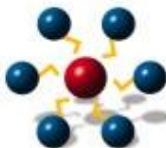
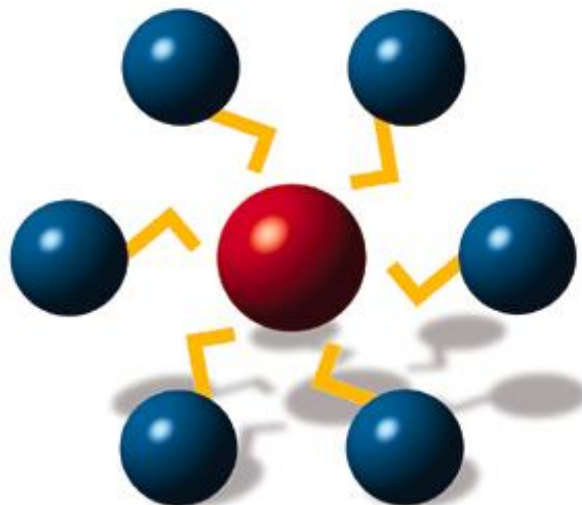
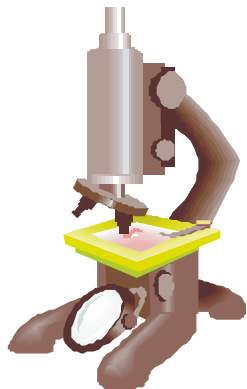


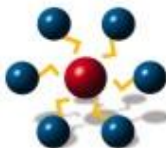
Mikroskopering

Matti Hotokka
Fysikalisk kemi

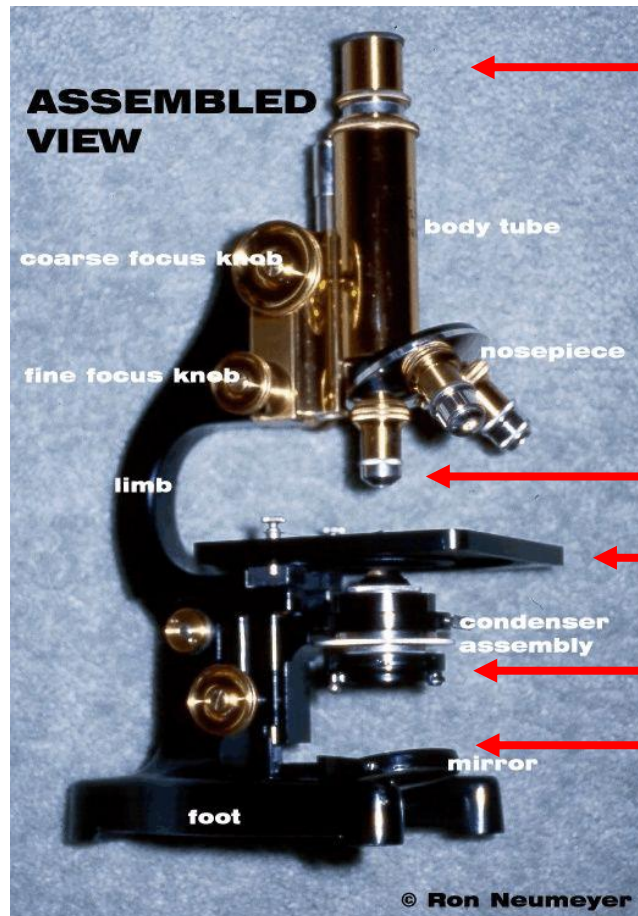


Vad diskuteras

- ⇒ Mikroskopens anatomi
- ⇒ Sätt att belysa provet
- ⇒ Praktiska aspekter
- ⇒ Specialapplikationer



Mikroskop



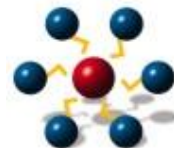
Okular

Objektiv

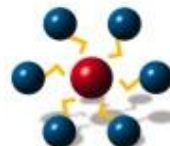
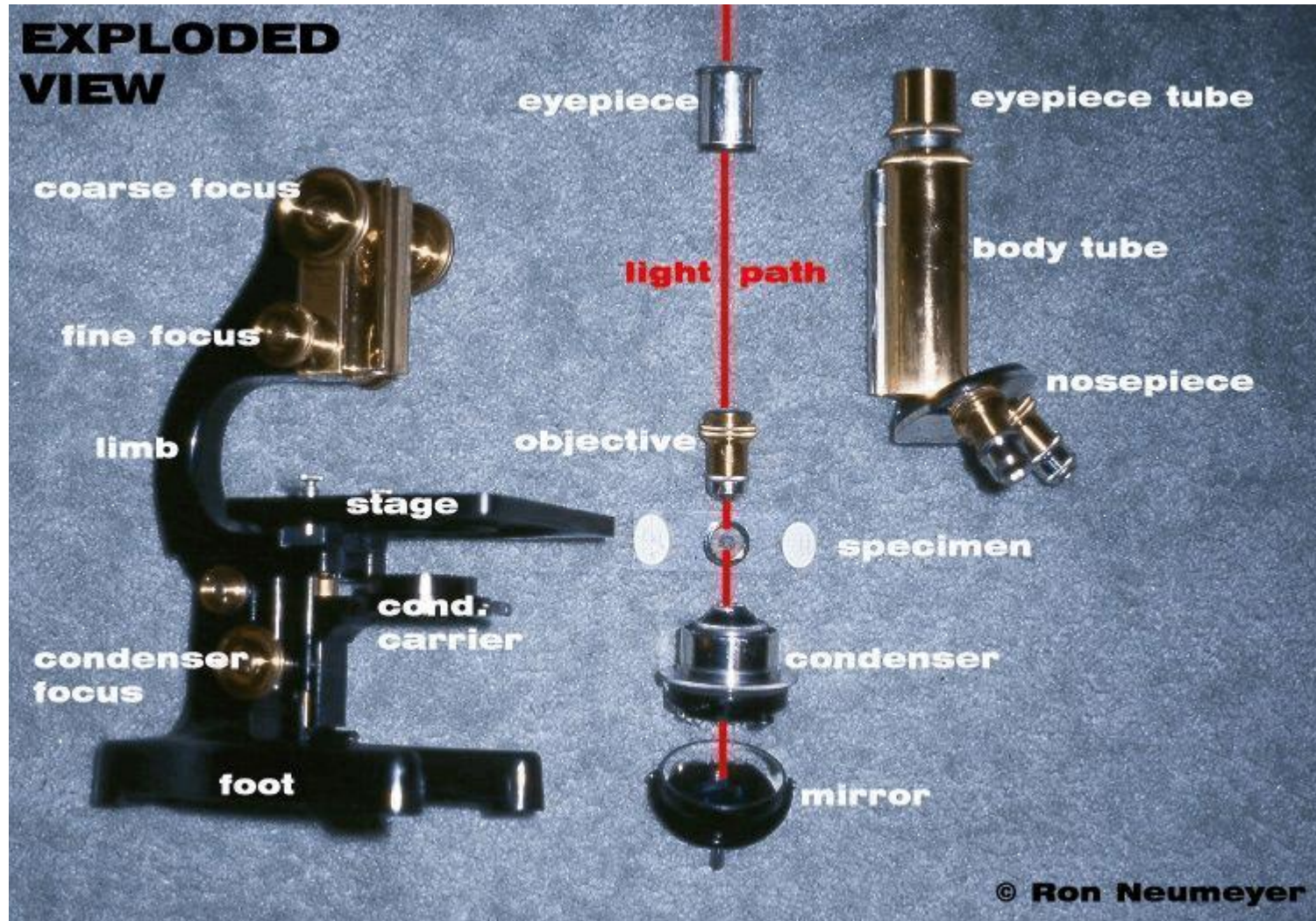
Objektbord

