

Přednáška 2_1

Konstrukce obrazu v mikroskopu

Vady čoček

Rozlišovací schopnost mikroskopu

Pavla Válová, 2018

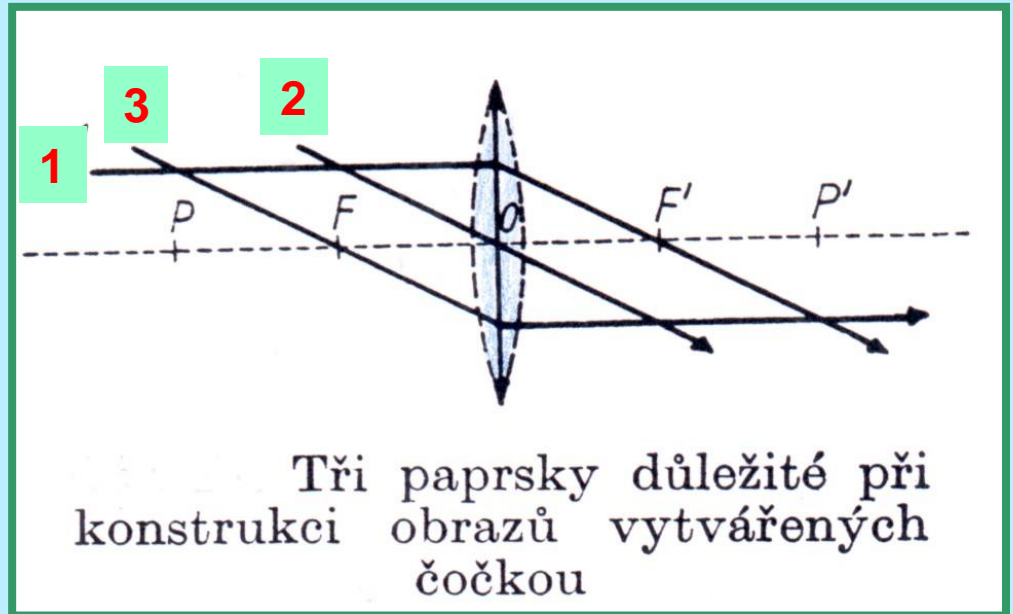
Geometrie zobrazování spojnou čočkou:

Paprsky důležité při konstrukci obrazů vytvořených čočkou*:

1. paprsek rovnoběžný s optickou osou se láme do obrazového ohniska (F')

2. paprsek procházející středem čočky (hlavní) se neláme

3. paprsek procházející předmětovým ohniskem (F) se láme rovnoběžně s optickou osou

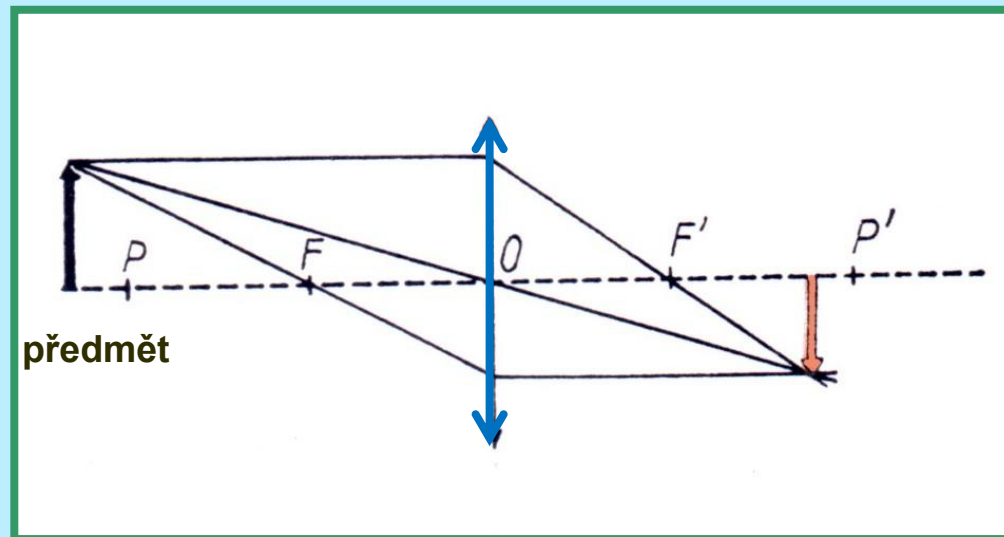


Pazourek, 1975.

* Předpokládáme velmi tenkou čočku..

Konstrukce obrazů při různých polohách objektu:

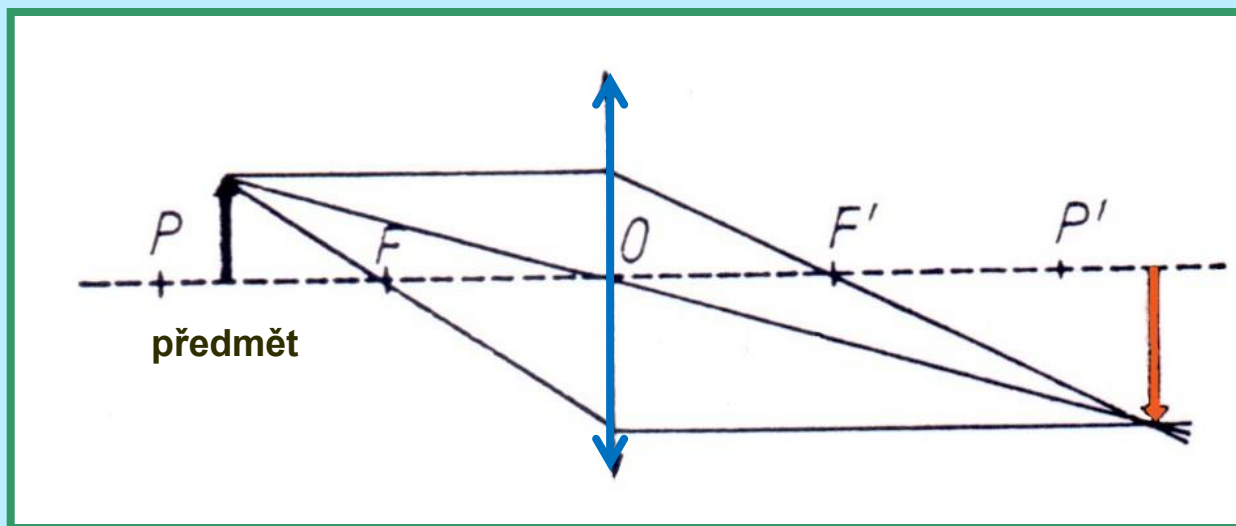
- 1) je-li předmět za dvojnásobnou ohniskovou vzdáleností (P)
→ obraz mezi ohniskem a dvojnásobnou ohniskovou vzdáleností - **skutečný, zmenšený a převrácený**



Pazourek, 1975.

2) leží-li předmět mezi dvojnásobnou ohniskovou vzdáleností (P) a F

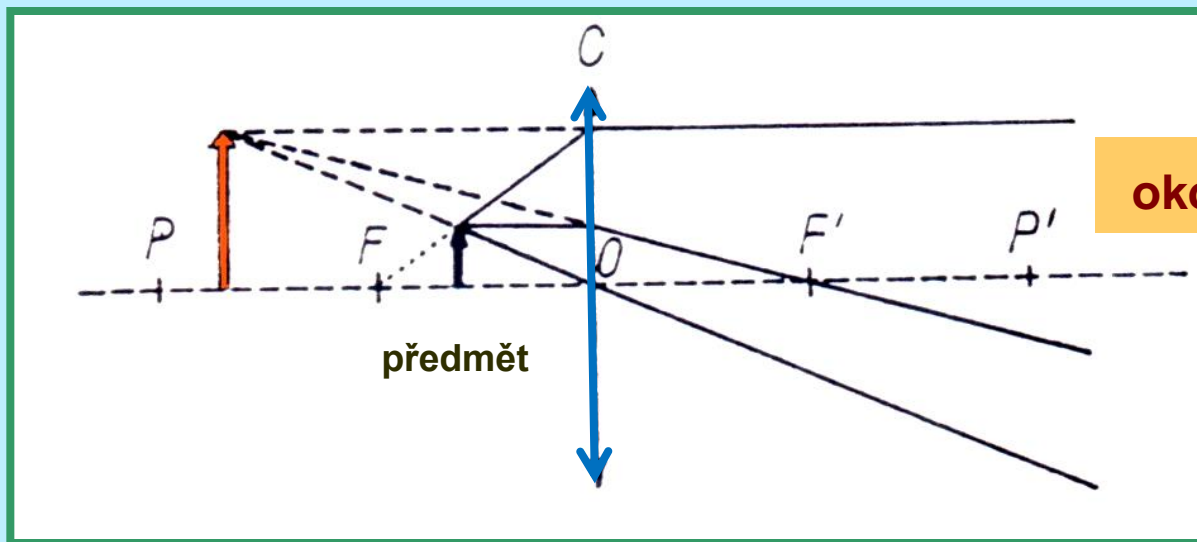
→ **skutečný, zvětšený a převrácený** za dvojnásobnou ohniskovou vzdáleností



Pazourek, 1975.

