

Světelná mikroskopie

Historie světelné mikroskopie

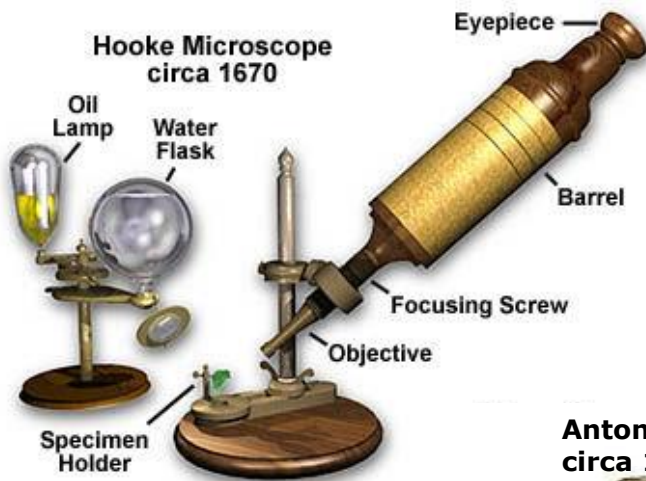
Robert Hook (1670) a Antonie van Leeuwenhoek (1670) – zakladatelé světelné mikroskopie



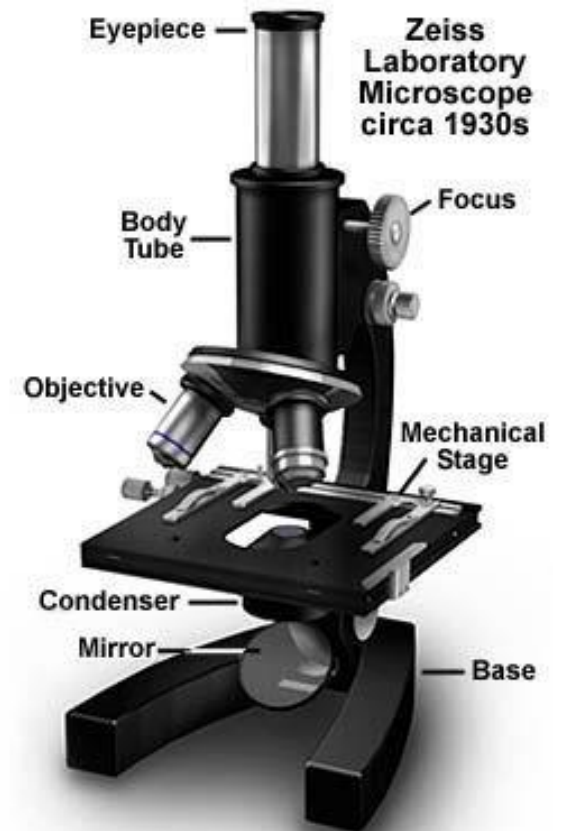
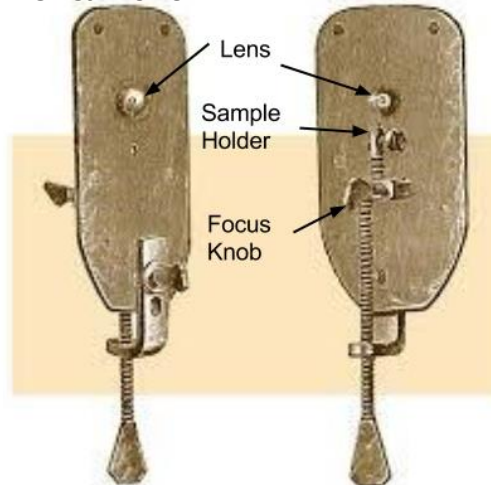
Světelná mikroskopie

Historie světelné mikroskopie

Robert Hook (1670) a Antonie van Leeuwenhoek (1670) – zakladatelé světelné mikroskopie

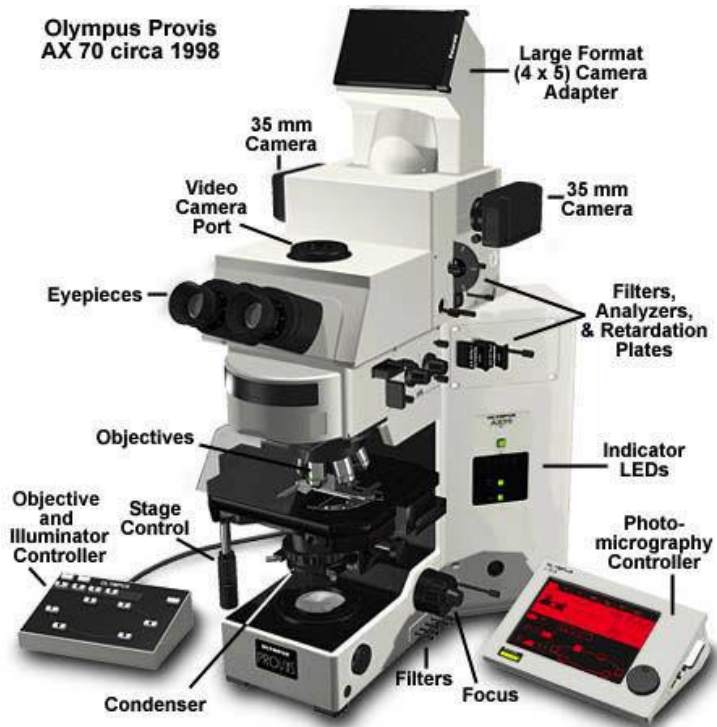


**Antonie van Leeuwenhoek
circa 1670**

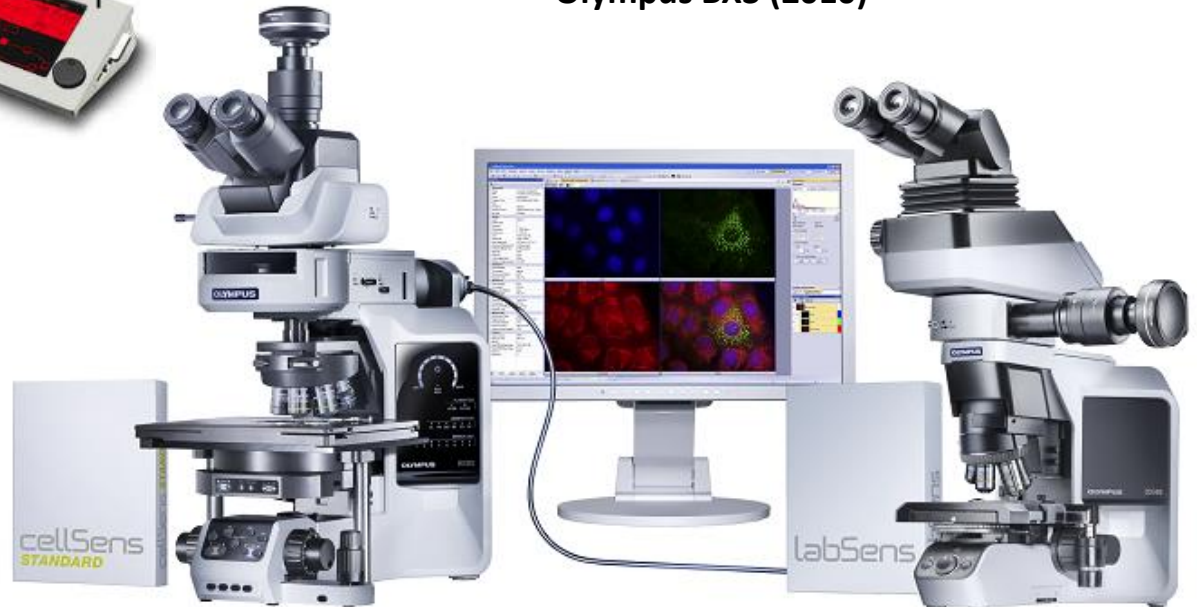


Světelný mikroskop

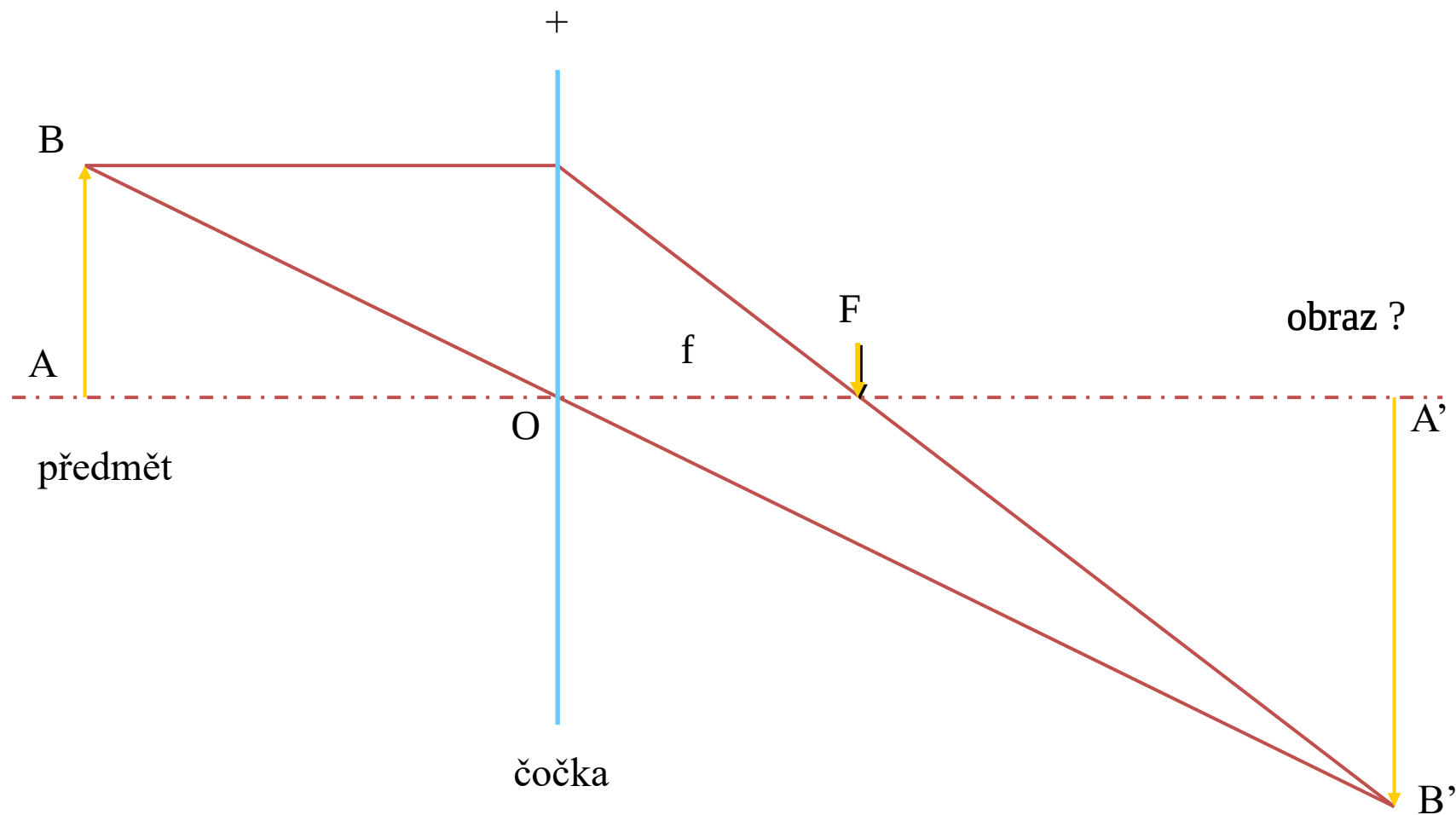
Olympus Provis
AX 70 circa 1998



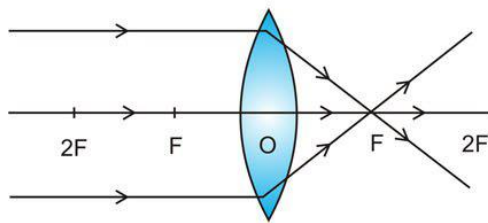
Olympus BX3 (2010)



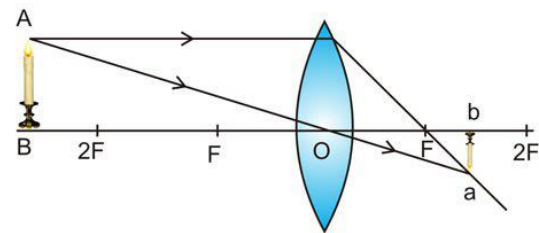
Teorie zobrazení světelného mikroskopu (SM)



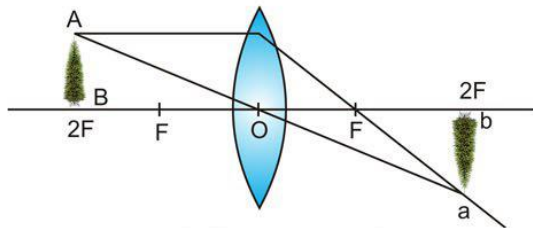
Teorie zobrazení světelného mikroskopu (SM)