Kondensorlins

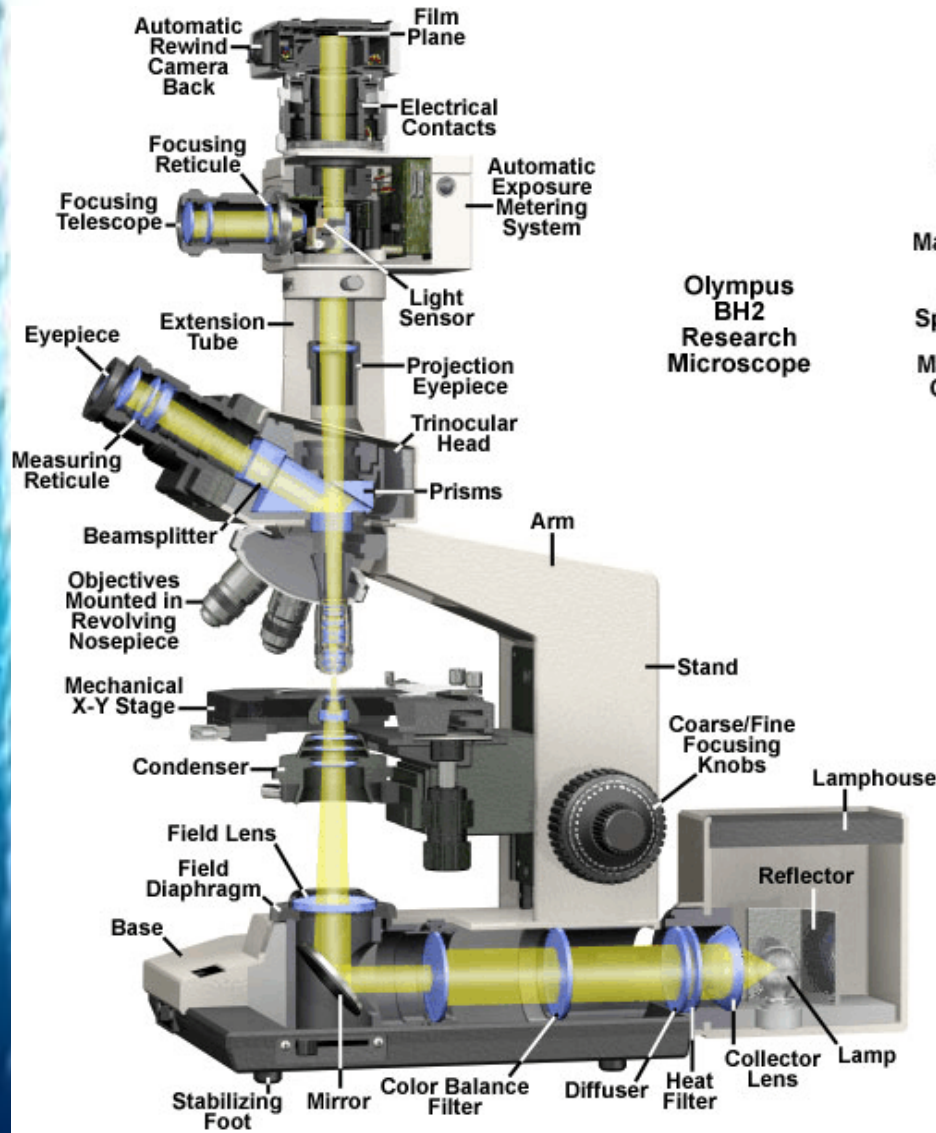
Ljuskälla



Mikroskopets delar

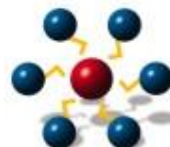
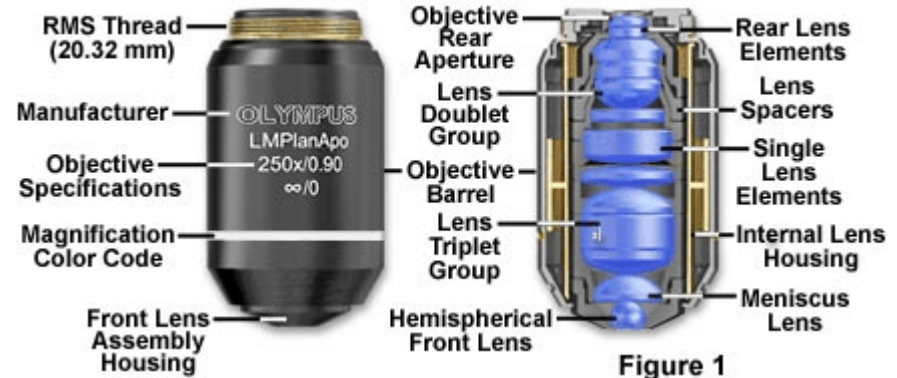


Modernt mikroskop

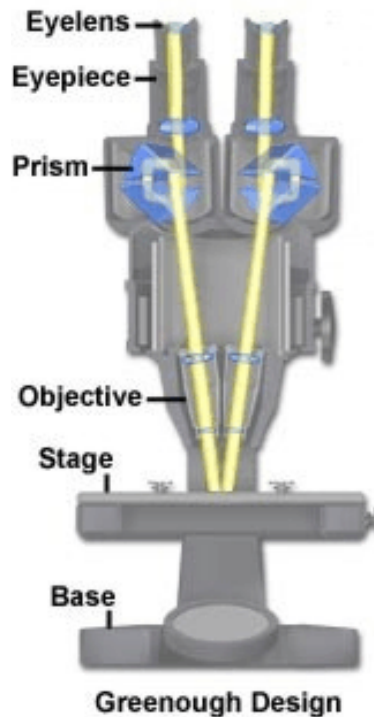


Olympus
BH2
Research
Microscope

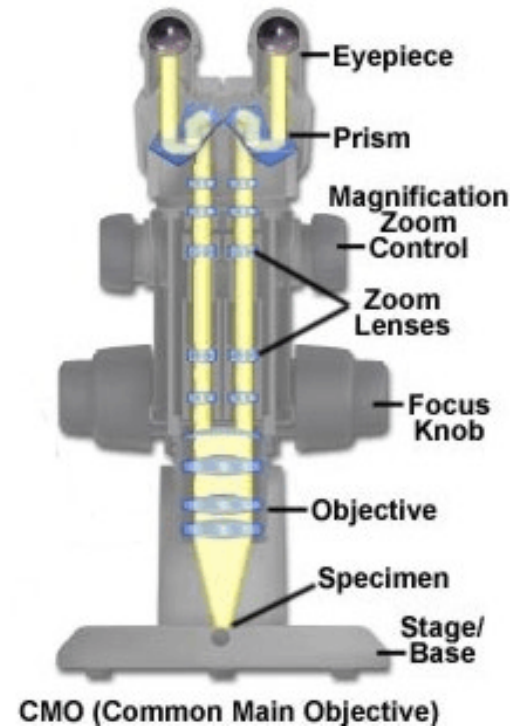
LWD Plan Infinity-Corrected Apochromat Objective



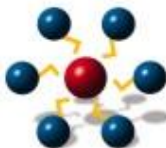
Mikroskoptyper



Stereomikroskop
Prepareringsmikroskop

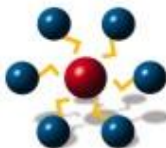


Biologiskt mikroskop
Vanligt mikroskop



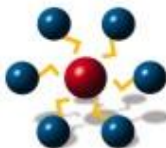
Stereomikroskopi

- ⇒ Förstoring typiskt 10 - 150 x
- ⇒ Tredimensionella bilder
- ⇒ Provet kan vara nästan vad som helst
- ⇒ Mycket utrymme för preparering



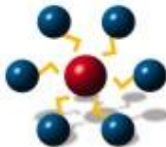
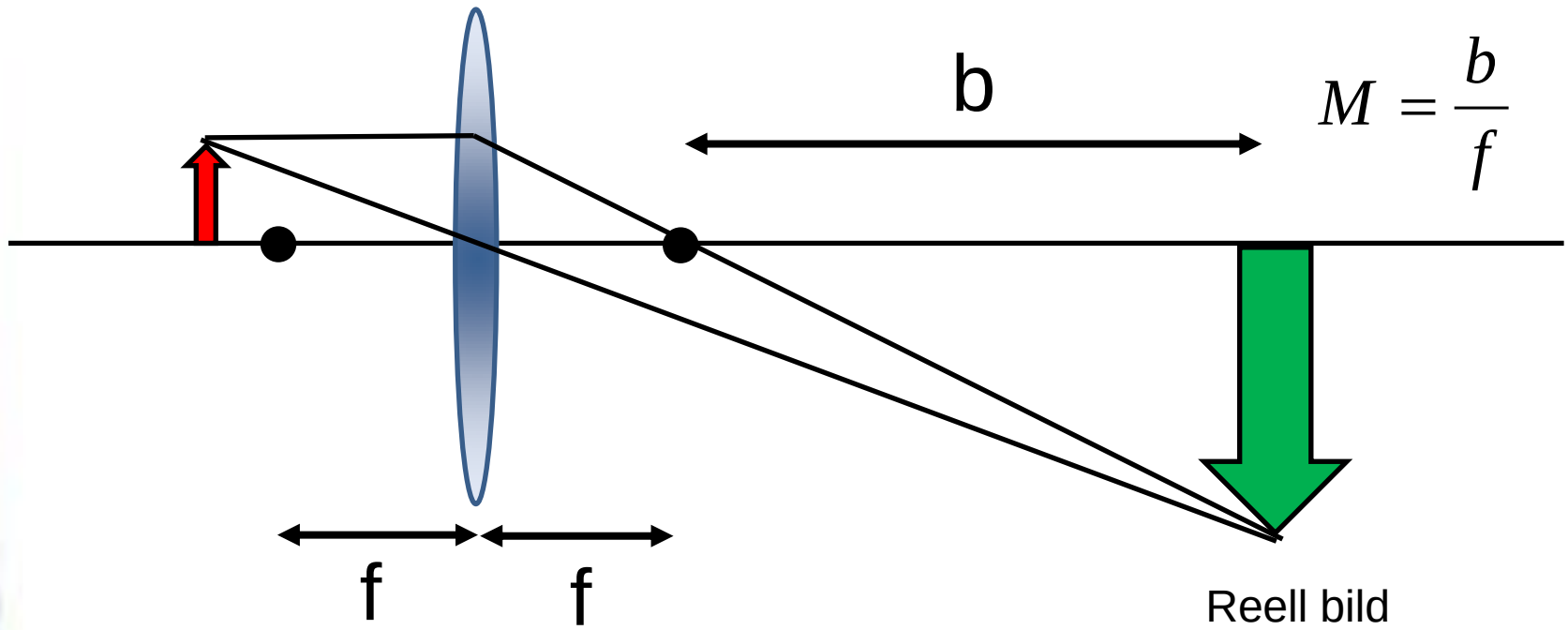
Vanligt mikroskop

- ⇒ Förstoring 100 - 1000 x
- ⇒ Tvådimensionell
- ⇒ Provet placeras på mikroskopglas
- ⇒ Provet ligger nära objektivet



