

Белорусский государственный университет
кафедра генетики

Современная микроскопия

С. В. Глушен





План лекции

- Геометрическая оптика и микроскоп
- Волновая природа света
- Дифракционная теория микроскопа
- Формула Аббе
- Настройка микроскопа по Кёлеру

Классификация методов микроскопии

Microscopy	Микроскопия	Физический принцип
Far field	дальнего поля	дифракция световых волн
Near field	ближнего поля	слабые стоячие волны, возникающие на границе раздела двух сред - evanescent waves
Full field	полного поля	стоячие волны, формируемые лазером в пространстве

Геометрическая оптика и микроскоп

Геометрическая оптика базируется на принципе Ферма.

Он гласит, что свет, идущий из одной точки в другую, выбирает наиболее быстрый путь.

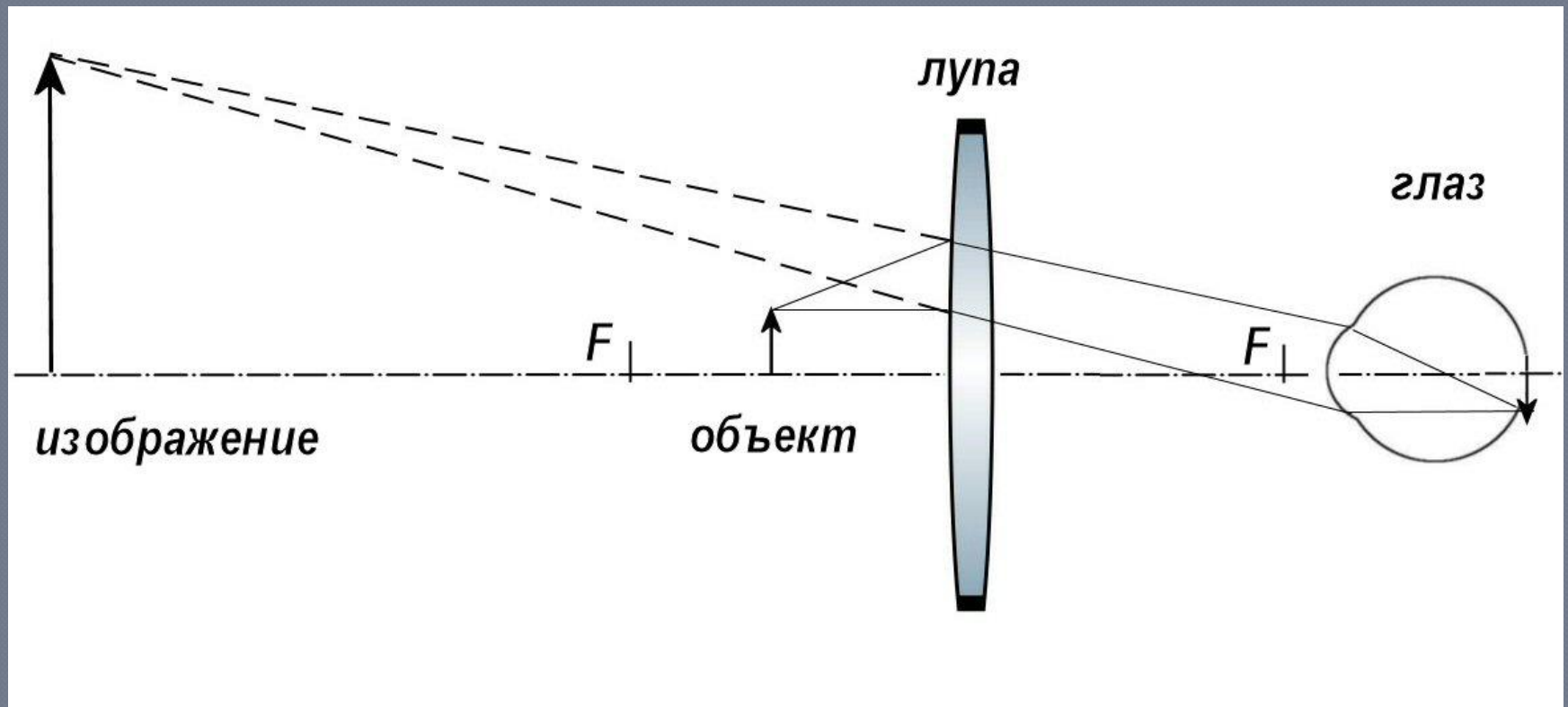
В однородной среде это будет прямая линия, тогда как в неоднородной среде он превратится в ломаную, которая изменит направление на границе раздела фаз, имеющих различную плотность.

Все законы геометрической оптики, как то *закон прямолинейного распространения света,* *закон независимого распространения лучей,* *закон отражения,* *закон преломления и* *закон обратимости светового луча* являются следствием этого принципа.

