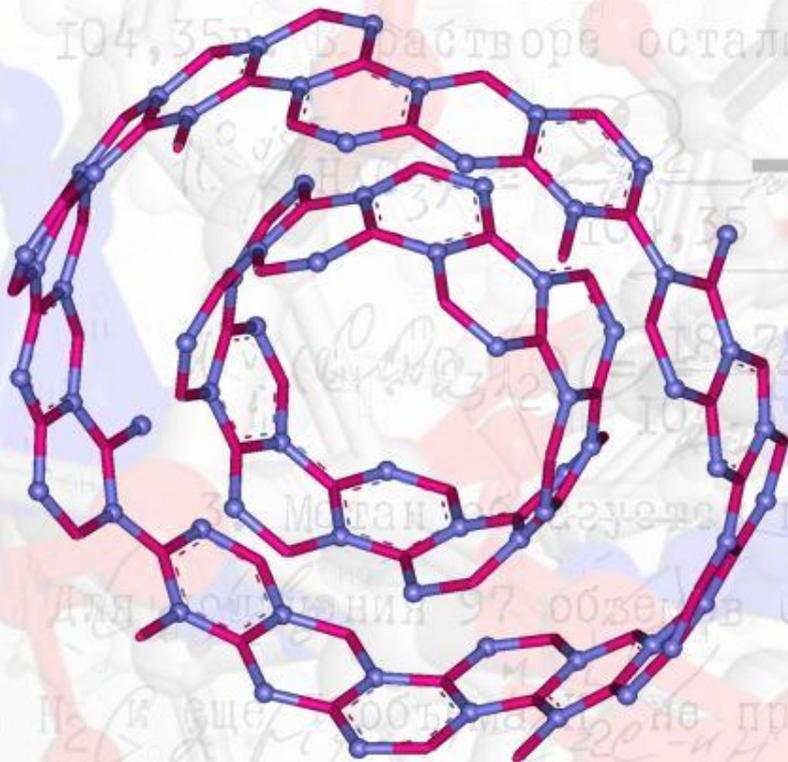


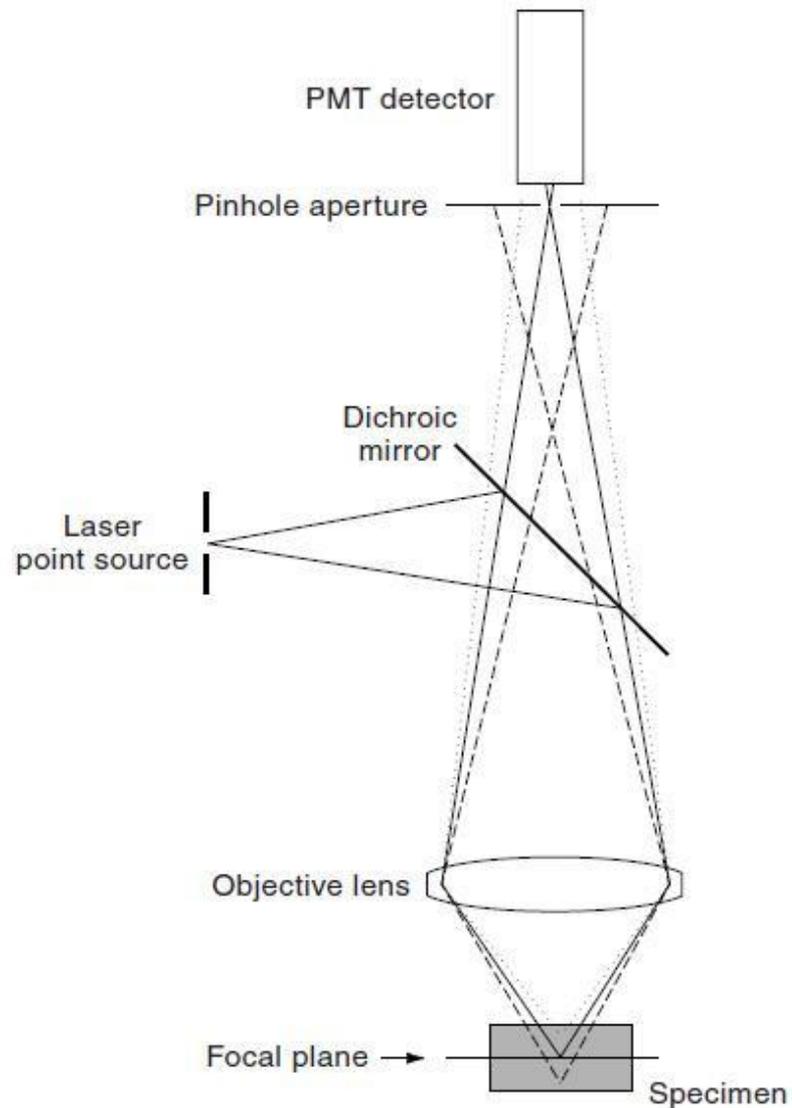
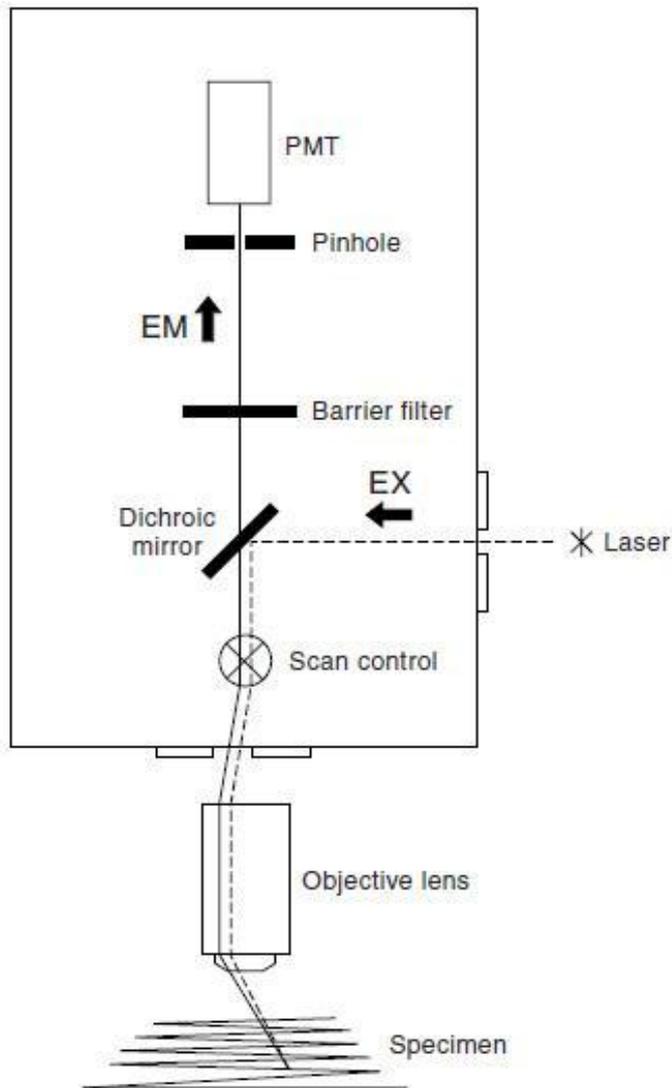
Оптическая микроскопия



Лазерная сканирующая
конфокальная микроскопия



Принцип лазерной сканирующей конфокальной микроскопии





Принцип лазерной сканирующей конфокальной микроскопии

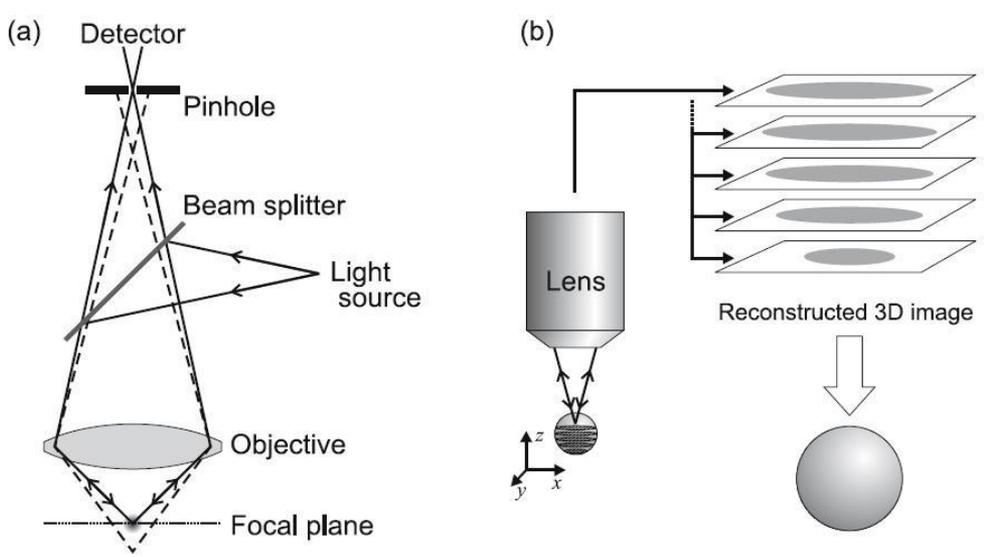
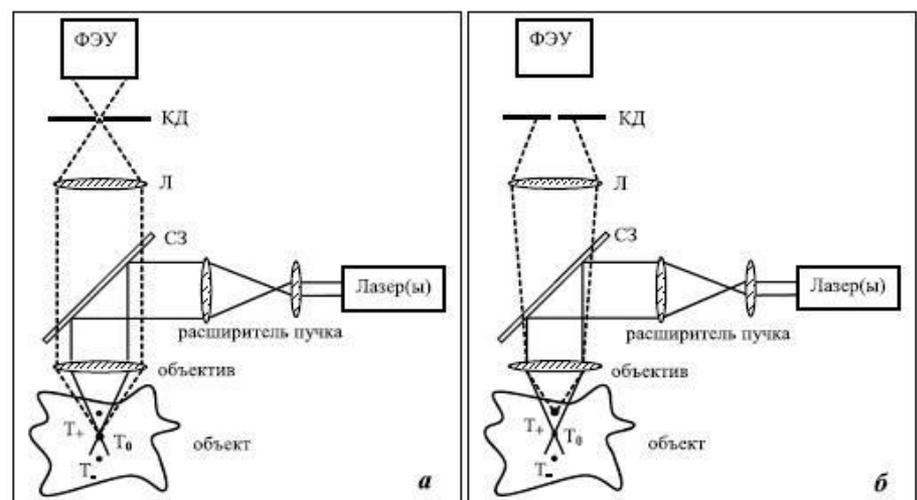


Рис. 1. Принцип конфокальной фильтрации сигнала.

