

rozlišovací schopnosti jednotlivých médií:

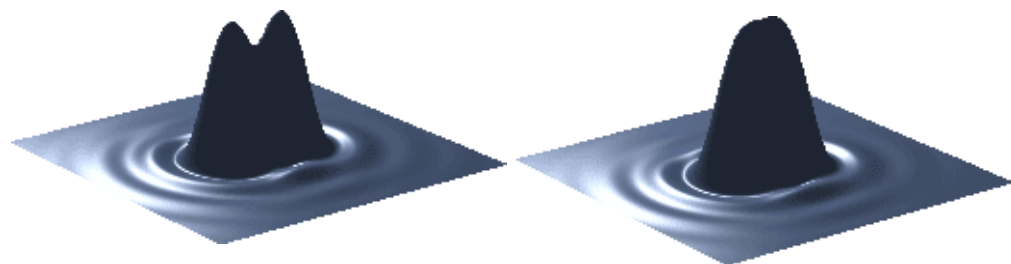
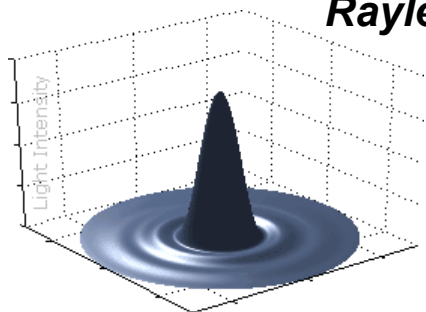
oko (1 úhlová minuta), negativ (100 čar/mm), CCD (velikost pixelu)

difrakce na kruhovém otvoru o poloměru R:

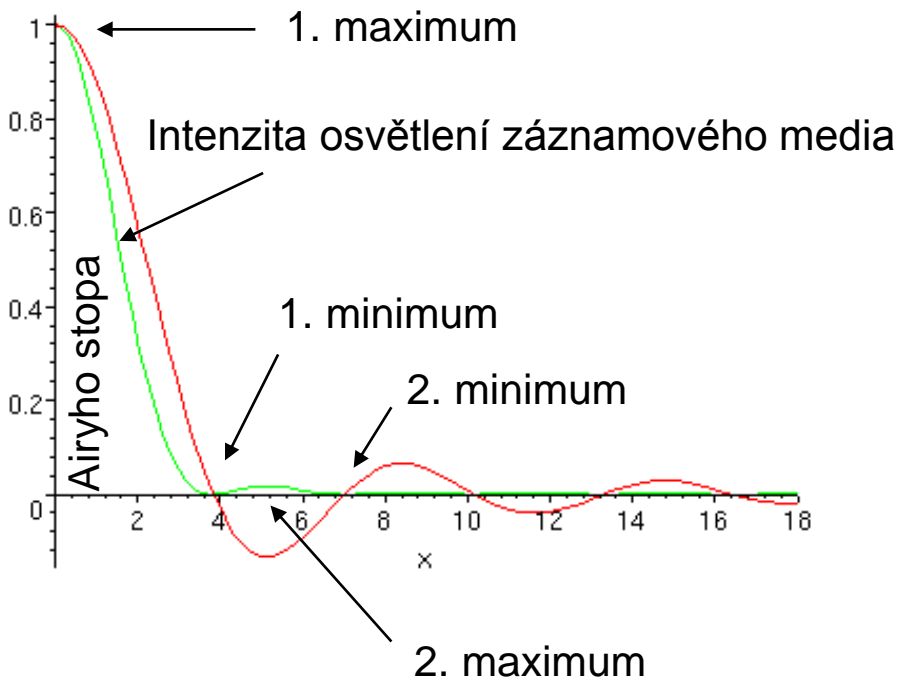
první maximum obsahuje cca 80% energie prošlého světla

Rayleighovo kritérium rozlišení:

dva body zdroje považujeme za rozlišitelné, pokud vzdálenost jejich obrazů je větší, než poloměr Airyho stopy.



$$I \approx f^2(kR\rho/r_0)$$



polohy minim intezity na stínítku:
3.83, 7.02, 10.17, 13.32, 16.47...