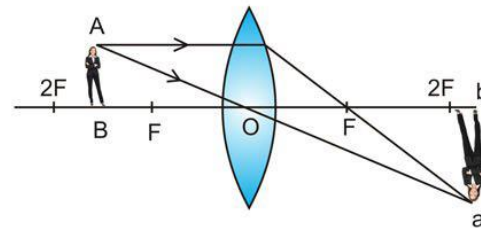
PŘEDMĚT V NEKONEČNU



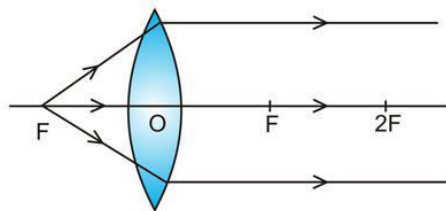
PŘEDMĚT PŘED 2F



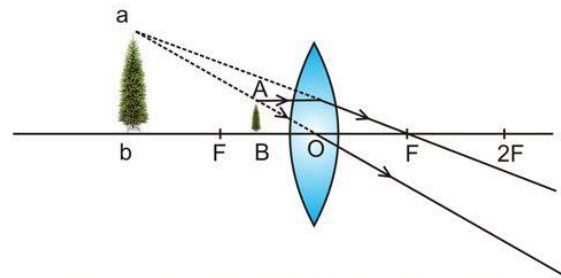
PŘEDMĚT V BODĚ 2F



PŘEDMĚT MEZI F A 2F

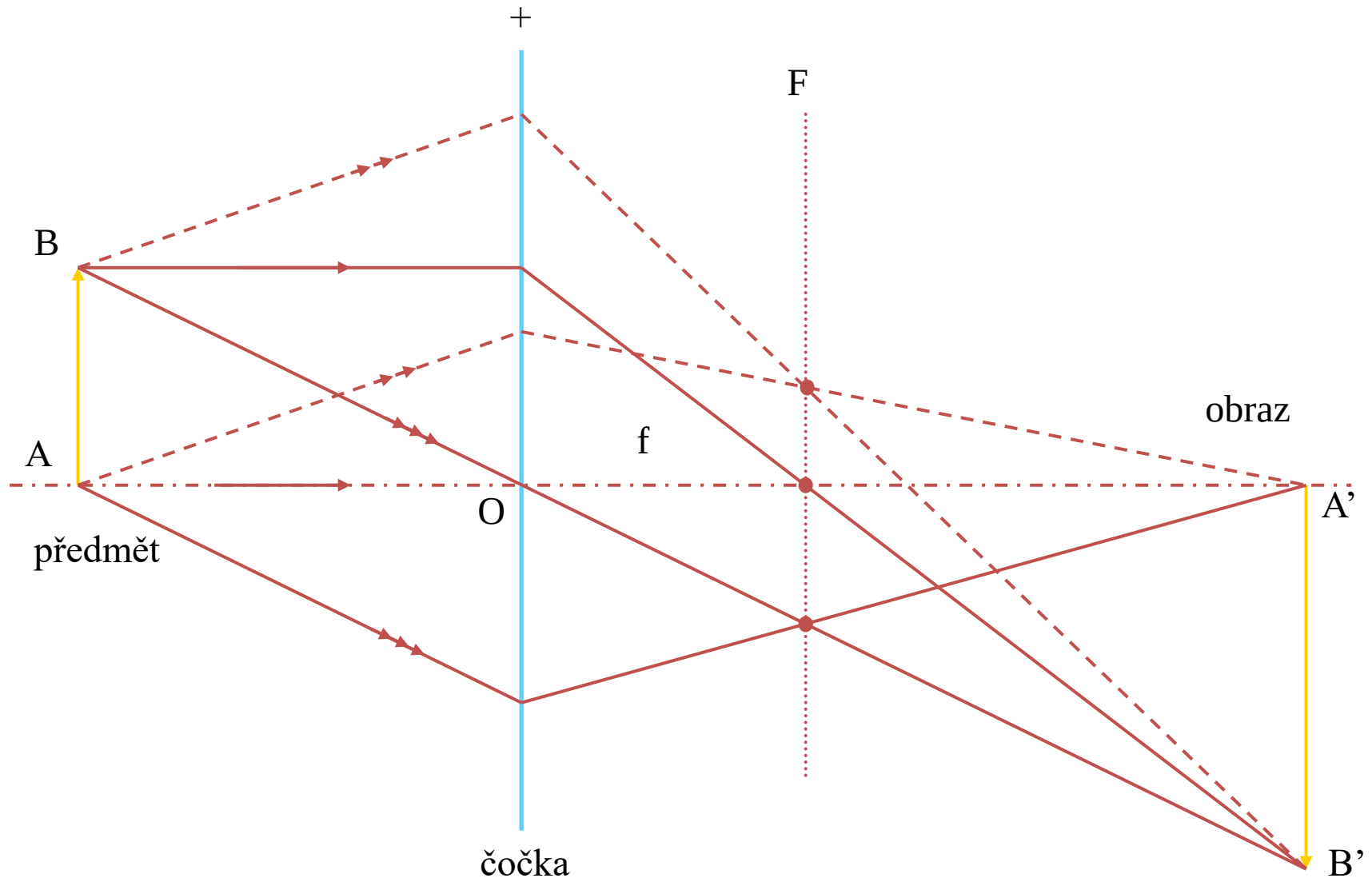


PŘEDMĚT V OHNISKU F



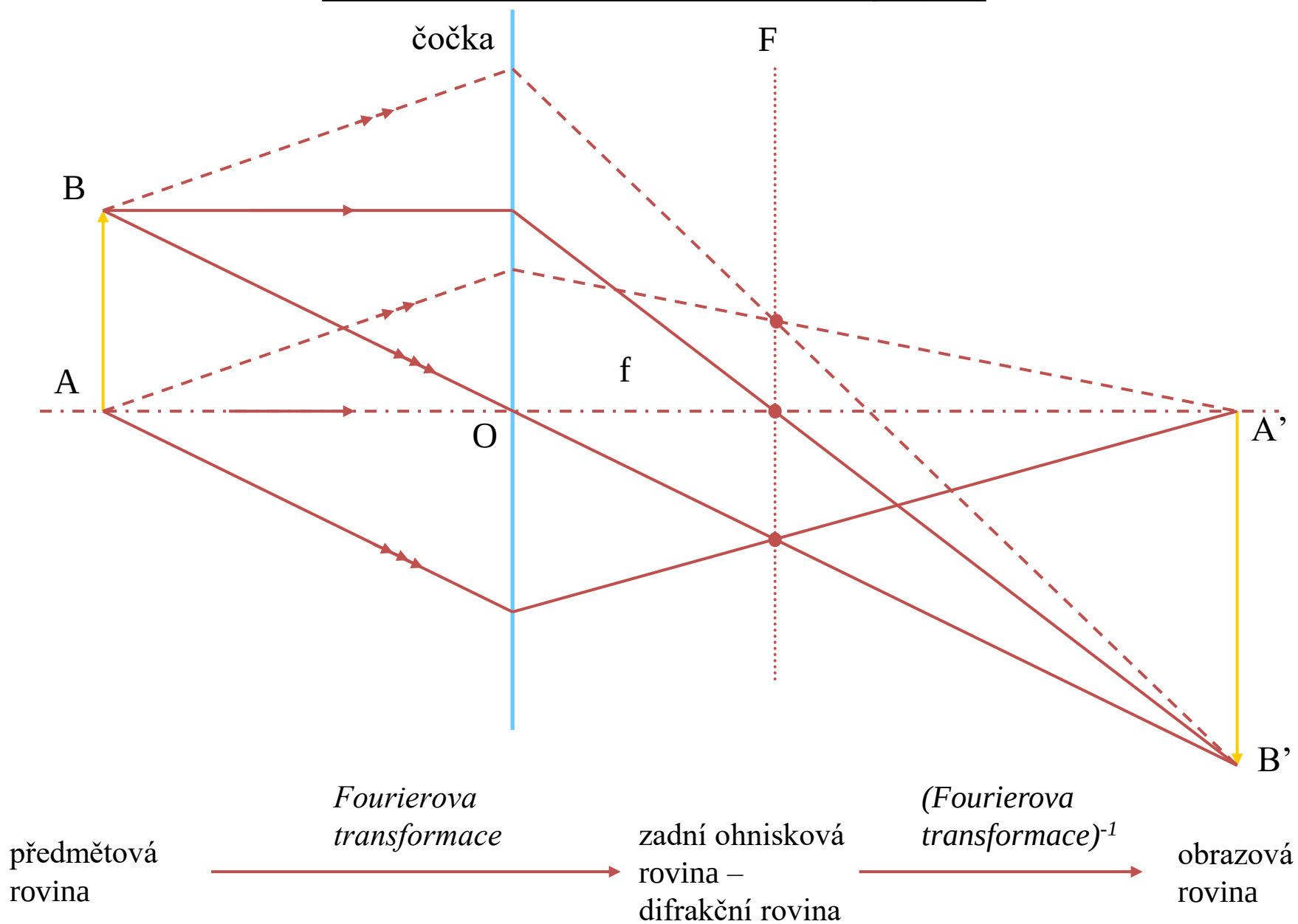
PŘEDMĚT MEZI F A STŘEDEM O

Teorie zobrazení světelného mikroskopu (SM)



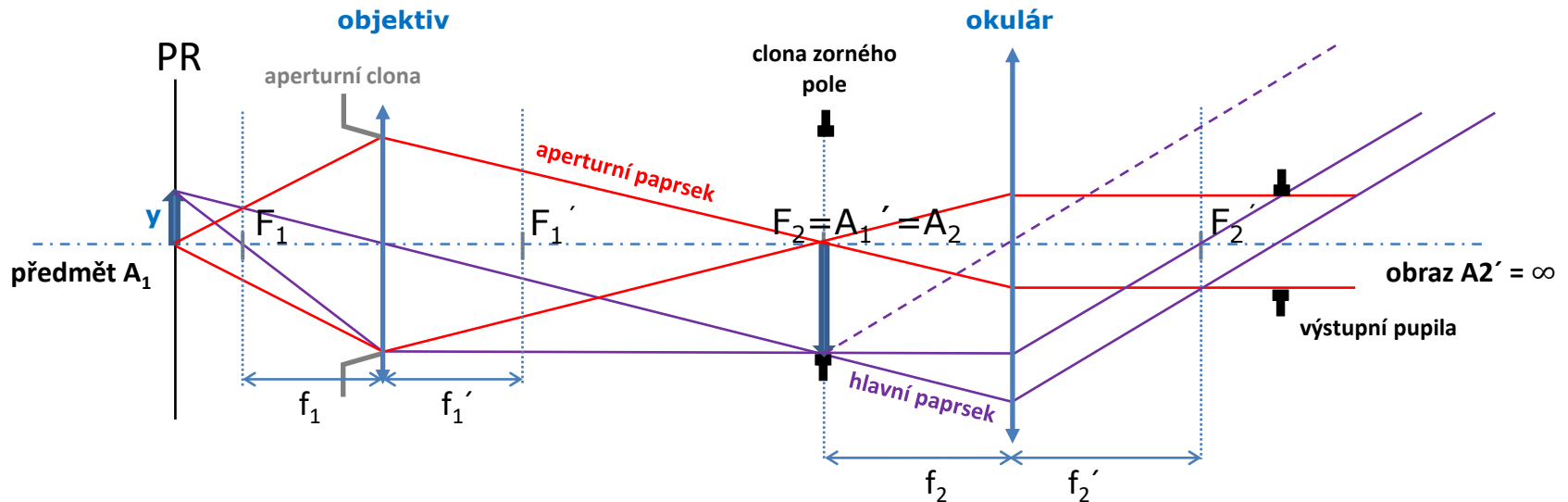
- v **zadní ohniskové rovině** se protínají paprsky difraktované vzorkem pod **stejným úhlem**
- v **obrazové rovině** se protínají paprsky difraktované **daným bodem** předmětu

Teorie zobrazení světelného mikroskopu (SM)



Teorie zobrazení a konstrukce světelného mikroskopu (SM)

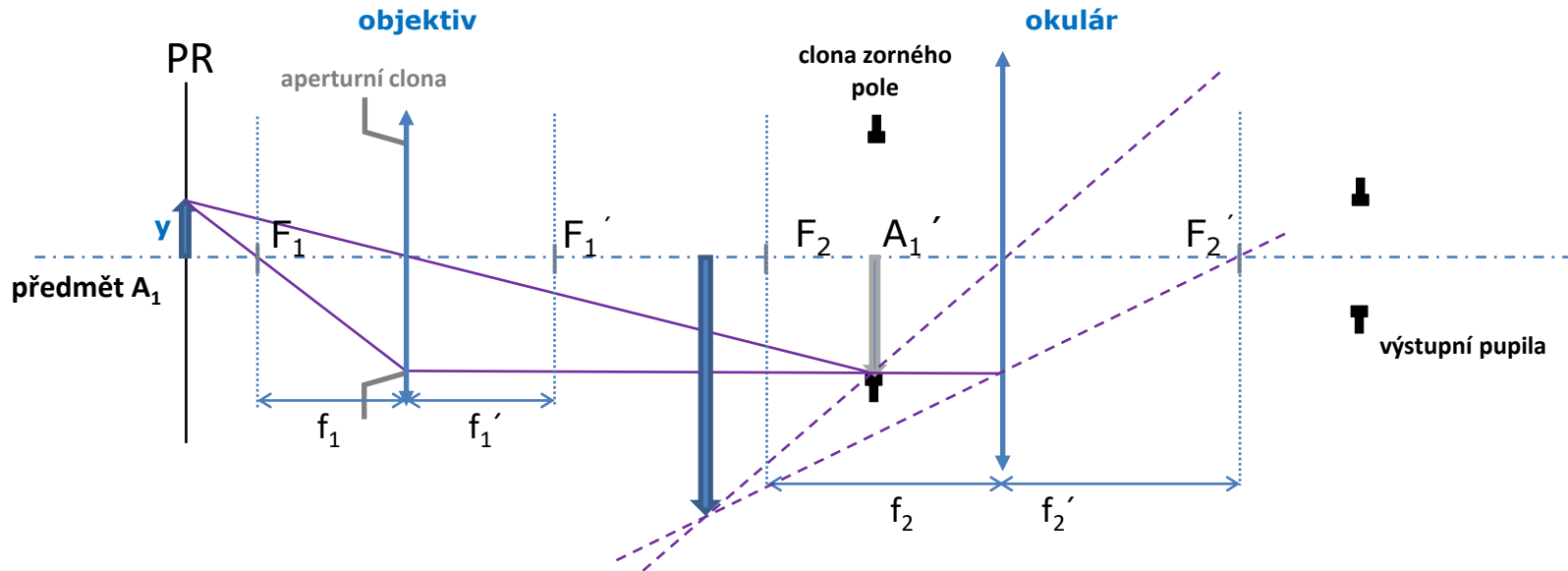
- SM představuje dvoustupňovou soustavu tvořenou *objektivem* a *okulárem* doplněnou *osvětlovací soustavou*
- průchod paprskových svazků SM (geometrická optika)



- **ohnisková rovina okuláru je v obrazové rovině objektivu**
- obraz pozorujeme uvolněným okem, obraz je neskutečný a převrácený
- *aperturní clona* – pro menší zvětšení objímka objektivu
pro větší zvětšení clona zorného pole
- *aperturní paprsek* – prochází okrajem aperturní clony (z osového bodu)
- *hlavní paprsek* – prochází středem aperturní clony (vstupní pupily) a středem výstupní pupily

Teorie zobrazení a konstrukce světelného mikroskopu (SM)

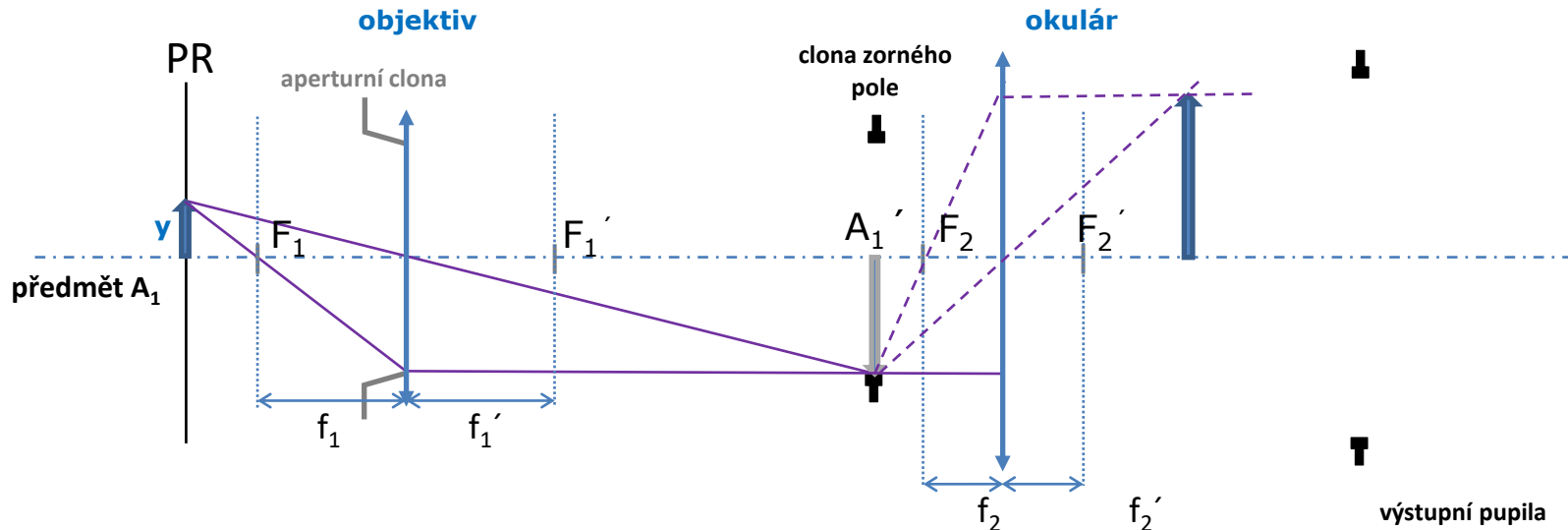
- reálná situace: okulár se skládá z více čoček
- **ohnisková rovina okuláru není v obrazové rovině objektivu**