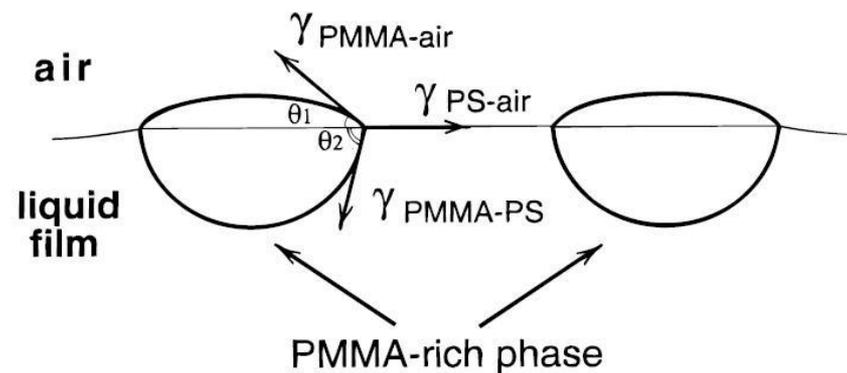
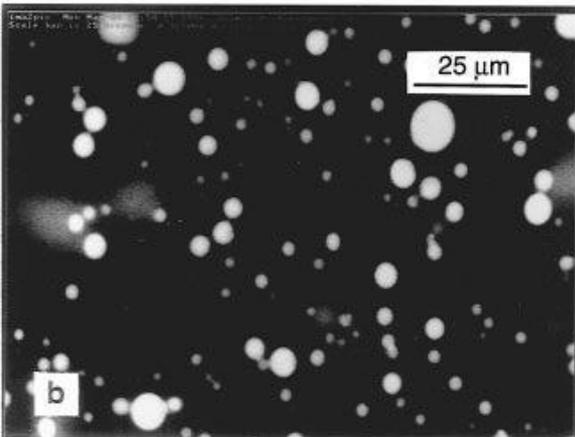
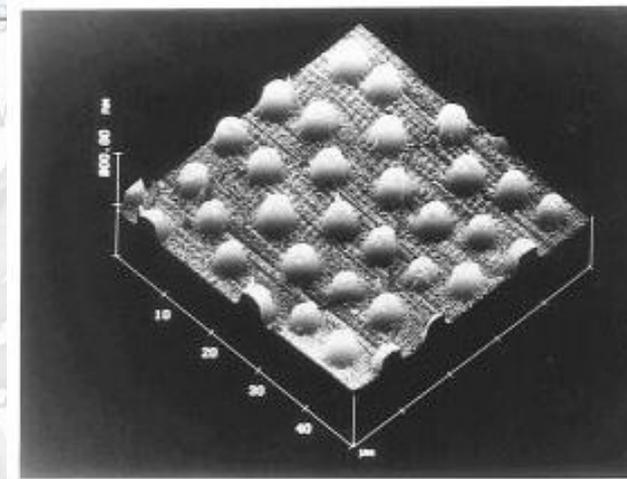
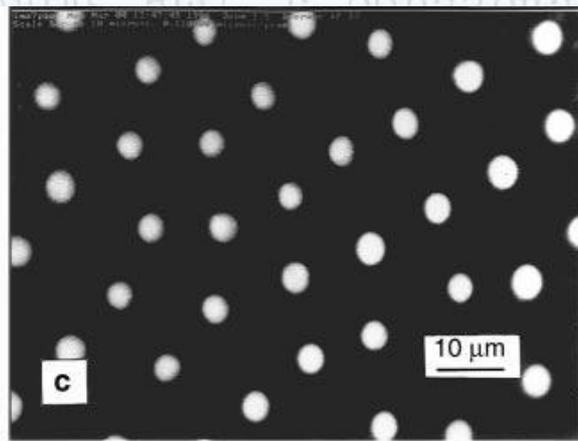
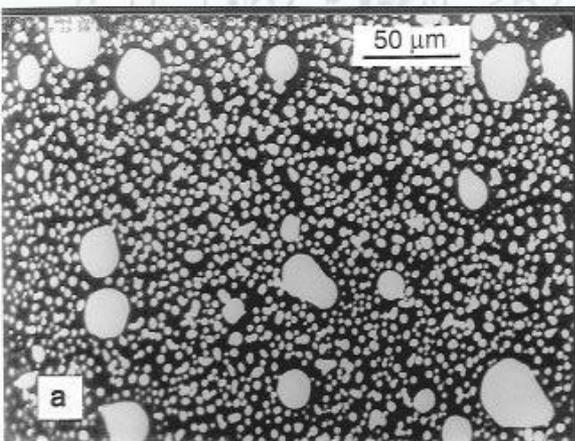
Луч лазера (непрерывная линия) с помощью селективного зеркала (СЗ) направляется в объектив микроскопа и фокусируется в точку T_0 в глубине исследуемого объекта. Флуоресценция, излучаемая из этой точки (прерывистая линия), собирается объективом и фокусируется линзой Л в сопряженной фокальной плоскости объектива, проходя через отверстие в конфокальной диафрагме (КД) к фотозумножителю (ФЭУ) (а). Флуоресценция, излучаемая из точек T_+ (б) и T_- (в), дефокусируется на КД и к ФЭУ не проникает. Таким образом обеспечивается подавление флуоресценции, испускаемой из точек образца, расположенных выше и ниже фокуса объектива, и улучшается разрешение вдоль оптической оси объектива.

Конфокальная диафрагма для пространственной селекции сигнала флуоресцентного отклика, сканирование, информация о трехмерной структуре



