



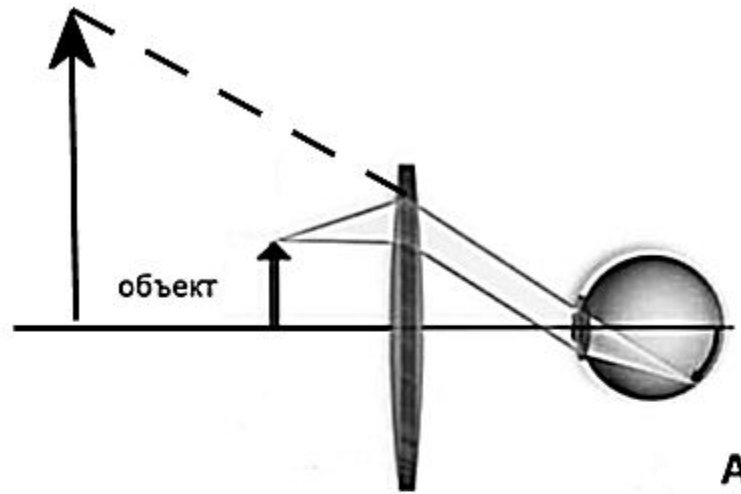
План лекции

- Теория микроскопа
- Методы светлого и темного поля
- Флуоресцентная микроскопия
- Конфокальная микроскопия
- Световая микроскопия высокого разрешения

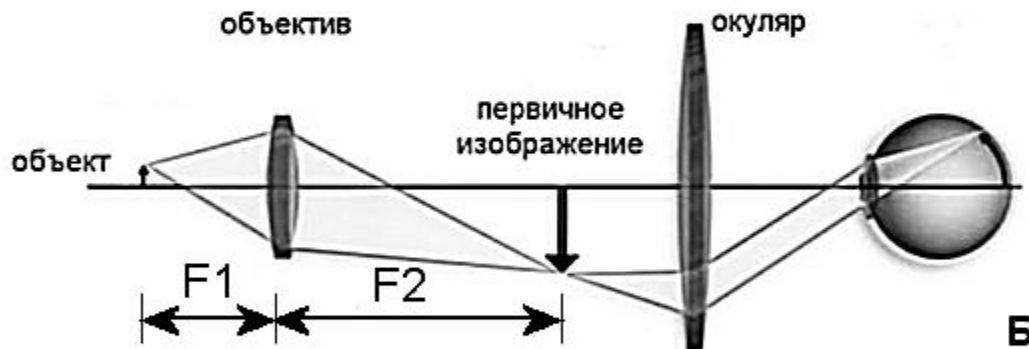
Классификация методов микроскопии

Microscopy	Микроскопия	Физический принцип
Far field	дальнего поля	используется дифракция световых волн
Near field	ближнего поля	используются оптические свойства слабых стоячих волн, возникающих на границе раздела двух сред (evanescent waves)
Full field	полного поля, или голографическая	используются стоячие волны, формируемые лазером в пространстве