- **virtuální obraz** pozorujeme v konečné vzdálenosti před okem (**pozice primárního obrazu A_1' je mezi okulárem a předním ohniskem okuláru F_2**)

Teorie zobrazení a konstrukce světelného mikroskopu (SM)

- reálná situace: okulár se skládá z více čoček
- **ohnisková rovina okuláru není v obrazové rovině objektivu**

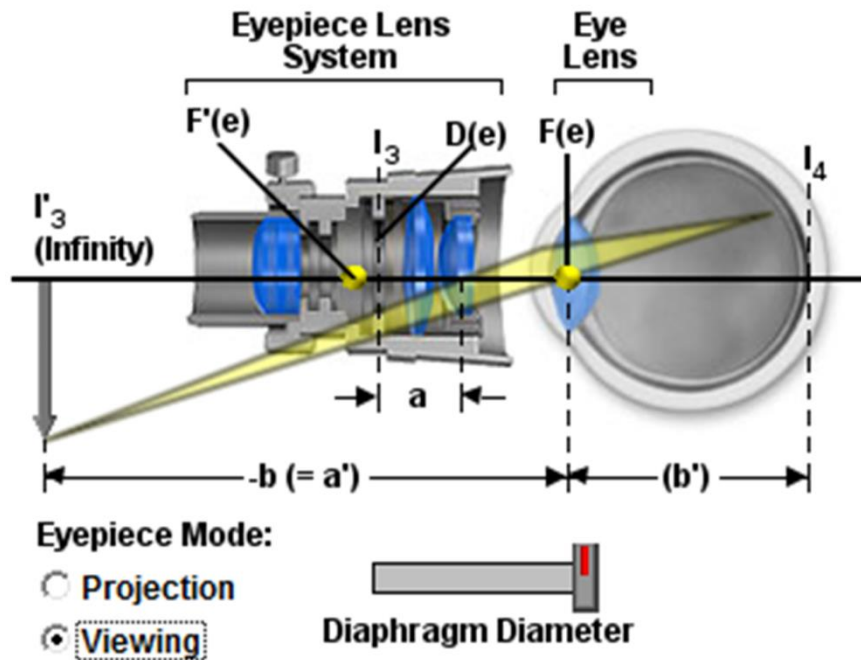


- když se **primární obraz A_1'** nachází **před předním ohniskem čočky okuláru F_2** , tak vzniká **reálný obraz**, který může být detekován pomocí externího zařízení (kamera, fotoaparát)

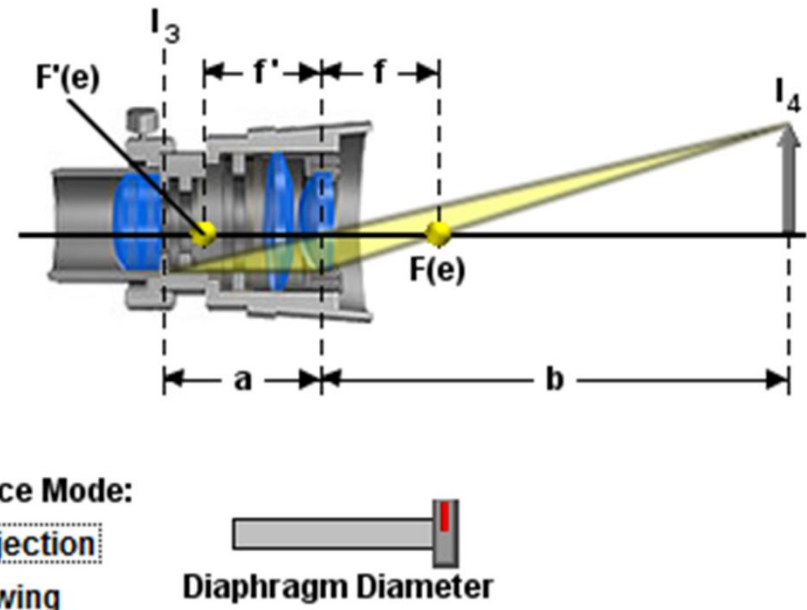
Teorie zobrazení a konstrukce světelného mikroskopu (SM)

- reálná situace: okulár se skládá z více čoček
- **ohnisková rovina okuláru není v obrazové rovině objektivu**

Virtuální obraz pozorovaný okem



Reálný obraz – detekce zobrazovací technikou



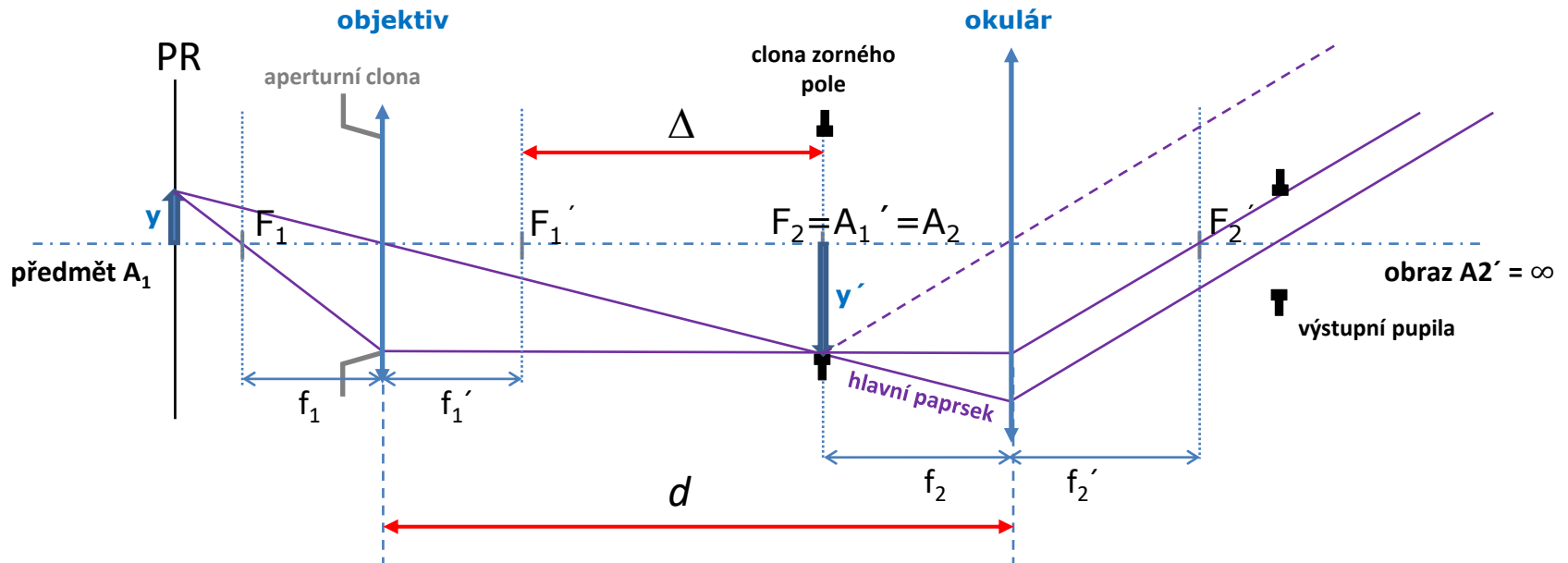
<http://www.olympusmicro.com/primer/java/components/eyepiece/index.html>

$F'(e)$, $F(e)$ – ohniska čočky okuláru

I_3 – pozice primárního obrazu předmětu

- vznik *virtuálního* nebo *reálného* obrazu závisí na pozici I_3 vzhledem k přednímu ohnisku čočky objektivu $F'(e)$

Výpočet zvětšení světelného mikroskopu



- Δ - optický interval mikroskopu
- SM považujeme za optickou soustavu o celkové ohniskové vzdálenosti f'

$$f' = \frac{f'_1 f'_2}{f'_1 + f'_2 - d} = -\frac{f'_1 f'_2}{\Delta}$$

SM jako lupa:

$$Z = \frac{\delta}{f'} = \frac{0.25}{f'} = -\frac{\Delta}{f'_1} \times \frac{0.25}{f'_2} = Z_{obj} \cdot Z_{ok}$$

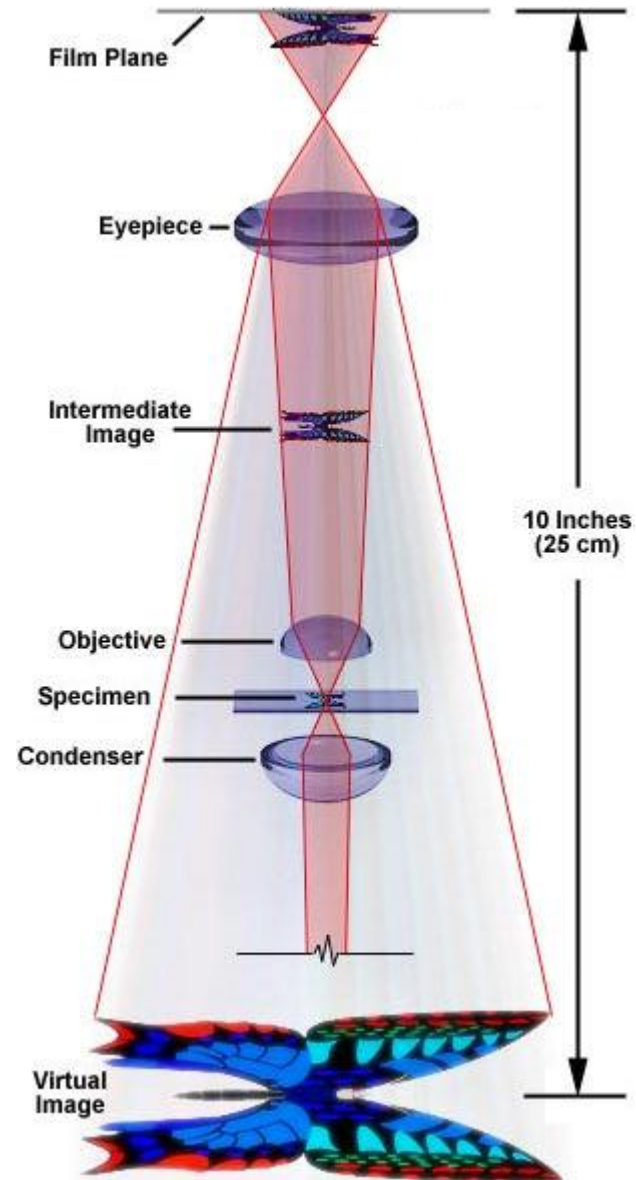
0.25 m – konvenční zraková vzdálenost; Z_{obj} – příčné zvětšení; Z_{ok} – úhlové zvětšení ¹²

Výpočet zvětšení světelného mikroskopu

$$Z = -\frac{\Delta}{f'_1} \times \frac{0.25}{f'_2} = Z_{obj} \cdot Z_{ok}$$

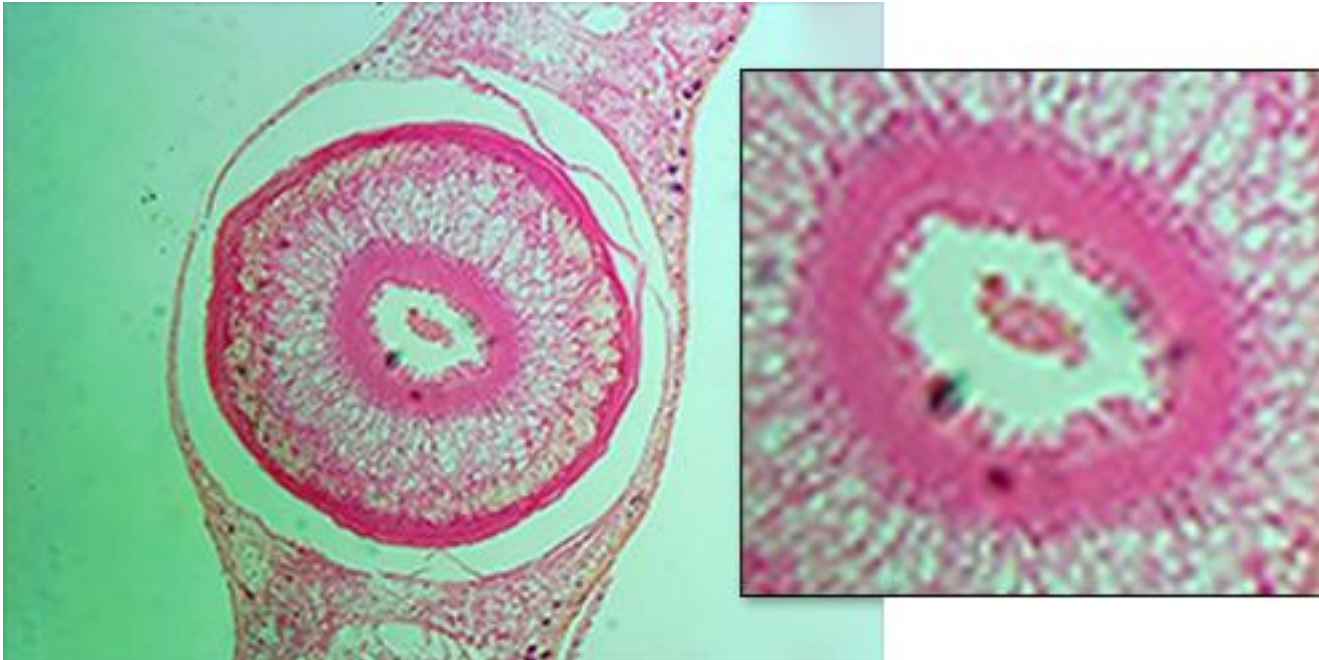
Změna zvětšení:

- výměna objektivů
- výměna okuláru
- změna optického intervalu Δ (moc se nepoužívá)
- obraz je vnímán okem jakoby by byl ve vzdálenosti 25 cm od zvětšeného objektu – virtuální obraz (zvětšený, nepřevrácený)
- virtuální obraz je vnímán okem
- reálný obraz detekován snímacím zařízením



Prázdné zvětšení světelného mikroskopu

- pro daný objektiv existuje horní hranice celkového zvětšení mikroskopu – tzv. užitečné zvětšení
- užitečné zvětšení – cca 500-1000 násobek numerické apertury (NA – důležitý parametr objektivu – ovlivňuje rozlišení)
- prázdné zvětšení – celkové zvětšení je větší než užitečné zvětšení – objektiv již nevydá více podrobností ve zvětšeném obraze



Rozlišovací mez a numerická apertura objektivové čočky SM

- **rozlišovací mez d_{min}** je minimální vzdálenost dvou bodů předmětu, které v obraze vytvořeným objektivem ještě rozlišíme (body jsou zobrazeny odděleně)
- **rozlišovací schopnost R** mikroskopu:
$$R = \frac{1}{d_{min}}$$