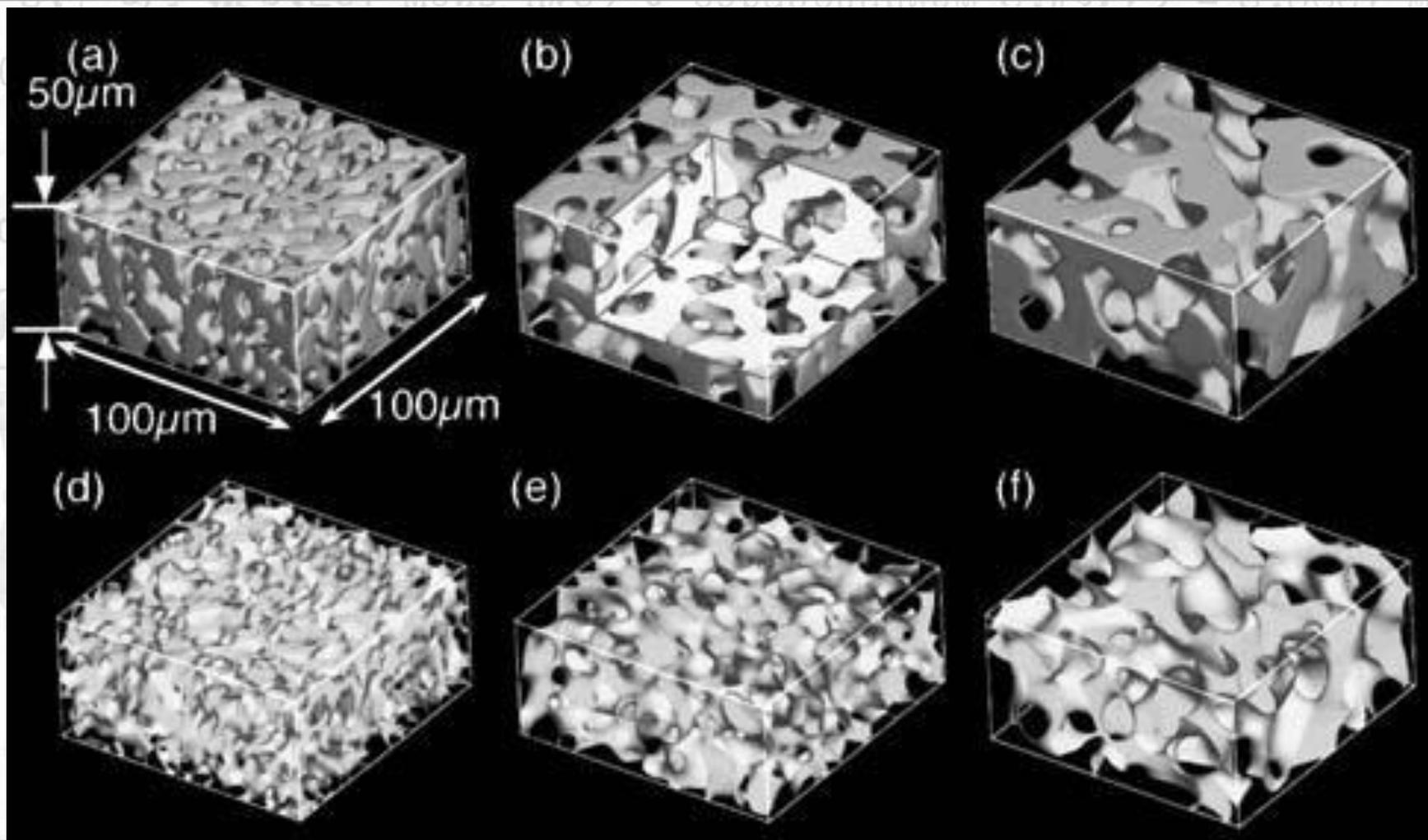


Фазовое разделение в смесях ПС / ПММА: результаты ЛСКМ





ЛСКФМ: динамика фазового разделения в смесях полимеров

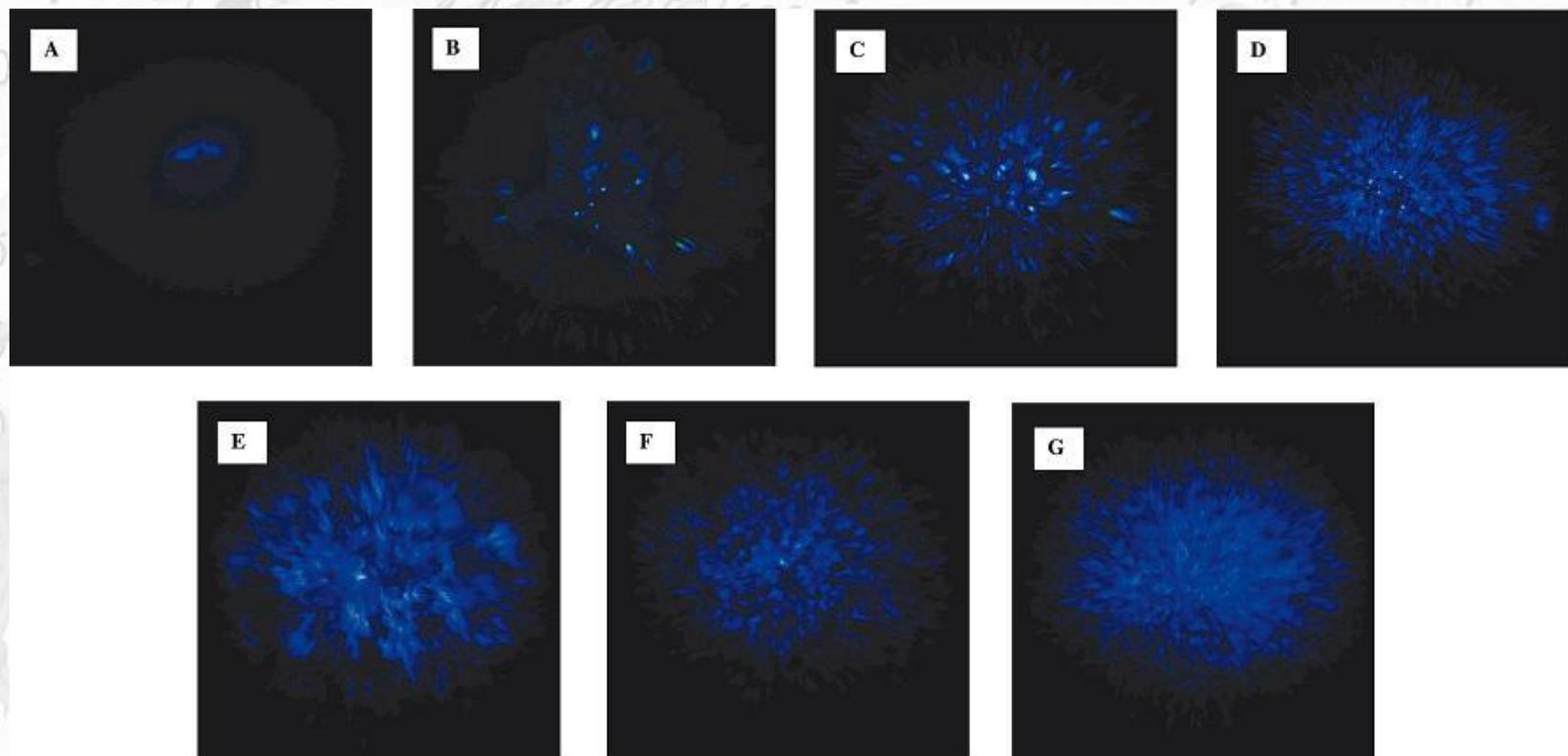


Ito & Aoki // Adv. Polym. Sci. 2005, 182, 131-169





Агрегация молекул β -глюкана в растворе: наблюдения ЛСКМ

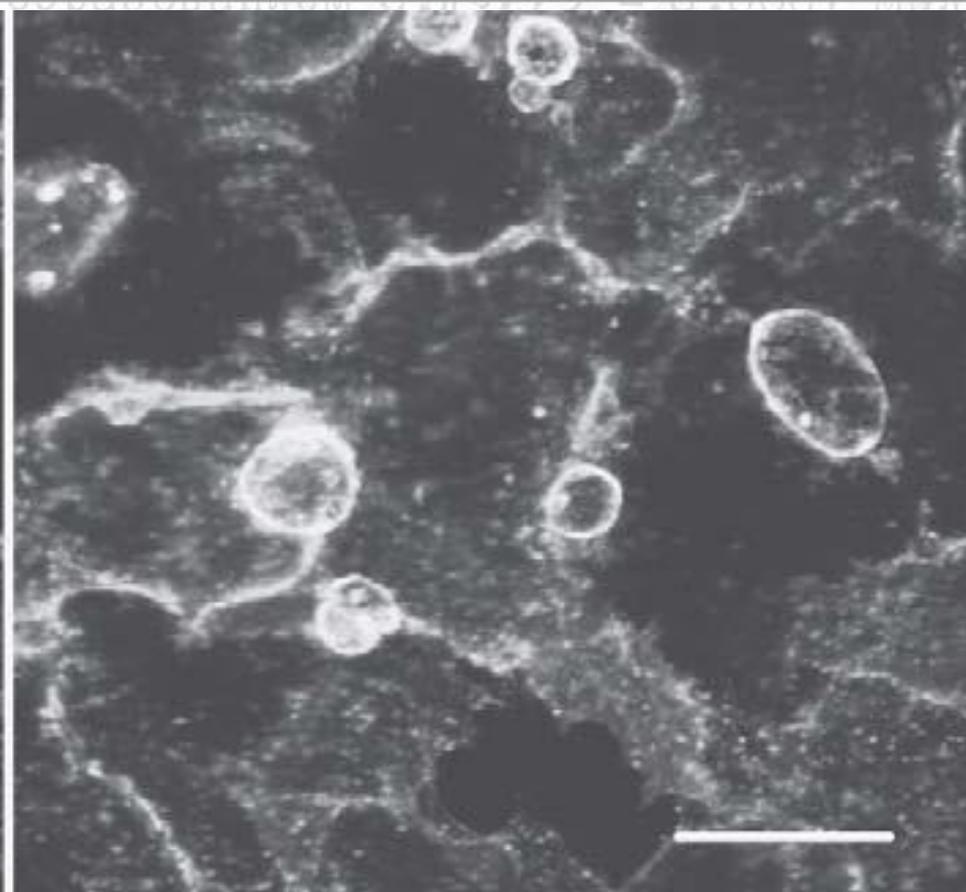
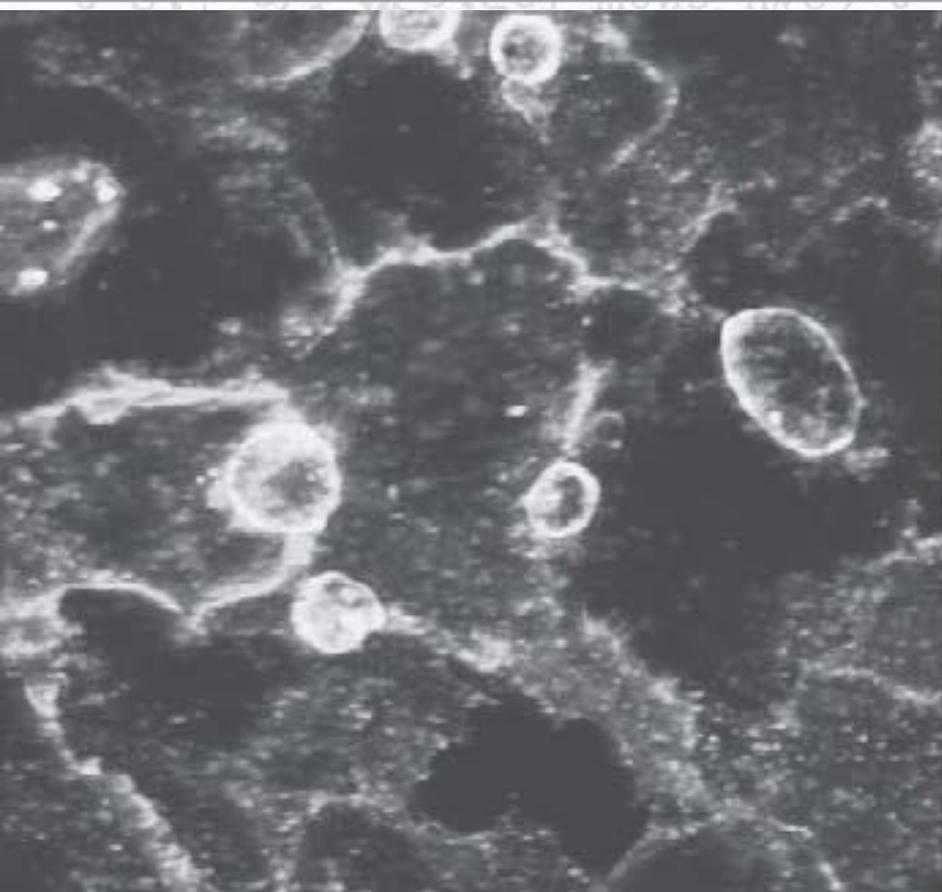


Возрастание концентрации в ряду: (A) 5, (B) 10, (C) 15, (D) 40, (E) 60, (F) 80, и (G) 100 мг/мл. Размер кадра 300 мкм × 300 мкм





Гепатоциты печени (3D)



10 мкм

Разрешение: $d_{x,y} \approx 0.4 \lambda / NA$, $d_z \approx 1.4 \lambda n / NA^2$





Оптическая микроскопия

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия многофотонная схема



3. Метан образуется по обратимой реакции $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightleftharpoons \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$

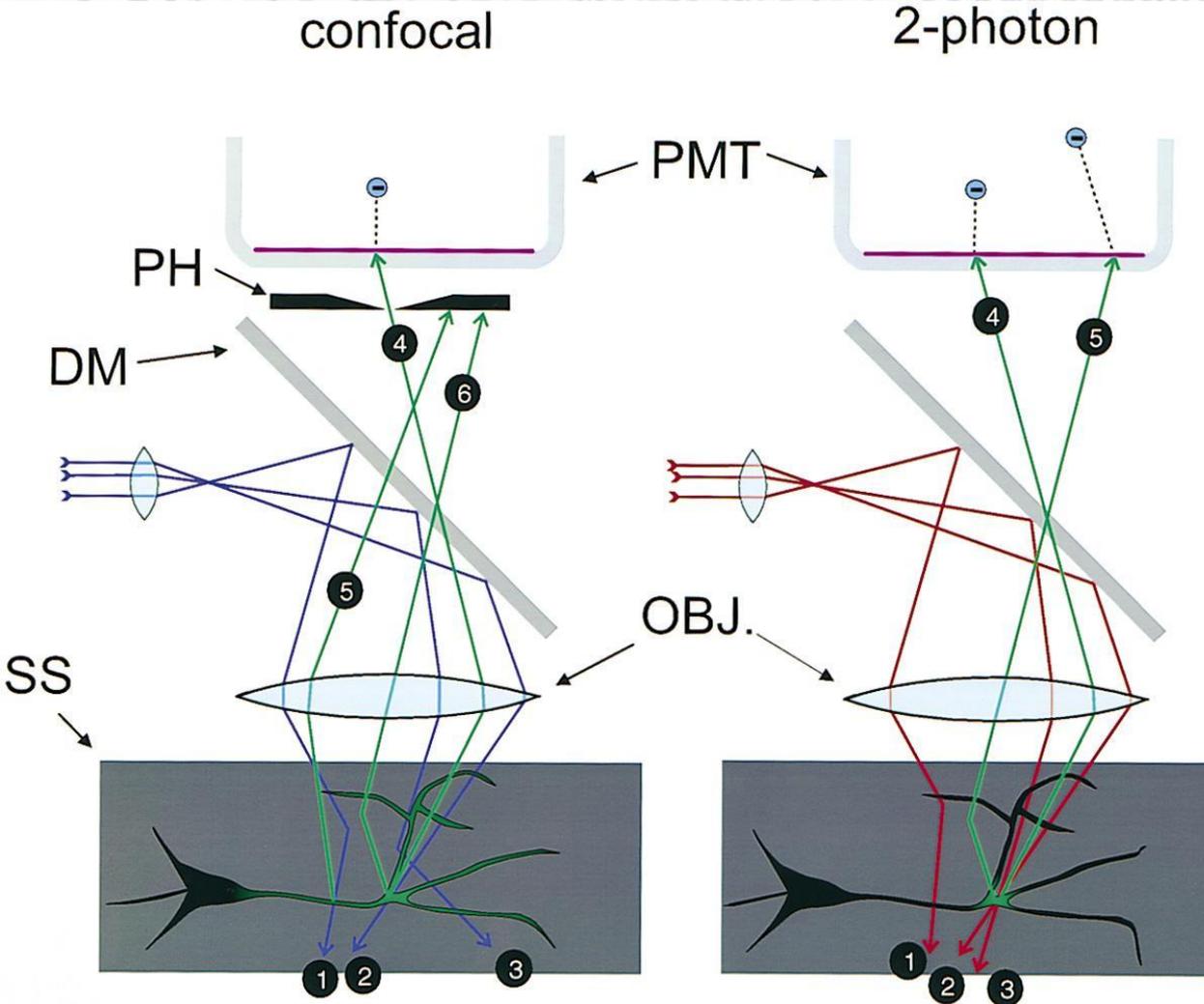
Для получения 97 объемов CH_4 было израсходовано $97 \cdot 2 = 194$ объема

H_2 и еще $\frac{1}{3}$ объема H_2 не прореагировало. Т.о. было взято 197 объемов





Преимущества многофотонной схемы ЛСКМ

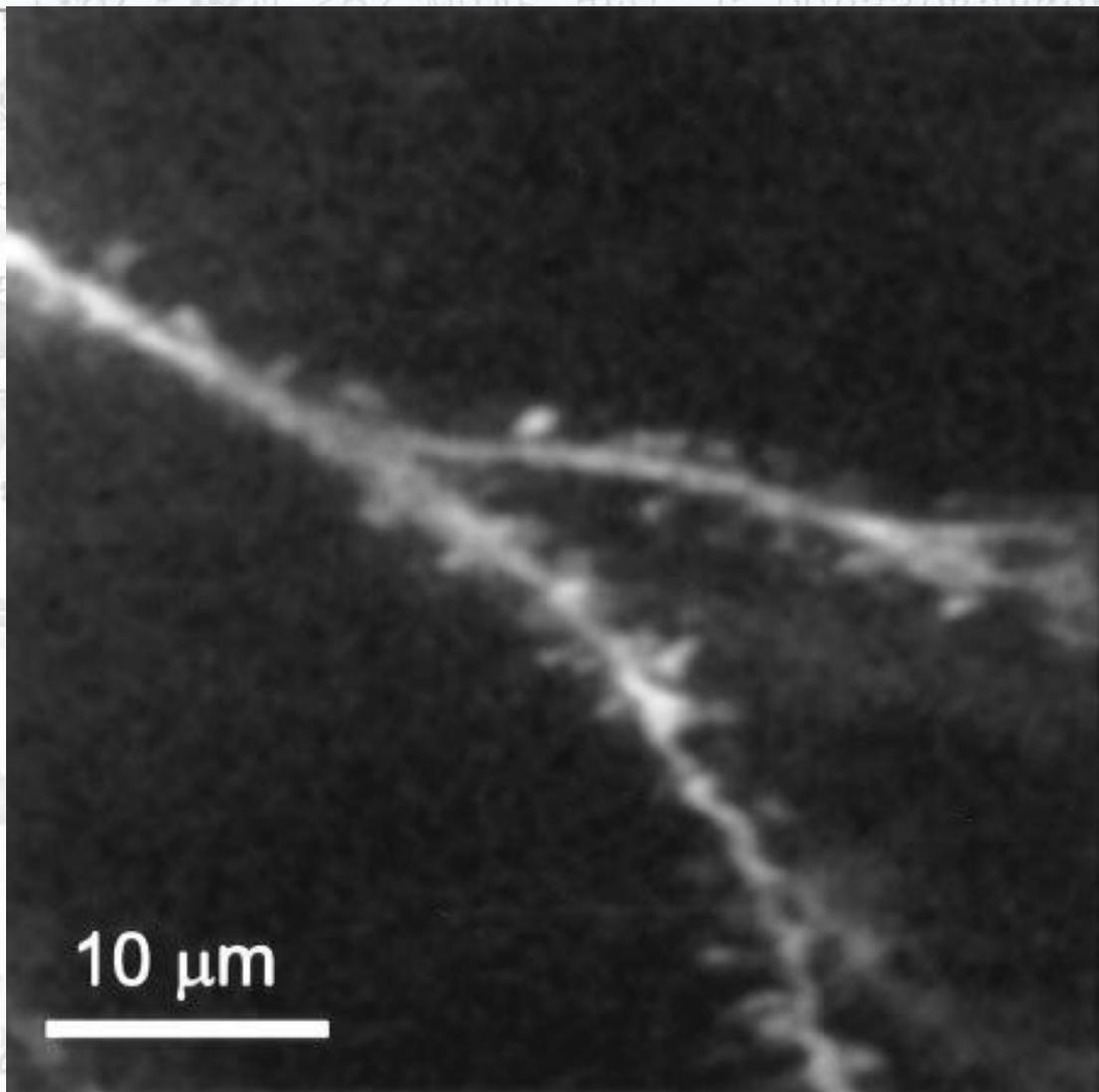


Сочетание высокого разрешения и высокой интенсивности сигнала (нет необходимости в диафрагме), предотвращение обесцвечивания красителя (возбуждение на иной длине волны), меньше рассеяние (больше контраст)





