



**FAKULTA
STROJNÍ
ČVUT V PRAZE**

Ústav konstruování a částí strojů

**Modernizace optické cesty
mikroskopu SPIM**

**Optical path of SPIM microscope
improvement**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2017

Bc. Tomáš MAJER

Studijní program: N2301 STROJNÍ INŽENÝRSTVÍ
Studijní obor: 2301T047 Dopravní letadlová a transportní technika
Vedoucí práce: Ing. František Lopot, Ph.D
Odborný vedoucí: Ing. Mgr. Daniel Hadraba, Ph.D

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem Modernizace optické cesty mikroskopu SPIM vypracoval samostatně pod vedením Ing. Františka Lopota, Ph.D. a odborným vedením Ing. Mgr. Daniela Hadraby, Ph.D. a s použitím literatury, uvedené na konci mé diplomové práce v seznamu použité literatury.

V Praze 27. 6. 2017

.....
Bc. Tomáš Majer

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu své diplomové práce Ing. Františku Lopotovi, Ph.D za odborné vedení, pomoc a rady při zpracování této práce. Dále bych chtěl poděkovat odbornému konzultantovi Ing. Mgr. Danielu Hadrabovi, Ph.D za seznámení s mikroskopovou problematikou a ochotu při spolupráci.

Anotační list

Jméno autora:	Bc. Tomáš MAJER		
Název DP:	Modernizace optické cesty mikroskopu SPIM		
Anglický název:	Optical path of SPIM microscope improvement		
Rok:	2017		
Studijní program:	N2301 STROJNÍ INŽENÝRSTVÍ		
Obor studia:	2301T047 Dopravní, Letadlová a Transportní Technika		
Ústav:	Ústav konstruování a částí strojů		
Vedoucí DP:	Ing. František Lopot, Ph.D		
Konzultant:	Ing. Mgr. Daniel Hadraba, Ph.D		
Bibliografické údaje:	počet stran	60	
	počet obrázků	67	
	počet tabulek	6	
	počet příloh	11	
Klíčová slova:	iluminační mikroskop, revolverová hlava, objektivy, optika		
Keywords:	illumination microscopy, carousel head, lenses, optics		

Anotace:

Tato diplomová práce se zabývá návrhem a realizací revolverového držáku objektivů pro iluminační mikroskop SPIM. V první části jsou popsány jevy geometrické a vlnové optiky a jejich vlastnosti při průchodu světla optickým zařízením. Dále je popis používaných zdrojů světla, používaných objektivů a nejčastější vady objektivů. Jsou zde popsány jednotlivé části mikroskopu SPIM a jeho funkčnost a použití. Dále jsou popsány metody přesné výroby součástí a existující přesná vedení.

V hlavní části se zabývám podrobným návrhem jednotlivých součástí revolverové hlavy pro objektivy mikroskopu, potřebnými výpočty pro správný návrh a výrobu. Na konci práce je seznam používaných součástí a potřebné výkresy pro výrobu součástí.

Abstract:

This master's thesis deals with design and realization of carousel lens holder for illumination microscopy SPIM. The first part describes the phenomena of geometric and wave optics and their properties when light passes through optical devices. The light sources, lenses, and the most common aberration of the lenses are described. There are characterized the individual parts of SPIM microscope, its functionality and its use. Further, the methods of precision component manufacturing and existing precision lines are explained.

The main part of the thesis explains the detailed design of the individual parts of the carousel head for microscope lenses, supplemented with the necessary calculations for the correct design and manufacture. At the end of the work is a list of used components and necessary drawings for component manufacturing.

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíl práce	2
3. Teoretická východiska	3
3.1. Geometrická optika.....	3
3.1.1. Zákon odrazu a lomu.....	3
3.1.2. Disperze.....	4
3.1.3. Polarizace světla.....	5
3.2. Vlnový charakter světla.....	5
3.2.1. Interference světla.....	6
3.2.2. Difrakce.....	7
4. Optický světelný mikroskop	9
4.1. Zdroje světla.....	9
4.2. Objektivy.....	11
4.3. Numerická apertura.....	11
4.4. Rozlišovací schopnost objektivu.....	12
4.5. Vady optických soustav.....	15
4.5.1. Sferická aberace.....	15
4.5.2. Chromatická aberace.....	16
5. Mikroskop SPIM	18
5.1. Excitační část.....	20
5.2. Komora se vzorek.....	22
5.3. Detekční část.....	23
6. Přesná mechanika	24
6.1. Technická řešení posunů.....	24
6.1.1. Přímá vedení kluzná.....	24
6.1.2. Přímá vedení valivá.....	25
6.2. Technická řešení rotací.....	27
6.2.1. Otočná uložení.....	27
6.2.2. Předpětí ložisek.....	28
6.2.3. Technická řešení revolverových hlav.....	28
7. Konstrukční návrh	30
7.1. Výchozí konstrukční řešení.....	30
7.2. Použité objektivy.....	31
7.3. Korekce lomu světla.....	32
7.4. Volba posuvného mechanismu.....	36
7.5. Návrh revolverové hlavy.....	40
7.6. Volba ložisek.....	40
7.7. Návrh stojanu revolverové hlavy.....	44
7.8. Sestava revolverové hlavy.....	46
Závěr	49
Použitá literatura	50
Seznam tabulek	55
Seznam příloh	55

1. Úvod

Mikroskop je nezanedbatelnou součástí vědních zařízení, který umožňuje zkoumání struktur neviditelných lidskému oku. Mikroskopické zobrazení se rozlišuje podle procházejícího záření (světlo, ultrafialové záření, polarizované světlo, infračervené záření, apod.). Optika je rozdělena na geometrickou optiku, která se řídí zákonem odrazu a lomu světla, a vlnovou optiku, zkoumající vznik a šíření světla, které popisuje pomocí elektromagnetických vln. Při popisu a návrhu optické cesty se primárně vychází z principů geometrické optiky, musí se však při tom brát v úvahu efekty způsobené vlnovým charakterem světla.

Optický mikroskop je zařízení, které pro zobrazení pozorovaného objektu využívá světelné paprsky. Tyto světelné paprsky po interakci s pozorovaným předmětem procházejí optickou soustavou čoček, popřípadě zrcadel, a zobrazují daný předmět do obrazové roviny. V dnešní době se využívá velké množství provedení optických mikroskopů, např. konfokální, fluorescenční nebo Selective Plane Illumination Microscopy (SPIM). Tento mikroskop je primárně určen k pozorování velkých objektů (v rozmezí centimetrů) a pracuje na principu absorpce molekul světla a následným vyzářením světla s delší vlnovou délkou.

Mikroskop openSPIM se nachází v prostorách Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky, oddělení Biomatematiky. Podrobný návod pro sestavení je dostupný z webové stránky <http://openspim.org/>.

2. Cíl práce

Cílem této práce je navržení revolverové hlavy pro uchycení objektivů mikroskopu SPIM při zadaných požadavcích a parametrech ze strany Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky, oddělení Biomatematicky. Pro změření velikostí součástí a zjištění všech východisek mi byl umožněn přístup k mikroskopu.

Důvodem vypracování této práce byla nutnost složitého vyjmutí objektivů při jejich výměně a následná korekce příslušných parametrů nového objektivu uchyceného na nynější zástavbě mikroskopu. Navržením nové revolverové hlavy bude snížení časových prodlev při výměně objektivů, jejich nastavení a možnost rychlé korekce při výměně média o rozdílném indexu lomu. Dalším důvodem je také originalnost mikroskopu, který je složen z v kupovaných či vyráběných součástí a není tak možné použití komerčně prodávaných hlav objektivů.

Požadavkem zadavatele bylo uchycení čtyř objektivů, z nichž tři jsou suché objektivy se zvětšením 2x, 5x a 10x a jednoho imerzního objektivu se zvětšením 20x. Dále umístění dvou filtrů do prostoru za objektiv a co nejmenší konstrukční zásah do aktuálního stavu mikroskopu.

3. Teoretická východiska

3.1. Geometrická optika

Je založena na představě šíření paprsků světla prostorem navzájem nezávisle a na rozhraní dvou různých prostředí se řídí zákonem odrazu a lomu.

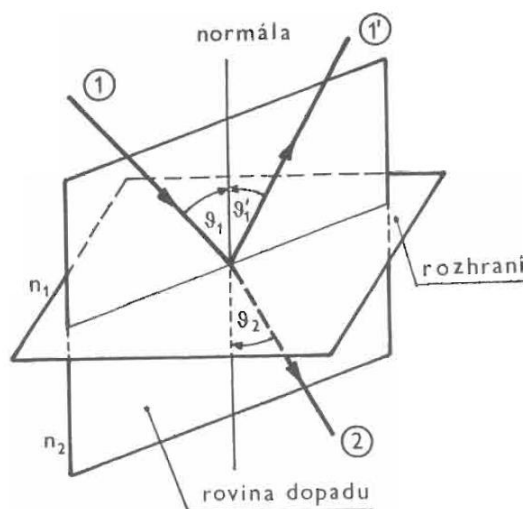
3.1.1. Zákon odrazu a lomu

Rychlostí světla rozumíme fázovou rychlost šíření vlnoplochy v daném prostředí dané permitivitou a permeabilitou. Rychlost světla je odlišná v různých prostředích. Nejrychleji se světlo šíří ve vakuu ($299\,792\,458\text{ ms}^{-1}$). Pro rychlost světla v různých prostředích stanovujeme index lomu světla.

$$n = \frac{c}{v} \quad (1)$$

kde: c je rychlost světla ve vakuu, v je fázová rychlost světla v daném prostředí, n je index lomu světla daného prostředí.

Index lomu prostředí se určuje vůči vakuu. Index lomu vzduchu závisí především na teplotě, tlaku a vlhkosti. Jeho hodnota pro teplotu 20°C a barometrický tlak je $n_{\text{vzduchu}}=1,0003$, což můžeme považovat za reálných podmínek rovnající se indexu lomu ve vakuu.



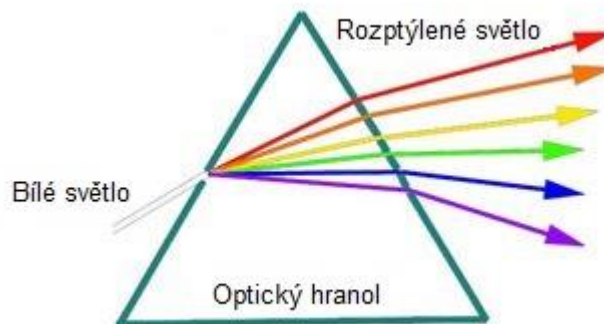
Obr. 1.: Lom světla v různém prostředí [1]

K lomu světla dochází při průchodu světla z jednoho prostředí do jiného. Abychom lom pozorovali, je nutné, aby byla obě prostředí průsvitná/průhledná. Při dopadu paprsku světla pod úhlem ϑ_1 na rozhraní dvou prostředí s různým indexem lomu dochází k částečnému, nebo k úplnému odrazu paprsku od roviny rozhraní (Obr. 1). Úhel odraženého paprsku ϑ'_1 je totožný s úhlem paprsku dopadajícího. Na rovinném rozhraní dvou látek s různým indexem lomu dochází k lomu světla. Paprsek, který se neodráží od rozhraní, se částečně láme pod úhlem ϑ_2 z důvodu změny indexu lomu. Tento vztah se nazývá Snellův zákon lomu. [1]

$$n_1 * \sin(\vartheta_1) = n_2 * \sin(\vartheta_2) \quad (2)$$

Prochází-li světlo z opticky řidšího prostředí do prostředí opticky hustšího (např. ze vzduchu do vody, ze vzduchu do skla) je relativní index lomu menší než jedna ($n_1 < n_2$), dochází k takzvanému lomu světla ke kolmici. Naopak při přechodu z hustšího prostředí do řidšího je relativní index lomu větší než jedna ($n_1 > n_2$), dochází k lomu od kolmice.

3.1.2. Disperze

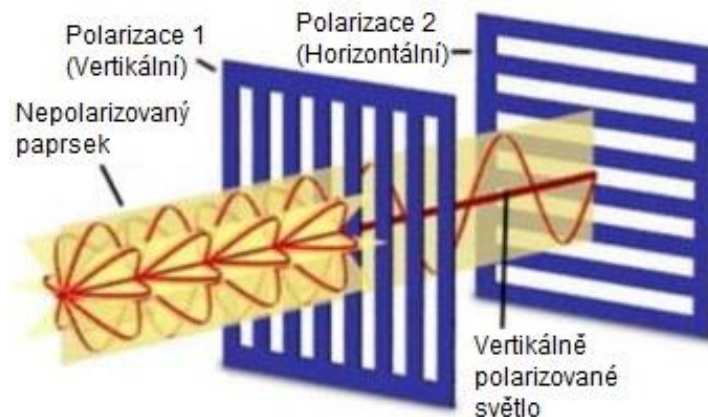


Obr. 2.: Optický hranol [2]

Disperze úzce souvisí s lomem světla a s délkou jednotlivých vln elektromagnetického záření. Jedná se o závislost šíření fázové rychlosti vlny na její frekvenci. Při dopadu bílého světla na rozhraní vzduch sklo dochází k lomu světla a k rozkladu na jednotlivé vlnové frekvence. Největší úhel lomu má fialová barva, nejmenší červená barva. Lépe je tento rozklad patrný při vícenásobném lomu. Pro tento jev se využívá optického hranolu, kde dochází k dvojitému lomu a tím je lépe vidět spektrální lom (Obr. 2). Disperzi můžeme pozorovat i na přírodním jevu – duha. Zde dochází ke vniknutí části paprsku světla do kapky vody, kde se odráží od vnitřní strany a rozděluje se na jednotlivé frekvence. [1]

3.1.3. Polarizace světla

Jakýkoliv zdroj osvětlení vytváří vlnění, jehož vektory elektrického pole E a magnetického pole B jsou k sobě navzájem kolmé a jsou také kolmé na směr šíření vlny. Když se rovina kmitání neustále mění, jedná se o nepolarizované světlo, u kterého dochází k odlesku u nepolarizovaných materiálů. Pokud však dokážeme filtrovat vlnění pouze do jedné roviny, potom se tomuto světlu říká polarizované. Nejčastěji dochází k polarizaci při vzájemném působení světla s látkou, a to odrazem, lomem či dvojlomem světla. Efekt nepolarizovaného světla můžeme nejčastěji pozorovat u fotografických snímků, pokud fotíme skleněné výlohy či povrchy hladin vodních ploch. K polarizaci světla se používají filtry (polarizátory), které se nanášejí jako tenké vrstvy na vnější plochy čoček a skel. Skládají se z určitých dlouhých molekul rozmístěných v umělé hmotě, která když se natáhne, uspořádají se molekuly do pravidelné řady. Při průchodu světla filtrem elektrická složka v jednom směru projde, zatímco v kolmém směru narazí na molekuly a zanikne. Tak bude mít světlo pouze směr vodorovný se směrem polarizace filtru.



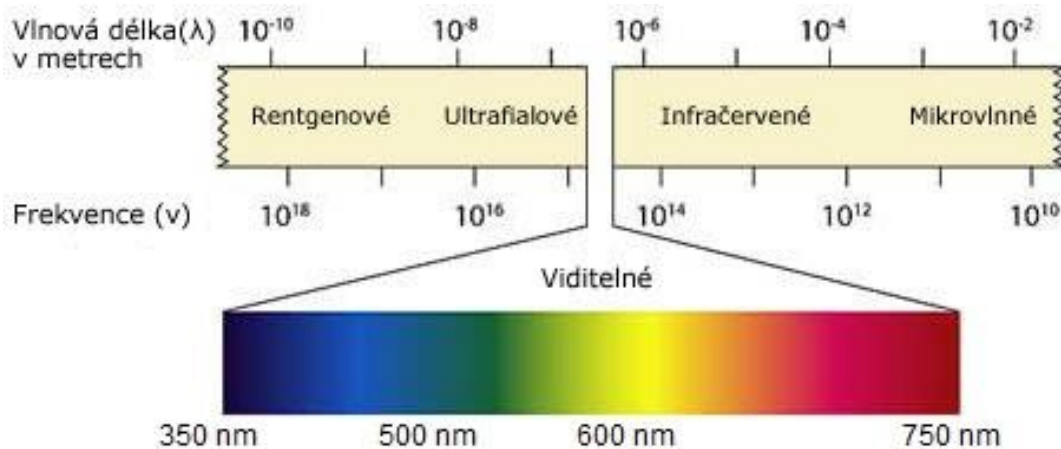
Obr. 3.: Polarizace světla převzato a upraveno z [3]

Polarizace odrazem je jen částečná a záleží na úhlu dopadu a indexu lomu prostředí. [1] [4] Důkladněji se jevem polarizace světla zabývá například kniha: Polarization of light od Serge Huarda.[5]

3.2. Vlnový charakter světla

Teorii, že se světlo pohybuje jako vlna, představil jako první fyzik Christian Huygens v 17. století a v polovině 19. století popsal matematicko-fyzikálními rovnicemi J. C. Maxwell. Elektromagnetické vlnění se šíří prostorem v různých vlnových délkách. Právě vlnová délka určuje u viditelného světla jeho barvu. Každý

materiál o teplotě vyšší než 0 K vyzařuje tepelné záření, které je součástí elektromagnetického záření.



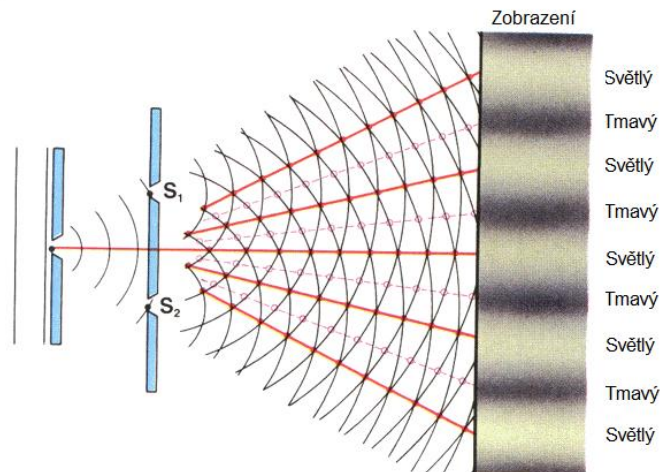
Obr. 4.: Vlnové spektrum převzato a upraveno z [6]

Pro lidské oko jsou viditelné vlnové délky o velikosti od 350nm (tmavě fialová barva) do 750nm (červená barva). Nejcitlivější je oko na světlo o vlnové délce 550 nm. [1] [4]

3.2.1. Interference světla

Interference (=skládání) světelných vln můžeme pozorovat na tenkých vrstvách mýdlových bublin nebo vrstvě oleje. Dochází zde k superpozici vlnoploch, které jsou skládány do interferenčních maxim nebo minim. Pro splnění interferujícího světla je nutné, aby zdroj světla byl koherentní (vlnění o stejné frekvenci, směru vlnění a stejné fázi) a monochromatický nebo kvazimonochromatický (vyzařovat světlo o stejné vlnové délce, nebo v úzkém vlnovém rozsahu).

