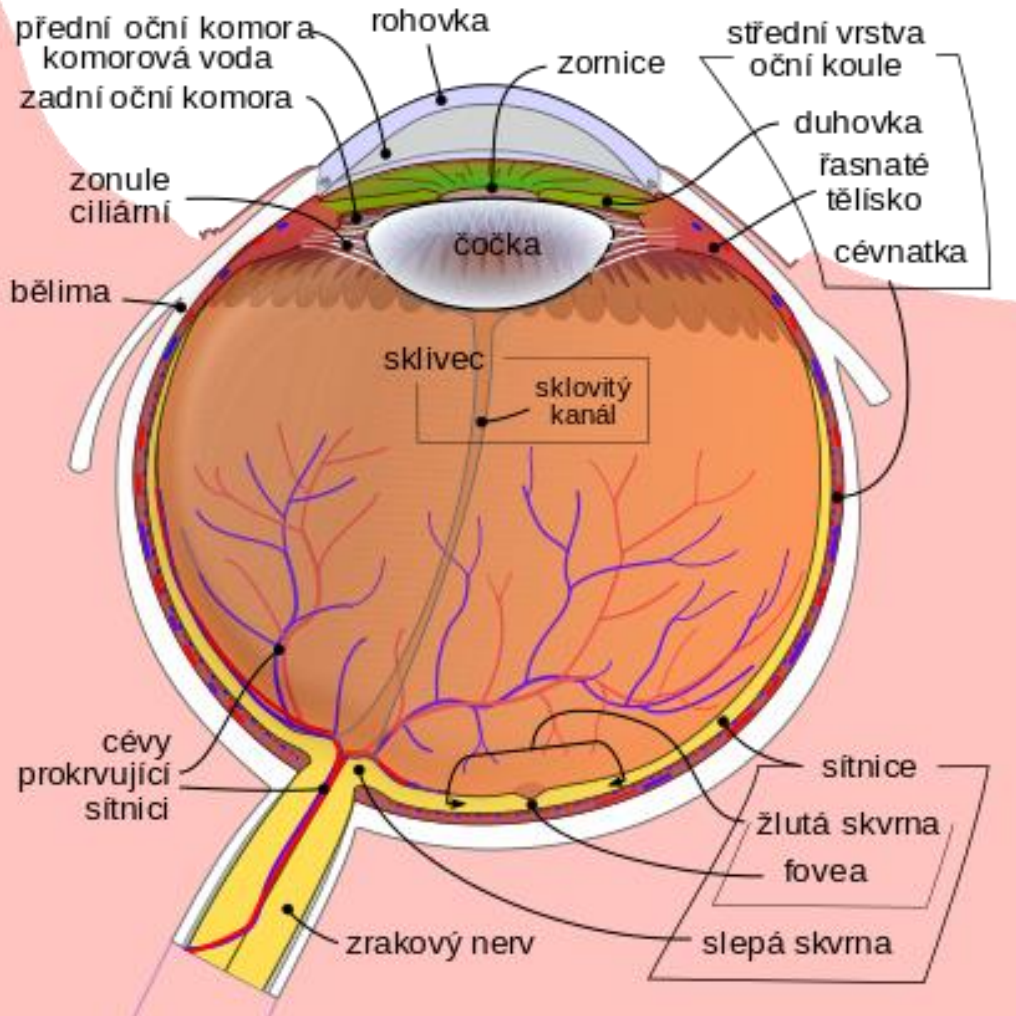


OPTICKÁ MIKROSKOPIE

D.Pavliňák - 2018
výuka C2690

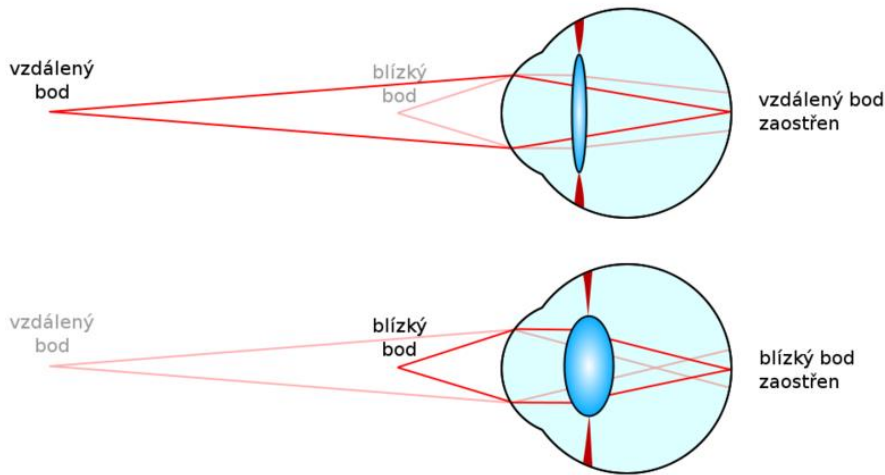
OPTICKÁ MIKROSKOPIE – LIDSKÉ OKO



Oblast vidění:

