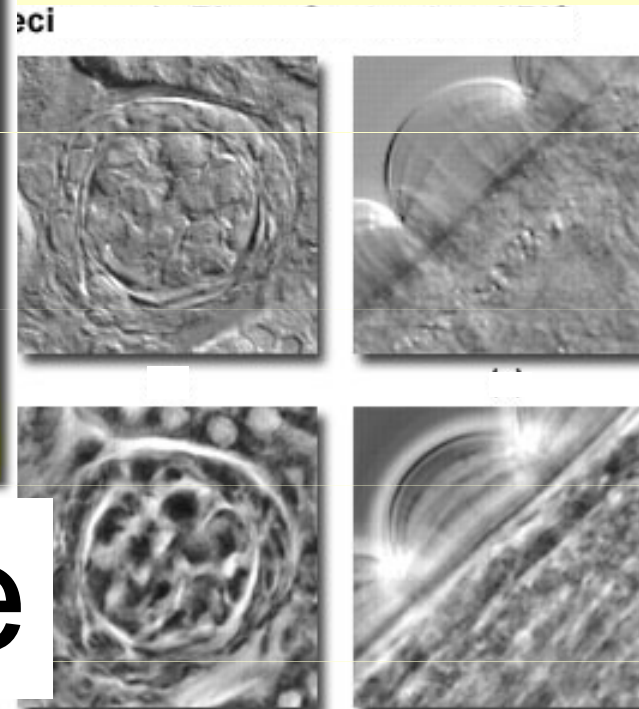
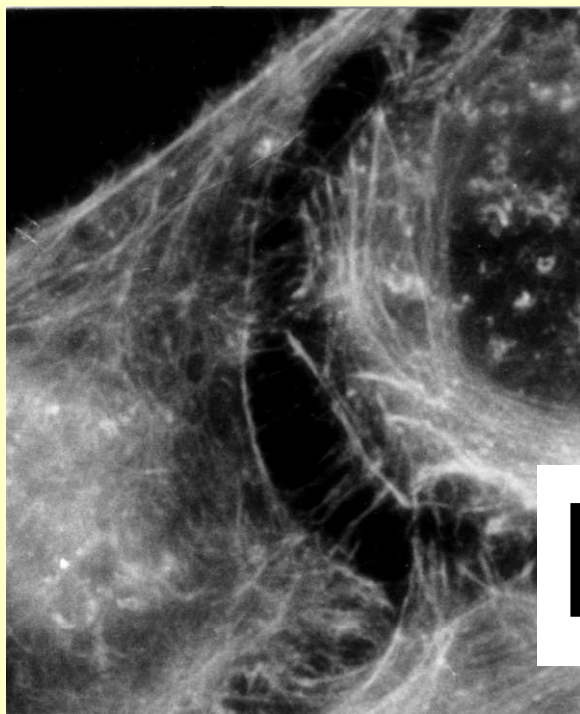
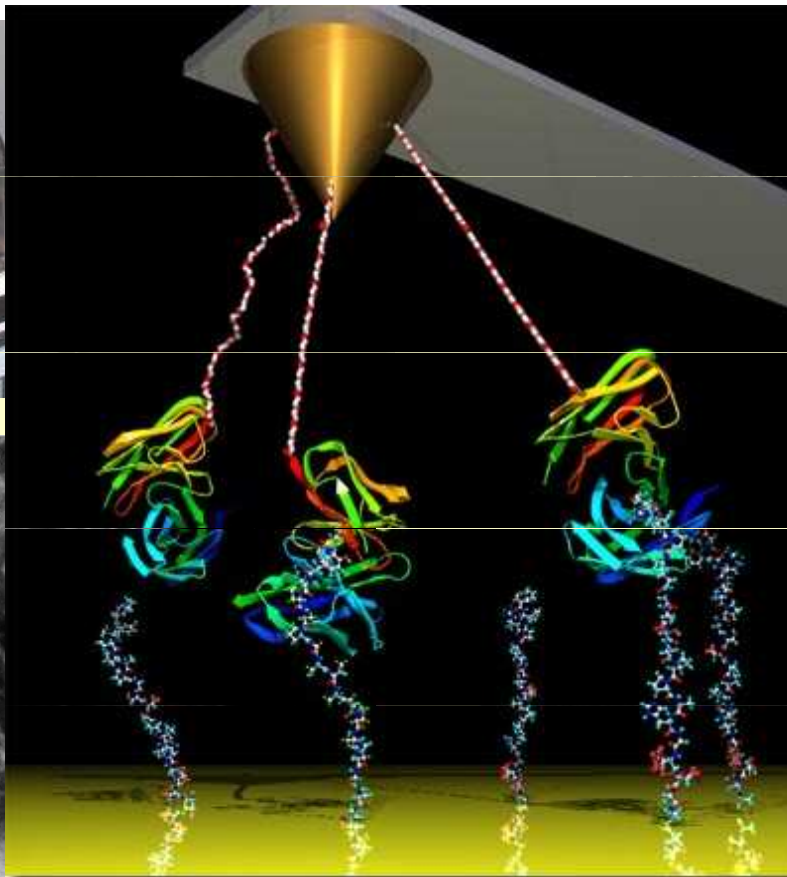
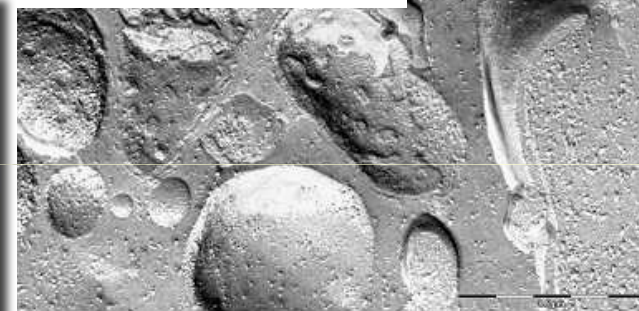


# Přednášky z lékařské biofyziky

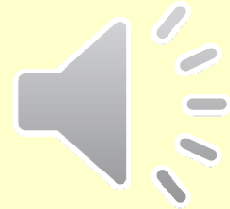
Biofyzikální ústav Lékařské fakulty  
Masarykovy univerzity, Brno



# Mikroskopie

# Obsah přednášky

- Optická (světelná) mikroskopie
  - Fyzikální principy mikroskopie
  - Varianty optických mikroskopů
    - Fázový kontrast
    - Fluorescenční mikroskop
  - Speciální optické mikroskopy
    - Laserový konfokální skenovací mikroskop
    - Superrozlišující mikroskopy
- Elektronová mikroskopie
  - Transmisní elektronový mikroskop
  - Skenovací elektronový mikroskop
- Mikroskopie skenující sondou
  - Skenovací tunelový mikroskop
  - ATM - Atomic force microscopy





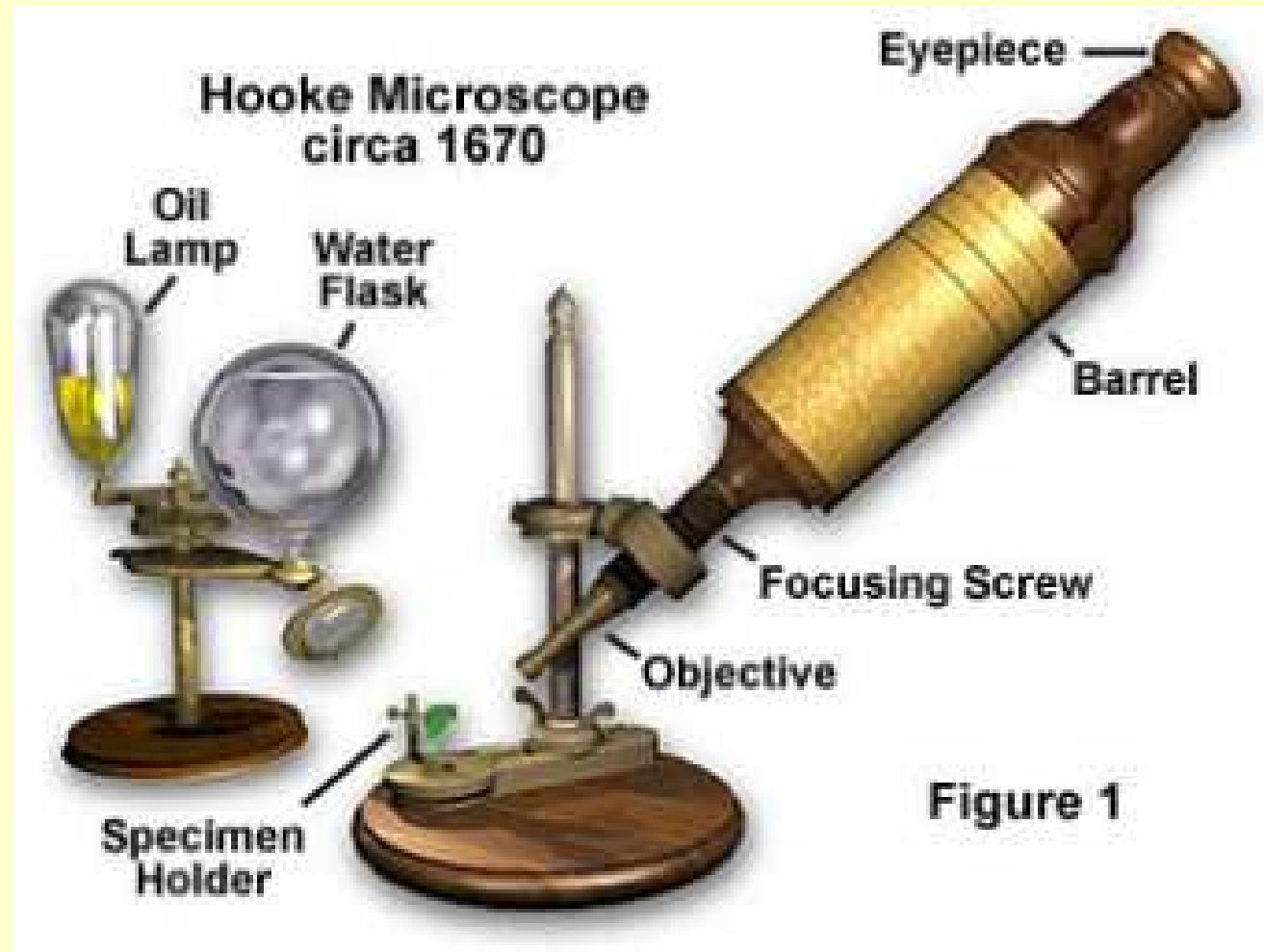
# Optická (světelná) mikroskopie - Úvod

- Prostorové rozlišení lidského oka ze vzdálenosti 25 cm je přibližně 14 čar na mm (odpovídá rozlišení dvou bodů vzdálených 0,07 mm od sebe).
- Lupa může toto rozlišení podstatně zvýšit (pro velké rozlišení potřebujeme velký průměr čočky a krátkou ohniskovou vzdálenost). Lupa však nemá dostatečně velké rozlišení pro studium mikrostruktury živé hmoty.
- První jednoduché mikroskopy byly vyrobeny v Nizozemí již na konci 16. století. Anthony van Leeuwenhoek (1632-1723) zdokonalil jeho konstrukci a použil mikroskop pro mnoho biologických pozorování.
- Sestrojení elektronového mikroskopu (ve 30. letech 20. století). Rozlišení se zlepšilo přibližně 1000x oproti dosavadním mikroskopům, takže bylo možno spatřit velké molekuly (řádově nm). Dnes můžeme pozorovat jednotlivé atomy.
- V zásadě můžeme použít jakékoliv vlnění pro zobrazení mikroskopických objektů. Jedinou podmínkou je, aby vlnová délka byla kratší než rozměry pozorovaného objektu – **Difrakční bariéra**.

# První složené mikroskopy



Robert Hooke 1635-1703





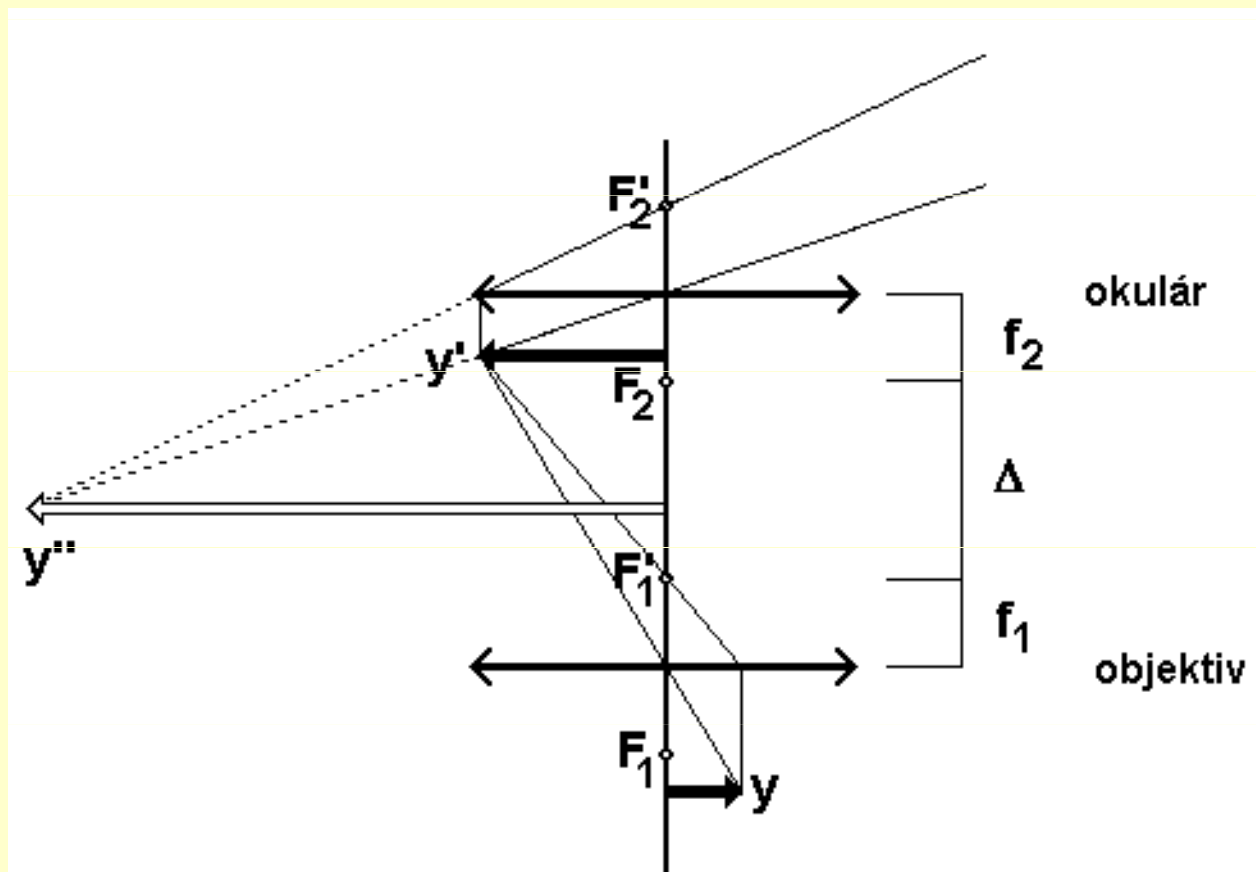
# Schéma mikroskopu a vlastnosti jeho optického systému

*Hlavní části: dvě soustavy spojných čoček - objektiv a okulár.*

- Z hlediska kvality obrazu je nejdůležitější částí mikroskopu **objektiv**, který vytváří skutečný, zvětšený a převrácený obraz. Pozorovaný objekt musí být umístěn mezi ohnisko a dvojnásobek ohniskové vzdálenosti objektivu (objektiv lze považovat za spojnou čočku s velmi krátkou ohniskovou vzdáleností – pro zajištění vysokého rozlišení).
- Mechanická část spojující objektiv s okulárem se nazývá **tubus**. Obraz vytvořený objektivem (umístěný hned za předmětové ohnisko okuláru) je pozorován **okulárem** jako jednoduchou lupou. Výsledkem je velmi zvětšený, převrácený a neskutečný obraz.
- **Kondensator** je optickým systémem soustředujícím světlo na pozorovaný objekt, zajišťuje jeho dokonalé osvětlení.

# Fyzikální principy mikroskopie

## Optické schéma a zvětšení mikroskopu



F – ohniska,

f – ohniskové vzdálenosti,

y - předmět,

y' – skutečný obraz  
předmětu tvořený  
objektivem,

y'' – neskutečný obraz  
viděný v okuláru,

Δ – optický interval  
mikroskopu.

$$M = M_{ob} \cdot M_{ok} = \frac{\Delta \cdot d}{f_{ok} \cdot f_{ob}}$$

**d** – konvenční zraková vzdálenost (0,25 m),

Δ – optický interval mikroskopu,

**f<sub>ob</sub>** a **f<sub>ok</sub>** jsou ohniskové vzdálenosti objektivu  
a okuláru.

# Fyzikální principy mikroskopie

## Objektivy mikroskopů



# Fyzikální principy mikroskopie

## Objektivy mikroskopů



Různé objektivy vybavené apochromatickou korekcí optických vad objektivu

Plan - Apochromatická korekce optické vady- objektiv je určený pro mikroskopy využívající fotoaparát nebo kameru k získání záznamu

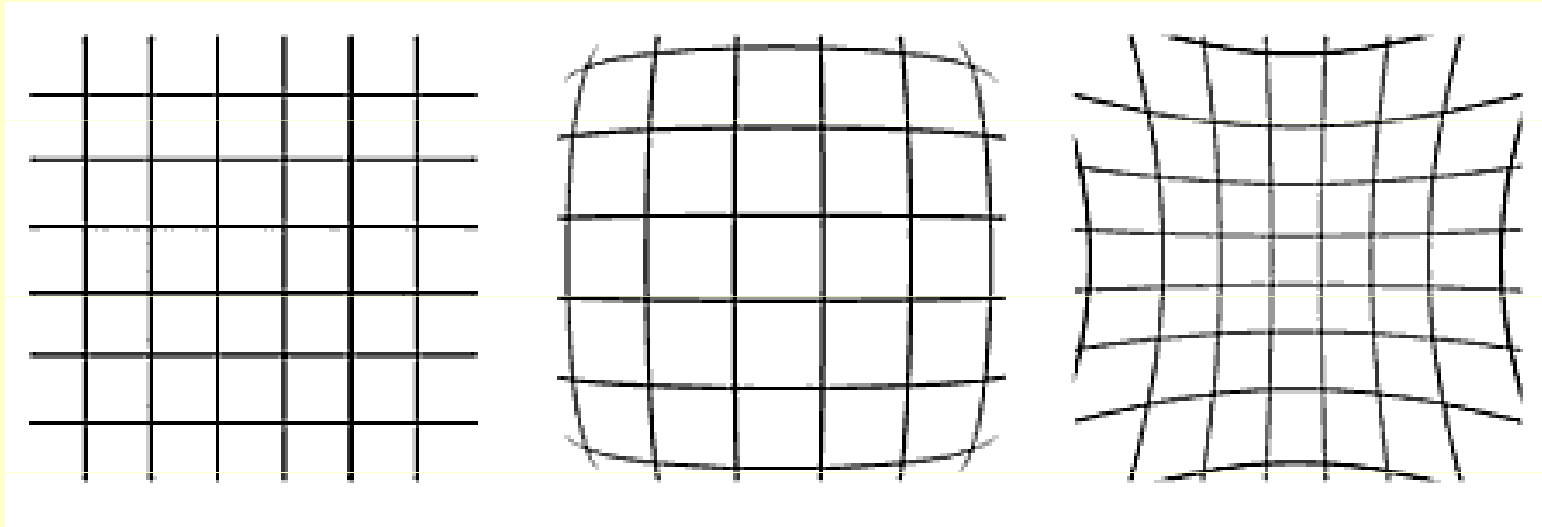
<http://micro.magnet.fsu.edu/>

**Korekce optických vad - Achro a Achromat** (achromatické), **FI, Fluar, Fluor, Neofluar, Fluotar** (fluoritové čočky, lepší odstranění kulové a barevné vady), **Apo** (apochromatické, nejvyšší stupeň korekce kulové a barevné vady), **Plan-** korekce zklenutí zorného pole (zaostření rovinného objektu v celém zorném poli mikroskopu)