Interferenci prokázal Thomas Young, který provedl takzvaný dvouštěrbinový pokus (Obr. 5), ve kterém poprvé demonstroval vlnovou povahu světla. Monochromatické světlo dopadá na přepážku s úzkou štěrbinou, kterou prochází, a dopadá na druhou přepážku s dvěma štěrbinami vzdálenými od sebe o D . Na stínítku ve vzdálenosti L můžeme poté pozorovat interferenční obrazec skládající se ze světlých a tmavých pruhů. Délka dráhy paprsku z jedné štěrbinou je jiná od délky dráhy druhé štěrbinou. Jejich rozdíl je poté Δl . Světlý proužek se nazývá interferenční maximum a dochází k němu, pokud je Δl sudým násobkem poloviny vlnové délky. Tmavý proužek se poté nazývá interferenční minimum. [1]

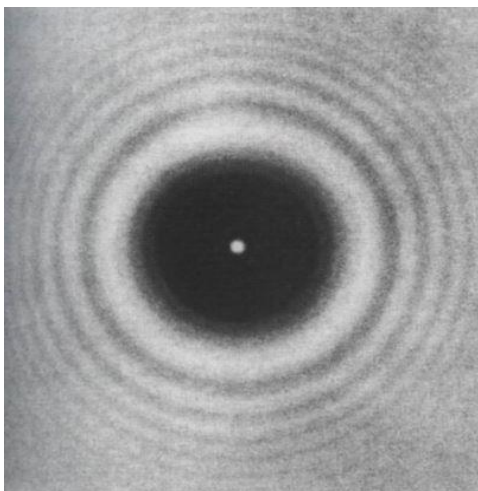


Obr. 5.: Interferenční pole převzato a upraveno z[7]

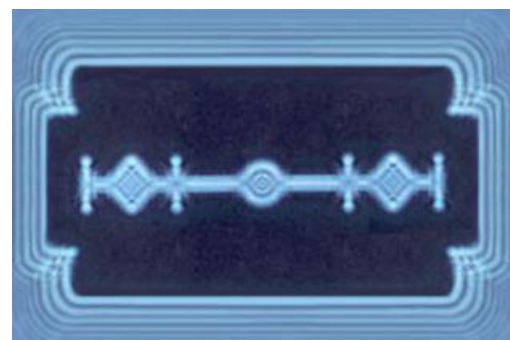
Interference na tenkých vrstvách se používá pro potlačení či zesílení odrazné složky světla od povrchu. V praxi se nanáší antireflexní vnější vrstvy skleněných čoček fotografických či mikroskopických objektivů, ty poté snižují ztráty odrazem. [1]

3.2.2. Difrakce

Tento jev je další ze způsobu ověření, že světlo se chová jako vlna. Počátkem 19. století bylo chování světla jako vlny v akademických kruzích dosti zpochybňováno, protože se většina vědců přikládala k teorii Isaaca Newtona, podle něhož je světlo proudem částí. Bylo poukázáno na to, že pokud by se světlo chovalo jako vlna, muselo by světlo procházející kolem okraje kuličky proniknout i do oblasti jejího stínu. Tento fakt prokázal francouzský fyzik Augustus Fresnel pokusem na disku (Obr. 6).



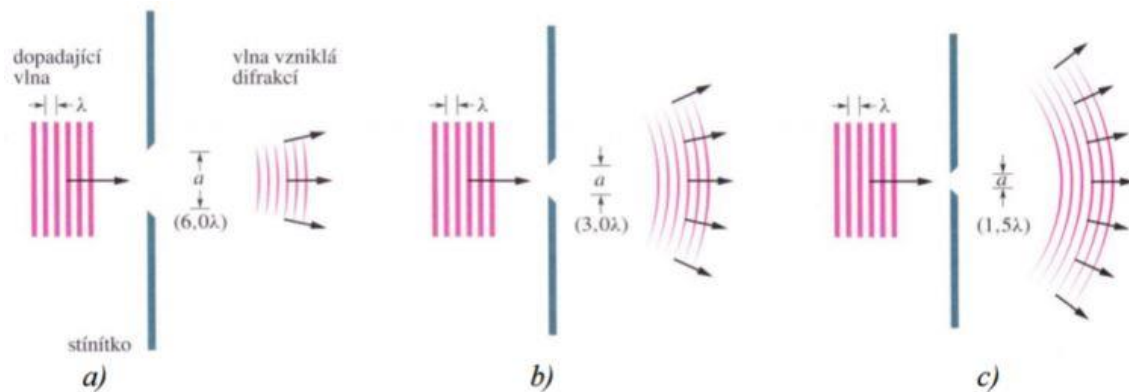
Obr. 6.: Fresnelova světla stopa na disku [4]



Obr. 7.: Difrakce kolem okrajů žiletky [8]

K difrakci dochází při míjení světla kolem okraje předmětu Obr. 7 u vnějších i vnitřních hran. Můžeme si zde všimnout vznikajících maxim a minim, což potvrzuje interferenci z předchozí kapitoly.

K difrakci dále dochází při průchodu světla malými otvory blízcími se svojí velikostí rozměru vlnové délky λ . Na Obr. 8 můžeme vidět tři varianty velikosti štěrbin ($a = 6\lambda$, $b = 3\lambda$, $c = 1,5\lambda$), jak ovlivňují hodnotu ohybu světla procházejícího otvorem ve stínítku. Čím je otvor menší, tím více dojde k difrakci světla. Tento poznatek je velmi důležitý pro oblast mikroskopie, protože čím větším zvětšením budeme předměty pozorovat, tím se bude vliv difrakce více projevovat. [4]



Obr. 8.: Vliv difrakce na velikost otvorů [4]

4. Optický světelný mikroskop

Mikroskop je optický přístroj sloužící k pozorování malých objektů až do zvětšení 1000x. Pro větší zvětšení se používají mikroskopy na bázi detekce elektronů (elektronový mikroskop), přičemž optické mikroskopy využívají k osvětlení fotony. Na Obr. 9 jsou popsány hlavní části mikroskopu. Vzorky jsou pozorovány buď přímo okem, nebo jiným optickým přístrojem (kamerou). Mezi nejdůležitější části, které nám udávají zvětšení a hlavně kvalitu obrazu, jsou objektivy. Ty jsou uchycené v revolverové hlavě, která má u většiny dnešních mikroskopů jinou osu rotace, než je optická osa mikroskopu. Tím je dosaženo lepšího přístupu ke vzorku. Revolverová hlava může být uložena i vodorovně, zde se však musí brát v úvahu tíha objektivů i samotné hlavy. Aby nedošlo ke zkreslení výsledku, musí být tato deformace kompenzována velice tuhým uchycením.



Obr. 9.: Optický mikroskop převzato a upraveno z [9]

4.1. Zdroje světla

Osvětlovací soustavy u prvních mikroskopů využívaly k nasvícení předmětu denní světlo, nebo olejové lampy, jejichž paprsek byl nasměrován pomocí několika zrcátek a čoček. S příchodem Thomase A. Edisona a jeho vynálezem žárovky se přešlo na lépe regulovaný zdroj světla. Zdroje světla jsou buď přímo zabudované v těle mikroskopu, nebo používány jako přídatná zařízení. V dnešní době se pro

osvětlení optických mikroskopů používají wolframové halogenové žárovky, které jsou umístěné v osvětlovací komoře, a světlo ke vzorku prochází skrz kolektor, aperturní clonu, polní clonu a čočku kondenzoru. Tyto žárovky vyzařují spektrum od 300 nm do 1200 nm. Pomocí potenciometru se ovládá přívod napětí od 4 do 24 V a jejich výkon je od 20 do 100 Wattů. [10]



Obr. 10.: Halogenová žárovka Narva GY6.35 100W [11]

Jako další zdroj osvětlení se používají LED diody (Light Emitting Diode). Jedná se o polovodičové součástky s PN přechodem, ve kterém se při průchodu elektrického náboje propustným směrem emituje koherentní světlo.

Výhody LED diod jsou [12]:

- vysoká životnost a spolehlivost
- nízká spotřeba energie
- při tlumení nemění barvu
- vyzařování světla v jedné barvě a v určitém směru
- lepší nahrazení denního světla než wolframové halogenové žárovky

Nevýhody:

- pro některé aplikace nedostatečný světelný tok
- u výkonných LED diod vyšší produkce tepla
- některé mikroskopy nelze převést na diodové osvětlení

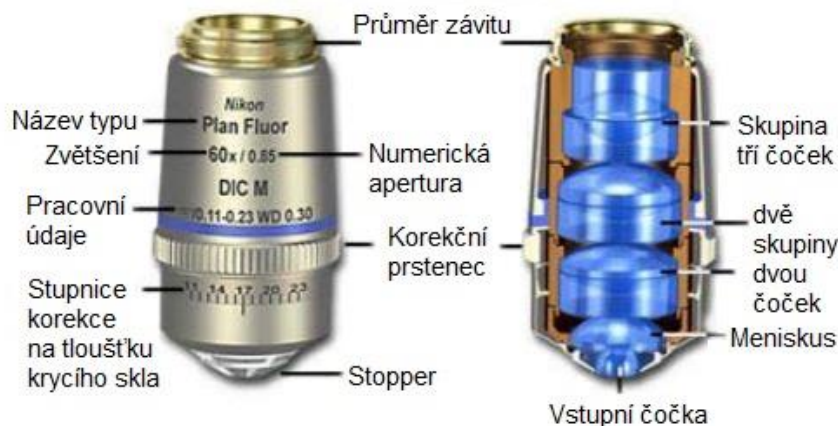
Aby byl u fluorescenční mikroskopie počet emitujících fotonů pro osvětlení dostačující, je potřeba výkonných zdrojů. Mezi nejběžnější patří žárovky s vysokotlakými plyny, jako jsou rtuťové nebo xenonové hořáky. V dnešní době jsou hojně používány laserové zdroje, které mají monochromatické polarizované osvětlení a pracují pouze v určité hranici vlnových délek v závislosti na aktivním médiu.[10]

Historie, princip a použití laseru ve vědních odvětvích je popsáno v knize: Nové pohledy na neinvazivní laser od Leoše Navrátila a kolektivu.[13]

4.2. Objektivy

Objektivy patří mezi nejdůležitější součást optických přístrojů. Jedná se o soustavu uspořádaných čoček. Mají hlavní vliv na kvalitu obrazu. Základní rozdělení podle konstrukce je na „suché“ objektivy pracující v prostředí vzduchu a „imerzní“ objektivy, kde vzduch je nahrazen imerzní kapalinou a tím je eliminován lom světla v prostředí vzduchu a v krycího skla.

Na konstrukci objektivu a na druhu skla závisí jas a kontrast obrazu. Jas přímo závisí na průměru vstupní čočky (nazývané pupila), která může být omezena objímkou. Pupila určuje spolu s ohniskovou vzdáleností světelnost objektivu. [14]



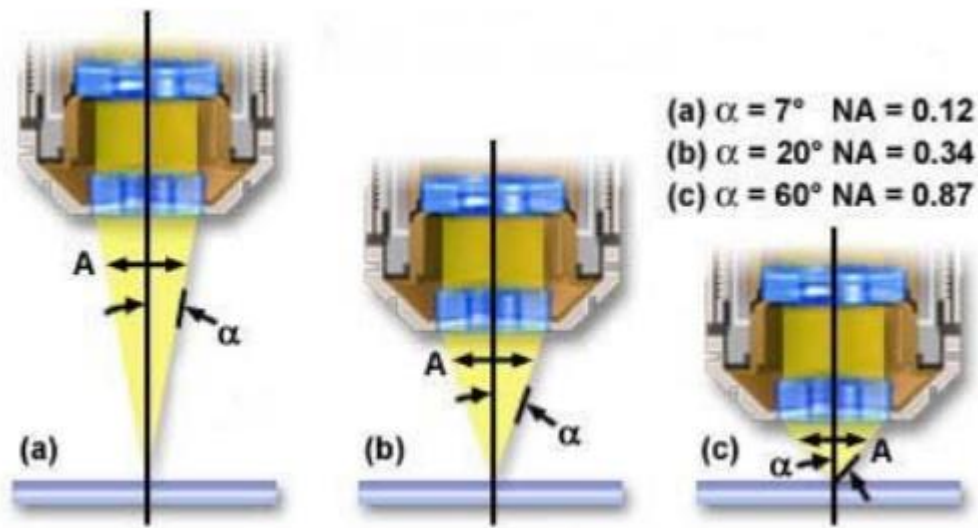
Obr. 11.: Parametry objektivu [14]

4.3. Numerická apertura

Jeden z nejdůležitějších parametrů, který udává vlastnosti objektivu a jeho světelnost, je numerická apertura (N.A., numerická= číselná, apertura= otvor). Objektivy se stejným zvětšením a vyšší numerickou aperturou mají lepší světelné vlastnosti. Jedná se o bezrozměrné číslo, které vychází z indexu lomu a sinu poloviny úhlu, který svírá osa objektivu se spojnicí krajního bodu čočky se středem pracovní vzdálenosti (Obr. 12).

$$NA = n \cdot \sin(\alpha) \quad (3)$$

S narůstajícím úhlem α projde do objektivu větší množství světla než u objektivů s menším úhlem, a tudíž více informací o prostředí. Je však důležité, aby vnikajícího světla nebylo příliš, poté dochází k přeexponování a ztrátě informací o objektu. Objektivy s vyšším číslem numerické apertury mají vyšší rozlišení. [14]



Obr. 12.: Příklad numerické apertury objektivů [14]

4.4. Rozlišovací schopnost objektivu

Jedná se o vzdálenost dvou bodů na objektu, které jsem ještě schopni od sebe rozlišit. Čím kratší je vzdálenost mezi detaily, tím je objektiv kvalitnější. Rozlišovací schopnost R závisí na numerické apertuře a vlnové délce světla.

$$R = \frac{0,61 * \lambda}{NA} \quad (4)$$

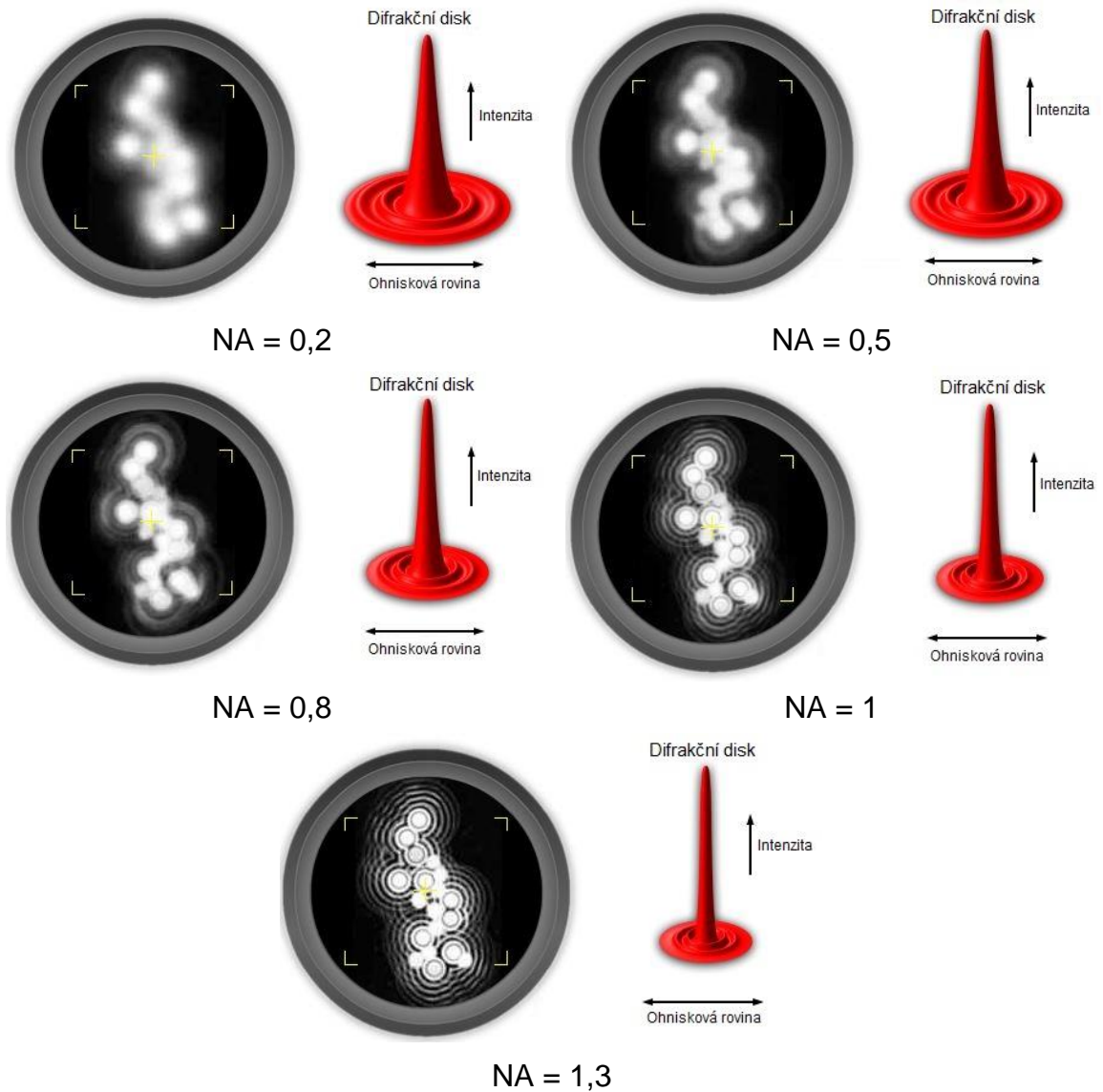
kde: R je nejmenší vzdálenost mezi body, které se dají rozlišit, λ je osvětlovací vlnová délka zdroje, NA je bezrozměrná numerická apertura.

Tabulka 1 ukazuje, že čím je osvětlovací vlnová délka menší, tím má objektiv lepší rozlišovací schopnost. [15]

Tabulka 1: Závislost vlnové délky na rozlišovací vzdálenosti [15]

Vlnová délka λ [μm]	360	400	450	500	550	600	650	700
Rozlišovací vzdálenost R [μm]	0,19	0,21	0,24	0,26	0,29	0,32	0,34	0,37

Obr. 13 znázorňuje rozlišovací schopnost závislou na numerické apertuře.