3) předmět ležící blíže než F

→ obraz **neskutečný (zdánlivý, virtuální), zvětšený a vzpřímený**



Pazourek, 1975.

Pozorování neskutečného obrazu:

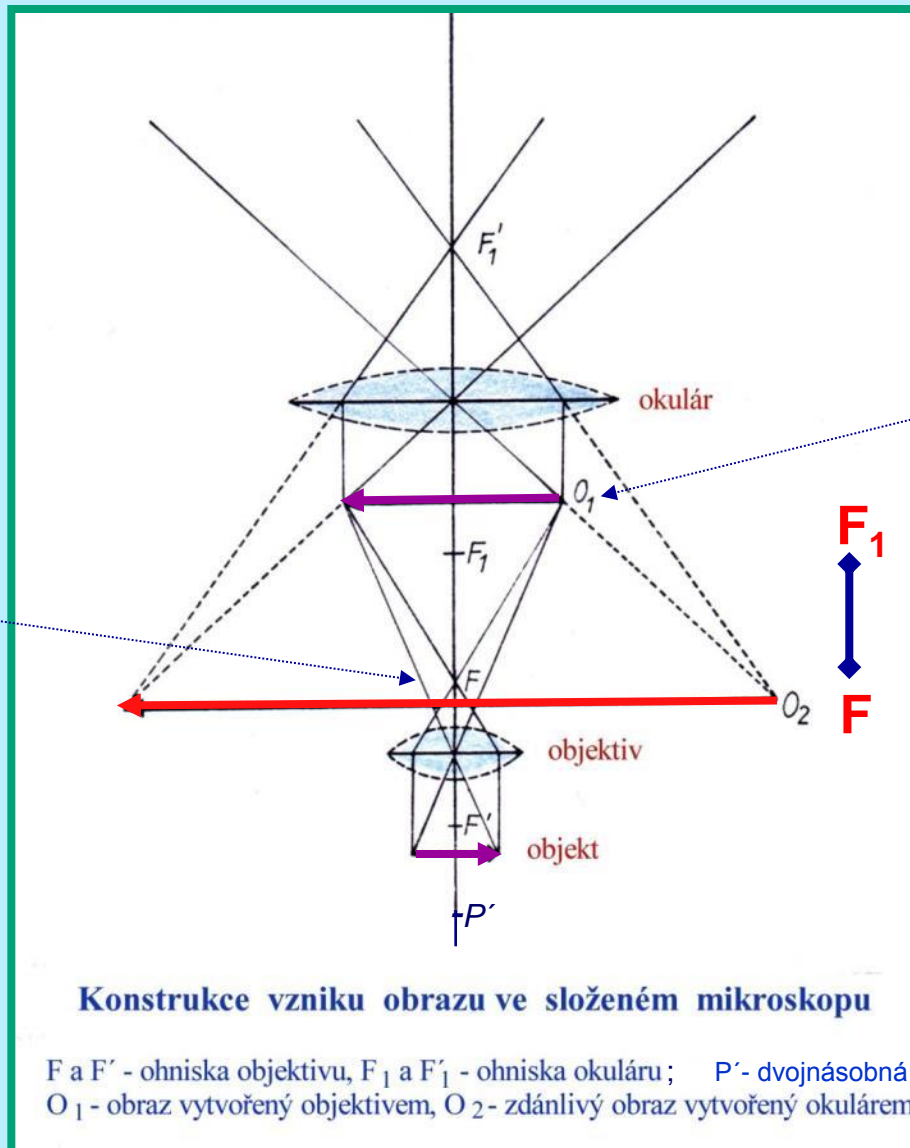
Oční čočka změří rozbíhavé paprsky ve sbíhavé – obraz předmětu pozorujeme v průsečíku, který vznikne zpětným prodloužením rozbíhavých paprsků.

Konstrukce obrazu vytvořeného složeným mikroskopem:

Složený mikroskop se skládá ze dvou optických částí funkčně i stavebně odlišných:

**z objektivu
a okuláru**

Pro konstrukci obrazu vycházíme ze zákonů geometrické optiky.



Zadní ohnisková rovina objektivu (F)

Obrazová rovina objektivu

Optický interval mikroskopu

F – ohnisko objektivu
 F_1 – ohnisko okuláru

Upraveno podle: Pazourek, 1975.

Optický interval mikroskopu (Δ) – vzdálenost mezi obrazovým ohniskem objektivu (F) a předmětovým ohniskem okuláru (F_1)

Při ostření nastavujeme objekt
mezi dvojnásobnou ohniskovou vzdálenost a ohnisko

- **objektivem** vzniká obraz

skutečný, zvětšený, převrácený
za dvojnásobnou ohniskovou vzdáleností

- tento obraz pozorujeme **okulárem** jako lupou
(obraz musí být mezi čočkou okuláru a jejím ohniskem),
tou získáme obraz **neskutečný, zvětšený, vzpřímený**

→ Konečný obraz pozorovaný v mikroskopu je vzhledem
k předmětu **převrácený**

Kvalita získaného obrazu:

Hlavní vady čoček

Vady chromatické

- barevná vada polohy
- barevná vada velikosti
- barevné variace monochromatických vad

Vady monochromatické

- otvorová vada
- astigmatická vada
- asymetrická vada (koma)
- vyklenutí zorného pole

Vada chromatická (barevná)

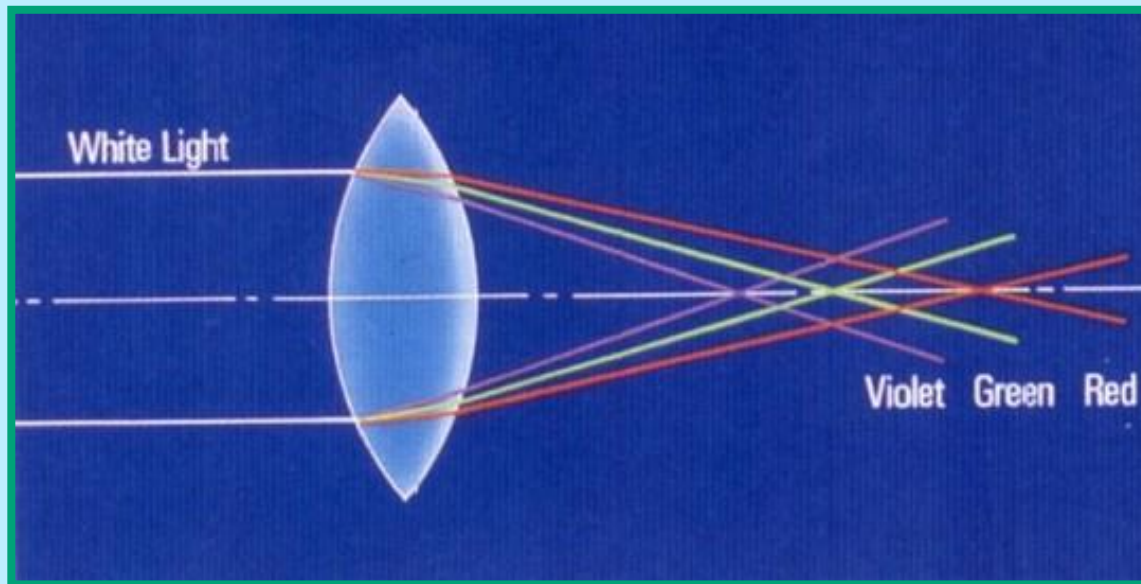
– různý lom světla o různé λ

Kvalitní čočky
fotoaparátu



Čočky
s neodstraněnou
chromatickou
vadou

<http://www.visioneng.com/resources/history-of-the-microscope>



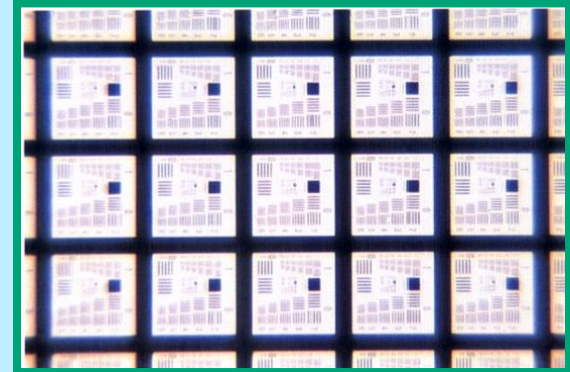
Obraz zaostřený v jedné barvě nebude současně ostrý i pro jiné barvy.