- Fotopické (denní)
 - Barevné vidění
 - Zajištěno čípkami
 - Vnímaný jas min. 10^2 cd/m²
 - Vjem vlnové délky 400-750 nm
 - Max. citlivost 555 nm
 - Plná adaptace 20-60 s.
- Skotopické (noční vidění)
 - Vnímání pouze jasu
 - Zajištěno tyčinkami
 - Vnímaný jas min. 10^{-3} cd/m²
 - Max. citlivost 555 nm
 - Plná adaptace 40-60 min.

OPTICKÁ MIKROSKOPIE – LIDSKÉ OKO



- Čočka může prostřednictvím ciliárního aparátu měnit zakřivení (akomodaci) a tím i optickou mohutnost. (Akomodace zajišťuje ostření na různou vzdálenost)
- Blízký bod - (maximální akomodace čočky) je nejbližší bod, při kterém lidské oko vidí ostře. U zdravého dospělého člověka je cca 25 cm.
- Vzdálený bod – největší vzdálenost, od které oko vidí ostře bez akomodace tzn. zaostřeno na nekonečno. U dospělého člověka od 5 m.
- Rozlišovací schopnost lidského oka je cca 0,2 mm (při vzdálenosti předmětu od oka 25 cm).
- Oko tvoří spojnou optickou soustavu s měnitelnou ohniskovou vzdáleností. Vzniklý oraz je zmenšený, převrácený a skutečný.

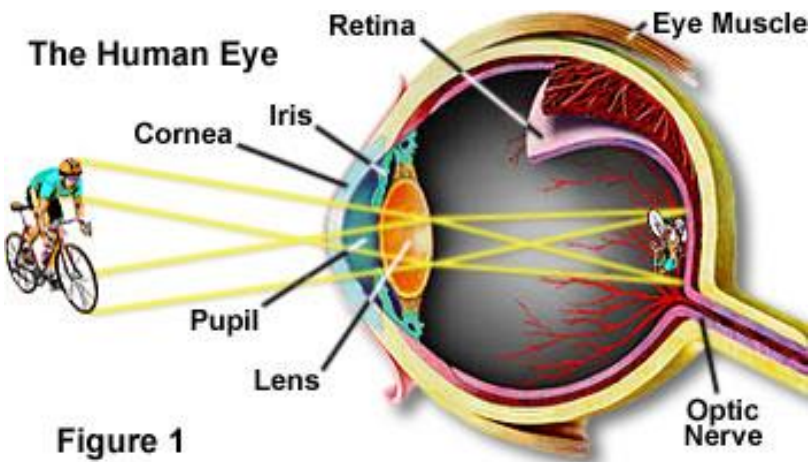
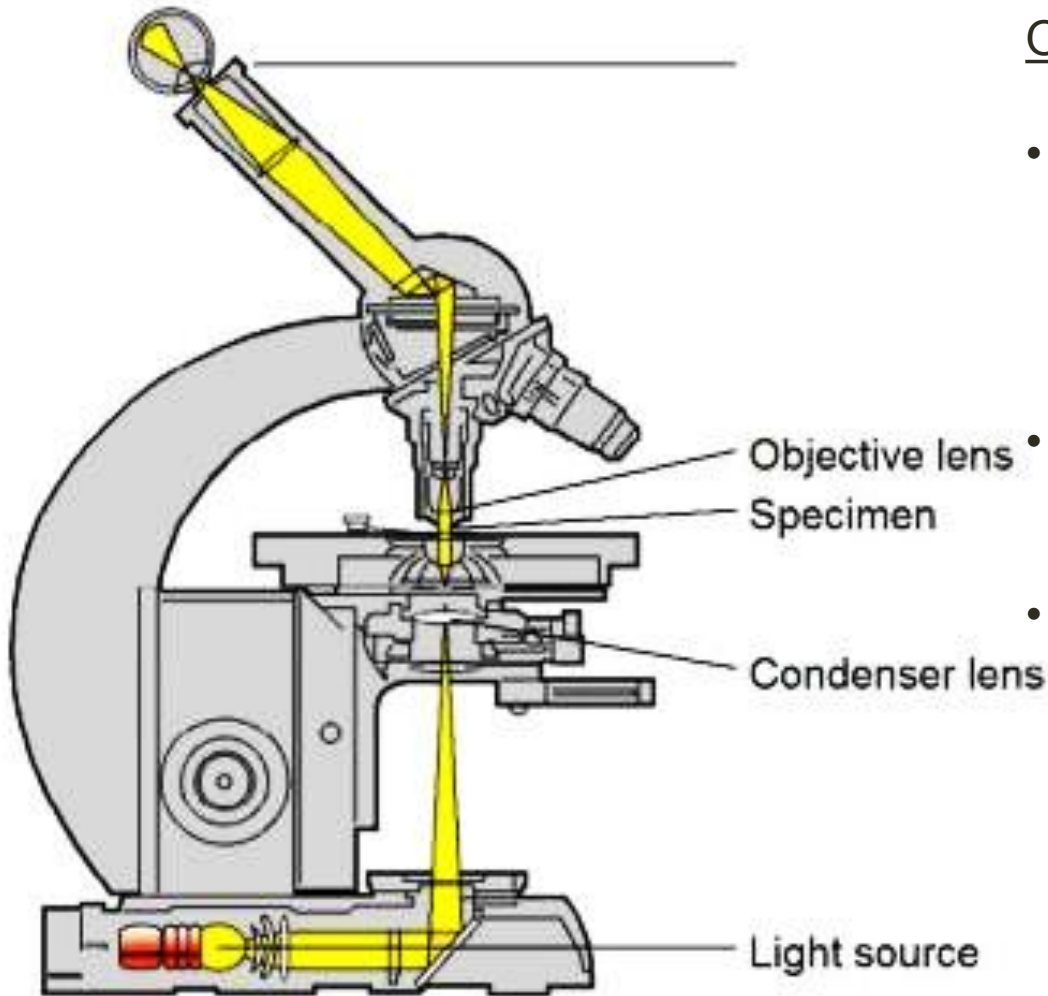