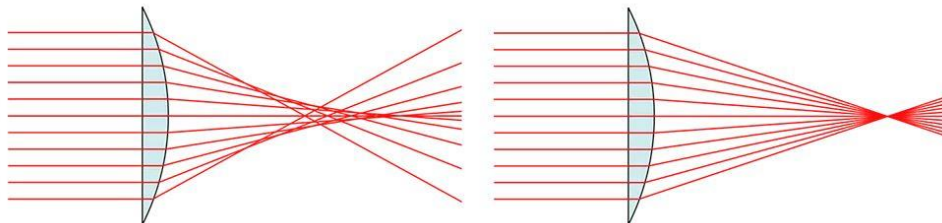
Obr. 13.: Rozlišovací schopnost závislá na numerické apertuře [15]

4.5. Vady optických soustav

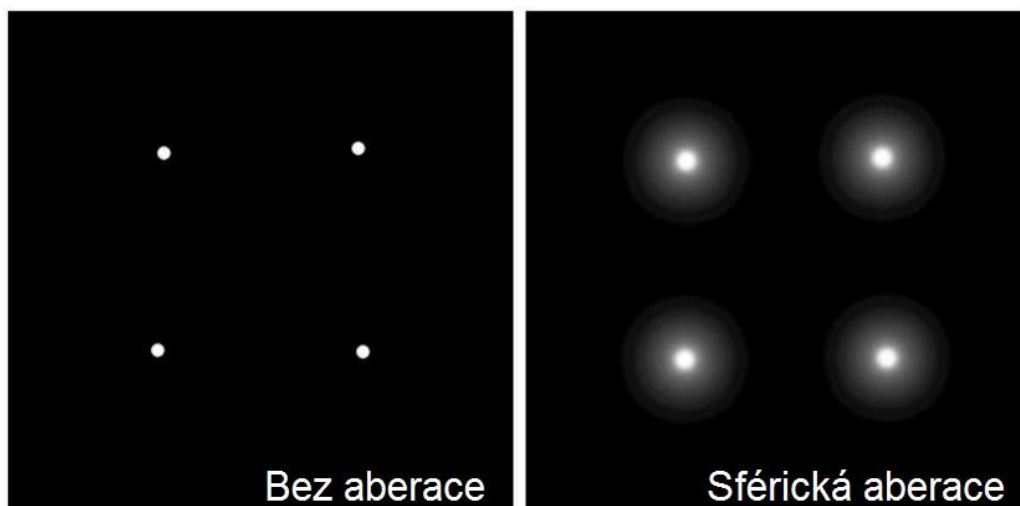
4.5.1. Sferická aberace

Sférická aberace (otvorová vada) je jednou z klasických osových vad světelných objektivů. Při dopadu svazku paprsků na konvexní nekorigovanou čočku dochází k lomu paprsků. Paprsky procházející v blízkosti středu čočky jsou ohýbány pouze nepatrně, zatímco paprsky na obvodu čočky jsou lomené více a na optické ose za čočkou vytvářejí řadu ohniskových bodů. Výsledkem je objekt s ostrým středem a postupně zesvětlujícími neostrými okraji. Objekt se zdá být rozmazaný. Toto je známé jako axiální sférická aberace. Jednou z hlavních příčin sférické vady je nesprávná délka tubusu mikroskopu, či přítomnost látky mezi objektivem a ohniskem, např. pozorovaným vzorkem, která má jiný index lomu.

Pokud je objektiv bez sférické aberace, všechny paprsky světla jsou směřovány do jedné ohniskové vzdálenosti a obraz je dokonale zaostřený. [16]



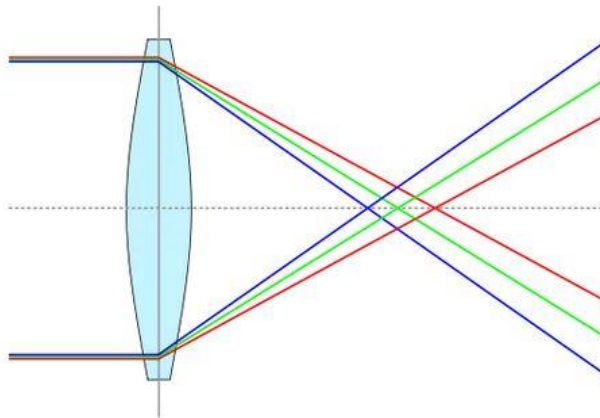
Obr. 14.: Sférická aberace[17]



Obr. 15.: Ukázka sférické aberace [18]

4.5.2. Chromatická aberace

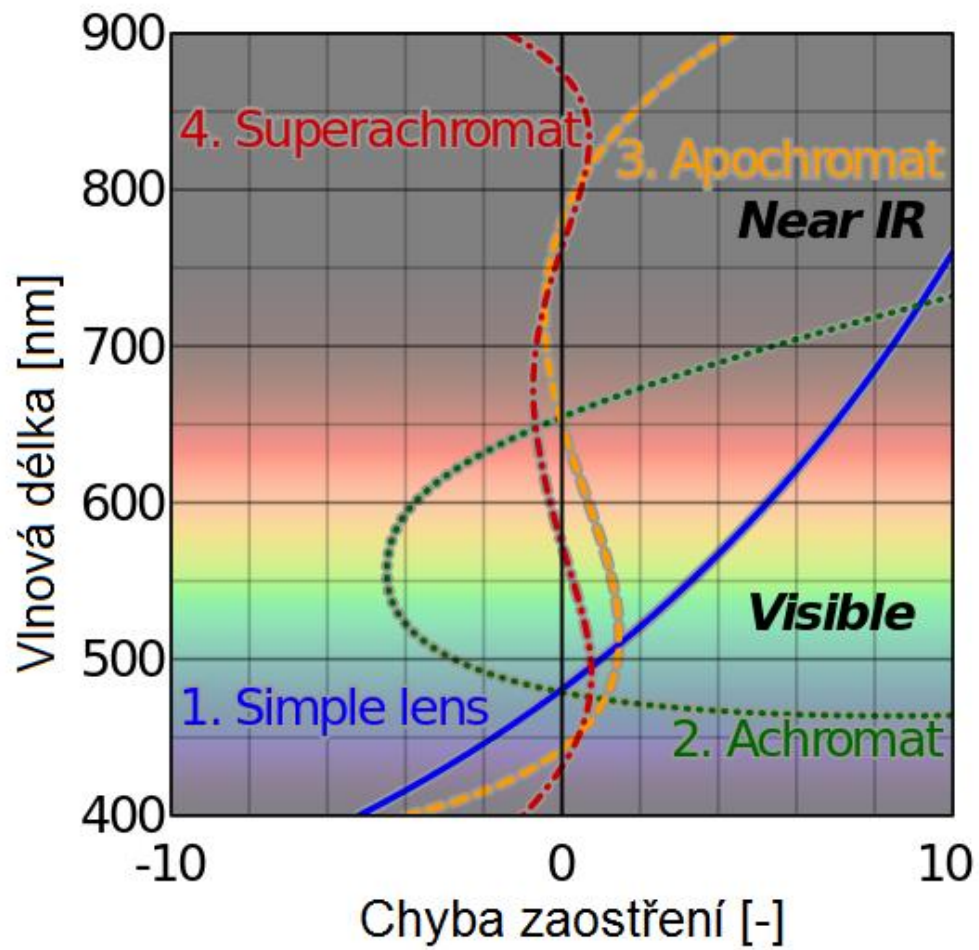
U chromatické aberace (barevné vady) dochází k disperzi světla, která je popsána v kapitole 3.4. Při dopadu bílého světla na plochu čočky dochází vlivem lomu k rozložení bílého světla na jednotlivé barvy podle vlnové délky. Ty dopadají na optickou osu v různých ohniskových vzdálenostech. Důsledkem této vady je bod o určité barvě, který je obklopen mezikružím jiných barev.



Obr. 16.: Chromatická vada [19]

Chromatické vady byly poprvé zkoumány v osmnáctém století, kdy John Dollond použil pro odstranění vad čočky s různým typem skla. V dnešní době je k dispozici velké množství druhů skel, díky nimž lze tyto vady eliminovat. Tím vznikají achromatické objektivy bez aberace, které dokáží zaostřit modré a červené vlnové délky do jedné ohniskové vzdálenosti. [16]

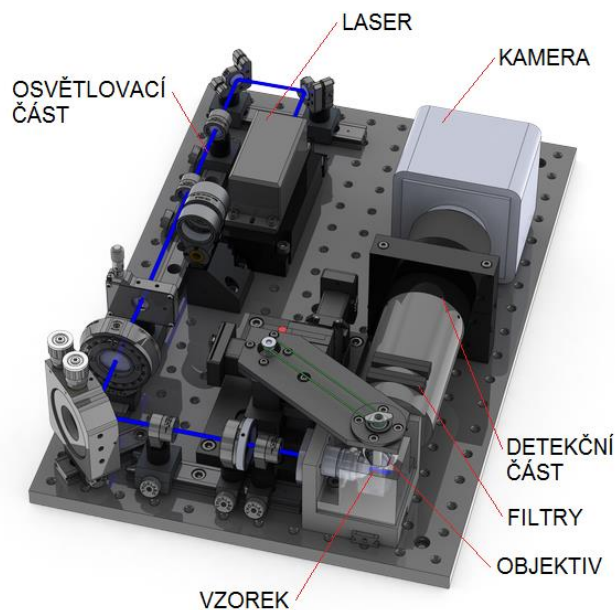
Na obrázku Obr. 17 je rozdělení objektivů podle počtu barev, které dokáží sjednotit na optické ose. Kolikrát průběh čáry dokáže protnout osu y v nule, tolik vlnových délek dokáže sjednotit. Nejjednodušší objektivy se používají pouze pro modrou barvu (na obrázku modrý průběh). Objektivy pro dvě barvy se nazývají achromatické a sjednocují modrou a červenou barvu (na obrázku zelený průběh). Další objektivy, u kterých je odstraněna barevná vada pro tři barvy, se nazývají apochromatické (žlutý průběh). Nejlepší objektivy pro čtyři barvy se nazývají superachromatické (červený průběh).



Obr. 17.: Rozdělení achromatických objektivů podle vlnové délky [20]

5. Mikroskop SPIM

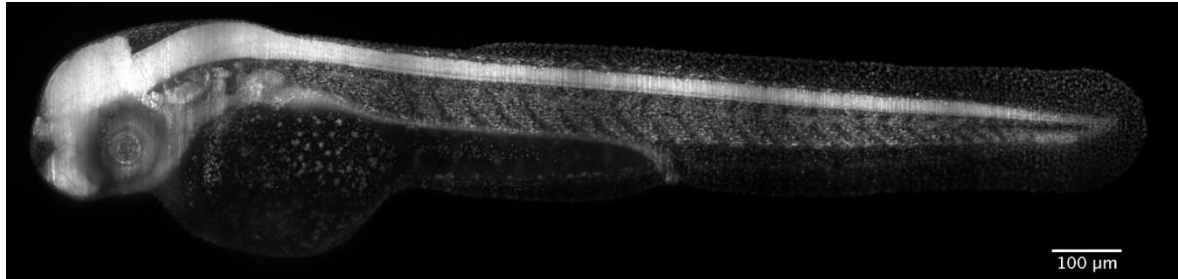
(Selective Plane Illumination Microscope) Jedná se o fluorescenční mikroskop osvětlující zkoumaný objekt tenkým paprskem koherentního světla (takzvaný light-sheet). Fluorescence patří do iluminačních procesů, v nichž citlivé molekuly emitují světlo vytvořené fyzikálním (absorbpcí světla), mechanickým (třením), nebo chemickým mechanismem. Generování molekul ultrafialovými, nebo viditelnými fotony se nazývá fotoluminiscence. Ta je dále rozdělena do dvou kategorií, fluorescence a fosforescence. Fluorescence je vlastnost atomů a molekul absorbovat světlo o určité vlnové délce a poté v krátkém intervalu (10^{-8} s) vydávat světlo o delší vlnové délce (Stokesův posuv). Dříve se pro emitaci molekul využívaly rtuťové výbojky, dnes jsou nahrazeny spíše LED diodami. Také se začaly využívat lasery pro jejich neinvazivní vlastnosti, zejména argonové s emisní schopností 488 a 514 nanometrů. [22]



Obr. 18.: Mikroskop SPIM [21]

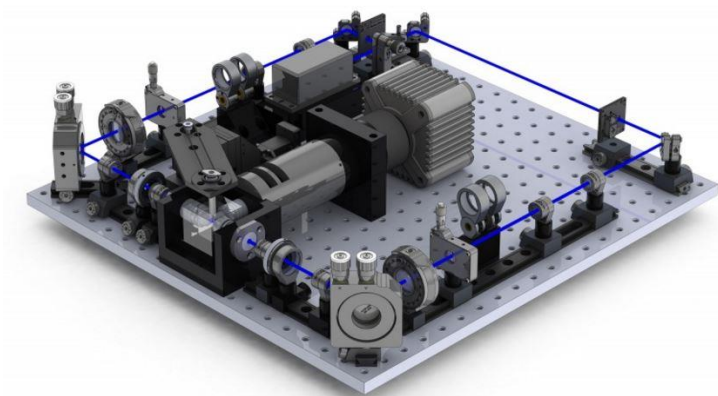
Mikroskop je modulární, skládající se z několika součástí uchycených na základní desce. Je vhodný pro velký rozsah vzorků, od několika desítek mikrometrů až po několik milimetrů. Fluorescenční mikroskop se využívá hlavně v přírodních vědách a medicíně. Zkoumají se tkáně, embrya, části buněk či bílkoviny. Využívá se zde neinvazivní a nedestruktivní proces zobrazení živých organismů. Živé vzorky, zejména vyvíjející se embrya, jsou velmi citlivé na vystavení světlu. SPIM je určen pro jemné zobrazení citlivých vzorků nebo vzorků s rychlým biologickým procesem. Vzorek je osvětlen pouze v jedné rovině a detekován v rovině kolmé.

Přesunem či pootočením vzorku v rovině světelného paprsku můžeme zaznamenat 3D vyobrazení vzorku. Umožňuje kontinuální snímání v řádu několika hodin v reálném čase. Dosahuje se vysoké ostrosti při velké hloubce prozáření



Obr. 19.: Zebrafish v projekci mikroskopu [23]

Mikroskop se vyskytuje v modifikovaných variantách sestavení. Například v laboratoři Neurobiologie v Nencki institutu experimentální biologie v polské Varšavě používají pro osvětlení vzorku hned dvě excitační cesty. Technologie luminiscenční mikroskopie však vyvíjejí i světové firmy v oblasti optiky, jako jsou Zeiss, Nikon či Leica. Technických modifikací je mnoho, vždy je však základem excitační cesta a na ní o 90° otočená detekční cesta.



Obr. 20.: Mikroskop SPIM s dvěma excitačními cestami [23]



Obr. 21.: SPIM umístěný v přenosném kufříku [23]

5.1. Excitační část

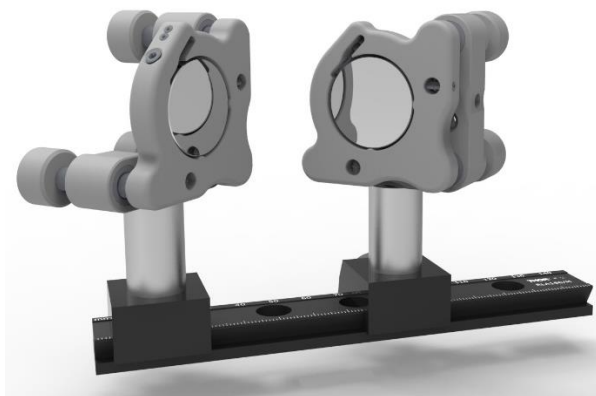
Všechny součásti jsou uchyceny na základní desce o rozměrech 400 x 400 mm. Otvory pro uchycení jsou M6 s roztečí 25mm.



Obr. 22.: CUBE Laser od firmy Coherent [24]

Jako zdroj tenkého paprsku světla mikroskopu SPIM je použit CUBE Laser od firmy Coherent. Laser je zdrojem koherentního světla o vlnové délce 490 nm a výkonu 50 mW. Laser přeměňuje dodávanou energii na elektromagnetické záření. Tento laser používá pro emitaci paprsku luminiscenční diody. Průměr paprsku je 1,3 mm.

Za výstupem ze zdroje laseru jsou použita dielektrická zrcadla pro usměrnění optického paprsku. Výběrem typů a tloušťek dielektrického povlaku lze navrhnout vrstvu s různou reflexivitou pro různé vlnové délky. Na Obr. 23 je zrcadlo vloženo v nastavitelném držáku a uchyceno na kolejnici, díky níž můžeme nastavovat vzdálenost. Dielektrická zrcadla jsou od firmy Thorlabs, s označením BB1-E02 - Ø1" Broadband Dielectric Mirror, 400 - 750 nm.



Obr. 23.: Dielektrická zrcadla umístěná na posuvné kolejnici

Achromatické dublety se používají pro řízení chromatické aberace (viz. kapitola 4.5.2). Dublety jsou navrženy tak, aby poskytovaly téměř konstantní ohniskovou vzdálenost. V případě mikroskopu SPIM, kde je monochromatické světlo, se využívají dublety jako beam expandery (zvětšování paprsku).

Účelem tohoto jednoduchého teleskopu je zvětšení paprsku, např. z 1 mm na 2 mm. Tohoto je docíleno umístěním dvou dubletů za sebou, z nichž první má ohniskovou vzdálenost $f_1 = 25\text{ mm}$ (AC127-025-A-ML of firmy Thorlabs) a druhý je umístěný ve vzdálenosti 75 mm od prvního s ohniskovou vzdáleností $f_2 = 50\text{ mm}$ (AC127-050-A-ML).

Dalším prvkem v ose paprsku je mechanicky nastavitelná štěrba VA100/M od firmy Thorlabs (Obr. 24), díky níž můžeme nastavovat šířku paprsku od 0 do 6 mm. Pohybující se ocelové čepele jsou černé pro co nejmenší odrazivost. Štěrba se nastavuje pomocí mikrometrického posuvu pro zúžení a dosažení požadované tloušťky paprsku.



Obr. 24.: Nastavitelná štěrba VA100/M [25]

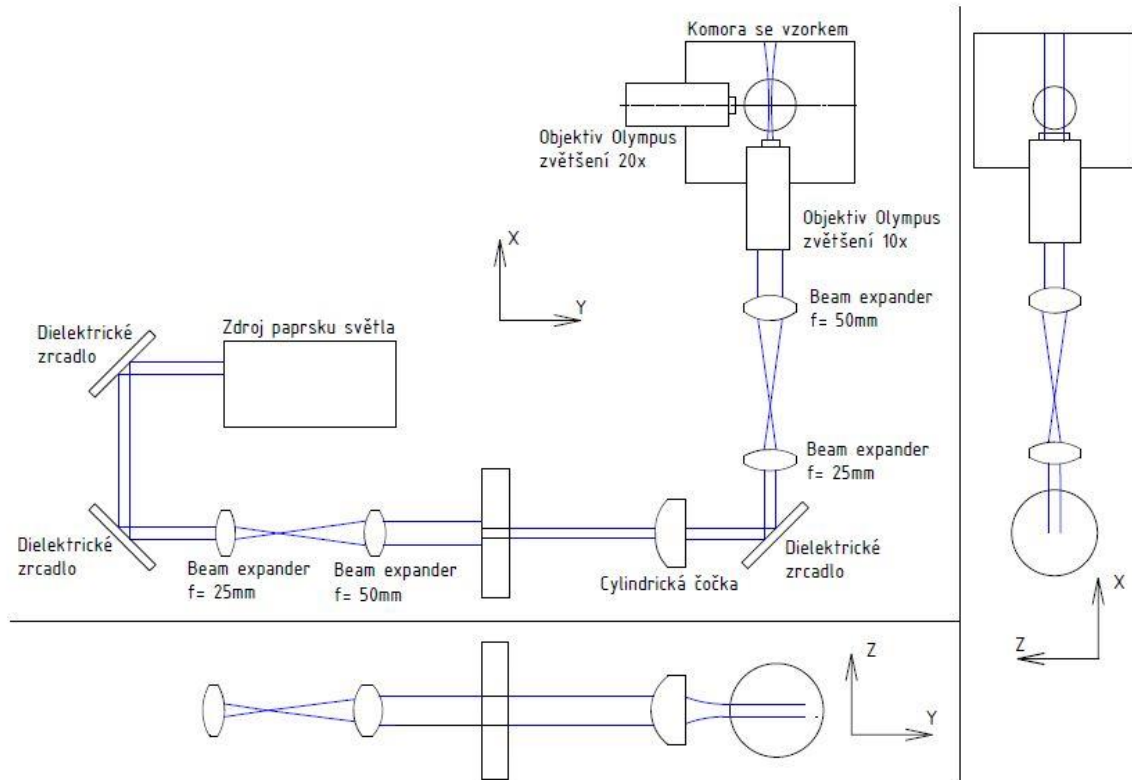


Obr. 25.: Otočný držák pro cylindrickou čočku [26]

Další součástí v ose excitace je cylindrická čočka ACY254-050-A s ohniskovou vzdáleností $f = 50\text{ mm}$, uchycená v otočném držáku. Ta je základem pro vznik light-sheetu. Cylindrická čočka zaostřuje rozšířený paprsek na tenkou vodorovnou čáru. To způsobuje, že v místě vzorku, kde je kolmo na paprsek zaostřen detekční objektiv, je proud světla nejvíce zúžený.