Elementär optik

Linsens förstoring

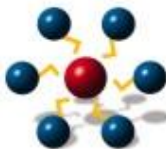
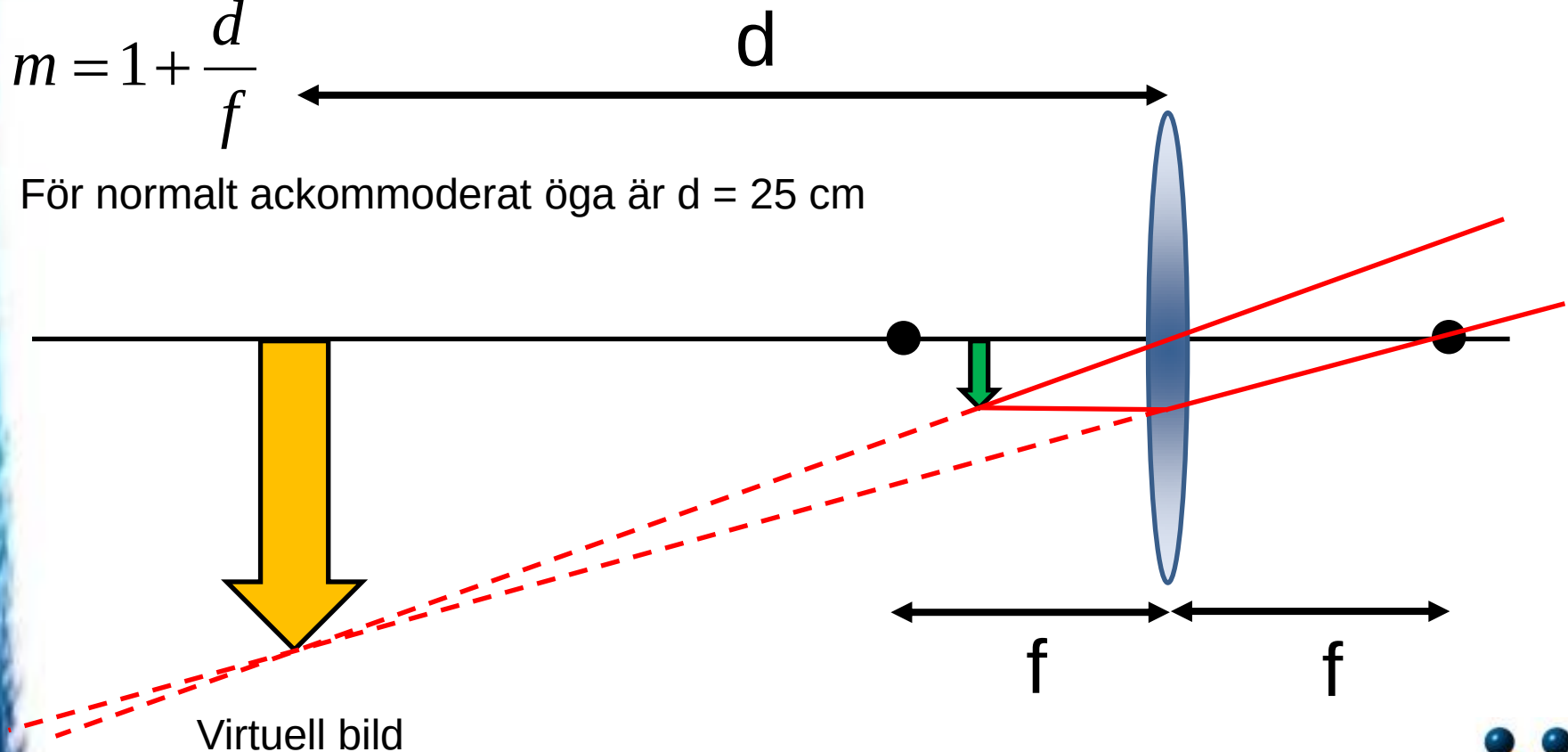


Elementär optik

Linsens förstoring

$$m = 1 + \frac{d}{f}$$

För normalt ackommoderat öga är $d = 25\text{ cm}$

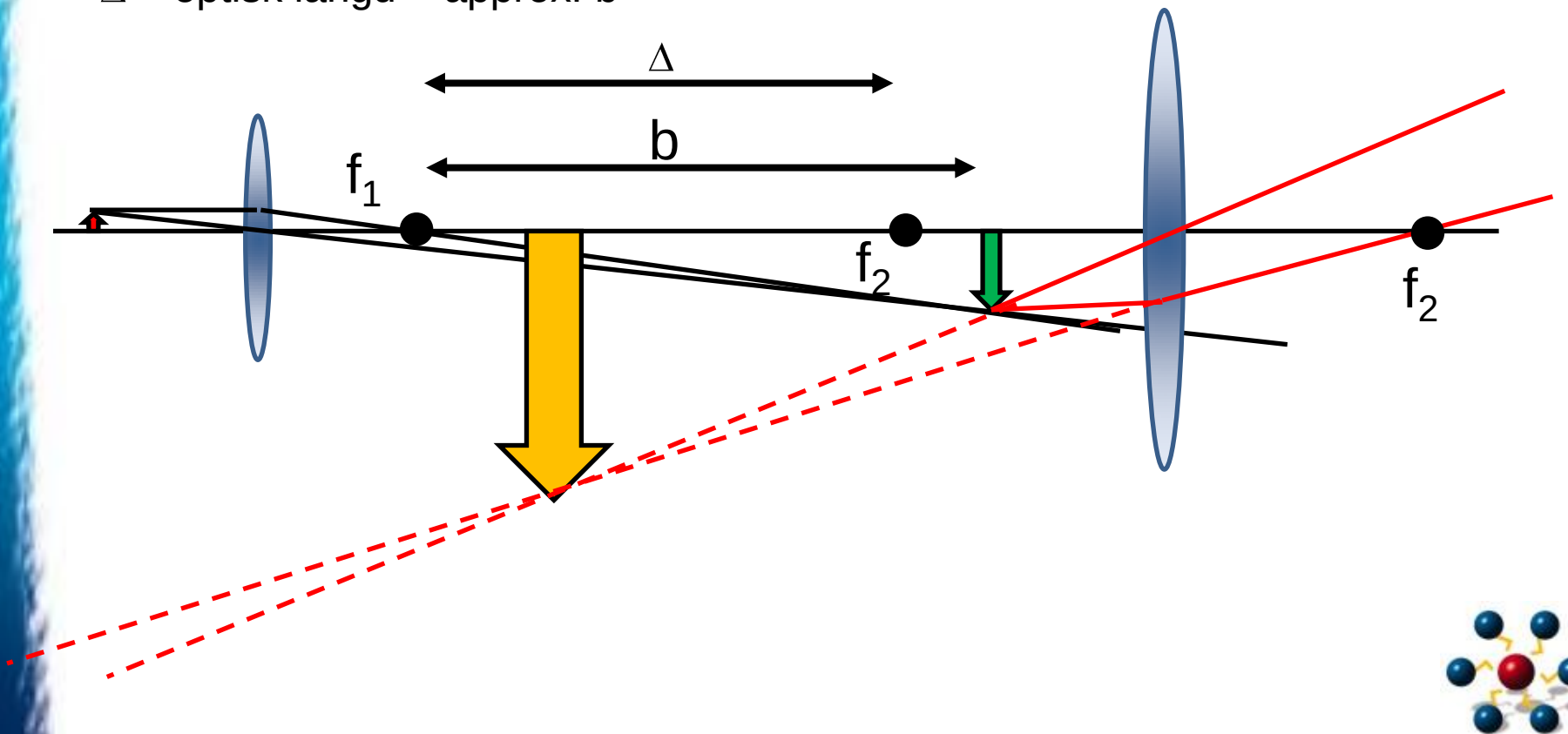


Elementär optik

Mikroskop

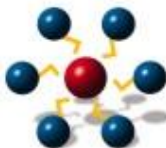
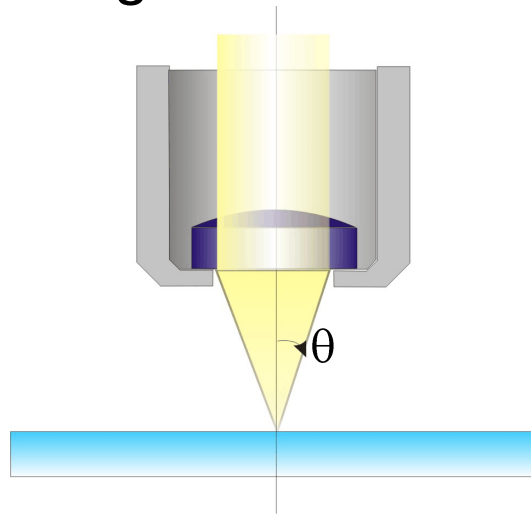
$$\text{Förstoring} = M \times m$$

Δ = optisk längd = approx. b



Numerisk apertur

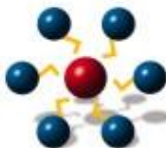
- ⇒ Låt θ vara halva öppningsvinkel av ljuskonen som passar i linsens dimension
- ⇒ Låt n vara det omgivande materialets brytningsindex (1 för luft, 1,5 för olja)
- ⇒ Numeriska aperturen är $NA = n \sin \theta$
- ⇒ Påverkar upplösningen



Bländartalet

⇒ För små numeriska aperturer är bländartalet (f-talet)

$$f \approx \frac{1}{2 \cdot NA}$$



Typiska objektiv

Magnification	NA
4x	0.10
10x	0.25
20x	0.40
100x (dry)	0.95
100x (immersed)	1.25

Media

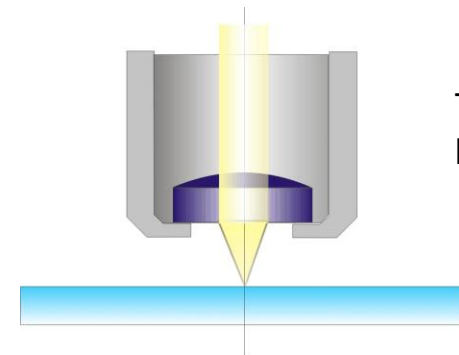
Vatten, $n=1.33$

Glycerin, $n=1.47$

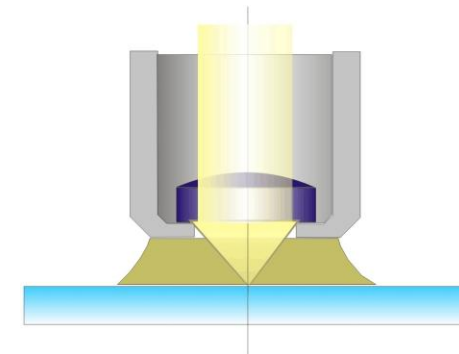
Olja, $n=1.51$

De flesta objektiven med förstoring x60 eller högre är konstruerade för att kunna doppas i olja.