Изображение многофотонной ЛСКФМ



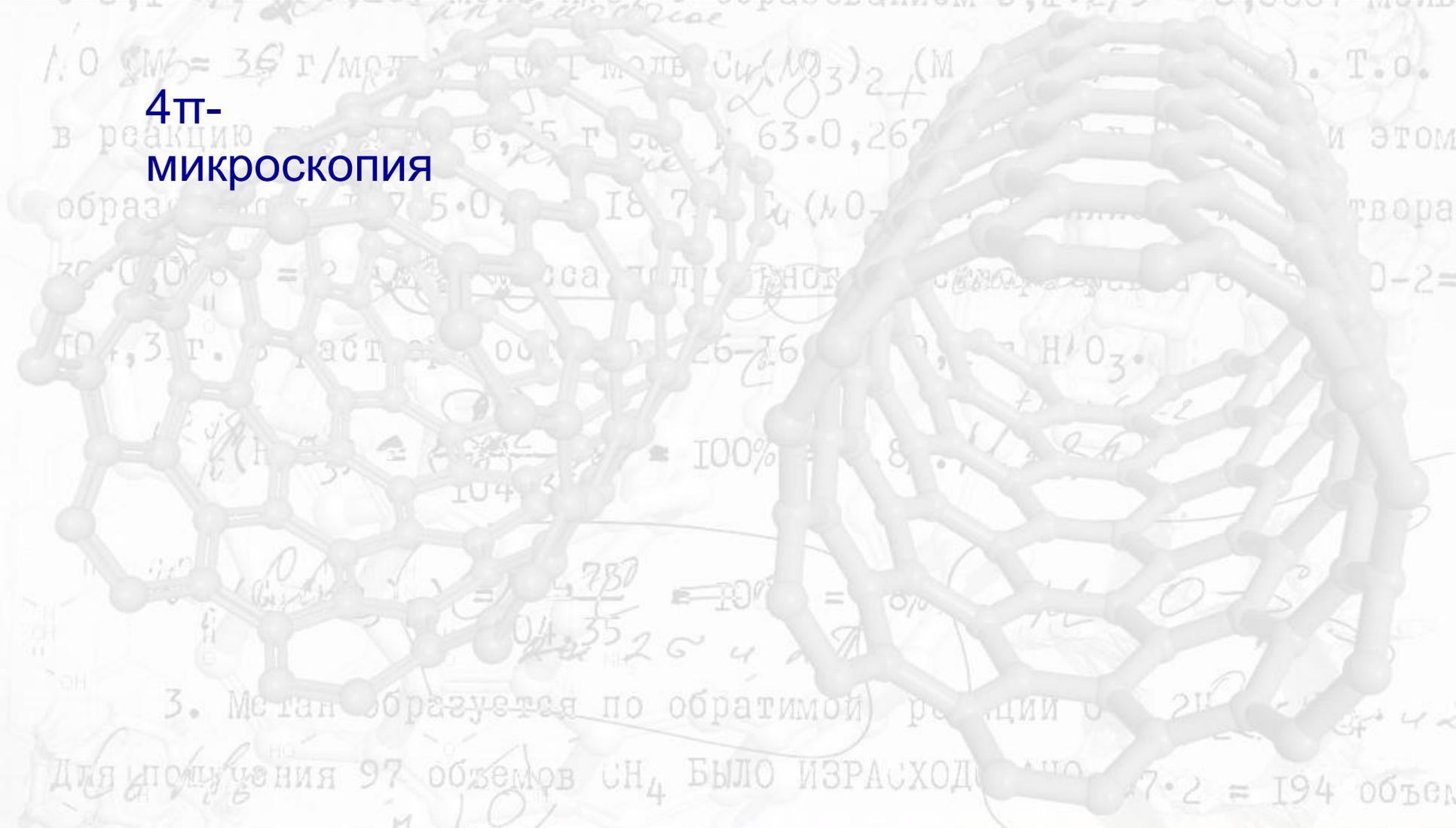
Изображение
нейрона *in vivo*,
высокое
разрешение





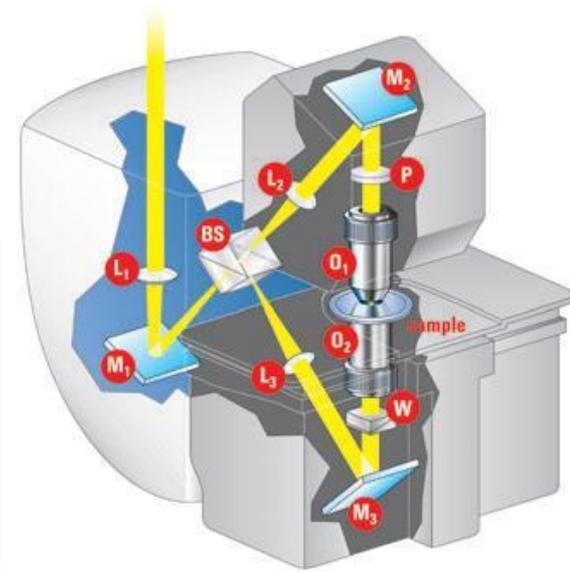
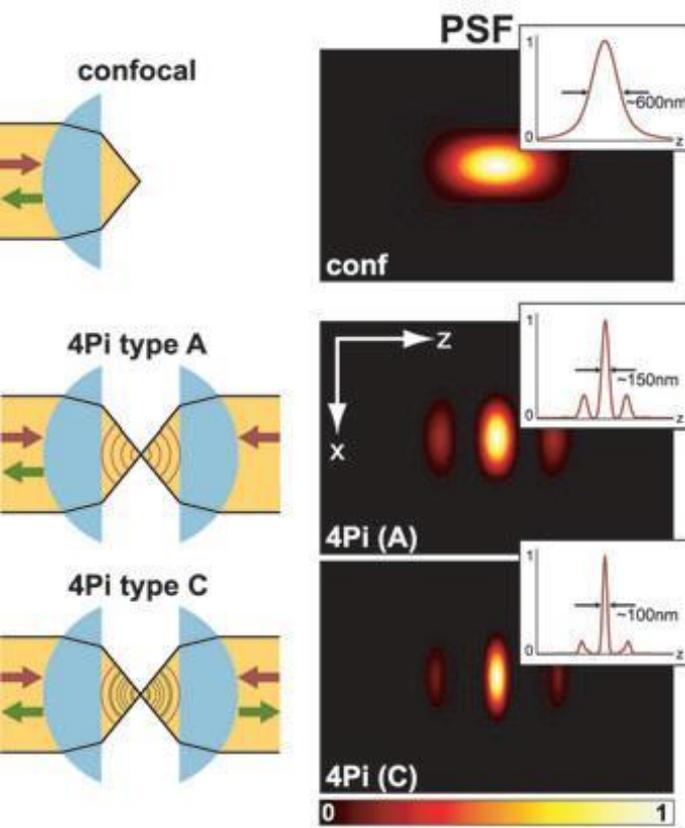
Оптическая микроскопия