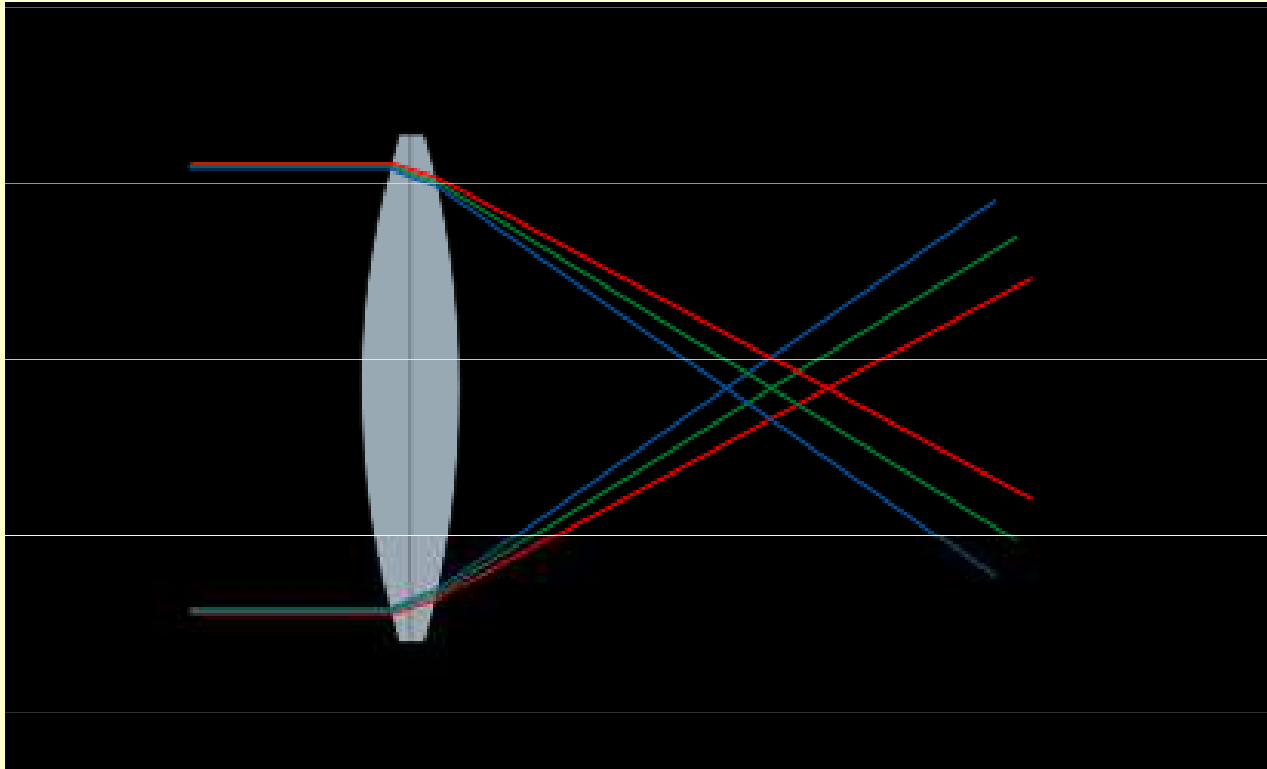
# Sférické vady



Sférické zkreslení způsobí deformaci přímek buďto na soudek (uprostřed) nebo na polštářek (vpravo)



# Barevné vady



Rozklad bílého světla na barevné spektrum, objektivy jsou korigovány na 2-3 barvy, nejčastěji žlutá, zelená a červená oblast.

# Specifikace objektivů - numerická apertura ( $NA$ )



- **Numerická apertura** –určuje úhel, pod kterým může světlo vstupovat do objektivu (což určuje jas obrazu, čím je  $NA$  větší, tím je větší zorný úhel),

$$NA = n \sin \alpha$$

kde  $n$  je index lomu prostředí mezi objektivem a krycím sklíčkem a  $\alpha$  je „zorný“ úhel.

- Pro zvýšení  $NA$  se využívá imersní prostředí s vyšším indexem lomu  $n$  než má vzduch

$$n_{\text{vzduch}} = 1,003$$

$$n_{\text{voda}} = 1,333$$

$$n_{\text{glycerol}} = 1,473$$

$$n_{\text{cedrový olej}} = 1,515$$

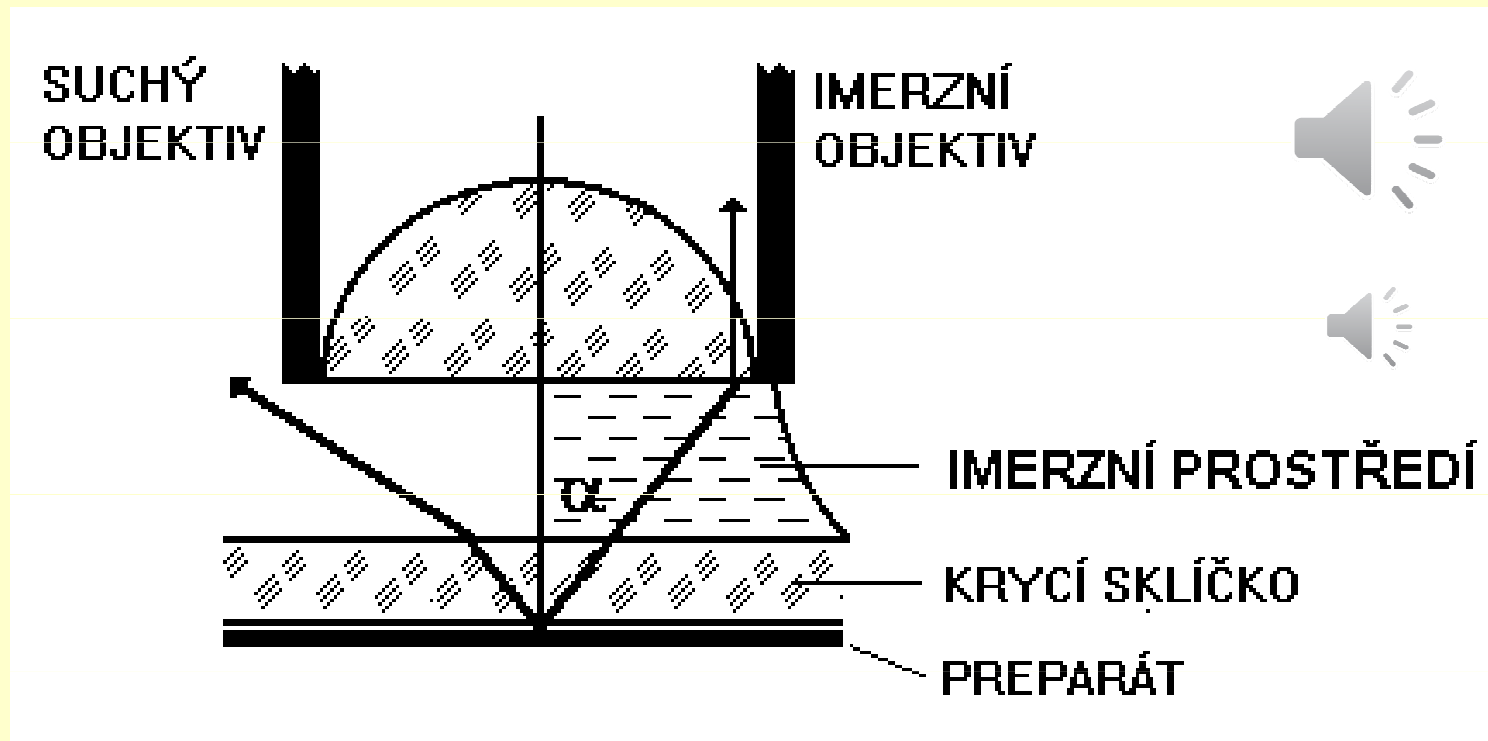
$$n_{\text{bromnaftalen}} = 1,658$$

$$n_{\text{metyleniodid}} = 1,740$$

- $NA$  maximální hodnota je kolem 1,5

# Fyzikální principy mikroskopie

## Použití imerzního prostředí



Levý paprsek opouštějící sklíčko se láme na jeho rozhraní se vzduchem od kolmice a nemůže se podílet na tvorbě obrazu. Pravý paprsek prochází do imerzního prostředí (jež má index lomu podobný jako sklo mezi 1,5 - 1,9), nemění svůj směr a podílí se na tvorbě obrazu.

# Další specifikace objektivů



- **Tloušťka krycího sklíčka** (standardně 0,17 mm). Některé objektivy mají **korekční kroužek** pro kompenzaci odchylek od tohoto standardu.
- **Pracovní vzdálenost** – Vzdálenost mezi čelem čočky objektivu a krycím sklíčkem, je-li pozorovaný předmět v ohnisku. Zmenšuje se při rostoucím zvětšení. Novější objektivy mají na sobě údaj o pracovní vzdálenosti v mm.
- **Barevné kódy** – Výrobci mikroskopů označují svoje objektivy barevnými kódy aby se usnadnila identifikace zvětšení a požadavků na imersní prostředí.



# Mez prostorové rozlišovací schopnosti mikroskopu

- Mezní rozlišovací schopnost je úměrná numerické apertuře **NA** a nepřímo úměrná vlnové délce  $\lambda$  použitého světla (německý fyzik *Abbe*, 1840-1905).
- V některých učebnicích je uváděn výraz pro rozlišovací schopnost:

$$\delta = \lambda/NA$$

kde  $\delta$  je vzdálenost dvou ještě rozlišitelných bodů ( $NA = n \sin \alpha$ , kde  $n$  je index lomu prostředí mezi objektivem a krycím sklíčkem a  $\alpha$  je dříve zmiňovaný zorný úhel).

- Prostorové rozlišení roste se zvětšením. Kombinací silných spojných čoček bychom mohli sestavit mikroskop s téměř libovolným zvětšením, avšak místo toho zjišťujeme, že za určitou hranicí (hranice „užitečného zvětšení“) se *rozlišení* již nezvětšuje (jde o „prázdné“ zvětšení).
- Jestliže se zmenšuje apertura (otvor) kondenzoru, prostorové rozlišení se snižuje, avšak roste kontrast! Proto musíme při volbě apertury kondenzoru dbát o vyváženost prostorového rozlišení a kontrastu. Chceme-li jen snížit jas obrazu, je vhodnější ztlumit lampu než zmenšit aperturu kondenzoru, protože takto nedojde ke zhoršení rozlišovací schopnosti.

# Hloubka ostrosti $Z$



Jde o tloušťku objektu podél osy  $z$ , která se současně nachází v ohnisku. Důležité u silnějších vzorků.

$$Z = \frac{n}{NA^2}$$

$n$  je index lomu vzorku (resp. tekutiny obklopující mikroskopovaný objekt).

# Varianty optické mikroskopie



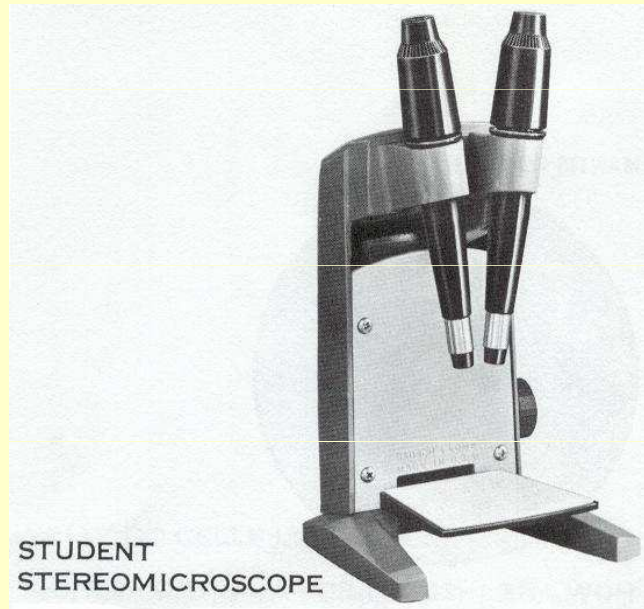
- Pozorování ve **světlém** nebo **tmavém poli**
- **Stereomikroskop** (dva mikroskopy se samostatnými objektivy a okuláry, jejichž optické osy svírají úhel asi  $15^\circ$ ) – stereoskopické vidění. V medicíně: **mikrochirurgie**. Obraz nesmí být převrácený. Operační pole je osvětleno optickými vlákny. Ohnisková vzdálenost objektivu se může plynule měnit - zoom – různé prostorové rozlišení.
- **mikrofotografie** nebo **mikrokinematografie (video)**.
- Software pro zpracování obrazu: mění kontrast, jas, ostrost atd. Pokročilý software umožňuje kvantitativní analýzu obrazu, hledání typických tvarů atd.
- Většina druhů mikroskopů může být sestavena z různých objektivů, okulárů, kondenzorů a dodatečně vybavena různými speciálními optickými prvky. Je k dispozici různé příslušenství, např. mikromanipulátory pro umístování elektrod do buněk, separování organel atd.



Varianty optických mikroskopů



# Stereomikroskop



•The **OPMI® Vario/NC 33** surgical microscope



Varianty optických mikroskopů

# Mikroskop s fázovým kontrastem

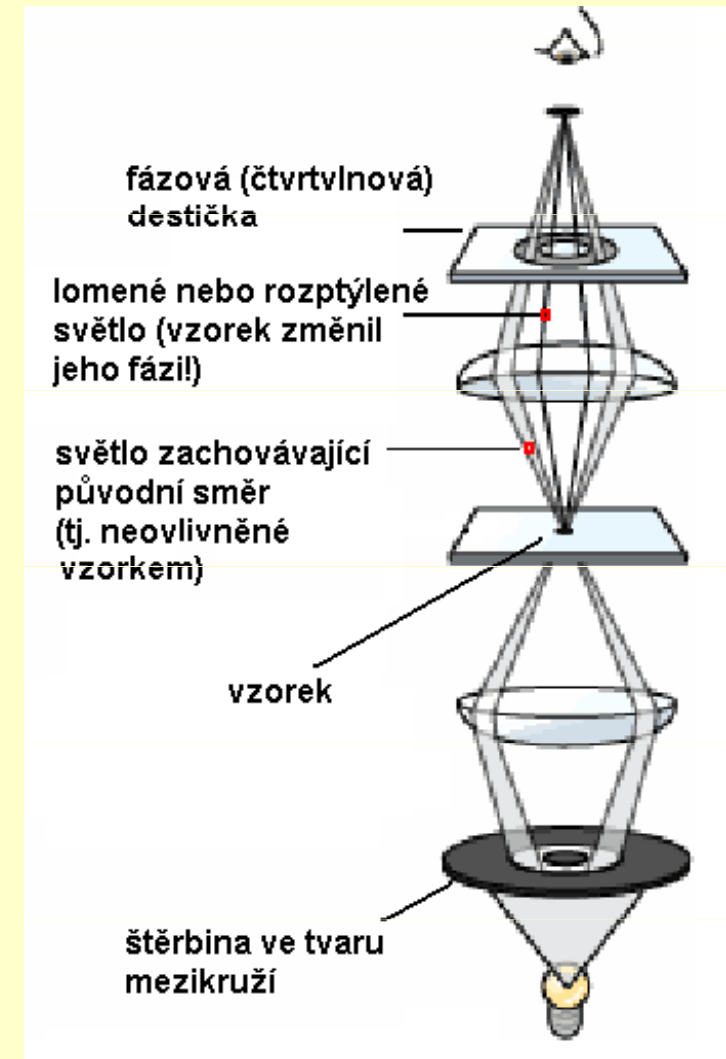
- Tato technika vytváří kontrastní obrazy např. živých buněk, jejichž struktury mají podobný útlum (jsou rovnoměrně průsvitné a proto málo kontrastní v mikroskopu zobrazujícím rozdíly v amplitudě procházejícího světla), avšak lehce se liší svým indexem lomu (v důsledku čehož dochází k fázovým posunům – rozlišení tzv. **fázových objektů**).
- *Fázově kontrastní technika mění rozdíly ve fázi v rozdíly v amplitudě. Živé buňky mohou být zkoumány ve svém přirozeném stavu, tj. bez fixace a barvení.*