Figure 1

OPTICKÁ MIKROSKOPIE

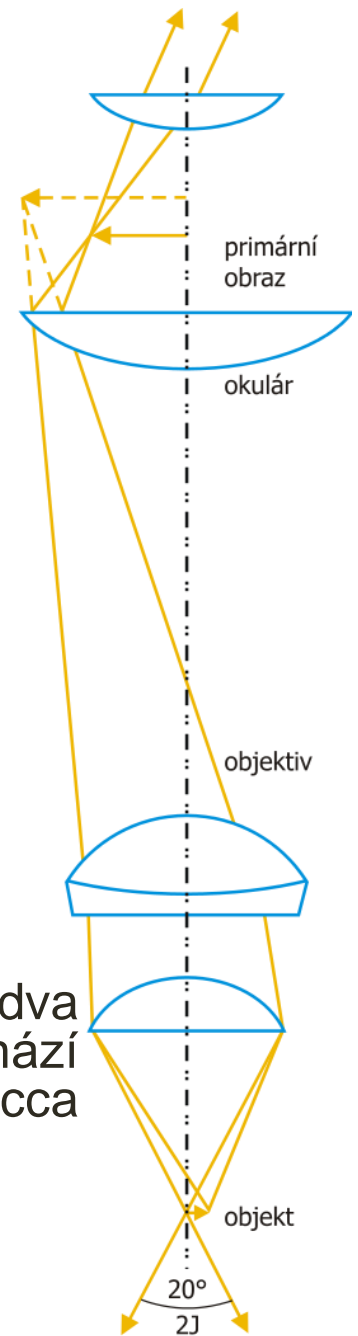
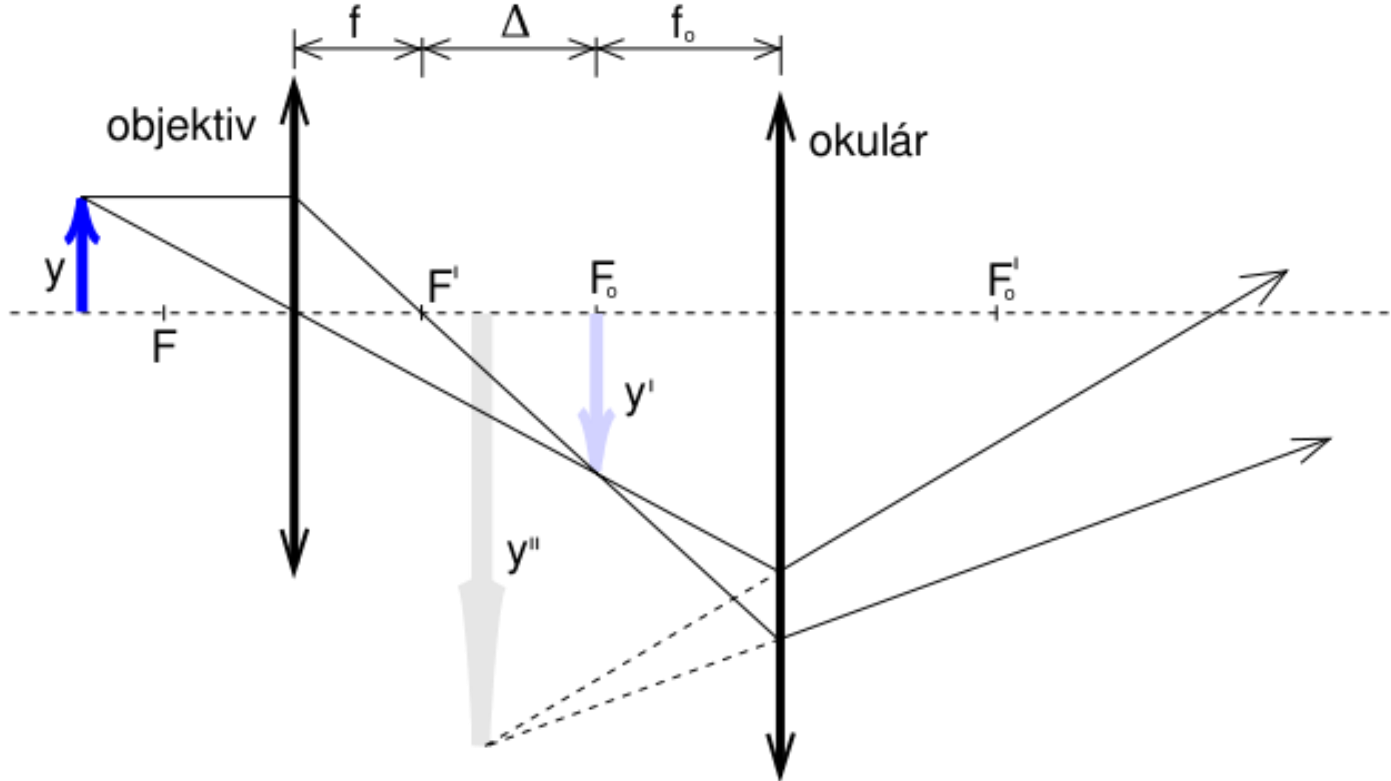
- Mikroskop – zařízení, které používáme k pozorování předmětů, které nejsme schopni spatřit pouhým okem.



Optická soustava mikroskopu:

- Objektiv – soustava čoček s velmi krátkou ohniskovou vzdáleností. Zobrazuje předmět převrácený, skutečný a zvětšený.
- Okulár – soustava čoček. Vytváří obraz zdánlivý, přímý a zvětšený.
- Kondenzor – je zjednodušeně osvětlovací soustava mikroskopu. (Ve skutečnosti má konstrukce kondenzoru významný vliv na kvalitu zvětšení a zobrazení zkoumaného předmětu.)

OPTICKÁ MIKROSKOPIE



- Rozlišovací schopnost mikroskopu – schopnost odlišit od sebe dva body. Je dáno především vlnovou délkou záření, které prochází mikroskopem. U světelné mikroskopie je přibližně $0,25 \mu\text{m}$. (cca 1000x více než u lidského oka)

- Zvětšení mikroskopu – Maximální užitečné zvětšení je až 2000x.

(Maximální užitečné zvětšení je však silně závislé na konstrukci mikroskopu.)