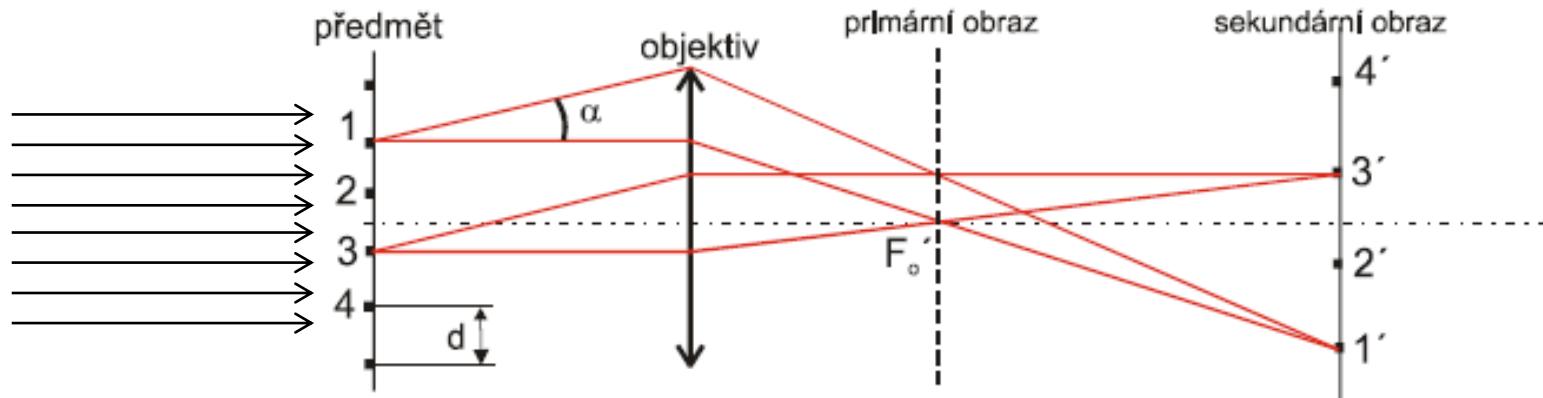
Určení rozlišovací meze

(1) Abbého teorie pro odvození rozlišovací meze

(2) Rayleighovo rozlišovací kritérium

- zohledňuje ohyb světla na kruhovém otvoru vstupní pupily (Fraunhoferův ohyb)
- ohyb světla způsobí, že bod se zobrazí jako ploška obklopená střídavě tmavými a světlými proužky

Abbého teorie odvození rozlišovací meze

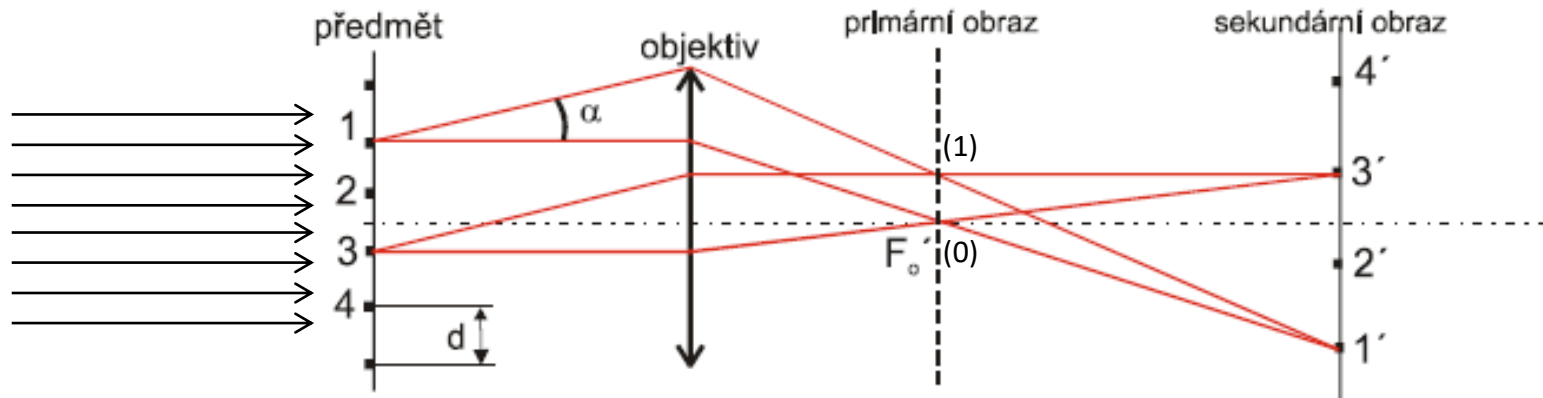


- předmět **optická mřížka** (d – vzdálenost vrypů) kolmá k optické ose mikroskopu je osvětlena rovnoběžným svazkem paprsků
- vznik **interferenčního obrazce** (primární obraz) v zadní ohniskové rovině objektivu
 - primární obraz - protínají se **paprsky** difraktované **z různých částí mřížky pod stejným úhlem**
- podmínka pro vznik interferenčního maxima
 - dráhový rozdíl paprsků ze sousedních štěrbin je roven celistvému násobku vlnové délky světla

$$n \cdot d \cdot \sin \alpha = k \cdot \lambda_0$$

$k \in \mathbb{Z}$, n – index lomu prostředí před objektivem
 α – úhel odklonu paprsků od optické osy
 λ_0 – vlnová délka světla ve vakuu

Abbého teorie odvození rozlišovací meze



- Abbého kritérium: pro rozlišení **dvou bodů v sekundárním obrazu** musí primární obraz obsahovat kromě **0-tého řádu ještě alespoň maximum 1. řádu**
 - interferenční maxima jsou od sebe vzdálena tím více, čím menší je perioda mřížky d

- Rozlišovací mez:

- pro α_0 = aperturní úhel, je nejmenší možná vzdálenost vrypů optické mřížky daná vztahem:

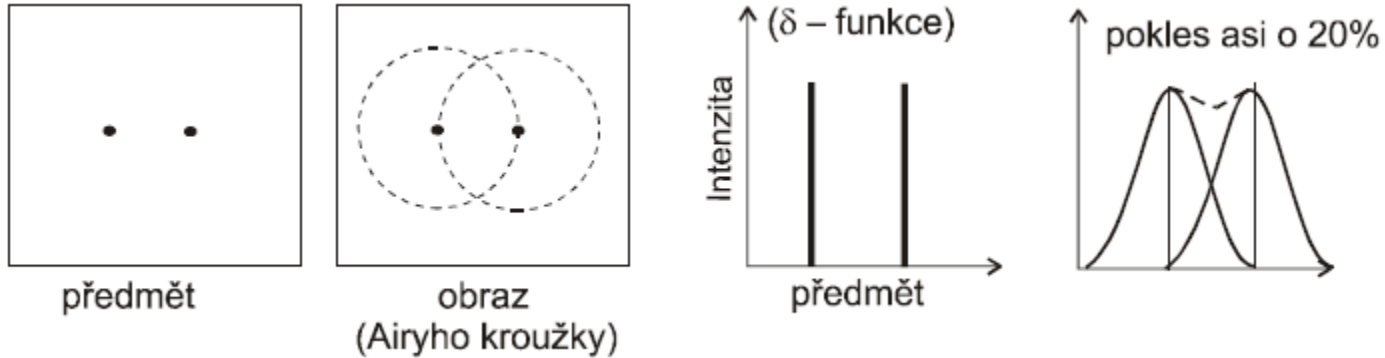
$$d_{min} = \frac{\lambda_0}{n \cdot \sin \alpha_0}$$

$NA = A_0 = n \cdot \sin \alpha_0$ – numerická apertura

- používají se objektivy s maximální hodnotou NA
 - ploskovypuklé čočky - maximální aperturní úhel
 - imersní metoda – zvýšení indexu lomu n (cedrový olej: $n = 1.52$)

Rayleighovo rozlišovací kritérium

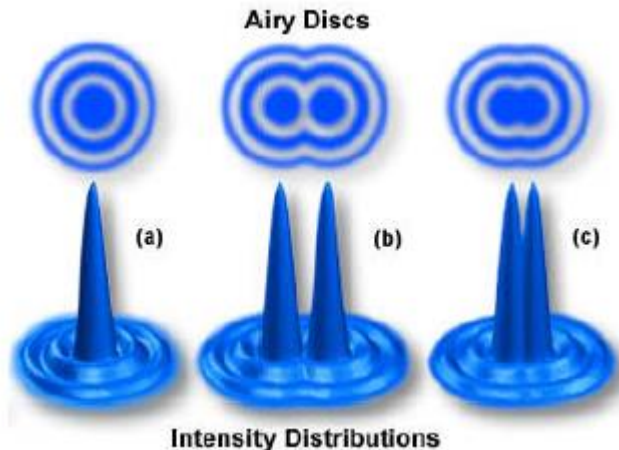
- zpřesněná teorie pro výpočet rozlišovací meze – uvažujeme ohyb světla na vstupní pupile



- bodů předmětu odpovídá ohybový obrazec - bod se zobrazí jako ploška obklopená střídavě tmavými (minimum) a světlými (maximum) proužky

Rayleighovo kritérium:

- dva body předmětu jsou v obrazu rozlišitelné, jestli centrální maximum jednoho kroužku splývá s prvním minimum druhého kroužku



- (a) nerozlišené body
- (b) rozlišené body
- (c) rozlišené - limit Rayleighova kritéria

Rayleighovo rozlišovací kritérium

- při Fraunhoferově ohybu na kruhovém otvoru je **průměr kroužku** promítnutý do roviny předmětu dán vztahem:

$$D = 1.22 \frac{\lambda_0}{A_0}$$

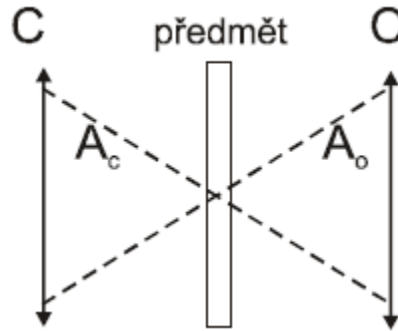
- dle Rayleighova kritéria, je minimální vzdálenost dvou bodů, které ještě rozlišíme, rovna **poloměru kroužku**

$$d_{min} = 0.61 \frac{\lambda_0}{A_0} = 0.61 \frac{\lambda_0}{n \sin \alpha_0}$$

- Pozn.: výraz pro odvození d_{min} není zcela správný, je nutné uvažovat Fresnelův ohyb (teoretické odvození rozlišovací meze příliš složité)

Abbého teorie odvození rozlišovací meze při zohlednění Fresnelova ohybu

- uvažujeme vliv kondenzoru – osvětlovací svazek není paralelní s optickou osou
- uvažujeme numerickou aperturu kondenzoru A_C



- při optimálním optickém přizpůsobení platí: $A_O = A_C$ (a pro $n_0 = n_C$)

$$d_{min} = \frac{\lambda_0}{A_0 + AC} = \frac{\lambda_0}{2n \cdot \sin \alpha_a}$$

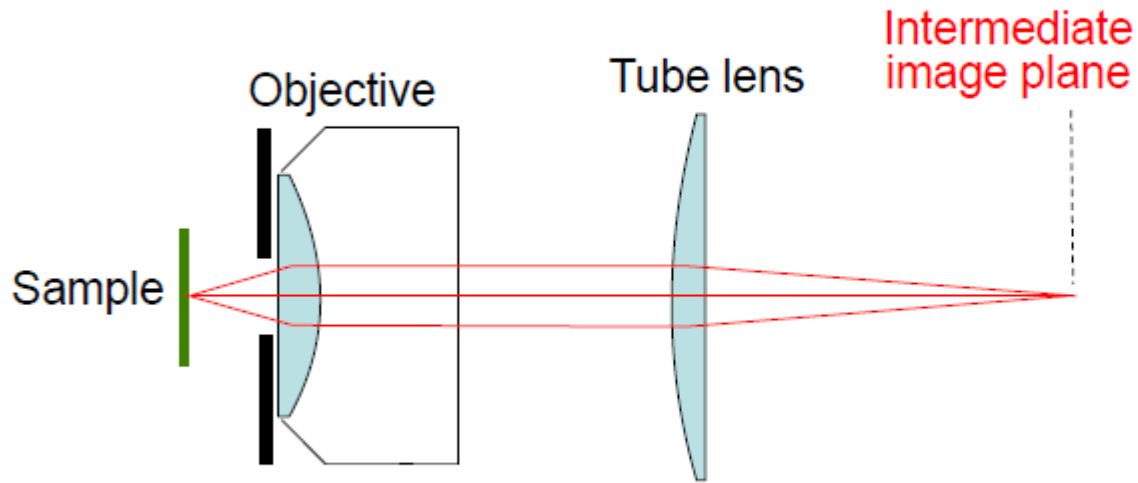
obecně

$$d_{min} = C \cdot \frac{\lambda_0}{A_0}$$

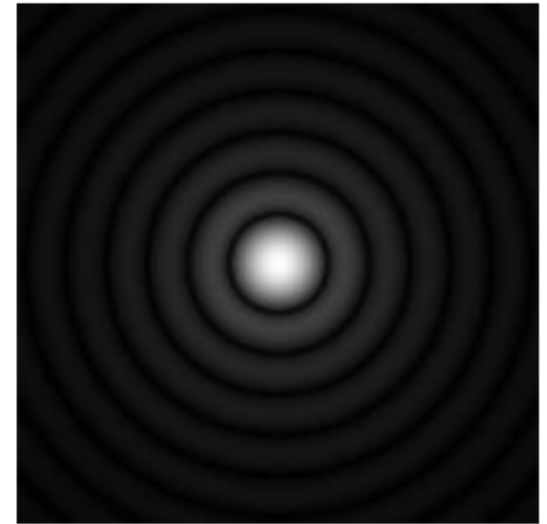
- kde C nabývá hodnot 0.5 – 1 (závisí na způsobu osvětlení, struktuře preparátu, atd.)
- pro $A_0 \sim 1$ a $\lambda_0 = 500 \text{ nm}$ je $d_{min} \sim 250 - 500 \text{ nm}$ (shodné s λ_0)

Shrnutí – numerická apertura objektivu a rozlišení

$$d_{min} = 0.61 \frac{\lambda_0}{A_o} = 0.61 \frac{\lambda_0}{n \sin \alpha_o}$$

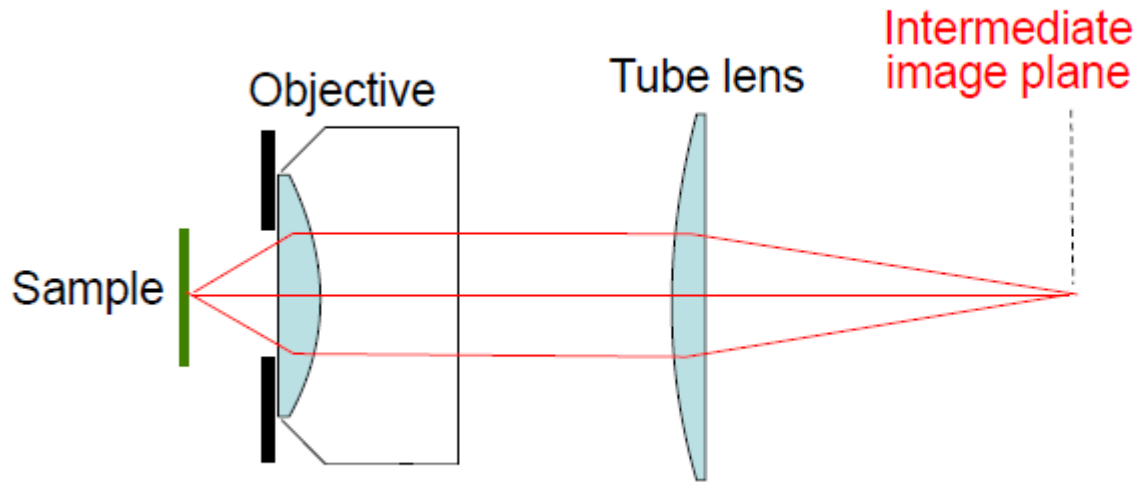


Diffraction spot
on image plane
= **Point Spread Function**

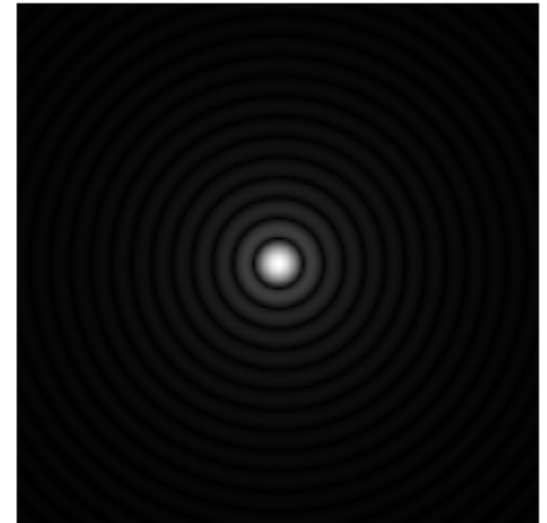


Shrnutí – numerická apertura objektivu a rozlišení

$$d_{min} = 0.61 \frac{\lambda_0}{A_o} = 0.61 \frac{\lambda_0}{n \sin \alpha_o}$$