1. Barevná vada polohy

– obraz pro každou barvu se vytváří v jiném místě

Odstranění vady:

- použití monochromátů



2. Barevná vada velikosti (zvětšení)

– obrazy předmětu jsou pro různé barvy různě veliké
(pro modré jsou menší než pro červené)

Odstranění:

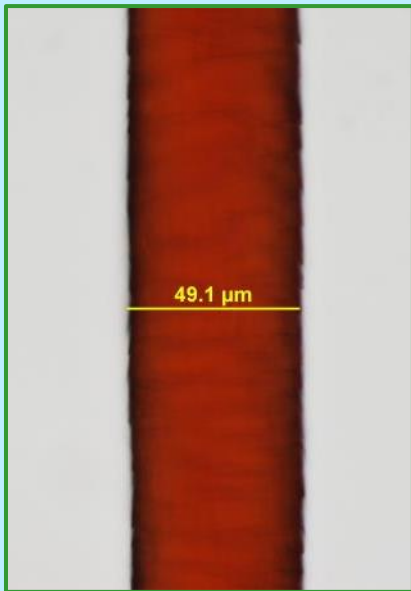
- kompenzační okuláry

Objektivy achromatické a apochromatické

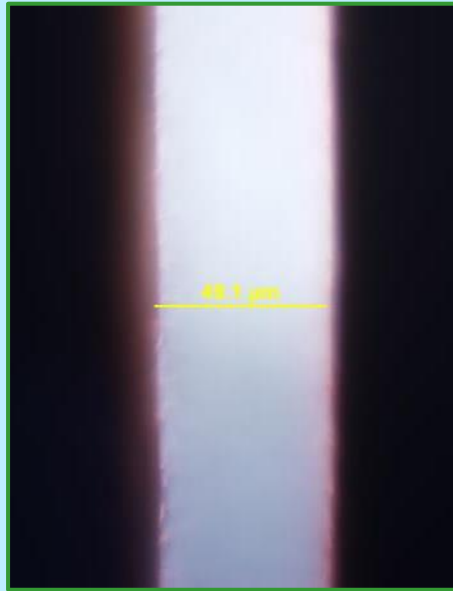
– čočka je nahrazena dvojicí či trojicí rozdílně tvarovaných čoček

Barevná vada velikosti

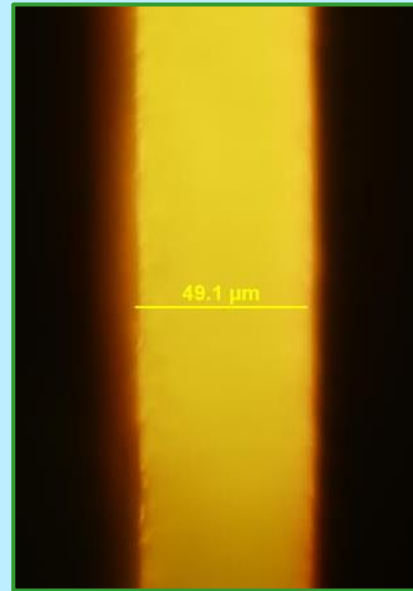
- velikost průměru vlasu pod mikroskopem
Z = 400x



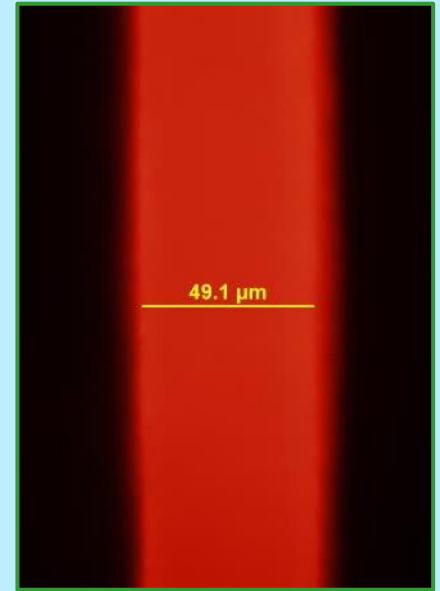
**Bílé
světlo**



**Fluorescence
WU
modrá emise**



**Fluorescence
WB
žlutá emise**



**Fluorescence
WG
červená emise**

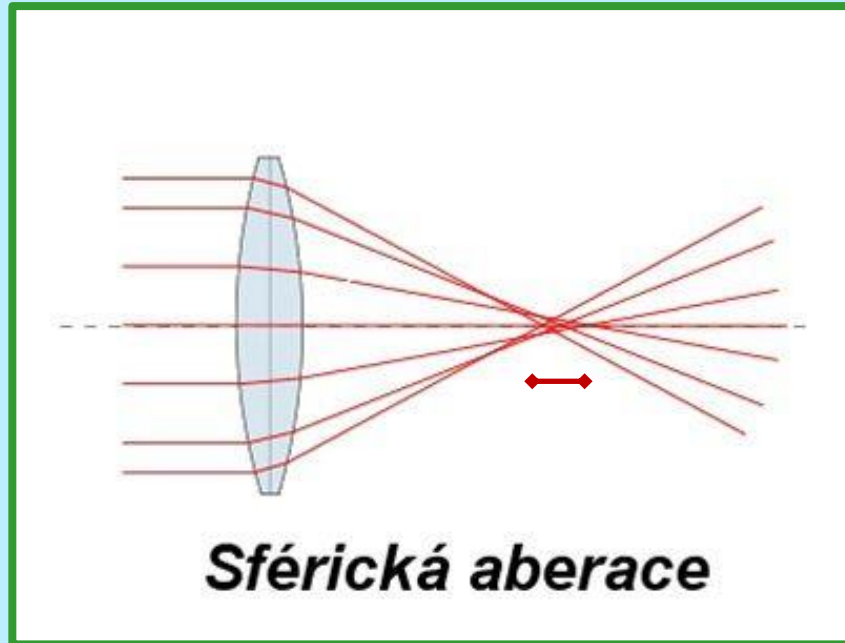
Vady monochromatické

Pozorovaný objekt



Vada otvorová (kulová, sférická)

- paprsky rovnoběžné s osou se lámou různě podle jejich vzdálenosti od středu čočky
- obrazem bodů nejsou body, ale překrývající se kruhy



http://technet.idnes.cz/zakladni-kamen-kazdeho-fotaku-jak-vznika-obraz-v-objektivu-pan-tec_foto.aspx?c=A071025_103506_tec_foto_jlb

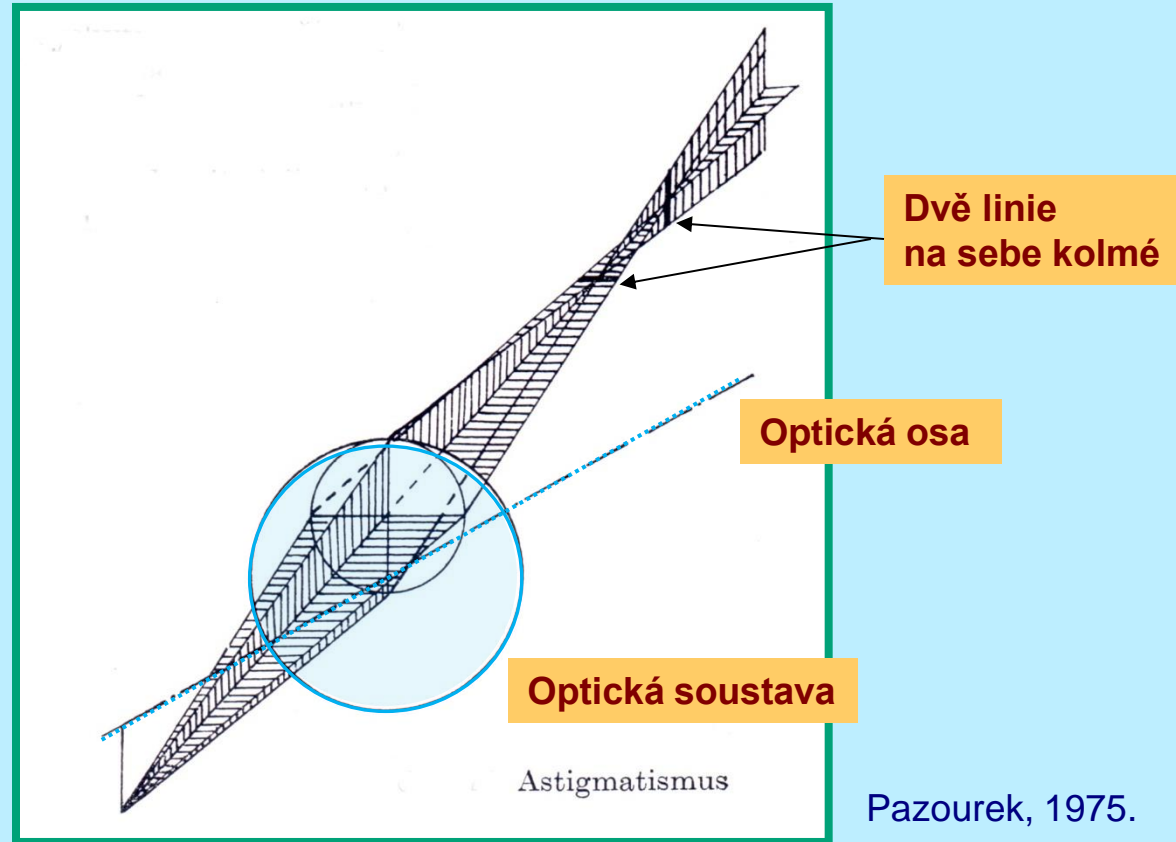
→ obraz je mdlý, s nízkou obrysovou ostroť

