

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.

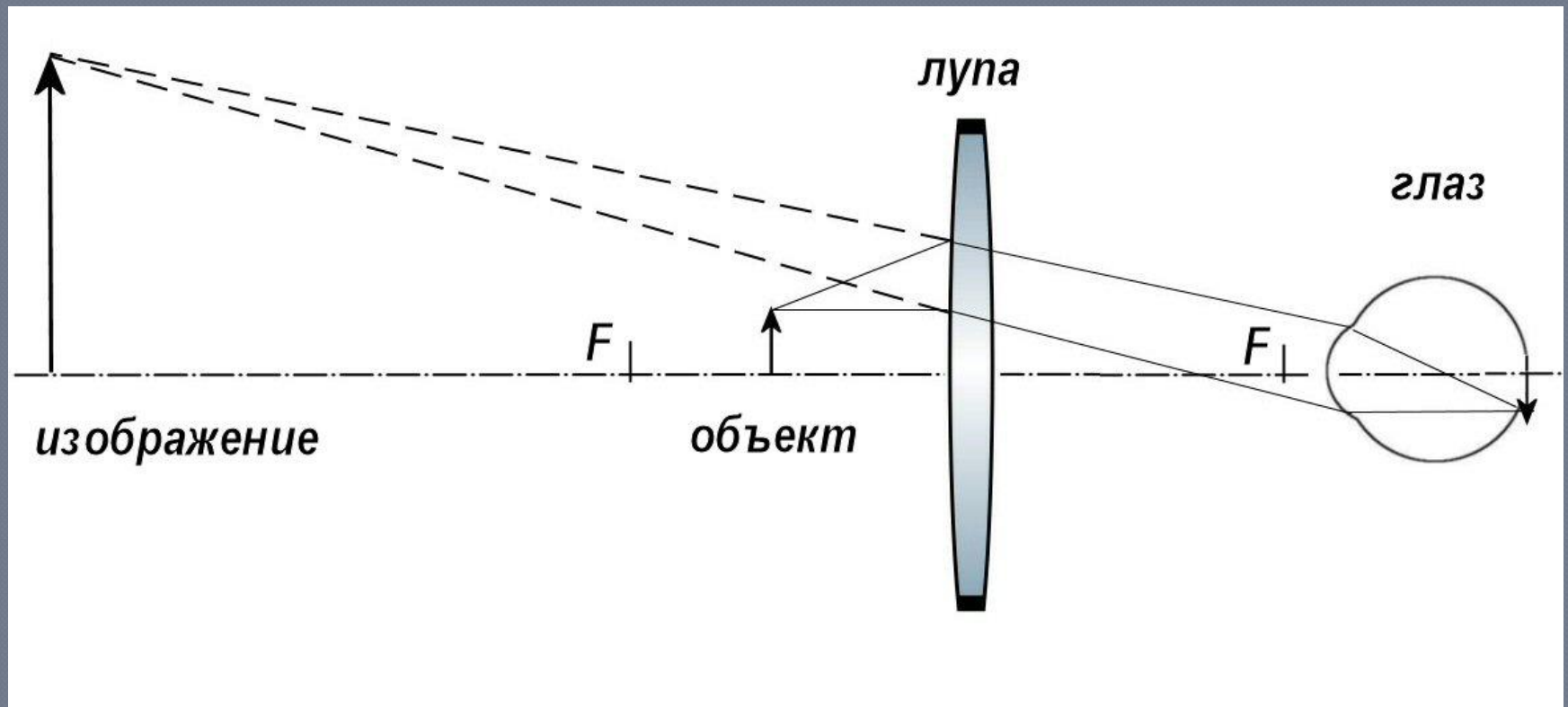
В однородной среде это будет прямая линия, тогда как в неоднородной среде он превратится в ломаную, которая изменит направление на границе раздела фаз, имеющих различную плотность.

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



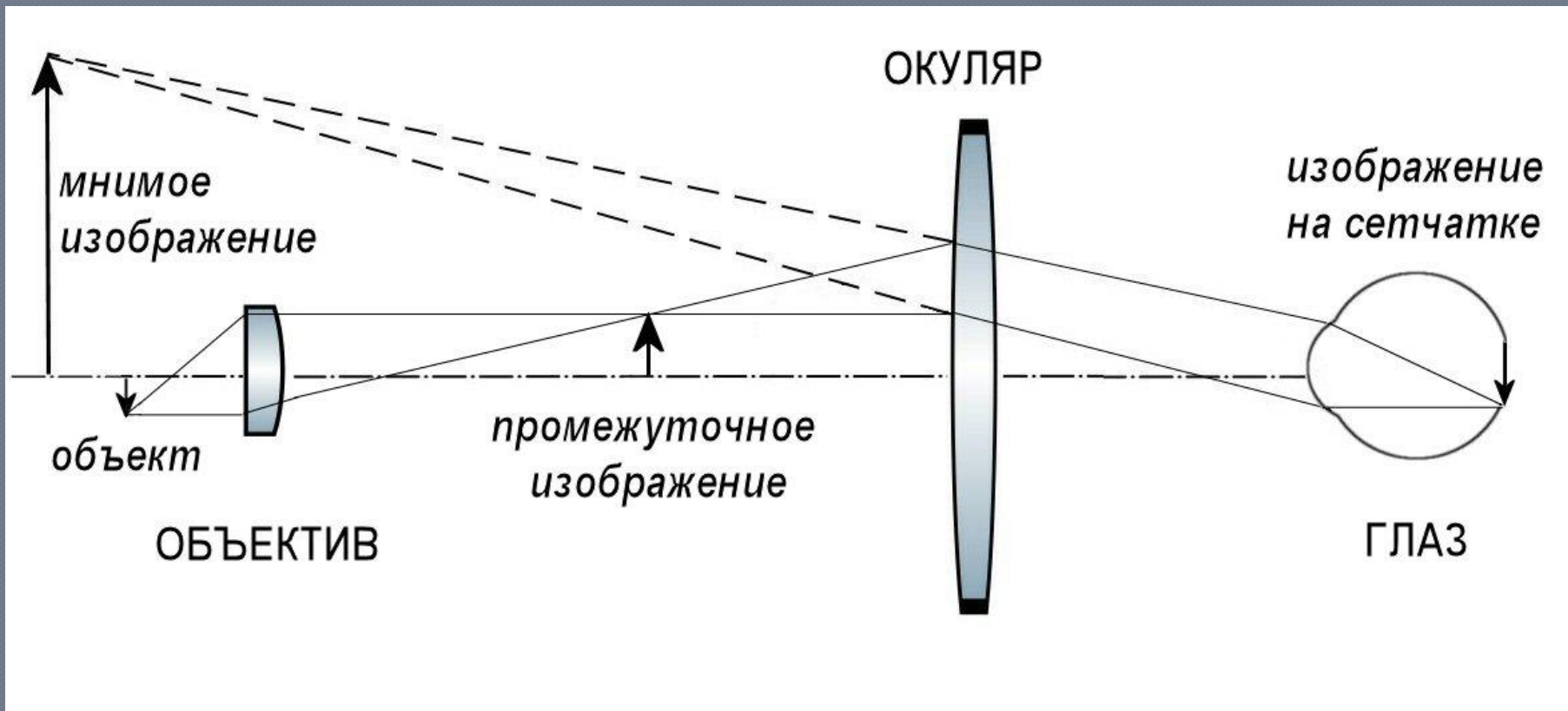
Номинальное увеличение  $M = 250/\Phi P$