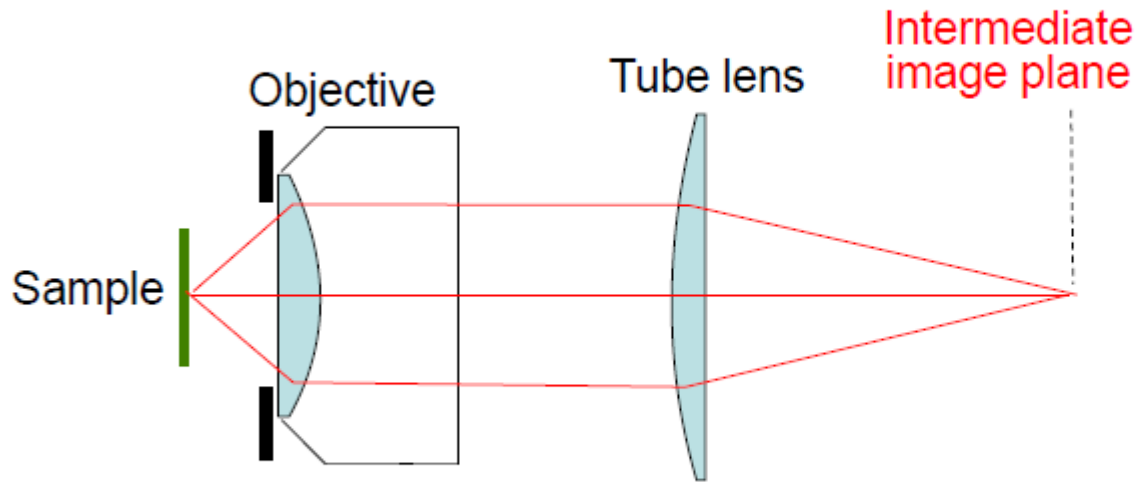


Diffraction spot
on image plane
= *Point Spread Function*

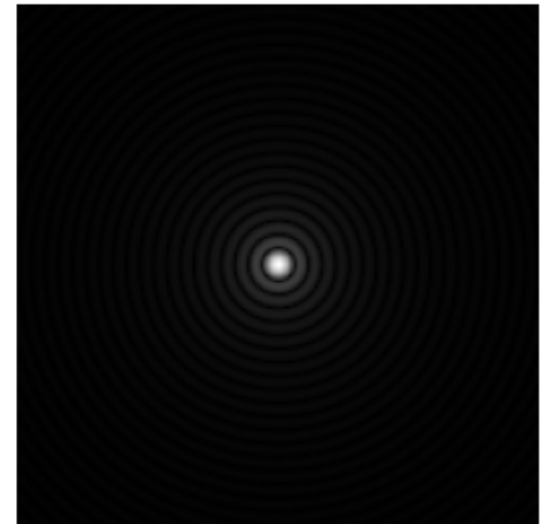


Shrnutí – numerická apertura objektivu a rozlišení

$$d_{min} = 0.61 \frac{\lambda_0}{A_o} = 0.61 \frac{\lambda_0}{n \sin \alpha_o}$$

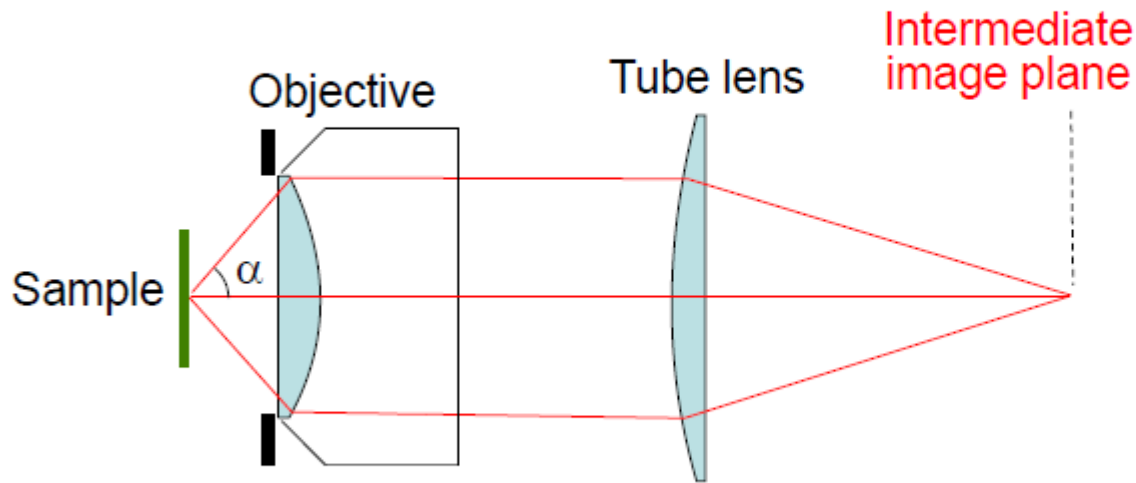


Diffraction spot
on image plane
= *Point Spread Function*

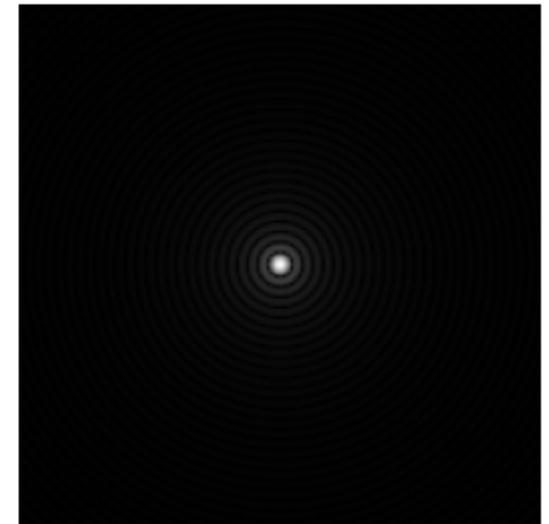


Shrnutí – numerická apertura objektivu a rozlišení

$$d_{min} = 0.61 \frac{\lambda_0}{A_o} = 0.61 \frac{\lambda_0}{n \sin \alpha_o}$$



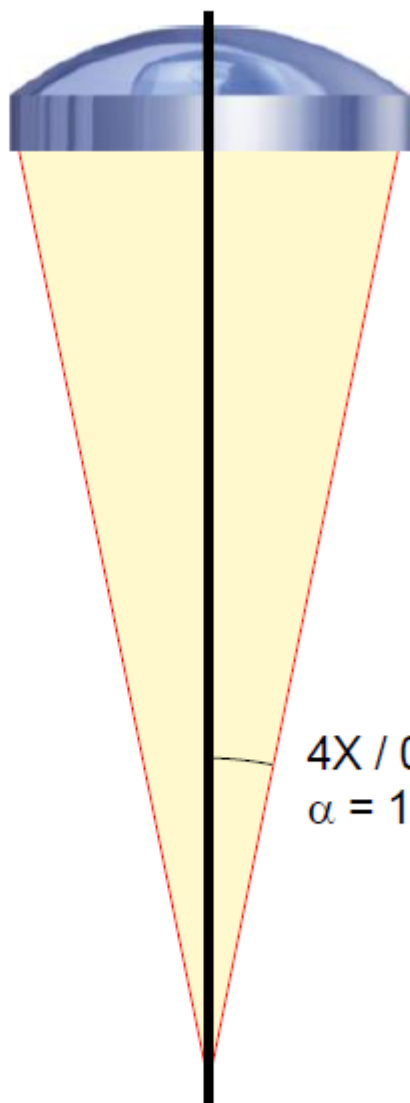
Diffraction spot
on image plane
(resolution)



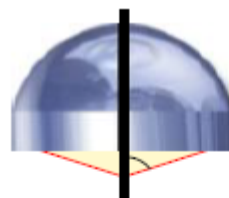
Rozlišovací mez je vyšší při větší **Numerické Apertuře** objektivu

$$NA = n \cdot \sin \alpha_o$$

Numerická apertura objektivu

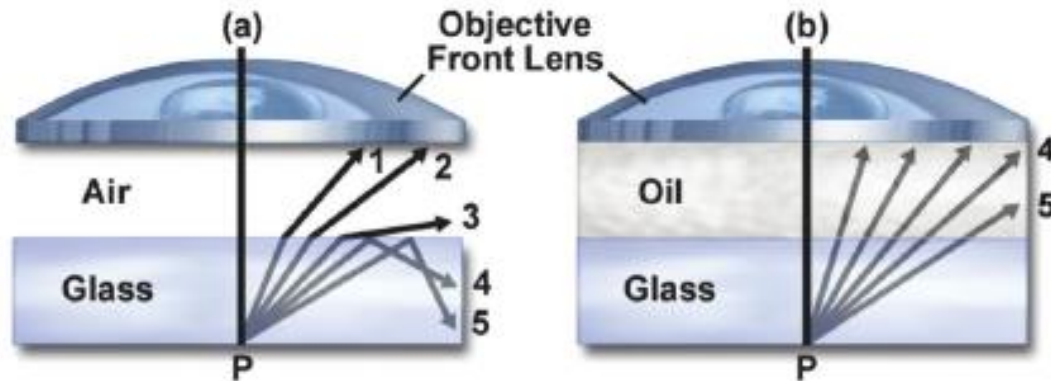


4X / 0.20 NA
 $\alpha = 11.5^\circ$



100X / 0.95 NA
 $\alpha = 71.8^\circ$

Imersní objektiv



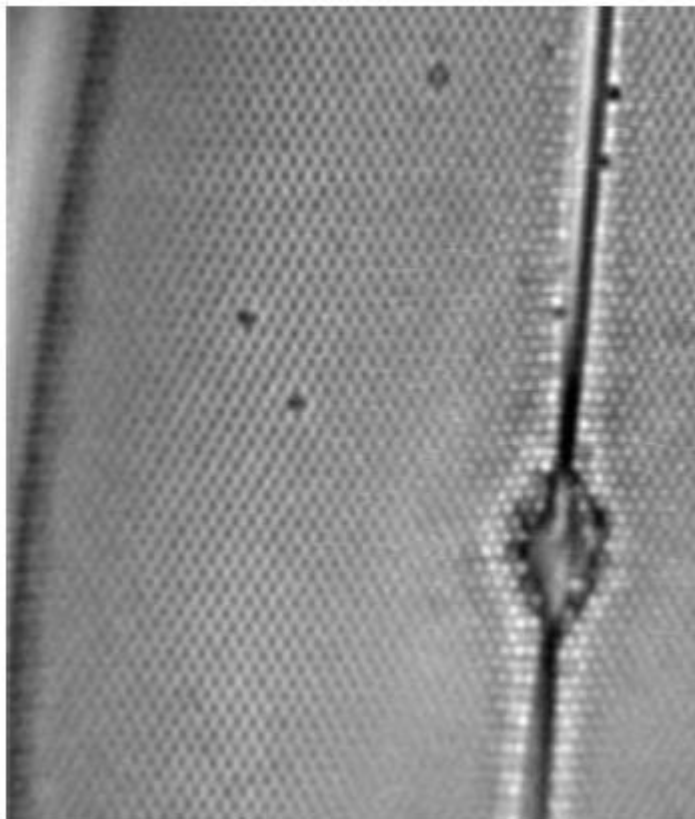
Rozhraní sklo – vzduch

- lom paprsků od kolmice dopadu
- paprsky nejsou zachyceny objektivem

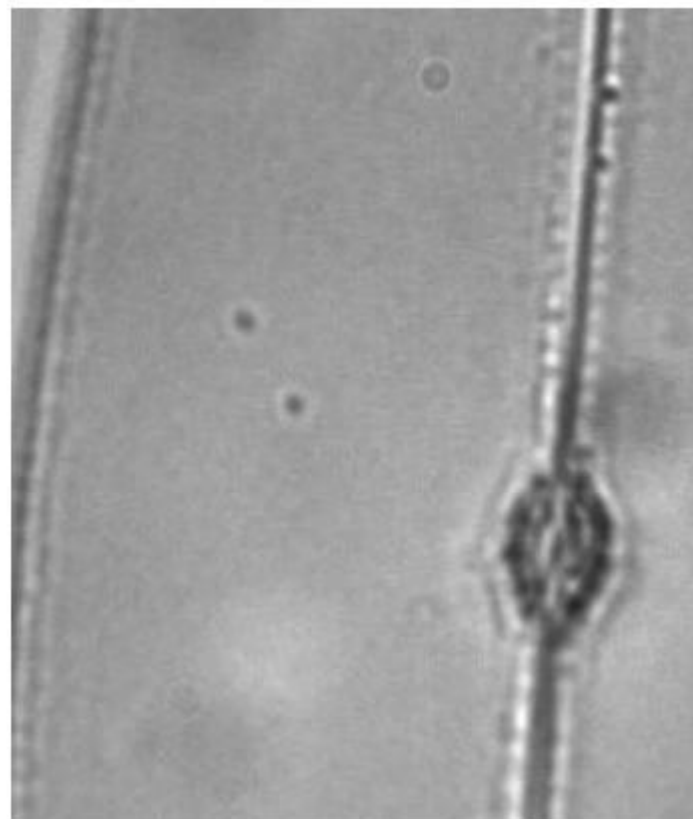
Rozhraní sklo – olej

- objektiv zachytí většinu difraktovaných paprsků – vyšší rozlišovací mez

Numerická apertura objektivu a rozlišení



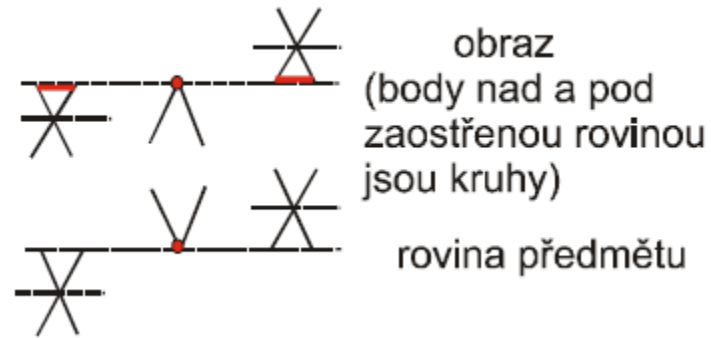
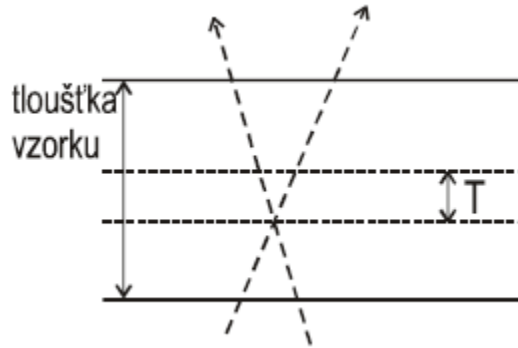
Objektiv s velkou NA