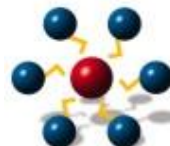
Använd inte andra medier ty linserna har satts ihop med lim. Limningarna kan påverkas av andra vätskor.



Torr
NA = 0.4



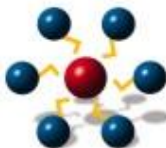
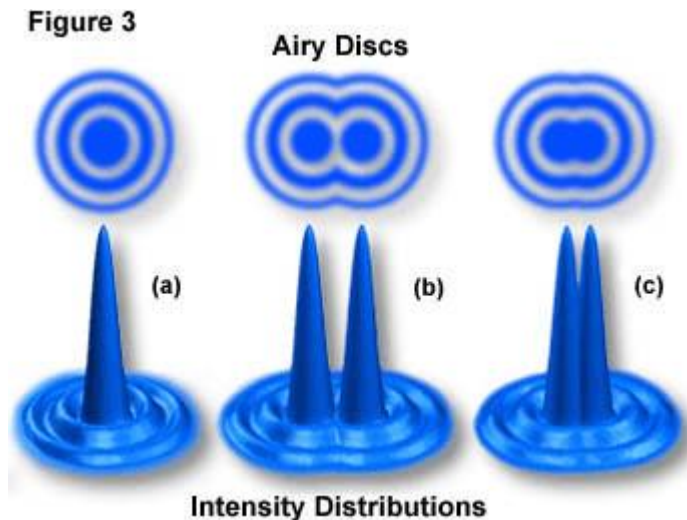
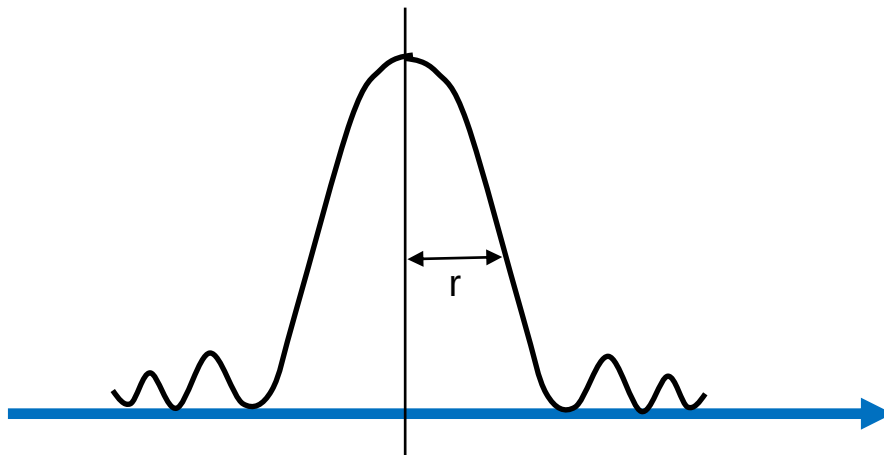
Doppad
i olja
NA = 0.6



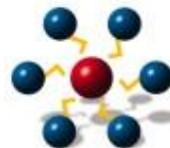
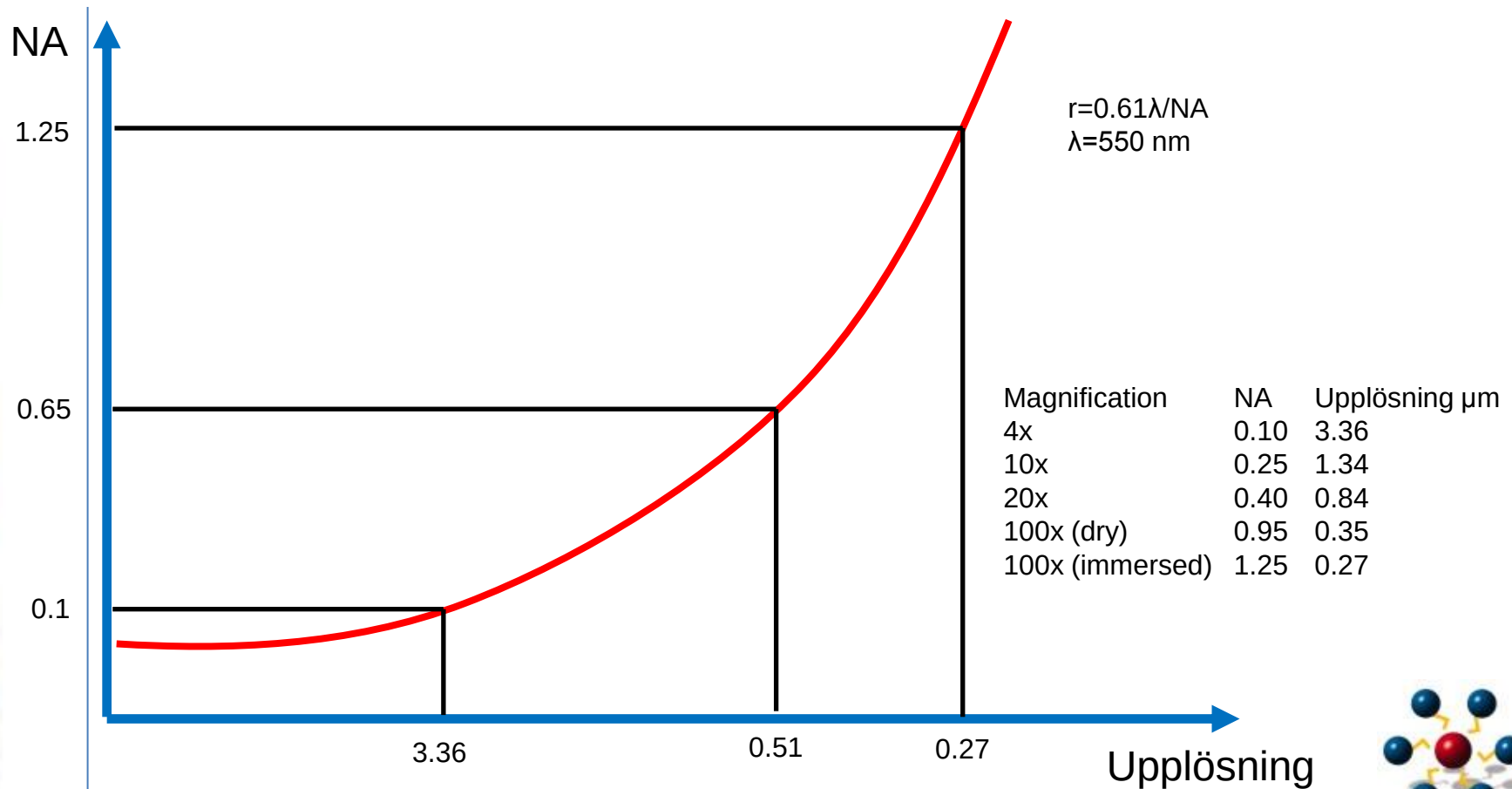
Upplösning

⇒ Två närliggande detaljer kan urskiljas om deras avstånd är större än Airys radius

$$r_{\text{Airy}} = \frac{1.22 \lambda}{2NA}$$



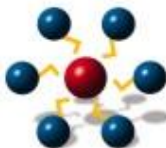
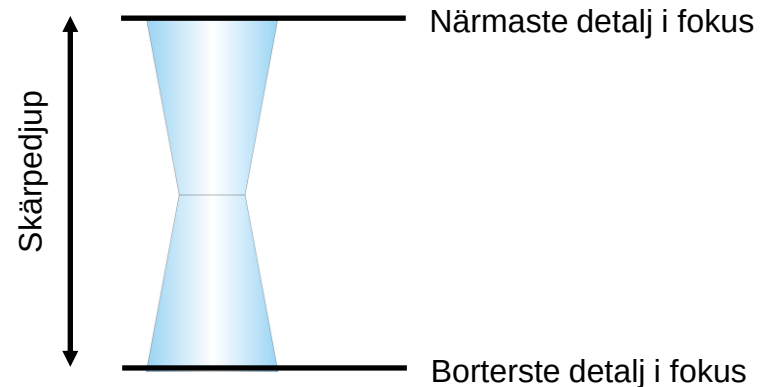
Upplösning



Skärpedjup

⇒ Ju större numerisk apertur (eller mindre f-tal) desto mindre är skärpedjupet

Magnification	NA	Skärpedjup μm
4x	0.10	55.5
10x	0.25	8.5
20x	0.40	5.8
100x (dry)	0.95	0.19
100x (immersed)	1.25	0.85



Synfält

Synliga områdets diameter

⇒ Det synliga områdets diameter ($\varnothing$ mm) är

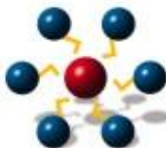
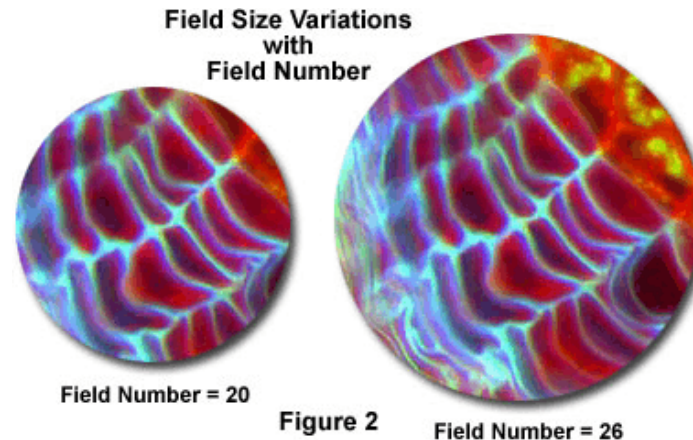
$$P = \frac{N}{M_{Obj} q}$$