# Сложный микроскоп

---



# Ход лучей в сложном микроскопе



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

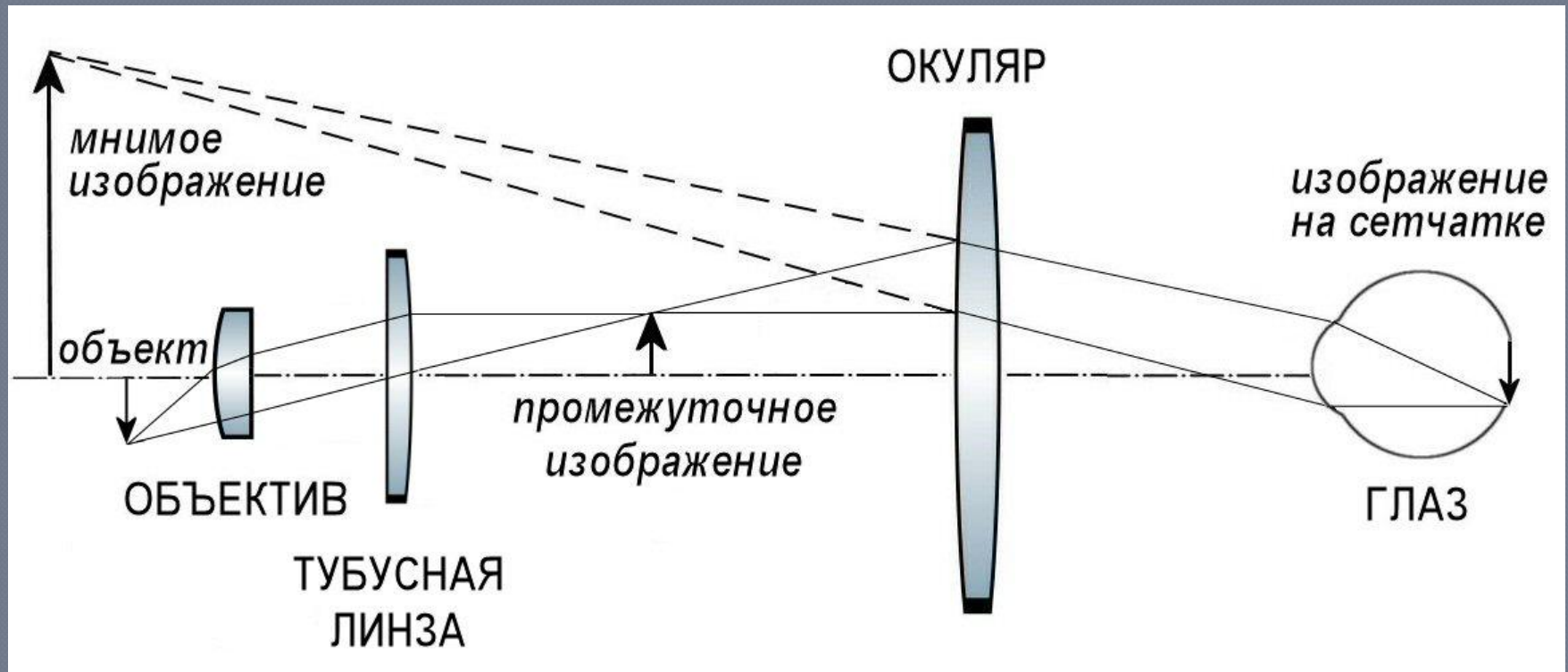


# Современный микроскоп

---



# Ход лучей в современном микроскопе



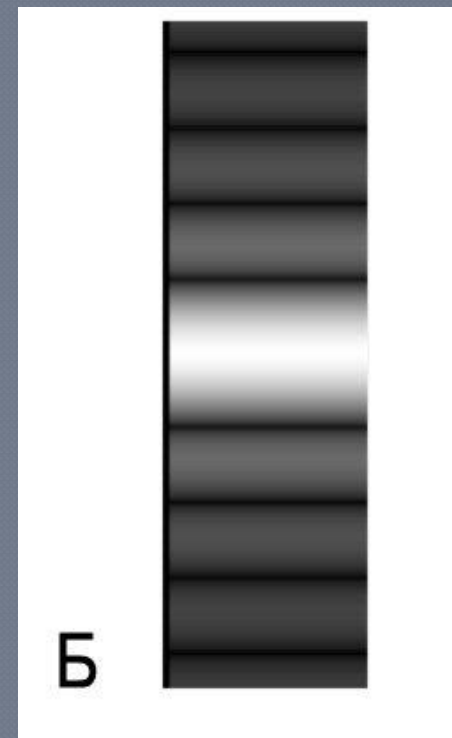