Objektiv s malou NA

Hloubka ostrosti

- tloušťka T vrstvy vzorku kolmé k optické ose, kterou vidíme v mikroskopu ostře



Tři zdroje hloubky ostrosti:

$$T = T_g + T_v + T_a$$

T_g ... geometrická hloubka ostrosti

T_v ... vlnová hloubka ostrosti

T_a ... akomodační hloubka ostrosti

Hloubka ostrosti

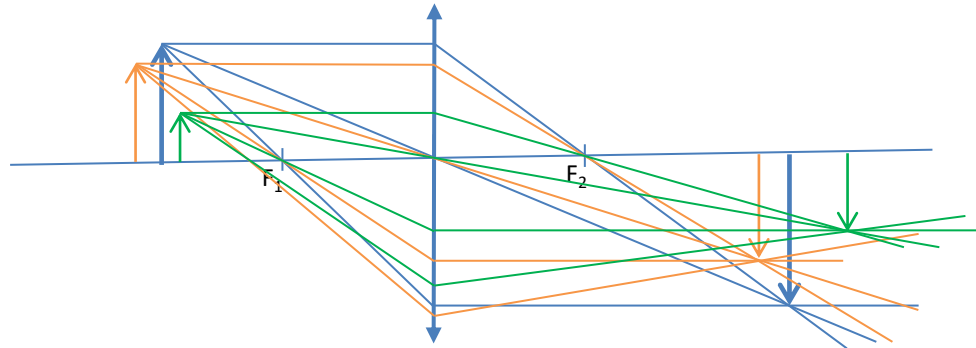
Tři zdroje hloubky ostrosti:

$$T = T_g + T_v + T_a$$

(1) Geometrická (T_g)

- body nad/pod rovinou předmětu se promítají v rovině obrazu jako kruhy
- pro ostře zobrazenou tloušťku vzorku platí, že úhlová velikost kruhů je menší než rozlišovací schopnost oka, tj. $2'$

$$T_g = \frac{1}{7} \frac{1}{A \cdot Z} [mm]$$



(2) Vlnová (T_v)

- díky ohybu světla je bod předmětu zobrazen v obrazovém prostoru jako třírozměrný útvar

$$T_v = \frac{n \cdot \lambda}{2A^2} [mm]$$

(3) Akomodační

- akomodační schopnost oka zvyšuje hloubku ostrosti

$$T_a = \frac{250}{Z^2} [mm]$$

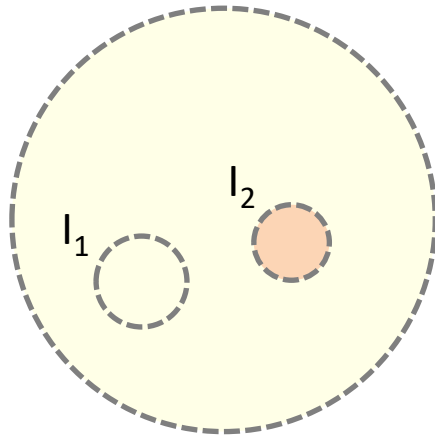
λ - vlnová délka, A – numerická apertura, Z – zvětšení mikroskopu, n – index lomu

Př.: $\lambda = 500 \text{ nm}$, $Z = 1000$, $A = 1$, $n = 1 \Rightarrow T = 643 \text{ nm}$

- T je úměrná rozlišovací mezi a klesá s rostoucí Z a A

Kontrast a zorné pole SM

- kontrast vystihuje zřetelnost obrazu díky rozdílu intenzit světla v různých bodech obrazu



I_1 – jas pozadí, I_2 – jas objektu

$$K = \frac{I_1 - I_2}{I_1 + I_2}$$

Možnosti:

1. $I_1 \gg I_2 \Rightarrow k \rightarrow +1$ (pozitivní kontrast)
2. $I_1 = I_2 \Rightarrow k = 0$ (bez kontrastu)
3. $I_1 \ll I_2 \Rightarrow k \rightarrow -1$ (negativní kontrast)

Z hlediska tvorby kontrastu objekty dělíme:

- amplitudové – mění se intenzita světla (různá absorpce, odraz, rozptyl světla)
- fázové – mění se pouze fáze procházejících světelných vln (různý index lomu)
 - metoda fázového kontrastu – změnu fáze převede na změnu amplitudy

Zorné pole

- oblast vzorku viděná v mikroskopu
- clona zorného pole v okuláru udává velikost zorného pole

Konstrukce SM – osvětlující soustava v procházejícím světle

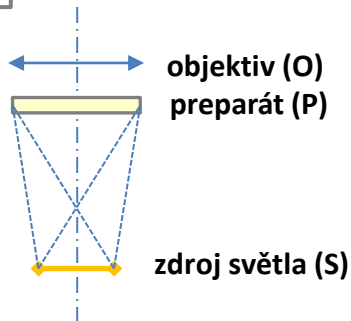
- osvětlení vzorku z opačné strany, než ze které je pozorován
- preparát musí být alespoň částečně průhledný



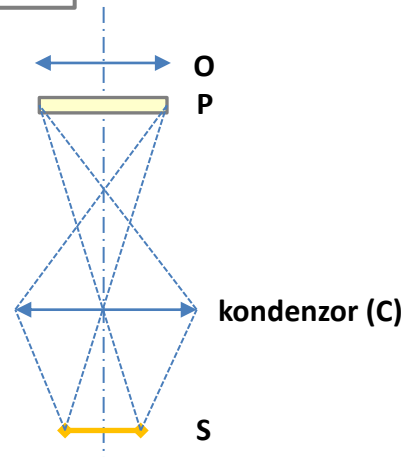
Typy osvětlujících soustav

- a) přímé osvětlení – nejjednodušší systém (pro malé zvětšení)
- b) kondenzor nebo duté zrcadlo – zdroj zobrazen kondenzorem na preparát
- nehomogenní osvětlení
- c) kondenzor + kolektor – **zdroj** zobrazen kolektorem do **přední ohniskové roviny** kondenzoru
- homogenní osvětlení preparátu
- d) Köhlerovo schéma (K + C + clonky)

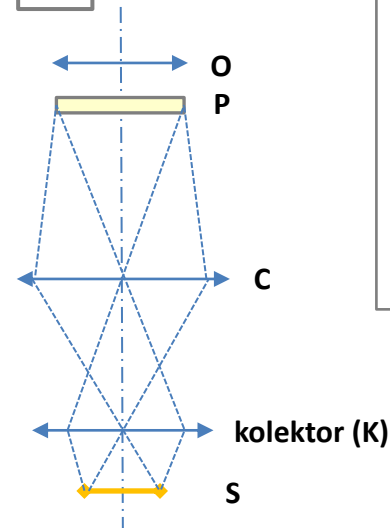
a)



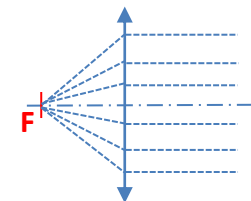
b)



c)



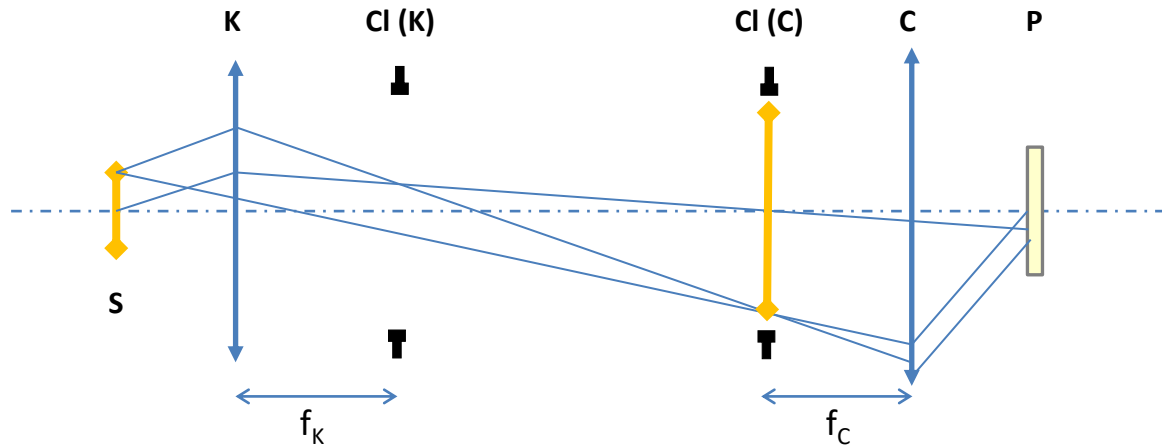
předmět v ohnisku – obraz v ∞



Konstrukce SM – osvětlující soustava v procházejícím světle

Köhlerovo schéma

- kombinace kolektoru (K), kondenzoru (C) a dvojice cloněk Cl(K) a Cl(C)



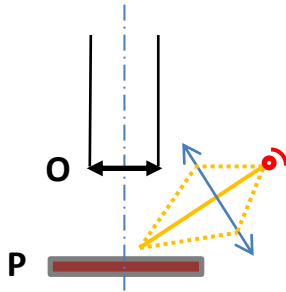
- $Cl(K)$ se nachází v zadní ohniskové rovině kolektoru
- $Cl(C)$ se nachází v přední ohniskové rovině kondenzoru
- zdroj S je kolektorem zobrazen do přední ohniskové roviny kondenzoru – na $Cl(C)$
 - homogenní osvětlení vzorku
 - změna velikosti $Cl(C)$ reguluje intenzitu osvětlení preparátu
 - menší $Cl(C)$ – lepší kontrast (nižší jas), ale horší rozlišení (menší aperturní úhel α) a naopak $\Rightarrow Cl(C)$ se nazývá *aperturní clonou*
- $Cl(K)$ je kondenzorem zobrazena na preparát
 - změna velikosti $Cl(K)$ reguluje velikost oblasti osvětlené části preparátu $\Rightarrow Cl(K)$ se nazývá *clona zorného pole*

Konstrukce SM – osvětlující soustava v dopadajícím světle

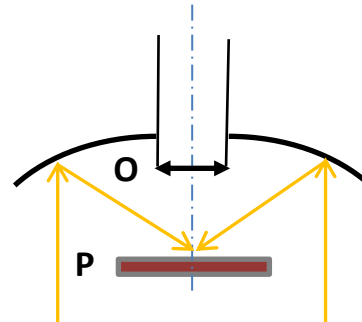
- osvětlení vzorku ze stejné strany, ze které je vzorek pozorován
- preparát je neprůhledný $\Rightarrow$ studium povrchů

Typy osvětlujících soustav

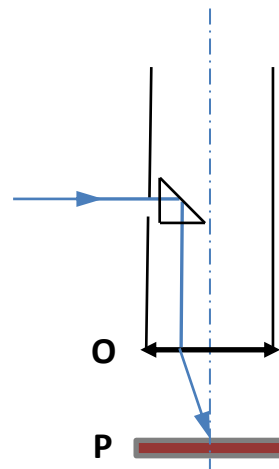
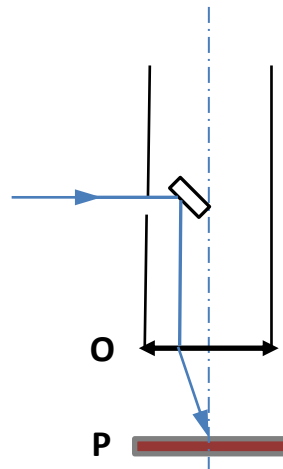
a) přímé nebo s kondenzorem



b) Lieberkühnovo zrcátko



- c) Iluminátory – osvětlení z tubusu přes objektiv (odraz na zrcátku nebo hranolu)
- Nejdokonalejší iluminátory sestaveny dle Köhlerova schématu



Zdroje světla SM

Žárovky

- nejčastěji *wolframové* nebo *halogenové* (např. wolfram s parami jodu)
- poskytují intenzivní osvětlení a vlákno napodobuje bodový zdroj (různé konstrukce)



Incandescent Light Sources



Žárovky o výkonu 100 W:

a) 12 V; b) 6 V; c, d) 6 – 30 V; e) současný standard SM
f) žárovka s odrazným zrcátkem

- teplota vlákna – okolo 2540 K
- barevná teplota – v rozmezí 2300 – 3400 K
- životnost – cca 1000 hod.

Zdroje světla SM

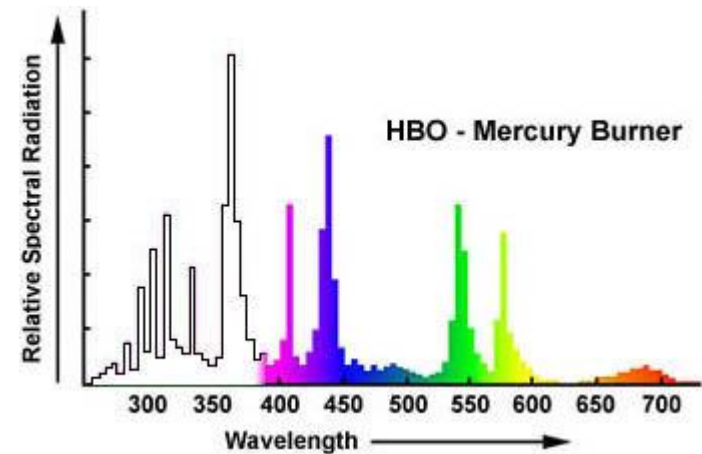
Vláknová optika

- přenos světla ze zdroje svazkem vláken
- flexibilní osvětlení, vysoká intenzita

Lasery - laserová konfokální mikroskopie

Výbojky

- rtuťové, xenonové výbojky
- pro luminiscenční mikroskopy
- UV oblast, ale i blízké IČ
- monochromatické světlo (s filtry)



LED zdroje

- LED kroužky na objektivy – poskytují pokrytí 360°
- bodový zdroj intenzivního světla
- regulace intenzity, vysoká životnost