Простой микроскоп, или лупа



Ход лучей в лупе

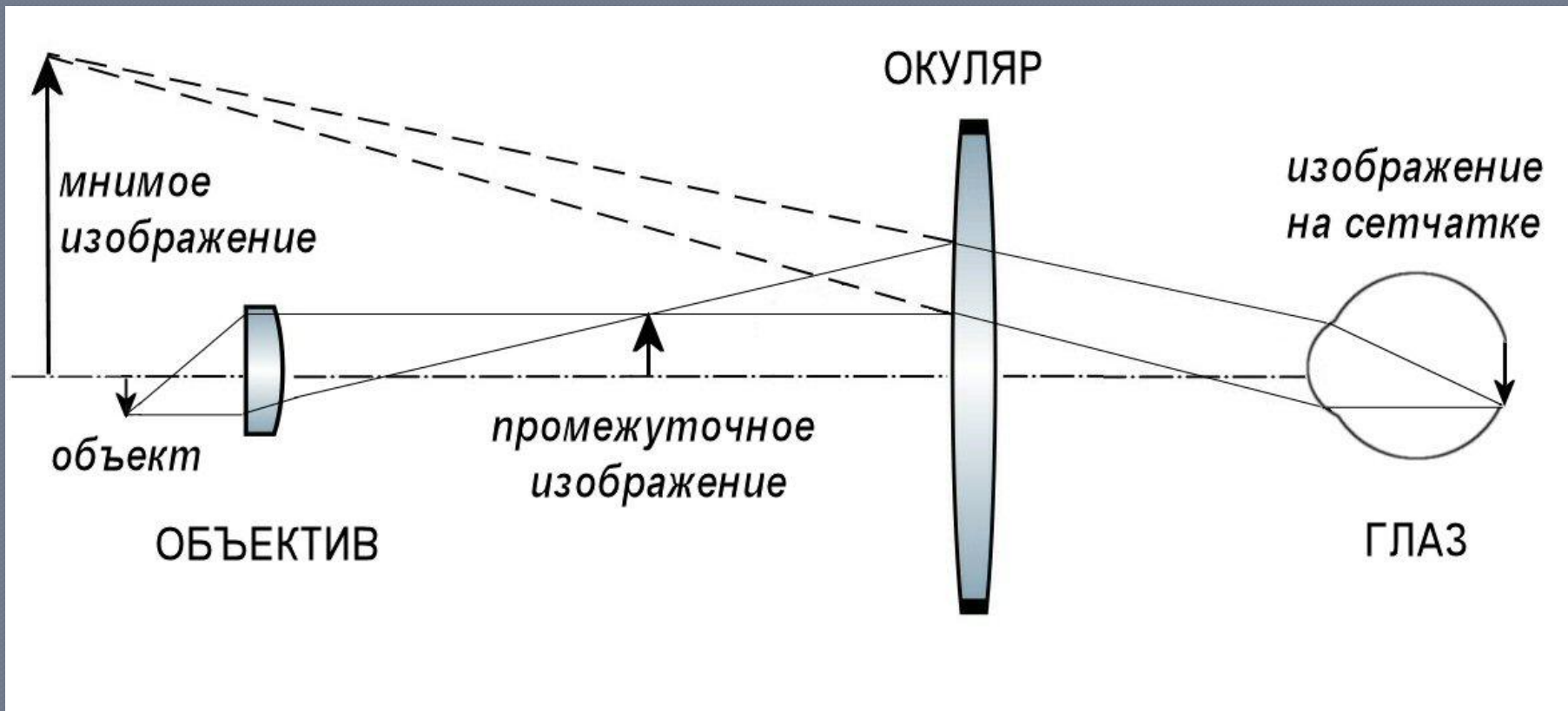


Номинальное увеличение $M = 250/\Phi R$

Сложный микроскоп



Ход лучей в сложном микроскопе

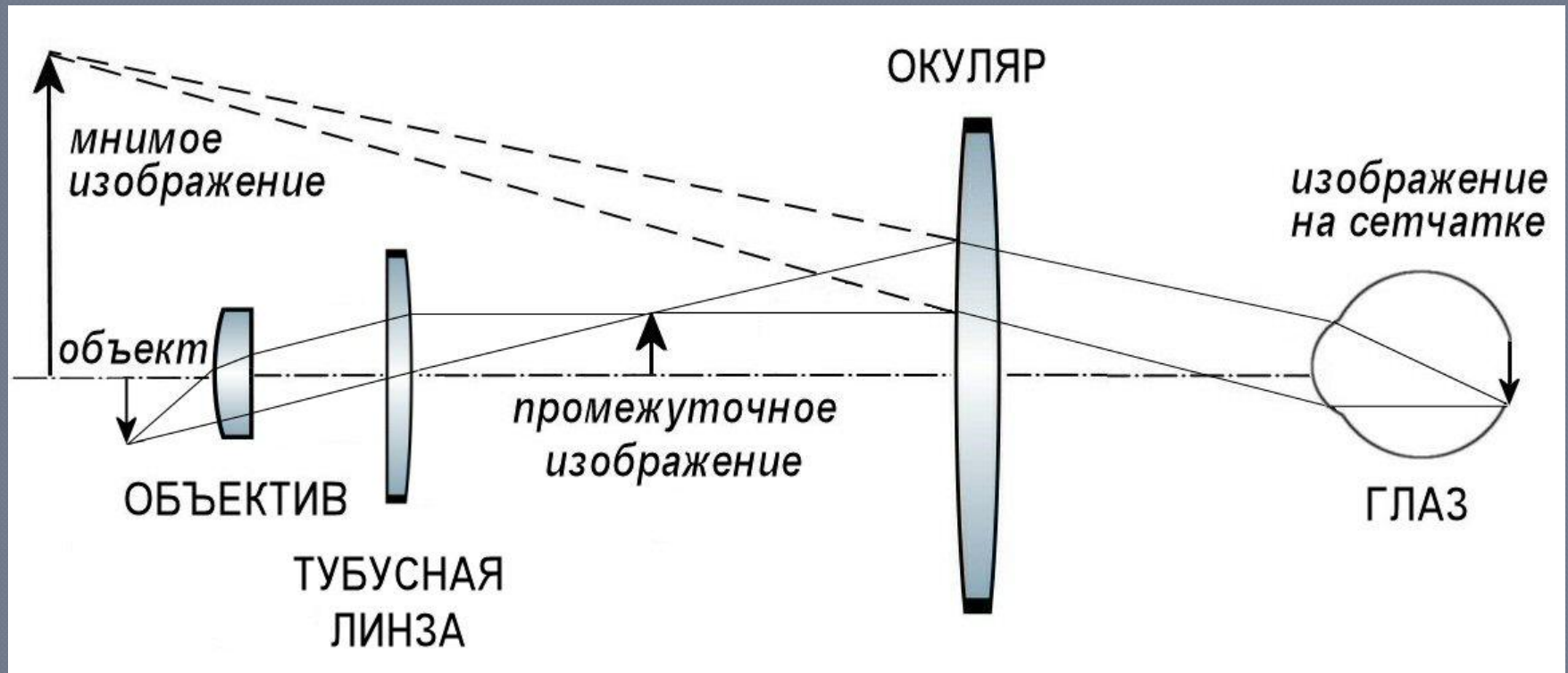


