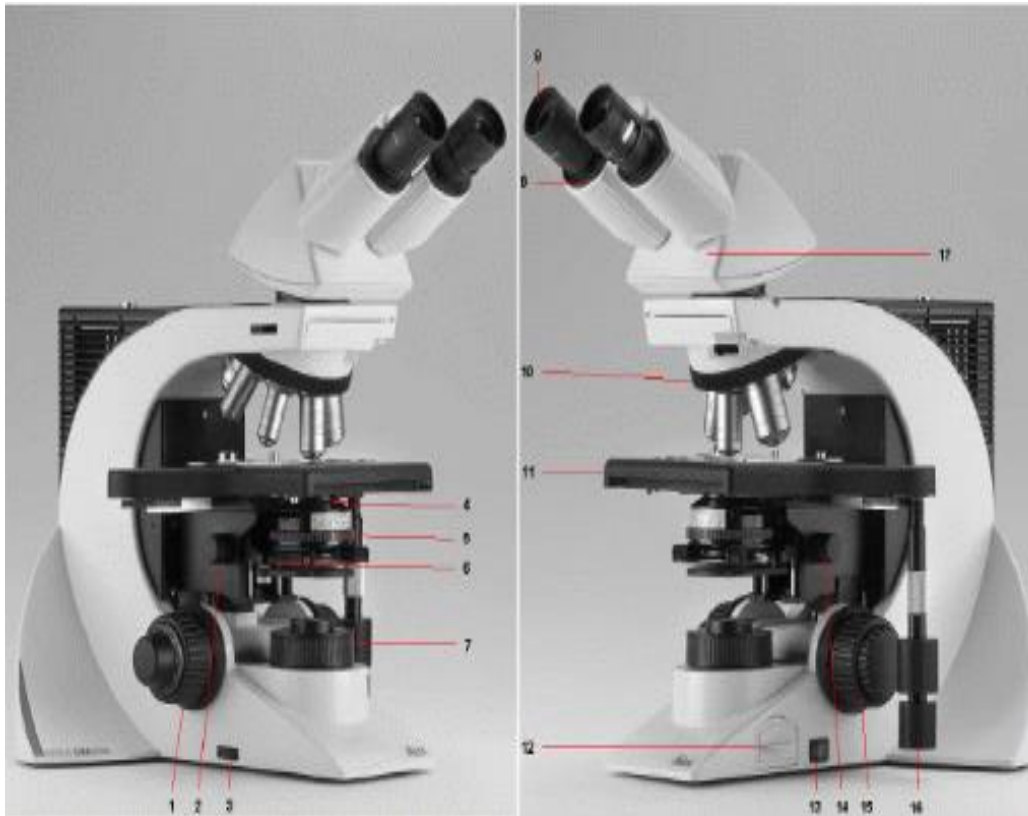


Fig. 1 - Mikroskop kun til Lysfelt

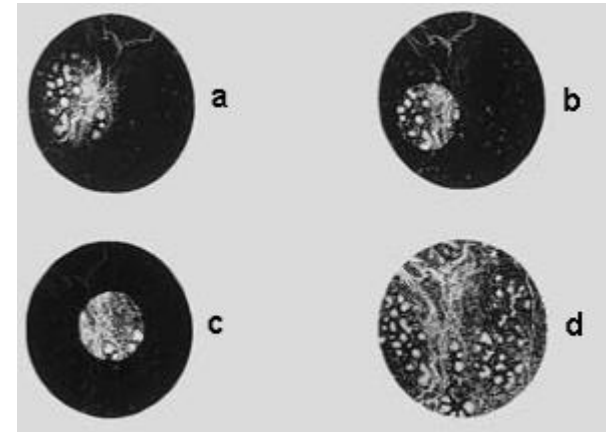


Fig.2 - Lysfeltblændens placering/skarphed

- a: Lysfeltblænde ikke fokuseret (skarp), ikke centreret
- b: Lysfeltblænde fokuseret (skarp), ikke centreret
- c: Lysfeltblænde fokuseret (skarp) og centreret, men ikke åbnet
- d: Lysfeltblænde åbnet = synsfelt