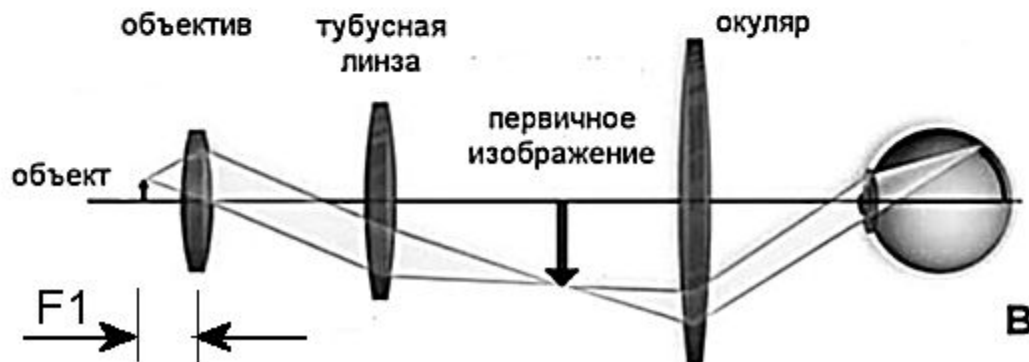
Геометрическая оптика



Увеличение лупы:
 $250/F$

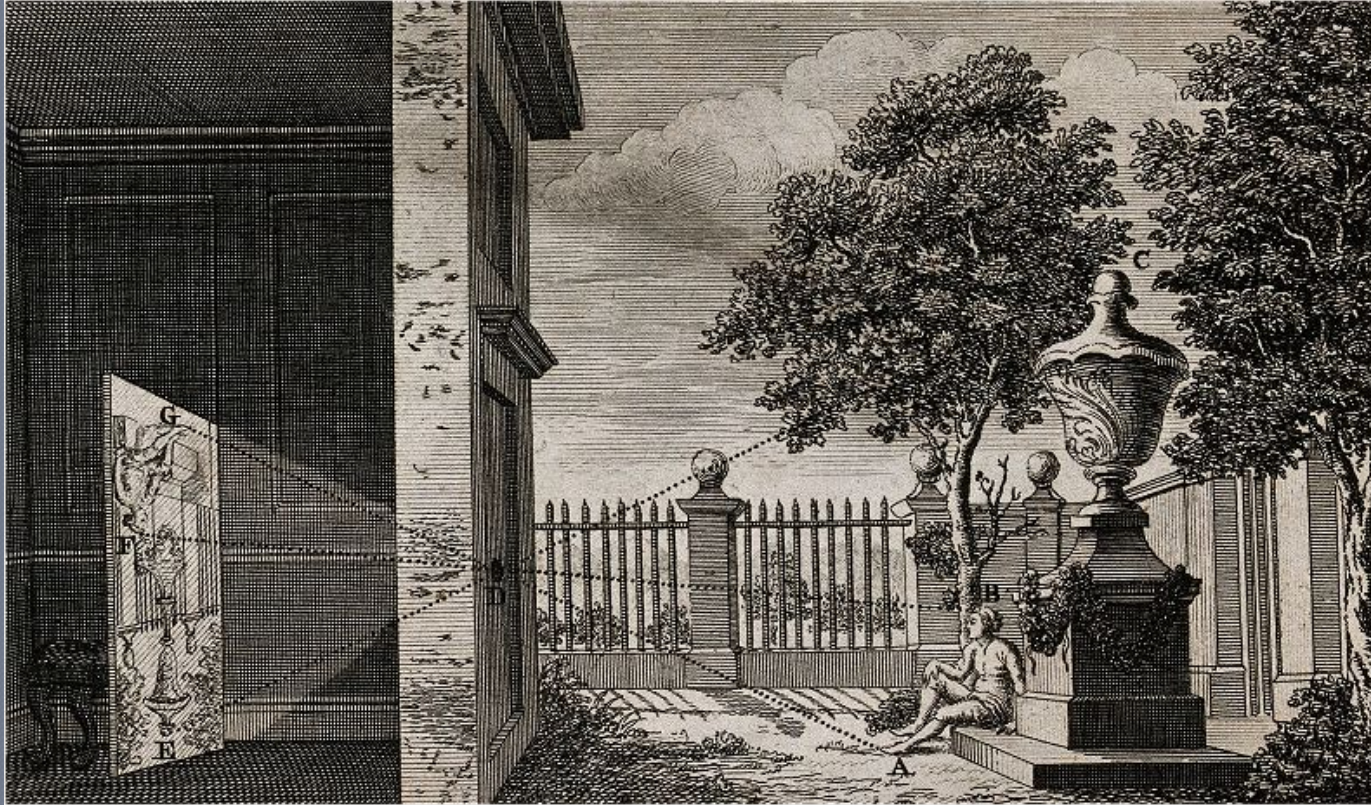


Увеличение
2К-микроскопа:
 $M_{об} * M_{ок}$



Увеличение
3К-микроскопа:
 $M_{об} * 250/F_{тл} * M_{ок}$

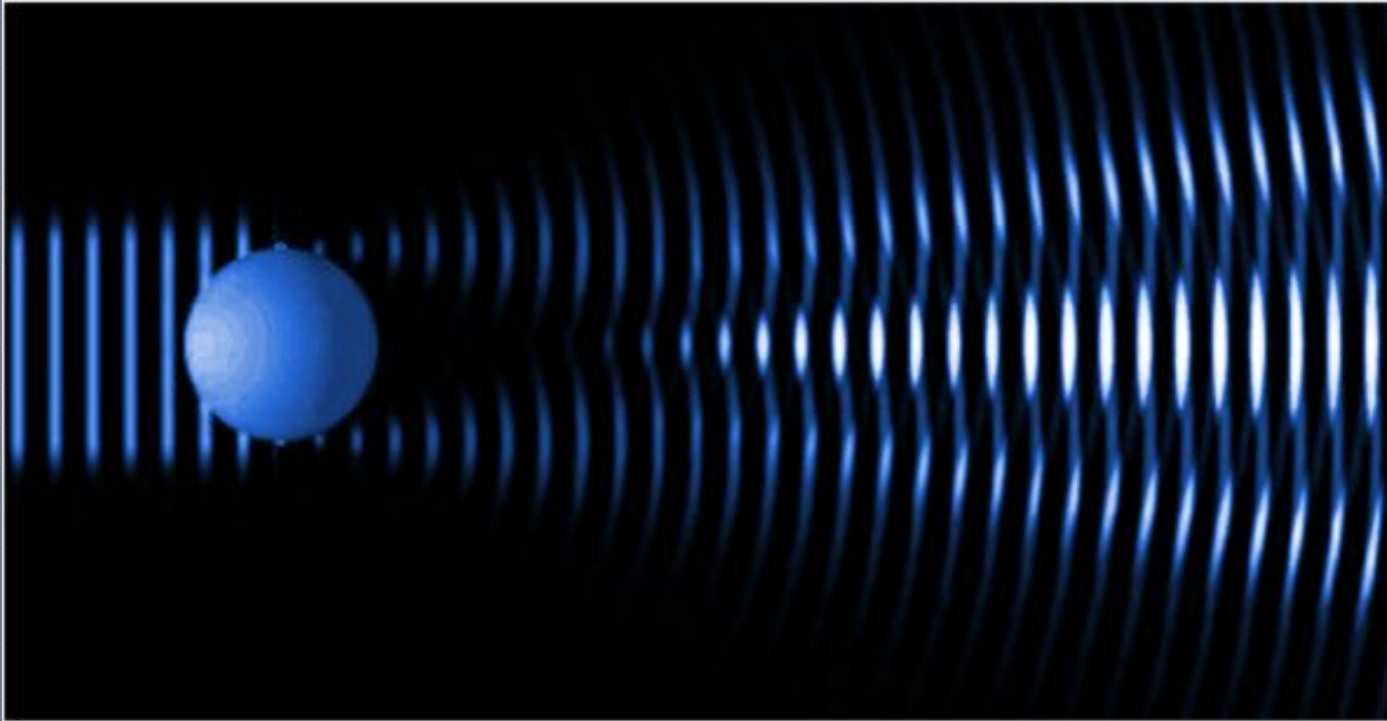
Камера обскура



Пинхол-фотография