OPTICKÁ MIKROSKOPIE - OMEZENÍ

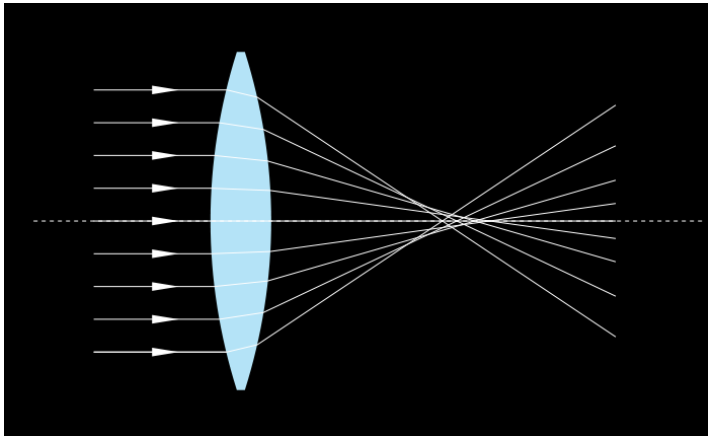
- Bodová rozlišovací mez oka je cca 0,2 mm
- Bodová rozlišovací mez mikroskopu je cca 0,002 mm
- **Objektiv má tím lepší rozlišovací schopnost, čím bližší dva body dovede rozlišit, neboli čím je vzdálenost „d“ mezi nimi menší.**
- Mez rozlišení mikroskopu (ovlivňuje):
 - Ohyb a interference světla
 - Numerická apertura
 - Kondenzor
 - Vady čoček
- Ohyb a interference - $d = \lambda / NA$
 - je dáno vlnovou délkou světla a numerickou aperturou
- Numerická apertura (NA) - $NA = n \cdot \sin \alpha$
 - Bezrozměrné číslo; dáno kvalitou objektivu a indexem lomu prostředí. Nejlepší objektivy mají NA cca 1,3)

OPTICKÁ MIKROSKOPIE - OMEZENÍ

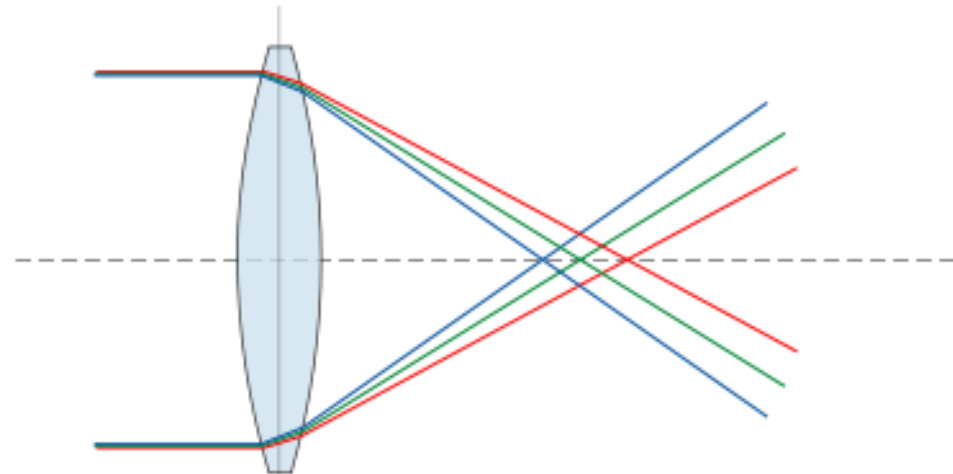
- Kondenzor - $d = \lambda / (NA_{\text{obj}} + NA_{\text{kon}})$

- Má za úkol efektivně koncentrovat světelný tok do roviny preparátu a do vstupní pupily objektivu. V praxi jde o technický problém konstrukce kondenzoru, jeho nastavení a kvality provedení.

- Vady čoček (základní)



Sférická aberace - světelné paprsky na okraji čočky se lámou více, než poblíž její optické osy.