Dalšími částmi jsou opět dielektrické zrcadlo pro usměrnění paprsku a další sada beam expanderů pro rozšíření paprsku.

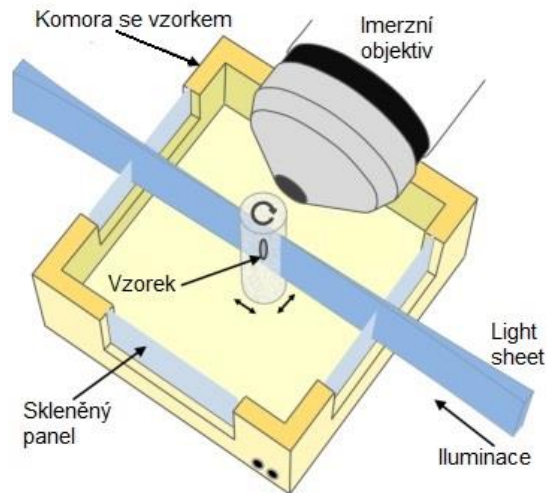
Na Obr. 26 je graficky znázorněn průběh paprsku od zdroje přes průchod jednotlivými čočkami až po vniknutí do komory se vzorkem.



Obr. 26.: Změna tvaru paprsku průchodem excitační částí

5.2. Komora se vzorek

Zkoumané vzorky se umísťují do průhledné komory z plexiskla (Obr. 27). Na jedné straně komory se nachází objektiv Olympus UMPLFLN 10XW se zvětšením 10x, skrz který vstupuje paprsek do komory a osvětluje vzorek. Komora je uchycena na dvouosém posuvném stolku s mikrometrickým posuvníkem. Vzorky jsou vloženy do skleněných trubiček, používaných k inzulinové injekci, a celá trubička je zachycena na elektricky poháněné plošině 4D USB STAGE od firmy Picard Industries, která umožňuje přímočarý pohyb ve třech osách a rotaci kolem svislé osy. Rotaci je zajištěno otáčení vzorku a zkoumání jeho struktury ve 3D zobrazení. Celá komora i se vzorkem je ponořena v kapalině o určitém indexu lomu. Kolmo na laserový paprsek je nasměrován imerzní objektiv, který zvětšuje vzorek, a jeho snímaný obraz je přenášen na čip kamery. Vodotěsnost kolem objektivu zajišťuje O-kroužek.



Obr. 27.: Komora se vzorkem [27]

5.3. Detekční část

V detekční části je obraz snímán a přenášen na obrazové zařízení. Kolmo na paprsek je umístěn detekční zvětšovací objektiv Olympus UMPLFLN 20XW. Dále obraz prochází skrz dva filtry, které jsou uchyceny v tubusu. Jeden je s pásmovou propustí (propustí pouze vlny o určité vlnové délce) a druhý je neutrální (slouží ke snížení jasu, aby nedopadalo na snímač kamery příliš mnoho světla). Za tubusem s filtry je vložen pro vedení zvětšeného obrazu tubusová čočka U-TLU od firmy Olympus. Dále je vložen kamera C-mount U-TV0.5XC-3 se zvětšením 0,5x, který usměřňuje světlo na snímač kamery. Poslední částí celého mikroskopu je kamera iXon3 897 od firmy Andor s modelovým číslem DU-897D-C00-#BV. Kamera má senzor EMCCD s velikostí pixelů 16 x16 μm a s aktivními pixely 512 x 512. [28]

6. Přesná mechanika

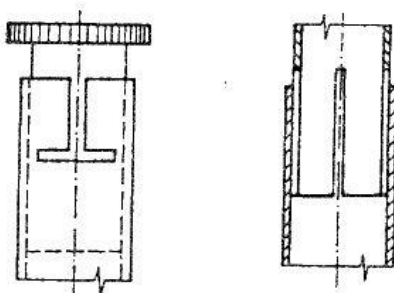
Přesná mechanika se zabývá stavbou jemných konstrukcí, přesných přístrojů a zařízení využívajících zejména v laboratorních a výzkumných podmínkách. Je úzce spjata se strojírenstvím a optikou. Hlavním znakem jemné mechaniky je přesnost. Oproti klasické mechanice nebývá kladený důraz na pevnost materiálu. V přesné mechanice je důležitá přesná obrobitelnost materiálu a jeho rozměrová a tvarová stálost. Například válcovité čepy moderních theodolitů jsou v ložisku lícovány s přesností 1 mikronu. [31]

6.1. Technická řešení posunů

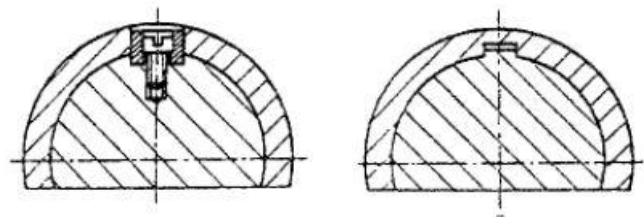
6.1.1. Přímá vedení kluzná

Přímá vedení můžeme definovat jako dvě součásti, které vůči sobě vykonávají relativní pohyb po stanovené dráze. Rozdělují se na vedení uzavřená, u kterých může síla působit v jakémkoliv směru, a vedení otevřená.

U kluzného vedení dochází ke smykovému tření mezi pevnou částí (kolejnicí) a pohyblivou částí (saněmi) vlivem vůle mezi touto kinematickou dvojicí. U kluzného vedení musíme zabránit vzpříčení vedené součásti. Na vzpříčení má vliv směr, velikost a poloha síly, na délce vedení a součinitelé tření. Mezi nejjednodušší kluzná vedení patří uzavřená válcová vedení. Lze s nimi dosáhnout relativně dobré přesnosti a jsou ekonomicky výhodná. Využívají se trubky, kterými lze dosáhnout dobré válcovitosti. Toto uložení lze použít pouze v případech, kde je užitečný rotační pohyb v ose vedení Obr. 28. Nemá-li se pohyblivá část otáčet, musíme jí v pohybu zabránit kolíky, šrouby či rovinnými plochami Obr. 29. Nejčastěji se používá trubek mosazných. Tento typ se používá u nejmenších hodinářských soustruhů. [29] [30]

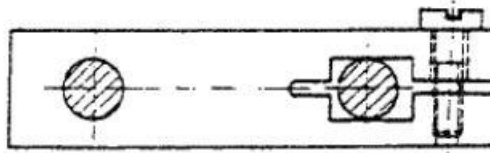


Obr. 28.: Válcová vedení s rotací [29]



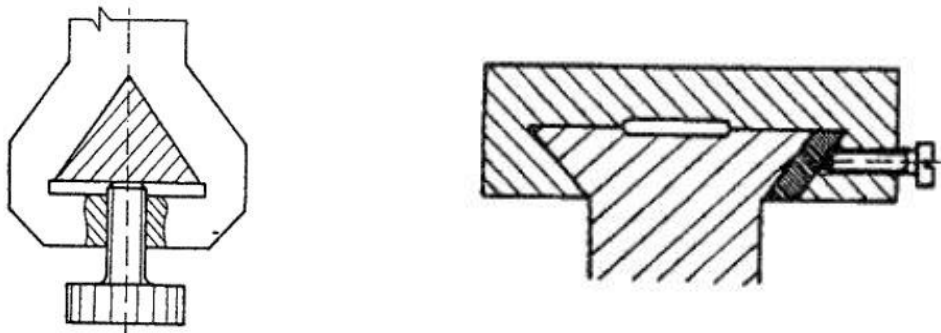
Obr. 29.: Válcová vedení bez rotace [29]

Pro zachycení větších sil se používá místo jednoduchého vedení dvojitě. Aby však zde nedocházelo k zvyšování třecích sil vlivem nepřesnosti výroby, je těsně uložena pouze jedna strana vedení a druhá strana je uložena na volno a slouží jenom jako podpěra k zachycení momentu Obr. 30.



Obr. 30.: Dvojitě válcové vedení [29]

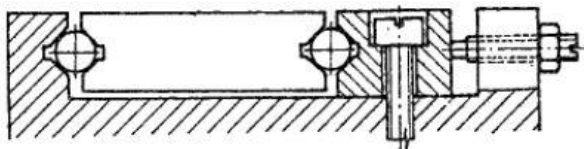
Další typ vedení lze získat pomocí rovinných ploch, které se dají vyrobit s velice velkou přesností. Do této kategorie patří trojúhelníkové nebo rybinové (prizmatické) vedení. Pro vymezení boční vůle se používají šrouby, nebo stavěcí kolíky. Úhel rybinového vedení je mezi 50° - 55° a drážka se vyrábí úhlovou frézou. [29] [30] [31]



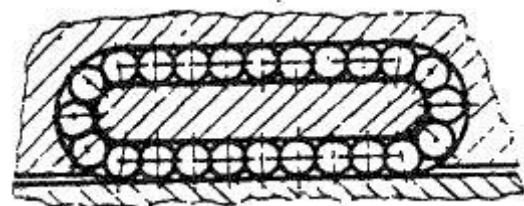
Obr. 31.: Trojúhelníkové a rybinové vedení [29]

6.1.2. Přímá vedení valivá

Vzájemný pohyb dvou součástí je u valivého vedení zajištěn vložením dalšího valivého elementu (kuličky nebo válečky) mezi pohyblivé části. Ty mají velice malý třecí odpor a velkou přesnost. Prizmatické drážky se používají pro větší tuhost a zachycení větších sil. Dvojitě valivé vedení je buď otevřené, nebo uzavřené se stavěcím šroubem pro uzavření.

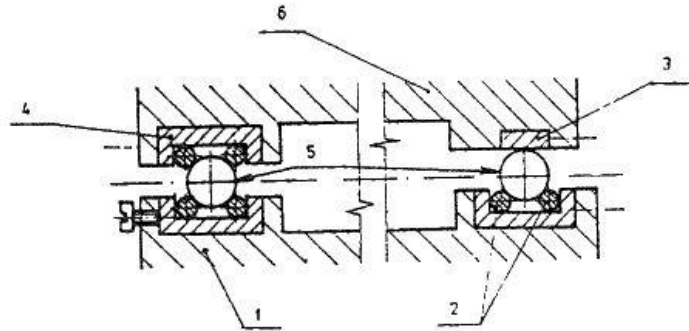


Obr. 32.: Valivé vedení otevřené [29]




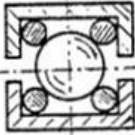

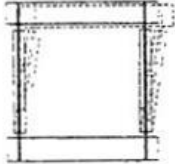
Obr. 33.: Valivé vedení uzavřené [29]

Vedení i kuličky jsou vyráběny z legované kalené oceli. Pro delší vedení se využívá pouze legovaných pouzder. Tato vedení se využívají pro posuvné stoly mikroskopických zařízení. [30]



Obr. 34.: Valivé vedení s pouzdem [29]

Na Obr. 35 je srovnání přímých vedení podle parametrů, jako jsou zatížení, součinitel tření, rozsah pohybu i cena.

Parametr	Přímá vedení			
	rybinová	kuličková-drátová	válečková-křížová	přibližná-s pružinovými klouby
				
Součinitel tření	Vysoký (0,25 až 0,35)	Nízký (0,002)	Nízký (0,003)	Není
Tuhost	Vysoká	Nízká	Vysoká	Vysoká
Zatížení	Vysoké	Nízké	Vysoké	Vysoké
Rozsah pohybu	Velký	Střední (<400 mm)	Střední (< 400 mm)	Malý (1 až 2 mm)
Odolnost proti znečištění	Vysoká	Střední	Malá	Velmi vysoká
Cena	Nízká	Střední	Vysoká	Střední

Obr. 35.: Porovnání přímých vedení [29]

6.2. Technická řešení rotací

6.2.1. Otočná uložení

Otočná uložení volíme podle zatěžující síly, velikosti tření, počtu otáček. Rozdělují se na kluzná a valivá. Kluzná uložení se používají pro otáčky s menší frekvencí. Hlavními prvky jsou čep a pánev se vzájemným uložením s vůlí. Využívají se materiály s dobrými mazacími vlastnostmi, jako jsou bronz nebo mosaz. U kluzných uložení by mělo docházet k pravidelnému mazání součástí buď kapalným olejem, nebo nánosem tenkého filmu pevného maziva. Oproti valivým uložení mají menší rozměry. V dnešní době se čím dál častěji využívají plastová kluzná ložiska, která již umožňují velké zatěžující síly a mají nízký třecí odpor. Jsou levná, mají odolnost proti korozi a dají se použít pro teploty stálého zatížení 300°C. Díky přídavným aditivům existuje mnoho druhů s různými vlastnostmi.

Valivá ložiska se rozdělují podle valivých elementů (kuličky, válečky, jehličky, soudečky, atd.), směru zatěžující síly (axiální, radiální, s kosoúhlým stykem), velikosti zatěžující síly (jednořadá, dvouřadá). I když se výrobní nepřesnosti jednotlivých elementů sčítají, i tak mohou být dnešní ložiska prakticky bezvůlová. Ložiska pro běžné použití se mohou vybírat podle katalogových listů jednotlivých výrobců a bývají zvolena podle vypočtené doby trvanlivosti,

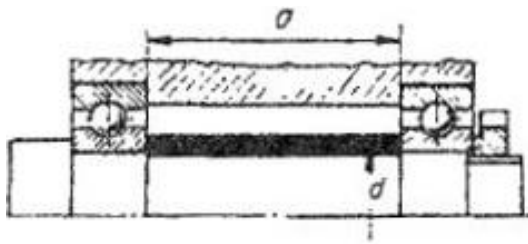
$$L_n = \frac{10^6}{60 * n} * \left(\frac{C}{F_{ekv}}\right)^m \quad (5)$$

kde: L je trvanlivost ložisek [hod], C je dynamická únosnost [N], F_{ekv} je ekvivalentní síla zatížení ložiska [N], n je počet otáček za minutu [ot/min], m je exponent (m=3 pro bodový styk, m=10/3 pro čárový styk),

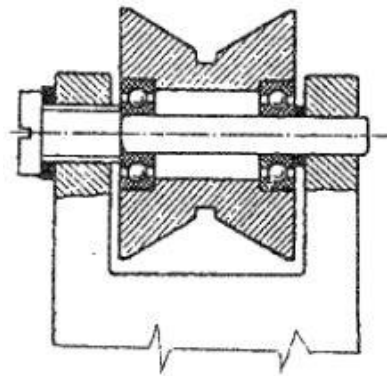
$$F_{ekv} = X * F_r + Y * F_a \quad (6)$$

: F_r je radiální síla, F_a je axiální síla, X a Y jsou součinitelé pro radiální a axiální zatížení. [30]

Pro nejpresnější uložení se používají různé techniky pro vymezení vůle ložiska v náboji či skříni. Na Obr. 36 je vymezení axiální vůle vnějších nebo vnitřních kroužků. Distanční trubky (na obrázku vyčerněná) musí být o něco menší než rozměr a, aby došlo při dotažení ložisek k posunu kroužků. Další způsob vymezení vůle je přibroušení podložky pod hlavou šroubu (Obr. 37). [29]



Obr. 36.: Vymezení vůle posunutím ložiskových kroužků [29]



Obr. 37.: Vymezení vůle přibroušením podložky [29]

6.2.2. Předpětí ložisek

Dalším používaným způsobem pro vymezení vůle je radiální předpětí ložisek, které se vyvolává přídatnou silou, a dochází tak k záporné vnitřní vůli. Předpětí zvyšuje tuhost, snižuje hlučnost, zlepšuje přesnost chodu a prodlužuje životnost ložisek. Jelikož je působení na ložiska v axiálním směru, je nutné, aby se použila ložiska, která zachycují i tuto sílu (kuželíková, s kosoúhlým stykem). Pouze u radiálních ložisek by muselo axiální sílu zachycovat druhé ložisko. Při návrhu předpětí se musí dbát na to, aby nedošlo k překročení optimální hodnoty. Pokud by došlo k překročení hodnoty, v ložisku by se zvýšila třecí síla a tím by došlo k nárůstu teploty, čímž by se snížila životnost ložisek. Aby nedošlo při předpětí k úplnému odlehčení jednoho ložiska při zatížení druhého ložiska větší silou, je potřeba zajistit osové předpětí F_0 . [31]

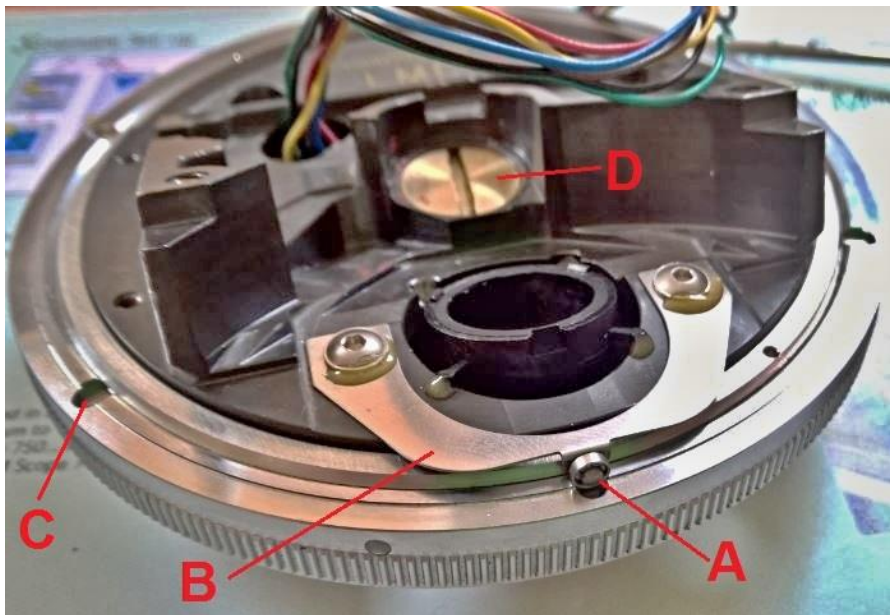
$$F_0 = \frac{K_a * C_B}{(C_a + C_B)} \quad (7)$$

kde: K_a je vnější zatěžující síla [N], C_a a C_b jsou tuhosti ložisek. [32]

6.2.3. Technická řešení revolverových hlav

Pro větší přehled, jak jsou revolvery konstruované a z jakých materiálů se skládají, mi bylo umožněno Fyziologickým ústavem Akademie věd rozebrání dvou vyřazených revolverů používaných na moderních mikroskopických přístrojích. Jednalo se o revolverové hlavy od firmy Leica a Nikon. Po odstranění vnějšího krytu revolveru Leica (Obr. 38) bylo patrné, že nastavování pozic jednotlivých objektivů je

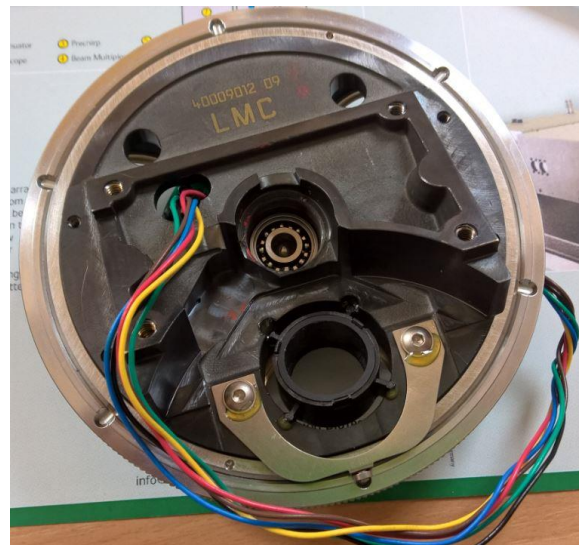
zajištěno pomocí malého kuličkového ložiska (A), které je přitlačováno pružným plechem (B) a dosedá do přesných oblých drážek (C).