4π-микроскопия





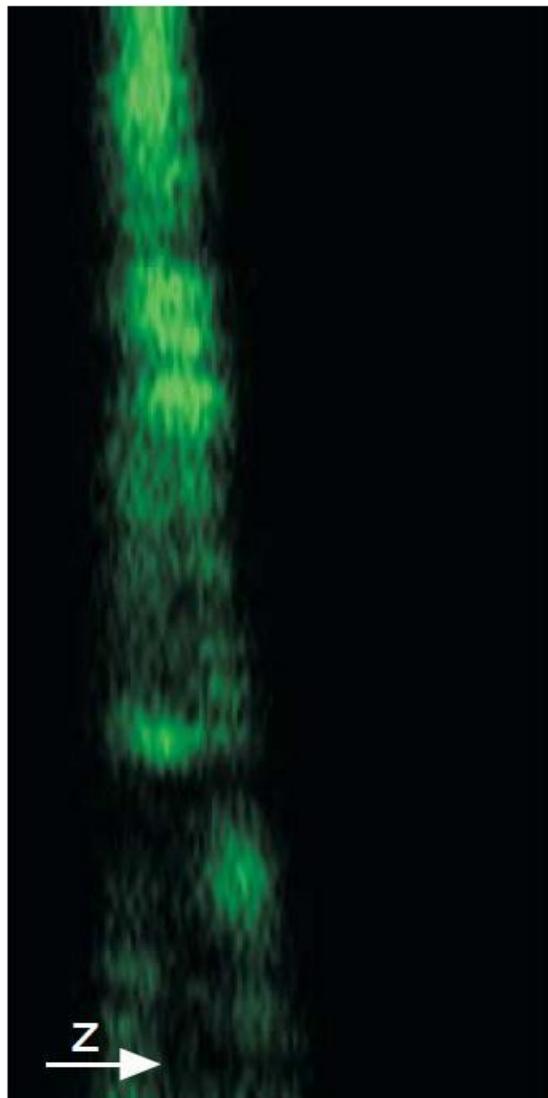
Принципы 4π-микроскопии



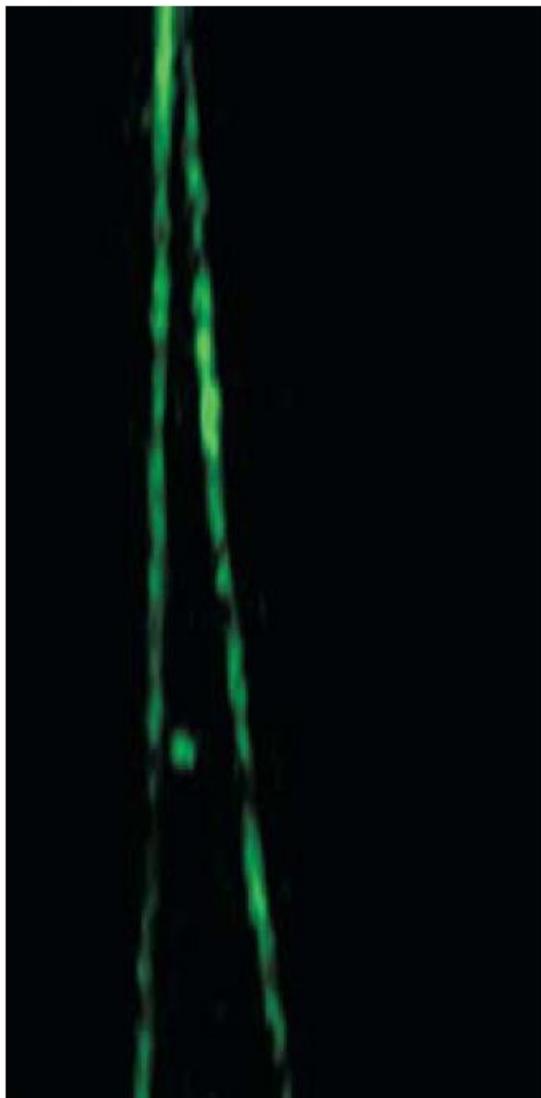


Разрешение 4π-

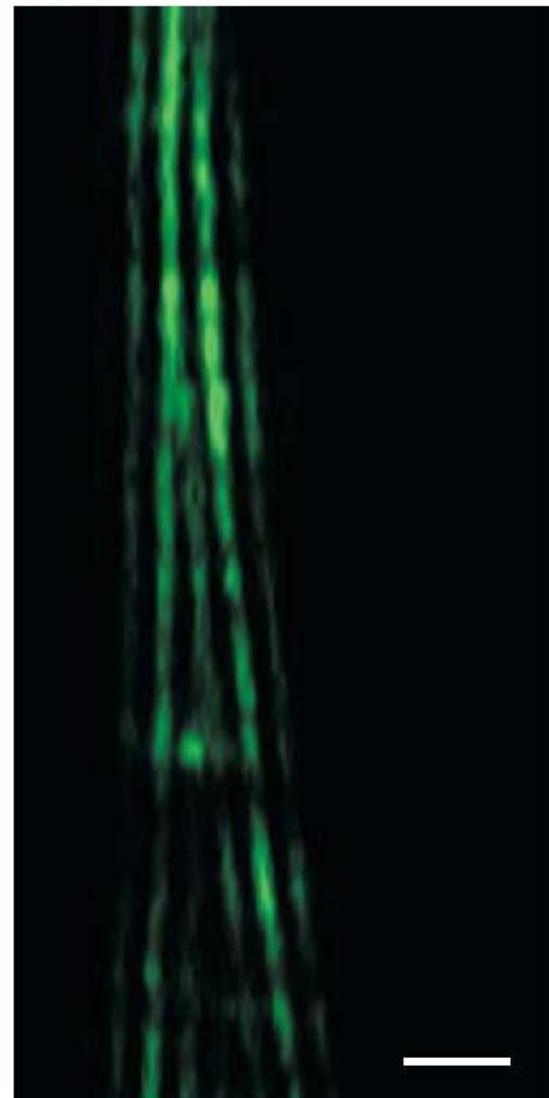
(a) Confocal



(b) 4Pi



(c) 4Pi-raw



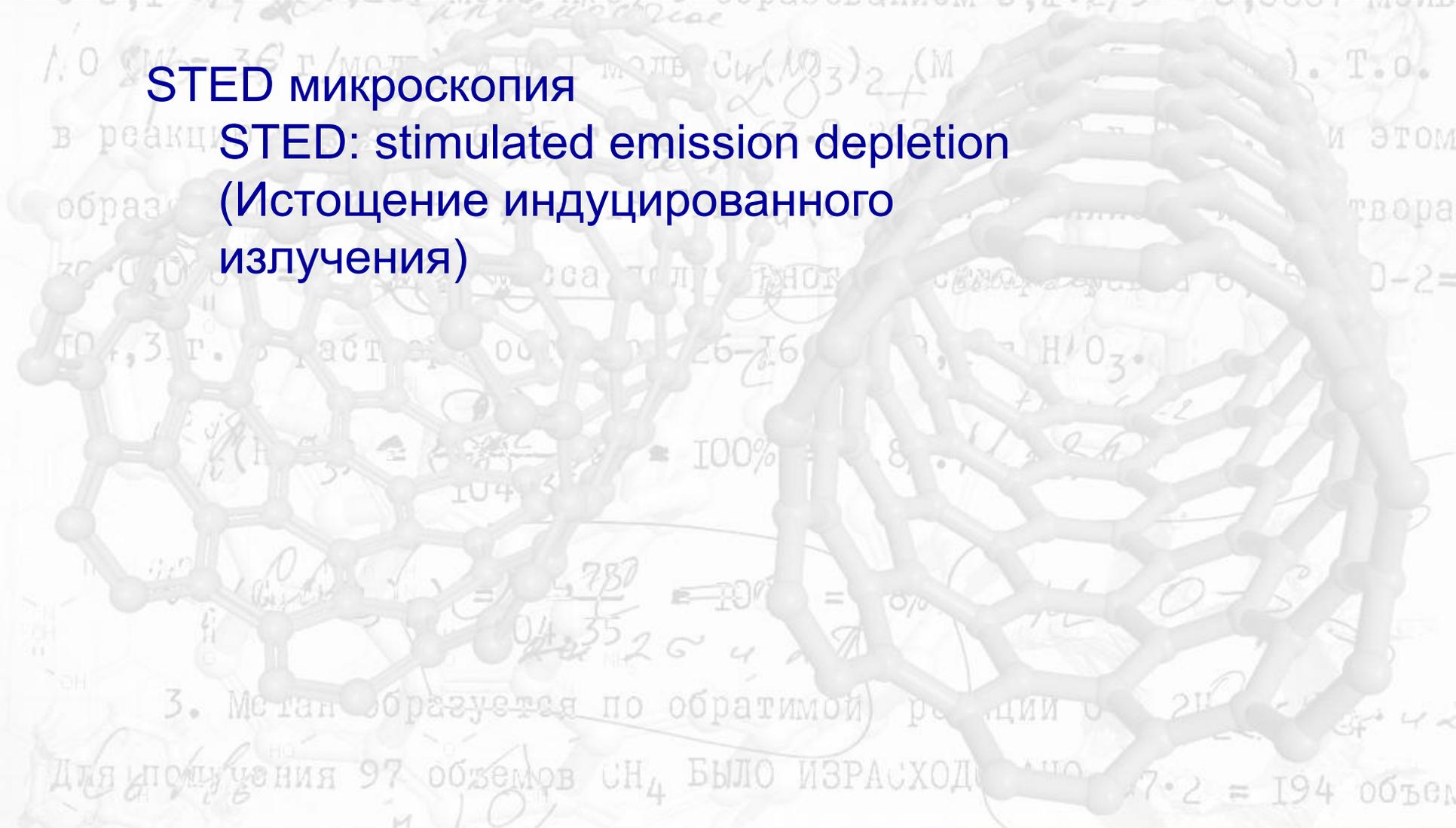


Оптическая микроскопия

STED микроскопия

STED: stimulated emission depletion

(Истощение индуцированного излучения)



3. Метан образуется по обратимой реакции $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightleftharpoons \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$

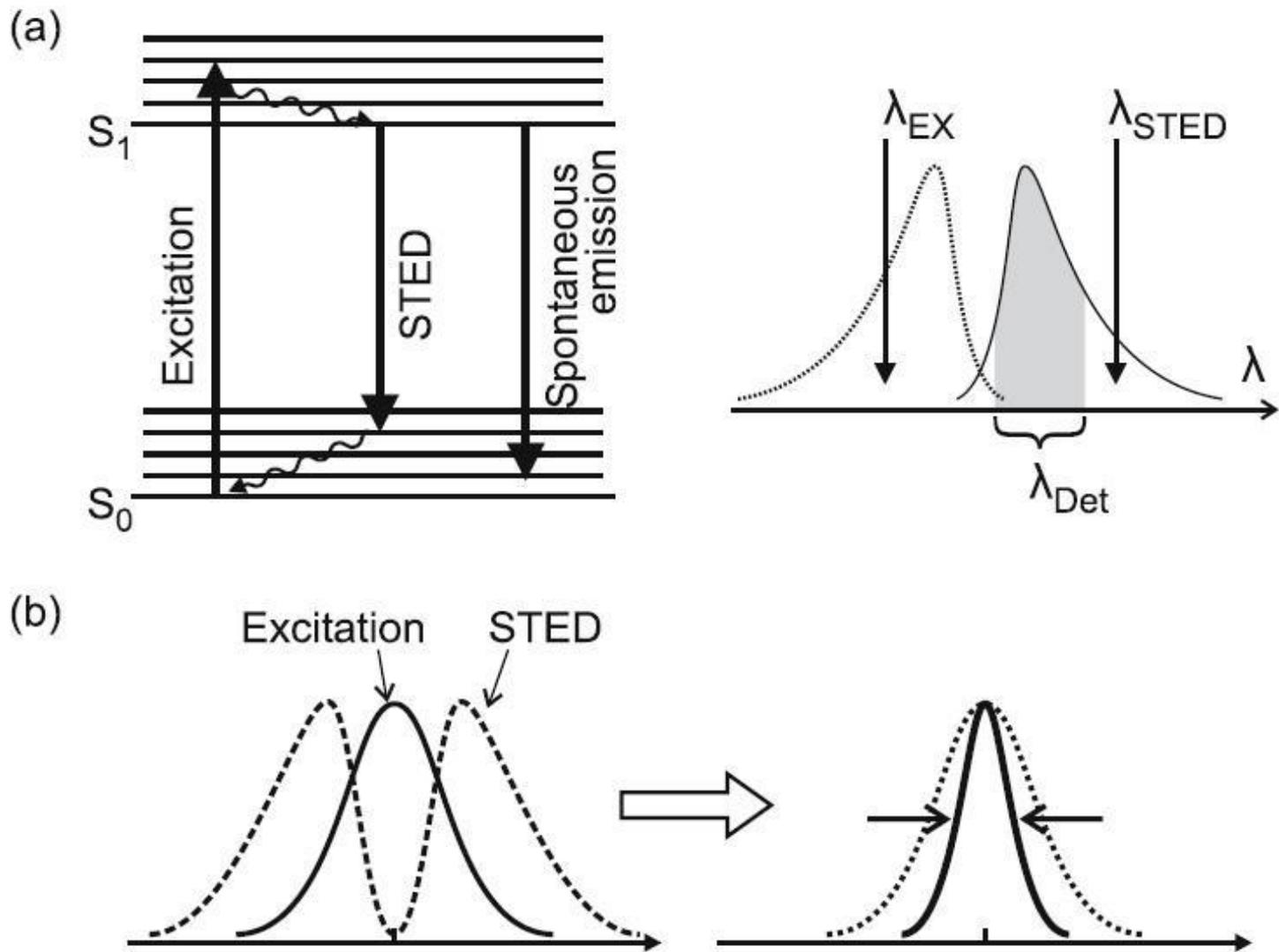
Для получения 97 объемов CH_4 было израсходовано $97 \cdot 2 = 194$ объема

H_2 и еще $\frac{1}{3}$ объема H_2 не прореагировало. Т.о. было взято $197 \frac{1}{3}$ объема



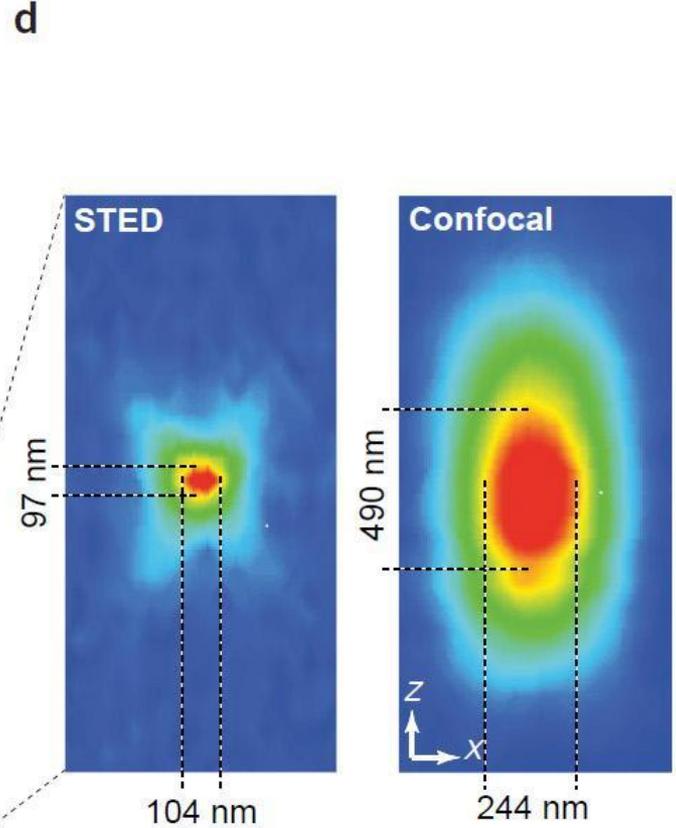
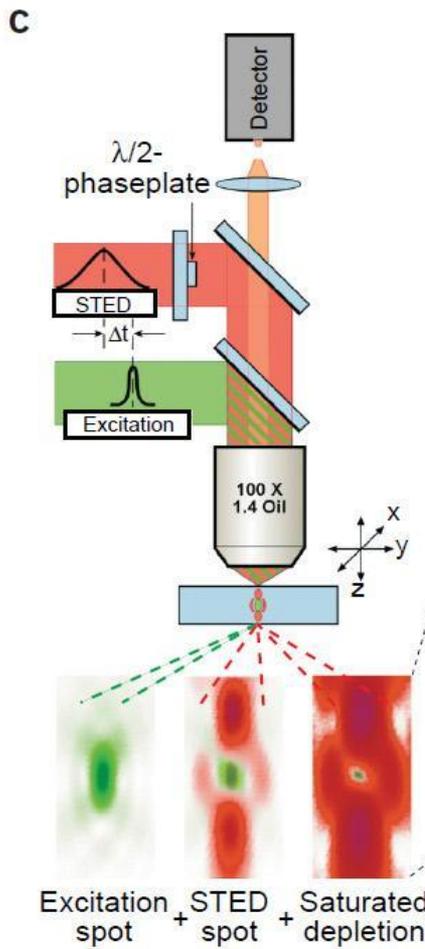
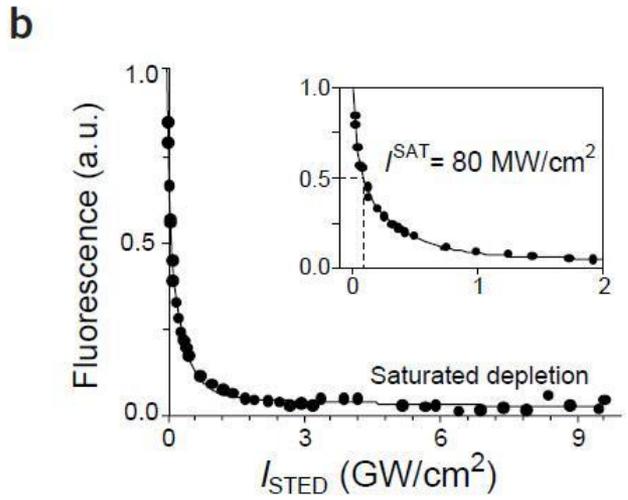
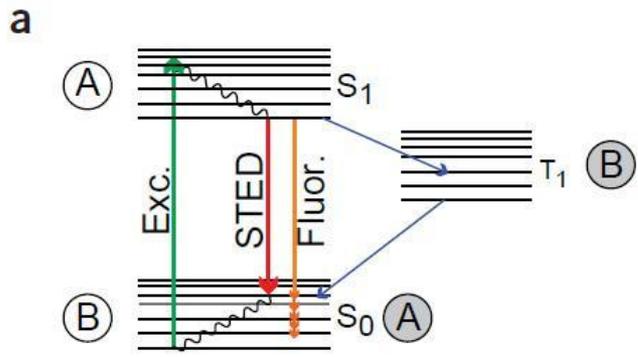