## Varianty optických mikroskopů

# Mikroskop s fázovým kontrastem

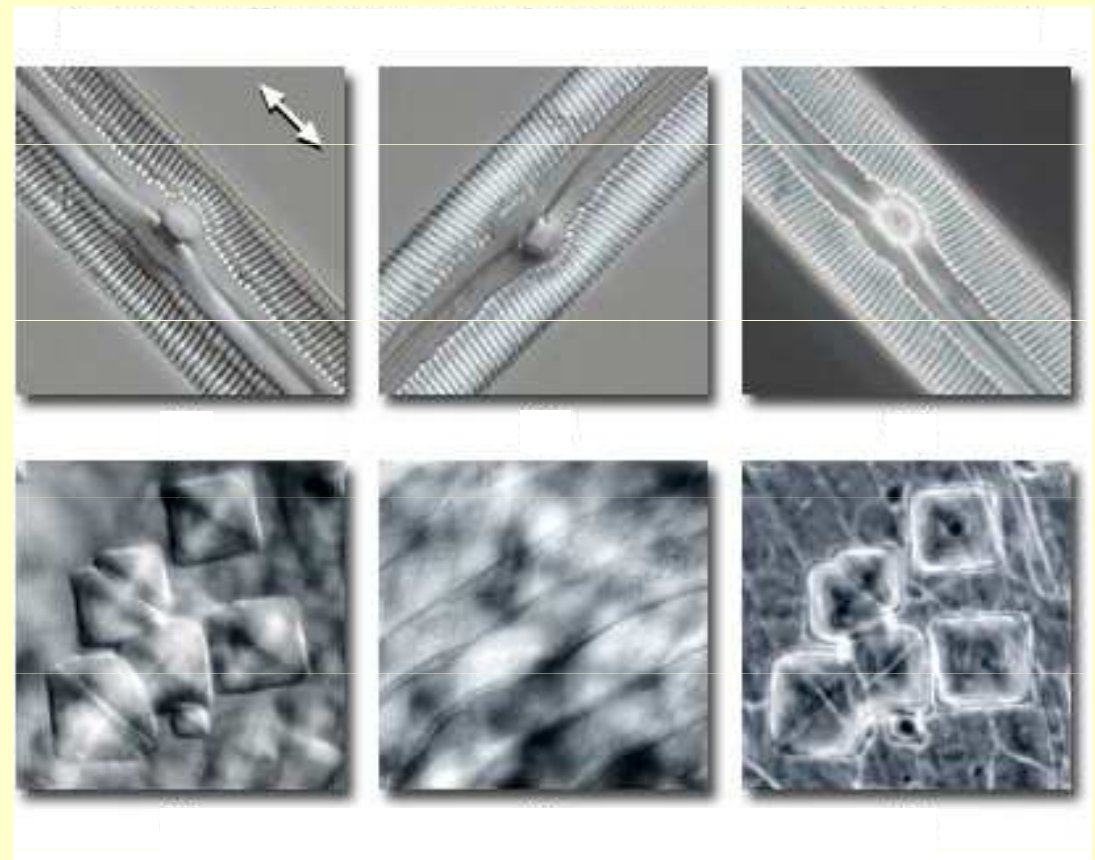
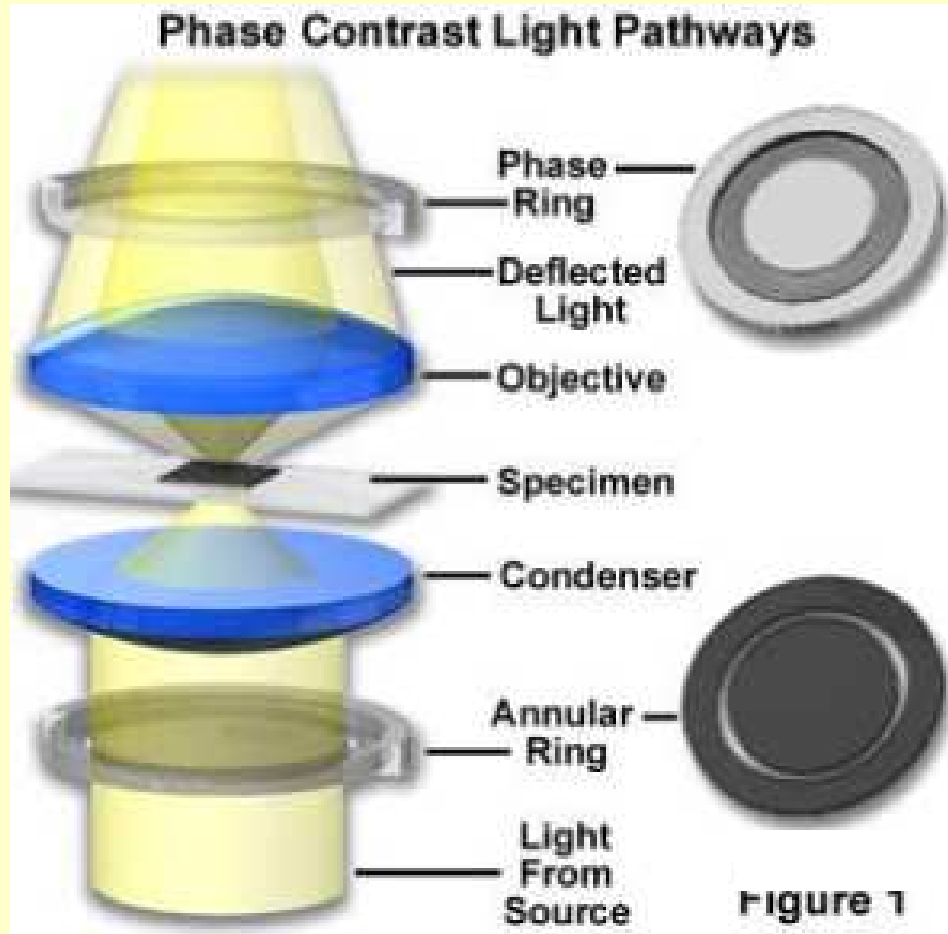
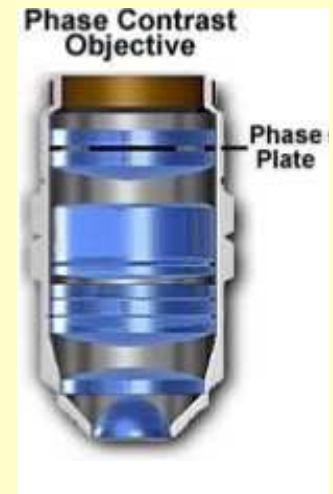
- Do přední ohniskové roviny kondenzoru je přidána clona se štěrbinou ve tvaru mezikruží, kterou pak prochází světlo. Když světlo prochází vzorkem, paprsky jsou odchylovány z původního směru a současně různě zpoždovány průchodem různými tloušťkami materiálu objektu.
- V obrazové ohniskové rovině objektivu se nachází **fázová destička**, opět ve tvaru mezikruží, jež posunuje fázi o  $+\pi/2$  nebo  $-\pi/2$ , tj. o čtvrtinu vlnové délky. Tato destička propouští paprsky, které nezměnily svůj směr na fázových objektech. Ostatní paprsky destičku minou a jejich fáze se nezmění.
- Obraz se vytváří interferencí fázově posunutých a neposunutých paprsků. Fázové objekty pak vypadají jako tmavé nebo světlé vůči svému okolí (pozitivní nebo negativní kontrast).



Podle  
<http://www.nobel.se/physics/educational/microscopes/phase/>

# Varianty optických mikroskopů

## Mikroskop s fázovým kontrastem





# Mikroskop s fázovým kontrastem

Mnohé bezbarvé biologické objekty (obtížně pozorovatelné v běžném mikroskopu) jsou fázovými objekty. Barviva je mohou zviditelnit, jsou však často pro buňky jedovatá. Fázově kontrastní mikroskopy umožňují pozorovat takovéto objekty bez barvení.



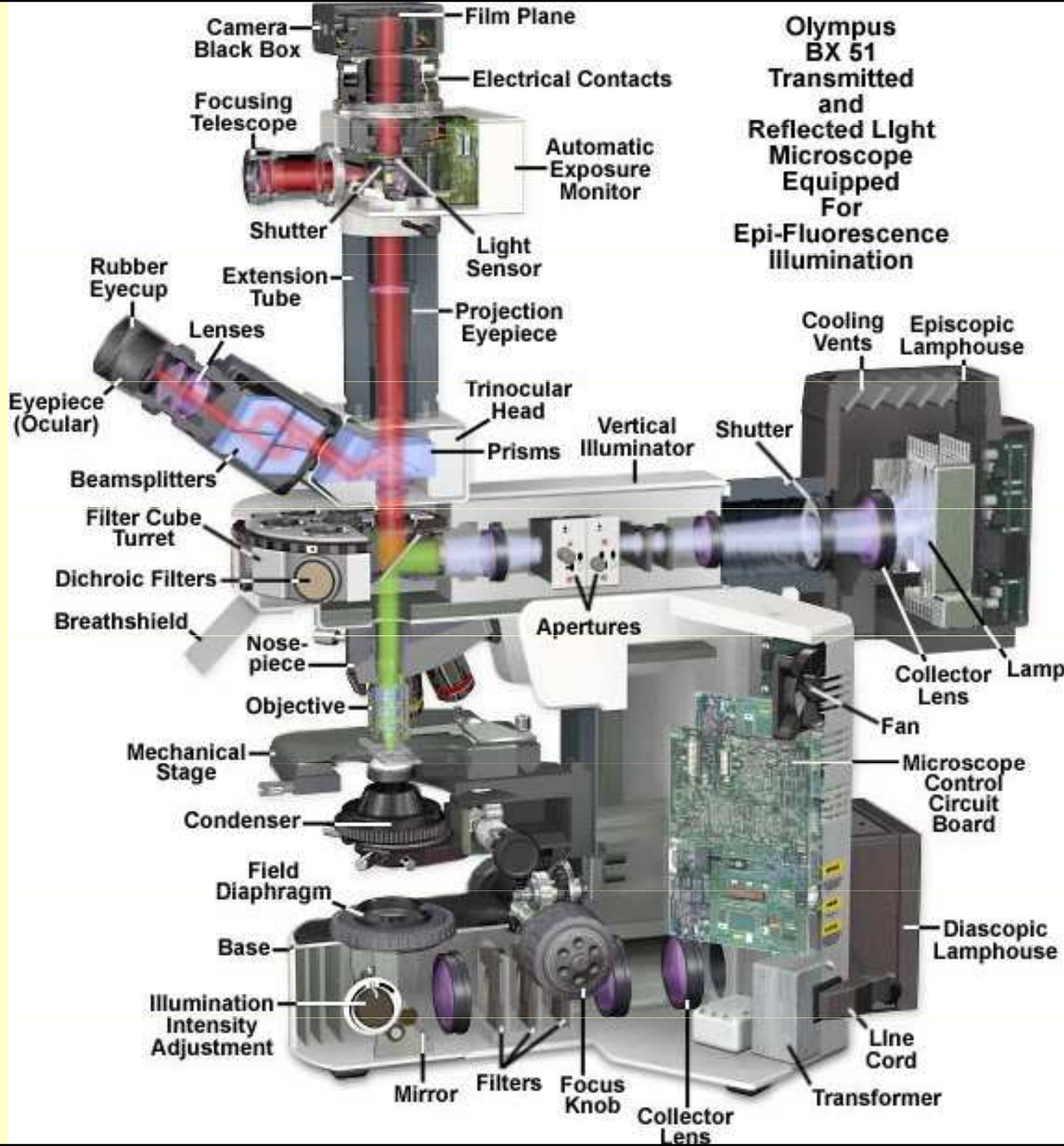
Améba ve fázovém kontrastu,  $Z = 250x$   
([www.durr.demon.co.uk/colour.html](http://www.durr.demon.co.uk/colour.html).)



# Fluorescenční mikroskop



- **Fluorescenční mikroskopie** je založena na schopnosti některých látek emitovat viditelné světlo po ozáření světlem o kratší vlnové délce (UV záření nebo fialové světlo).
- Optika kondenzoru musí být přizpůsobena UV záření (křemenné, kalciové sklo), které však může k preparátu přicházet též objektivem (horní osvětlení). Zbývající části mikroskopu jsou stejné jako u běžných mikroskopů. Nutná je ochrana očí před UV zářením (UV filtry).
- Fluorescenci vykazuje např. tryptofan či jiné sloučeniny s aromatickým kruhem či heterocyklem. Ve většině případů se však ke vzorkům přidávají **fluorescenční barviva** specificky interagující s různými buněčnými strukturami. Často je barvivo (fluorochrom, fluorescenční sonda) vázáno na (monoklonální) **protilátku** specifickou pro některou bílkovinu. Tato imunofluorescenční metoda může selektivně zviditelnit např. cytoskelet, chromatin či různé membránové bílkoviny.



Olympus BX 51 Transmitted and Reflected Light Microscope Equipped For Epi-Fluorescence Illumination

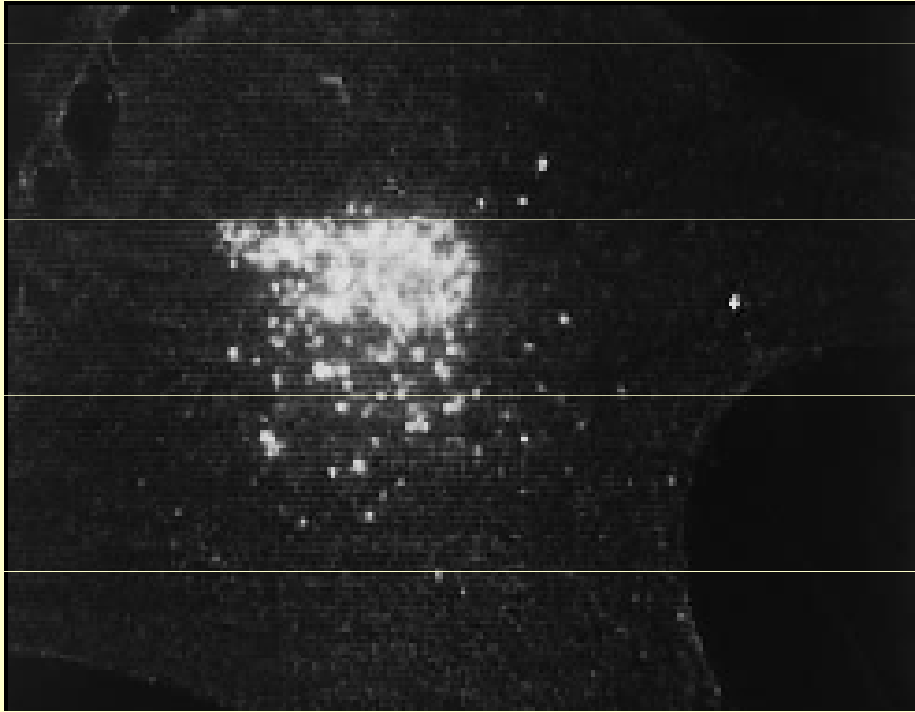
FM



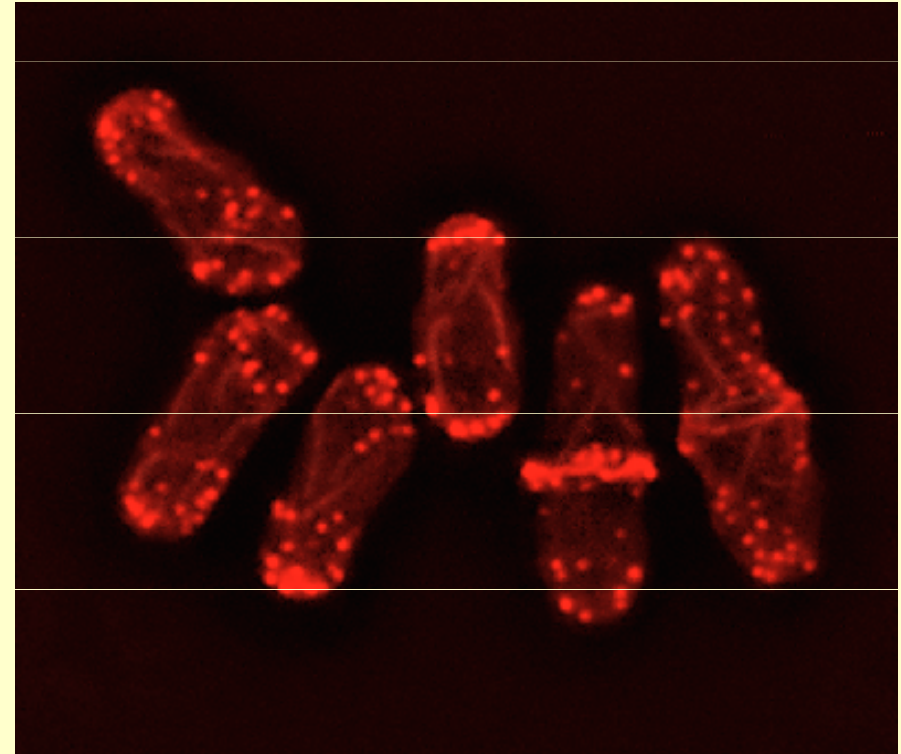
Varianty optických mikroskopů

Varianty optických mikroskopů

# Fluorescenční mikroskop



Viriony v infikované buňce -  
<http://usa.hamamatsu.com/sys-biomedical/slc2400/slc-smpl.htm>



Aktinová vlákna kvasinek zviditelněná fluorescenční mikroskopií – barveno rhodaminem-phalloidinem

[www.paulyoung.com/.../fission\\_yeast\\_actin\\_cytoskeleton.htm](http://www.paulyoung.com/.../fission_yeast_actin_cytoskeleton.htm).