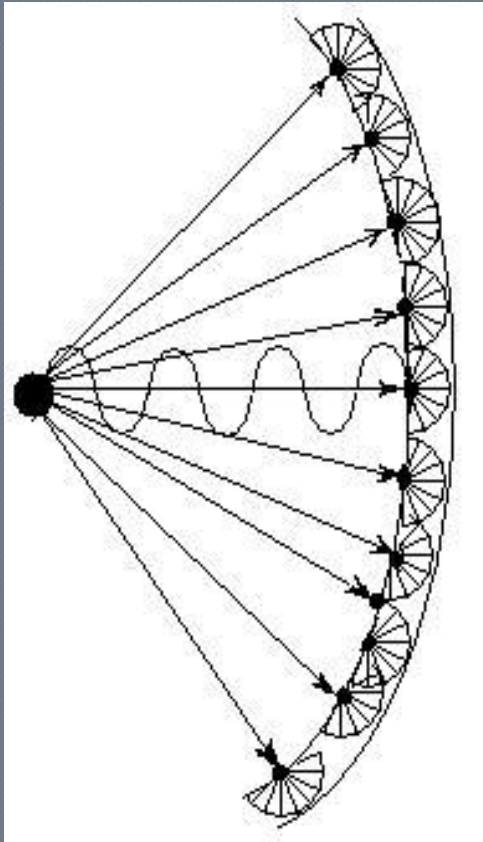
Интерференция и дифракция



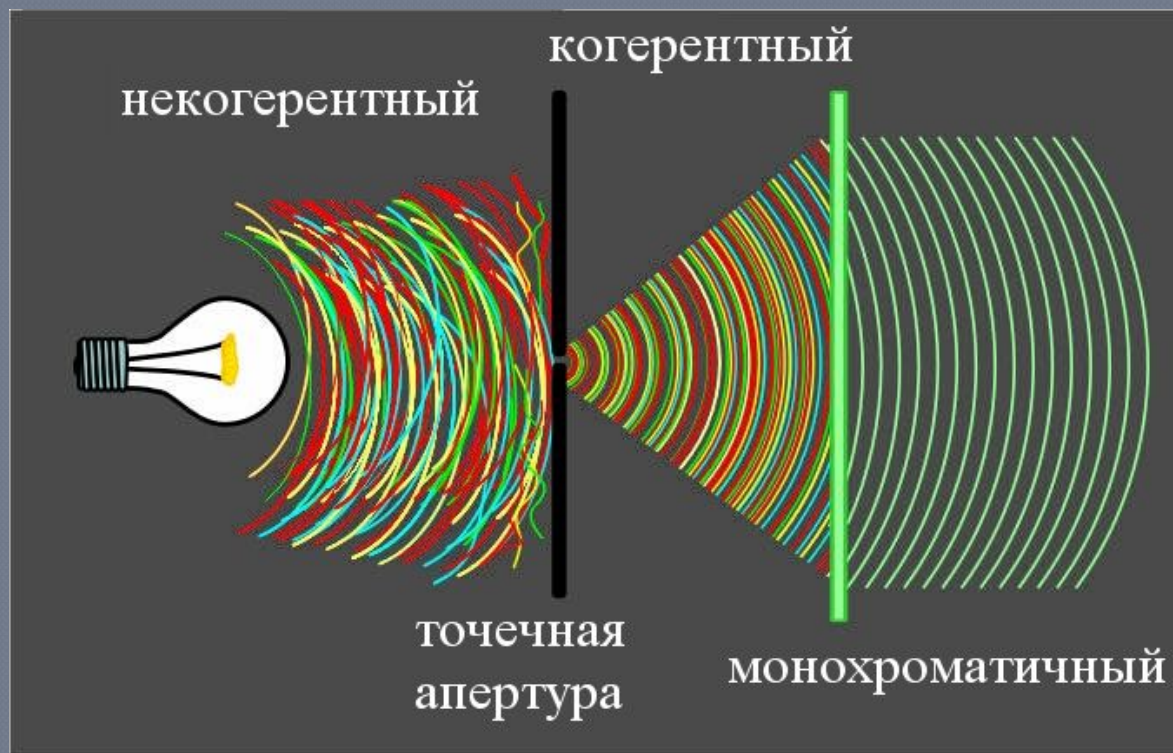
Дифракцией называется огибание волнами препятствий на их пути