N = okularets synfält, anges ofta som 10/20 (förstoring / N)

M_{obj} = objektivets förstoring, anges ofta som 40/0.65 (förstoring / NA)

q = tubus, vanligtvis 1, ibland 1.25

I exemplet är det synliga områdets diameter i provet 20/40 mm = 0.5 mm



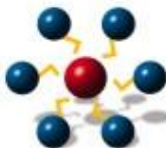
Mikroskoperingsmetoder

⇒ Belysning genom provet

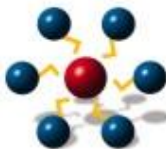
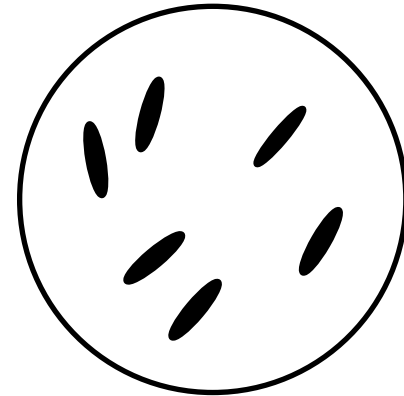
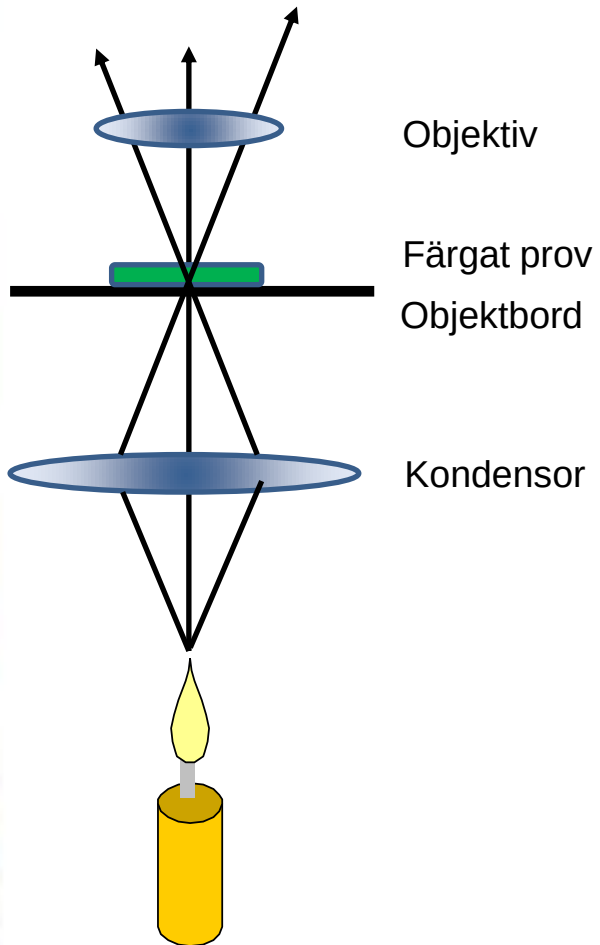
- Ljusfält
- Mörkfält
- Polariserat ljus
- Faskontrastmetod
- Interferenskontrast

⇒ Reflektionsbelysning

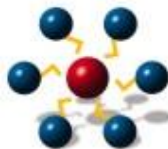
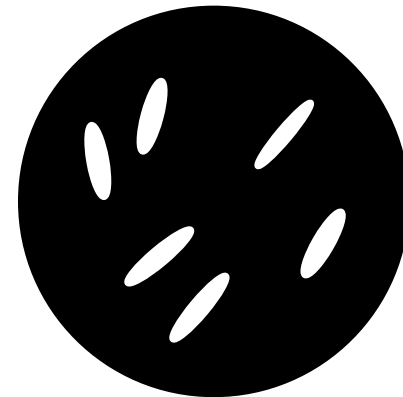
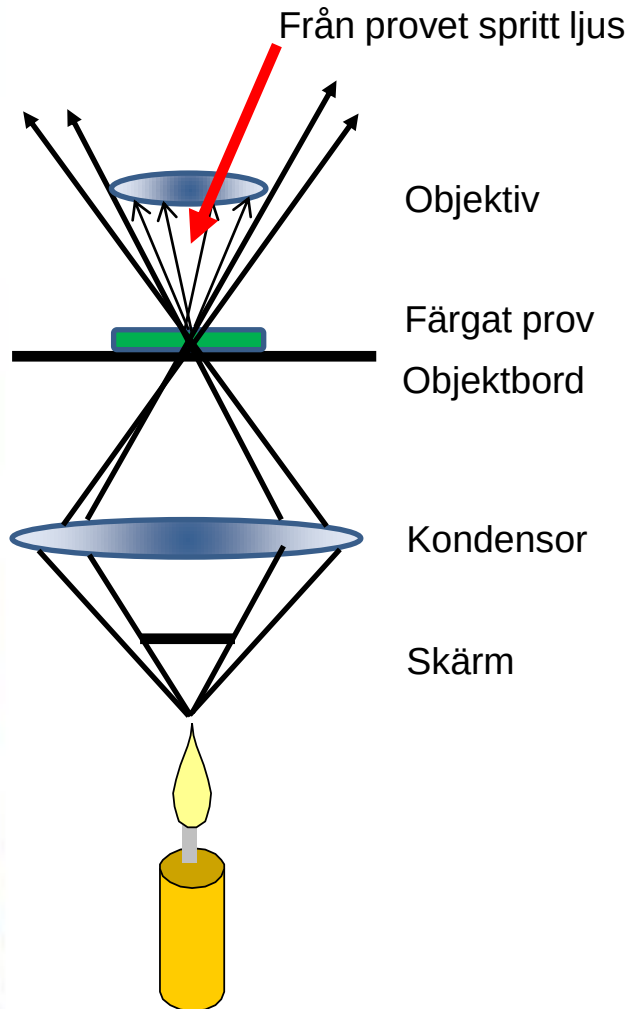
- En likadan lista



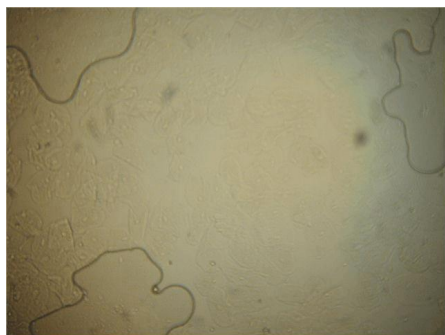
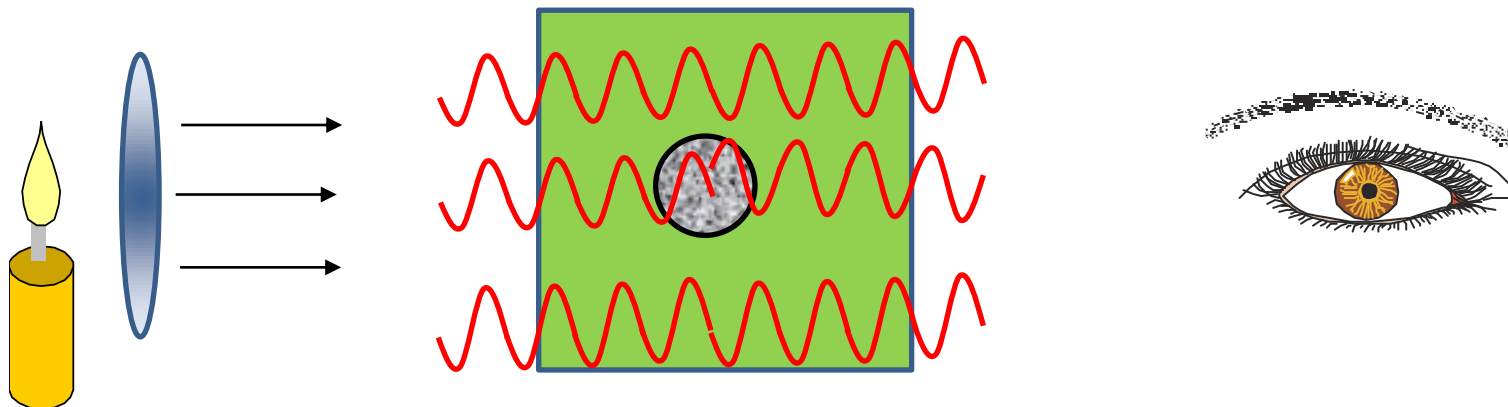
Ljussfält



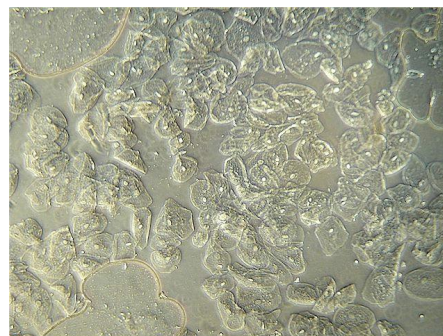
Mörkfält



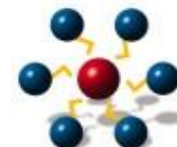
Faskontrastmetod



Ljusfält



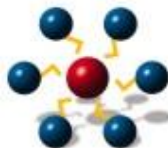
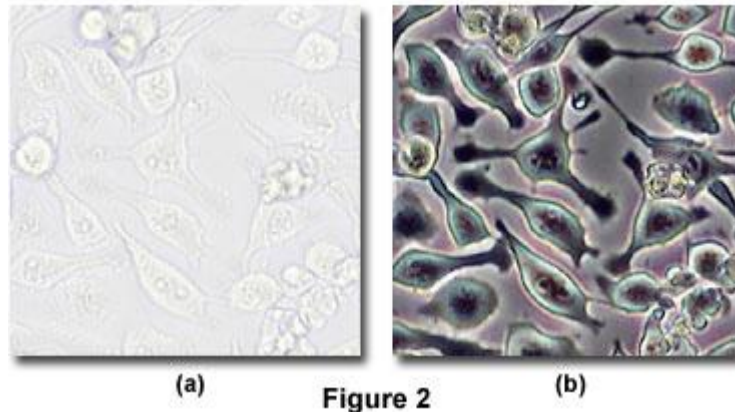
Faskontrast