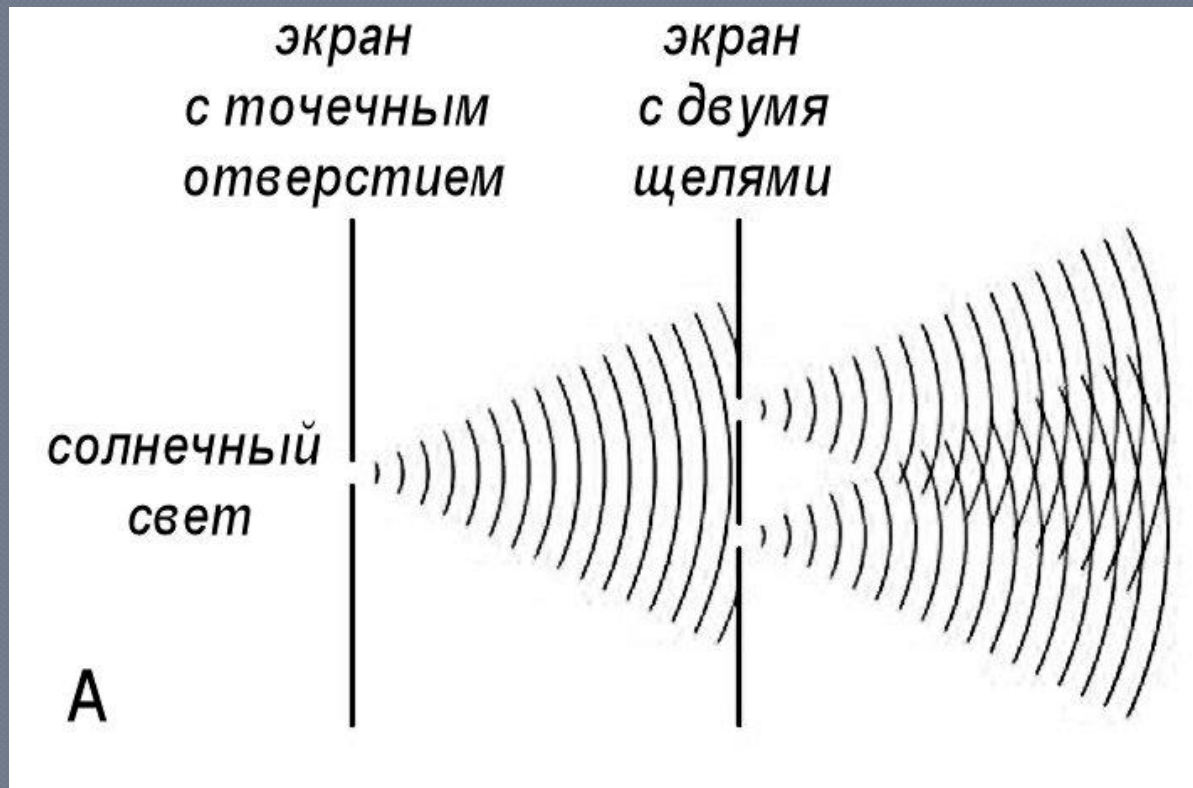
$$\text{Увеличение } M = M_{\text{об}} \times M_{\text{тл}} \times M_{\text{ок}}$$

# Волновая природа света

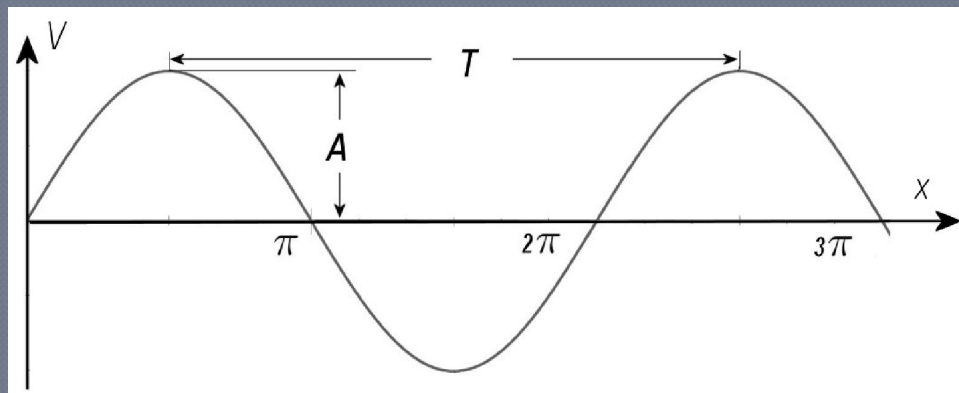
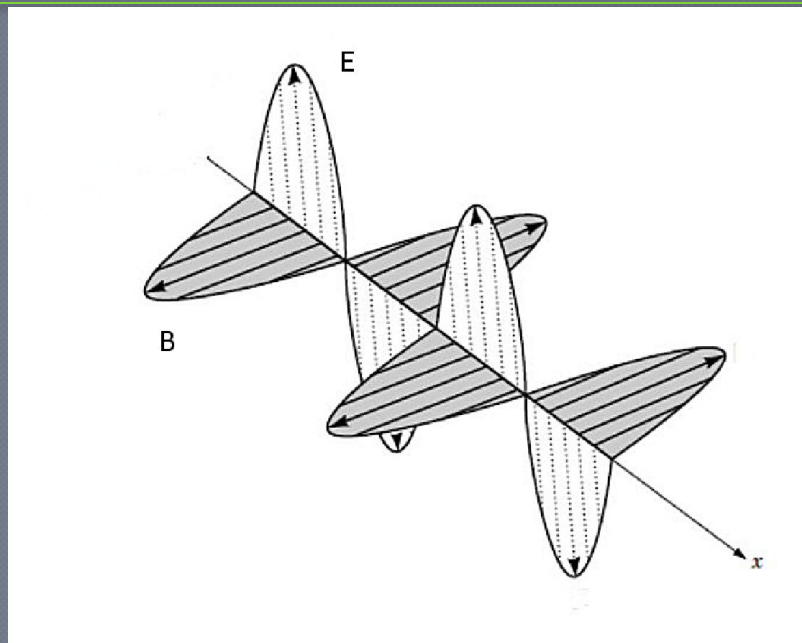