$$\text{Увеличение } M = M_{\text{об}} \times M_{\text{ок}}$$

Современный микроскоп



Ход лучей в современном микроскопе



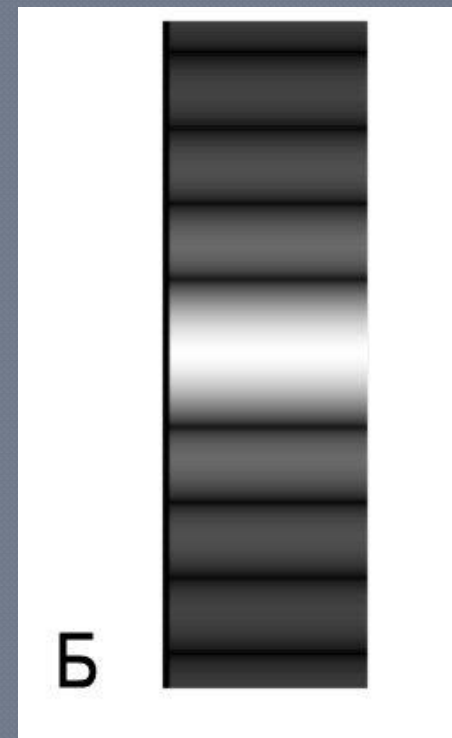
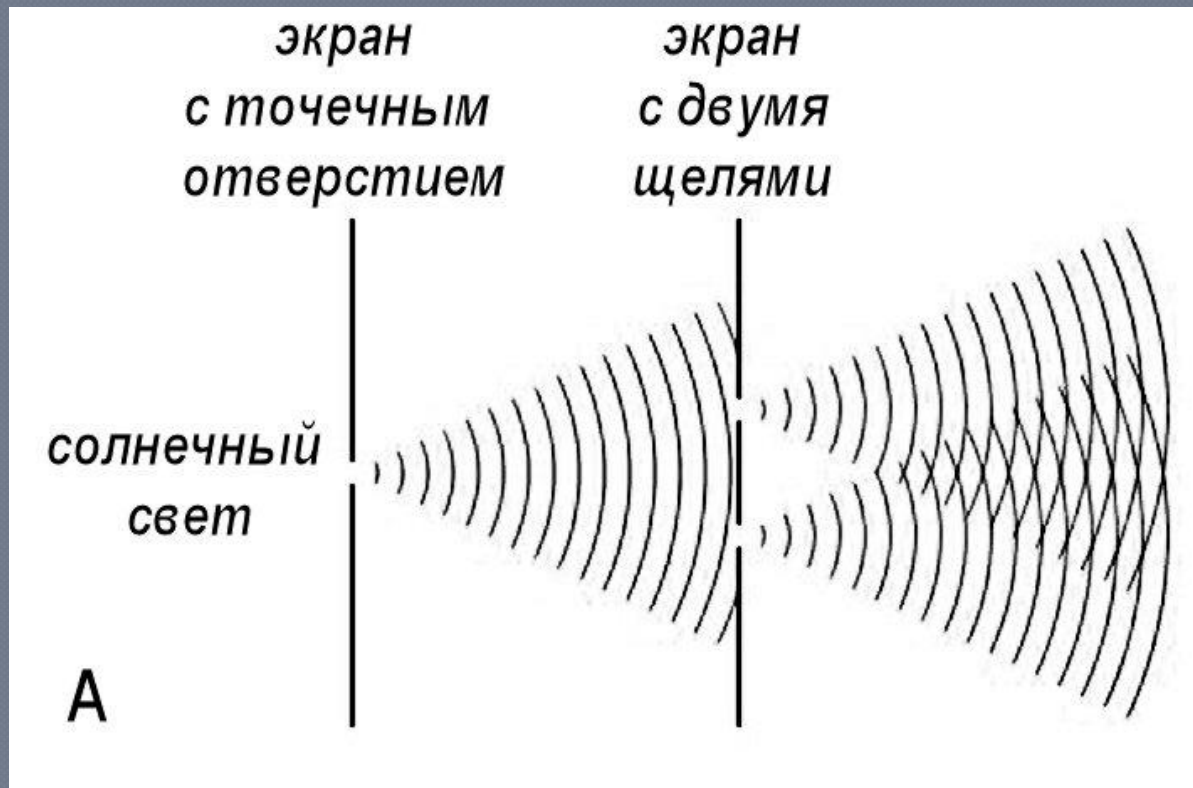
$$\text{Увеличение } M = M_{\text{об}} \times M_{\text{тл}} \times M_{\text{ок}}$$