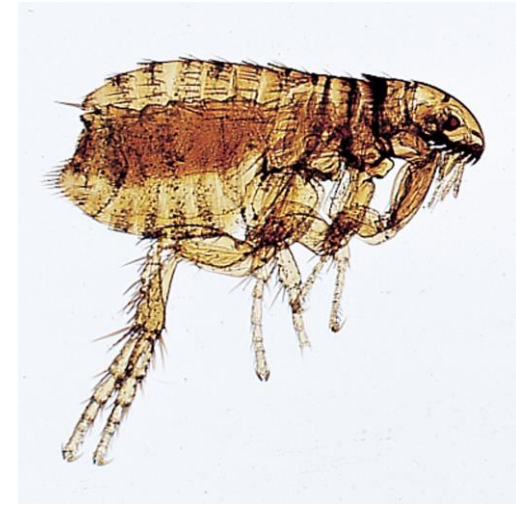
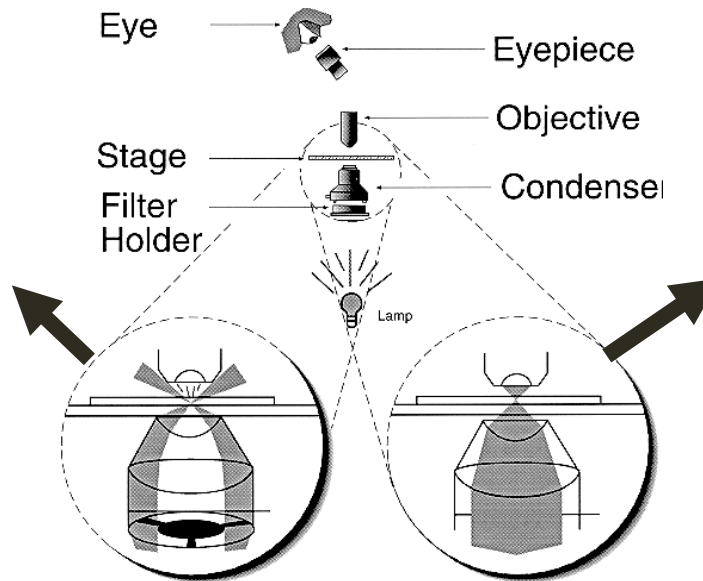


Chromatická aberace – ohnisková vzdálenost čočky je závislá na vlnové délce záření.

OPTICKÁ MIKROSKOPIE - OMEZENÍ

- Užitečné zvětšení mikroskopu – $Z_{\text{užitečné}} = d_{\text{RLO}}/d_{\text{min.}}$
 - d_{RLO} (rozlišovací schopnost lidského oka (200 μm ; 25 cm))
 - $d_{\text{min.}}$ (rozlišovací schopnost objektivu; pro nejlepší apertury je to cca 0,17 μm)
- Celkové užitečné zvětšení mikroskopu (zjednodušeně)
 - V praxi se jedná o zvětšení, které ještě vede k pozorování nových podrobností.
 - V případě, že se vzrůstajícím zvětšením nepozorujeme žádné nové detaily, ale pouze zvětšený obraz, jedná se o prázdné zvětšení. (dá se zjednodušeně připodobnit k digitálnímu zoomu)
 - $Z_{\text{užitečné celkové}} = (\text{zvětšení objektivu} \times \text{zvětšení okuláru}) \times \text{NA}$
- V praxi platí pro klasické světelné mikroskopy $Z_{\text{užitečné celkové}} = (500 \text{ až } 1000) \times \text{NA}$

OPTICKÁ MIKROSKOPIE – ZOBRAZOVACÍ METODY



• Zobrazovací metody:

• Metoda světelného pole (brightfield)

– Je metoda procházejícího světla, tedy světlo prochází vzorkem. Vzorek má pak tmavé obrysy a nachází se ve světlém poli.

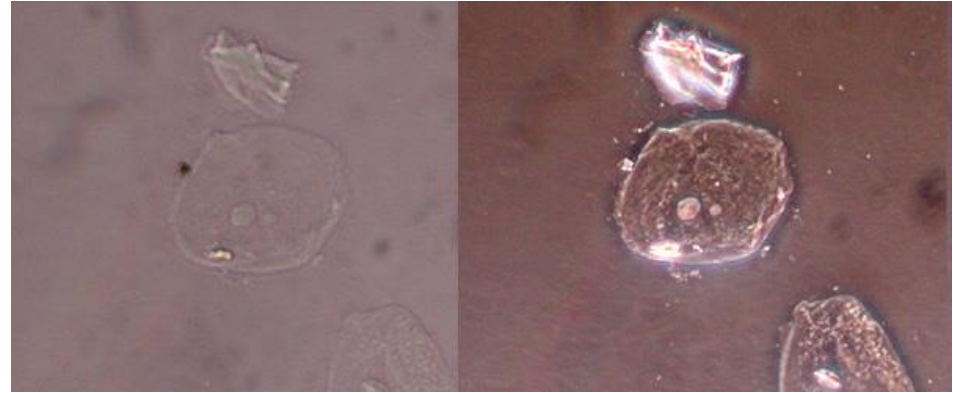
• Metoda tmavého pole (darkfield)

- do roviny vzorku vstupují světelné paprsky šikmo. Vzorek je tedy osvětlený ze stran do objektivu vstupuje jen světlo rozptýlené vzorkem. Vzorek se tedy jeví jako „svítící“ na tmavém pozadí.

