

SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE

ÚVOD DO PŘEDMĚTU BI1301

Botanická mikrotechnika

Hana Cempírková

Časové mezníky historie světelného mikroskopu

- začátky světelné mikroskopie - asi před 400 lety
- 1590 (1595?) - **Hans a Zacharias Janssenovi** první složený mikroskop
- 1653 - **Anthony van Leeuwenhoek** (1632-1723)
- 1665 – **Robert Hook**
- 1829 – **J.J.Lister** - konstrukce achromatického objektivu (kombinace čoček) – rozšíření použití mikroskopů v biologii, medicíně, mineralogii, chemii
- 1828 - **William Nicol** - hranol z islandského vápence slepený kanadským balzámem = Nicolův hranol - polarizační mikroskopie - využití v mineralogii, průmyslu i biologii
- 1870 – **Ernst Abbe** (Abbeův kondenzor)
- 1931 – Ernst Ruska – první elektronový mikroskop

První složený mikroskop

- výrobce brýlí Zacharias Janssen a otec Hans
- Okulár a objektiv



The First
Compound
Microscope
(circa 1595)

rozsah zvětšení 3 – 10x



„Galileův“ mikroskop



vyrobený podle
principu Janssenova
mikroskopu =
zaostřování výsuvem
tubusu



Galileo
Microscope
(circa late 1600s)

tento mikroskop ze
17. století přisuzován
Galileovi byl vyroben
asi až 50 let po jeho
smrti

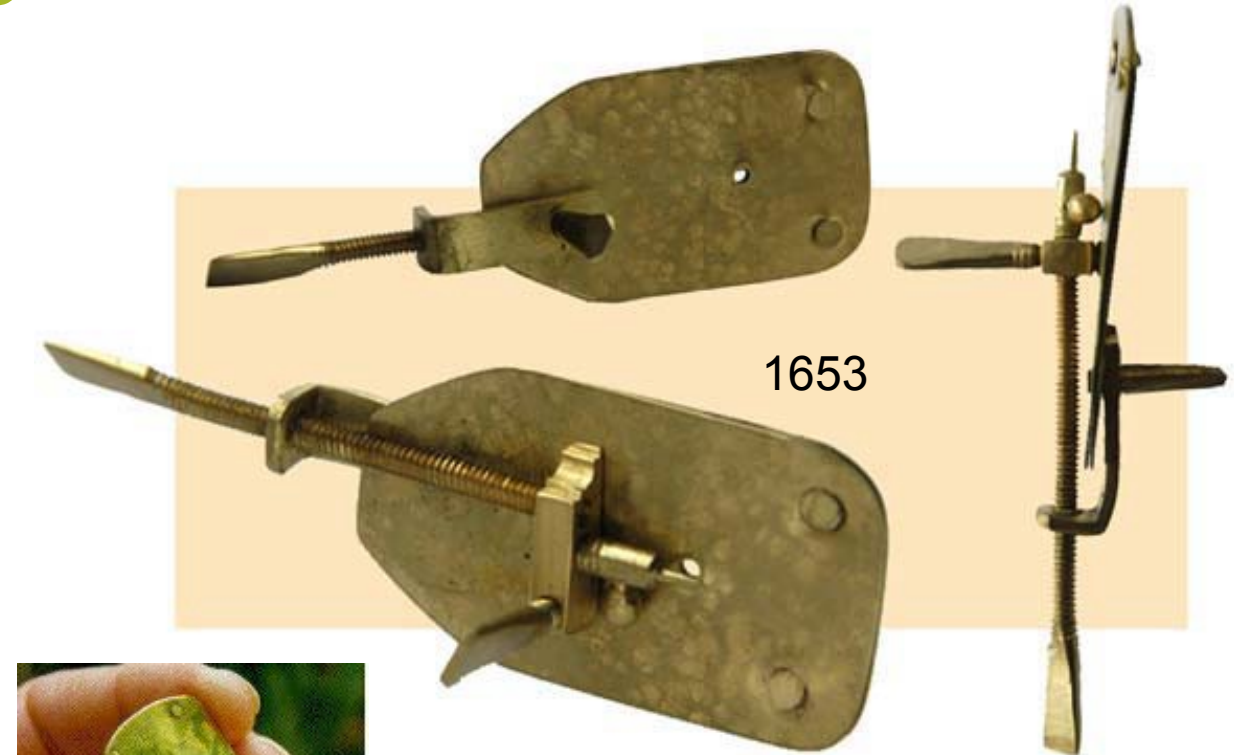
<http://www.library.ethz.ch/exhibit/galilei/galileod6.html>