Indstilling af mikroskop

Fasekontrast

- Lys, der passerer en strukturdetalje, som har større brydningsindeks eller er tykkere end omgivelserne, bliver relativt forsinket.
- Dette forhold udnyttes i *fasekontrastmikroskopet*
- Præparatet belyses gennem en ringformet blænde
- I objektivets bageste brændplan, hvor det brudte og det ubrudte lys er rumligt adskilt, er indlagt en tilsvarende ringformet *faseplade*, som forsinker det ubrudte lys i forhold til det brudte
- Det brudte og det ubrudte lys er således ved mødet i billedplanet faseforskudt
- Interfererer destruktivt, således at strukturen afbildes mørk på lys baggrund
- Fasekontrast er et optisk system, som bruges til at forøge kontrasten i kontrastsvage mikropræparater. Det betyder, at man uden at farve præparatet kan se celler, cellekerner, vakuoler, organeller osv., men ikke i detaljer som med farvede præparater.

Indstilling af mikroskop

Fasekontrast

- Indstil mikroskopet efter Köhler's lysfeltprincip. Herefter indstilles til fasekontrast.
- Aperturblænden (5) sættes til PH.
- Kondensordrevet indstilles til PH-1,2,3... Indstillingen er afhængig af, hvilket objektiv der anvendes.
- Læg et blankt objektglas på objektbordet (11)
- Indsæt hjælpeokular (Fig. 3) i et af tubus(okularrørene) (17)
- Stil skarpt på den mørke fasering ved at løsne hjælpeokularets låsering, fokuser ved at dreje på hjælpeokularets linse og låse igen med låseringen (Fig.3)
- Er lysringen centreret (den lyse ring skal være placeret i den mørkere ring), skal der ikke indstilles (Fig.4 c)
- Er lysringen ikke centreret (Fig.4b), gøres dette således:
 - Indsæt fasecentreringsskruerne bag kondensoren(Fig.5)
 - Centrér lysringen vha. skruerne.
- Indstillingen gælder kun det valgte objektiv. Gentag proceduren hvis der vælges et andet. Husk at ændre kondensordrevet, så det passer til objektivet.
- Hjælpeokularet udskiftes med alm. okular, og mikroskopet er klar.



Indstilling af mikroskop

Fasekontrast



Fig. 3 - Hjælpeokular
a: Linse
b: Låsering

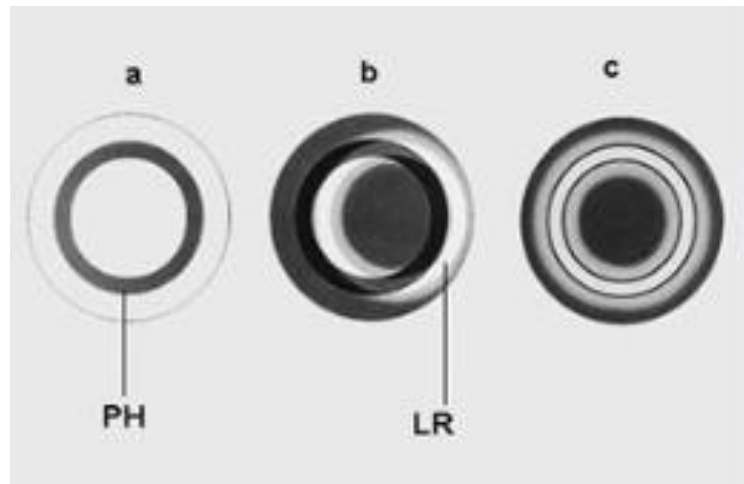


Fig. 4 - Billede i hjælpeokular.
a: Kondensoren står i lysfeltposition (BF=bright field)
b: Kondensoren står i fasekontrast position (PH), Faseringe ikke centreret
c: Kondensoren står i fasekontrast position (PH), Faseringe centreret