Faskontrastmetoden

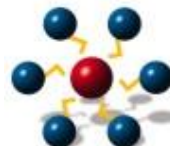
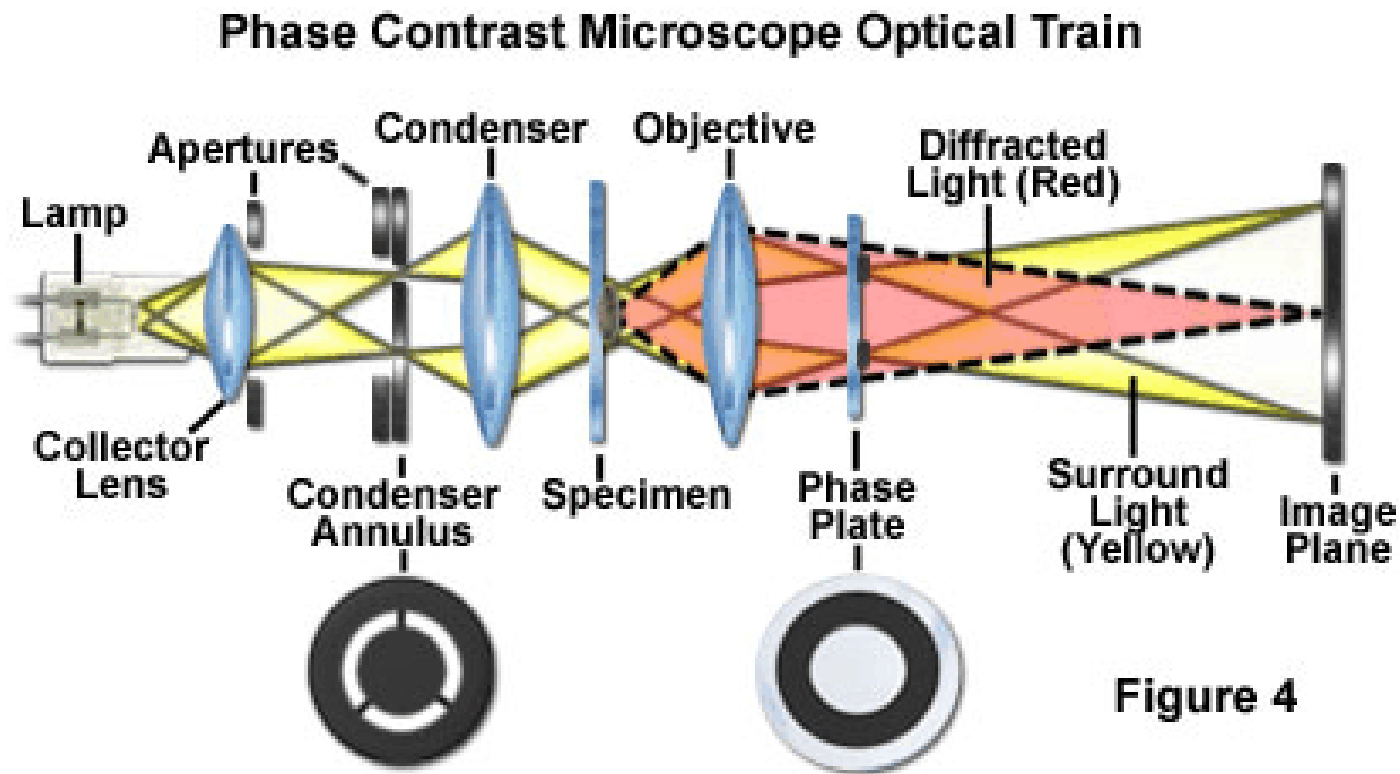
- ⇒ Användbar för höga förstoringar (400 x ->)
- ⇒ Användbar för färglösa prov eller prov med så små detaljer, att färgerna inte kan urskiljas i ljusfält

Living Cells in Brightfield and Phase Contrast



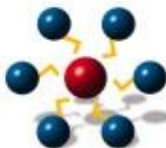
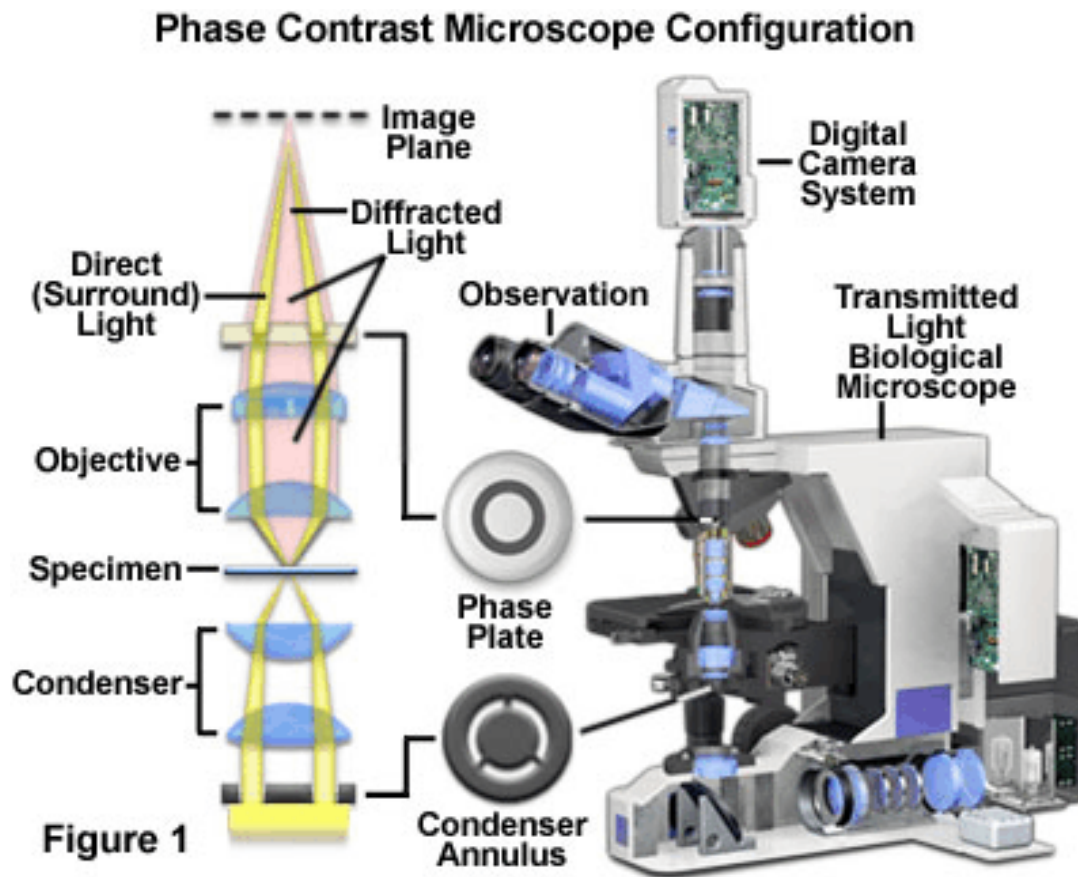
Faskontrastmetoden

Optiskt arrangemang



Faskontrastmetoden

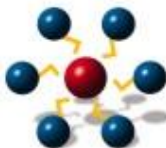
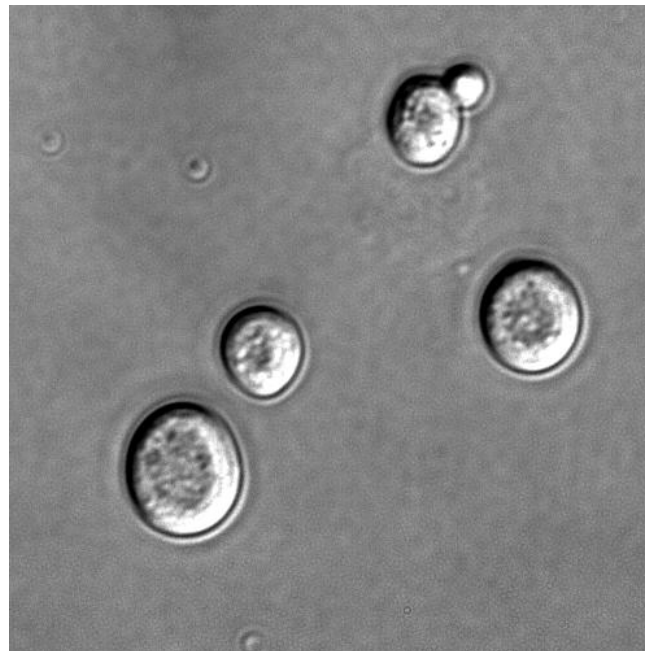
Optiskt arrangemang