Принципы STED-микроскопии





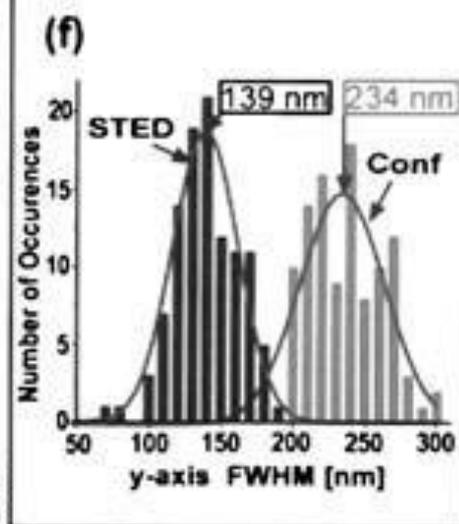
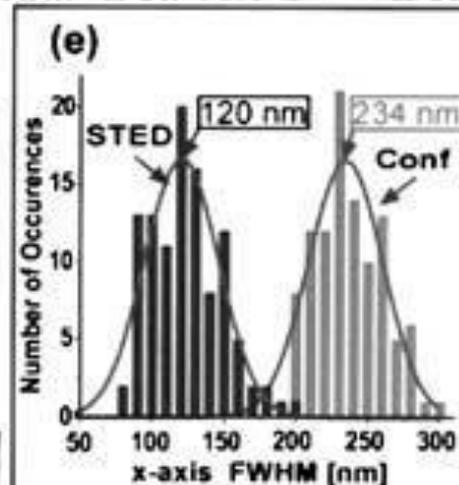
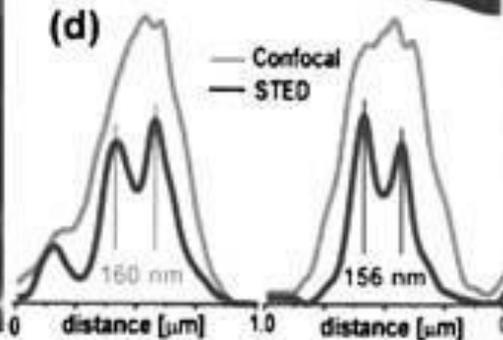
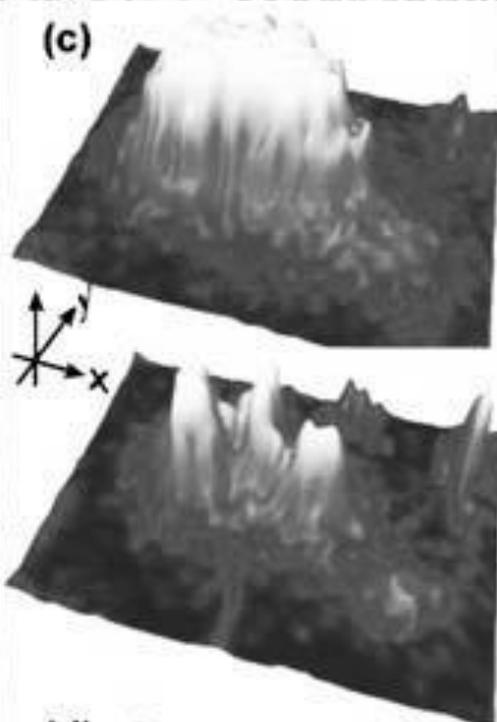
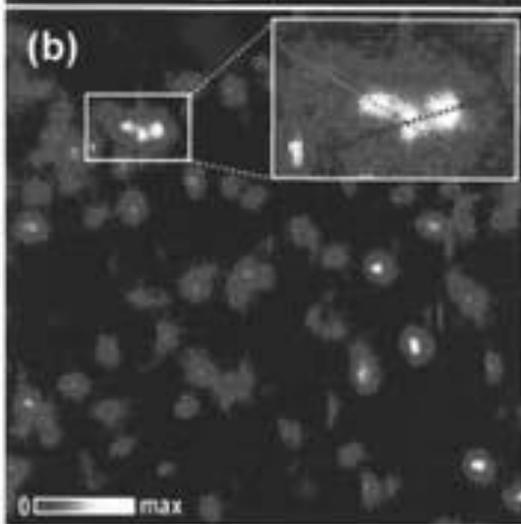
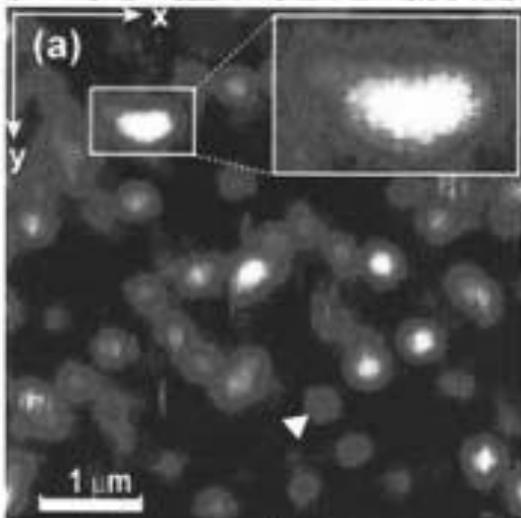
Принципы STED-микроскопии