camera obscura

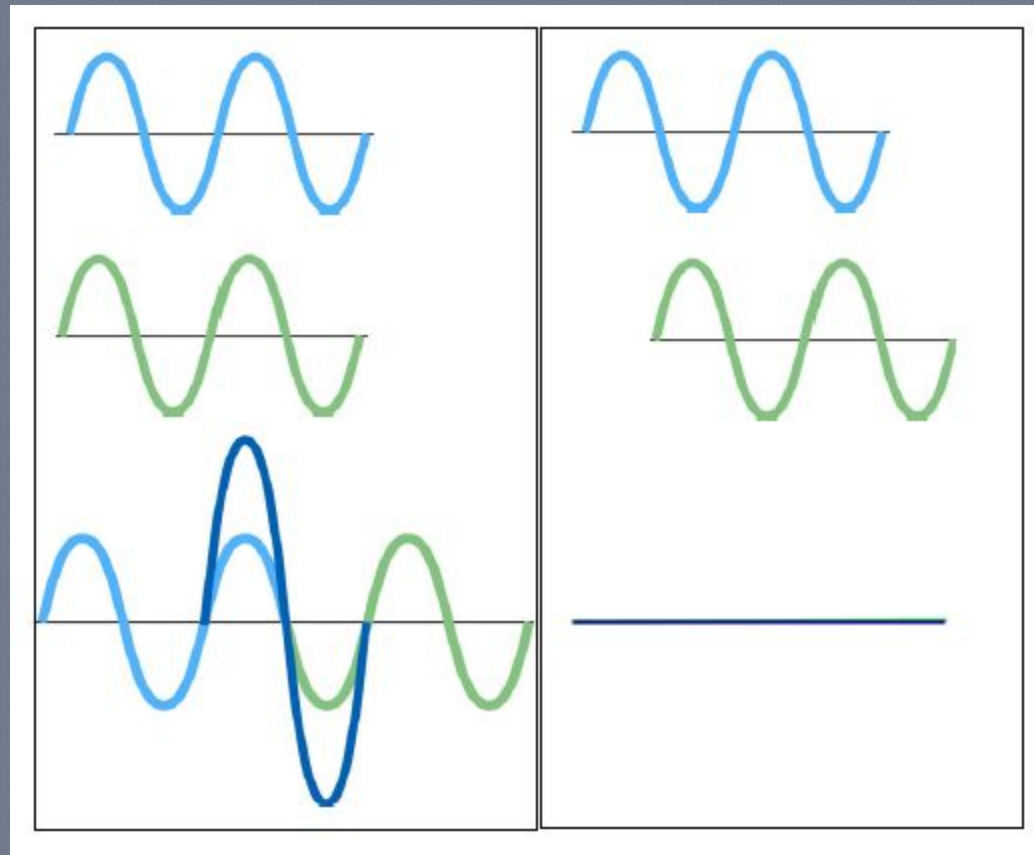
# Эксперимент Томаса Юнга



# Волновая природа света

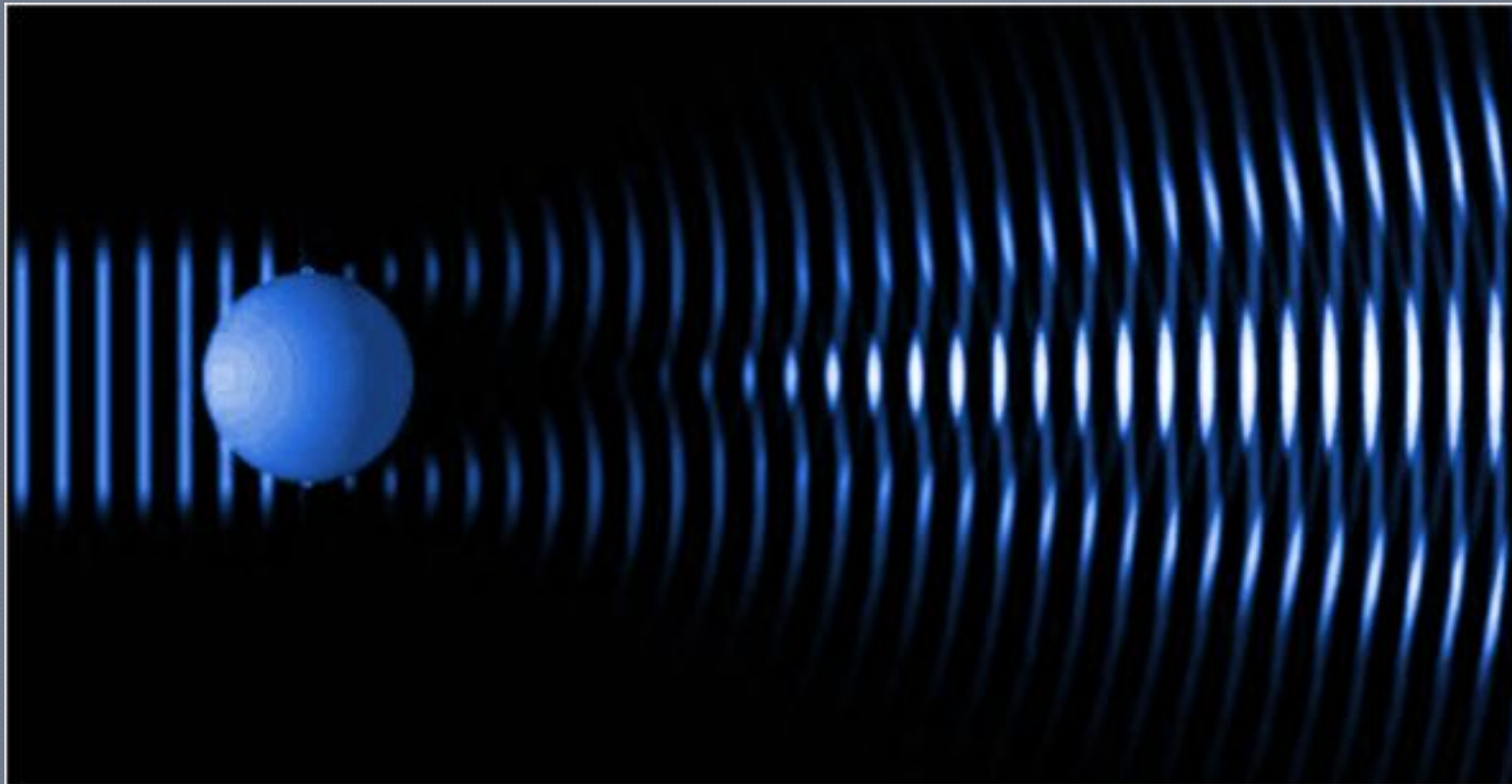