Волновая природа света

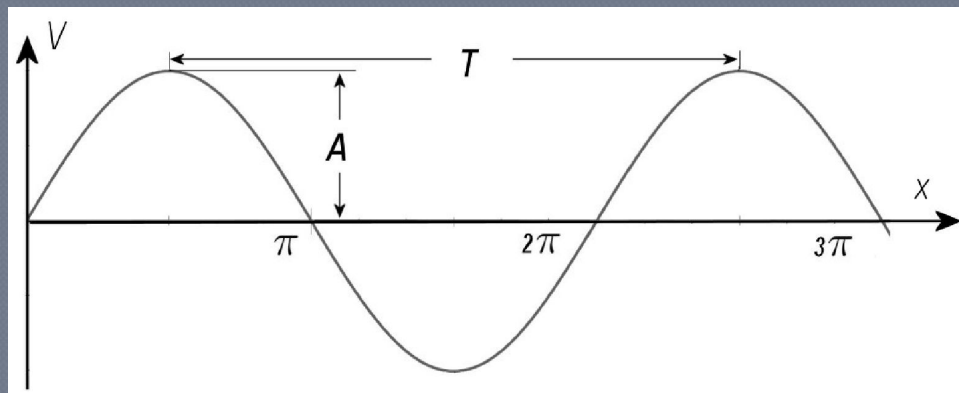
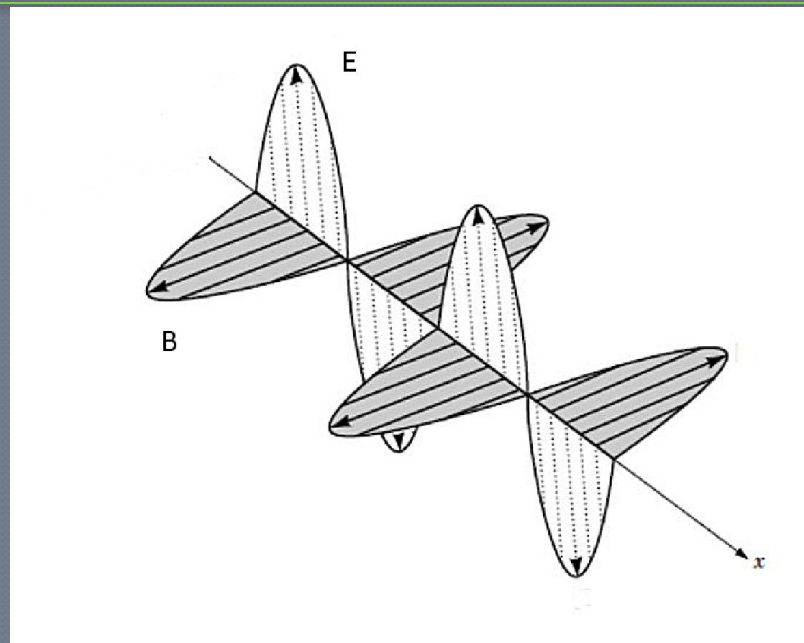