Přepočteno na úhlovou vzdálenost objektů: $\xi_k = \frac{144''}{D[\text{mm}]}$

Stejné úvahy se aplikují při zachytávání dynamických dějů:
pohyb částic nemá způsobit **pohybovou neostrost** (proudění krve atd)

osvětlovací soustavy mikroskopů

žárovky: wolframové vlákno,

halogenové žárovky (wolframové vlákno + kapka jodu v baňce)

výbojky: nezanedbatelná emise v UV oblasti:

intenzivní zdroj + dobře budí fluorescenci

filtry: barevné (monochromatické)

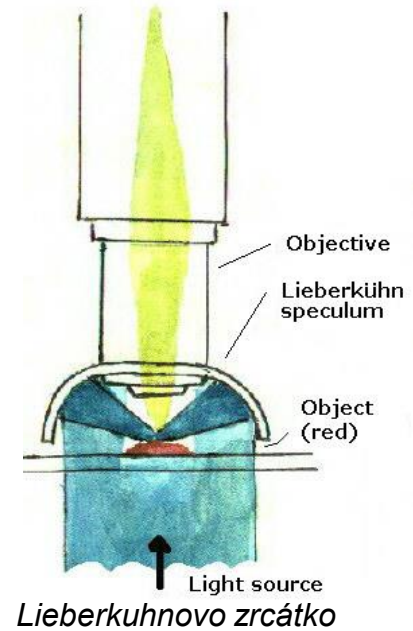
šedé ND (regulují intenzitu světla) – může být provedeno též nezávisle elektricky ve zdroji světla

kondenzor

úlohy: homogenizovat světlo, popříp. vyrobit rovinnou vlnoplochu,

zvýšit numerickou aperturu objektivu (a tím rozlišení mikroskopu)

umožnit pozorování metodou, vhodnou pro daný vzorek



Lieberkuhnovo zrcátko

Abbe Condenser Optical Pathway

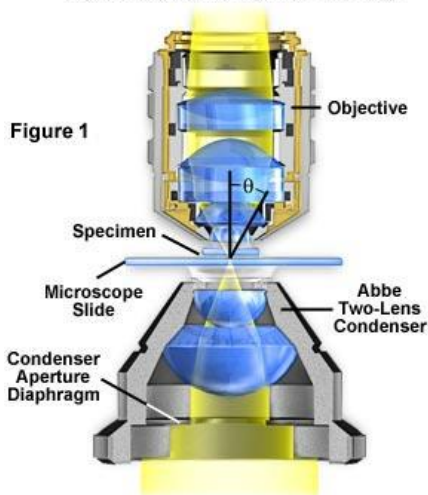


Figure 1

$$d_{\min} = \frac{\lambda_0}{A_0 + A_C} = C \frac{\lambda_0}{A_0} \quad C \approx 0.5 \div 1$$

vlákna žárovek mají tvar, který je difrakcí kopírován:

místo kroužků se obraz skládá ze spirálek

v rámci eliminace tohoto jevu může být po cestě navíc *matnice*

profesionální kondenzory mívají revolverový měnič clonek

(nic - světlé pole, terčik - temné pole, disk - fázový kontrast..)

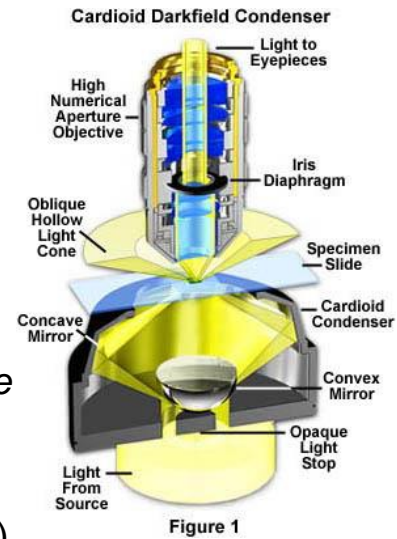


Figure 1

optické soustavy obsahující dva optické členy

numerická apertura: ohybový obrazec závisí na vlnové délce

$$d_{\min} = \frac{1,22\lambda}{n \sin \alpha}$$

jedním ze způsobů jak tento limit omezit, je změna vlnové délky:
 imerzní kapalina (vzduch má index lomu roven jedné)