Obr. 38.: Revolverová hlava Leica- detail na aretační ložisko



Obr. 39.: Revolverová hlava Leica- pohled
zpředu



Obr. 40.: Revolverová hlava Leica- pohled
zezadu

Revolverová hlava s otvory pro objektivy je otočně uchycena k základní části na kuličkovém ložisku (viděno na Obr. 40). Ložisko je poté seshora staženo měděným šroubem (D) a tím jsou ložisku odstraněny vůle.

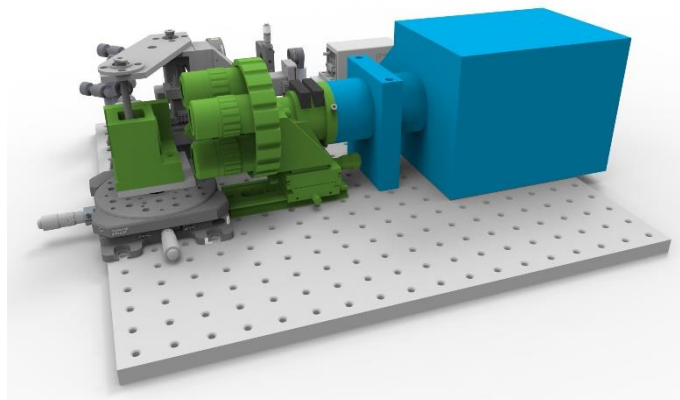
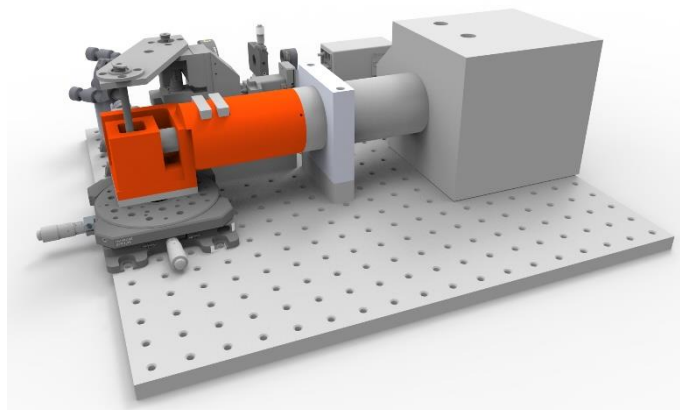
Obě hlavní části revolveru jsou vyrobené z oceli. Důraz je kladen na co nejvyšší tuhost, aby při zkoumání vzorku nijak neovlivňovaly výsledek měření a dále na vzájemnou polohu osy objektivu a osy tubusu mikroskopu.

7. Konstrukční návrh

Při navrhování konstrukčního řešení jsem vycházel z teoretických poznatků výše zmíněných v jednotlivých kapitolách a také z řešení moderních mikroskopů a jejich součástí. Úskalím zde byl malý zástavbový prostor, do kterého jsem musel revolver s objektivy umístit. To se neobešlo bez některých změn, které jsem musel na mikroskopu provést.

7.1. Výchozí konstrukční řešení

Nejdříve jsem se na stránkách <http://openspim.org/> seznámil s parametry mikroskopu a jednotlivých součástí a podle příslušného návodu jsem v programu Creo Parametric 2 sestavil model mikroskopu. Na Obr. 41 jsou červeně označené součásti, které jsou odstraněny a již se používat nebudou, modré součásti, které byly ze svého původního místa posunuty a zelené součásti, které byly nově vytvořeny.



Obr. 41.: Stav mikroskopu v původním stavu (horní obrázek), po přidání revolverové hlavy (dolní obrázek)

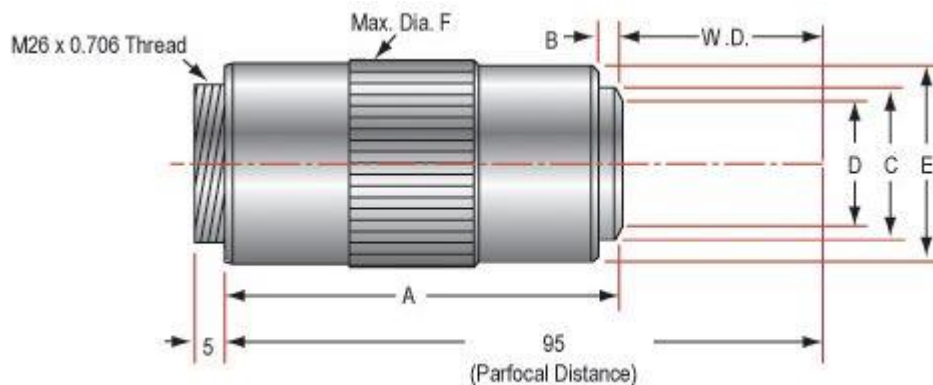
7.2. Použité objektivy

Objektivy používané pro práci na mikroskopu SPIM jsou tři suché a jeden imerzní. Suché objektivy od firmy Mitutoyo mají dlouhou pracovní vzdálenost. Všechny objektivy jsou Plano Apochromats, mají tedy barevnou vadu korigovanou na tři barvy (červená, modrá, žlutá). Tabulka 2 zahrnuje parametry jednotlivých suchých objektivů a rozměry, které jsou vyznačeny v Obr. 42.

Tabulka 2: Parametry objektivů Mitutoyo [33]

Zvětšení	Mitutoyo		
	2x	5x	10x
Numerická apertura (NA)	0.055	0.14	0.28
Hloubka ostrosti [μm]	91	14	3.5
Zobrazovací pole, 1/2" senzor [mm]	3,2 x 2,4	1,28 x 0,96	0,64 x 0,48
Ohnisková vzdálenost [mm]	100	40	20
Maximální průměr [mm]	34	34	34
Rozsah vlnových délek [nm]	435 - 655	435 - 655	435 - 655
Hmotnost [g]	220	230	240
Pracovní vzdálenost	34	34	33.5

Rozměry [mm] :			
A	61	61	61
B	1,4	1,6	0
C	27,5	25	28,2
D	24,7	24	28,2
E	32,2	32,2	32,2

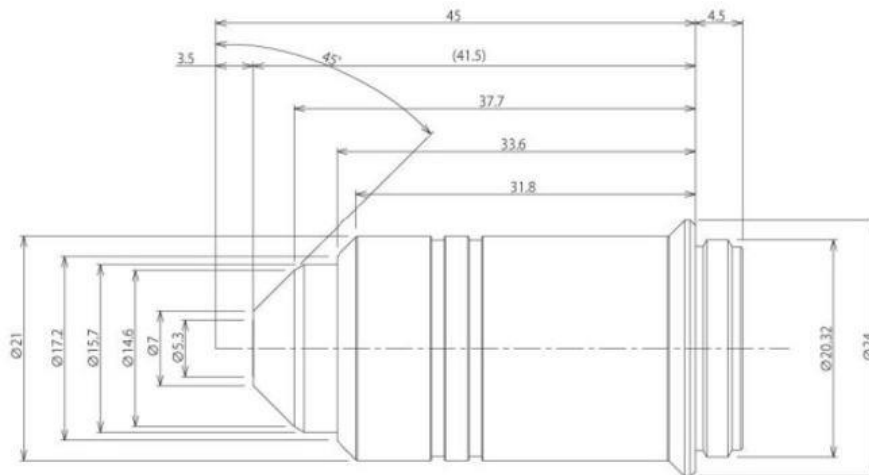


Obr. 42.: Rozměry objektivů Mitutoyo [33]

Imerzní objektiv je od firmy Olympus s označením UMPLFLN 20XW. Rozměry tohoto objektivu jsou na Obr. 43.

Tabulka 3: Parametry objektivu Olympus UMPLFLN 20XW [34]

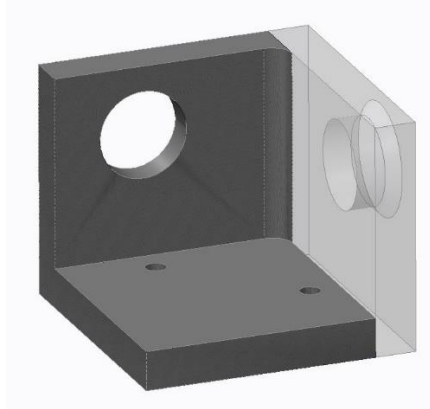
Zvětšení	Pracovní vzdálenost (WD) [mm]	Numerická apertura (NA)	Typ závitů	Hmotnost [g]
20x	3,5	0,5	W 20,32 x 0,706	70



Obr. 43.: Rozměry imerzního objektivu Olympus UMPLFLN 20XW [34]

7.3. Korekce lomu světla

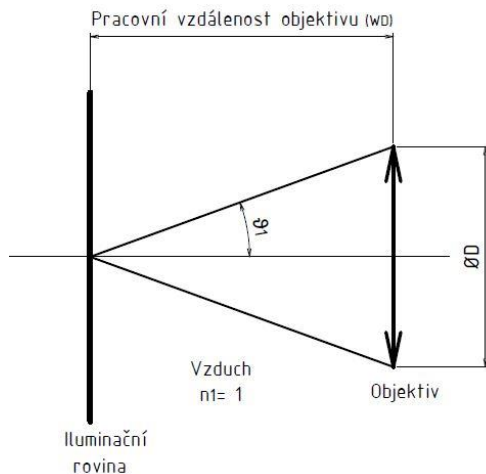
Již při prvním umístění objektivů Mitutoyo v modelu do jejich pracovní pozice dochází ke kolizi mezi objektivy a přepážkou komory, na které je uchycený stávající imerzní objektiv. Protože bude objektiv umístěn na revolveru, není již přepážka potřebná a po konzultaci se zadavatelem práce jsme se dohodli na vyrobení nové komory bez přepážky. Výkres nové komory je v Příloze 1.



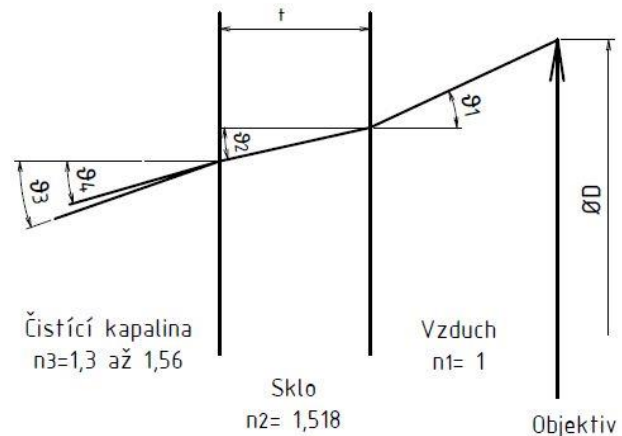
Obr. 44.: Odstranění stěny držáku komory

Prvotně jsem se při návrhu zabýval použitím suchých objektivů a jejím ovlivněním lomu světla při průchodu krycím sklem komory a kapalinou, abych mohl určit, v jakém rozmezí se bude revolver pohybovat. Krycí sklo komory má tloušťku 1,2 mm a jeho index lomu je $n = 1,518$. Dále světlo prochází skrz čisticí kapalinu, která má index lomu v rozmezí podle používaných kapalin od 1,3 při použití vody po 1,56 pro kapalinu dichloromethan / dibenzylether. Další používané čisticí kapaliny jsou v Příloze 2.

Na Obr. 45 je znázorněn suchý objektiv v pracovní vzdálenosti, jak vypadá kužel paprsku světla, který dopadá na vnější čočku pod úhlem ϑ_1 , když v cestě paprsku není krycí sklo. Na Obr. 46 je detail lomu světla v krycím skle a dále v čisticí kapalině o různém indexu lomu.



Obr. 45.: Lom vzduchem u suchého objektivu bez překážky



Obr. 46.: Lom světla v krycím skle a čisticí kapalině

Korekce objektivu Mitutoyo 2x :

- Úhel dopadajícího světla na sklo (úhel světla procházejícího pouze vzduchem):

\varnothing vnější čočky objektivu $D = 24,7$ mm

Pracovní vzdálenost objektivu $WD = 34$ mm

$$\vartheta_1 = \arctg\left(\frac{\varnothing D}{2 WD}\right) = \arctg\left(\frac{24,7}{34}\right) = 19,96^\circ$$

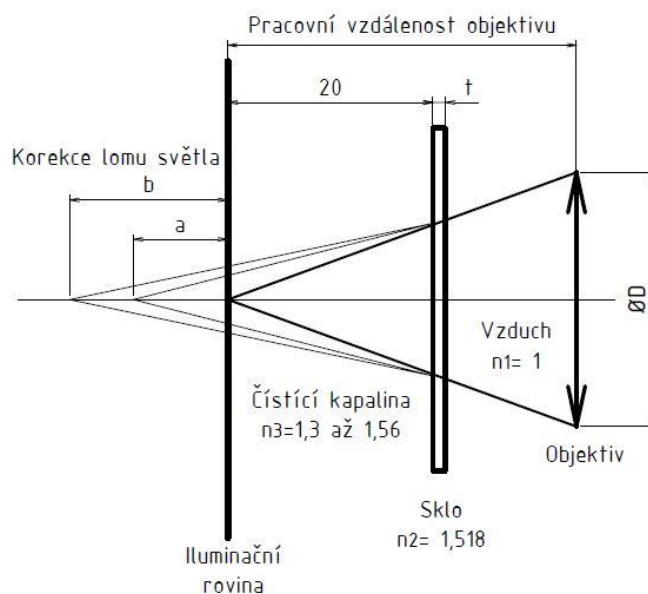
- Úhel lomu světla v krycím skle (použití vzorce 2):
Index lomu světla vzduchu $n_1 = 1$, krycího skla $n_2 = 1,518$

$$n_1 * \sin(\vartheta_1) = n_2 * \sin(\vartheta_2)$$

$$\frac{n_1}{n_2} * \sin(\vartheta_1) = \sin(\vartheta_2)$$

$$\frac{1}{1,518} * \sin(19,96) = \sin(\vartheta_2)$$

$$\vartheta_2 = 12,99^\circ$$



Obr. 47.: Korekce objektivů Mitutoyo

- Korekce při použití čisticí kapaliny vody:

Index lomu světla vody $n_3 = 1,3$

Tloušťka skla $t = 1,2$ mm

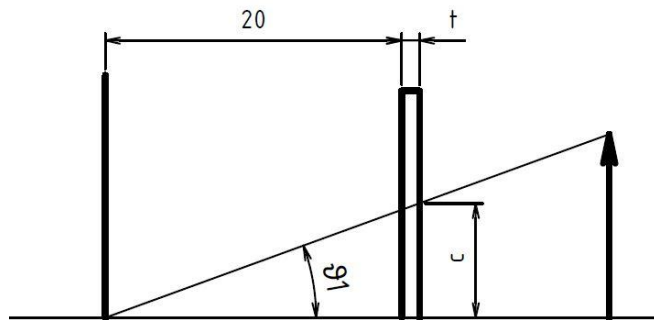
$$n_2 * \sin(\vartheta_2) = n_3 * \sin(\vartheta_3)$$

$$\frac{n_2}{n_3} * \sin(\vartheta_2) = \sin(\vartheta_3)$$

$$\frac{1,518}{1,3} * \sin(12,99) = \sin(\vartheta_3)$$

$$\vartheta_3 = 15,21^\circ$$

- Výpočet vzdálenosti a podle Obr. 48 pomocí goniometrických funkcí:

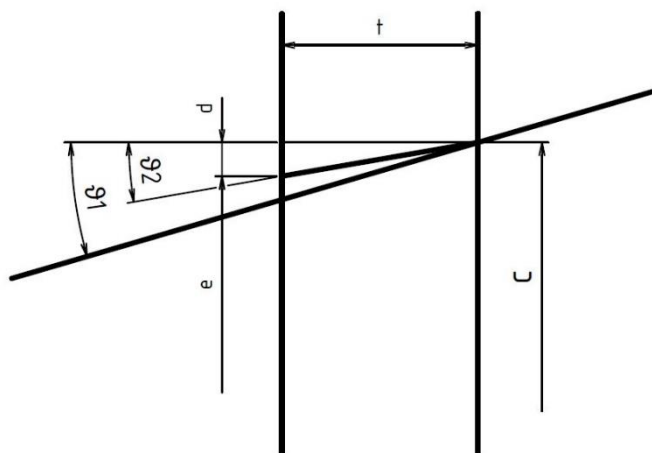


$$\sin(\vartheta_1) = \frac{c}{20 + t}$$

$$c = (20 + t) * \sin(\vartheta_1)$$

$$c = (20 + 1,2) * \sin(19,96)$$

$$c = 7,237\text{mm}$$



$$\text{tg}(\vartheta_2) = \frac{d}{t}$$

$$d = \text{tg}(\vartheta_2) * t$$

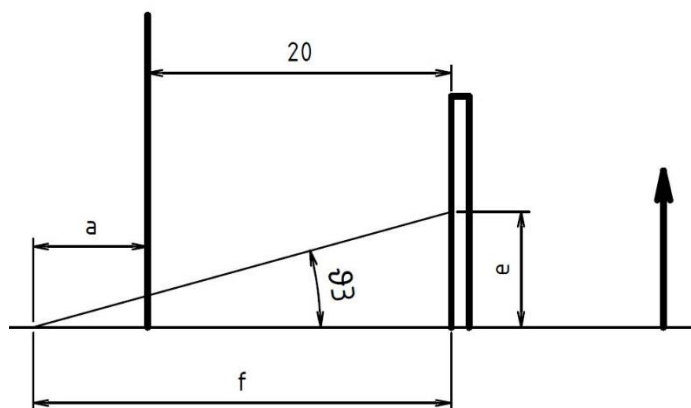
$$d = \text{tg}(12,99) * 1,2$$

$$d = 0,277\text{mm}$$

$$e = c - d$$

$$e = 7,237 - 0,277$$

$$e = 6,96\text{mm}$$



$$\text{tg}(\vartheta_3) = \frac{e}{f}$$

$$f = \frac{e}{\text{tg}(\vartheta_3)}$$

$$f = \frac{6,96}{\text{tg}(15,21)}$$

$$f = 25,6\text{mm}$$

$$a = f - 20$$

$$a = 25,6 - 20$$

$$a = 5,6\text{mm}$$

Obr. 48.: Schémata pro výpočet korekce lomu světla

Při použití čisticí kapaliny vody je posunutí objektivu z důvodu lomu světla $a = 5,6\text{mm}$.