Дифракционная теория микроскопа Аббе

Принцип Гюйгенса-Френеля



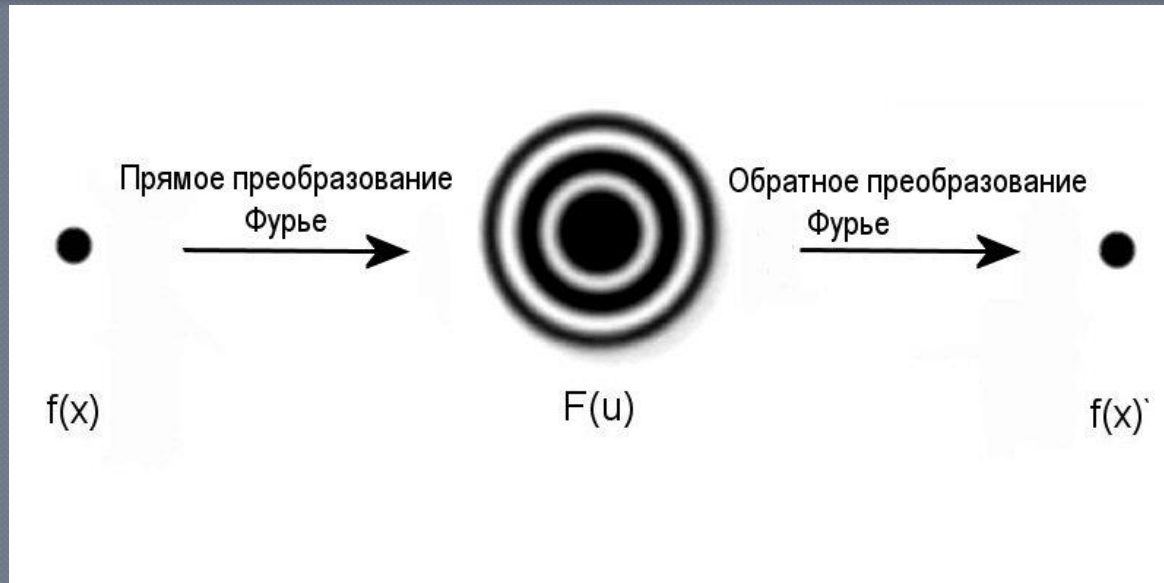
Когерентность и монохроматичность



Непрерывным условием интерференции волн является их когерентность – т.е. постоянство разности фаз

Теория микроскопа

Микроскоп – частично когерентный оптический процессор

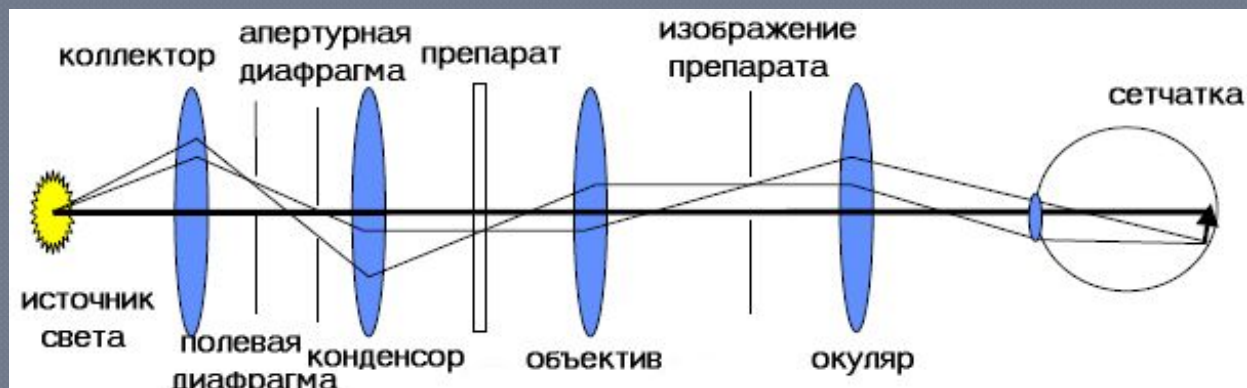


$$F(u) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x) [\cos(2\pi xu) - i \sin(2\pi xu)] dx$$

$$f(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} F(u) [\cos(2\pi xu) + i \sin(2\pi xu)] du$$

Теория микроскопа

В микроскопе преобразование Фурье выполняют линзы, тогда как первоначально дифракционная картина формируется системой освещения



Условиями формирования дифракционной картины являются когерентность волны и ее длина, которая должна быть не более чем в два раза больше размеров микрообъекта. Для микроскопии наибольшее значение имеет закон масштаба преобразования Фурье, который гласит, что чем меньше размеры объекта, тем больше величина его дифракционной картины.