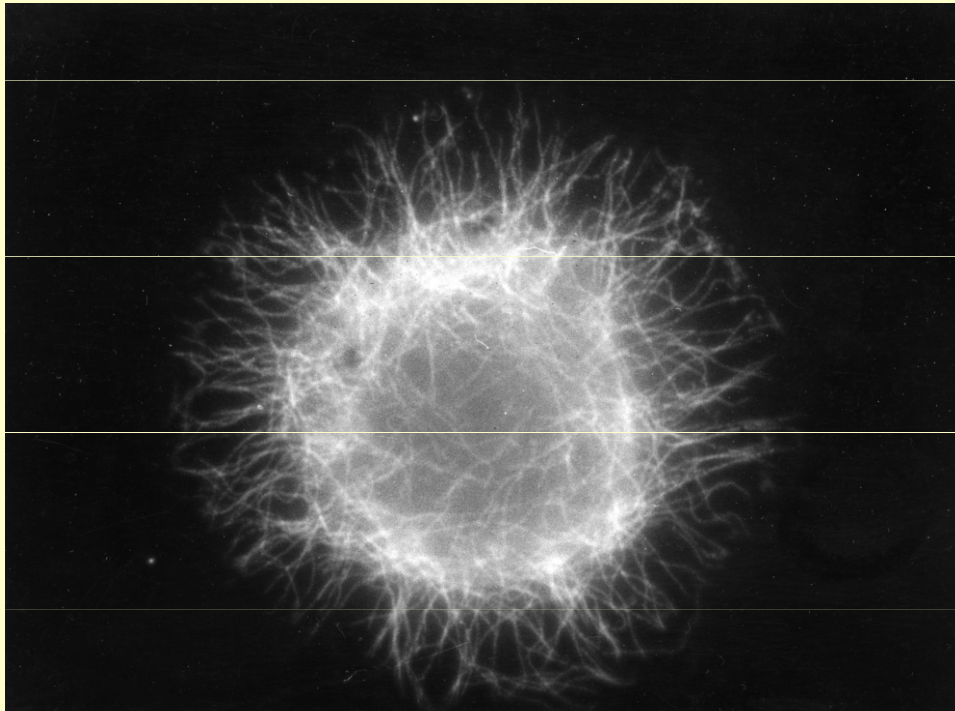


Varianty optických mikroskopů

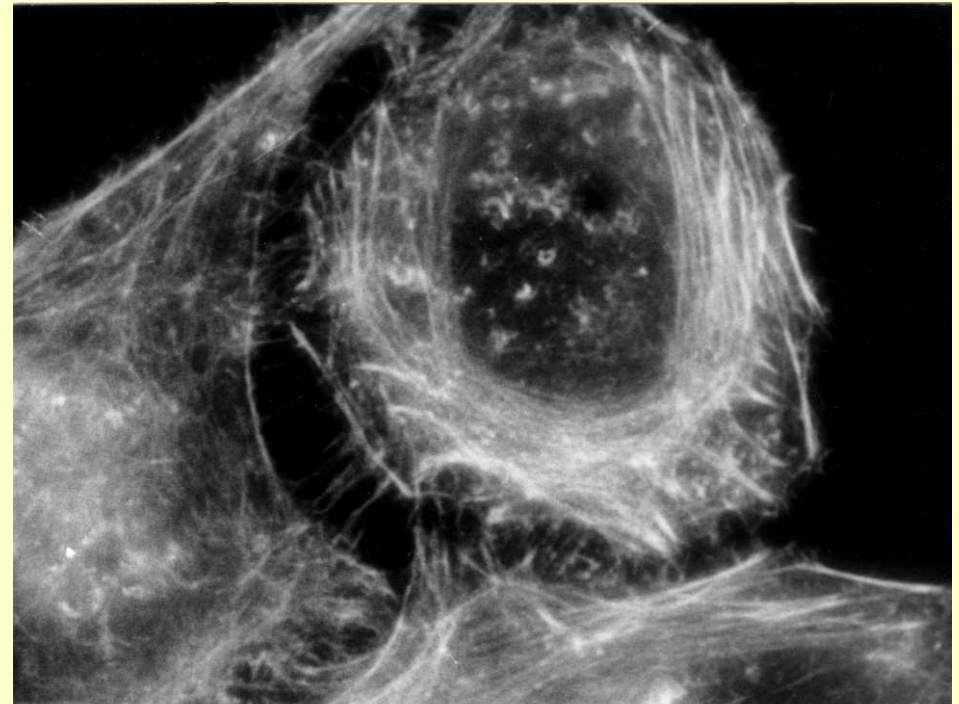
# Fluorescenční mikroskop



Cytoskelet zviditelněný imunofluorescenční metodou



Mikrotubuly HeLa  
buněk



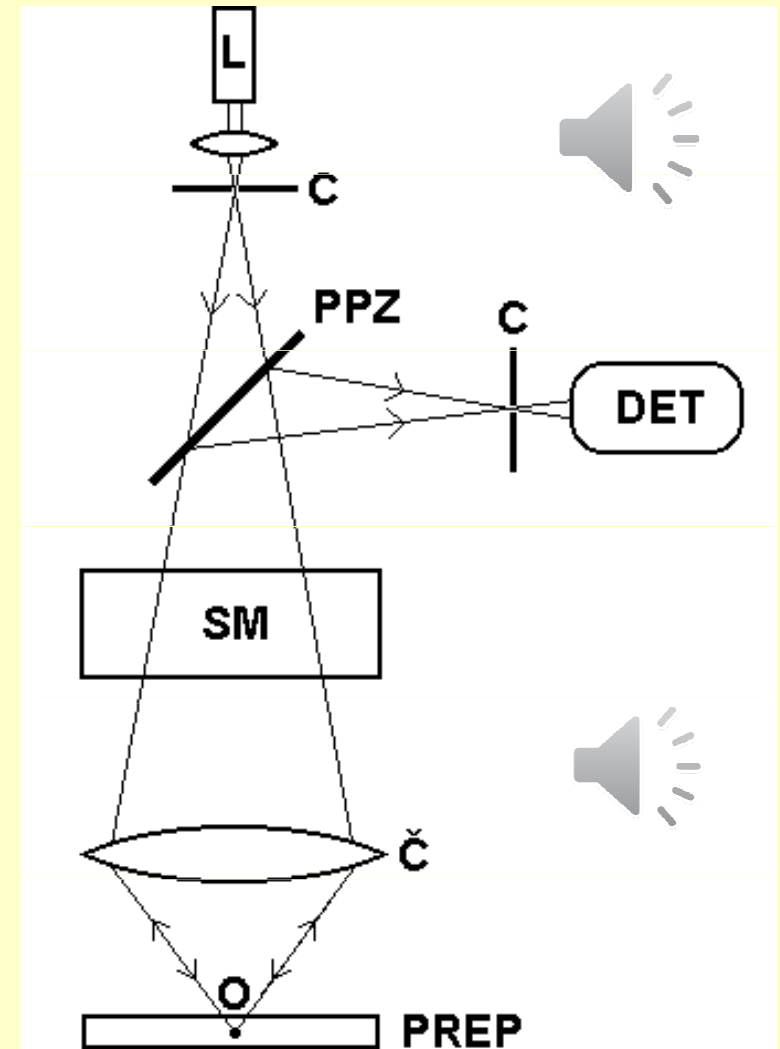
Mikrofilamenta HeLa  
buněk

## Speciální optické mikroskopy

# Konfokální laserový skenovací mikroskop

- L - laser, C – clony s malými kruhovými otvory, PPZ – polopropustné zrcadlo, DET – detektor světla (fotonásobič), SM – skenovací mechanismus, Č – čočka objektivu (projektivu), O – bodový předmět, PREP – preparát (řez).

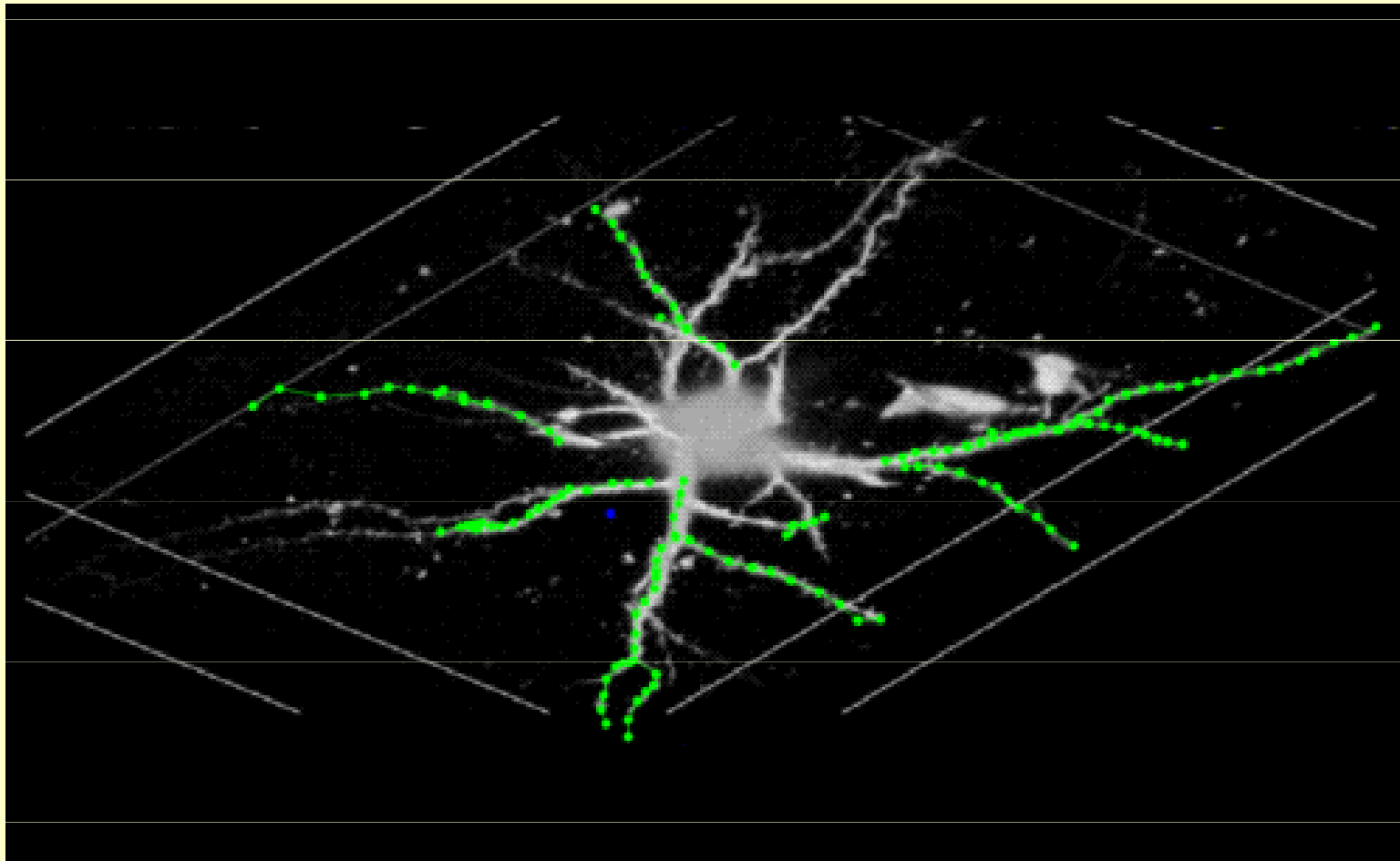
- Pouze paprsky odražené od bodových struktur v ohnisku mohou projít přes clonu C před detektorem. Ostatní paprsky (rozptýlené) jsou zastaveny clonou. Tyto paprsky by u běžného mikroskopu zhoršovaly kvalitu obrazu, protože snižují kontrast. Pomocí tohoto mikroskopu můžeme zkoumat poměrně silné nativní řezy. Skenovací mechanismus je systém rotujících zrcadel, která mohou s ohniskem pohybovat v hustých rovnoběžných liniích.



# Konfokální laserový skenovací mikroskop



V praxi se používá imunozaření pro specifikaci pozorovaných struktur, zvýraznění chromozomů, membránových receptorů.



3D obraz neuronu, fluorescence - <http://www.cs.ubc.ca/nest/magic/neuron.html>

# Konfokální laserový skenovací mikroskop



Live Cell Imaging- sledování růstu buněčných kultur v reálném čase v průtokové komůrce

Sledování přímých účinků chemických nebo fyzikálních faktorů na buněčné kultury.



Souběžné použití absorpčního spektrofotometru jako součásti konfokálního mikroskopu, náhrada běžného laseru za „bílý laser“, tj. laser s plynule laditelnými vlnovými délkami 470-670 nm, určený k spektrofotometrickým analýzám - např. určení koncentrace léčiva ve sledovaném vzorku během kultivace.

# Superrozlišení – prolomení difrakční bariéry

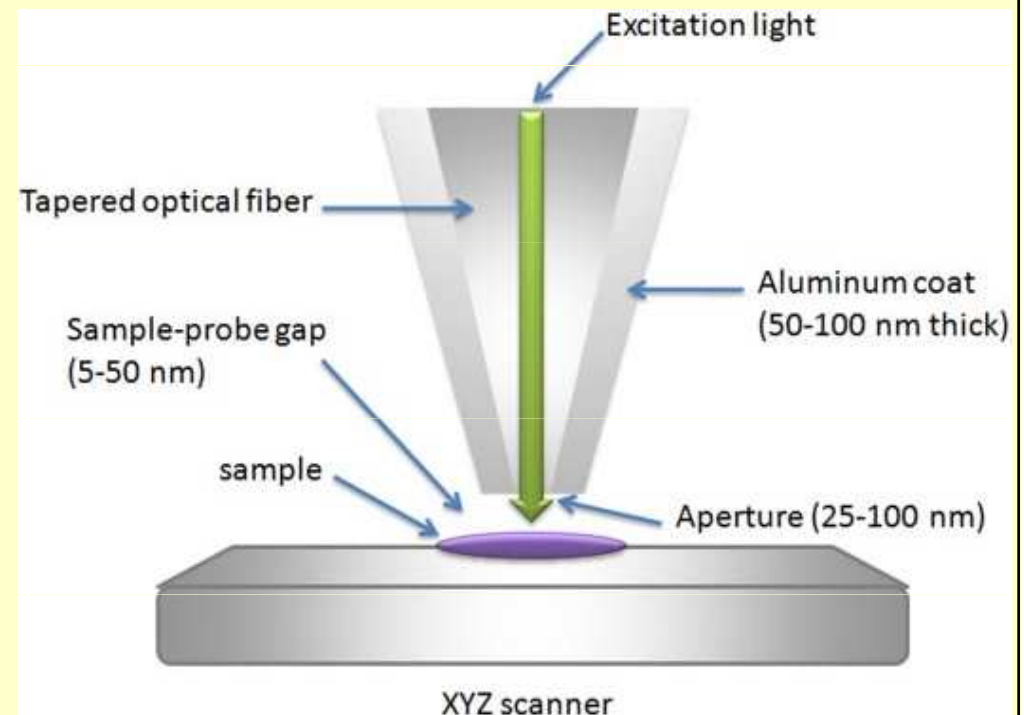
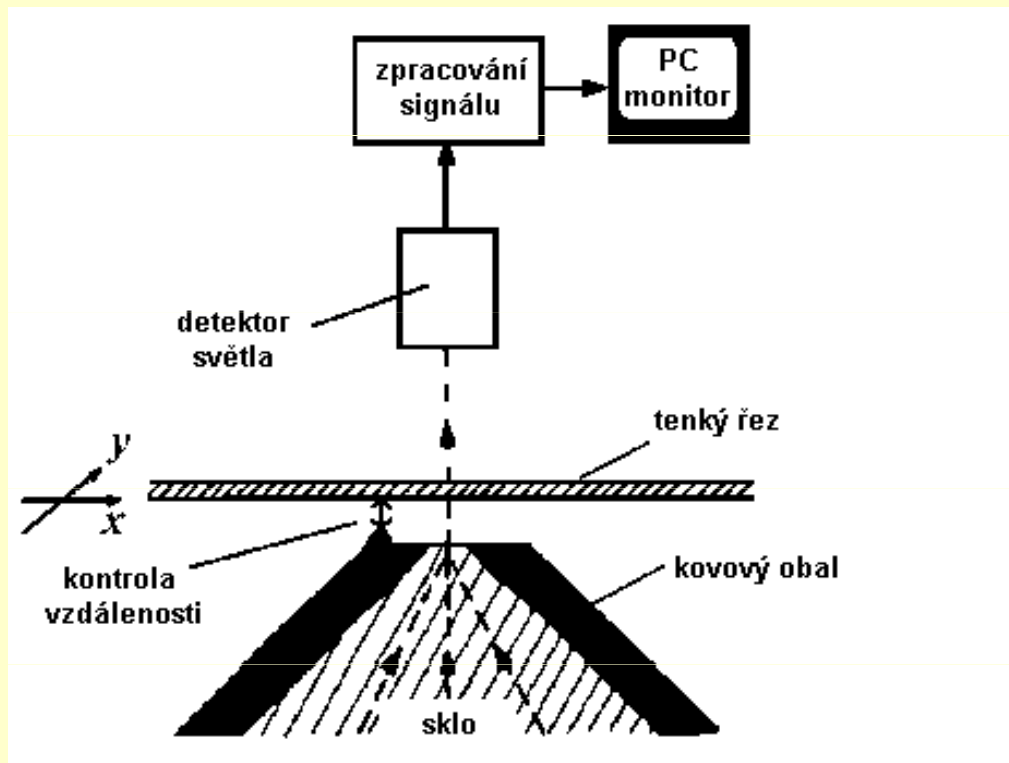
## Skenovací mikroskopie v blízkém optickém poli

(near field optical scanning microscopy - NFOSM)

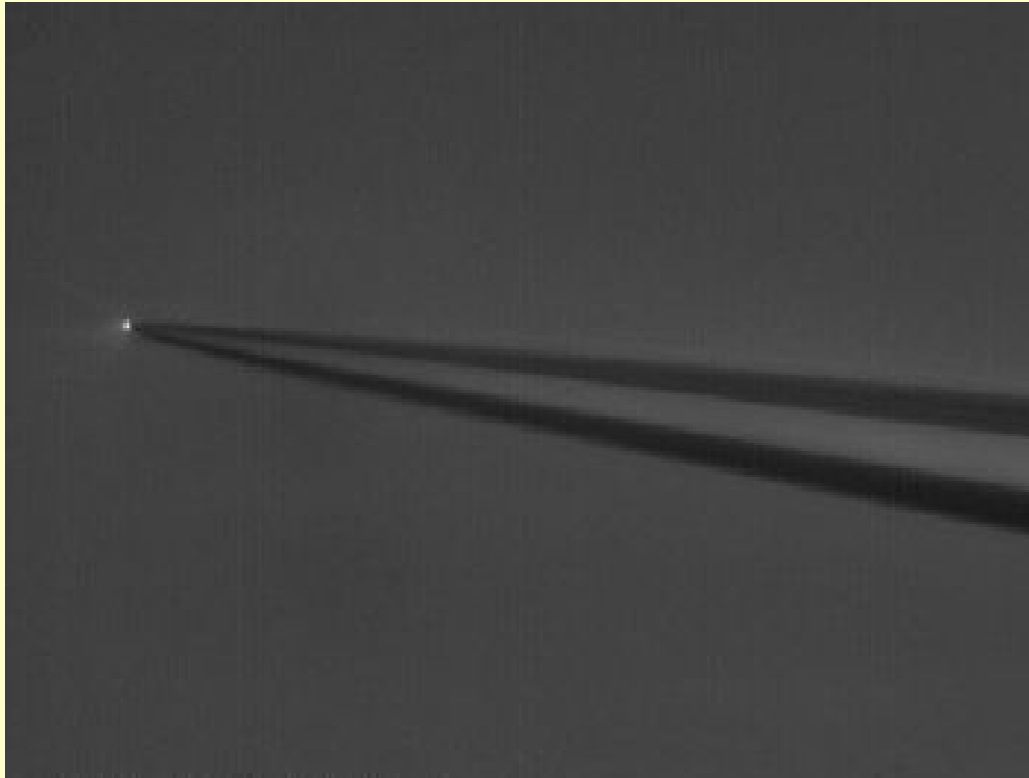
NFOSM = NSOM = SNOM



Schéma mikroskopu pro pozorování v blízkém optickém poli. Úzký svazek světla argonového laseru prochází velmi malým otvorem ( $\varnothing$  řádově desítky nm) v kovem pokrytém (hliník) skleněném hrotu. Tenký řez se pohybuje nad otvorem v konstantní vzdálenosti. Obrázek vlevo dle Rontó a Tarjána (1994). Využívány vlastnosti evanescentní světelné vlny.