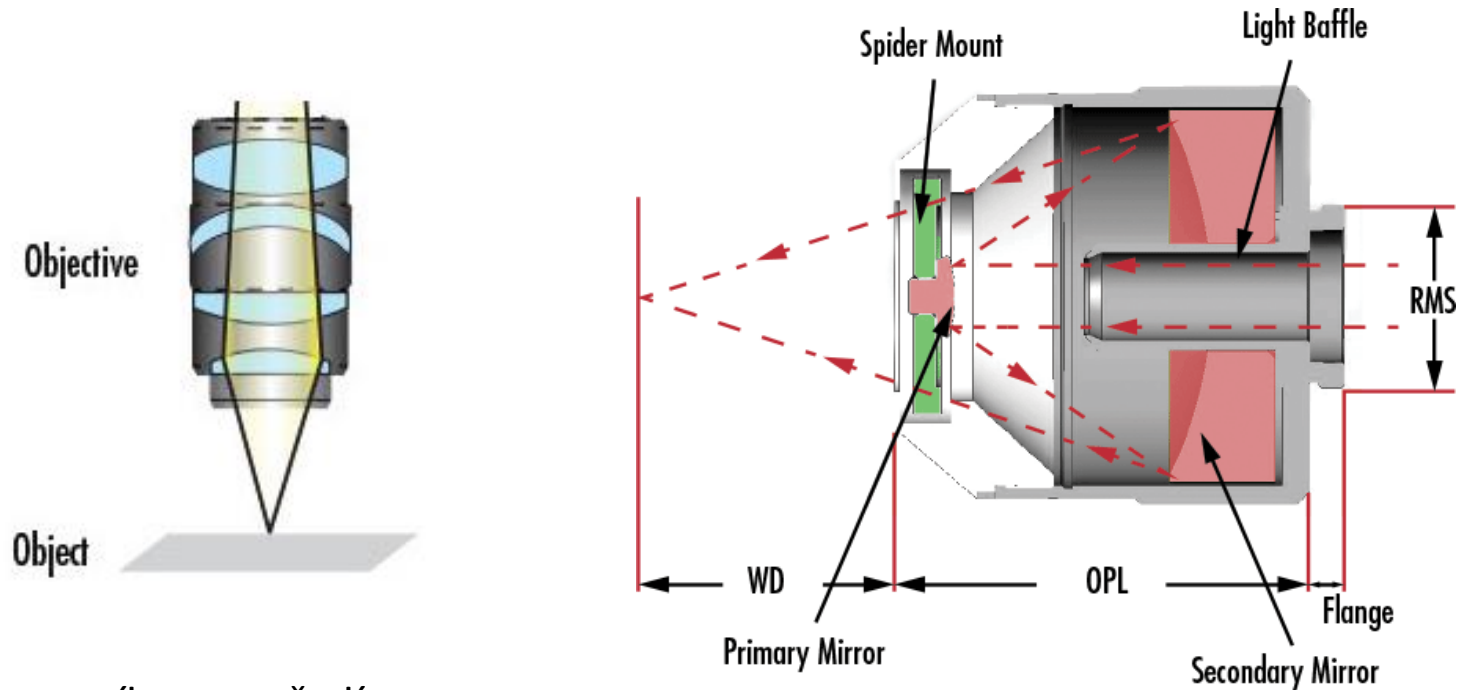
Objektiv SM

- je to optický prvek, pojmenovaný podle toho, že je nejbližší vzorku (object $\Rightarrow$ objective)
- nejdůležitější optický prvek SM – určuje kvalitu výsledného obrazu

Rozdělení:

Podle fyzikálního principu

- založené na lomu světelných paprsků (refractive objectives) – optické prvky - čočka
- založené na odrazu světelných paprsků (reflective objectives) – optické prvky - zrcadla



Podle pracovního prostředí

- suché – mezi vzorkem a objektivem je vzduch
- imerzní – prostor mezi vzorkem a objektivem vyplněn látkou s vysokým indexem lomu

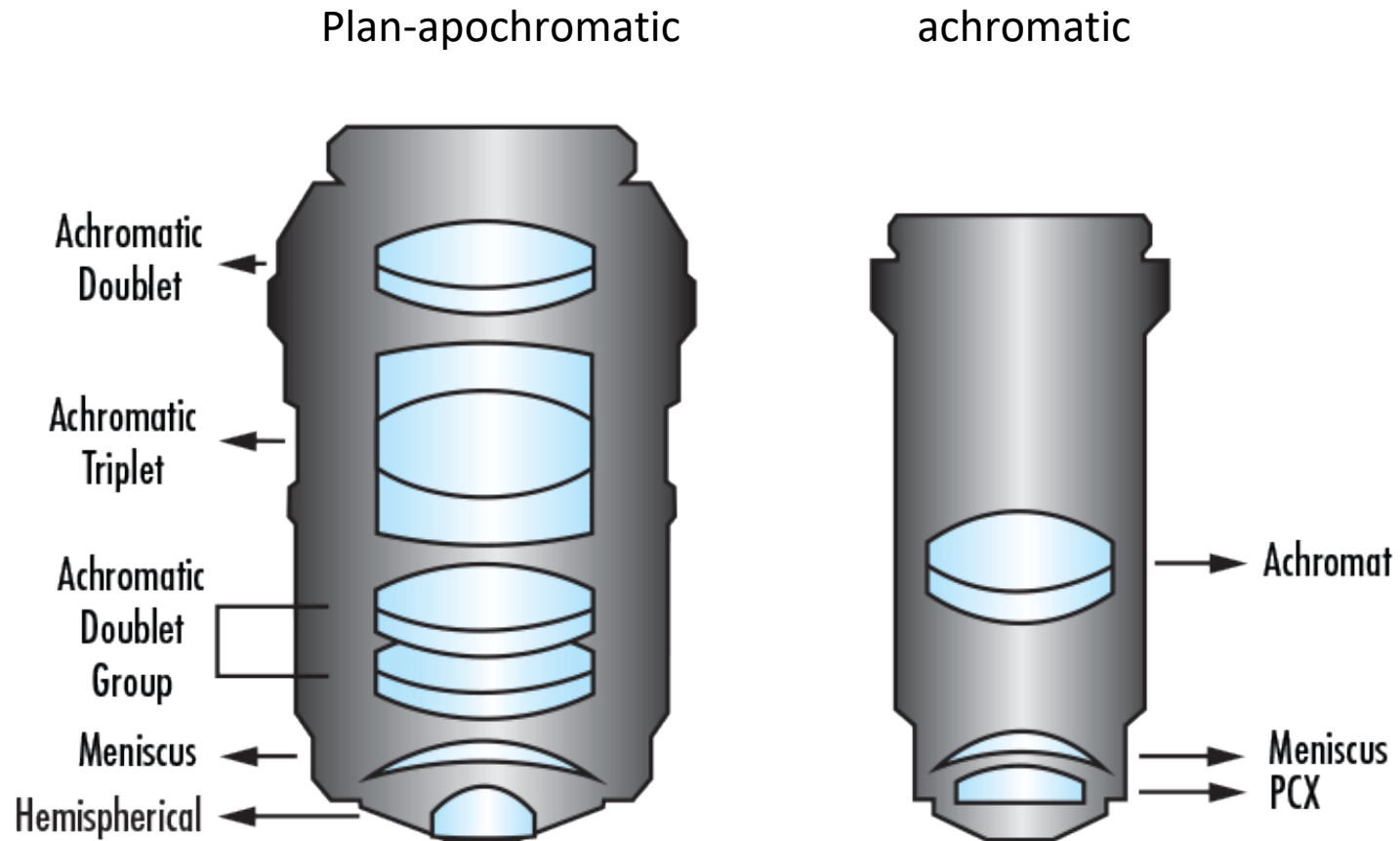
Objektiv SM

60x Plan Apochromat Objective



Každý výrobce nabízí 20-30 různých typů objektivů!

Objektiv SM



- antireflexní úprava čoček – eliminace zpětného odrazu světla (dobrá světelnost)
- čelní (frontální) čočka – plankonvexní
- rozptylka z flintového skla
- spojka z korunového skla

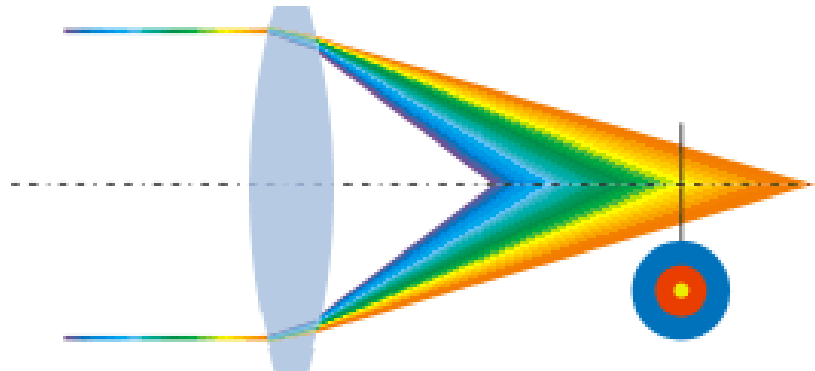
Materiál čoček objektivu SM

Korunové sklo

- křemičitan sodno-vápenatý nebo křemičitan draselno-vápenatý
- menší index lomu v porovnání s flintovým sklem

Flintové sklo

- oproti korunovému sklu obsahuje olovo jako přísadu
- sklo s vysokým indexem lomu
- index lomu závisí na vlnové délce



Charakteristika objektivů SM

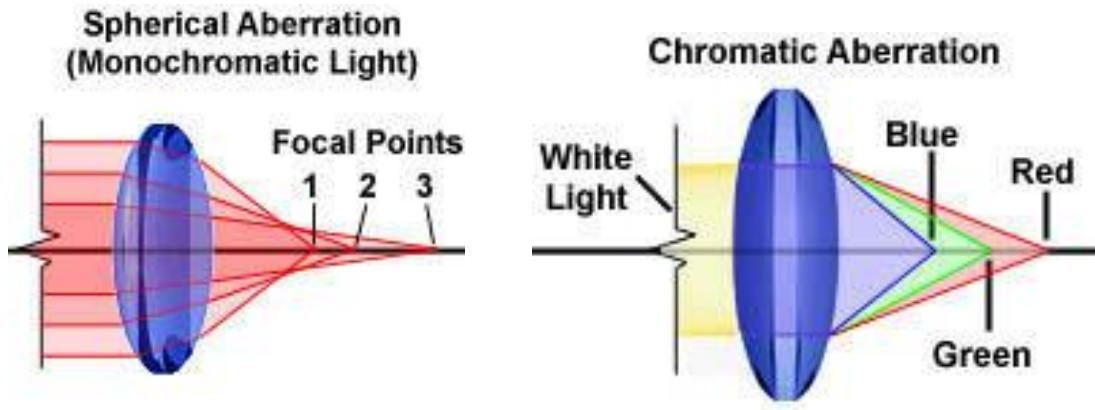
1. zvětšení Z_o - obvykle 2x – 100x
2. numerická apertura NA a příp. imerzní médium
3. předepsaná délka tubusu nebo obrazová vzdálenost (uvádí se v mm, např. 170 nebo ∞)
4. předepsaná tloušťka krycího skla v mm (např. 0.17), bez krycího skla – 0, „-“
5. volná pracovní vzdálenost – vzdálenost mezi objektivem a preparátem
6. **korigované optické vady a speciální optické vlastnosti**



Optické vady objektivu SM a jejich korekce

- optická vada – **aberrace** – odchylka zobrazení reálného od ideálního
- aberrace – monochromatické a chromatické (barevné)

1. Sférická a chromatická aberrace (kulová, otvorová)



- sférická (monochromatické světlo)
 - úhel lomu paprsku světla vzrůstá při průchodu paprsku blíže k okraji čočky
- chromatická (barevné světlo)
 - úhel lomu paprsku světla závisí na vlnové délce (ohnisková vzdálenost závisí na λ)

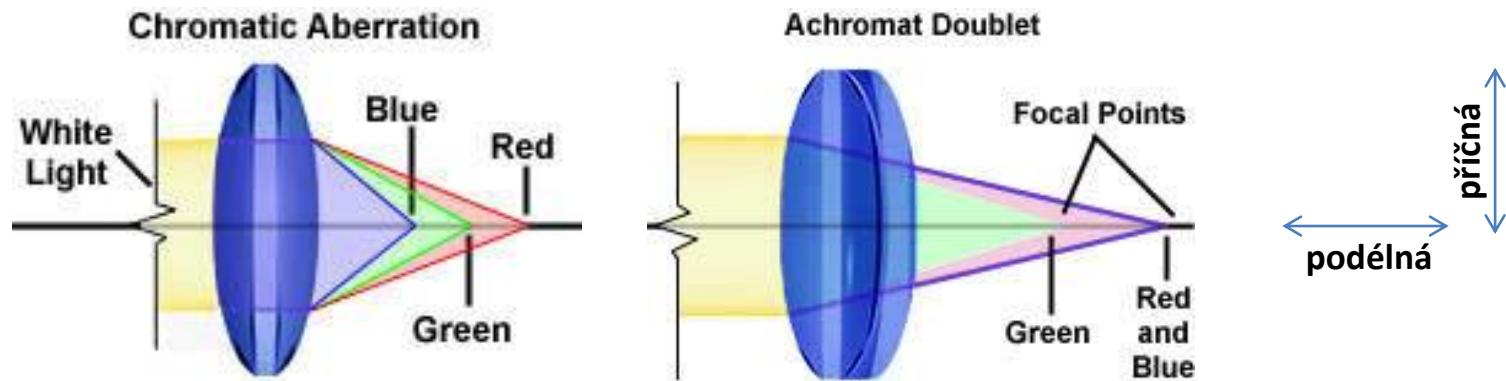
Korekce

- kombinace čoček z korunového a flintového skla
 - každé sklo má jiný index lomu
 - index lomu u flintového skla závisí i na vlnové délce

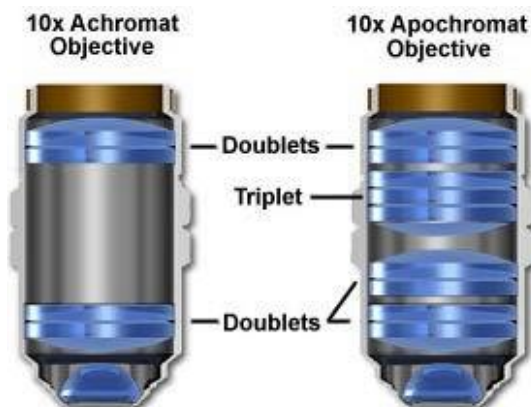
Optické vady objektivu SM a jejich korekce

1. Sférická a chromatická aberace (kulová, otvorová)

Korekce



- kombinace *spojky* z korunového skla a *rozptylky* z flintového skla
- spojka láme krajní paprsky více než středové, rozptylka vykazuje opačnou závislost
- korekce pro dvě vlnové délky – tzv. **dublet** $\Rightarrow$ **achromatický objektiv**
- korekce pro tři vlnové délky – tzv. triplet $\Rightarrow$ **apochromatický objektiv**

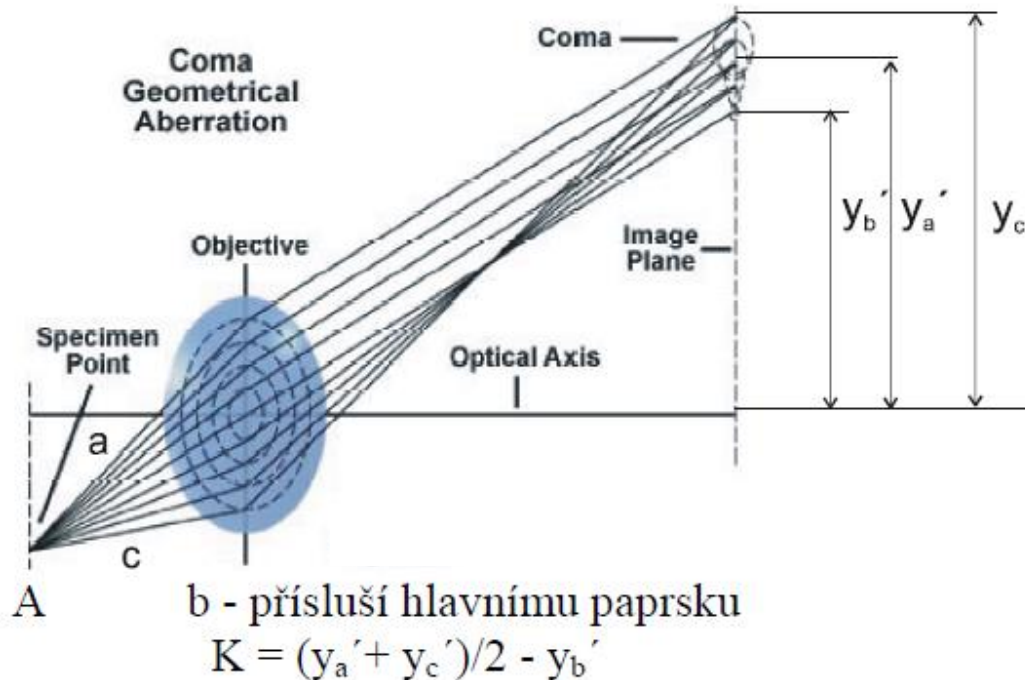


- navzdory korekci podélné chromatické aberace vzniká příčná chromatická aberace a zklenutí pole kompenzované speciálními **kompenzačními okuláry**