Odstranění vady:

- zúžením svazku paprsků; použitím soustav čoček konvexních a konkávních, tzv. aplanatické čočky

Vada astigmatická

- paprsky dopadající na čočku ze strany (z bodu ležícího mimo optickou osu) se neprotnou v jednom místě, ale zobrazí se jako dvě linie na sebe kolmé

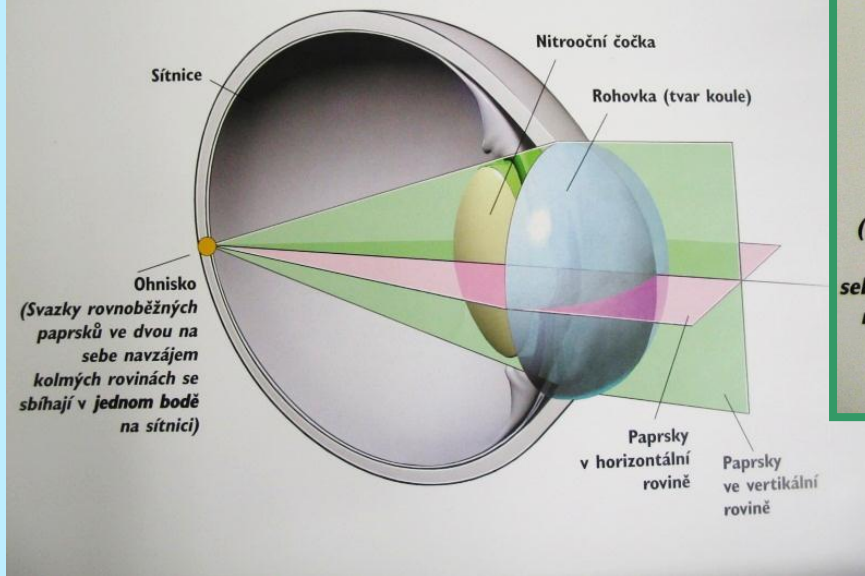


Odstranění vady:

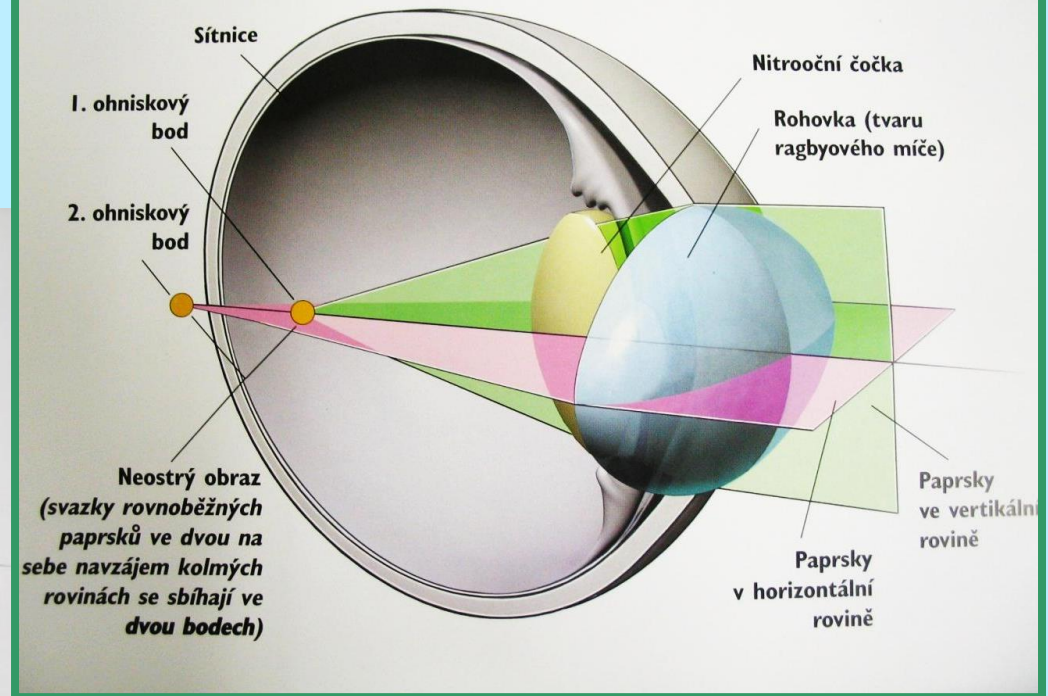
- spojení s rozptylkou opačné chyby
- důležitá správná konstrukce mikroskopu

Astigmatická vada u oka

PRŮŘEZ NORMÁLNÍM OKEM



PRŮŘEZ ASTIGMATICKÝM OKEM



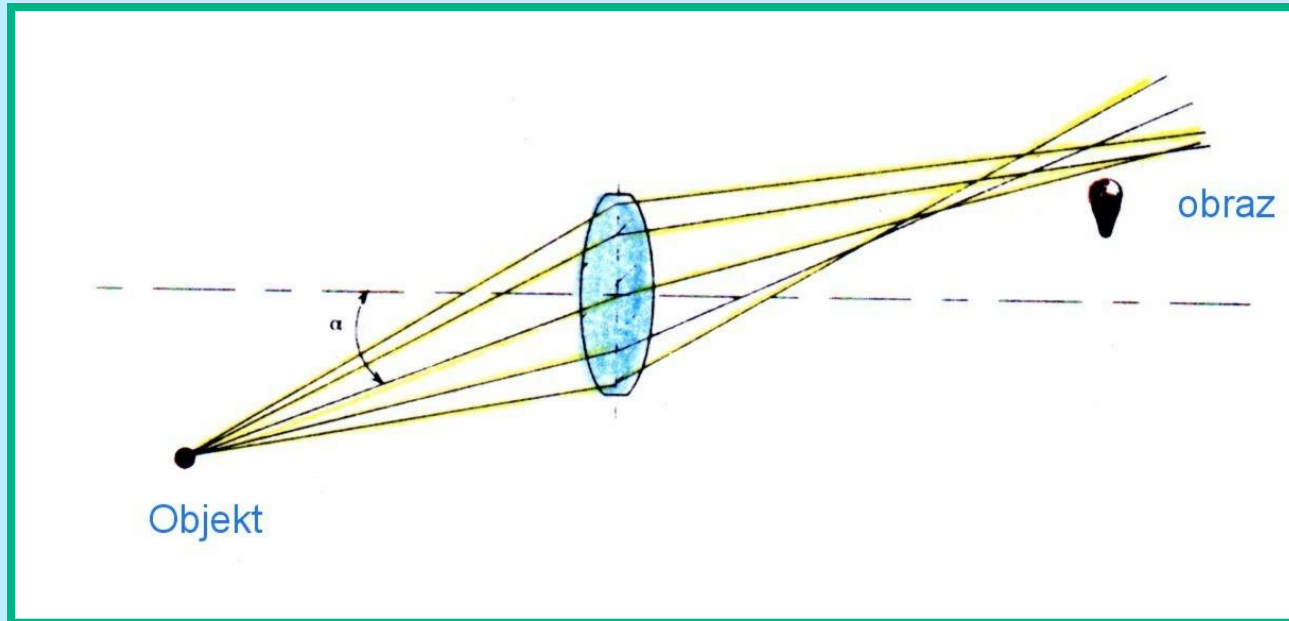
Korigovaný (vlevo) a nekorigovaný (vpravo) astigmatismus

Odstranění vady:

Toroidní čočka – ve dvou navzájem kolmých rovinách má jiné zakřivení, takže v každé z nich ovlivňuje sbíhavost paprsků jinak.