micro.magnet.fsu.edu/primer/museum/galileo.html

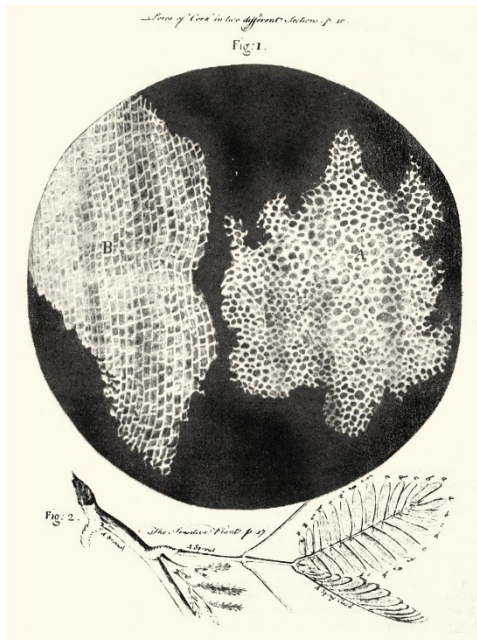
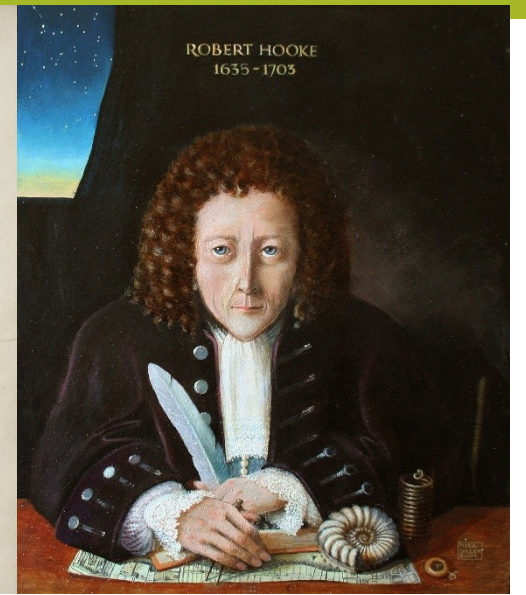
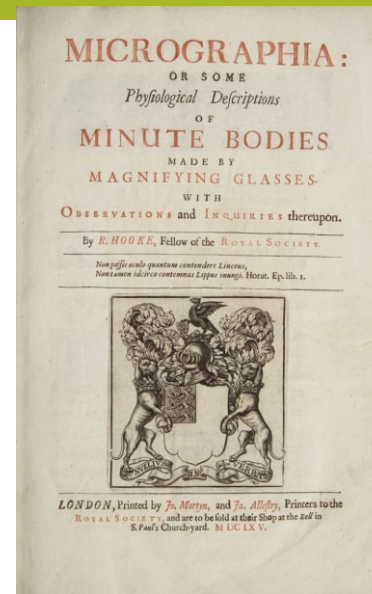
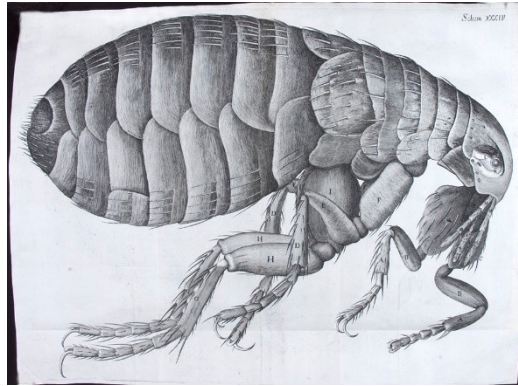
Anthoni van Leeuwenhoek jednoduchý mikroskop