Теория микроскопа

Разрешающая способность объектива

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



Формула Аббе

Номинальное разрешение объектива

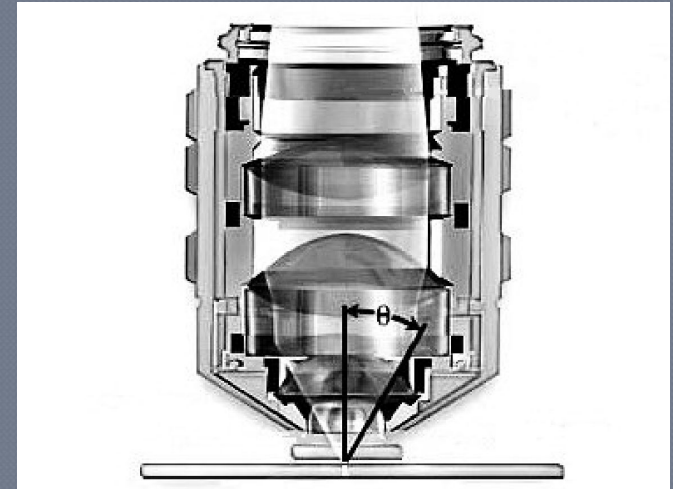
$$d = 0.61 \frac{\lambda}{n * \sin \alpha}$$

где λ – длина волны света;

n – показатель преломления среды ;