Používané kapaliny mívají index lomu přes 1,5:

vzduch	1,0003
voda	1,33
im. olej	1,515
bromnaftalen	1,658
metylenjodid	1,740

Oil Immersion and Numerical Aperture

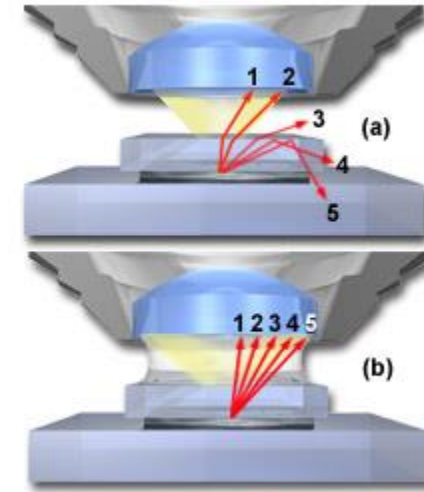


Figure 1

Jedná se o speciálně přizpůsobené objektivy (bývají označeny proužkem)

Jiným způsobem je použití kondenzoru

(aplikací všech možných zlepšení se dá rozlišit až cca jedna vlnová délka)

temné pole na odraz a na průchod

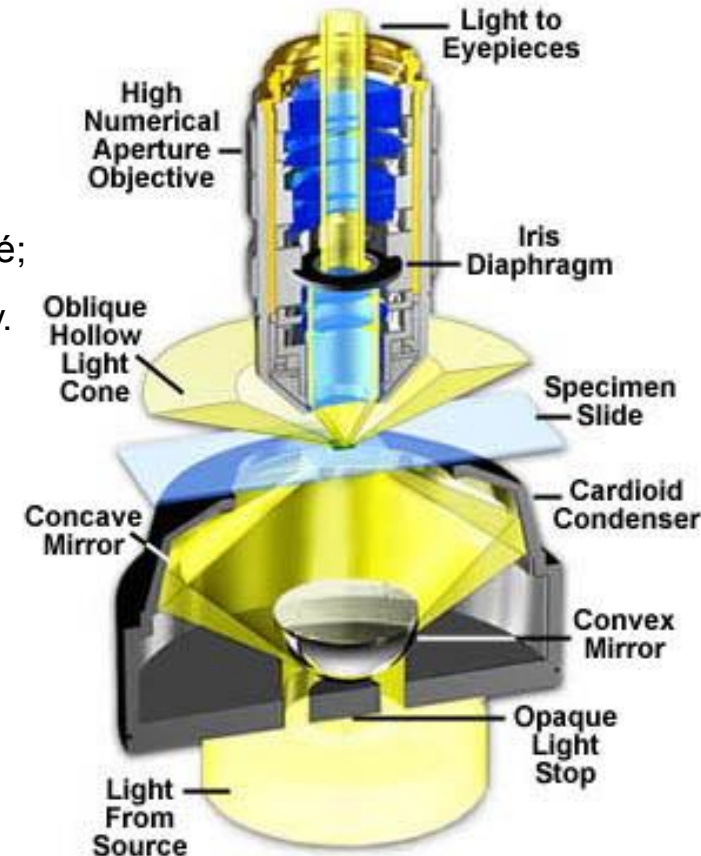
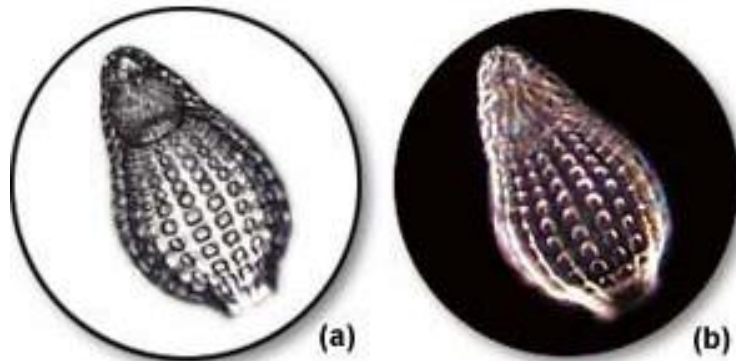
Na konstrukci obrazu se podílejí téměř všechny paprsky, při pozorování bez vzorku vidíme světlé pole: podle směru, odkud na vzorek světlo pomocného osvětlení dopadá, označujeme **světlé pole na odraz/průchod**