Thonis Philipszoon (1632-1723)
"Anthony from the Lion's Corner"

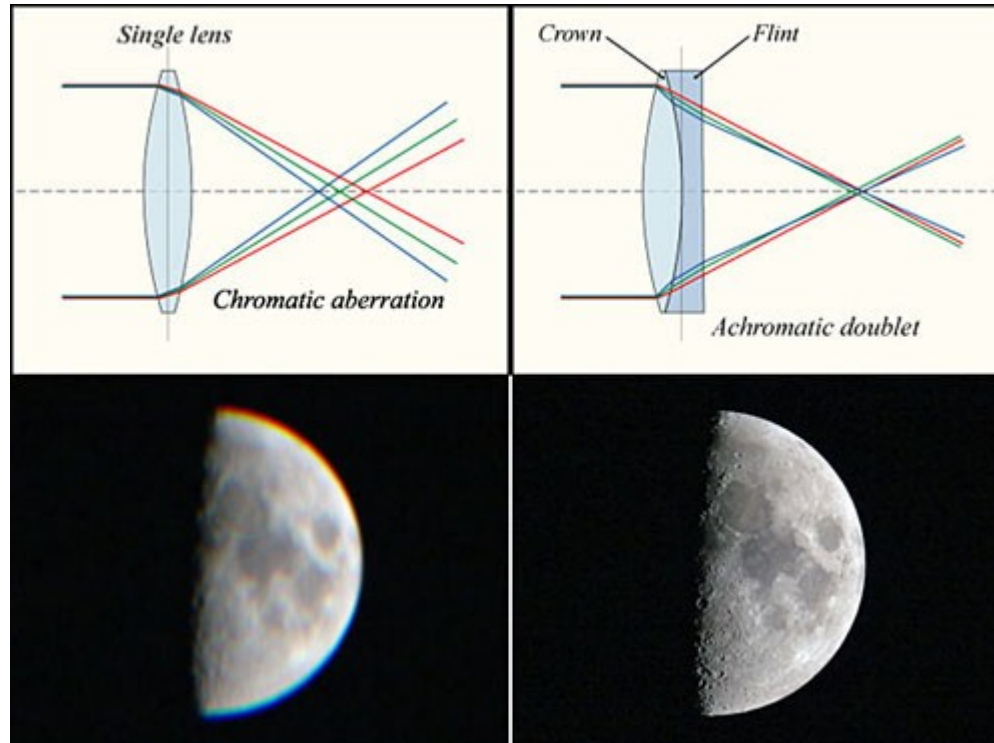


Robert Hooke - Micrographia

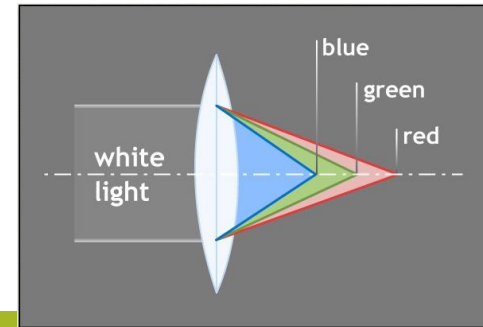


- 1665
- Primitivní složený mikroskop
- Vlastnoruční kresby
- V řezech korku pojmenoval „buňky“

J.J. Lister – achromatický objektiv



Vada barevná (chromatická): čočka má pro každou složku polychromatického světla jiné ohnisko (index lomu je $f(\lambda)$) - barevná vada velikosti nebo polohy obrazu



Mikroskopy 18. století



tubus z mahagonu

John Marshall
Compound
English
Microscope
(circa 1720)

stativ z ořechu



Benjamin Martin
Drum Microscope
(circa 1760)