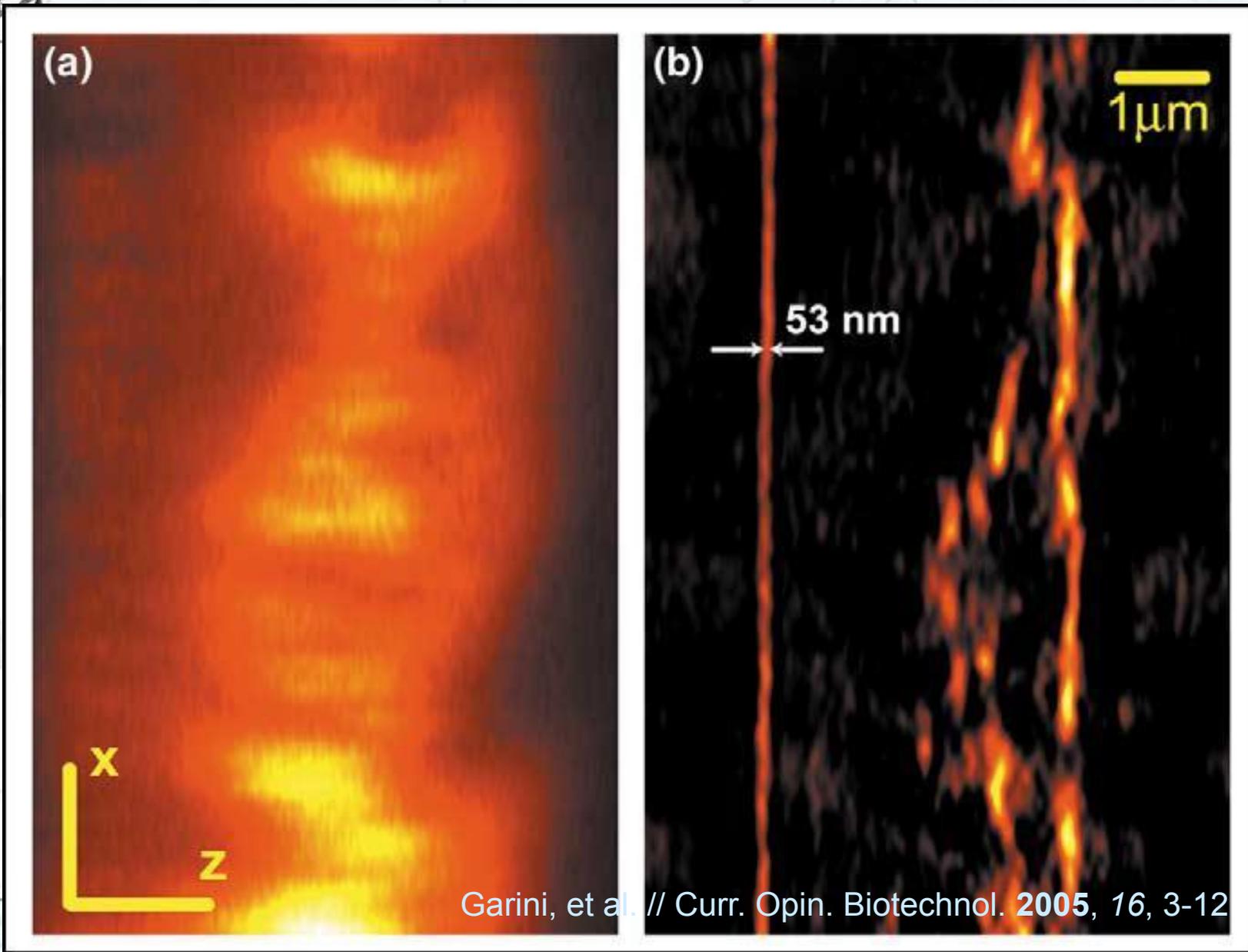


STED-микроскопия преодолела оптический предел разрешения

Молекулы флуоресцентного красителя



Разрешение STED-микроскопии



Garini, et al. // Curr. Opin. Biotechnol. 2005, 16, 3-12



Электронная микроскопия

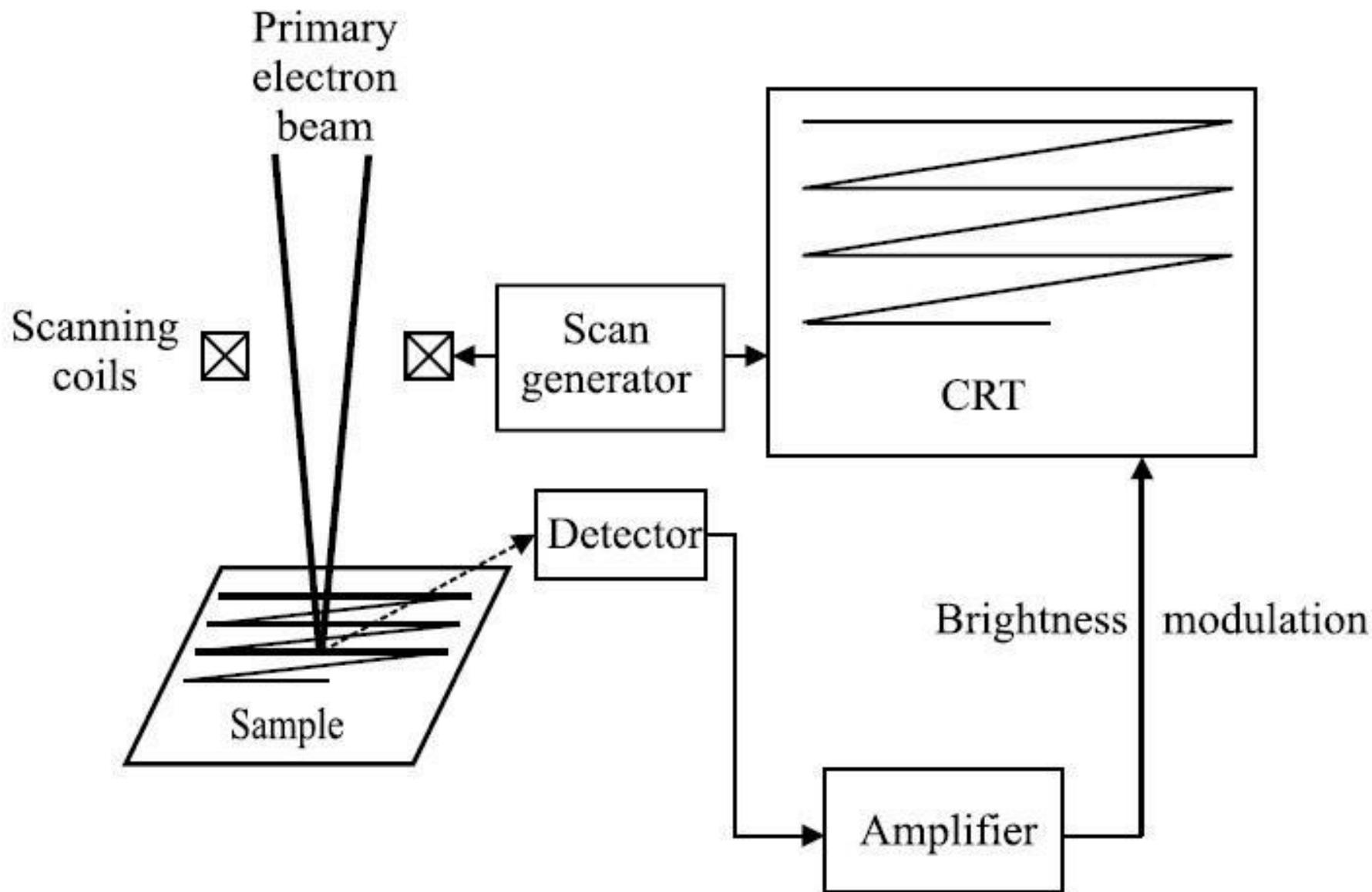
Сканирующая электронная микроскопия

- сер. 40х XX в, В.К. Зворыкин
- 1931 Р. Руденберг получил патент на просвечивающий электронный микроскоп
- 1932 году М. Кнолль и Э. Руска построили первый прототип современного прибора (1986 год - Нобелевская премия по физике)
- разработки кон. 40х–50е гг. XX в, Ч. Отли, университет Кембриджа
- 1965 г., первый коммерческий СЭМ, Stereoscan Mark 1, Cambridge Instruments

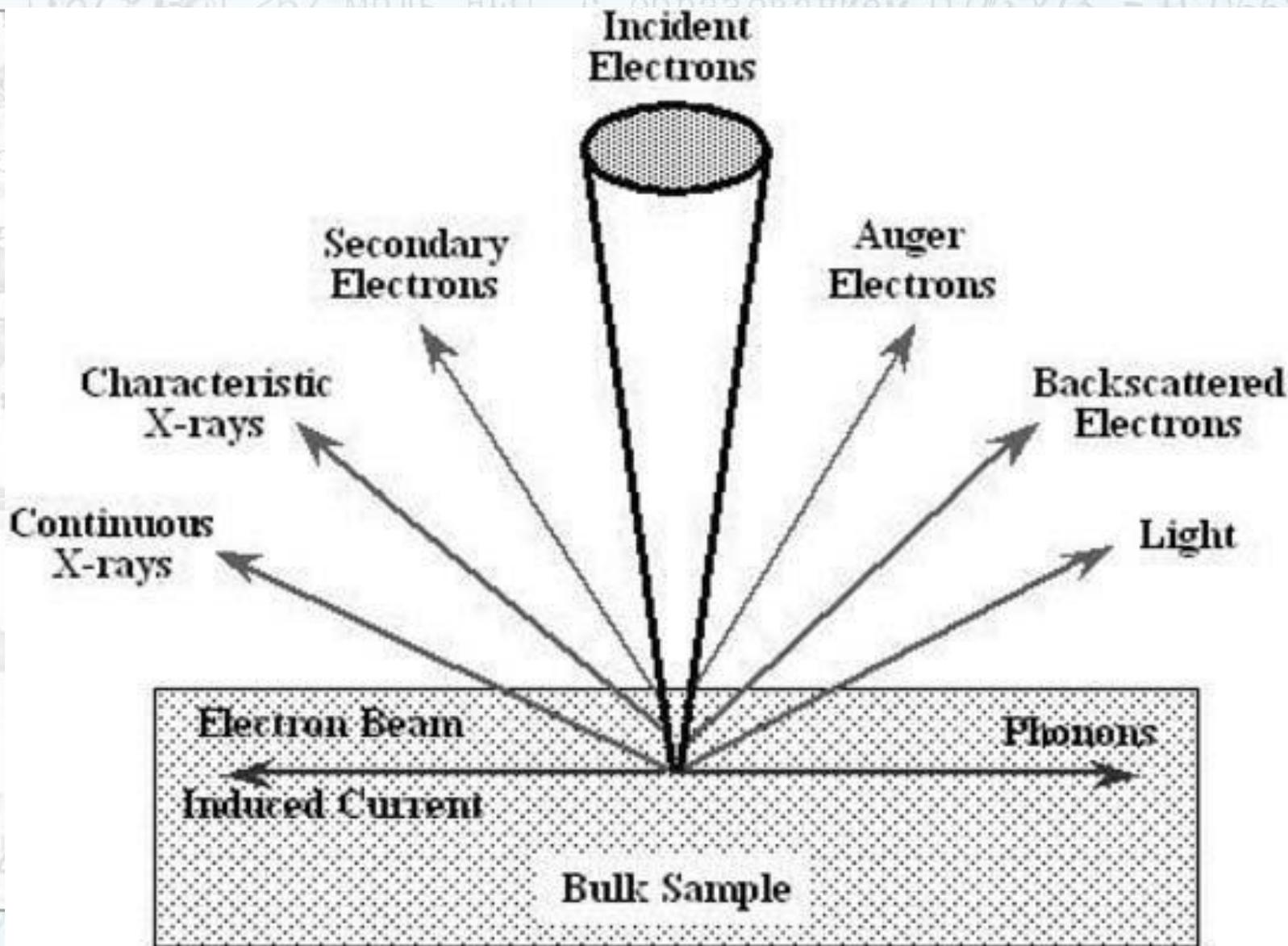




Принцип СЭМ

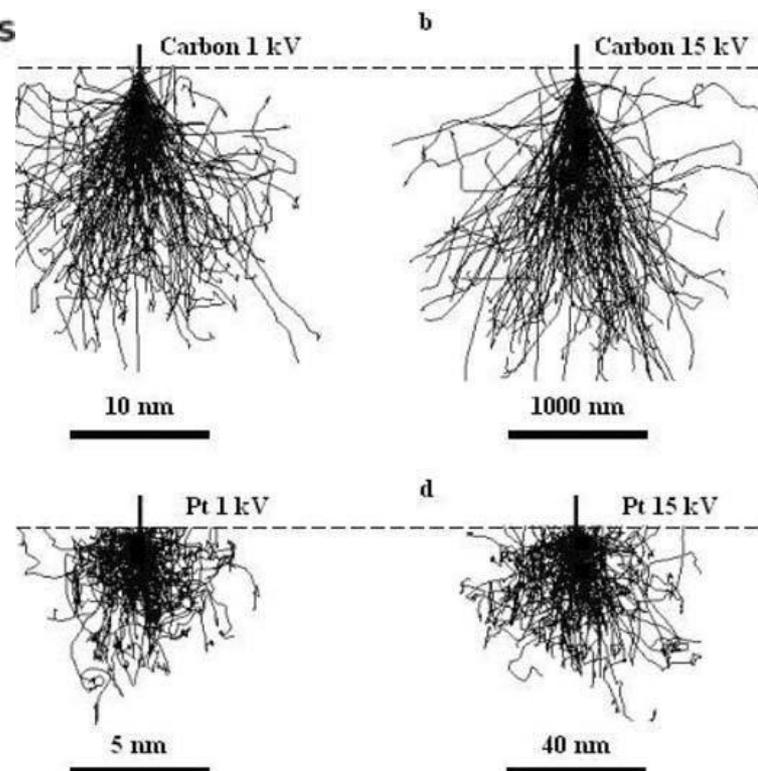
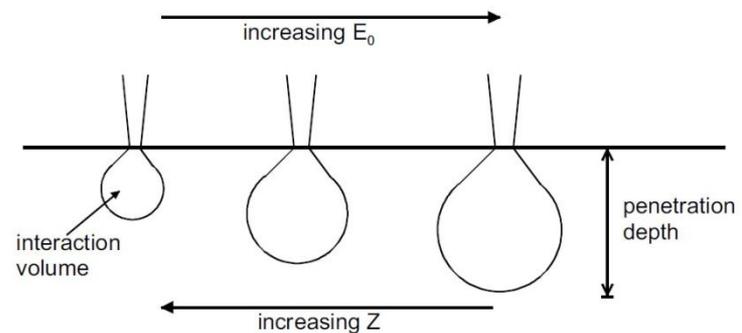
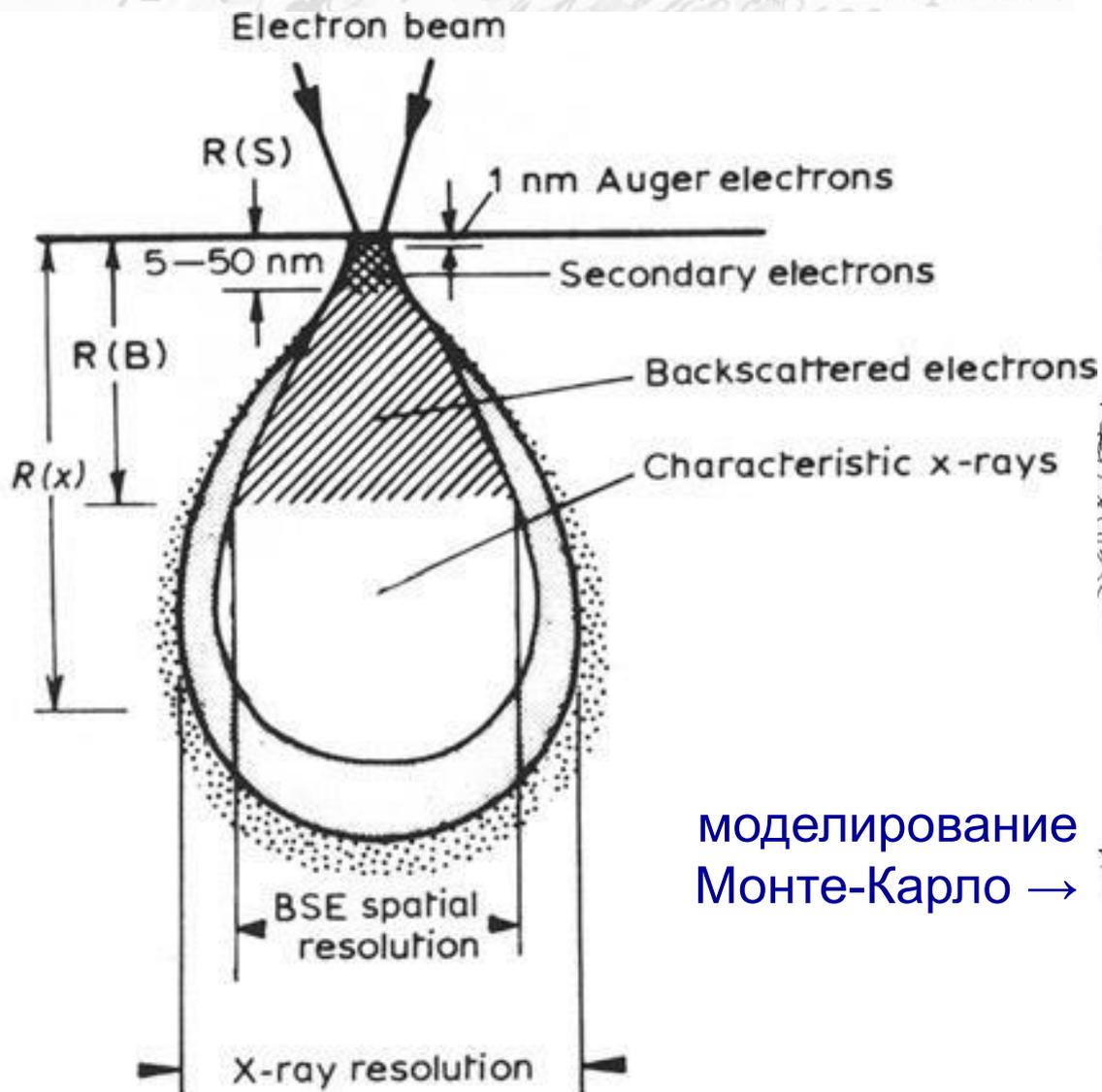