- Dále stejný postup výpočtu pro čisticí kapalinu s nejvyšším indexem lomu:
Index lomu dichloromethan / dibenzylether $n_4=1,56$

$$n_2 * \sin(\vartheta_2) = n_4 * \sin(\vartheta_4)$$

$$\frac{n_2}{n_4} * \sin(\vartheta_2) = \sin(\vartheta_4)$$

$$\frac{1,518}{1,56} * \sin(12,99) = \sin(\vartheta_4)$$

$$\vartheta_4 = 12,63^\circ$$

Při použití kapaliny dichloromethan / dibenzylether je posunutí $b= 11,06\text{mm}$.

Tabulka 4 obsahuje korekce dalších suchých objektivů. Vzdálenost objektivů z pracovní vzdálenosti bez korekce ke krycímu sklu je pro objektivy 2x a 5x (WD= 34mm) 12,8mm. Pro objektiv 10x (WD= 33,5) 12,3mm. V tabulce 3 můžeme vidět, že největší posuny objektivů b jsou menší než vzdálenost objektivů od krycího skla. Při maximálním posunutí tedy objektivy nenarazí na krycí sklo.

Tabulka 4: Korekce pro lom světla objektivů Mitutoyo

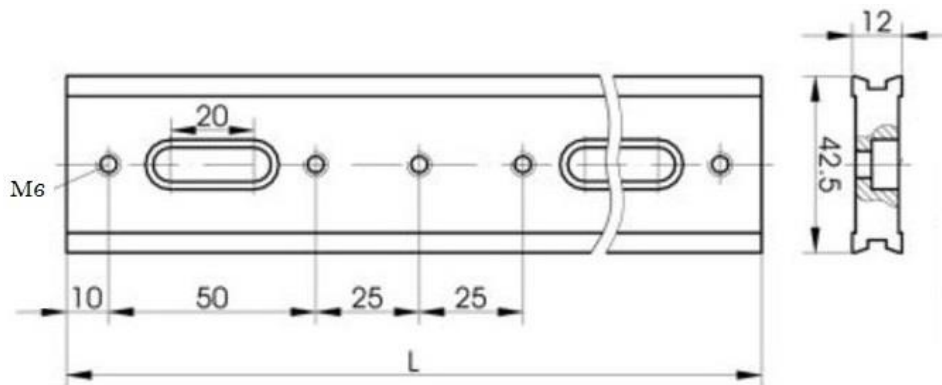
Zvětšení	2x	5x	10x
$\varnothing D$ [mm]	24,7	23	28,2
ϑ_1 [°]	19,96	18,68	22,82
ϑ_2 [°]	12,99	12,18	14,8
ϑ_3 [°]	15,21	14,26	17,35
ϑ_4 [°]	12,63	11,84	14,39
a [mm]	5,6	5,7	5,3
b [mm]	11,06	11,15	10,18

7.4. Volba posuvného mechanismu

Z přechozích kapitol pro korekci lomu světla a pro objektivy s různou pracovní vzdáleností je patrné, že je pro správné nastavení revolveru potřeba posuvu v ose detekce. Imerzní objektiv má krátkou pracovní vzdálenost (3,5 mm) a suché objektivy mají dlouhé pracovní vzdálenosti (34 a 33,5 mm). Pro správné nastavení je tedy potřeba posunutí revolverové hlavy podle použitého objektivu. Dále je potřeba mechanismu pro jednotlivé zaostření vzorku, aby obraz nebyl rozmazaný. Na trhu je mnoho firem, které se zabývají jemnou opto-mechanikou v různých provedeních a velikostech. Mezi nejznámější patří firmy Thorlabs, Standa, Newport.

Součásti pro posuvný pohyb jsem volil podle velikosti, protože zástavbový prostor je omezen, dále podle množství pohybů a také podle cenové náročnosti. Všechny součásti jsem vybral z důvodu kompatibility od jedné firmy, italského výrobce Standa. Firma neposkytuje výrobní dokumentace, avšak dle sdělení obchodního zástupce jsou připojovací a zástavbové rozměry jejich výrobků ve shodě s ISO 2768-fH.

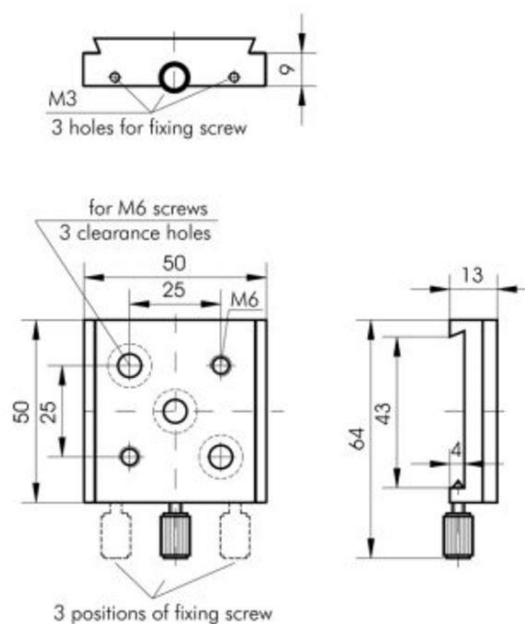
- Ocelová kolejnice pro optiku 2OR6-270



Obr. 49.: Kolejnice pro optiku 2OR6-270 od firmy Standa [35]

Kolejnice (Obr. 49) se prodává s délkou $L = 270$ mm a otvory pro šrouby 8x M6. Váha je 0,76 kg a cena je 99€. Kolejnice je pomocí šroubů upevněna na základní desku mikroskopu. Pro naše potřeby je však potřeba kolejnici zkrátit na délku 100mm - viz výkres v Příloze 3.

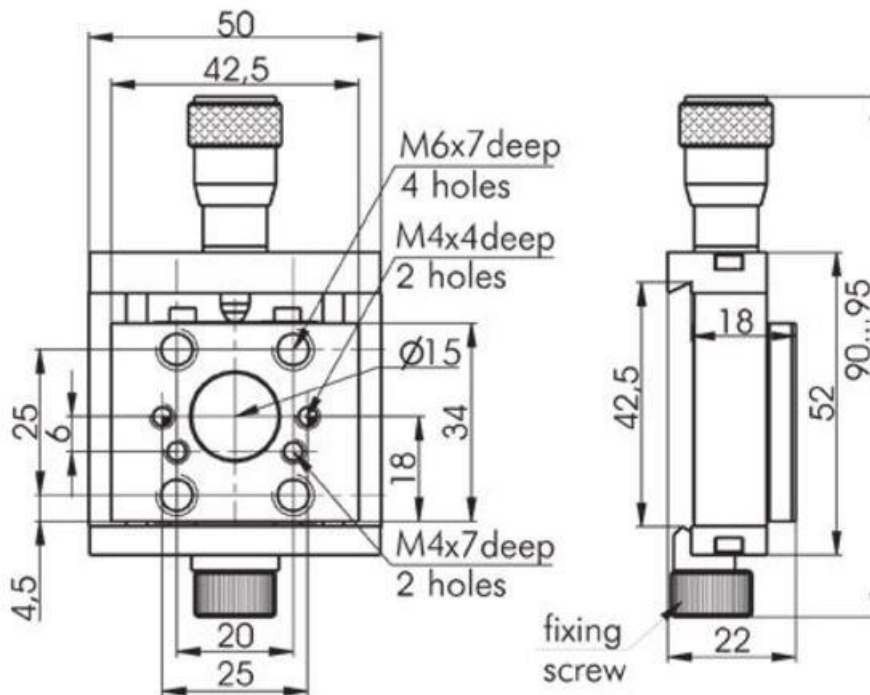
- Ocelová posuvná kolejnice 2SRC6-50



Obr. 50.: Posuvná kolejnice 2SRC6-50 od firmy Standa [36]

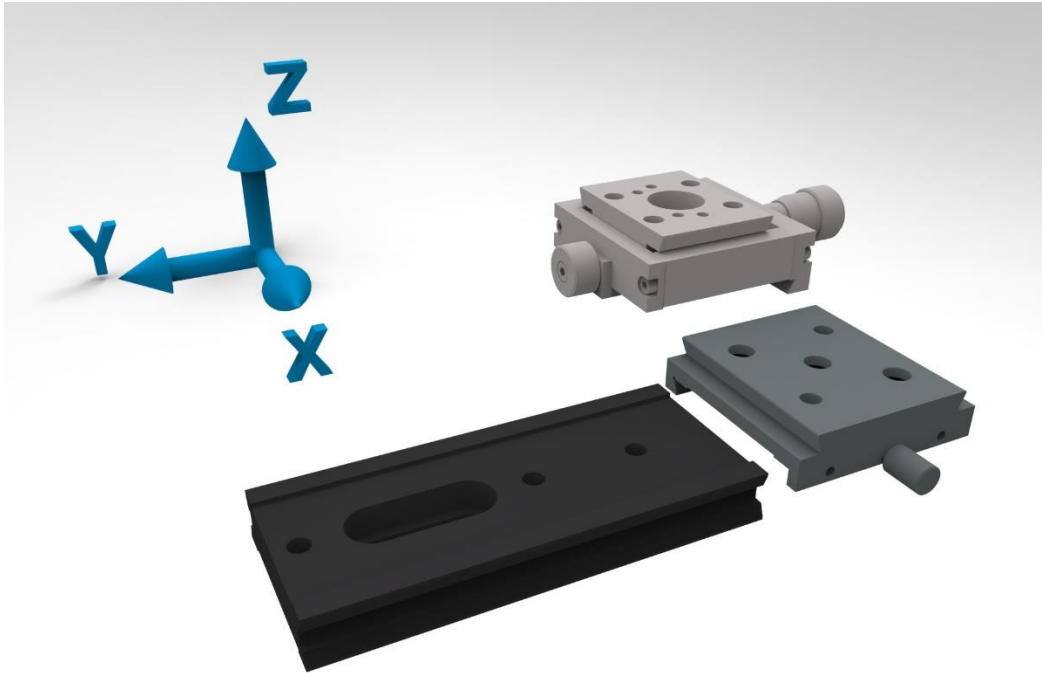
Posuvná kolejnice (Obr. 50) je nasunuta na kolejnici 2OR6, ve které vykonává pohyb v detekční ose (osa Y viz Obr. 52). Boční aretační šroub slouží k zafixování polohy revolverové hlavy. Jedná se o univerzální platformu, na kterou lze připevnit jiné součásti, které mají také rybinovou drážku, a lze je posouvat o $\pm 15\text{mm}$. Kolejnice je vyrobena z černěné kalené oceli. Cena kolejnice je 69€.

- Mini polohovací kolejnice s kuličkovým systémem 7T8-01

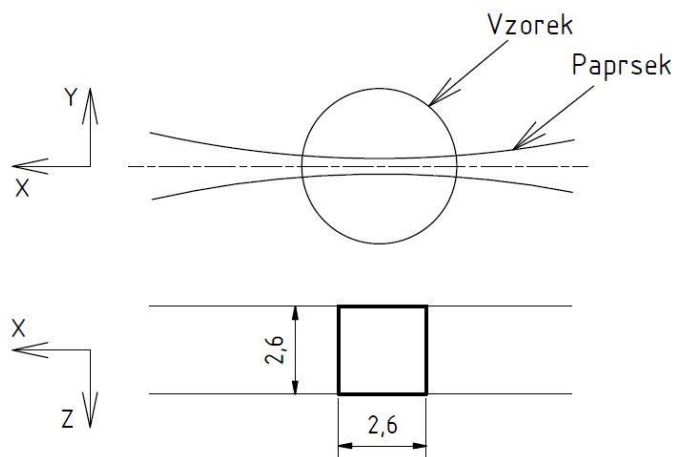


Obr. 51.: Polohovací kolejnice 7T8-01 od firmy Standa [37]

Polohovací kolejnice (Obr. 51) má rozsah pohybu 5mm. Je nasunuta na kolejnici 2SRC6-50. V rybinové drážce se může kolejnice pohybovat v ose X (viz Obr. 52) a mikrometrické ovládání umožňuje jemné nastavení v ose Y (zaostření). Mikrometr je uchycen v závitě M10x1 a jeho přesnost je $10\mu\text{m}$. Aretační šroub slouží k zafixování polohy. Přesnost sledování jsou $2\mu\text{m}$ a čtecí přesnost je $5\mu\text{m}$. Nosnost kolejnice je 3kg a cena je 191€.



Obr. 52.: Sestavení polohovacího mechanismu



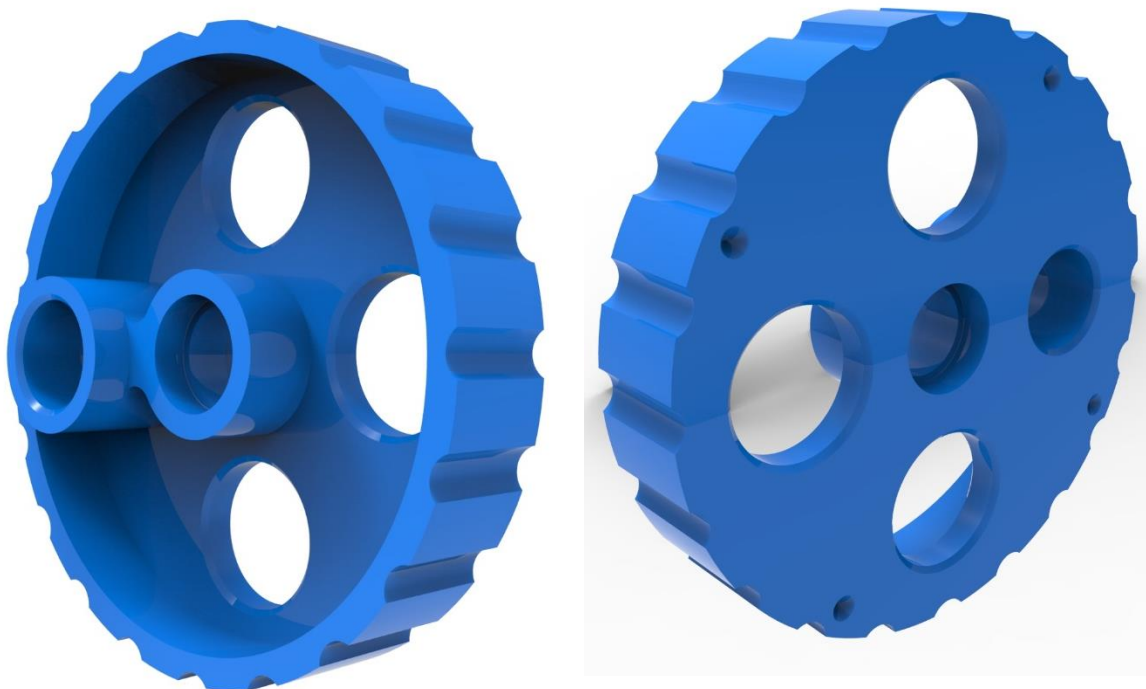
Zvětšení 4x => zobrazovací pole 2,6 mm

Obr. 53.: Nastavení osy objektivu do oblasti paprsku

Posuv v ose Z je řešen tolerancí při výrobě součástí. Výška paprsku vychází při průchodu čočkami přibližně na velikost zobrazovacího pole objektivu se zvětšením 4x (Obr. 53). Střed tolerančního pole je nastaven na spodní hranu paprsku. Když jsou všechny součásti vyrobeny na horní toleranční mez, bude se osa detekce nacházet v oblasti paprsku (osa X, Z). Když jsou všechny součásti vyrobeny na dolní toleranční mez, osa objektivu je pod spodní hranou paprsku, tuto neshodu vyřešíme pomocí planžet, které vložíme pod stojan revolveru a tím se dostaneme osou objektivu do oblasti paprsku.

7.5. Návrh revolverové hlavy

Revolverová hlava je uchycena na dvou ložiskách, na kterých se otáčí. Má čtyři otvory se závitem, tři pro suché objektivy se závitem M26x0,706 a ve vystouplém válci je uchycen imerzní objektiv na závitu W20.32 x 0.706. Největší průměr hlavy je 104 mm a šířka je 27 mm. Je vyroben z hliníku EN AW 6082-T6, který má velmi dobrou obrobiteľnosť, lze ho eloxovat a jeho pevnost v tahu je 310 MPa (tvrdost cca 95HBW). [39]



Obr. 54.: Revolverová hlava

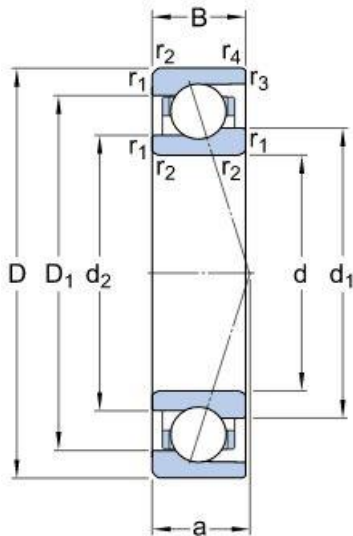
Z druhé strany revolverové hlavy jsou čtyři kuželové díry, které udávají polohu jednotlivých objektivů v detekční ose. Do kuželových děr zapadá stavěcí šroub s kuličkou, který je zašroubován ve stojanu. Výkres revolverové hlavy je v Příloze 6.

7.6. Volba ložisek

Otáčení revolverové hlavy a tím výměna jednotlivých objektivů je realizována pomocí dvou vysoce přesných kuličkových ložisek s kosoúhlým stykem sestavených do „O“. Ložiska jsou od firmy SKF s označením 719/8 ACE/P4A (ACE-stykový úhel 25°, P4A- rozměrová přesnost podle třídy přesnosti ISO 4 a přesnost

chodu lepší než třída přesnosti ISO 4). Základní parametry ložiska jsou na Obr. 55 a v Tabulka 5, ostatní parametry jsou v Příloze 4.