camera obscura

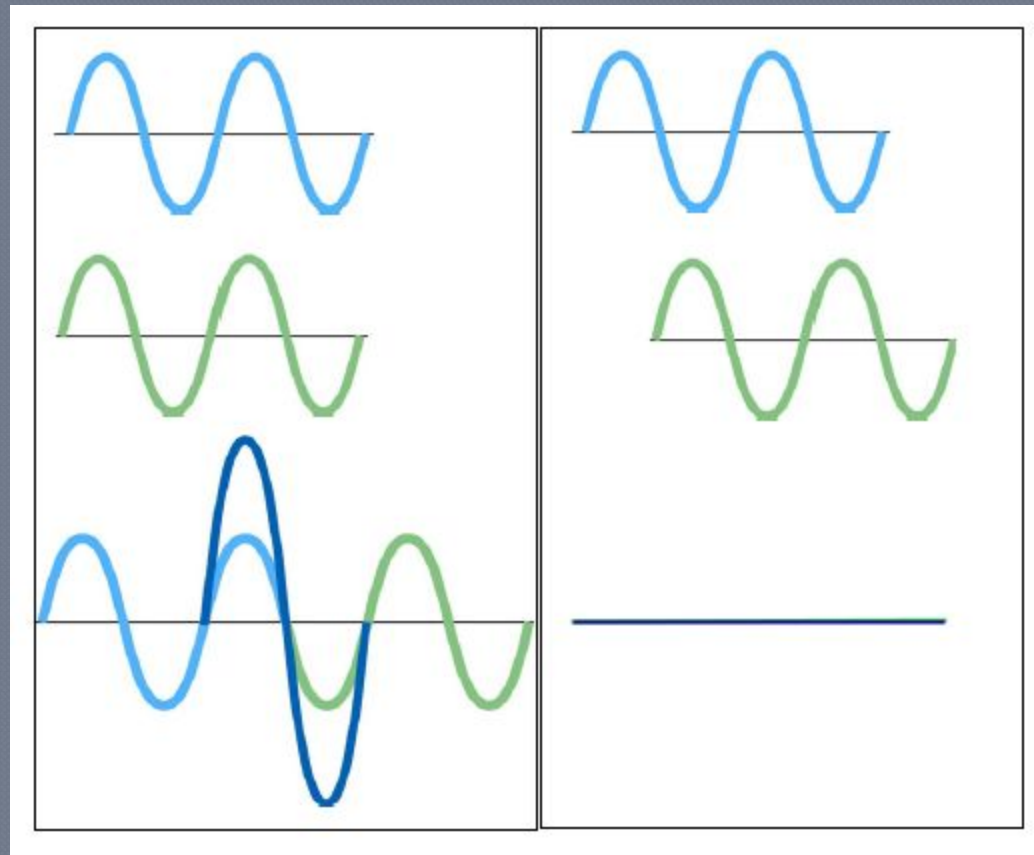
Эксперимент Томаса Юнга



Волновая природа света

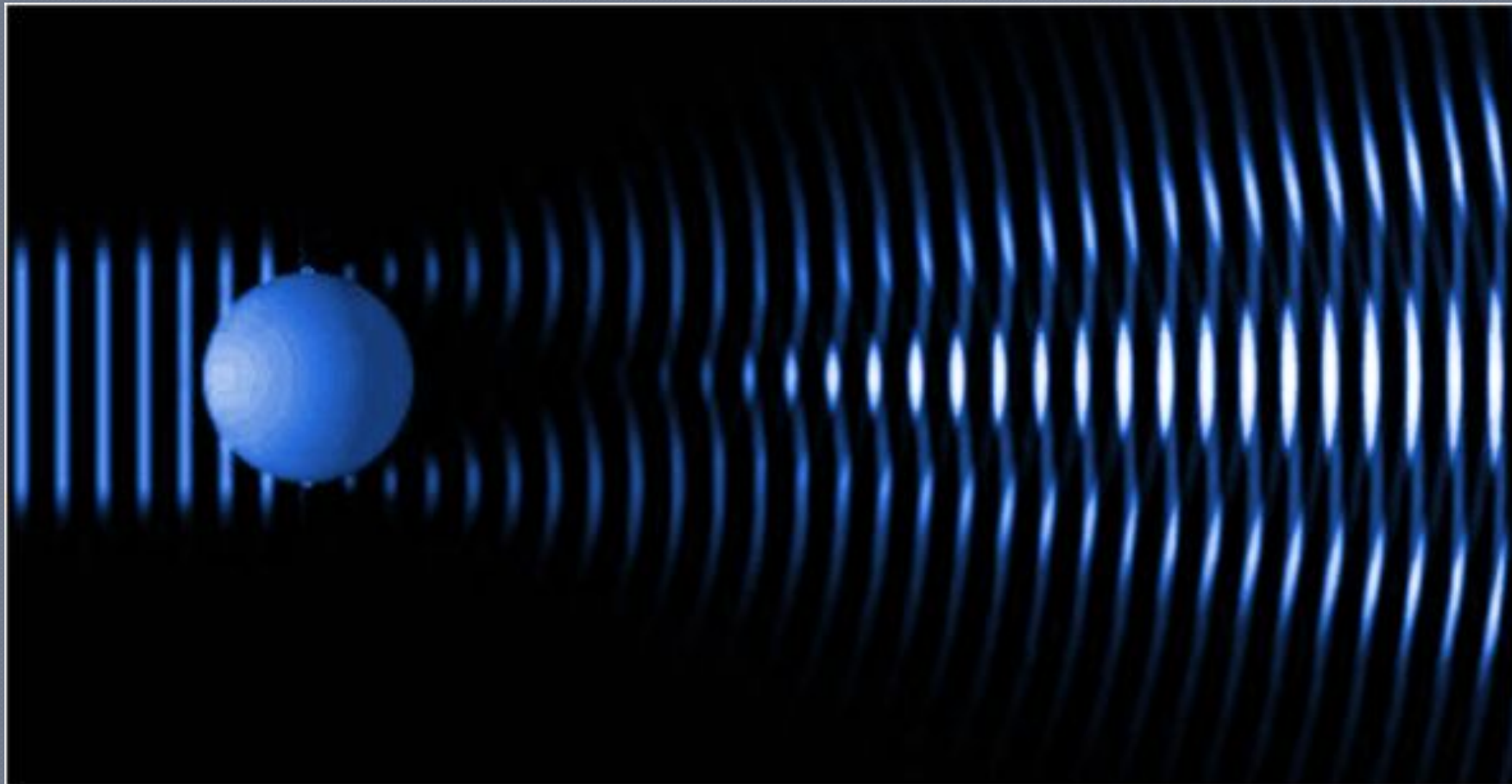


Интерференция



Условием интерференции световых волн является их **когерентность** – постоянство длины волны и разности фаз

Дифракция



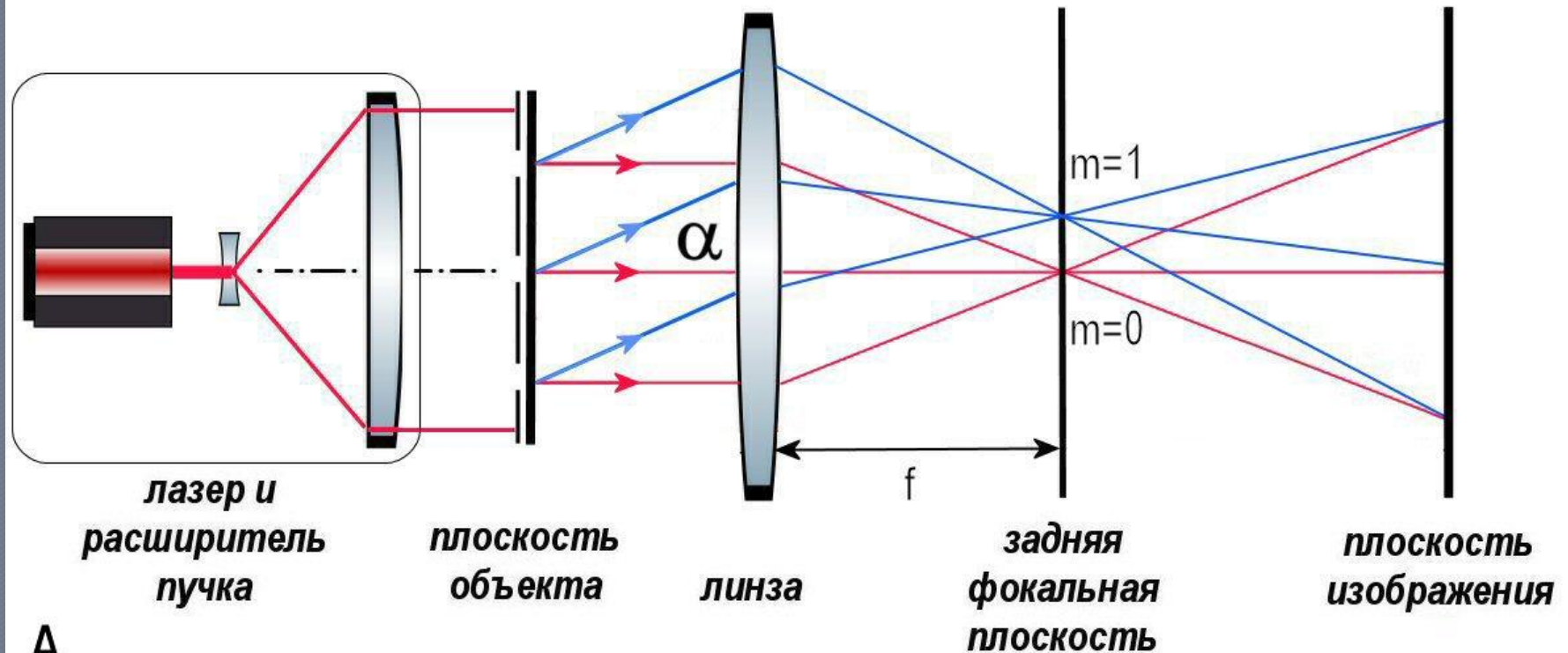
Дифракцией называется огибание волнами препятствий на их пути

Дифракционная теория микроскопа



Эрнст Карл Аббе (1840-1905)