Interferenskontrastmetod DIC

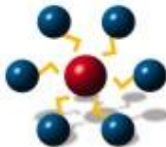
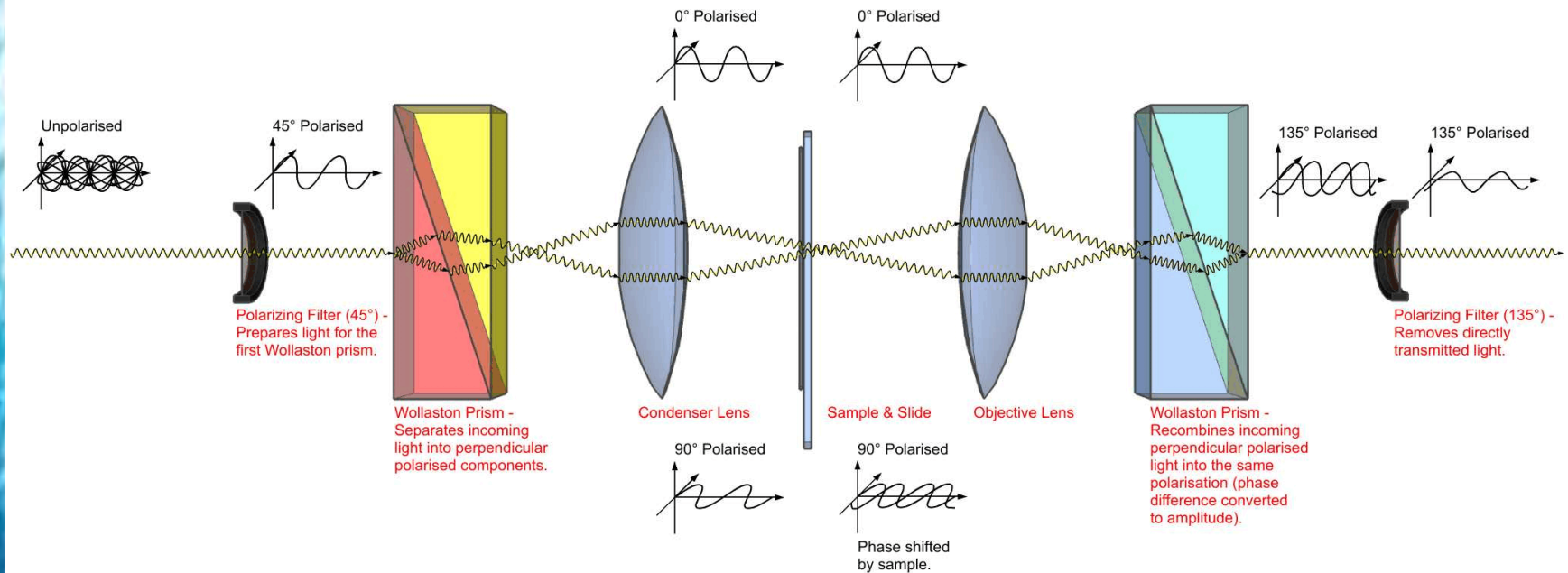
Differential Interference Contrast

⇒ Tjockare prov än vanligt kan observeras i fokus



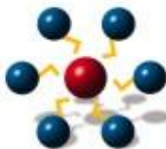
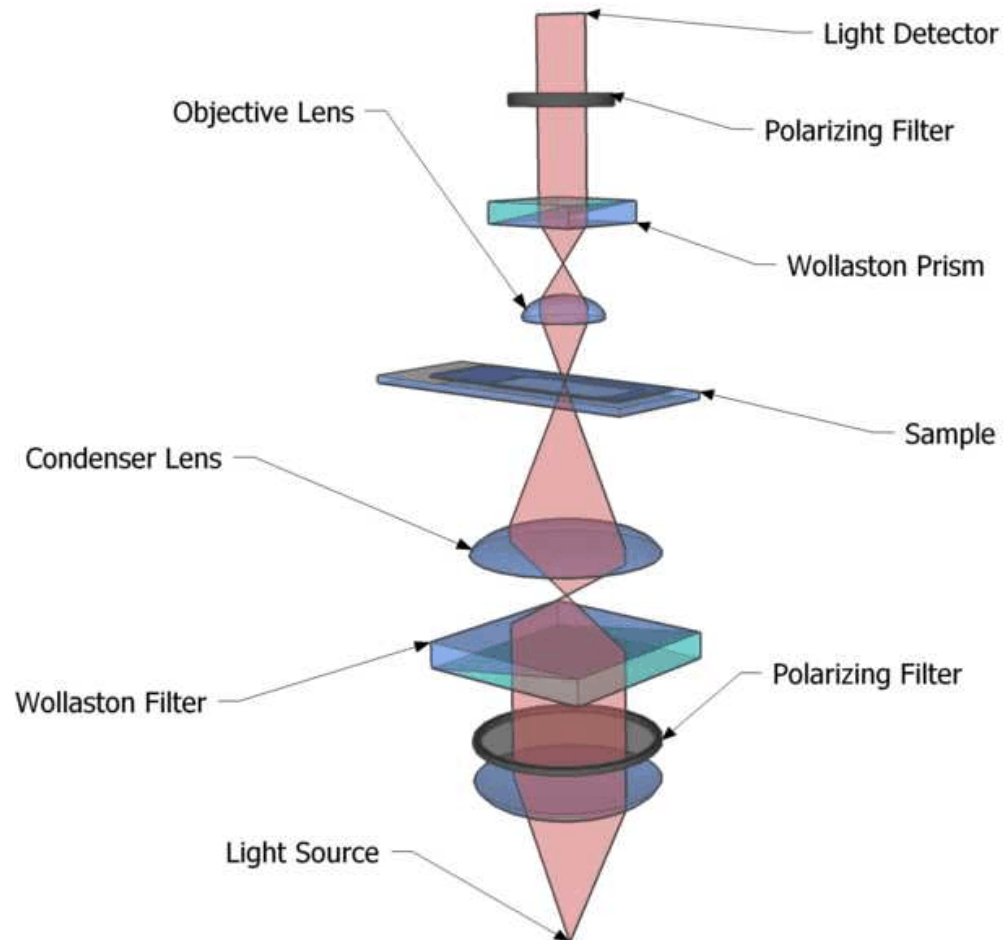
DIC

Differential Interference Contrast

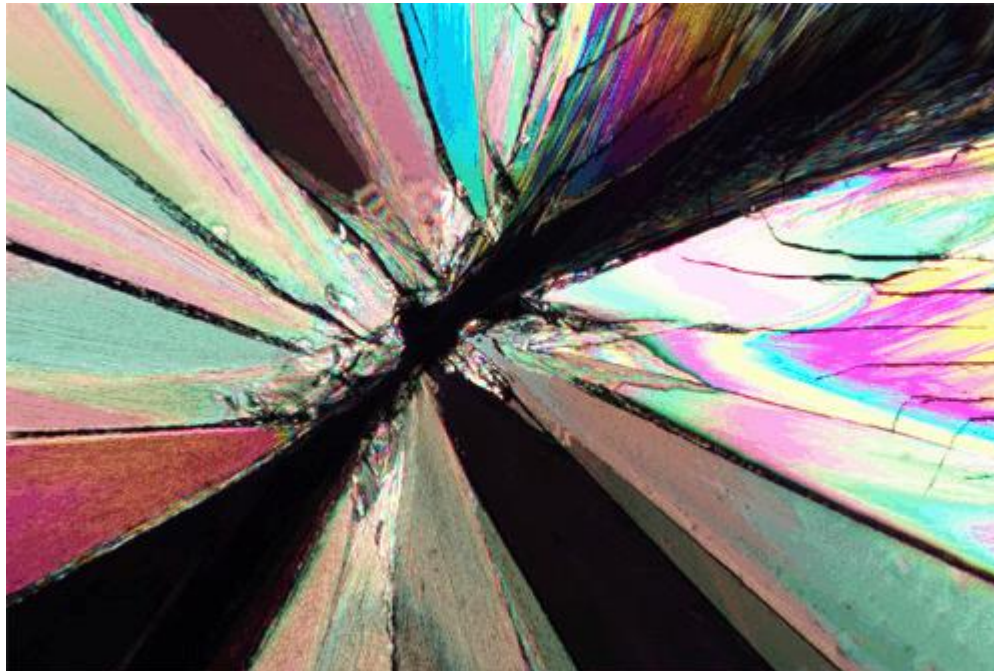


DIC

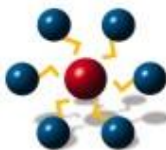
Differential Interference Contrast



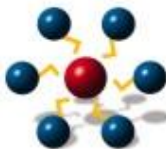
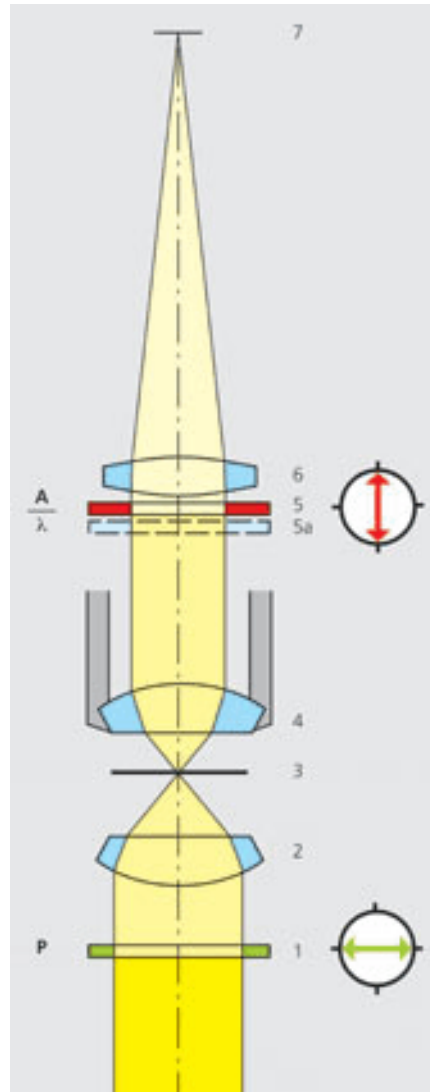
Polariseringsmetod