# Интерференция



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

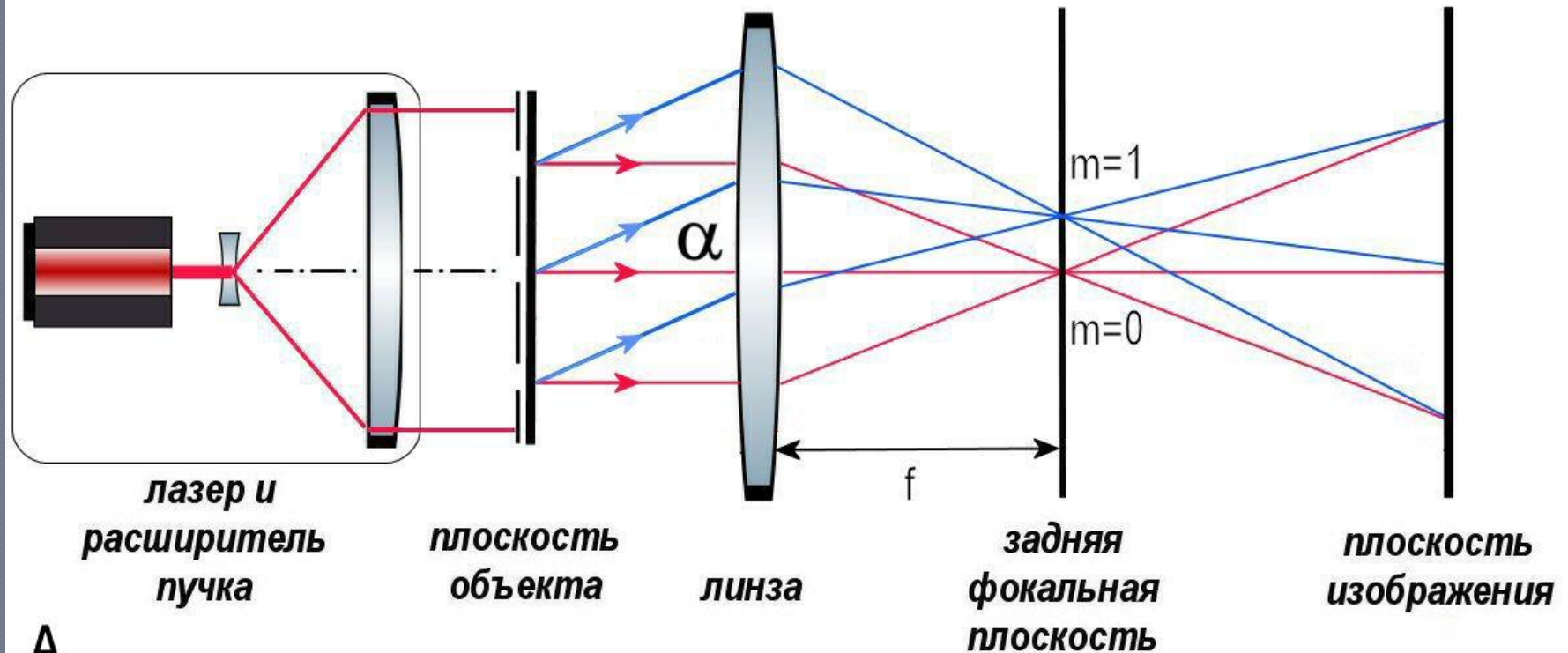
---



Эрнст Карл Аббе (1840-1905)