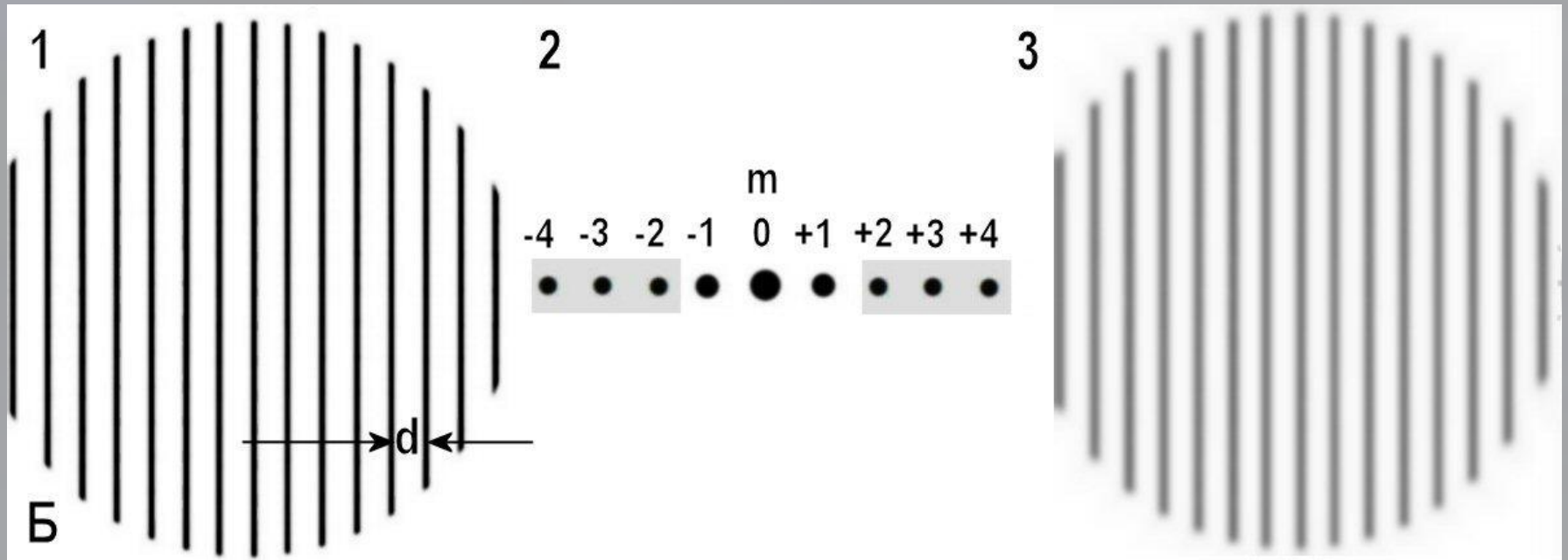
Эксперимент Аббе



A

$$d * \sin \alpha = m * \lambda$$

Эксперимент Аббе

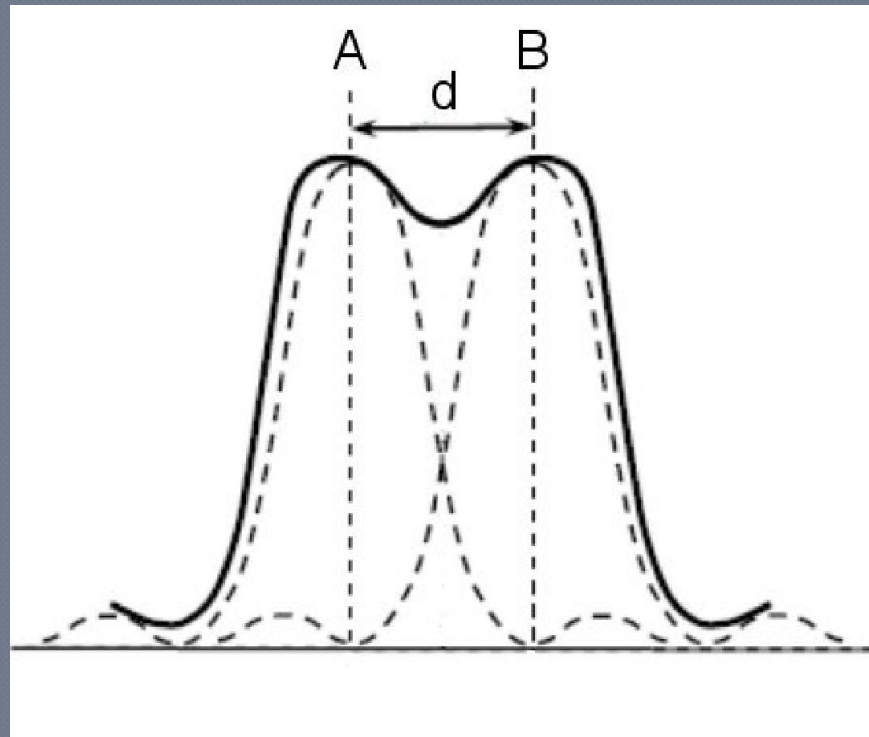


$$d * \sin \alpha = m * \lambda$$

Выводы из эксперимента Аббе

- Один и тот же объект может давать различные изображения, если модифицировать его дифракционную картину;**
- Ограничение по области дифракции приводит к ухудшению качества изображения;**
- Для формирования изображения центрального максимума недостаточно;**
- Формируемое микроскопом изображение не может быть копией объекта, а только приближением к нему ввиду существующих ограничений.**