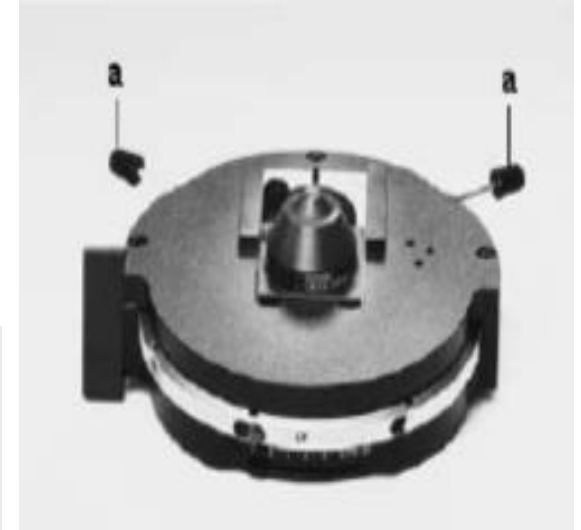


Fig. 5 - Kondensor
a: Fasecenteringskruer



Fejlfinding

- Objektiv og kondensorindstilling passer ikke sammen
- Mikroskopet er urent – støv på kondensorens frontlinse og okularets linser ses tydeligt.
De kan fejlagtigt tælles med ved tællinger:

Støv på okularlinserne spores ved at dreje okularet i tubus, billedet af støvpartiklerne vil da cirkle med rundt.

Støv på kondensorens frontlinse spores ved at hæve og sænke kondensoren.
Støvpartiklerne vil afbildes mere eller mindre skarpt

- Mikroskopet er ikke korrekt indstillet
- Mikroskopering i forkert niveau
- Er der slet intet lys, kan det være pæren, som er sprunget
- Objektivet er urent
- Objektivet er ridset/knust



Skift af pære

- I mikroskopets manual vil det være beskrevet, hvilken slags pære, ex. 12V, 30W halogenpære
- Åben lågen til lampehuset (placeringen kan variere imellem de forskellige modeller)
- Pæren er monteret på dette (pæren er måske varm)
- Fjern pæren
- Isæt den nye pære uden at fjerne indpakningen helt – pæren må ikke berøres med fingrene
- Sæt lågen til lampehuset på plads.



Vedligeholdelse

- Når mikroskopet ikke er i brug, bør det dækkes til for at forhindre støv i at sætte sig på linsefladerne.
- Støvpartikler på linseflader fjernes vha. et stykke linsepapir. Der kan evt. bruges rensbenzin og eftertørre med et tørt stykke linsepapir. For bedre at kunne komme helt ud i kanten af objektivet, foldes linsepapiret så der dannes en spids.
- Efter brug af olieobjektiver aftørres disse straks efter brug med linsepapir fugtet med rensbenzin og eftertørres med et tørt stykke linsepapir
- Hver dag bør objektiver, objektbord, m.m. renses med rensbenzin og eftertørres med rent linsepapir.
- Filteret under kondensoren kan blive støvet og skal tørres af en gang imellem

Brug aldrig ethanol(sprit), da det kan opløse det kitmiddel, der holder linserne på plads i objektivet. Støv og olie kan trænge ind bag frontlinsen og bevirke varig billedforringelse.



A close-up photograph of a vibrant green tree frog lying on its back on a large, green lily pad. The frog's front legs are raised towards its chest, and its hind legs are also raised, giving it a relaxed, almost human-like posture. The frog's skin is a bright, saturated green, and its large, dark eyes are prominent. The background is a soft, out-of-focus green, suggesting a natural, moist environment. The overall mood is peaceful and serene.

Relax.

www.facebook.com/montereybayholistic

It's a healthy choice!