Optické vady objektivu SM a jejich korekce

2. Koma

- vzniká při zobrazování mimoosového bodu
- bodu A ve vzorku přísluší asymetrická ploška v obrazové rovině (připomíná kometu)
 - jasné jádro a rozšiřující se chvost
- vzrůstá úměrně se vzdáleností od optické osy



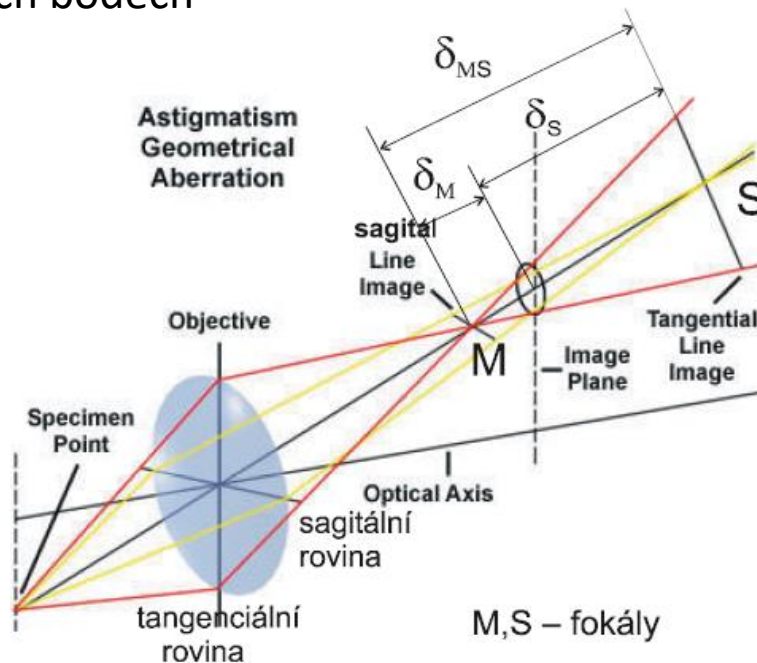
Korekce

- vhodná kombinace více čoček – korekce sférické aberace a komy $\Rightarrow$ ***aplanát***

Optické vady objektivu SM a jejich korekce

3. Astigmatismus a zklenutí

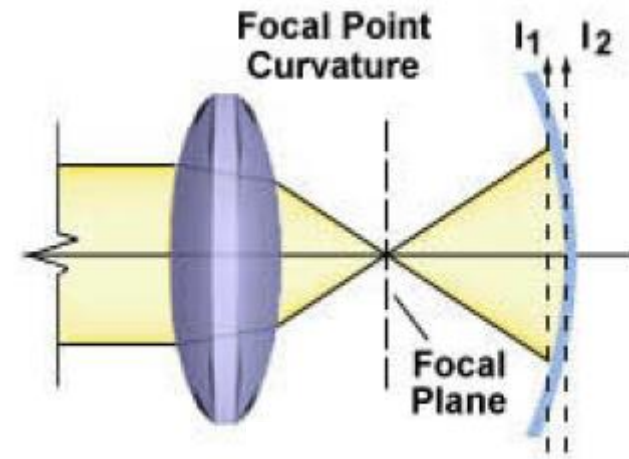
- úhel lomu paprsku podél soustředné kružnice čočky není stejný
- bod vzorku se zobrazí jako krátká úsečka (v pozici fokálů) nebo kroužku (mezi fokály)
- díky zklenutí se body roviny předmětu zobrazí na zakřivené ploše - obraz není ostrý ve všech bodech



δ_{SM} – astigmatismus

δ_S – sagitální zklenutí

δ_M – tangenciální zklenutí



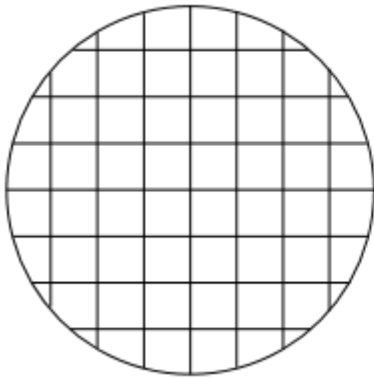
Korekce

- úprava poloměru křivosti čočky $\Rightarrow$ **anastigmat**
- zklenutí zorného pole $\Rightarrow$ **planachromát**

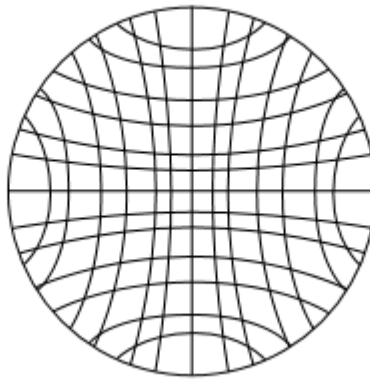
Optické vady objektivu SM a jejich korekce

4. Zkreslení (flat-field)

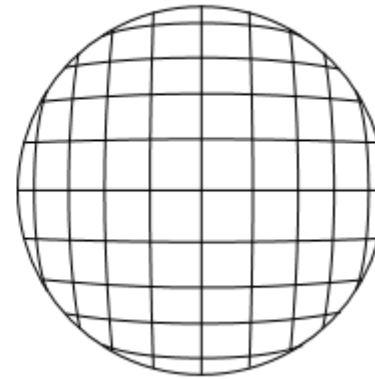
- zvětšení vnějších a vnitřních částí předmětu je odlišné
- dobře viditelné při zobrazení rastru



rastr



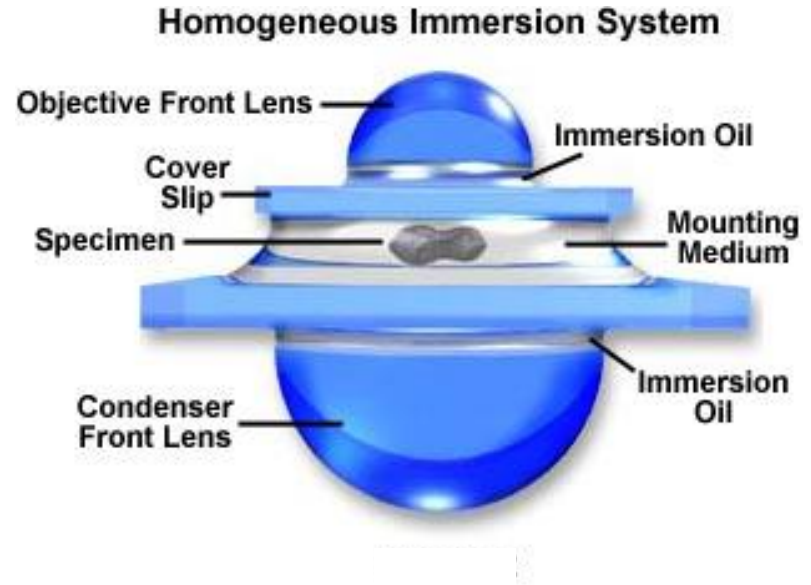
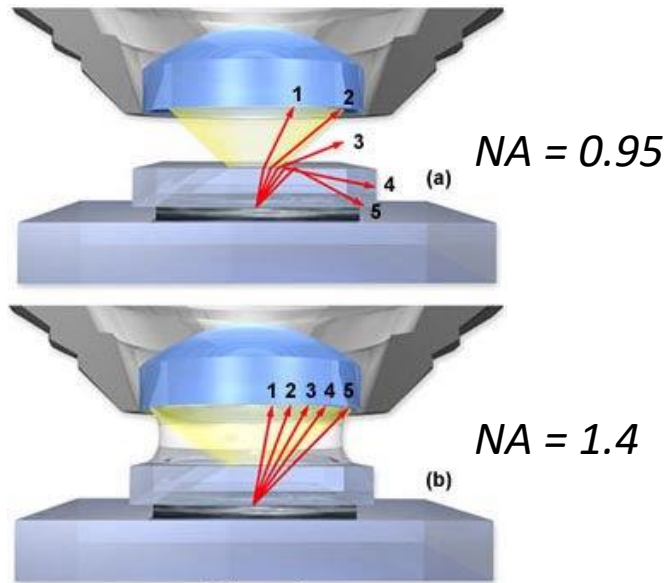
poduškovité zkreslení



soudkovité zkreslení

Korekce $\Rightarrow$ **ortoskopická** korekce čočky (flat-field correction)

Imerzní objektiv SM



- kritérium rozlišení:
$$d_{min} = \frac{0.61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin \alpha} = \frac{0.61 \cdot \lambda}{NA}$$
- imerzní médium zvyšuje aperturu objektivové čočky $\Rightarrow$ vyšší rozlišovací mez
- nové typy mikroskopů používají i imerzní kondenzory

Pracovní vzdálenost objektivu (WD)

- minimální vzdálenost okraje objektivu od krycího sklíčka, kdy je vzorek zaostřený

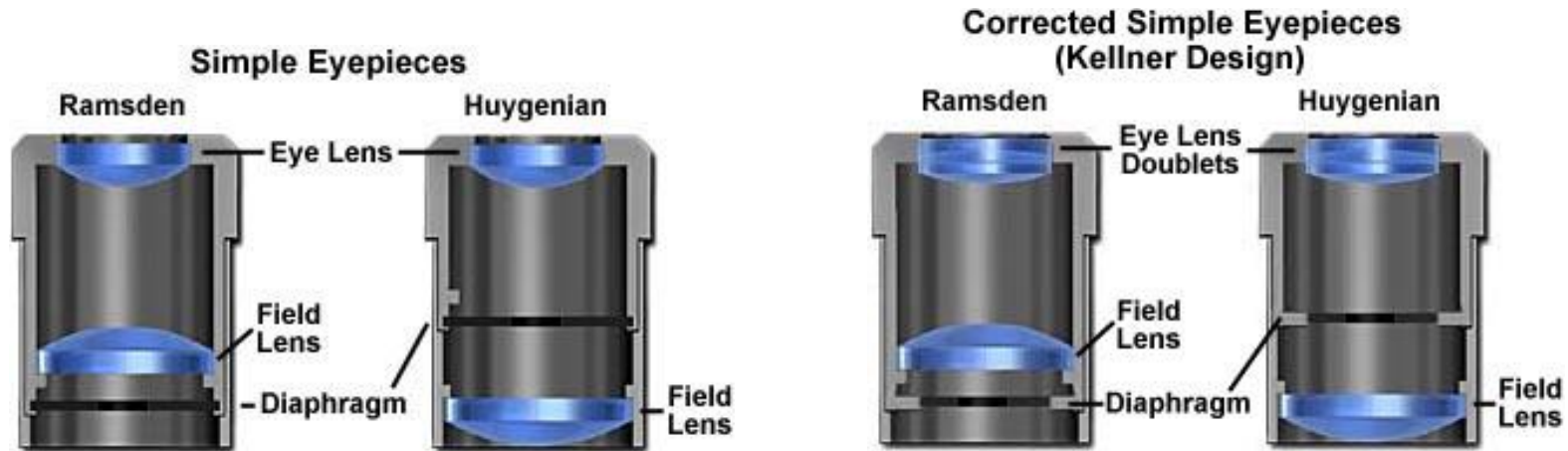


Manufacturer	Correction	Magnification	Numerical Aperture	Working Distance
Nikon	PlanApo	10x	0.45	4.0 mm
Nikon	PlanFluor	20x	0.75	0.35 mm
Nikon	PlanFluor (oil)	40x	1.30	0.20 mm
Nikon	PlanApo (oil)	60x	1.40	0.21 mm
Nikon	PlanApo (oil)	100x	1.40	0.13 mm

- WD klesá se zvětšením SM a hodnotou NA

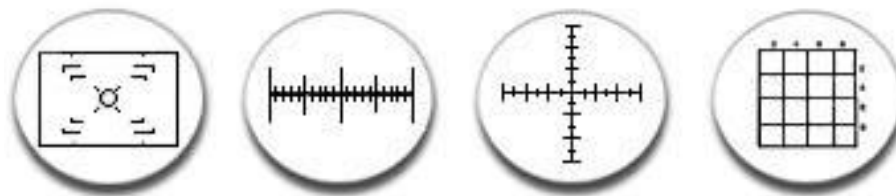
Okulár SM

- zvětšení bývá 5x – 25x
- výběr okuláru by měl být podřízen typu objektivu $\Rightarrow$ nejlepší výsledky
- konstrukce většinou ze dvou ploskovypuklých čoček (u korekčních okulárů je čoček více)



- *Ramsdenův okulár* (pozitivní) – ohnisková rovina je před okulárem
- *Huyghensův okulár* (negativní) – ohnisková rovina je mezi čočkami, velmi často používaný
- *Kellnerův okulár* Ramsdenova a Huyghenova typu – korekce oční čočky okuláru
- Clona zorného pole je umístěna v ohniskové rovině okuláru (přip. stupnice, atd.)

Measuring Graticules



Okulár SM

Kompenzační okulár

- kompenzace zbytkové aberace objektivové čočky (vykazují opačnou aberaci)
- musí být použity v kombinaci s příslušným typem objektivu

Projekční mikrofotografický okulár (PE)

- obvykle Huygensova typu (clona mezi čočkami)
- korekce aberací pro dokonalé snímky
- vytváří skutečný obraz – umožňuje přímé fotografování



CVIČENÍ

Cvičení: výpočet rozlišovací meze oka a SM

- ohyb na kruhové apertuře limituje rozlišení oka i SM

$$\sin \alpha = \frac{1,22 \cdot \lambda}{d}$$

Oko: rozlišovací mez je daná průměrem zornice – určuje aperturní úhel α

- průměr zornice: $d = 4 \text{ mm} = 0.004 \text{ m}$
- vlnová délka světla: $\lambda = 500 \text{ nm} = 0.0000005 \text{ m}$

$$\sin \alpha = \frac{1,22 \cdot 0.0000005}{0.004} = 0.0001525$$

$$\alpha = 0.0087^\circ = 0.5' \quad \text{realita: } \alpha = 2'$$

Jak velký objekt odpovídá úhlové vzdálenosti při pozorovací vzdálenosti 25 cm?



Pro malé úhly platí:

$$\sin \alpha = \tan \alpha = \frac{x}{0.25}$$

$$\underline{x = 0.15 \text{ mm} \cong 0.2 \text{ mm}}$$

Zdravé oko je schopné rozlišit dva body vzdálené od sebe cca 0.2 mm.

Cvičení: výpočet rozlišovací meze oka a SM

- ohyb na kruhové apertuře limituje rozlišení oka i SM

$$\sin \alpha = \frac{1,22 \cdot \lambda}{d}$$

SM: rozlišovací mez je daná aperturním úhlem α

$$d = \frac{1.22 \cdot \lambda}{n \cdot \sin \alpha}$$

Dle Rayleighova kritéria:

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

NA = 1.5 (imersní objektiv)

$\lambda = 500 \text{ nm}$

$$d_{min} = \frac{0.61 \cdot 0.0000005}{1.5} \cong \mathbf{200 \text{ nm}}$$

Rozlišovací mez SM je při použití imersního objektivu cca 200 nm, což je přibližně polovina vlnové délky použitého světla.

Pozn.: d má význam průměru kruhové apertury promítnuté do roviny předmětu.