α – половина угла раскрытия объектива

Знаменатель формулы есть численная апертура объектива NA



съемка живых клеток
плоское поле
флюоритовое
стекло

увеличение/апертура
дифференциально-
интерференционный
контраст

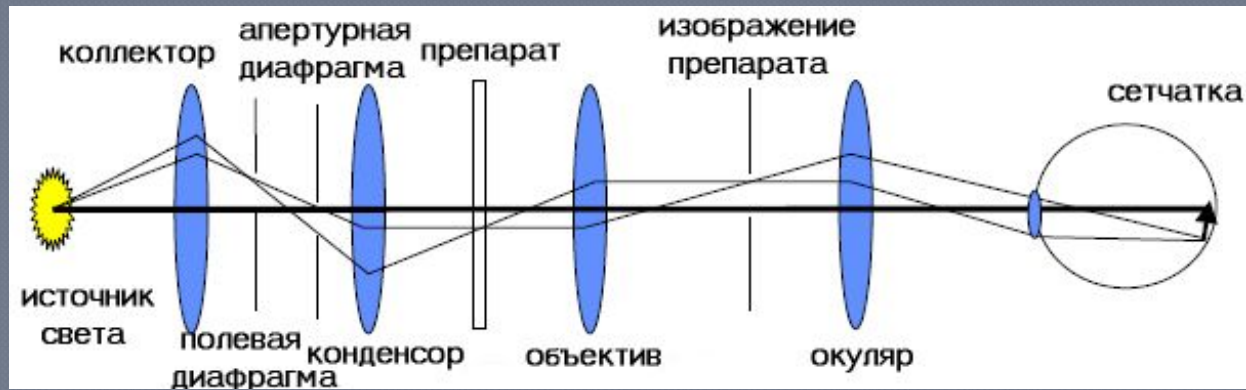
коррекция на
бесконечность

толщина покровного
стекла 0 или 0.19-0.15 мм

настройка на толщину
покровного стекла
выбор типа иммерсии



Настройка микроскопа по Кёлеру

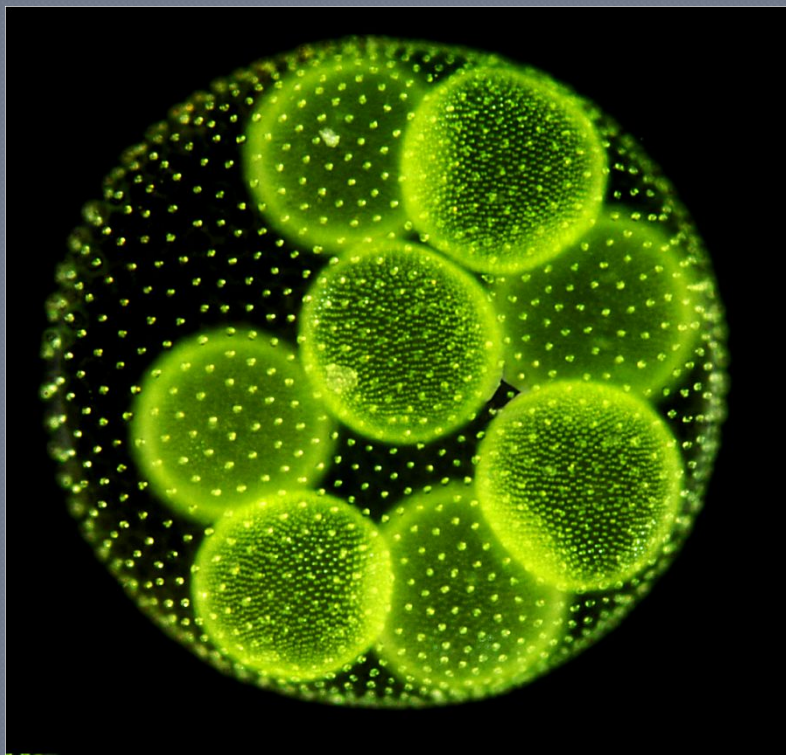


- определить положение полевой и апертурной диафрагмы. Установить объектив с малым увеличением (но не менее 8x).
- Полностью открыть обе диафрагмы. Установить на контрастный препарат и сфокусироваться на него.
- Закрыть полевую диафрагму и, передвигая конденсор по высоте, добиться ее резкого изображения.
- Открыть полевую диафрагму до границы поля зрения.
- Вынуть окуляр и совместить апертурную диафрагму в конденсоре с входным отверстием объектива. Вернуть окуляр на место.

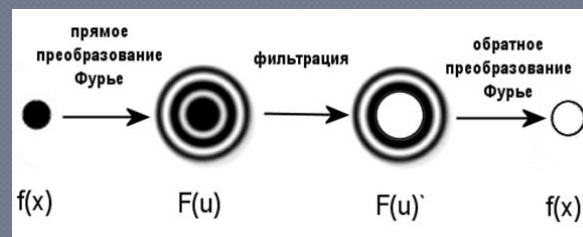
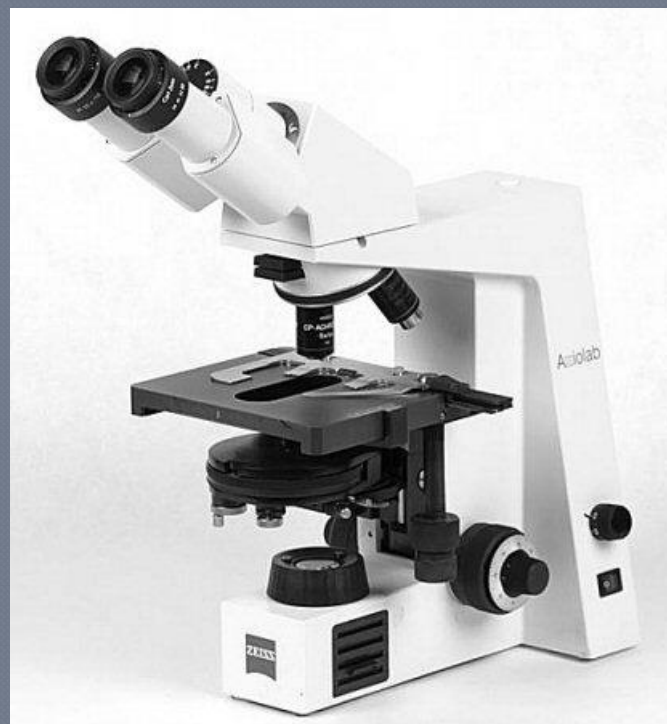
Метод светлого поля: 3D-фото *Vinca rosea*



Метод тёмного поля



Volvox aureus



**СПАСИБО ЗА
ВНИМАНИЕ**