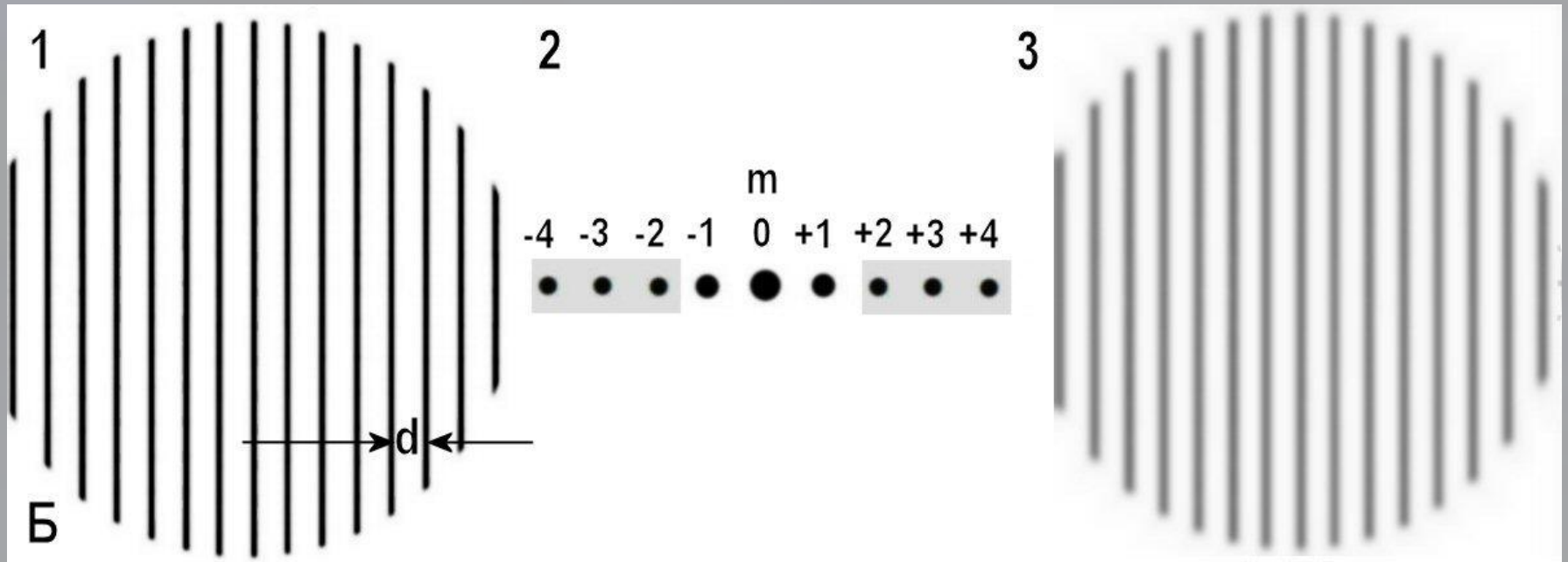


# Эксперимент Аббе



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

# Эксперимент Аббе



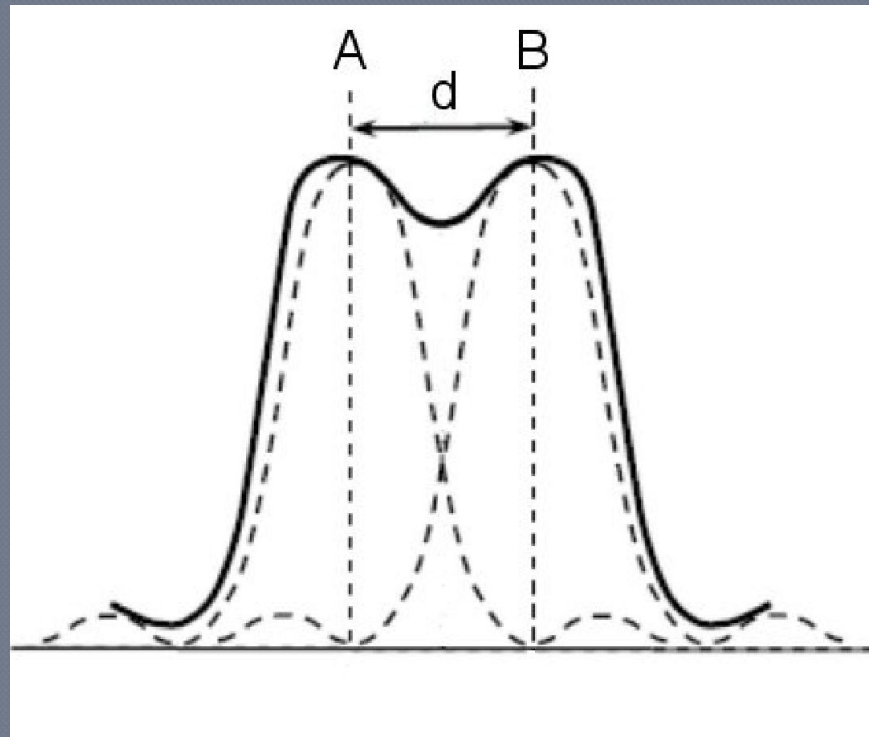
$$d * \sin \alpha = m * \lambda$$

# 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.**

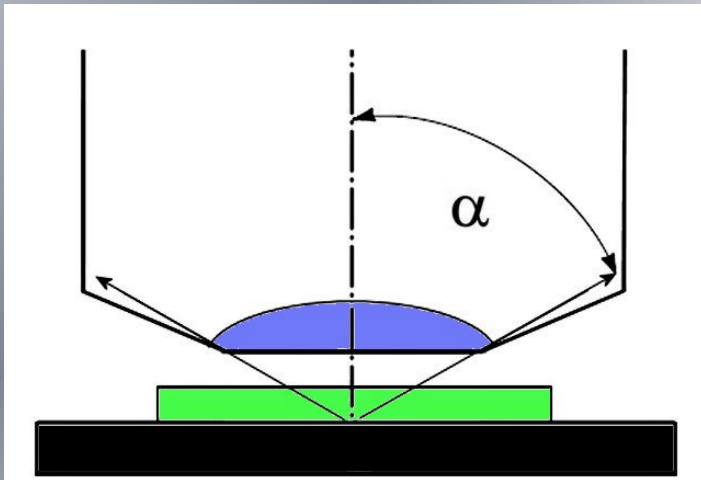
# Разрешающая способность объектива



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

# Формула Аббе

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



$\lambda$  – длина волны света;