Asymetrická vada - koma

– komplexní vada; bod ležící mimo osu čočky se zobrazuje širokým svazkem paprsků v prostorový útvar, který na rovinném stínítku vytváří skvrnku připomínající tvarem kometu



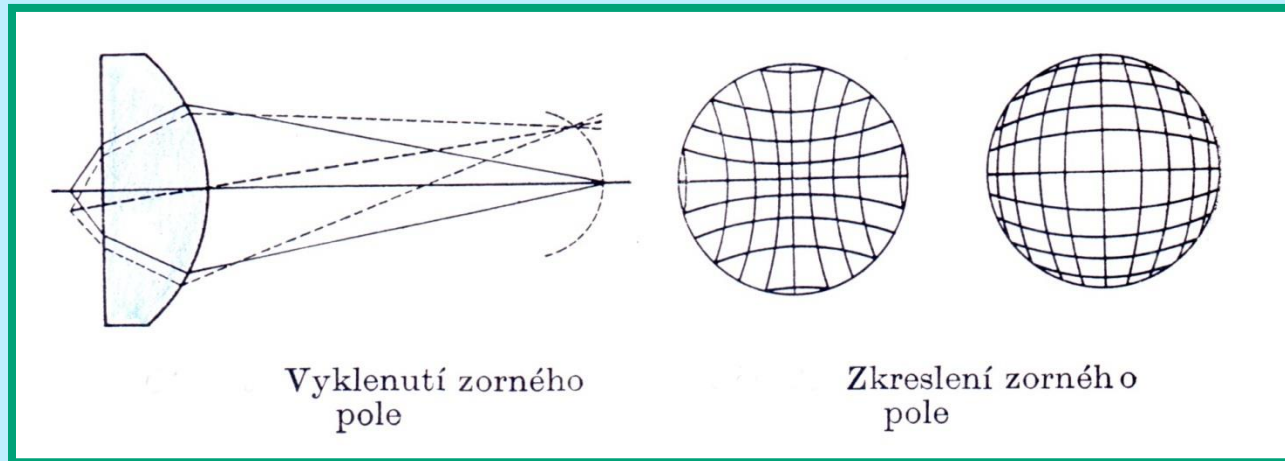
Pazourek, 1975.

Odstranění vady:

- aplanatické optické systémy;
- důležitá správná konstrukce mikroskopu

Vyklenutí zorného pole

- paprsky dopadající na čočku šikmo mají jiné ohnisko, než rovnoměrné paprsky přímé → obraz roviny se nevytvoří v rovině, ale na zakřivené ploše → nelze zaostřit na celý předmět



Pazourek, 1975.

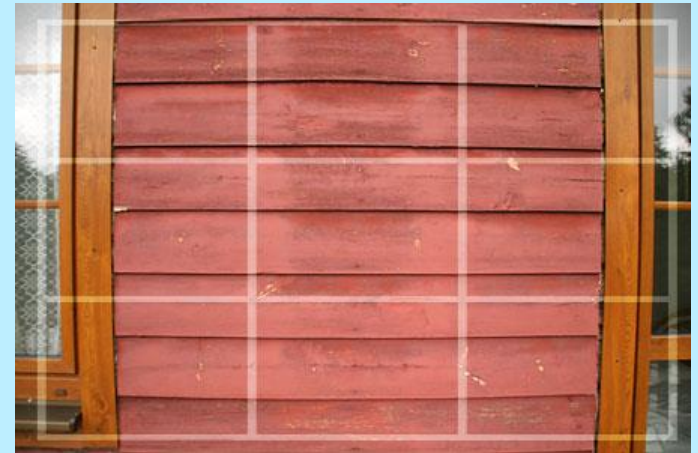
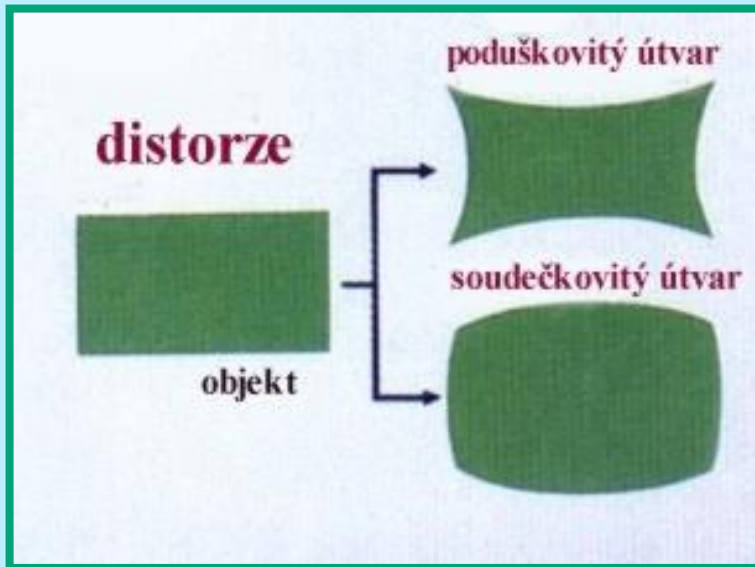
Odstranění vady:

- použití planobjektivů

Důležité pro mikrofotografii kvůli zobrazení nezkráceného celého zorného pole

Distorze (zkreslení)

– okraje zorného pole jsou více nebo méně zvětšené než střed - přímky mimo optickou osu se zobrazují jako prohnuté čáry → deformace reality



Soudečkovitá distorze
(http://fotoroman.cz/glossary2/2_sfera.htm)

(obraz bez distorzní vady je tzv. ortoskopický)

- Možnost korekce vad vhodnými kombinacemi různých čoček a materiálů.

Zobrazení detailů v mikroskopu

Důležitým parametrem kromě zvětšení mikroskopu
je také
schopnost rozlišovat podrobnosti v preparátu

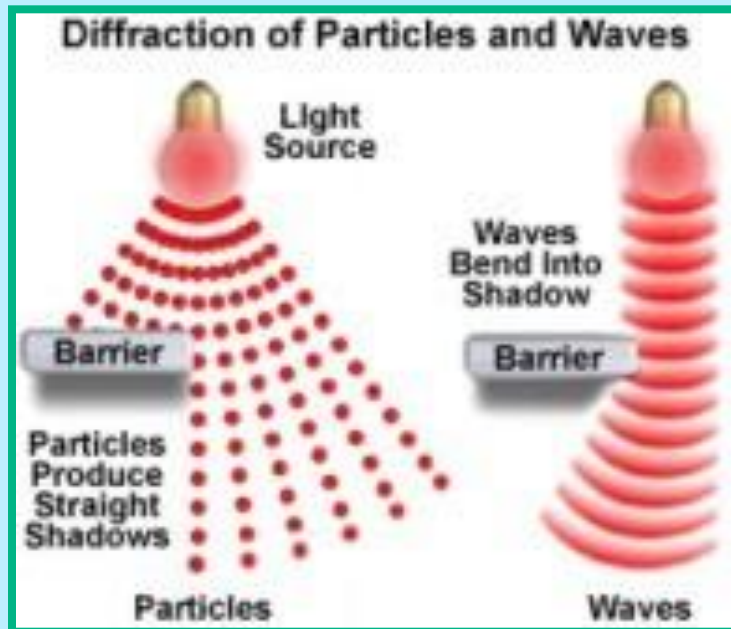
Na vzniku obrazu
se podílí lom a chod paprsku
(viz geometrická optika)

Na kvalitu obrazu má vliv
ohyb a interference světla
(elektromagnetické vlnění)



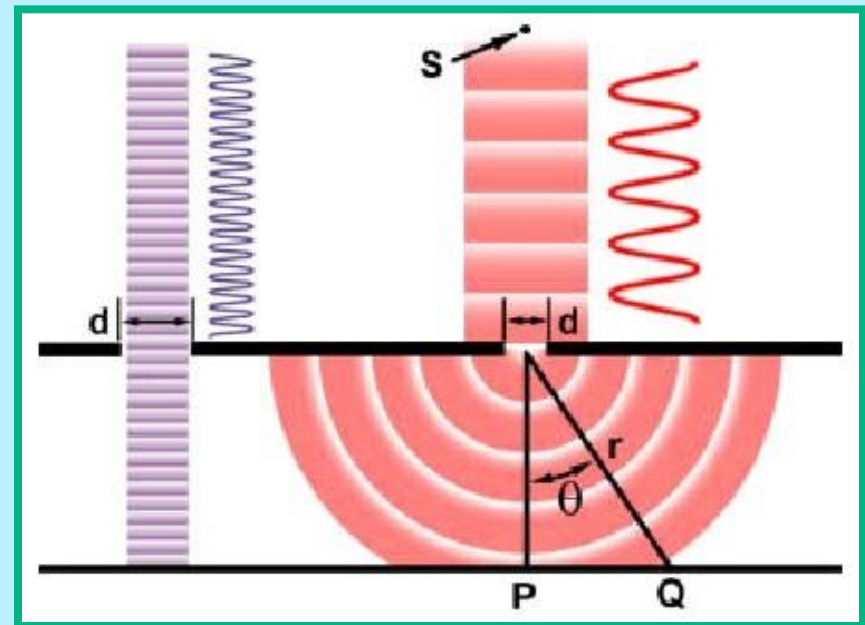
Foto Pavla Válová

Zobrazení detailů v mikroskopu - ohyb (difrakce)