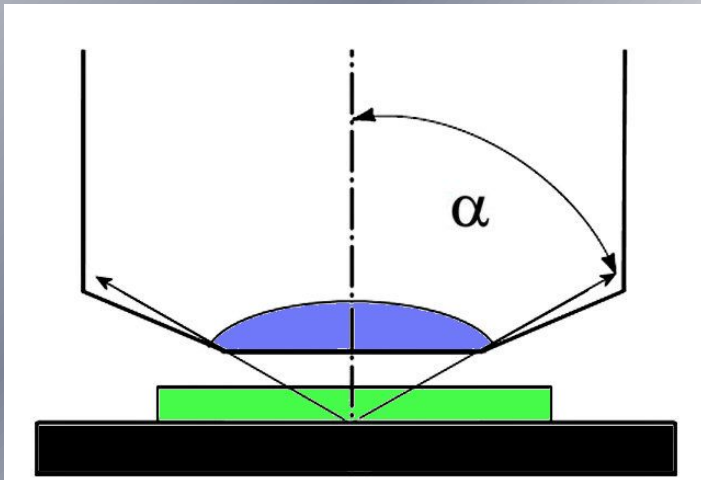
Разрешающая способность объектива



Оптическое разрешение есть минимальное расстояние между двумя точками изображения, пока они еще видны раздельно

Формула Аббе

$$d = \lambda / n \sin \alpha$$



λ – длина волны света;

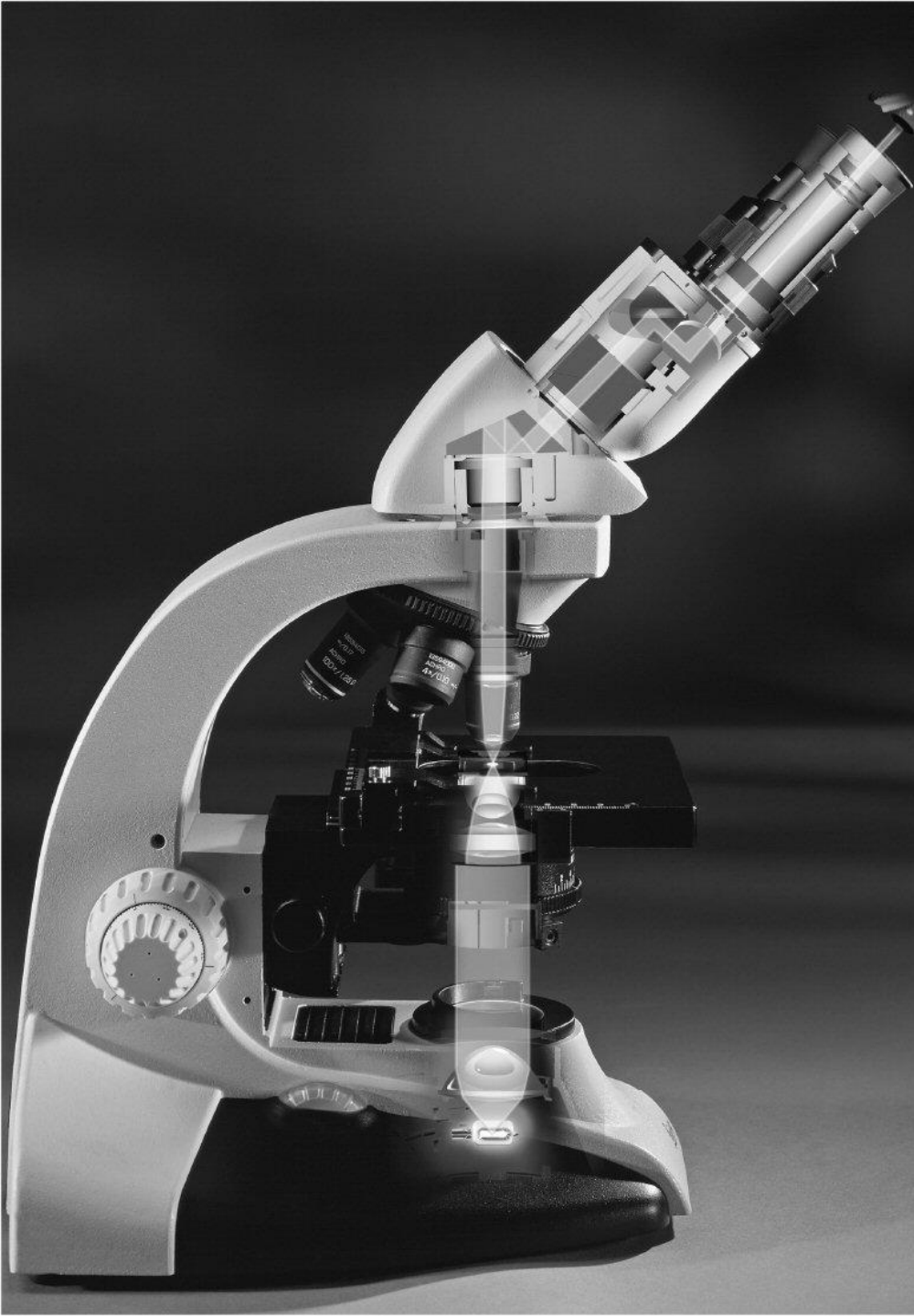
n – показатель преломления
среды

α – половина угла раскрытия
объектива

1-ая модификация формулы

$$d = \lambda / NA$$

λ – длина волны света; $NA = n \sin\alpha$ – численная апертура (относительное отверстие) объектива



2-ая модификация формулы

$$d = \lambda / 2NA$$

при условии
равенства
апертур
объектива и
конденсора

3-ая модификация формулы Аббе

с учетом частичной когерентности освещения в микроскопе:

$$d = 0.61\lambda / NA$$

Формула Аббе показывает, что разрешающая способность микроскопа тем выше, чем меньше длина волны света, используемого для освещения препарата, и чем больше численная апертура объектива.