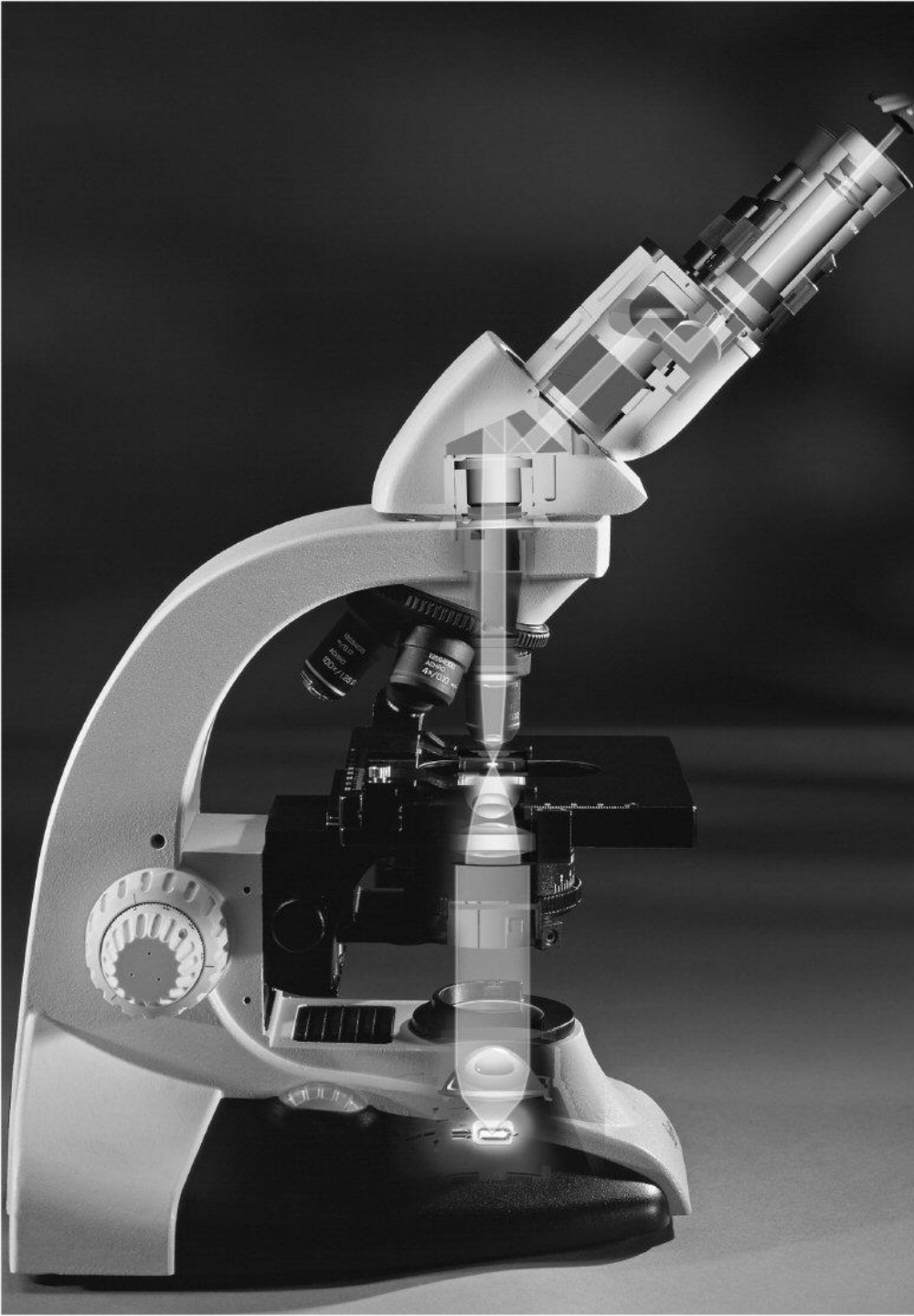
$n$  – показатель преломления  
среды

$\alpha$  – половина угла раскрытия  
объектива

# 1-ая модификация формулы

$$d = \lambda / NA$$

$\lambda$  – 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

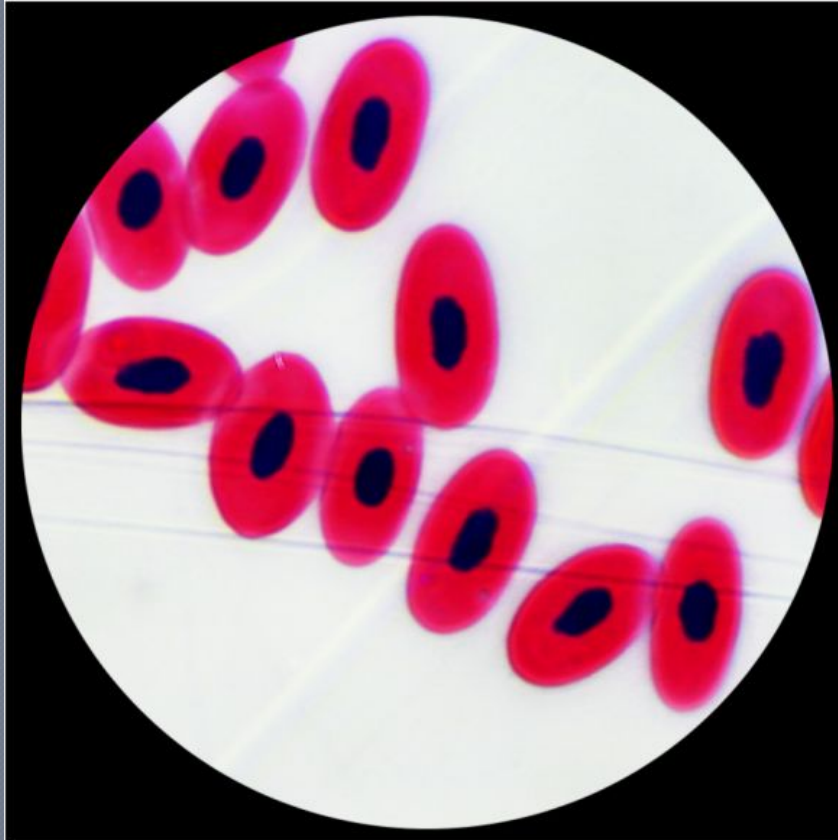


# Настройка микроскопа по Кёлеру



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

# Настройка микроскопа по Кёлеру



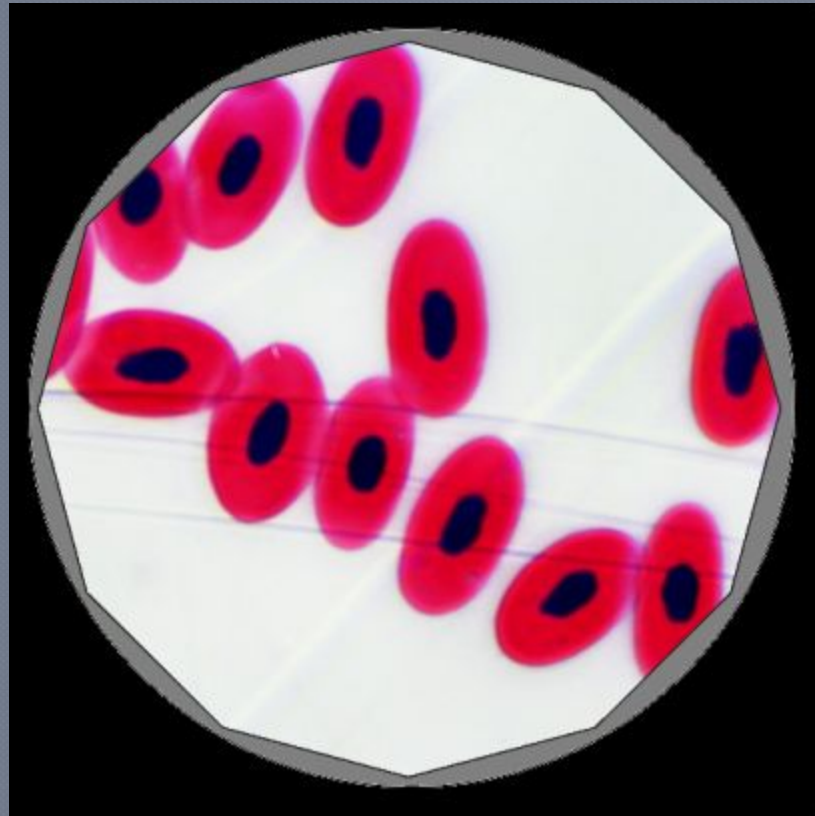