Tabulka 5: Základní parametry ložiska SKF 719/8 ACE/P4A [38]

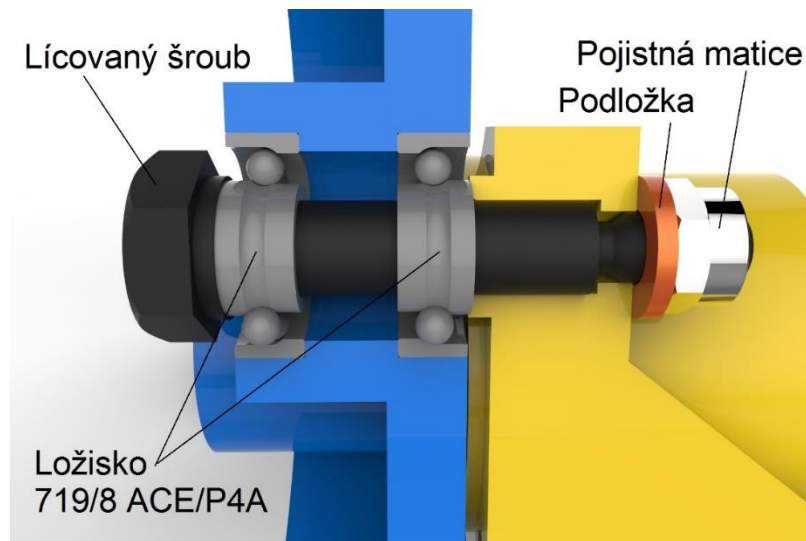


d	8	mm
D	19	mm
B	6	mm
d ₁	11,3	mm
d ₂	10,76	mm
D ₁	15,7	mm
r _{1,2}	min. 0,3	mm
r _{3,4}	min. 0,15	mm
a	6,5	mm
hmotnost	7	g

Obr. 55.: Základní parametry ložiska SKF 719/8 ACE/P4A [38]

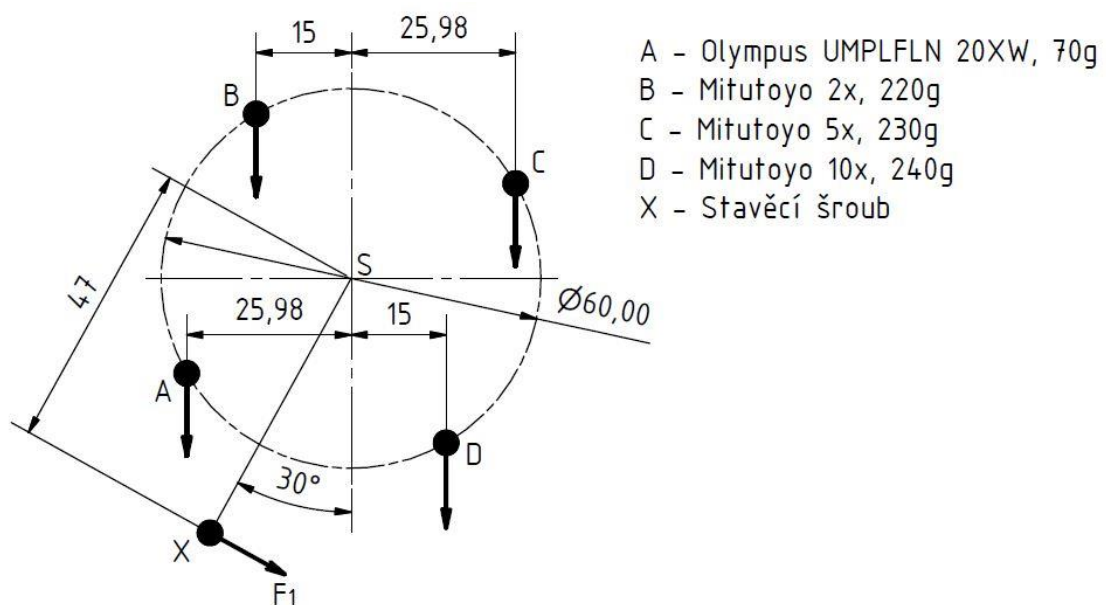
Ložiska mají pro nalisování toleranční parametry pro vnější i vnitřní kroužek horní toleranci +0 μm a dolní toleranci -4 μm . Toleranční hodnoty jsou k dispozici u příslušných ložisek na stránkách firmy SKF. Ložiska jsou dále pro větší přesnost a tuhost předepnuta pomocí maximální doporučené osové síly $G_c = 91\text{N}$, protože mají ložiska při otáčení velice malou úhlovou rychlost a nedochází k tak častému otáčení, nebude vznikat teplo vlivem zvýšeného tření při předpětí.

Na Obr. 56 je zástavba ložisek a lícovaného šroubu v revolverové hlavě. Obě ložiska jsou vnějším kroužkem nalisována na vyrobený ocelový lícovaný šroub 8xM6x30 (průměr 8 je tolerovaný na m6), jehož výkres je přiložen v Příloze 5. Vnější kroužek ložisek je nalisován do revolverové hlavy, na kterou jsou našroubovány objektivy. Z jedné strany je ložisko opřeno vnějším kroužkem o hlavu lícovaného šroubu. Druhé ložisko je opřeno vnějším kroužkem o stojan, jež je pevně připojen na polohovací kolejnici s mikrometrem. Lícovaný šroub je do tohoto stojanu nalisován a tím je vymezena jeho přesná poloha. Předpětí je dosaženo pojistnou maticí M6, pod kterou je vložena podložka.



Obr. 56.: Umístění ložisek a lícovaného šroubu

- Výpočet potřebné přitlačné síly stavěcího šroubu:
- Největší síla je potřebná při nastavení, kdy je v záběru imerzní objektiv (A) Obr. 57.



Obr. 57.: Rozmístění objektivů v revolverové hlavě

Rovnice rovnováhy:

$$A * 25,98 + B * 15 = C * 25,98 + D * 15$$

$$70 * 25,98 + 220 * 15 = 230 * 25,98 + 240 * 15$$

$$5\,118,6 \text{ gmm} < 9\,575,4 \text{ gmm}$$

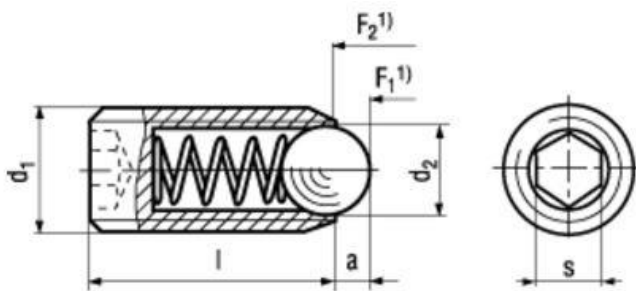
$$9\,575,4 - 5\,118,6 = 4\,456,8 \text{ gmm}$$

$$\frac{4\,456,8}{47} = 95g \Rightarrow F_1 = 0,95N$$

Při uvažování bezpečnosti $k=2$ je síla $F_1 = 0,95 \cdot 2 = 1,9 \text{ N}$. Je tedy potřeba zachytit sílu $F_1 = 1,9 \text{ N}$.

Podle síly, která se musí zachytit, volím odpružený šroub M8 s kuličkou a vnitřním šestihranem označení BN 20199 od firmy Bossard. Kulička je kalená z automatové oceli, šroub je černěný. Pružinka je z nerezové oceli.

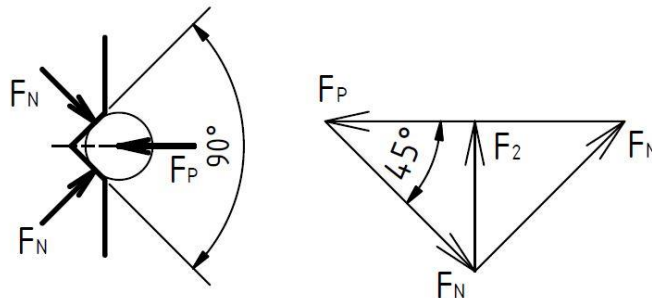
Tabulka 6: Parametry stavěcího šroubu [40]



d_1	M8	
l	18	mm
a	1,5	mm
d_2	4,5	mm
s	4	mm
F_{P1}	18	N
F_{P2}	31	N

Obr. 58.: Stavěcí šroub [40]

- Výpočet síly, která se musí překonat při otáčení:



Obr. 59.: Rozložení sil stavěcího šroubu

$$F_{N1} = \frac{F_{p1}}{2 \cdot \sin(45)} = \frac{18}{2 \cdot \sin(45)} = 12,7 \text{ N}$$

$$F_{N2} = \frac{F_{p2}}{2 \cdot \sin(45)} = \frac{31}{2 \cdot \sin(45)} = 21,9 \text{ N}$$

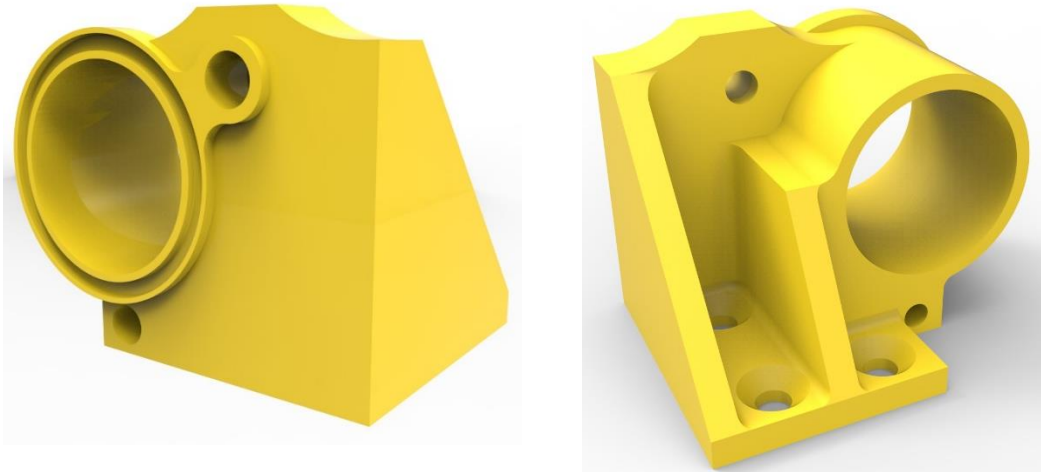
$$F_2 = \cos\left(\frac{45}{2}\right) \cdot F_{N1}$$

$$F_2 = \cos\left(\frac{45}{2}\right) \cdot 12,7$$

$$F_2 = 11,7 \text{ N}$$

$F_2 > F_1$ ($23,51 \Rightarrow$ nerovnováha tíhy objektivů je tedy zachycen silou F_2). Zvolený aretační šroub vyhovuje.

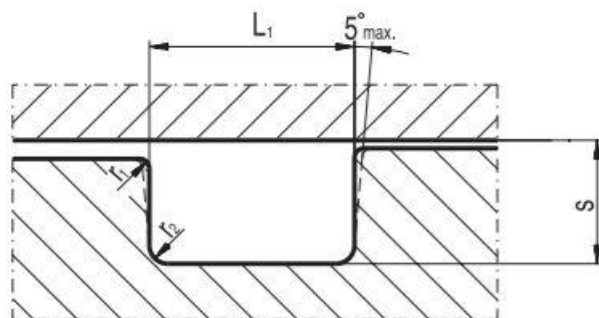
7.7. Návrh stojanu revolverové hlavy



Obr. 60.: Stojan revolverové hlavy

Stojan je uchycen na polohovací kolejnici třemi šrouby M6 se zápustnou hlavou a vnitřním šestihranem. Součást je vyrobena obráběním z materiálu hliníku EN AW 6082-T6. V tomto stojanu je ve vrchním malém otvoru nalisován lícovaný šroub. Ve spodním otvoru je zašroubován stavěcí šroub. Výkres stojanu je v Příloze 4.

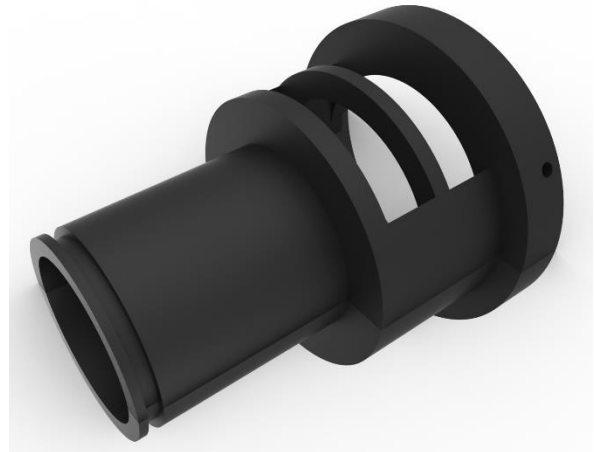
V čele stojanu je drážka pro O-kroužek, který se přitlačí na revolverovou hlavu a zabraňuje okolnímu světlu vniknutí do detekční cesty. Drážka je normalizovaná a její parametry jsou na Obr. 61. O-kroužek volím od firmy Rubena a má velikost vnitřního průměru $d = 37\text{mm}$ a tloušťku $b = 2\text{mm}$.



Obr. 61.: Drážka pro O-kroužek [41]

Pro tloušťku $b = 2\text{mm}$ jsou doporučené rozměry $s = 1,5$, $L_1 = 2,6$, $r_1 = 0,1\text{mm}$, $r_2 = 0,2\text{mm}$.

Ve stojanu je zasunutý tubus, do kterého se vkládají filtry. Zároveň tubus zajíždí do otvoru ve stojanu, když je potřeba celý držák posouvat dopředu či dozadu. Tubus je vyroben z hliníku EN AW 6063 obráběním. Také má jako rameno drážku pro O-kroužek, který chrání proti vniknutí světla. Rozměry O-kroužku jsou $d = 31\text{mm}$ a tloušťka $b = 2\text{mm}$. Stojan je uchycen pomocí tří šroubů M3 na okuláru. Výkres tubusu je v Příloze 7.

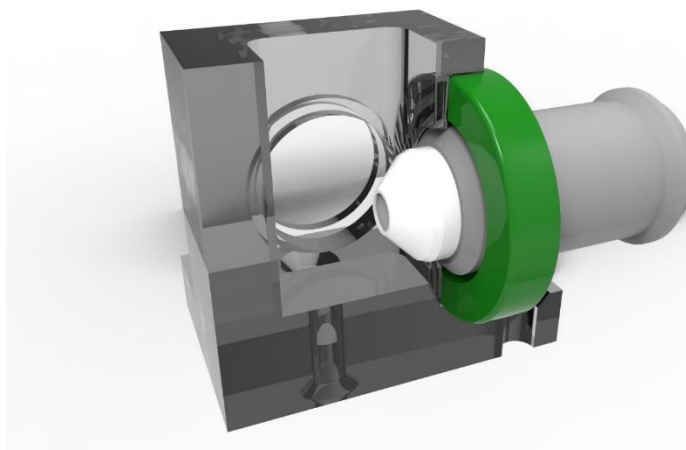


Obr. 62.: Tubus

Pro imerzní objektiv je nutné vyřešení těsnosti mezi objektivem a komorou. Ve stávajícím stavu je imerzní objektiv umístěn v O-kroužku. Toto provedení těsnění je účinné, avšak je velice náročné vtlačení objektivu do O-kroužku.

Pro můj způsob návrhu revolveru, kdy bude imerzní objektiv zajíždět do komory, jsem jako těsnění použil hřídelové těsnění 21x35x7 HMS5 RG od firmy SKF. Těsnění je s předepjatým těsnícím břitem, jehož označení materiálu je RG= nitrkaučuk. Je doporučeno pro zadržení olejových maziv s nízkou viskozitou. Parametry těsnění jsou v Příloze 9. [42]

Pro tuto konstrukci je nutná výroba nové komory, kde bude prostor pro usazení těsnění. Výkres komory je v Příloze 10.



Obr. 63.: Imerzní objektiv s těsněním umístěný v komoře

7.8. Sestava revolverové hlavy



Obr. 64.: Sestava revolverové hlavy

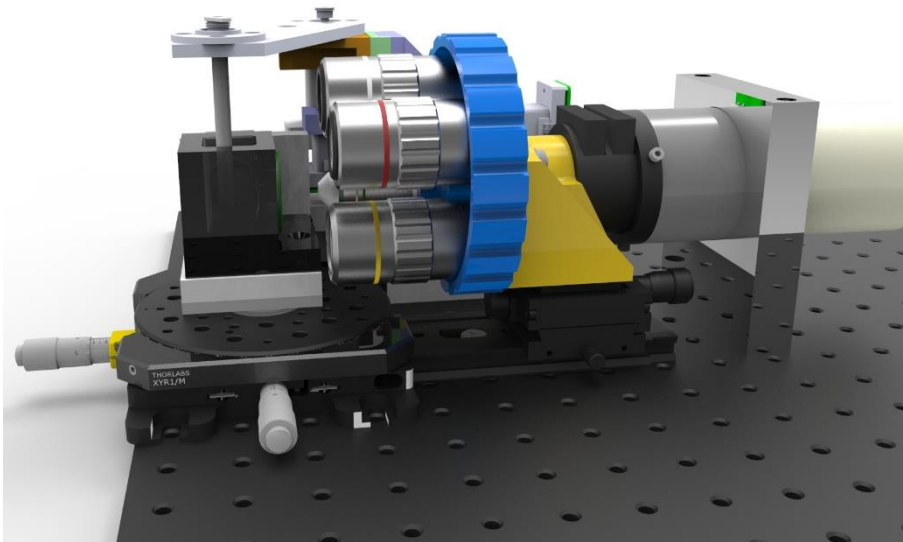
Po umístění celé revolverové hlavy na mikroskop SPIM se pro použití jednotlivých objektivů nastavuje sestava do tří pozic. V první pozici (Obr. 65) jsou objektivy mimo komoru se zkoumaným objektem. V této pozici se může revolverová hlava otáčet a tím se mění objektivy.

Druhá pozice je určena pro suché objektivy. Po vybrání příslušného objektivu se uvolní aretační šroubek na posuvném stolku a celá sestava se posune po kolejnici směrem ke komoře do přibližné pracovní polohy. Zde se povolný aretační

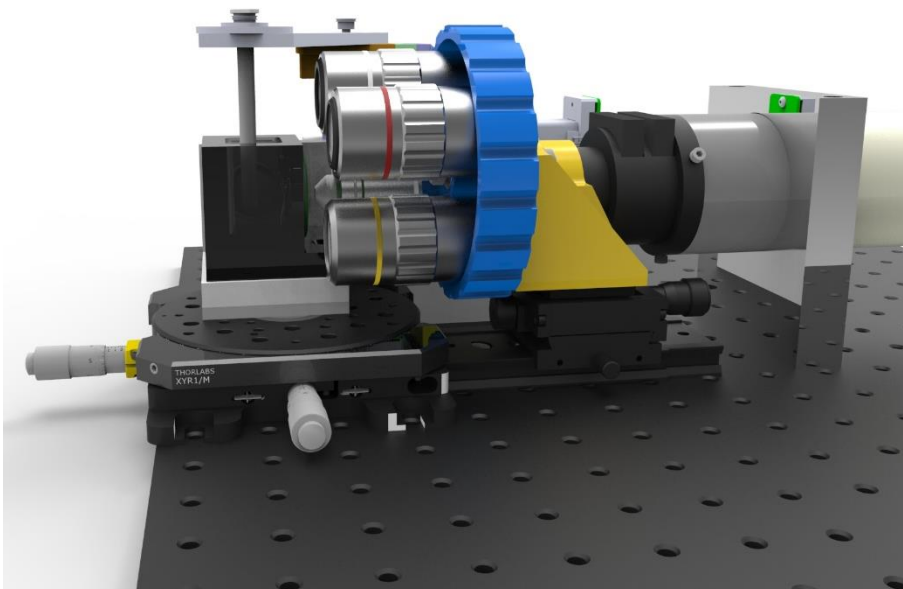
šroubek opět zafixuje a zaostření obrazu se provede pomocí mikrometrického šroubu (Obr. 66). V této pozici nelze objektivy otáčet, protože by vznikla kolize s komorou.