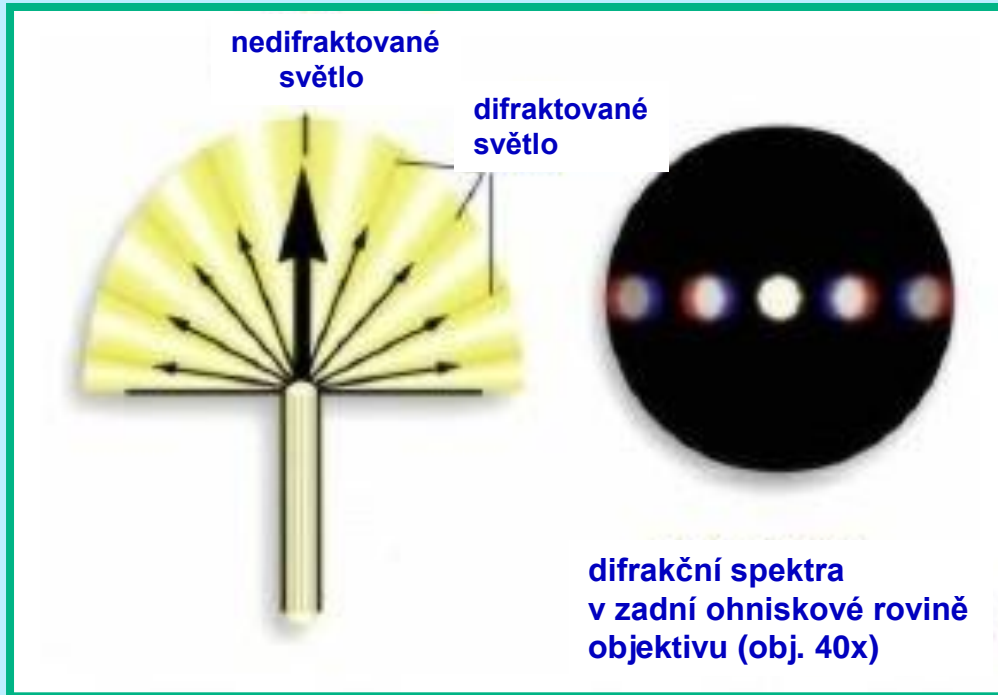


částice

vlny



Ohyb světla (difrakce)



Preparát: mřížka s širokými štěrbinami



- vznik difrakčních obrazců

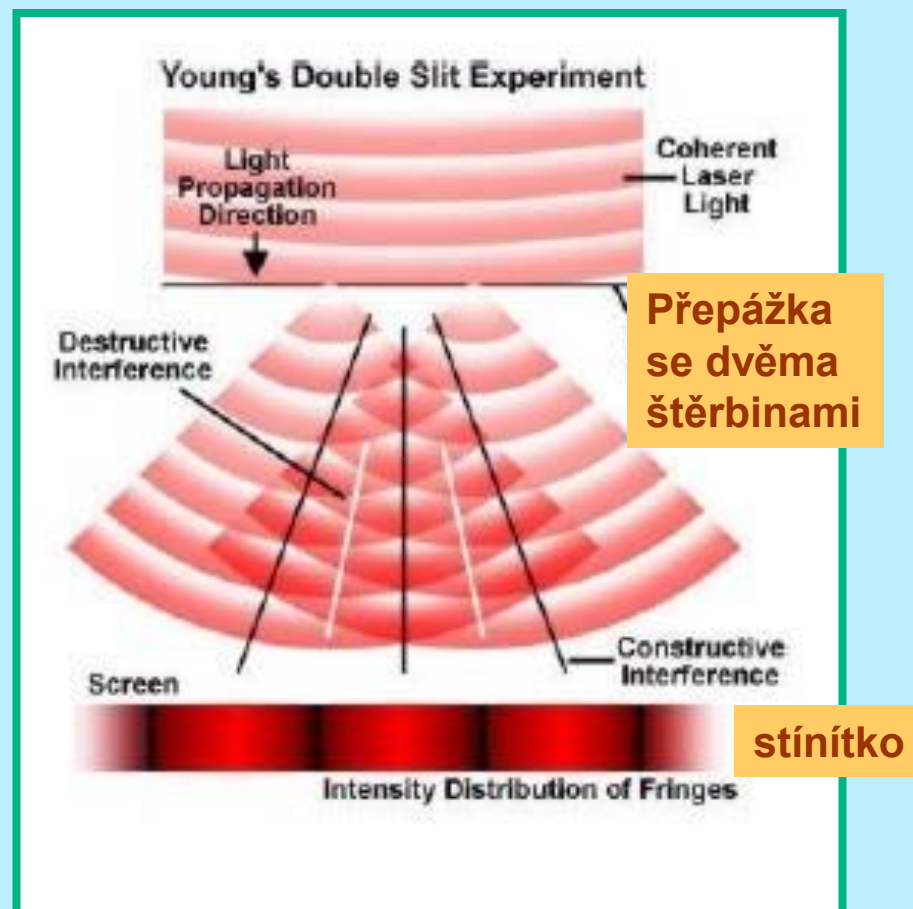


Preparát bez mřížky

- difrakční obrazce nevznikají

Zobrazení detailů v mikroskopu

- Preparát se skládá z množství detailů (bodů), které se liší svými optickými vlastnostmi od svého okolí
(možnost přirovnání k mřížce)
- Otvor v neprůhledné destičce je zdrojem nového světelného vlnění
- Skládání (interference) vln z více otvorů
→ vznik světlých a tmavých zón (maxim a minim)



Youngův* pokus s dvojitou štěrbinou

*Thomas Young (1773-1829) - [jang] – anglický lékař a fyzik

Potřeba maxim k tvorbě obrazu:

Nulté maximum (0)

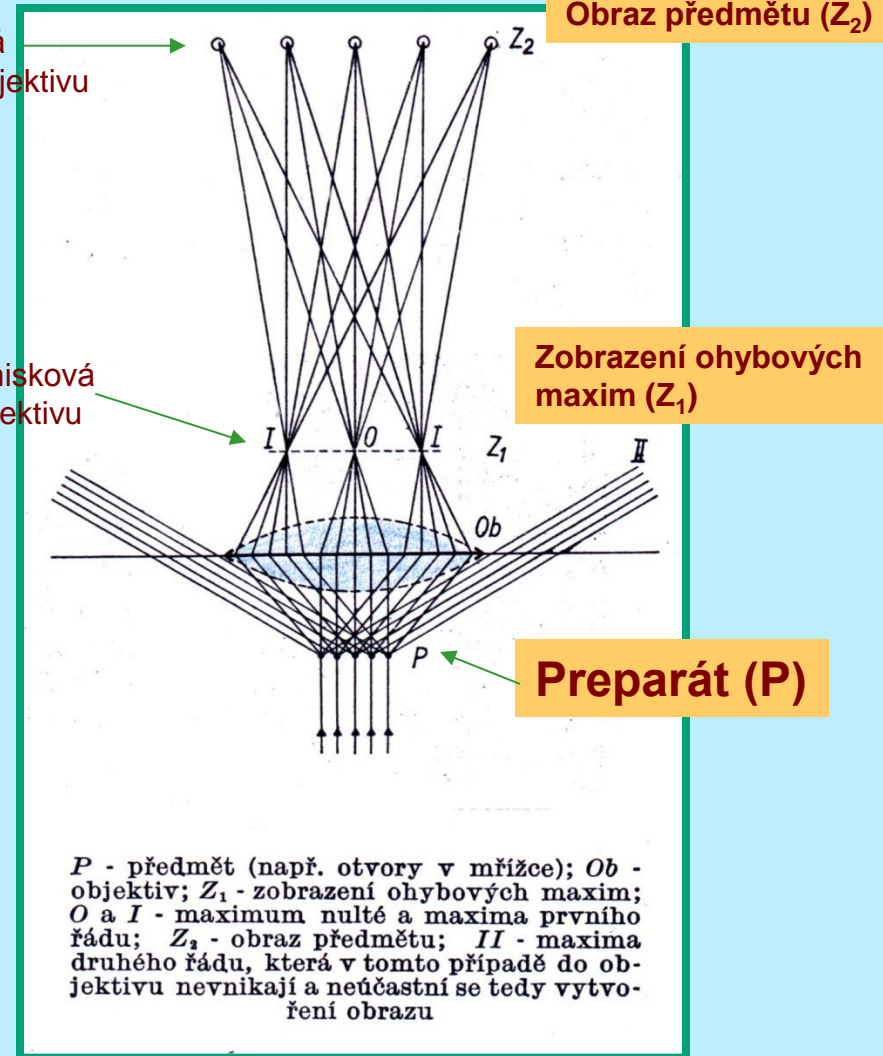
– prochází přímo, projde vždy, ale nepodílí se na vzniku obrazu