3. Поместить на предметный столик препарат и сфокусироваться на него.

# Настройка микроскопа по Кёлеру



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

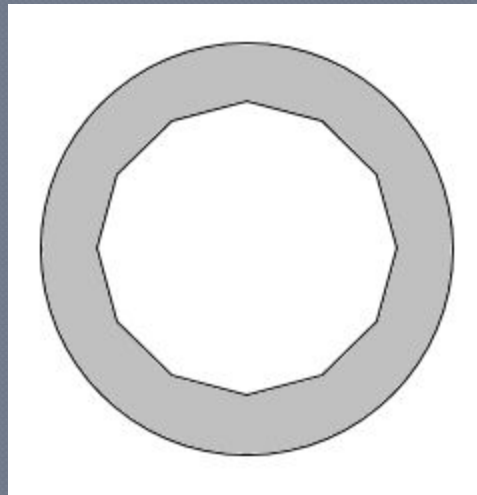
# Настройка микроскопа по Кёлеру



5. Открыть полевую диафрагму до границ поля зрения

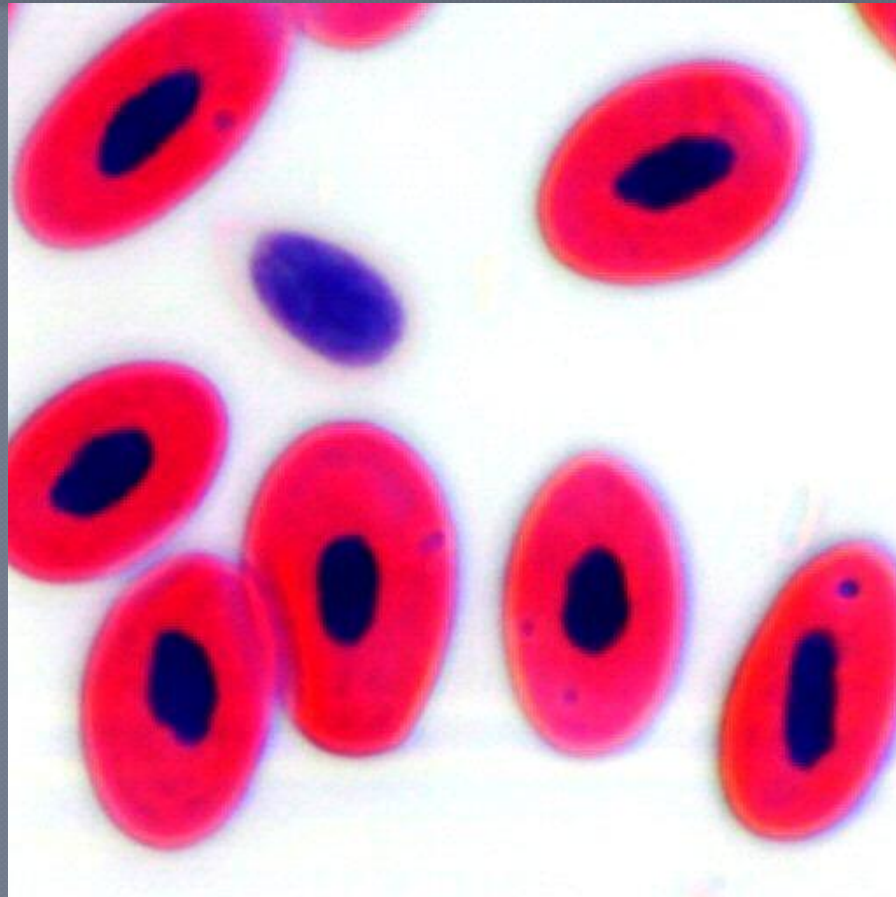
# Настройка микроскопа по Кёлеру

---



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**

---