Třetí pozice je pro imerzní objektiv. Pro tento objektiv je potřeba vyměnit komoru s krycím sklem za komoru s hřídelovým těsněním. Nejdříve se tedy ustaví nová komora, poté se posune sestava z první pozice (kde se volí objektiv) až do pracovní pozice skrz těsnění. Nakonec se komora zaplní čisticí kapalinou a obraz se doostří (Obr. 67).

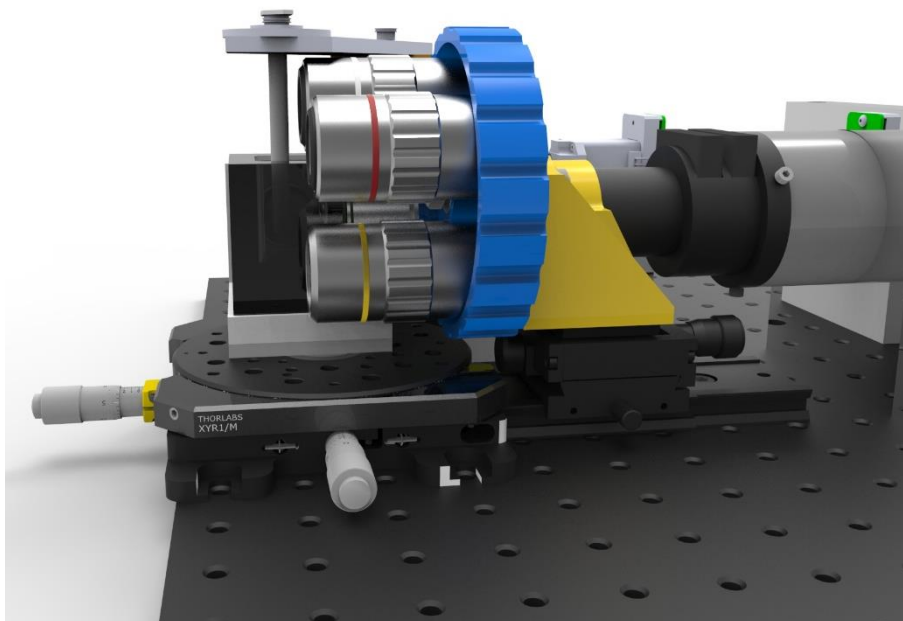
Sestava a použité součásti jsou k nalezení v Příloze 11.



Obr. 65.: Sestava revolverové hlavy - první pozice



Obr. 66.: Sestava revolverové hlavy - druhá pozice



Obr. 67.: Sestava revolverové hlavy - třetí pozice

Závěr

Cílem této diplomové práce bylo navržení nosiče daných objektivů pro mikroskop SPIM, který se nachází v Ústavu biologické matematiky Akademie věd ČR.

V první kapitole byly popsány jevy, které ovlivňují průchod světla optickým zařízením, rozdělené na geometrickou a vlnovou optiku. Geometrická optika popisuje vlastnosti světla při dopadu paprsku na rozhraní dvou prostředí (odraz a lom světla, disperze, polarizace světla). Vlnový charakter světla zahrnuje jevy elektromagnetického vlnění, jako jsou interference a difrakce.

V další kapitole je popsán optický mikroskop, nejpoužívanější zdroje osvětlení, parametry a vlastnosti používaných objektivů, jako jsou numerická apertura a rozlišovací schopnost objektivu. Dále jsou zahrnuty vady optických soustav, jejich vznik a eliminace.

Dále jsou informace o principu a činnosti mikroskopu SPIM, na jaké vzorky se používá a v jaké míře ovlivňuje vzorek. Velká část této kapitoly je věnována popisu hlavních částí a jednotlivých používaných součástí.

Kapitola přesné mechaniky pojednává o technických řešeních posuvů a rotací jemných součástí. Jsou zde popsány jednotlivé způsoby vedení, jejich rozdíly a výhody. Otočná uložení jsou věnována převážně ložiskům, jejich vymezením vůle a předpětí.

V konstrukční kapitole jsou informace o použitých objektivěch. Pro suché objektivy je proveden výpočet lomu světla při průchodu paprsku prostředími s různými indexy lomu. Jsou zde popsány jednotlivé komponenty a jejich sestavení.

Práce dosahuje vytyčených cílů, jejichž výsledkem je 3D model držáku objektivů a jednotlivých použitých součástí. K práci je dodána technická dokumentace ve formě výkresů, která je příloze. Také jsou dodány modely v univerzálním CAD formátu pro obrábění.

Použitá literatura

- [1] SOPKO, Bruno, Ladislav SAMEK a František ČERNÝ. Fyzika II. Praha: Vydavatelství ČVUT, 2005. ISBN 80-01-03194-2.
- [2] „PODMANICKÁ, Petra. O škole: Fyzika: Rozklad světla [online]. © medias media, 2017 [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: http://www.oskole.sk/wap/index.php?id_cat=3&year=9&new=14674,“.
- [3] „Olympus microscopy resource center: Polarization of Light [online]. © 2012 Olympus America [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/java/polarizedlight/3dpolarized/index.html>,“.
- [4] HALLIDAY, David, Robert RESNICK a JEARL WALKER. Fyzika: vysokoškolská učebnice obecné fyziky. Brno: VUTIUM, 2000. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 80-214-1868-0.
- [5] HUARD, Serge. Polarization of light. Paris: Masson, 1997. ISBN 2-225-85372-x.
- [6] „Netcam: Denní a noční vidění síťových kamer [online]. © netcam.cz [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <http://www.netcam.cz/encyklopedie-ip-zabezpeceni/denni-a-nocni-videni.php>,“.
- [7] „Physics [online]. [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <https://physics.stackexchange.com/questions/137860/what-is-the-difference-between-diffraction-and-interference-of-light/137871>,“.
- [8] „Optical microscopy primer: Diffraction of Light [online]. [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <https://micro.magnet.fsu.edu/primer/lightandcolor/diffractionintro.html>,“.
- [9] „Intraco micro [online]. © 2017, Intraco Micro [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <http://www.mikroskopy-optika.cz/produkt/laboratorni-mikroskop-model-ba-410e-trino>,“.
- [10] „Microscopy resource centre: Light Sources [online]. © 2012 Olympus America [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorosources.html>,“.
- [11] „SAD Narva [online]. © 2014 SAD s.r.o [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: http://www.narva.sk/svetelne-zdroje-halogenove-a-kryptonove-ziarovky-g4-g6-35-a-gy6-35-gy6-35_c535.html,“.
- [12] „PAVLIS, Robert. An Overview of LEDs in Microscopy [online]. © Microscopy UK or their contributors [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artjun08/rp-LEDsummary.html>,“.
- [13] NAVRÁTIL, Leoš. Nové pohledy na neinvazivní laser. Praha: Grada Publishing, 2015. ISBN 978-80-247-1651-0.
- [14] E. Hruška, „ARE: Základní metody světelné mikroskopie [online]. © Optoteam, 2014 [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: http://www.are.cz/data/file/zakladni_metody_svetelne_mikroskopie.pdf,“.

- [15] „Microscopy university: Resolution [online]. © 2016 Nikon Instruments [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/resolution/>,“.
- [16] „Microscopy resource center: Common Optical Defects in Lens Systems [online]. © 2012 Olympus America [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/lightandcolor/opticalaberrations.html>,“.
- [17] „Digital photography live: Understanding Chromatic & Spherical Aberration of Lenses [online]. © 2017 Digitalphotographylive [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <http://digitalphotographylive.com/chromatic-spherical-aberration/>,“.
- [18] „NORMAN, Ian. Lonely speck: A Practical Guide to Lens Aberrations and the Lonely Speck Aberration Test [online]. © 2017 Ian Norman [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <http://www.lonelyspeck.com/a-practical-guide-to-lens-aberrations-and-the-lonely-speck-aberrati/>,“.
- [19] „Digital photography live: What is chromatic aberration and how to tackle them while shooting? [online]. © 2017 Digitalphotographylive [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <http://digitalphotographylive.com/chromatic-aberration/>,“.
- [20] „Wikipedia: Chromatic aberration [online]. [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Chromatic_aberration#/media/File:Comparison_chromatic_focus_shift_plots.svg,“.
- [21] „OpenSPIM [online]. 2015 [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <http://openspim.org/Operation>,“.
- [22] „Microscopy resource center: Fluorescence Microscopy [online]. © 2012 Olympus America [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>,“.
- [23] „OpenSPIM: Gallery [online]. 2013 [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <http://openspim.org/Gallery>,“.
- [24] „Coherent [online]. © Coherent, Inc. 2017 [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <https://www.coherent.com/lasers/laser/cw-solid-state-lasers/cube-lasers>,“.
- [25] „Thorlabs [online]. Copyright 1999-2017 Thorlabs [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <https://www.thorlabs.de/thorProduct.cfm?partNumber=VA100/M>,“.
- [26] „Thorlabs [online]. Copyright 1999-2017 Thorlabs [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <https://www.thorlabs.de/thorProduct.cfm?partNumber=RSP1X15/M#ad-image-0>,“.
- [27] „OpenSPIM [online]. [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: http://openspim.org/Welcome_to_the_OpenSPIM_Wiki,“.
- [28] „Andor [online]. [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: http://www.andor.com/pdfs/specifications/Andor_iXon_897_Specifications.pdf,“.
- [29] HARNA, Zdeněk. Přesná mechanika. Brno: Vysoké učení technické, 1996. ISBN 80-214-0794-8.

- [30] KAMARÁD, Josef a Zdeněk SLÁDEK. Základy přesné mechaniky 1. 2.vyd. Praha: ČVUT, 1987.
- [31] HAJN, Miroslav. Základy jemné mechaniky a hodinářství: přehled přesné mechaniky v celém rozsahu s podrobným pojednáním o hodinářské technice. Praha: Práce, 1953
- [32] „SKF: Určení předpětí [online]. [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <http://www.skf.com/cz/products/bearings-units-housings/ball-bearings/principles/application-of-bearings/bearing-preload/determining-preload-force/index.html>,“.
- [33] „Edmundoptics [online]. Copyright 2017, Edmund Optics [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <https://www.edmundoptics.com/microscopy/infinity-corrected-objectives/mitutoyo-infinity-corrected-long-working-distance-objectives/>,“.
- [34] „Olympus [online]. Copyright OLYMPUS CORPORATIO [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: [https://www.olympus-lifescience.com/en/objectives/lumplfln-w/#!cms\[tab\]=%2Fobjectives%2Flumplfln-w%2F20xw](https://www.olympus-lifescience.com/en/objectives/lumplfln-w/#!cms[tab]=%2Fobjectives%2Flumplfln-w%2F20xw),“.
- [35] „Standa: 2OR6 - Steel Optical Rails [online]. © 2000 - 2017 STANDA [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: http://www.standa.lt/products/catalog/brackets_rails?item=14&prod=steel_optical_rails,“.
- [36] Standa: 2SRC6-50 - Steel Sliding Rail Carrier [online]. [cit. 2017-06-26]. Dostupné z: http://www.standa.lt/products/catalog/brackets_rails?item=95&prod=steel_sliding_rail_carrier
- [37] Standa: 7T8-01 - Mini Rail System Ball Slide Positioners [online]. [cit. 2017-06-26]. Dostupné z: http://www.standa.lt/products/catalog/translation_rotation?item=35
- [38] „SKF [online]. [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <http://www.skf.com/group/products/bearings-units-housings/super-precision-bearings/angular-contact-ball-bearings/acbb-skf-high-and-super-precision/index.html?designation=719%2F8%20ACE>,“.
- [39] „Ehliník [online]. [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: <http://www.ehlinik.cz/prilohy/zakladni-technicke-informace.pdf>,“.
- [40] „Bossard [online]. [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: https://eu.shop.bossard.com/cz/cz/11230/ovladaci-prvky-pojistnetlacitko/staveci-tlacitka-s-odpruzenou-kulickou/bn-20200_odpruzene-srouby-s-kulickou-a-vnitrim-sestihranem-kulicka-kalena-pozinkovana-zluty-c,“.
- [41] „Hennlich industrietechnik: Hennlich těsnění [online]. [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: http://tesneni.hennlich.cz/uploads/O_krou%C5%BEky_tech_info_1_10.pdf,“
- [42] „SKF [online]. [cit. 2017-06-25]. Dostupné z: http://www.skf.com/binary/tcm:54-129139/10919_CZ_lowres_tcm_54-129139.pdf,“.



- [43] POSPÍCHAL, Jaroslav. Technické kreslení. Vyd. 3., přeprac. Praha: Vydavatelství ČVUT, 1995. ISBN 978-80-01-03214-5.
- [44] LEINVEBER, Jan, Jaroslav ŘASA a Pavel VÁVRA. Strojnické tabulky. 3., dopl. vyd., dot. Praha: Scientia, 1999. ISBN 80-7183-164-6.
- [45] SLANEC, Karel. *Strojírenské konstruování: geometrická přesnost výrobků: příklady*. Praha: Vydavatelství ČVUT, 2009. ISBN 978-80--01-04402-5.

Seznam obrázků

Obr. 1.: Lom světla v různém prostředí [1].....	3
Obr. 2.: Optický hranol [2].....	4
Obr. 3.: Polarizace světla převzato a upraveno z [3].....	5
Obr. 4.: Vlnové spektrum převzato a upraveno z [6].....	6
Obr. 5.: Interferenční pole převzato a upraveno z [7].....	7
Obr. 6.: Fresnelova světlá stopa na disku [4].....	7
Obr. 7.: Difrakce kolem okrajů žiletky [8].....	7
Obr. 8.: Vliv difrakce na velikost otvorů [4].....	8
Obr. 9.: Optický mikroskop převzato a upraveno z [9].....	9
Obr. 10.: Halogenová žárovka Narva GY6.35 100W [11].....	10
Obr. 11.: Parametry objektivu [14].....	11
Obr. 12.: Příklad numerické apertury objektivů [14].....	12
Obr. 13.: Rozlišovací schopnost závislá na numerické apertuře [15].....	14
Obr. 14.: Sférická aberace [17].....	15
Obr. 15.: Ukázka sférické aberace [18].....	15
Obr. 16.: Chromatická vada [19].....	16
Obr. 17.: Rozdělení achromatických objektivů podle vlnové délky [20].....	17
Obr. 18.: Mikroskop SPIM [21].....	18
Obr. 19.: Zebrafish v projekci mikroskopu [23].....	19
Obr. 20.: Mikroskop SPIM s dvěma excitačními cestami [23].....	19
Obr. 21.: SPIM umístěný v přenosném kufříku [23].....	19
Obr. 22.: CUBE Laser od firmy Coherent [24].....	20
Obr. 23.: Dielektrická zrcadla umístěná na posuvné kolejnici.....	20
Obr. 24.: Nastavitelná štěrbina VA100/M [25].....	21
Obr. 25.: Otočný držák pro cylindrickou čočku [26].....	21
Obr. 26.: Změna tvaru paprsku průchodem excitační částí.....	22
Obr. 27.: Komora se vzorkem [27].....	23
Obr. 28.: Válcová vedení s rotací [29].....	24
Obr. 29.: Válcová vedení bez rotace [29].....	24
Obr. 30.: Dvojitá válcová vedení [29].....	25
Obr. 31.: Trojúhelníkové a rybinové vedení [29].....	25
Obr. 32.: Valivé vedení otevřené [29].....	25
Obr. 33.: Valivé vedení uzavřené [29].....	25
Obr. 34.: Valivé vedení s pouzdem [29].....	26
Obr. 35.: Porovnání přímých vedení [29].....	26
Obr. 36.: Vymezení vůle posunutím ložiskových kroužků [29].....	28
Obr. 37.: Vymezení vůle přibroušením podložky [29].....	28
Obr. 38.: Revolverová hlava Leica- detail na aretační ložisko.....	29
Obr. 39.: Revolverová hlava Leica- pohled zředu.....	29
Obr. 40.: Revolverová hlava Leica- pohled zezadu.....	29
Obr. 41.: Stav mikroskopu v původním stavu (horní obrázek), po přidání revolverové hlavy (dolní obrázek).....	30
Obr. 42.: Rozměry objektivů Mitutoyo [33].....	31
Obr. 43.: Rozměry imerzního objektivu Olympus UMPLFLN 20XW [5].....	32
Obr. 44.: Odstranění stěny držáku komory.....	32
Obr. 45.: Lom vzduchem u suchého objektivu bez překážky.....	33
Obr. 46.: Lom světla v krycím skle a čistící kapalině.....	33
Obr. 47.: Korekce objektivů Mitutoyo.....	34



Obr. 48.: Schémata pro výpočet korekce lomu světla	35
Obr. 49.: Kolejnice pro optiku 2OR6-270 od firmy Standa [35].....	37
Obr. 50.: Posuvná kolejnice 2SRC6-50 od firmy Standa [36].....	37
Obr. 51.: Polohovací kolejnice 7T8-01 od firmy Standa [36]	38
Obr. 52.: Sestavení polohovacího mechanismu.....	39
Obr. 53.: Nastavení osy objektivu do oblasti paprsku	39
Obr. 54.: Revolverová hlava	40
Obr. 55.: Základní parametry ložiska SKF 719/8 ACE/P4A [38].....	41
Obr. 56.: Umístění ložisek a lícovaného šroubu.....	42
Obr. 57.: Rozmístění objektivů v revolverové hlavě	42
Obr. 58.: Stavěcí šroub [40].....	43
Obr. 59.: Rozložení sil stavěcího šroubu	43
Obr. 60.: Stojan revolverové hlavy	44
Obr. 61.: Drážka pro O-kroužek [41].....	44
Obr. 62.: Tubus	45
Obr. 63.: Imerzní objektiv s těsněním umístěný v komoře.....	45
Obr. 64.: Sestava revolverové hlavy	46
Obr. 65.: Sestava revolverové hlavy - první pozice.....	47
Obr. 66.: Sestava revolverové hlavy - druhá pozice.....	47
Obr. 67.: Sestava revolverové hlavy - třetí pozice.....	48

Seznam tabulek

Tabulka 1: Závislost vlnové délky na rozlišovací vzdálenosti [15]	12
Tabulka 2: Parametry objektivů Mitutoyo [33]	31
Tabulka 3: Parametry objektivu Olympus UMPLFLN 20XW [34].....	32
Tabulka 4: Korekce pro lom světla objektivů Mitutoyo	36
Tabulka 5: Základní parametry ložiska SKF 719/8 ACE/P4A [38].....	41
Tabulka 6: Parametry stavěcího šroubu [40].....	43

Seznam příloh

- Příloha 1: Používané čisticí kapaliny
- Příloha 2: Parametry ložiska SKF 719/8 ACE/P4A
- Příloha 3: Výkres ocelové kolejnice 2OR6-270
- Příloha 4: Výkres stojanu revolverové hlavy
- Příloha 5: Výkres lícovaného šroubu
- Příloha 6: Výkres revolverové hlavy
- Příloha 7: Výkres tubusu
- Příloha 8: Výkres sestavy revolverové hlavy
- Příloha 9: Výkres držáku komory
- Příloha 10: Výkres komory
- Příloha 11: Parametry hřídelového těsní