jsou-li indexy lomu vzorku a jeho okolí srovnatelné, rozdíl v kontrastu při pozorování běžným způsobem (světlé pole) je minimální

Jednou z metod zlepšení situace je odstranění paprsků jdoucích přímo do objektivu: není-li přítomen vzorek, pozorované pole je temné; po vložení vzorku se na tvorbě obrazu podílejí jen rozptýlené paprsky.

Technicky je třeba vyřešit, aby ztráta světla zcloněním přímé cesty nebyla zbytečně velká (tedy přeorganizovat chod paprsků)

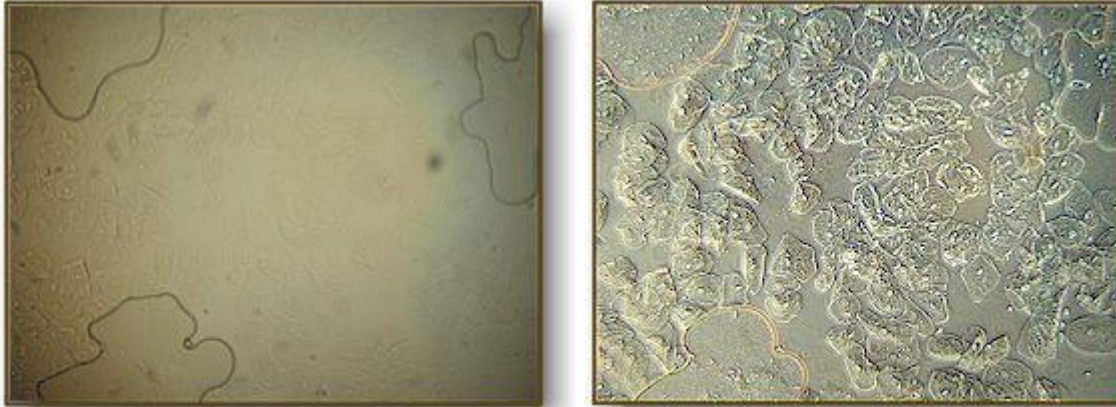
Ještě komplikovanější schéma má temné pole na odraz...



HRT pracuje na principu metody temného pole

fázový kontrast (Zernike 1930, Nobelova cena 1953)

objekty, které mají jen rozdílné indexy lomu n_s od prostředí n_m , nemusí být dobře viditelné ve světlém poli:



průhledné a bezbarvé vzorky je možné obarvit, ale buňky většinou hynou

proměnný index lomu způsobuje rozptyl, změnu úhlu odrazu ale také **změnu rychlosti** takové vzorky tedy puchod světlo zpomalí, nebo zrychlí: dochází k fázovému posunu

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda_0} d(n_s - n_m)$$

úkolem zobrazovacího zařízení je změny fáze přeměnit na změny intenzity

fázový kontrast (Zernike 1930, Nobelova cena 1953)

Vhodného účinku se dosahuje omezením vstupního svazku světla způsobem, který oddělí záření prošlé vzorkem od jasu pozadí:

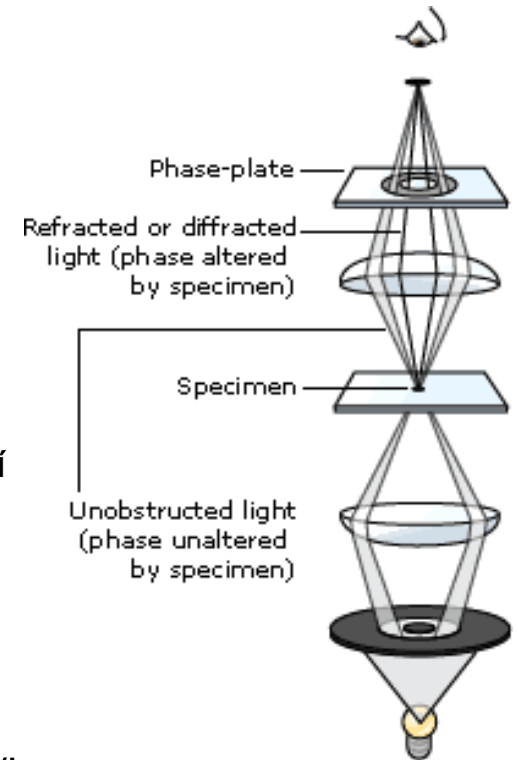
clona v kondenzoru + fázová destička

Přidáním čtvrtvlnné destičky dochází k destruktivní interferenci jasu pozadí
dalšího zvýšení kontrastu lze dosáhnout aplikací absorpční vrstvy

teoreticky pro každou propustnost vzorku by bylo třeba volit jiné parametry:
v praxi se volí parametry pro nepohlcující vzorky

fázový posuv je razantně ovlivněn při použití dvou různých vlnových délek:
musí se používat monochromatický filtr (zpravidla žlutozelený 540 nm – kvůli citlivosti oka)

Nevýhoda metody: hrany mají složité stíny – halo při velkých změnách indexu lomu (např. na hranici vzorku)



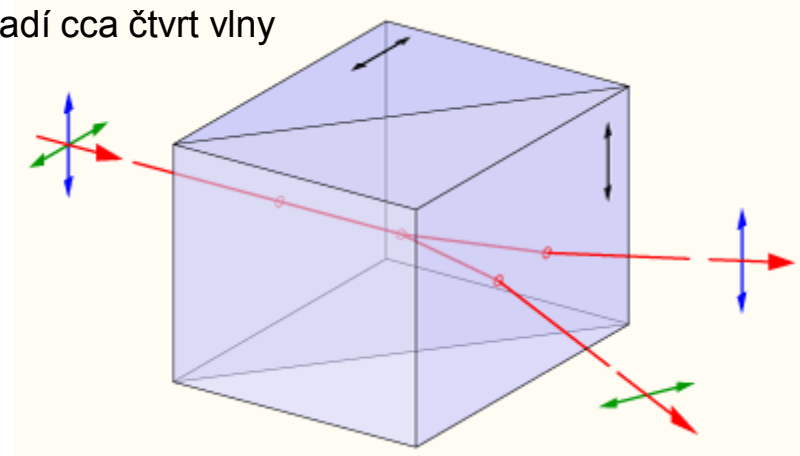
DIC (diferenciální interferenční kontrast)

Vylepšení metody fázového kontrastu: odstranění halo

Používá se u vzorků, které způsobují fázový rozdíl oproti pozadí cca čtvrt vlny

wollastonův hranol

obvykle krystal kalcitu CaCO_3 ,
slepený kanadským balzámem ($n=1,55$)



Dvojlomný materiál vytváří řádný a mimořádný paprsek, které díky tvaru hranolu vystupují rozbíhavé a se stejným fázovým posunem

Vzorek je v každém bodě osvětlován jakoby dvěma zdroji, posunutými přibližně $0,2 \mu\text{m}$ od sebe.