Mikroskopy v expozici muzea v klášteře Zlatá Koruna

- mechanické části
mosazné a dřevěné



19. století

Zakladatelé firmy Carl Zeiss Jena



Ernst Abbe (1840 - 1905)

Abbeův kondenzor



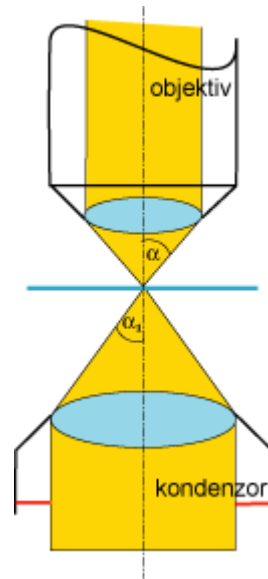
Carl Zeiss (1816 - 1888)

August Köhler - otec správného nastavení osvětlení mikroskopu

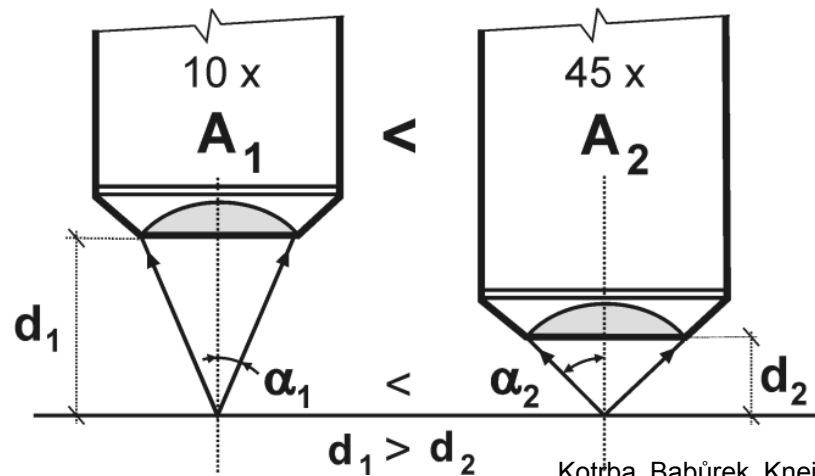
Předpokladem pro plné využití NA objektivu je, že kužel paprsků vycházejících z kondenzoru osvětlujících preparát odpovídá numerické apertuře objektivu.

Kondenzor, objektiv a preparát musí být vůči sobě umístěny tak, aby preparát ležel ve společném ohnisku kondenzoru a objektivu

Numerická apertura (NA) vyjadřuje v mikroskopii účinnou světelnost objektivu. Je to bezrozměrné číslo, které lze vyjádřit matematickým zápisem:
 $NA = n \cdot \sin \alpha$



August Köhler
(1866 - 1948)
Köhlerův princip



$d_1 > d_2$

Kotrba, Babůrek, Knejzlík:
Návody ke cvičením z biologie,
VŠCHT Praha, 2006

reálné $\alpha = 140^\circ$
 $\sin 70^\circ = 0,939$
 $n(\text{vzduch}) \approx 1$
 $A (NA) = 0,94$