OPTICKÁ MIKROSKOPIE - METODY

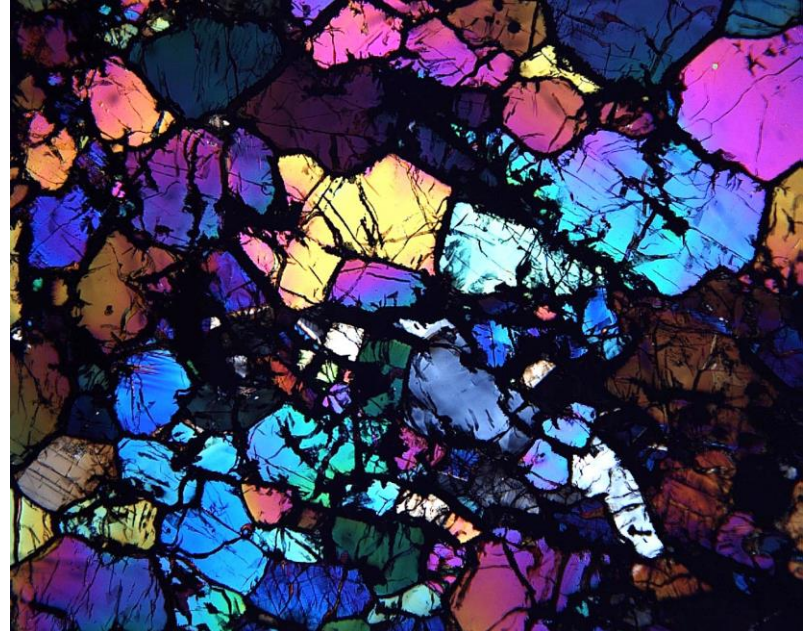
- Mikroskopie fázového kontrastu

- Metoda slouží ke zvýraznění kontrastu a průhledných struktur. Využívá se například v biologii pro zobrazení buněčné struktury.



- Polarizační mikroskopie

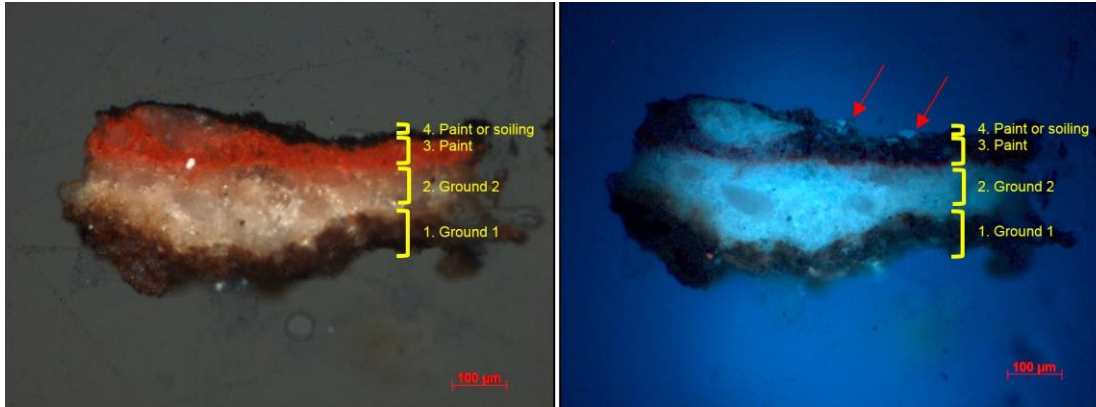
- Analyzujeme polarizované světlo – tj. vzorky schopné stáčet rovinu polarizovaného světla. (Nachází využití v geologii nebo materiálovém inženýrství pro studium krystalických rovin)



OPTICKÁ MIKROSKOPIE - METODY

• Ultrafialová mikroskopie

- Zdroj světla je v oblasti UV – zvyšuje rozlišovací schopnost mikroskopu
- (často najdeme ve spojení s fluorescenční mikroskopii)