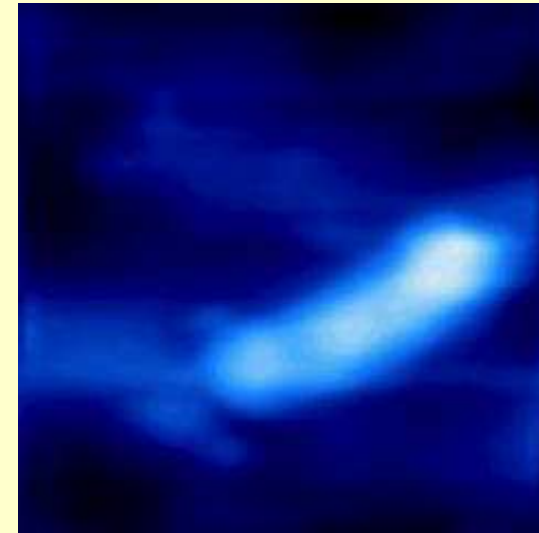


# Superrozlišení – prolomení difrakční bariéry: Skenovací mikroskopie v blízkém optickém poli



Světlo procházející osvětlovacím hrotem přístroje pro skenovací mikroskopii v blízkém optickém poli pozorované v normálním optickém mikroskopu

<http://physics.nist.gov/Divisions/Div844/facilities/nsom/nsom.html>



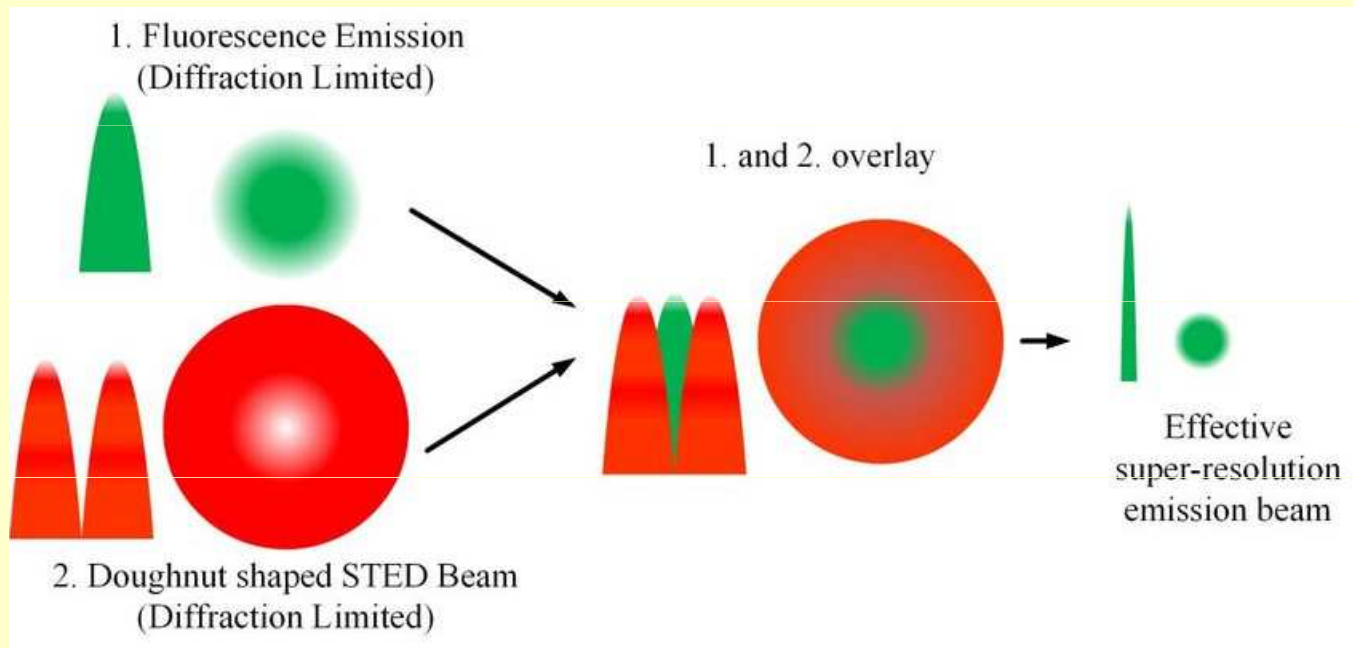
Plasmidová DNA (10 kb)

•[http://www.snom.omicron.de/examples/twinsnom/x-tsnom\\_12.html](http://www.snom.omicron.de/examples/twinsnom/x-tsnom_12.html)



# Superrozlišení – prolomení difrakční bariéry

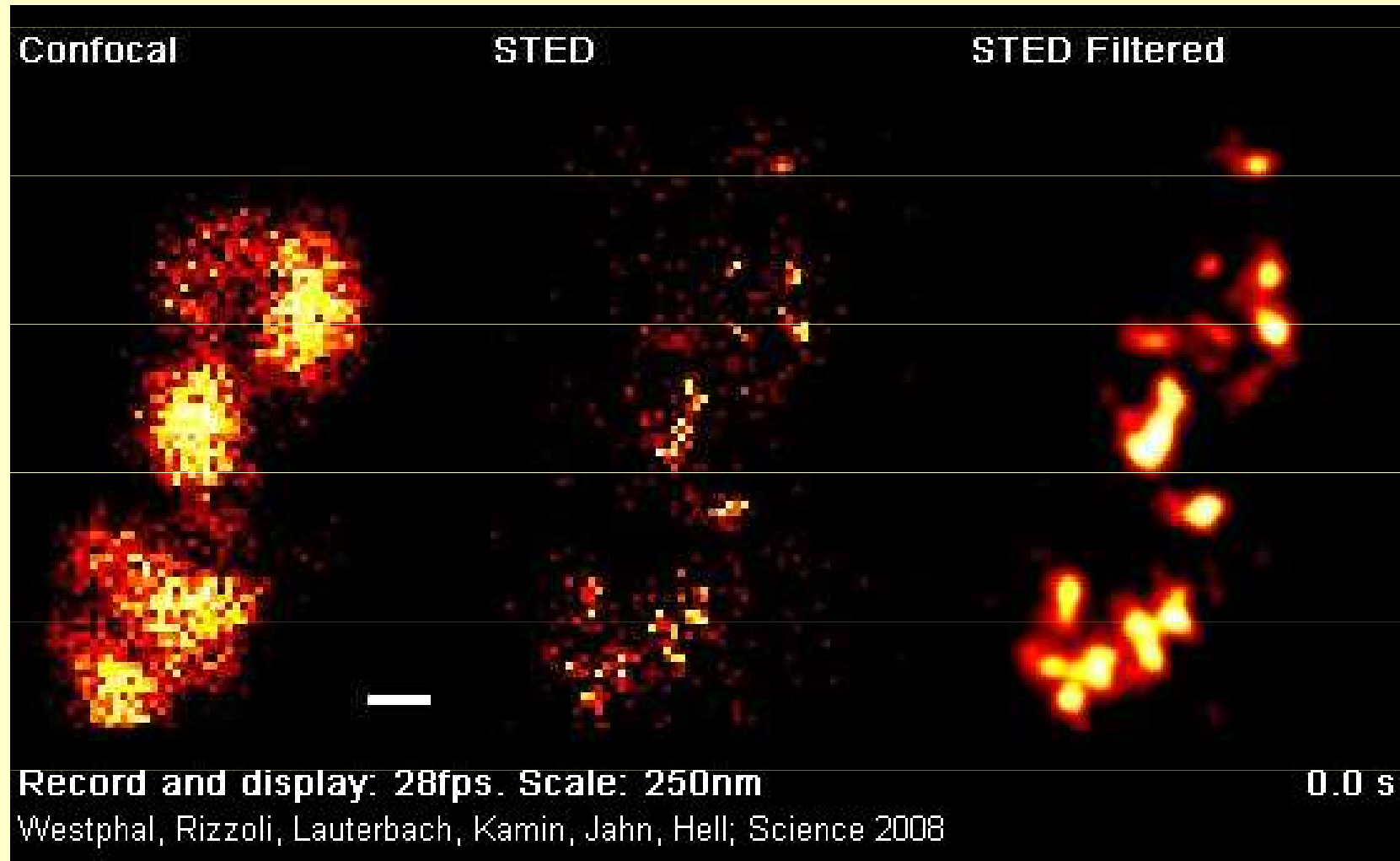
## Stimulated Emission Depletion – STED



**Analogie konfokálního mikroskopu**, která využívá zhášení fluorescence ke zlepšení rozlišovací schopnosti – dochází k překonání tzv. difrakčního limitu.

Mikroskop založený na principu fluorescence v kombinaci s jejím potlačením. Klasický fluorescenční mikroskop je omezen difrakcí. Pokud ale pro vybuzení fluorescence použijeme laser, jehož svazek má tvar mezikruží - uvnitř zastíněný - a má nižší energii (delší vlnovou délku) než světlo, které by vyvolalo fluorescenci, dojde v místě kam svazek dopadá k potlačení fluorescence. Vnitřní oblast mezikruží na vzorku je vystavené laseru s vyšší energií (kratší vlnovou délkou), která fluorescenci vyvolá. Ta je zaznamenávána - skenovacím způsobem. Rozlišení takového mikroskopu je pak dané velikostí vnitřního otvoru "koblíhy" (z anglického "donut"), dnes kolem 50 nm i méně.

# Superrozlišení – prolomení difrakční bariéry Stimulated Emission Depletion – STED



Synaptické vezikuly



# Elektronová mikroskopie



- „Klasické“ elektronové mikroskopy (EM) používají pro zobrazení svazky urychlených elektronů. Elektrony mají vlnovou délku tzv. **de Broglieových hmotnostních vln**. Připomeňme si následující vztahy:

$$\lambda = \frac{h}{m v}$$

$$eU = \frac{1}{2} m v^2$$

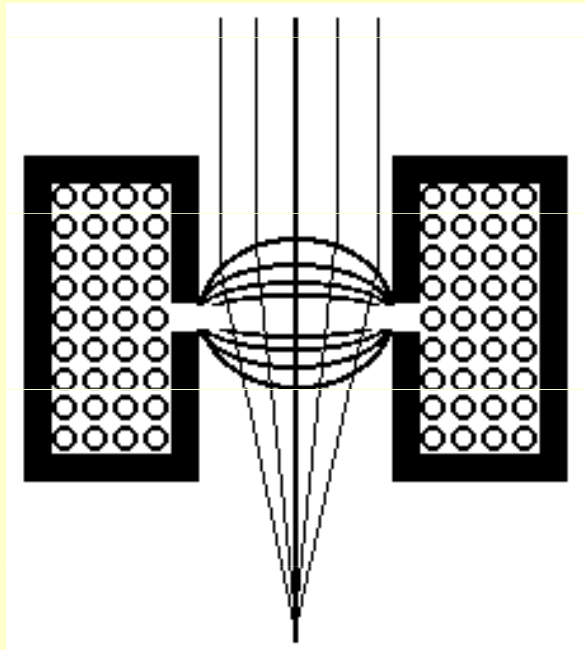


$\lambda$  je vlnová délka,  $h$  Planckova konstanta,  $m$  relativistická hmotnost elektronu,  $v$  jeho rychlost,  $e$  – jeho elektrický náboj a  $U$  je urychlovací napětí. Je-li velikost pozorovaných objektů srovnatelná s  $\lambda$ , dochází k difrakci a vytvoření obrazu je znemožněno. Elektron s energií 1,5 eV má vlnovou délku 1 nm. Pomocí urychlených elektronů dosahujeme zhruba  $10^5$ -krát kratších  $\lambda$ . Viz  $\delta = \lambda/n \sin \alpha$ . Velké optické vady systému však způsobují, že numerická apertura je velmi malá - řádově  $10^{-2}$ . Prostorové rozlišení EM je v praxi na úrovni několika desetin nm.

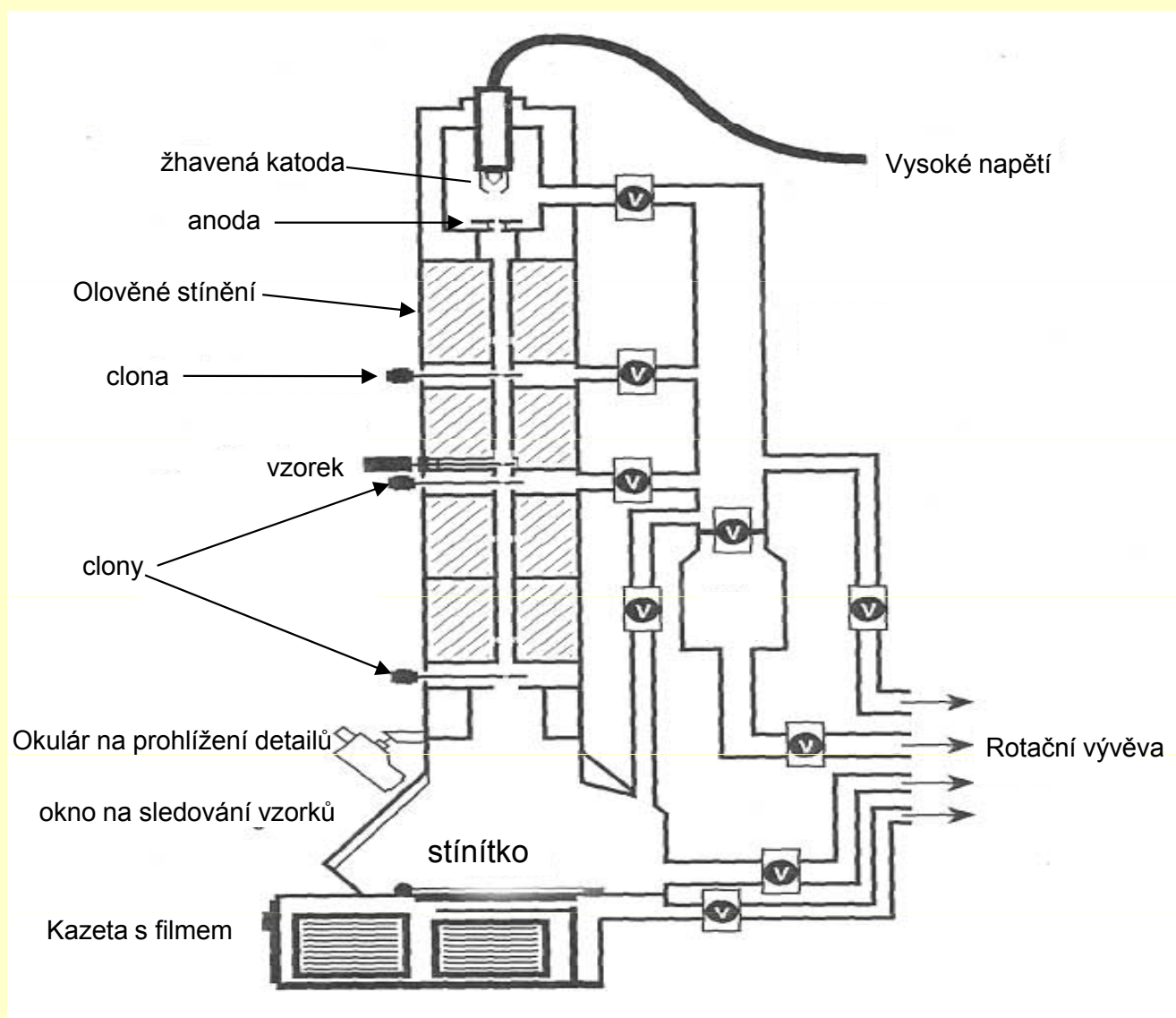
# Elektronová mikroskopie



## Magnetická čočka



Příčný řez cívkou, která je magneticky stíněna pancéřováním. Elektronový svazek je fokusován v místě, kde je pancéřování přerušeno. Magnetická čočka působí na elektrony jako spojka na světlo.



# transmisní elektronový mikroskop (TEM)

[www.mauricewilkinscentre.org/bioviz/](http://www.mauricewilkinscentre.org/bioviz/)

# Transmisní elektronový mikroskop



## Brookhaven TEM

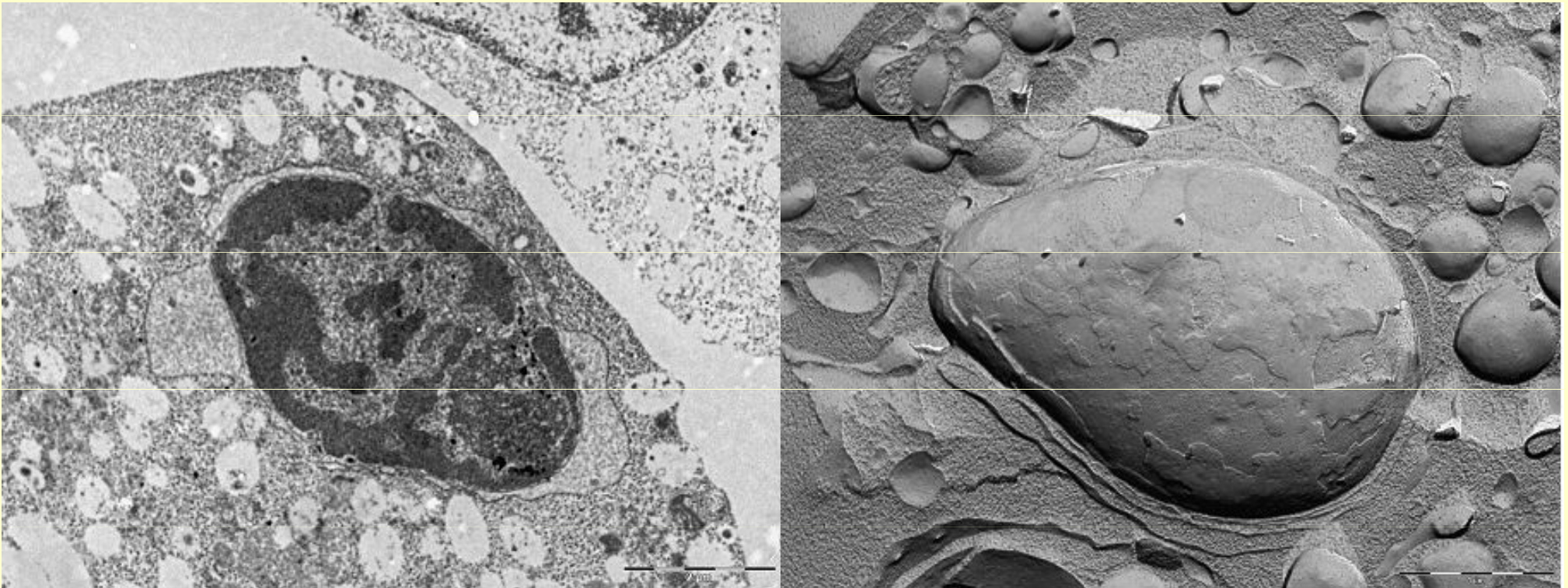
Zvětšení 50 000 000x, rozlišení 0,1 nm,

Lze provádět simultánně chemickou analýzu vzorku pomocí rentgenové spektrometrie (pouze některé prvky)





# Rozdíl mezi řezem a replikou

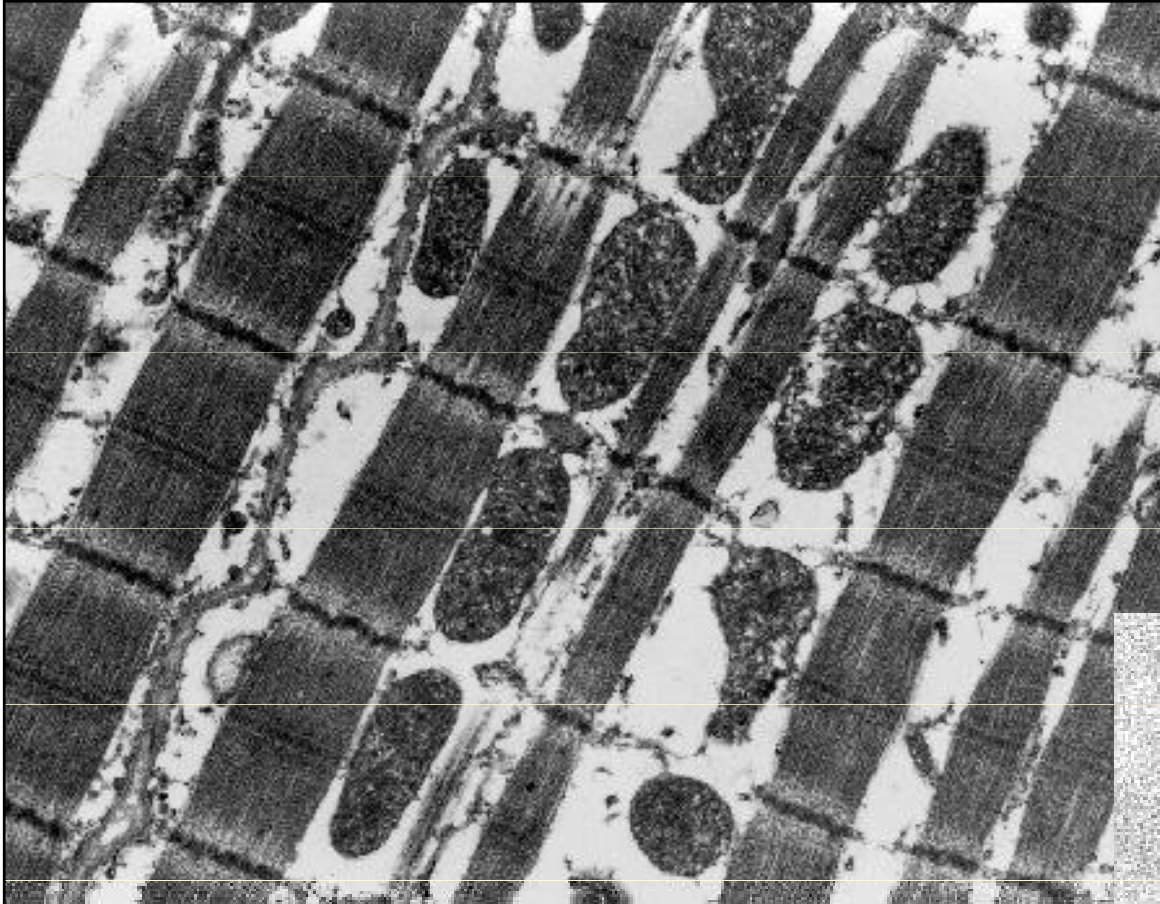


Buňky HL-60, fragment jádra, morfologické změny v průběhu apoptózy.  
Levý snímek- ultratenký řez, kontrastování  $\text{OsO}_4$ .  
Pravý snímek- replika lomu, napařená vrstva Pt a C.  
Snímky z TEM MORGAGNI 268 D (Philips), snímané na CCD kameru.