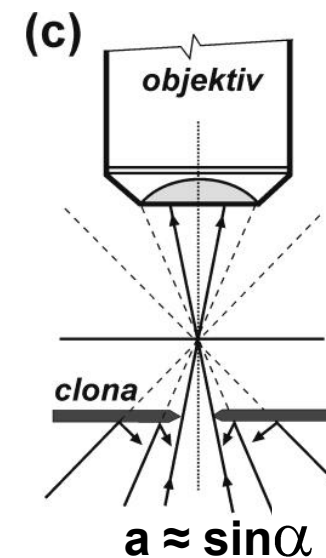
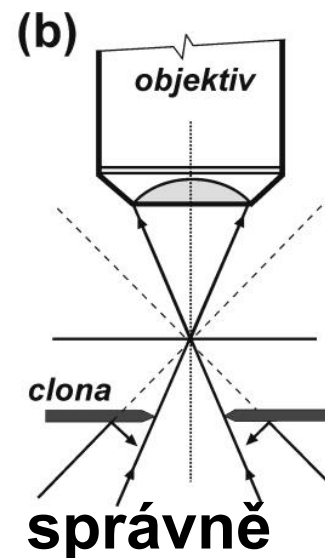
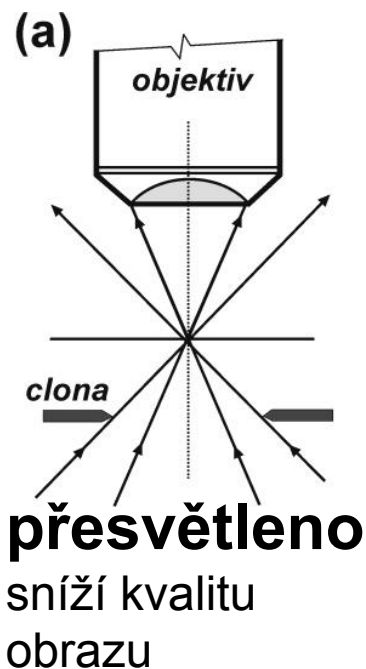
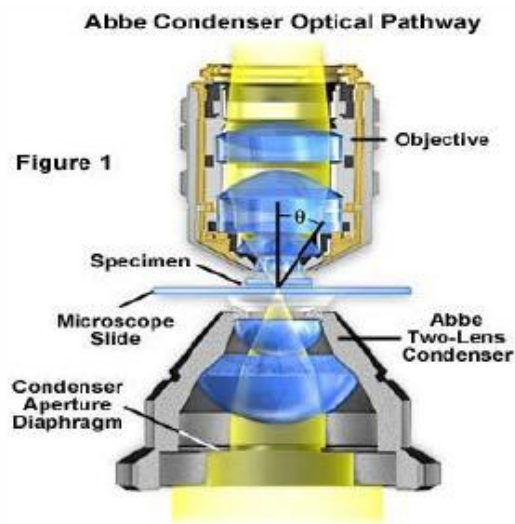
$$A = n * \sin \alpha/2$$

α ... Polovina úhlu svíraného paprsky vycházejícími z objektu, které jsou zachyceny objektivem

n ... index lomu prostředí

Kondenzor = „převrácený objektiv“

soustava čoček s krátkou ohniskovou vzdáleností
(průměr čoček větší, barevná a kulová vada neodstraněna)



Kotrba, Babůrek, Knejzlík:
Návody ke cvičením z
biologie, VŠCHT Praha, 2006

Apertura (NA) kondenzoru má být shodná s aperturou objektivu (pankratický kondenzor – plynulá změna apertury od 0,16 do 1,4 v soulase s použitým objektivem) - možná úprava na hodnotu shodnou s objektivem pomocí irisové clony

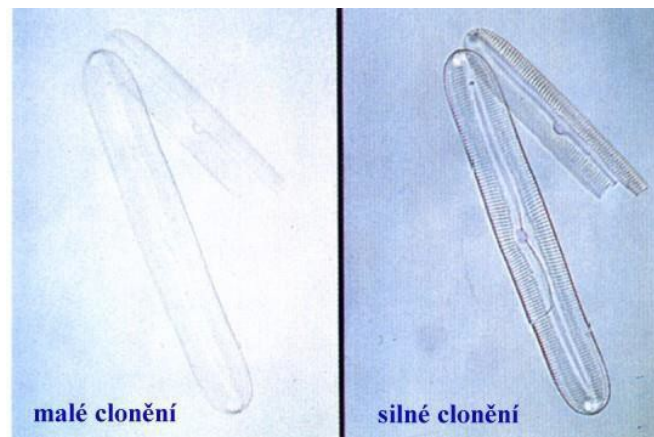
Clony u kondenzoru

regulace množství světla, přicházejícího do mikroskopu:

irisová (aperturní) clona – pod kondenzorem
polní clona – blíže zdroje světla

Cloněním ovlivňujeme:

- **kontrast**
- **hloubku ostrosti**
- **rozlišení podrobností**
- **jas**



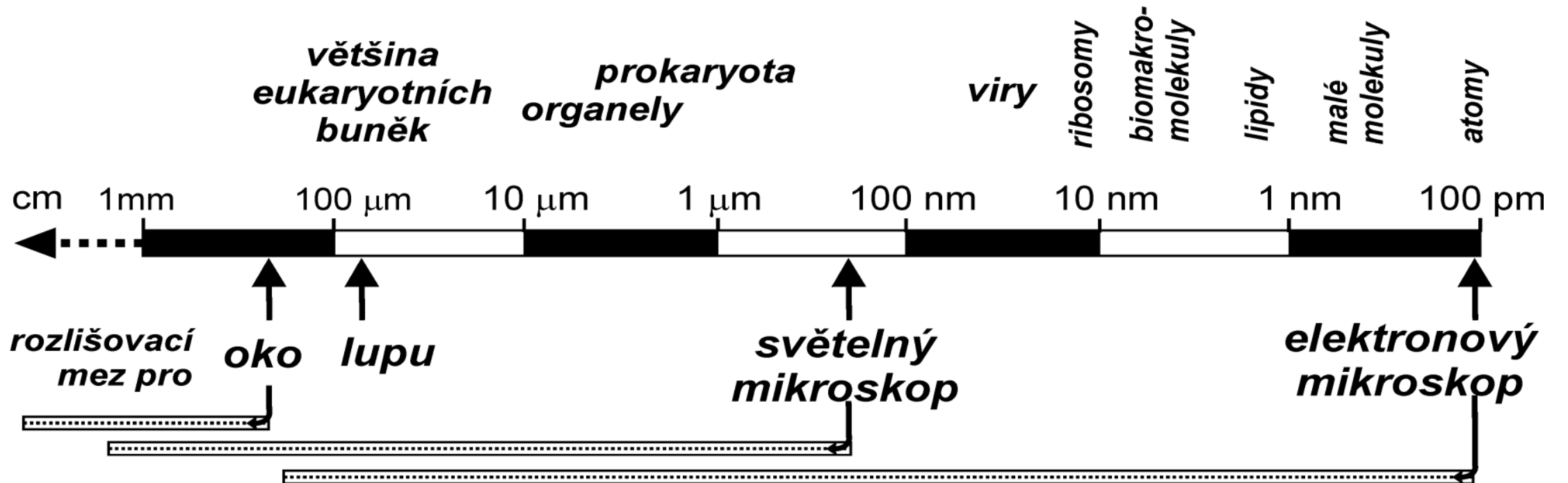
Jednotlivé parametry nelze nastavit nezávisle:

Aperturní clona kondenzoru	Kontrast	Hloubka ostrosti	Rozlišení	Jas
zcela otevřená	malý	malá	velké	velký
zcela zacloněná	velký	velká	malé	malý

Zlepšování rozlišovací schopnosti

- definice rozlišovací schopnosti: $a = 0.61 \lambda / (n \cdot \sin \alpha)$, kde $n \cdot \sin \alpha = NA$ (numerická apertura)
- Zvýšení rozlišení: snížení λ nebo zvýšení NA, resp. n (imerzní olej)
- počátek 19. století = asi $0,5 \mu\text{m}$
- s Köhlerovým osvětlením a lepšími čočkami (Abbeův kondenzor) se limit zmenšil na $\lambda/2 = 0,3 \mu\text{m}$
- s použitím UV ($\lambda = 254 \mu\text{m}$) = rozlišení $0,1 \mu\text{m}$
- od poloviny 20. století - rozvoj elektronové mikroskopie
 - SEM 3 nm
 - TEM $0,2 \text{ nm}$

Rozlišovací schopnost/mez



Kotrba, Babůrek, Knejzlík: Návod k cvičením z biologie, VŠCHT Praha, 2006

rozlišovací mez = nejmenší vzdálenost mezi dvěma body, které daná soustava rozliší jako dva body