– na vzniku obrazu se podílí maxima I., II., III. ... řádu

- Čím více maxim projde do objektivu, tím kvalitnější obraz

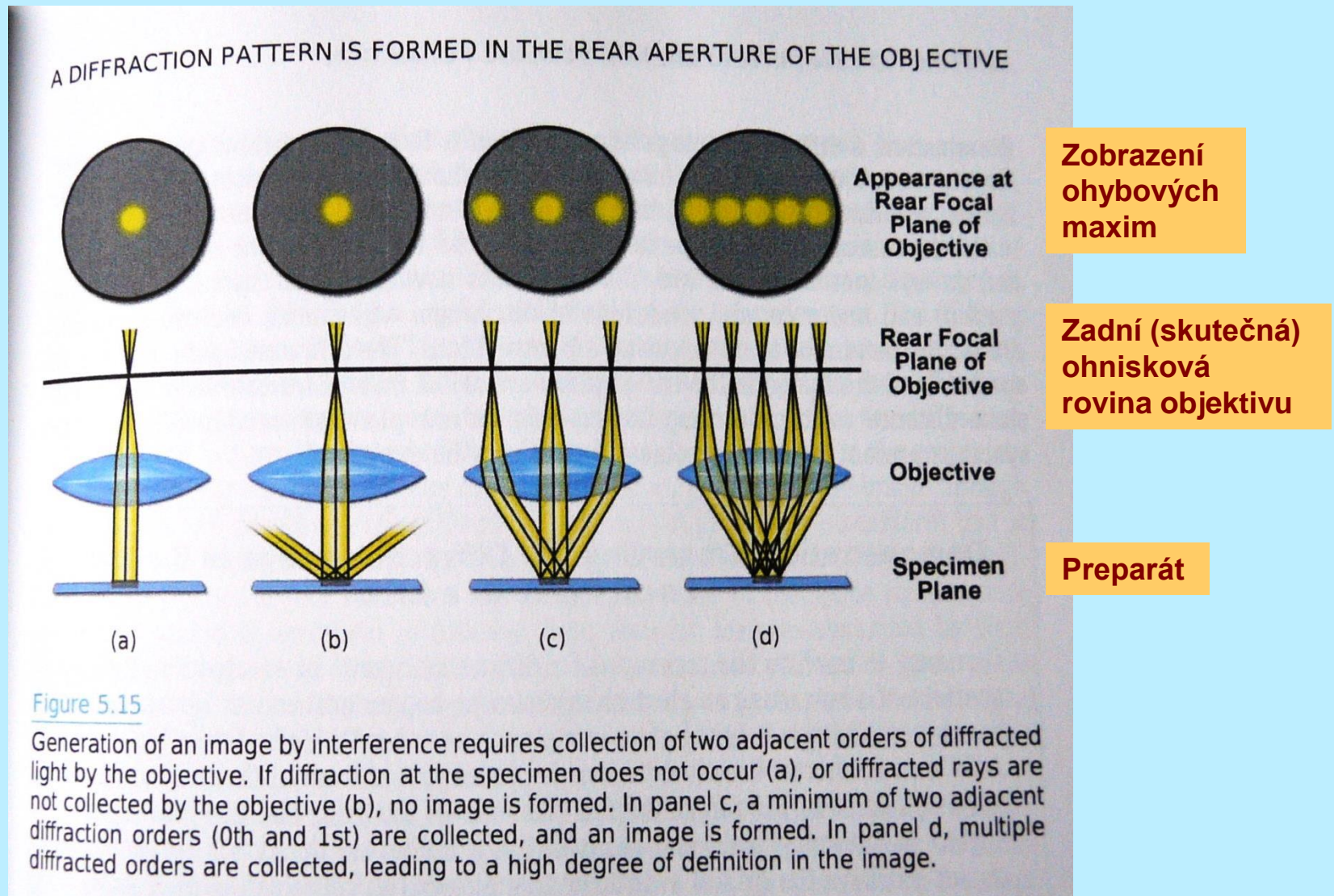
Obrazová rovina objektivu

Zadní ohnisková rovina objektivu

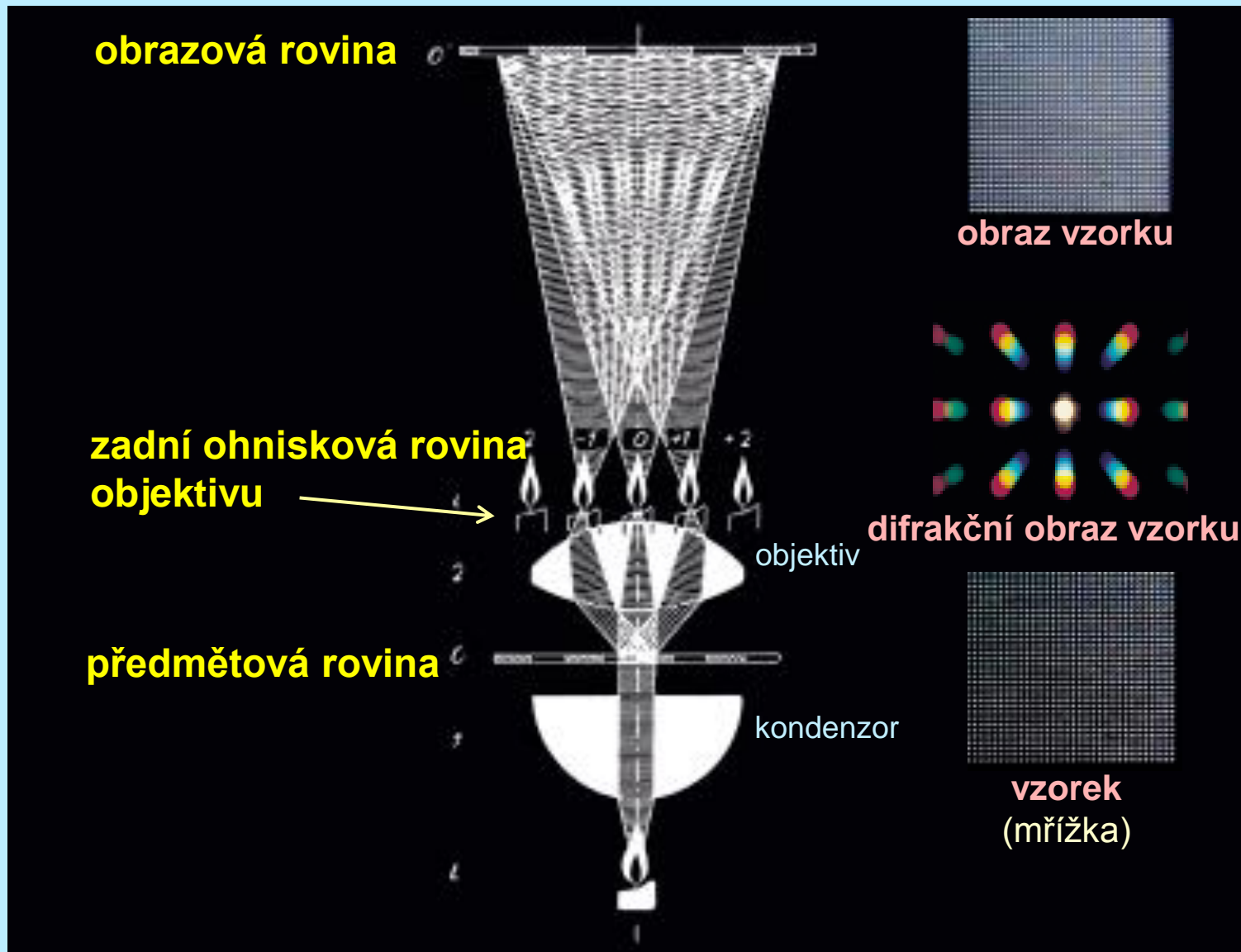


Pazourek, 1975.