съемка живых клеток
плоское поле
флюоритовое
стекло

увеличение/апертура
дифференциально-
интерференционный
контраст

коррекция на
бесконечность

толщина покровного
стекла 0 или 0.19-0.15 мм

настройка на толщину
покровного стекла
выбор типа иммерсии

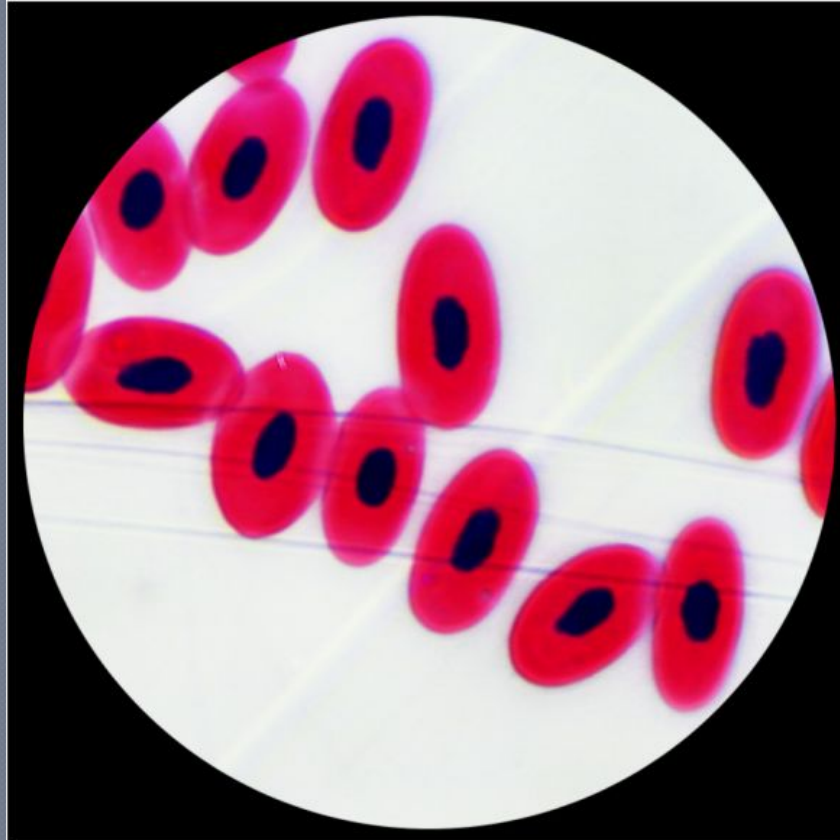


Настройка микроскопа по Кёлеру



- Определить положение полевой и апертурной диафрагм в микроскопе.
- Установить объектив малого увеличения. Полностью открыть обе диафрагмы.

Настройка микроскопа по Кёлеру



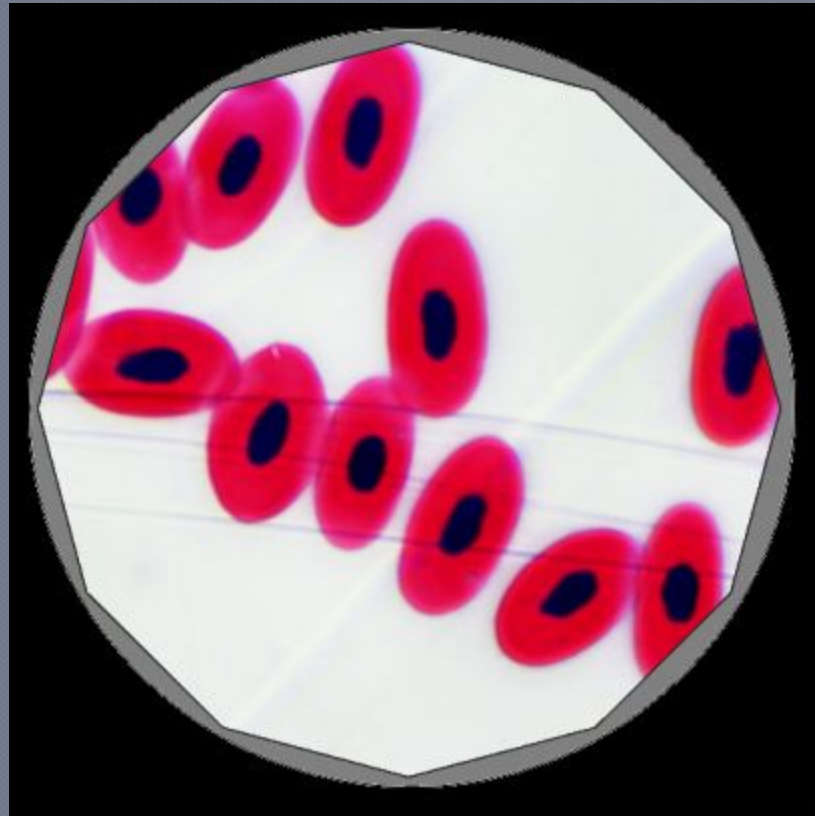
3. Поместить на предметный столик препарат и сфокусироваться на него.

Настройка микроскопа по Кёлеру



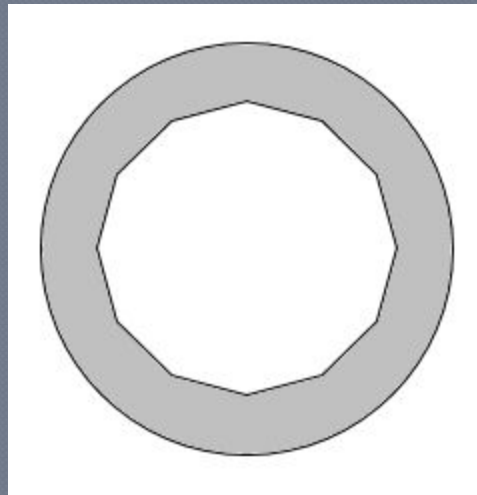
4. Закрывать полевую диафрагму и, передвигая конденсор по высоте, добиться ее резкого изображения. Если надо, отцентрировать диафрагму, передвигая конденсор

Настройка микроскопа по Кёлеру



5. Открыть полевую диафрагму до границ поля зрения

Настройка микроскопа по Кёлеру



6. Вынуть окуляр и уменьшить размеры апертурной диафрагмы на 20-40%. Вернуть окуляр на место

Эритроциты и лейкоцит крови лягушки



Повторить все операции для объектива с другим увеличением

**СПАСИБО ЗА
ВНИМАНИЕ**