Za objektivem se tak vlastně šíří dva obrazy světlého pole, o kousek posunuté, ovšem s fázovou informací (uvnitř vzorku světlo neinterferuje kvůli kolmým polarizacím)

Druhý Wollastonův hranol každé dva svazky opět slučuje

Interferuje světlo prošlé vzorkem a okolním prostředím: kontrast je způsoben fázovým rozdílem

Podobně jako u fázového kontrastu, vzniká dojem 3D vzorku, zde jakoby šikmým osvětlením vzorku

Nevýhoda: rozbíhavé svazky nutí používat v kondenzoru šterbinu: rapidně klesá osvětlení

Konkrétních provedení je mnoho: Nomarského kontrast, de Senarmont, DIC v odraženém světle

Princip vzniku pseudo 3D obrazu:

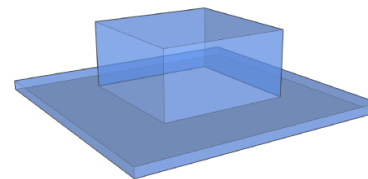
Efekt bočního osvětlení, „směr“ závisí na orientaci hranolů

Slabě světlo pohlcující vzorek

Za prvním hranolem vzikají dva prostorově oddělené paprsky

Rozdíl fází obou paprsků je ovšem nezanedbatelný

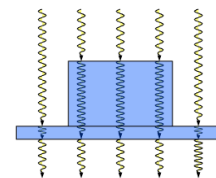
Po rekombinaci dochází ke konstruktivní nebo destruktivní interferenci



This transparent sample is illuminated by two slightly offset light sources, one at 0° polarisation and the other at 90° polarisation.



These are the two visible images due to each polarisation. These are not useful as the transparent sample is not well visualised.



Passage of light through the optically dense sample causes shortening of the wavelength, so a change in phase (phase change greatly exaggerated).



Phase of the two polarisations. This clearly shows the transparent sample, however this information is not visible to the human eye.

Polarisations rotated to allow interference and images overlaid.



Visible image after interference of the two polarisations. The phase difference becomes visible through interference and this clearly shows the shape of the transparent sample.

Diferenciální kontrast lze skutečně simulovat excentrováním kondenzoru:

vznikající efekt šikmého osvětlení ovšem místo fázového posunu

kombinuje intensity prošlých svazků:

rozlišovací schopnost a kontrast jsou velmi nízké .

Nomarského kontrast

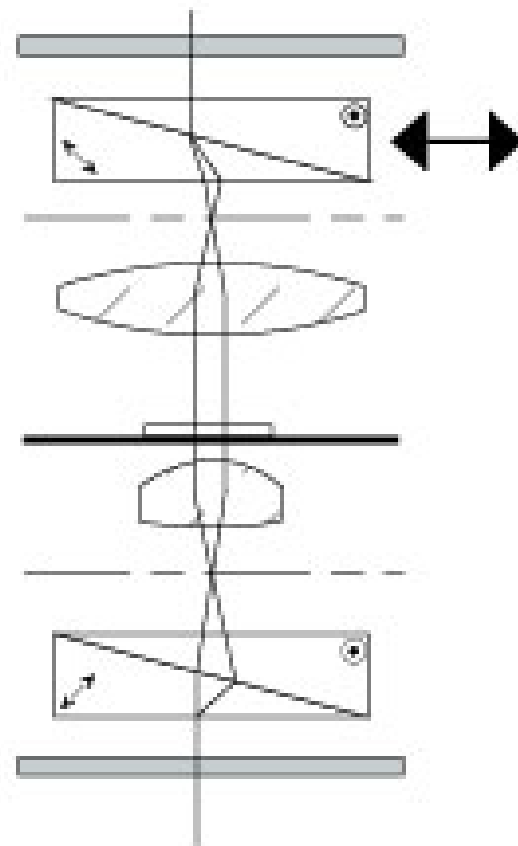
Nomarského hranol:

Vylepšený Wollastonův hranol: světlo se blízko za koncem hranolu kříží
(clona kondenzoru se může stáhnout)

Polarizátor a analyzátor používají ve zkřížené poloze

Justace zařízení komplikovaná, zahrnuje Kohlerovo osvětlení před vložením hranolů

Konkrétní rozměry hranolu se musí přizpůsobit použitému objektivu



Universal Condenser Turret DIC Configuration



nevýhoda: obraz je pouze pseudo 3D;

i zde je potřeba rozvažovat hodnocení

největší počet optických členů: nejvyšší cena