# Transmisní elektronový mikroskop

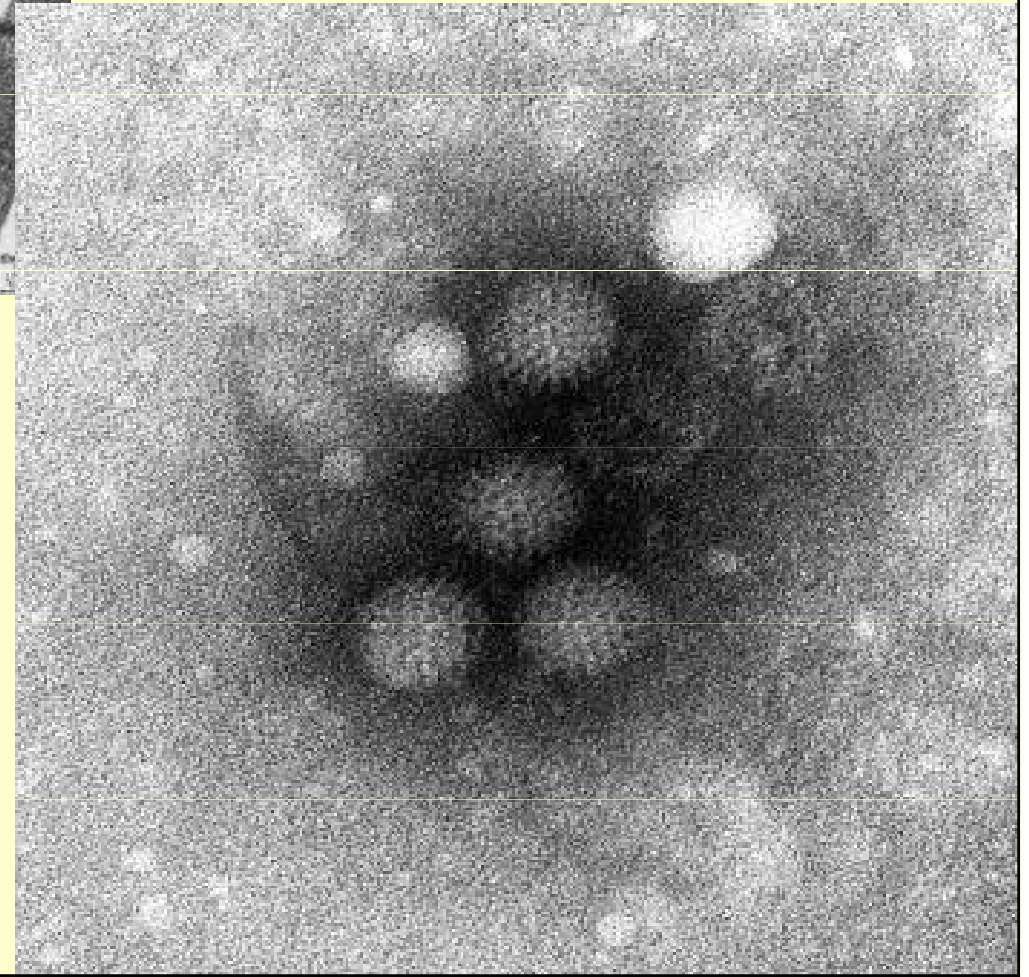


<http://www.ualberta.ca/~mingchen/tem.htm>



Buňky břišního svalu ↑

Corona virus, negativní  
barvení →



Transmisní elektronový mikroskop

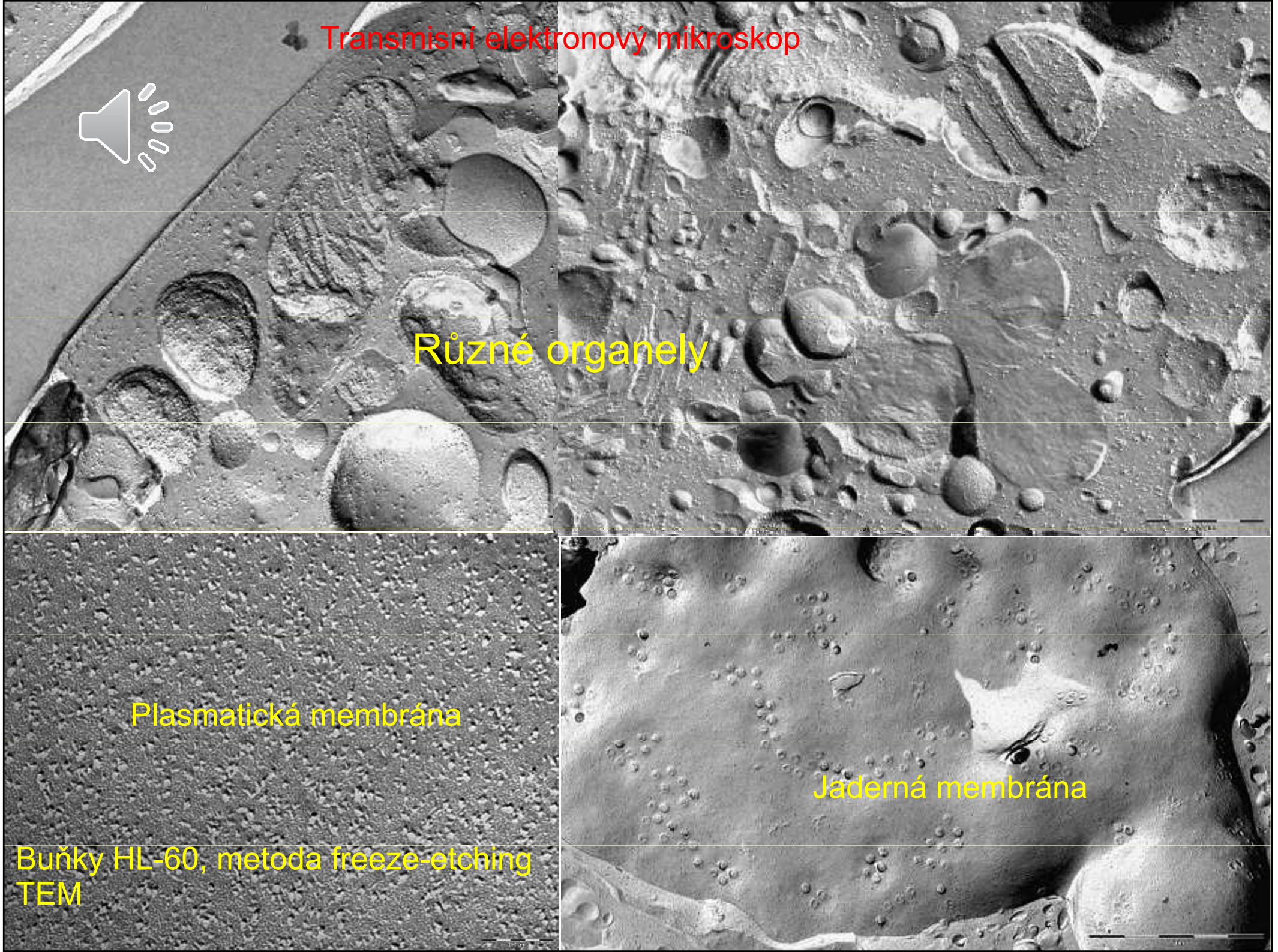


Různé organely

Plasmatická membrána

Jaderná membrána

Buňky HL-60, metoda freeze-etching  
TEM



# Skenovací elektronová mikroskopie





# Skenovací elektronová mikroskopie - SEM

Podobně jako u metody TEM, jsou i pro SEM vzorky připravovány velmi složitým způsobem – zde musí být pokryty tenkou kovovou vrstvou pro zajištění vodivosti povrchu.



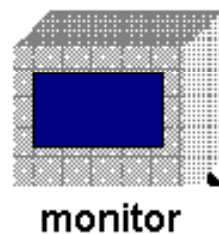
Podle:  
<http://www.rpi.edu/dept/materials/COURSES/NANO/shaw/BigSEM.gif>

elektronový svazek je tvořen elektronovým dělem, podobným jako v osciloskopu

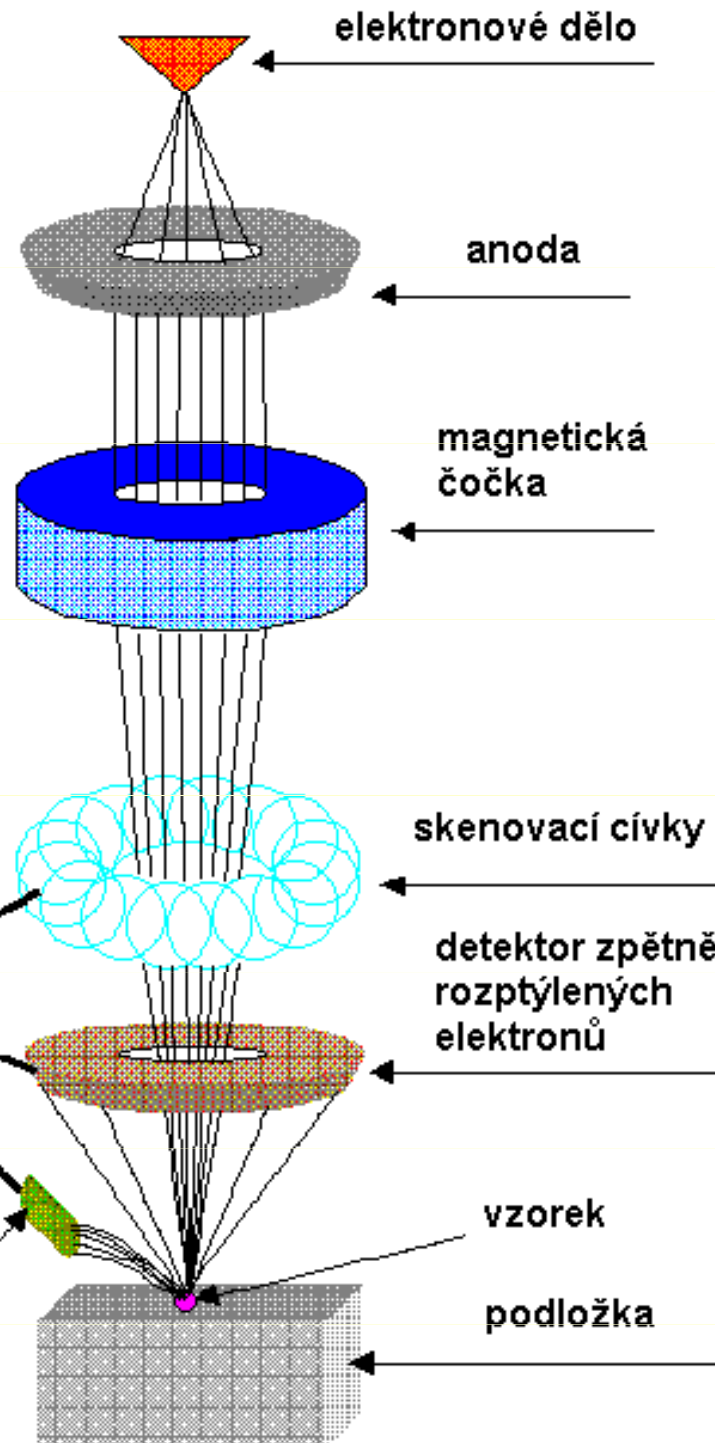
elektrony jsou pak urychlovány anodou a fokusovány magnetickou čočkou

skenovací cívky nutí elektronový paprsek k rychlému přebíhání po povrchu vzorku

vzorek pozorujeme v módu snímání zpětně rozptýlených nebo sekundárních elektronů



detektor sekundárních elektronů



## Skenovací elektronová mikroskopie



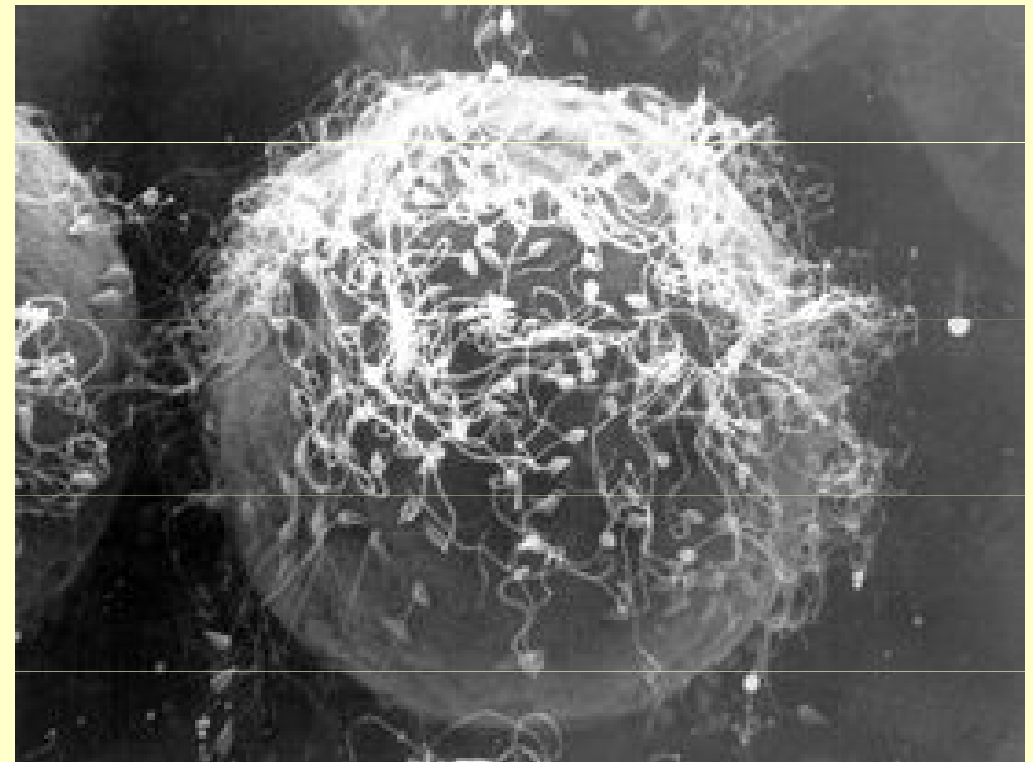
- Detail nohy mravence v SEM

<http://www.wtn.org/ss/story.phtml?storyId=33&type=EdOutreach>



- Vajíčka ježovky obklopená spermiemi, SEM 3000x zvětšeno

<http://www.stanford.edu/dept/news/report/news/august9/sperm-89.html>



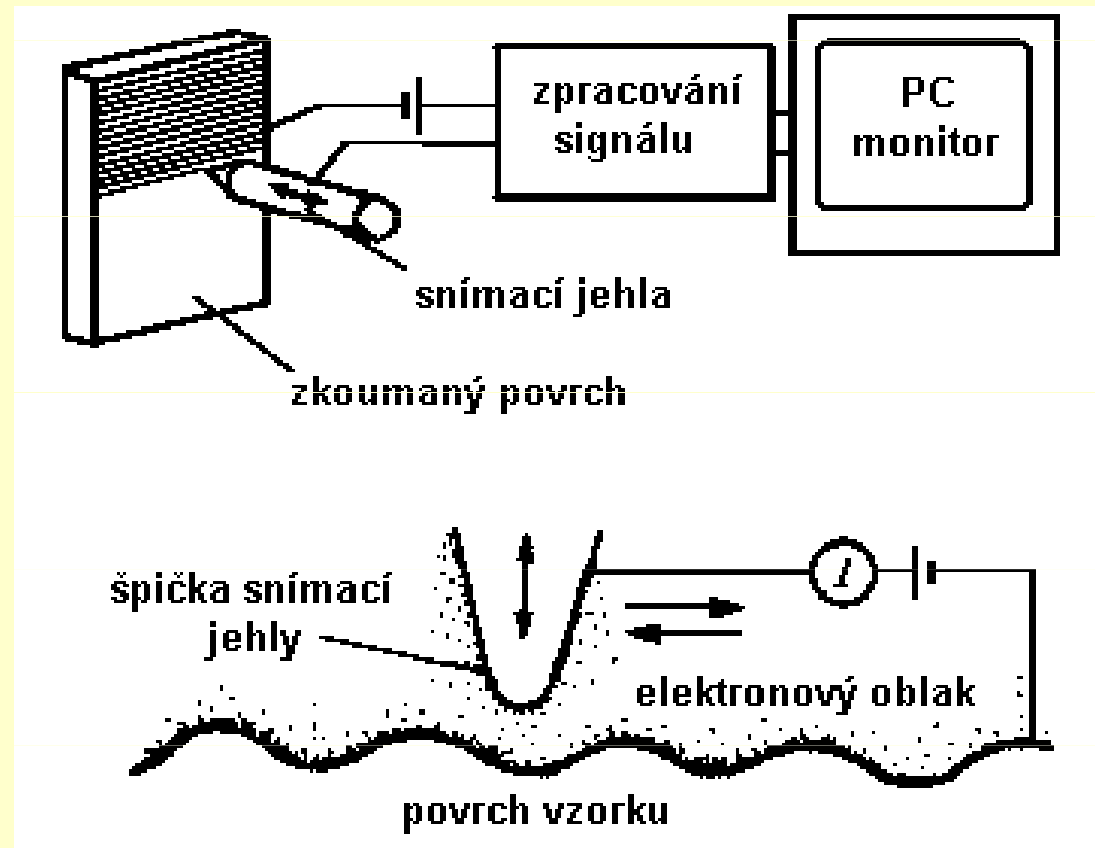
Mikroskopie skenující sondou

# Skenovací tunelový mikroskop (STM)



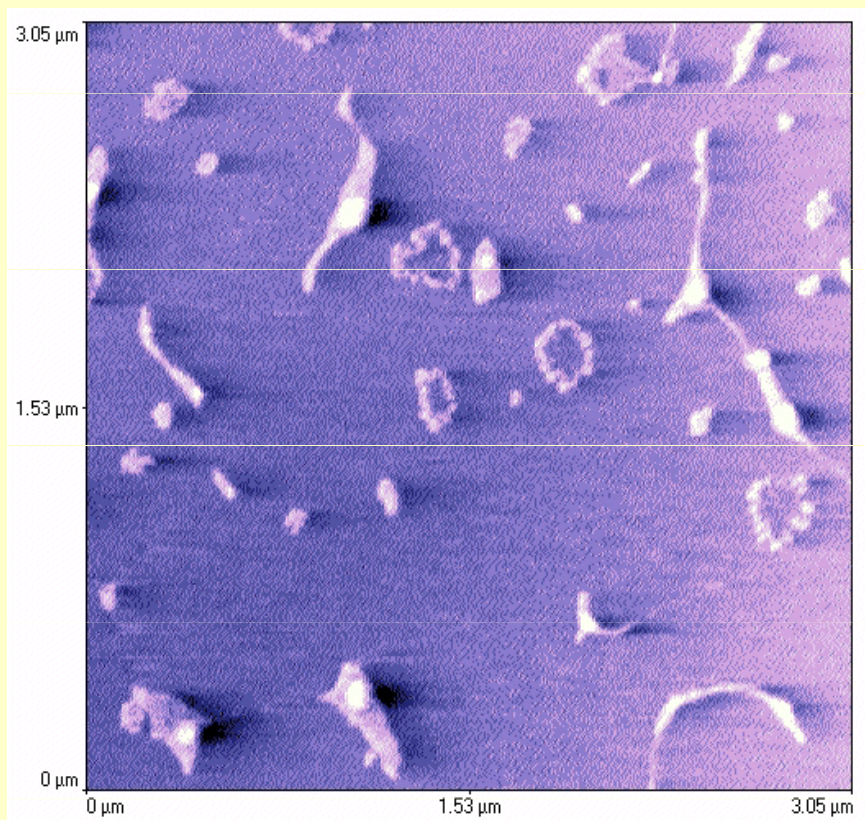
Schéma skenovacího tunelového elektronového mikroskopu (STM). Dole detail kovové detekční jehly. Kladně nabitá jehla kopíruje povrch vzorku.