• Infračervená mikroskopie

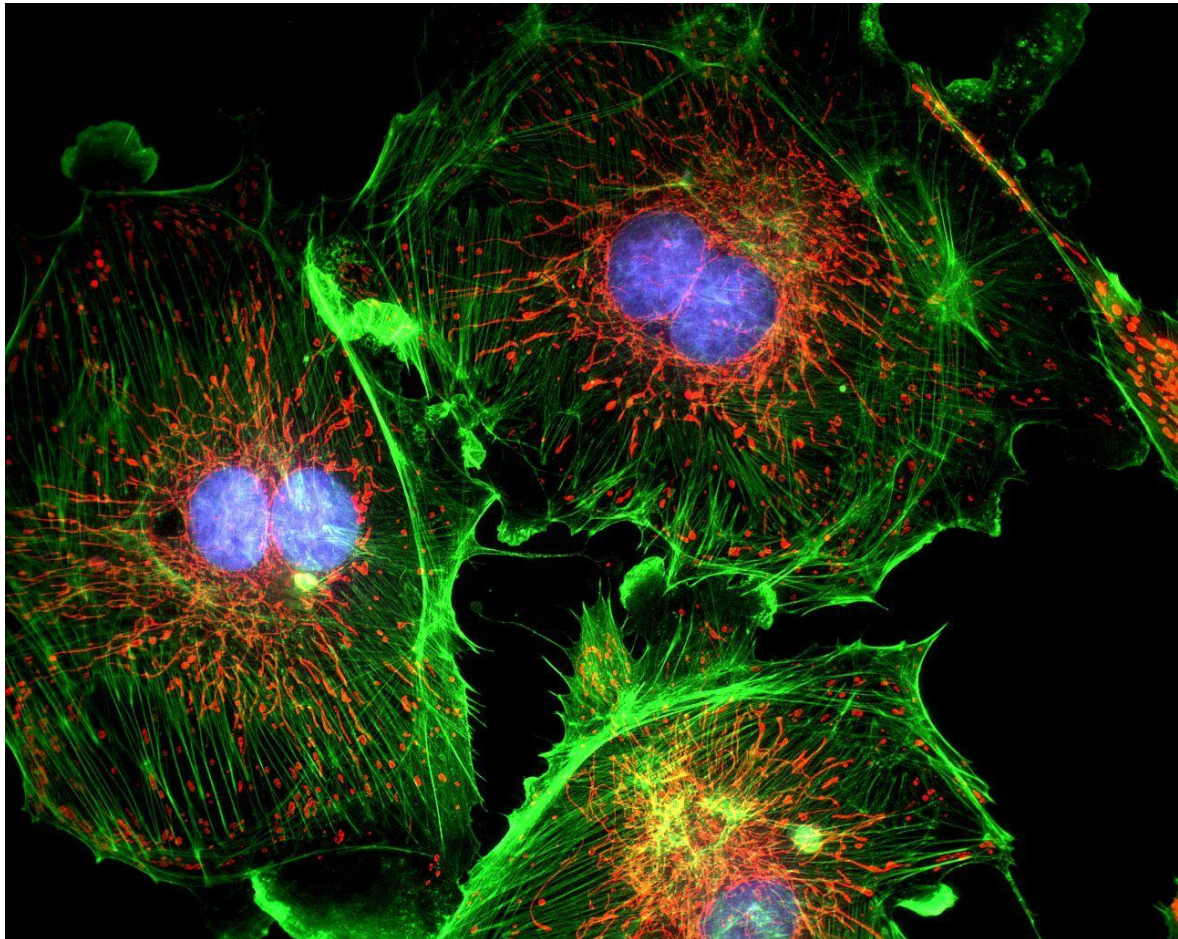
- Zdroj světla je v IR oblasti – na principu absorpce IR záření. (Často se používá v kombinaci s termickou analýzou nebo IR spektroskopií.)



OPTICKÁ MIKROSKOPIE - METODY

- Fluorescenční mikroskopie

- Na principu analýzy emitovaného záření barvivem. Jako zdroj se používá záření o kratší vlnové délce např. UV dioda, laser. Má důležité uplatnění v biologii pro studium buněčných struktur.



OPTICKÁ MIKROSKOPIE - METODY

• Konfokální laserová mikroskopie

- Konfokální mikroskop je využíván při studiu povrchových vlastností materiálů a měření výšky strukturních elementů. Má vyšší rozlišení než klasický světelný mikroskop.
- Zdrojem světla je laser.
- Konfokální mikroskop s rozmítaným laserovým paprskem označujeme jako CLM (LSCM). Rastrování probíhá posouváním paprsku pomocí clony postupně do všech bodů roviny v ose Z.
- Pokud je postupně nasnímáno dostatečné množství rovin, je možné pomocí počítače složit 3D model preparátu.
- Lze kombinovat s fluorescenčními technikami pro biologické preparáty.