Отклик на первичный пучок





Взаимодействие первичных электронов с образцом



моделирование
Монте-Карло →

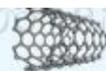
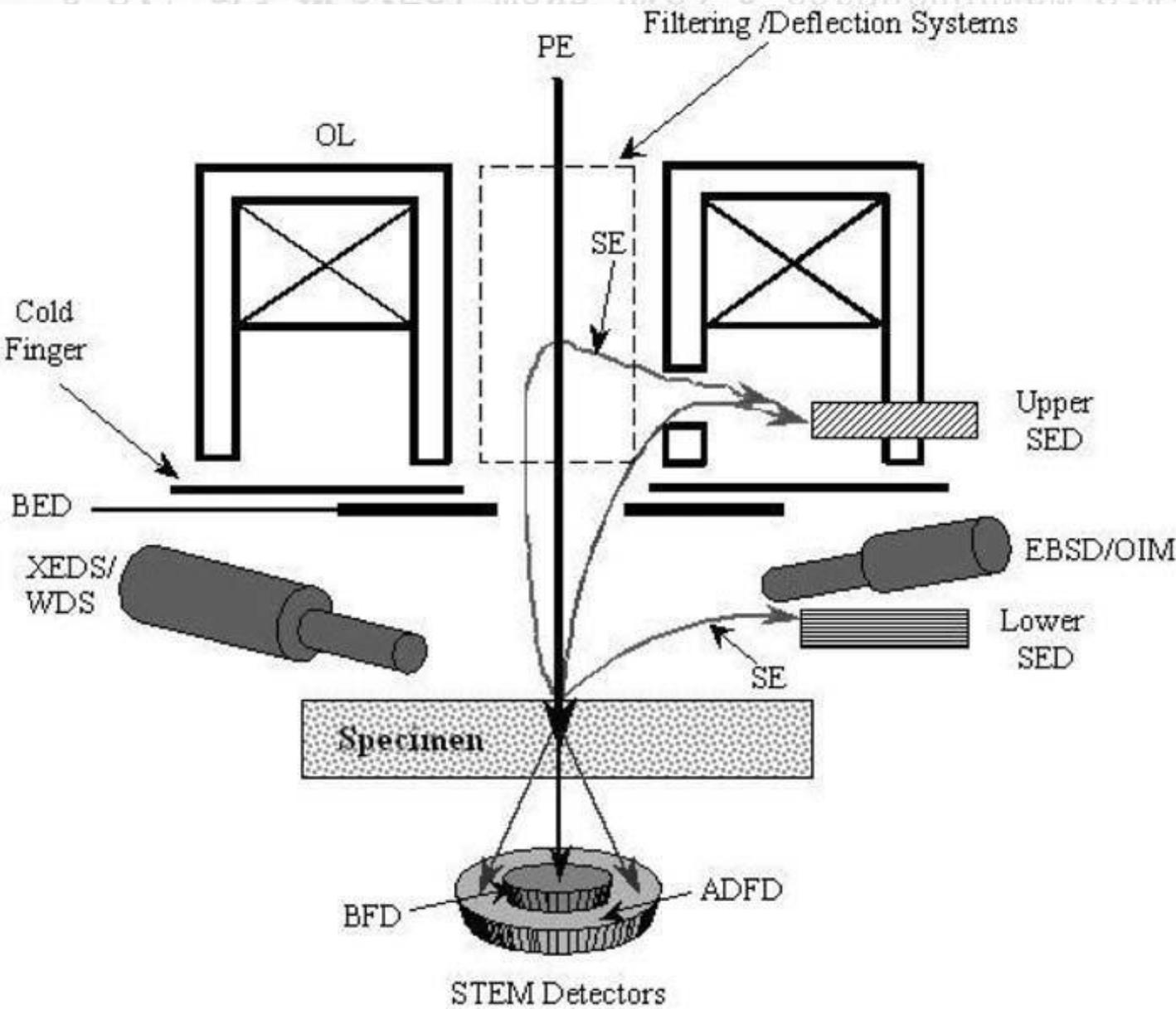




Схема СЭМ

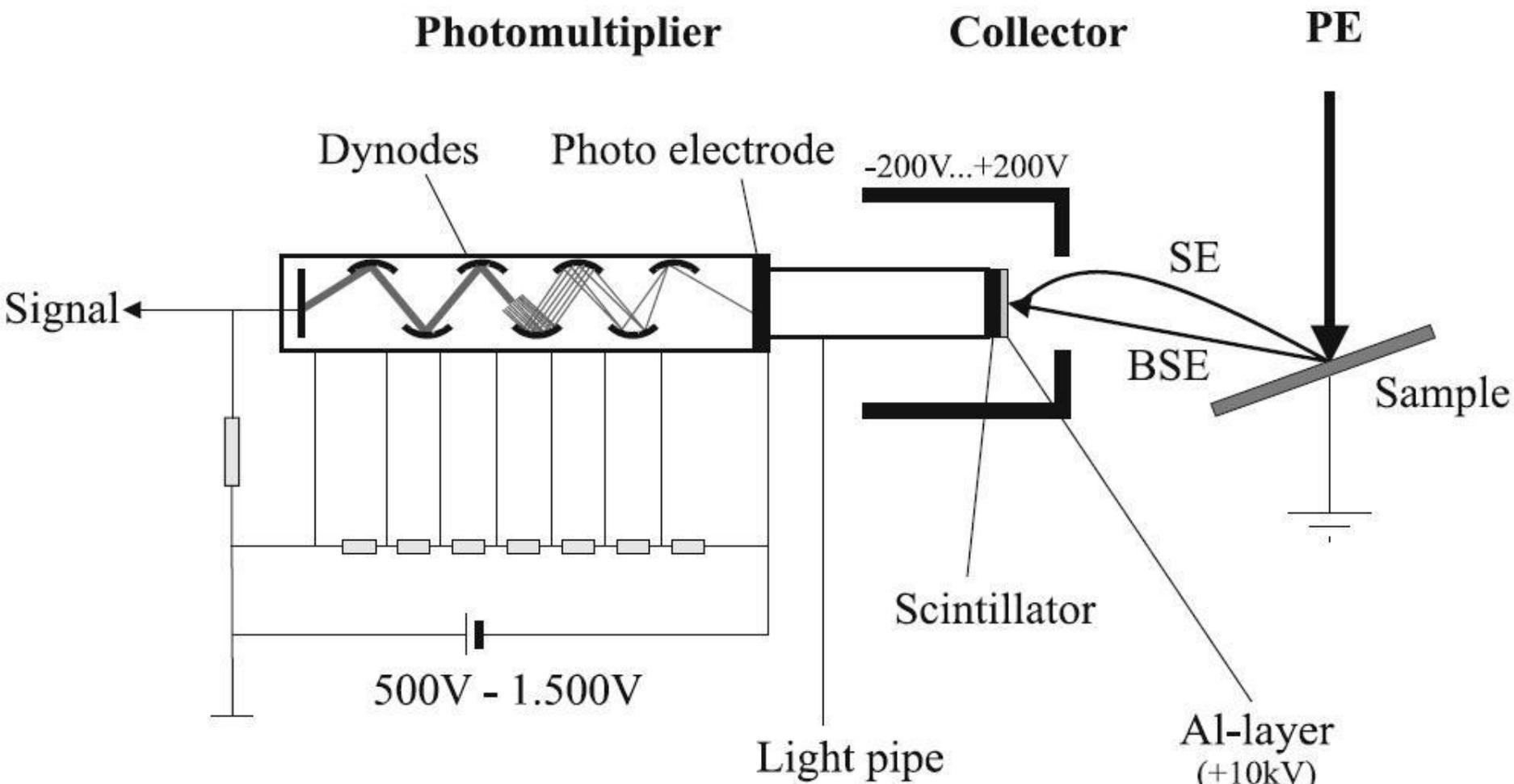


PE –
первичные
электроны,
OL – линзы
объектива,
SE –
вторичные
электроны,
BED – детектор
обратно-
рассеянных
электронов,
EDX/WDX –
рентгеновские
детекторы





Детектор Эверхарта-Торнли

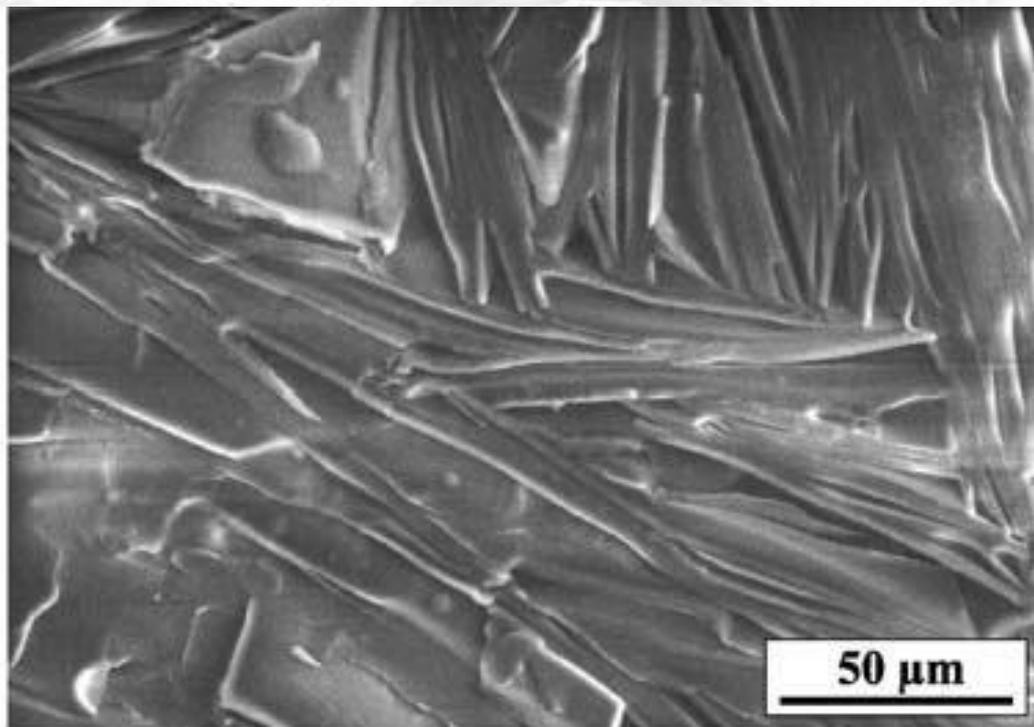
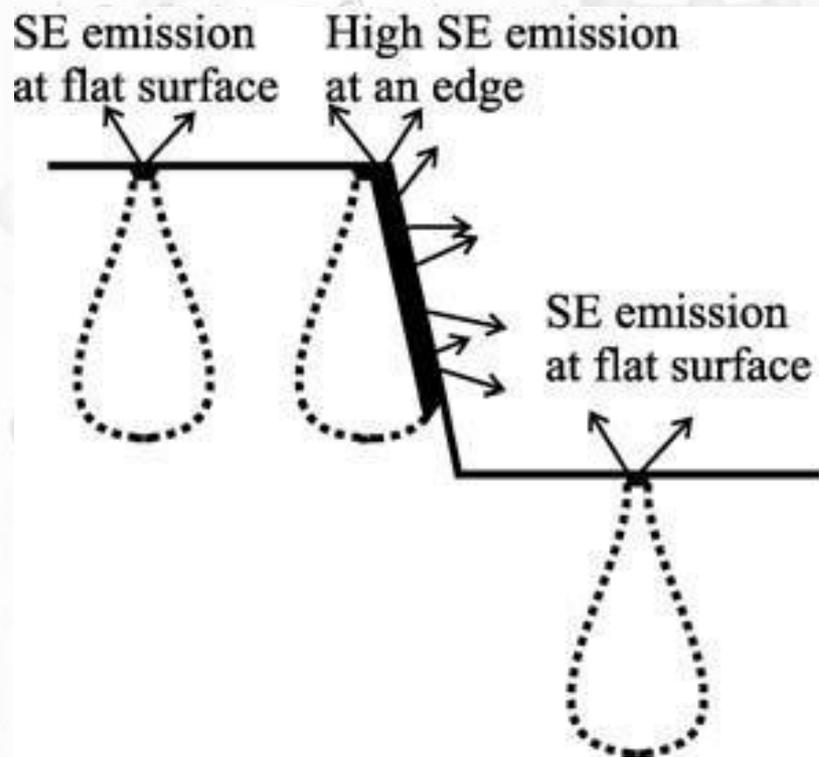


...и еще 3 объема H₂ не прореагировало. Т.о. было взято 137...





Контраст и рельеф поверхности



Кристаллы парафина
12 кВ

Получены при регистрации вторичных электронов