Podle Rontó a Tarjána (1994).



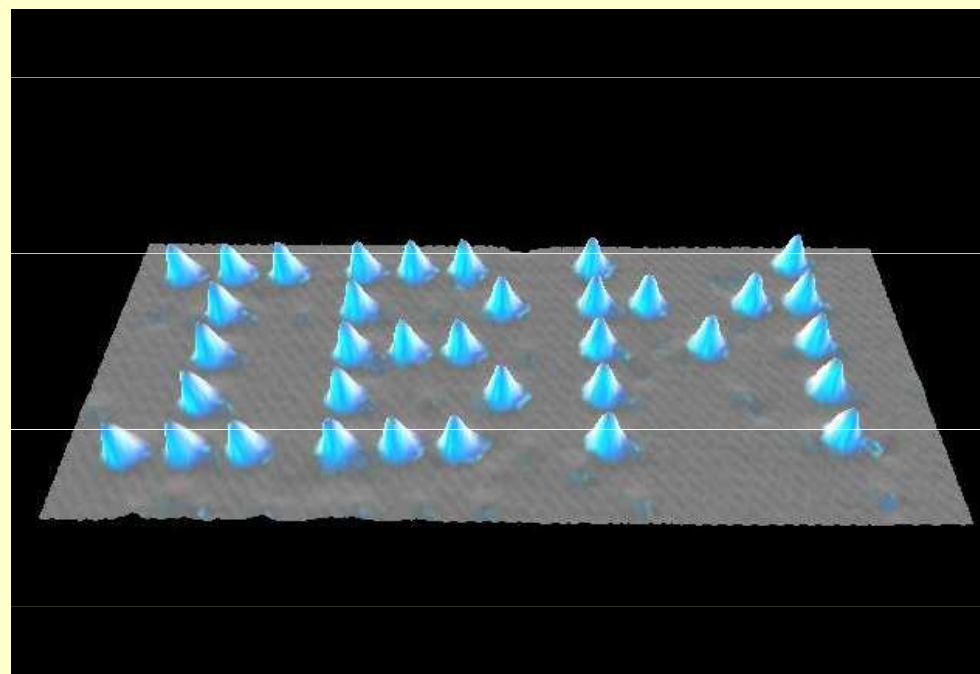


# Skenovací tunelový mikroskop



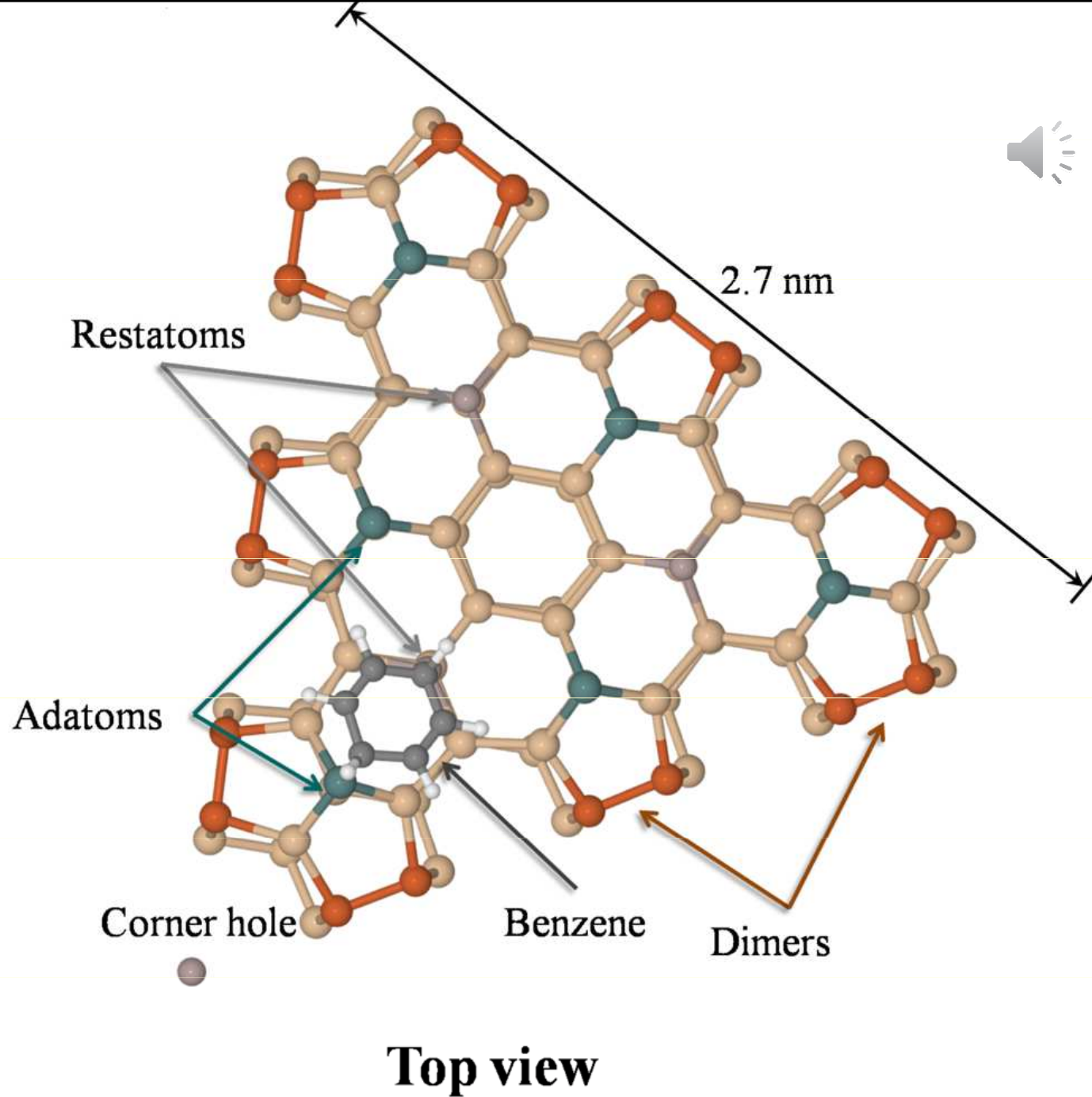
Rozštěpené a nenarušené kruhy  
plazmidové DNA

• <http://www.sci.port.ac.uk/spm/overfig5.htm>



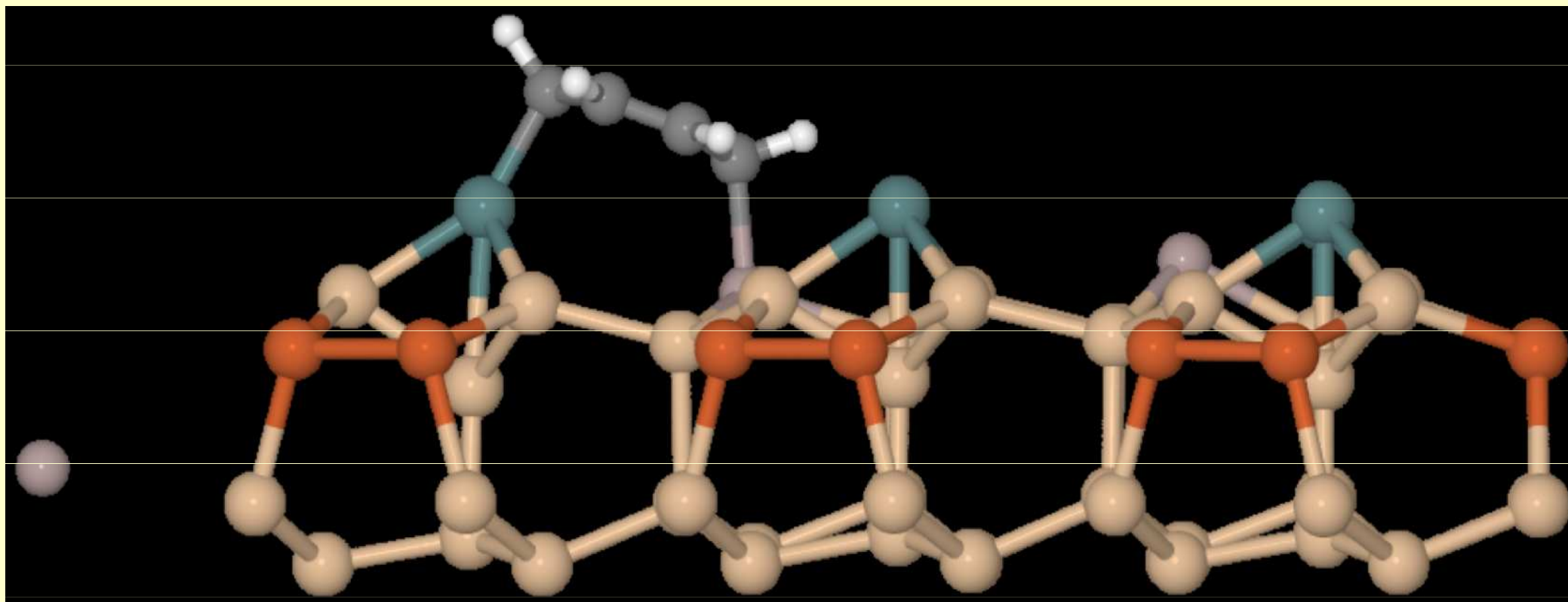
Nápis IBM vytvořený z atomů  
xenonu na niklové podložce

<http://www.almaden.ibm.com/vis/stm/images/stm10.jpg>

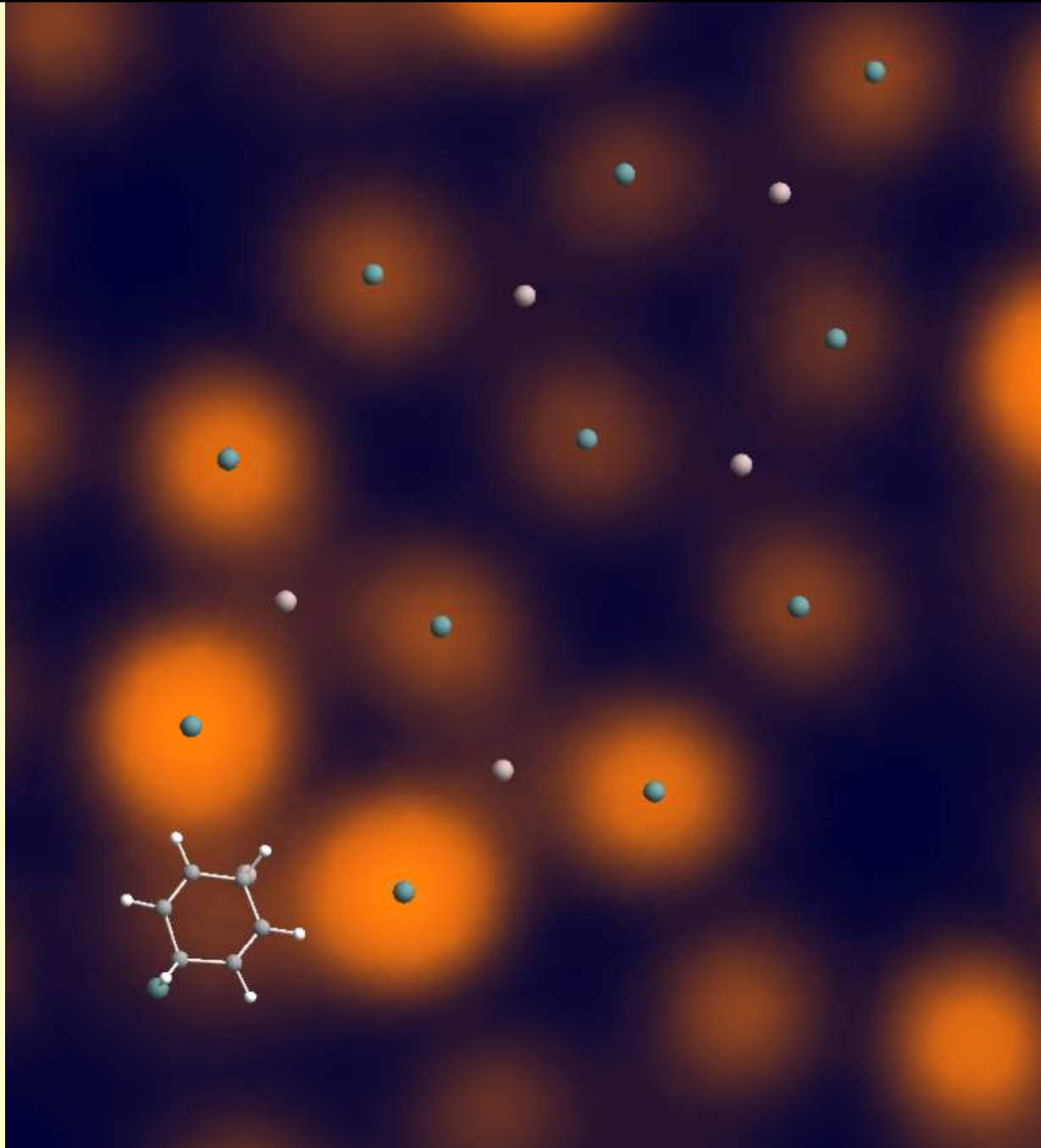


STM – Simulace povrchu křemíku s navázaným benzenem. Tato struktura bude následně porovnána se strukturou zjištěnou experimentálně.

# Skenovací tunelový mikroskop



Moderní mikroskopy STM (a AFM) umožňují ověřování struktury složitých molekul či krystalů, což má zásadní význam pro vývoj počítačových komponent (paměti a procesory na úrovni nanotechnologií). Je zde vidět, že "adatoms" leží jakoby nad rovinnou plochou krystalu, "restatoms" jsou níže - dáno trojrozměrným tvarem krystalů. Interakce benzenu, vzhledem k jeho velikosti, s jedním Ad a jedním restatomem. Proto "neleží rovně" na povrchu. Jde o projev van der Waalsových sil.



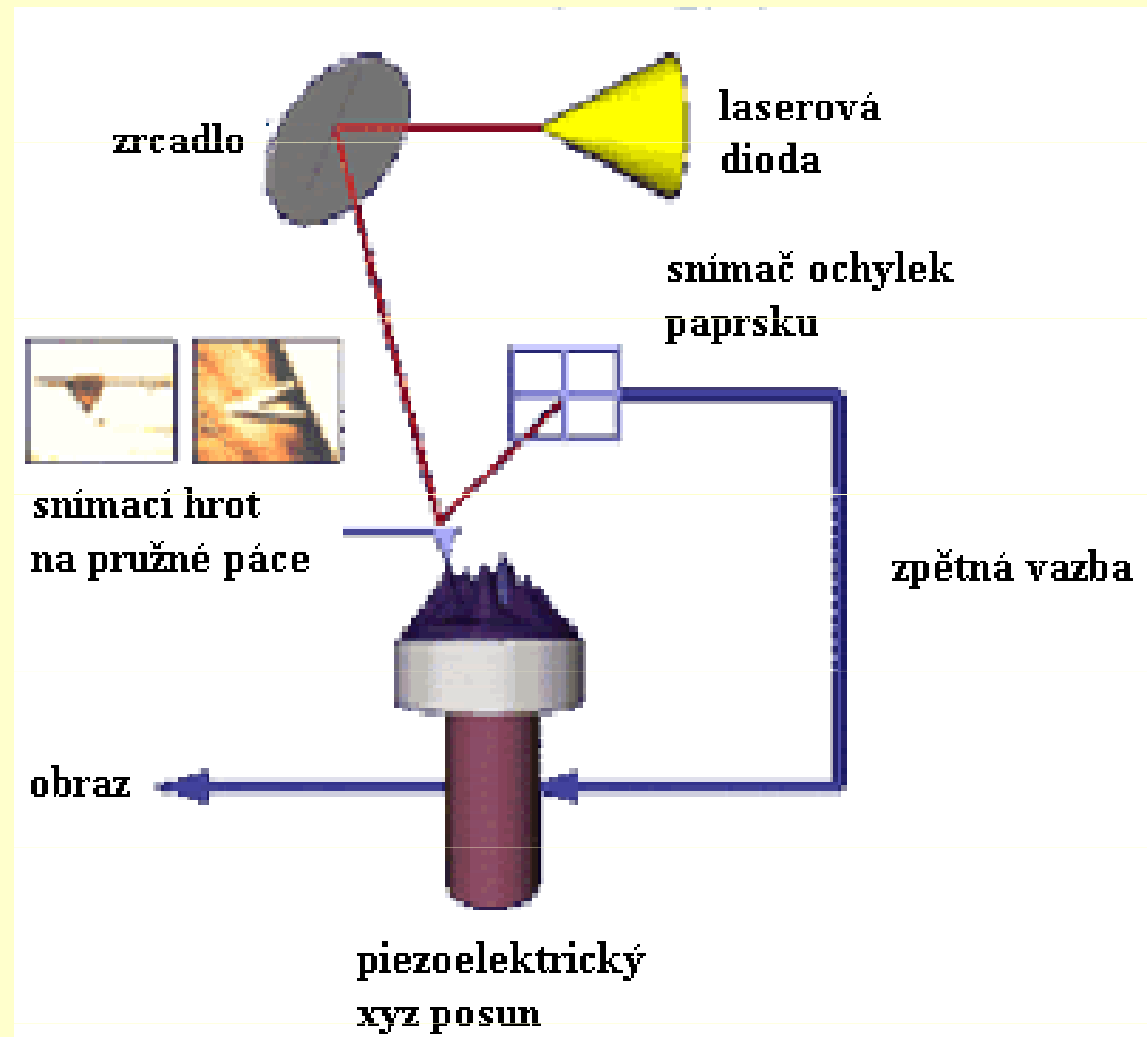
- STM - Experimentální data s naznačenou polohou atomů křemíku a molekuly benzenu