Zobrazení ohybových maxim:



Difrakce – vznik difrakčních obrazů v mikroskopu



Obr.: upraveno podle Innovation 15, Carl Zeiss AG, 2005.
https://www.zeiss.de/content/dam/Corporate/pressandmedia/downloads/innovation_ger_15.pdf

Rozlišovací schopnost světelného mikroskopu

- je shodná s rozlišovací schopností objektivu
- je závislá na:
 - numerické apertuře (NA) objektivu a kondenzoru
 - na vlnové délce světla použitého k osvětlení
 - na kvalitě osvětlení preparátu
(optimální nastavení podle Köhlera)

Rozlišovací mez (d) - nejmenší vzdálenost 2 bodů, které lze mikroskopem rozlišit

- vztah odvozen na základě teorie německého fyzika Ernsta Abbeho

- **Numerická (číselná) apertura**

(*apertura* = lat., otvor)

- jedná se o bezrozměrné číslo, které je číselným měřítkem pro schopnost mikroskopické optiky zachycovat informace, obsažené v pozorovaném objektu



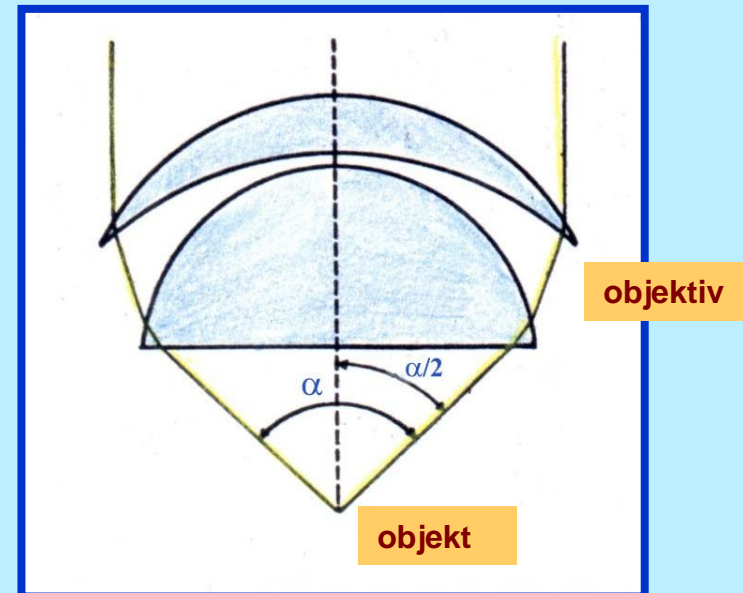
NA (N.A.) nebo také jen **A**

= vztah mezi otvorovým úhlem (α) a lomivostí prostředí (n)

$$NA = n \cdot \sin \alpha/2$$

α = vstupní úhel paprsků do objektivu

n = index lomu prostředí mezi objektivem a preparátem



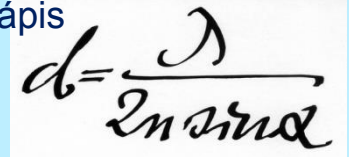
Obr. Pazourek, 1975

Nejmenší vzdálenost mezi dvěma body:

Podle Abbeho

$$d = \frac{\lambda}{2NA_{\text{obj}}}$$

Abbeho zápis


$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

Podle Rayleigha*

$$d = 0,61 \cdot \frac{\lambda}{NA_{\text{obj}}}$$

d	= vzdálenost mezi body
0,61	= konstanta (Rayleighovo kritérium)
λ	= vlnová délka použitého světla
NA_{obj}	= číselná apertura objektivu

Rozlišení tvaru:

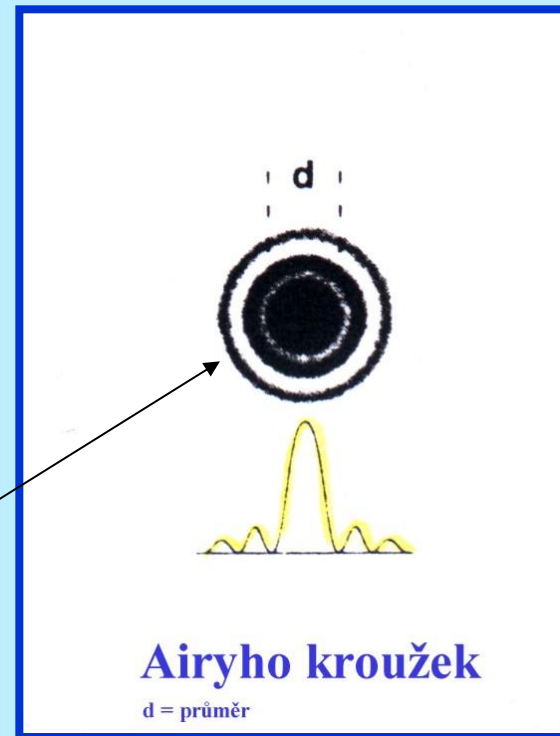
- vzdálenost mezi body musí být 5 d - 10 d

* **Lord Rayleigh** – John William Strutt (1842–1919), anglický fyzik, spoluobjevitel argonu, zabýval se i optickým a elektromagnetickým rozptylem světla.

Rayleighovo kritérium

Na vzniku obrazu v mikroskopu se podílejí:

- odraz a lom paprsku
 - **difrakční (ohybové) jevy**
- kvůli difrakčním jevům se ideální bod nezobrazí jako bod, ale jako poněkud rozmazaná malá ploška, tzv. **Airyho kroužek**



Rayleighovo kritérium:

- dva body jsou rozlišené,
pokud nulté maximum jednoho
kroužku právě splývá s prvním
minimem druhého kroužku (A)



nulté maximum

první minimum



A)

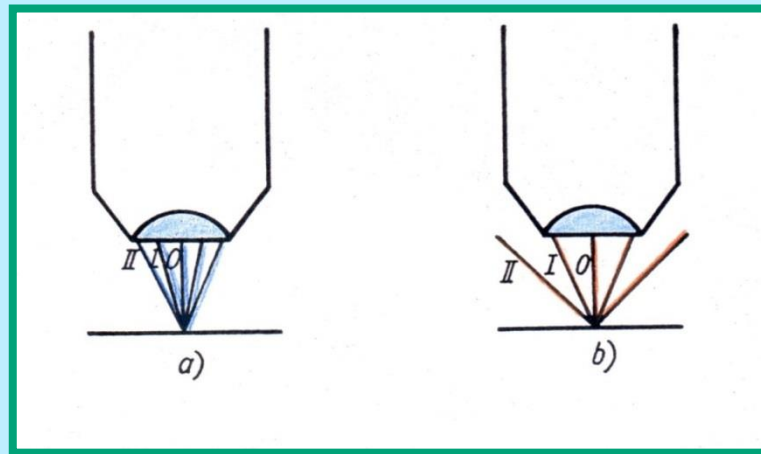
B)

A – rozlišené body

B – nerozlišené body

Vliv vlnové délky na rozlišení struktury

- při použití kratší vlnové délky bude teoretická rozlišovací schopnost mikroskopu lepší



0, I, II – maxima nultého, prvního a druhého řádu

Pazourek, 1975

Při $NA_{obj} = 1,4$ (s imerzí)

d pro modré světlo (380 nm) = 170 nm

d pro červené světlo (780 nm) = 340 nm

d pro běžně používané bílé světlo (cca 550 nm) = cca 240 nm

pro $NA_{obj} = 1,25$ (školní mikroskop) = cca 270 nm

d = vzdálenost mezi body

- **Mikroskopem pozorujeme obraz, který vytvořila určitá optická soustava a který je zpracován smyslovým receptorem a mozkiem ve vjem**



Informace o objektu

(druh a množství podrobností) **závisí na**

- **vlastnostech použité optické soustavy**
- **individuálních schopnostech pozorovatele**

Jan Evangelista Purkyně (1787-1869)

- klasik české biologie:

„Vždyť není jen oko, jež vidí – neboť je to spíše představivost a intelekt, jež to, co nyní vidíme, přiřazují k tomu, co jsme viděli předtím, a z tvarů dříve pozorovaných objasní neznámé a nejasné“.

Kapka jako čočka



Kapky jako lupa. Foto Pavla Válová, Křížov. 2015.

Více inspirace viz Prezentace



<http://www.authorstream.com/Presentation/annamariaianutol-1776226-gouttes-de-pluie1/>

<https://www.online.muni.cz/vite/3900-jak-funguje-zobrazovani-nejen-prirodnimi-cockami>