# Mikroskopie atomárních sil



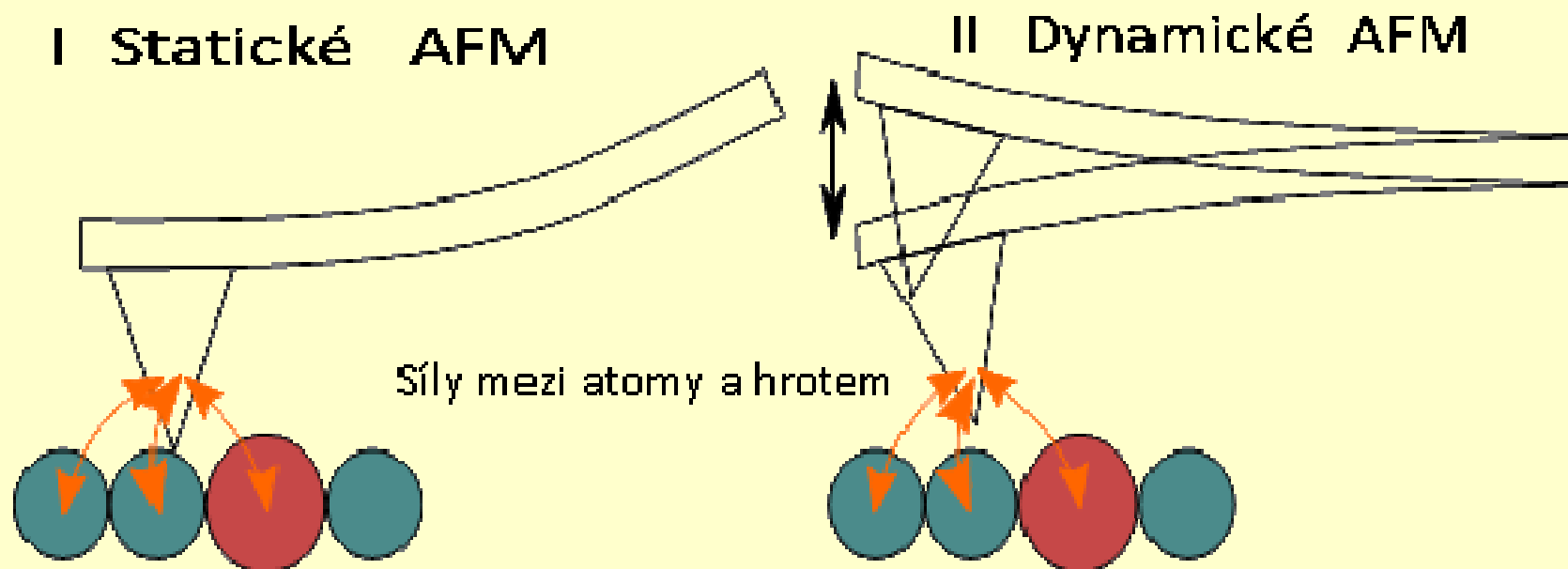
AFM – Atomic force microscopy – hrot sleduje profil povrchu vzorku.

•<http://physchem.ox.ac.uk/~rgc/research/afm/afm1.htm>



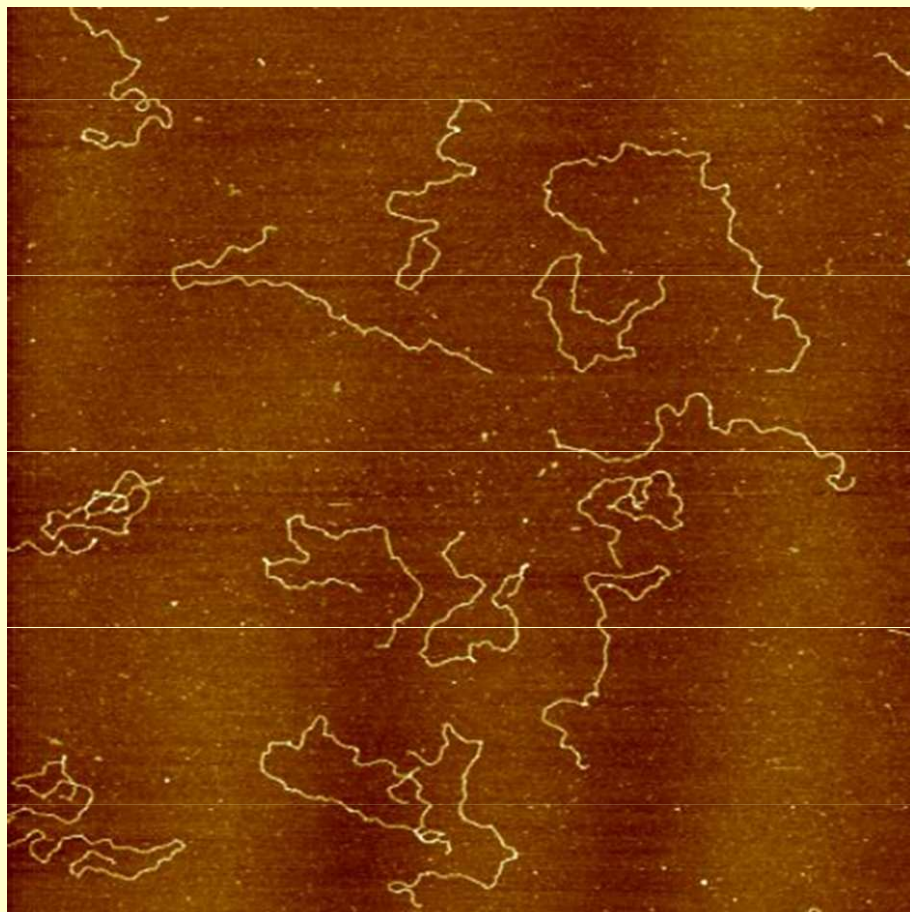


# Mikroskopie atomárních sil



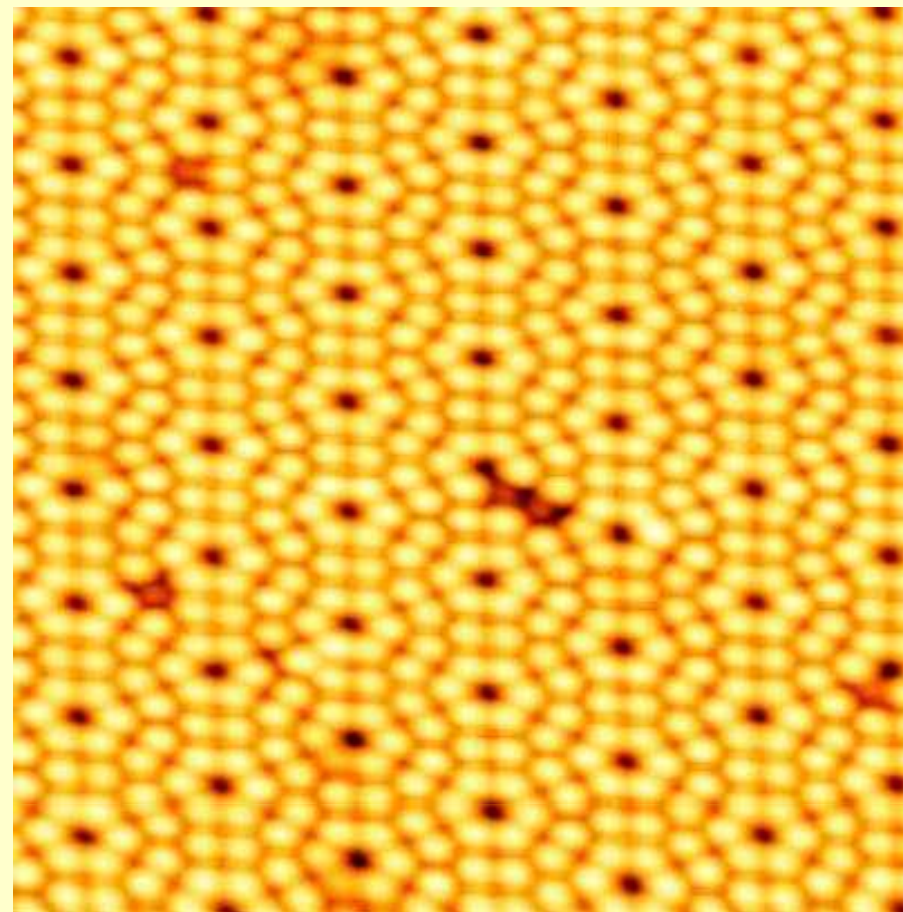
Dle O. Krejčího

# Mikroskopie atomárních sil



DNA – linearizovaná plasmidová

• [http://www.snom.omicron.de/examples/twinsnom/x-tsnom\\_12.html](http://www.snom.omicron.de/examples/twinsnom/x-tsnom_12.html)



Povrch křemíku – atomární rozlišení  
včetně molekul benzenu

Dle O. Krejčího

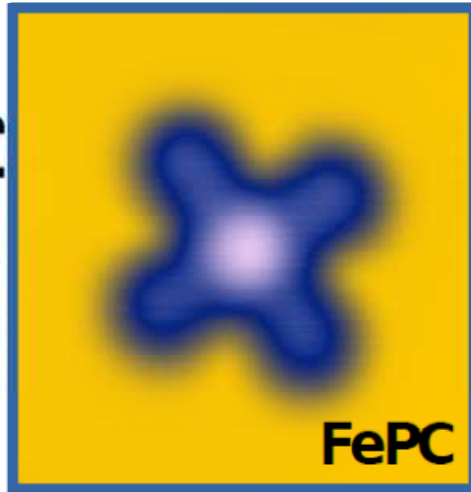


# 4K Ultra-high-vacuum microscope

## Iron Phtalocyanine on Gold (111) surface

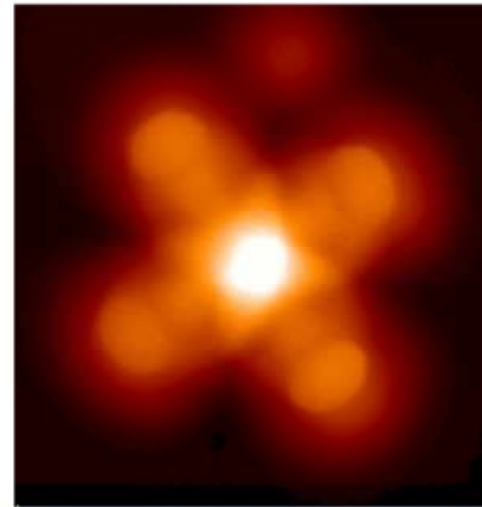
Scanning Tunnelling  
Microscopy

FePC metallic tip

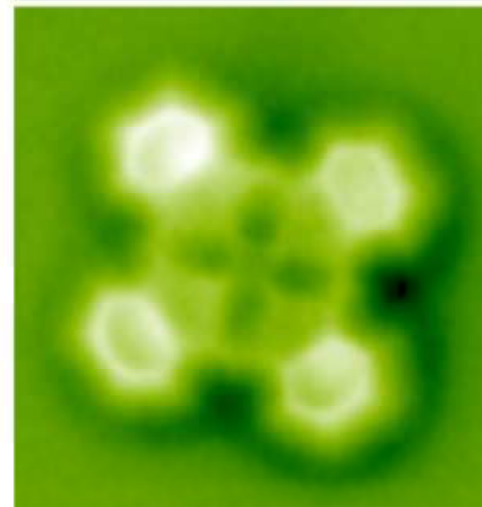


Possible,  
but not-recorded

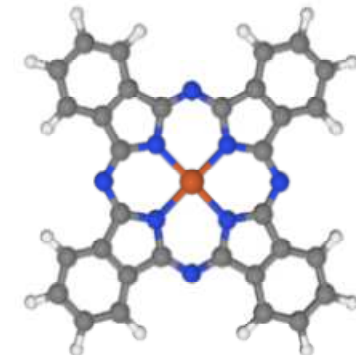
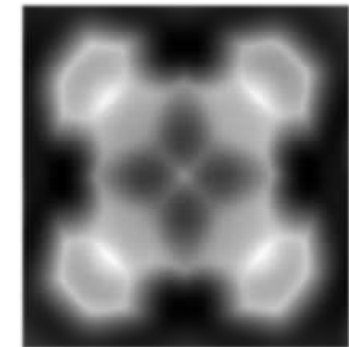
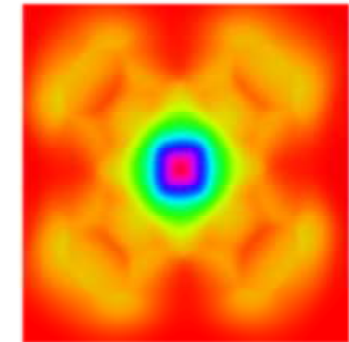
FePC CO-tip (flexible)



frequency modulation  
non-contact  
Atomic Force Microscopy



Theoretical  
simulations  
CO-tip

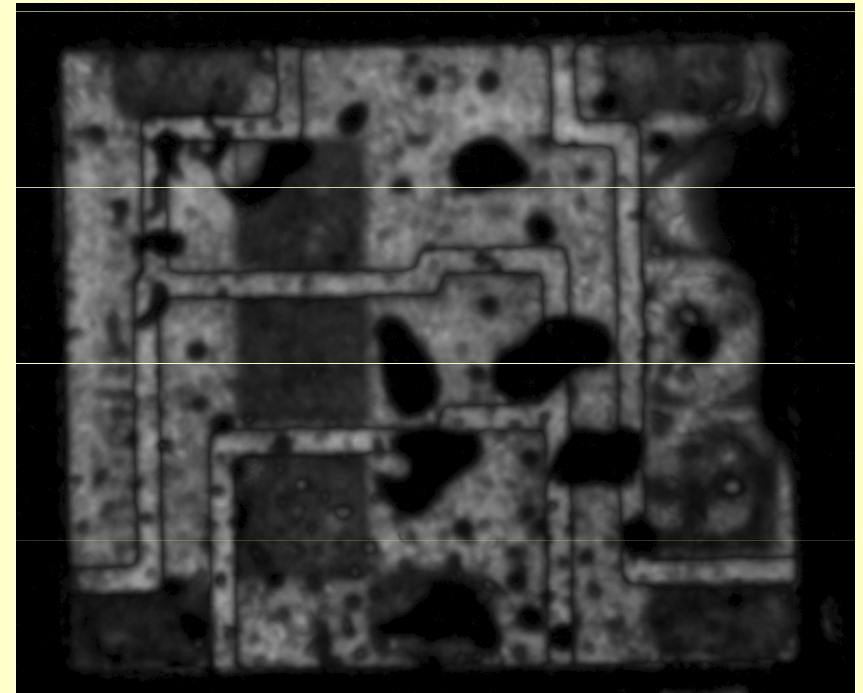
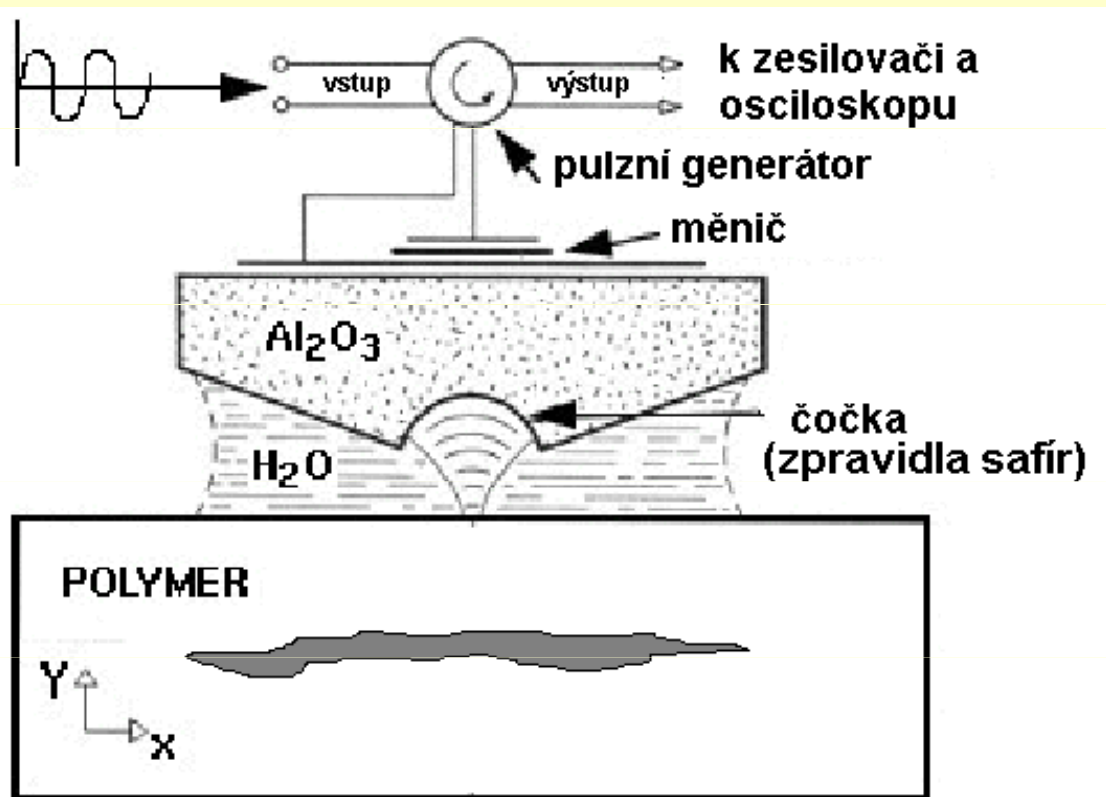


de la Torre et al. PRL 119,  
166001 (2017)

# Mikroskopy založené na jiných fyzikálních principech

## Akustická mikroskopie

Odrazová varianta



• podle:  
[http://www.sv.vt.edu/comp\\_sim/sam/full.gif](http://www.sv.vt.edu/comp_sim/sam/full.gif)

- Akustický sken čipu s vnitřním poškozením
- <http://www.predictiveimage.fr/en/applications/78/analyse-de-defaillance-pont-de-diodes-defectueux-microscopie-acoustique/>

Autoři:  
**Vojtěch Mornstein**  
**Daniel Vlček**  
**Naděžda Vašková**

Poslední revize a ozvučení: duben 2020