Vinsyrakristall

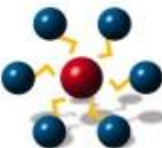


Polariseringsmikroskop



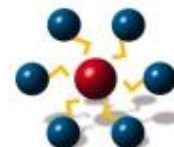
Digital fotografi

⇒ Observera att fotot visar ca 60 % av det synfält, som kan observeras i okulare



Praktiska aspekter

- ⇒ Alla knappar som kan vridas med fingrar utan verktyg får (och bör) vridas. Gör man inte det regelbundet kan fettet hårdna.
- ⇒ Putsning
- ⇒ Inställningar
- ⇒ Optimering av Köhlerilluminering



Rengör objektiven

⇒ Blås bort dammet

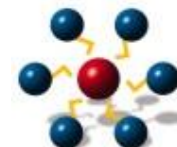
- Använd ren och torr tryckluft

⇒ Tvätta objektivet

- Använd lösning med 70 % eter och 30 % alkohol
- Använd mjukt optiskt papper
- Använd cirkulära rörelser

⇒ Inspektera visuellt

- Använd okularet som förstöringsglas



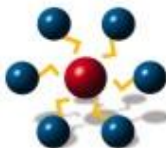
Justera okularet

⇒ Fokusera

- Stäng högra ögat
- Justera fokuseringen så att bilden är skarp

⇒ Justera för ögats ackomodering

- Stäng vänstra ögat istället
- Vrid ringen för diopterjustering så att bilden är skarp



Köhlerillumining

Maximera ljusstyrkan vid provet

- ⇒ Använd objektiv med förstoringen 10 x
- ⇒ Fokusera till provet
- ⇒ Flytta kondensorlinsen till sin översta läge
- ⇒ Minimera storleken av fältaperturen
- ⇒ Flytta kondensorlinsen ner så att aperturens kant är skarp
- ⇒ Flytta den belysta punkten till mitten av synfältet
- ⇒ Öppna aperturen så att hela synfältet är belyst

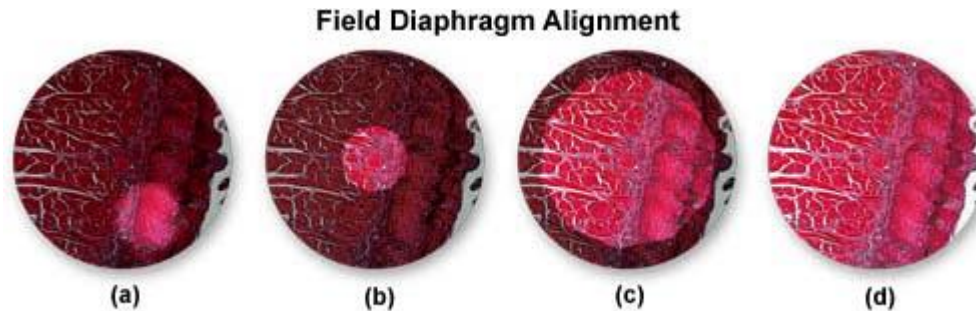
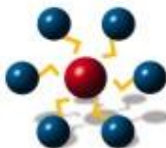
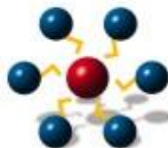
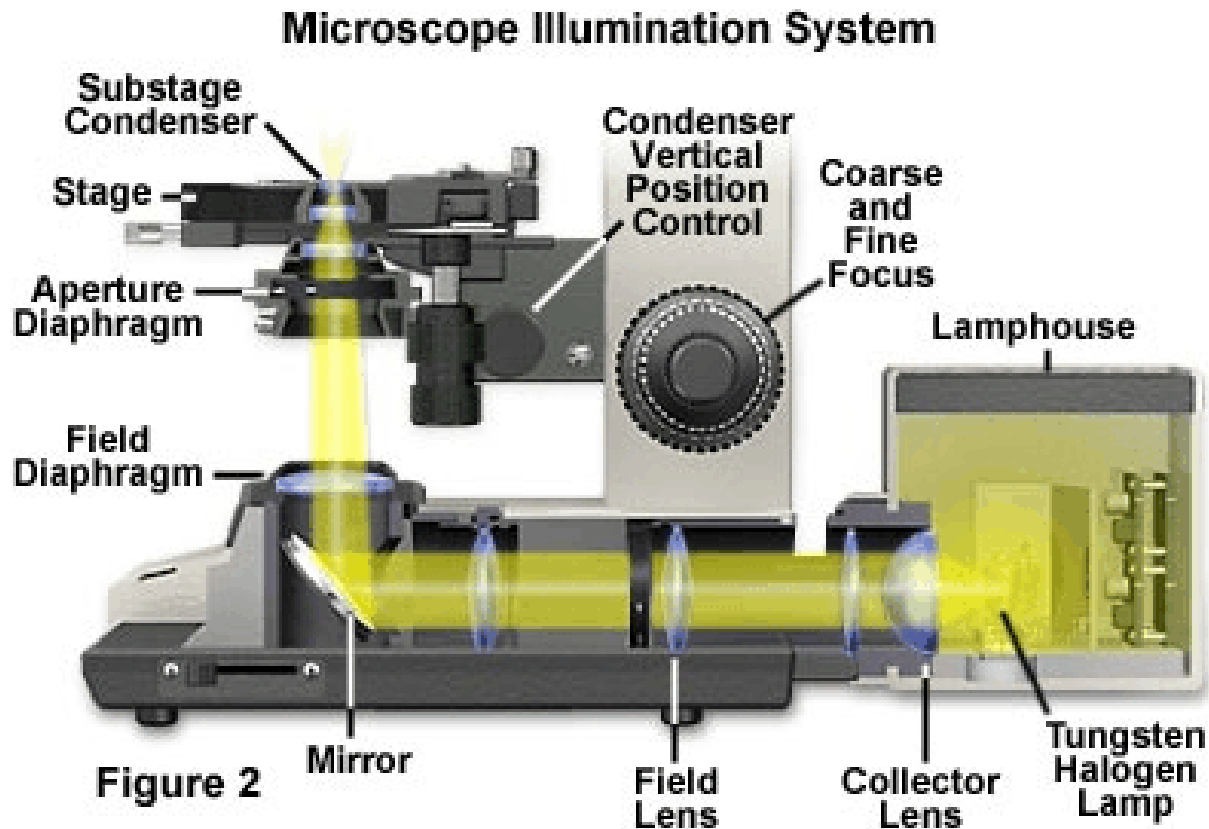


Figure 6



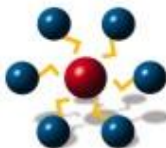
Köhlerillumining

Mikroskopets ljussystem



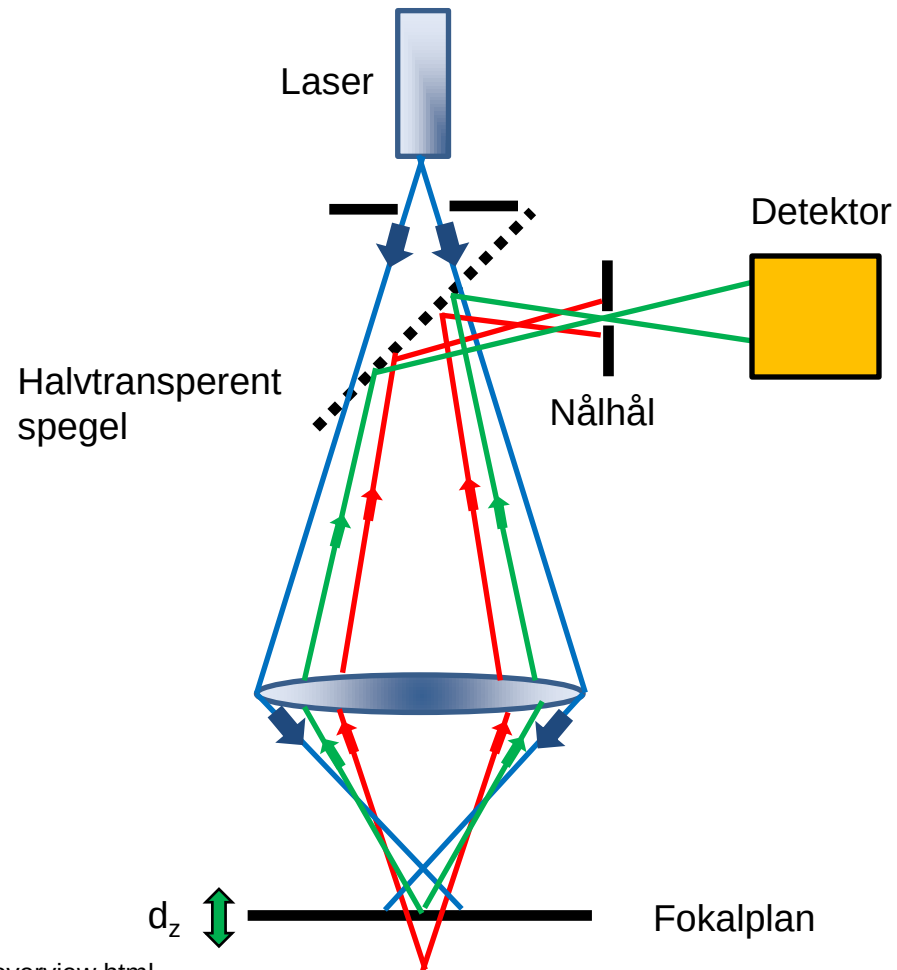
Specialtillämpningar

- ⇒ Konfokalmikroskopi
- ⇒ Fluorescensmikroskopi
- ⇒ Närfältnmikroskopi
- ⇒ Bildanalys

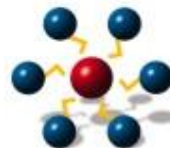


Konfokalmikroskopi

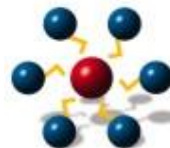
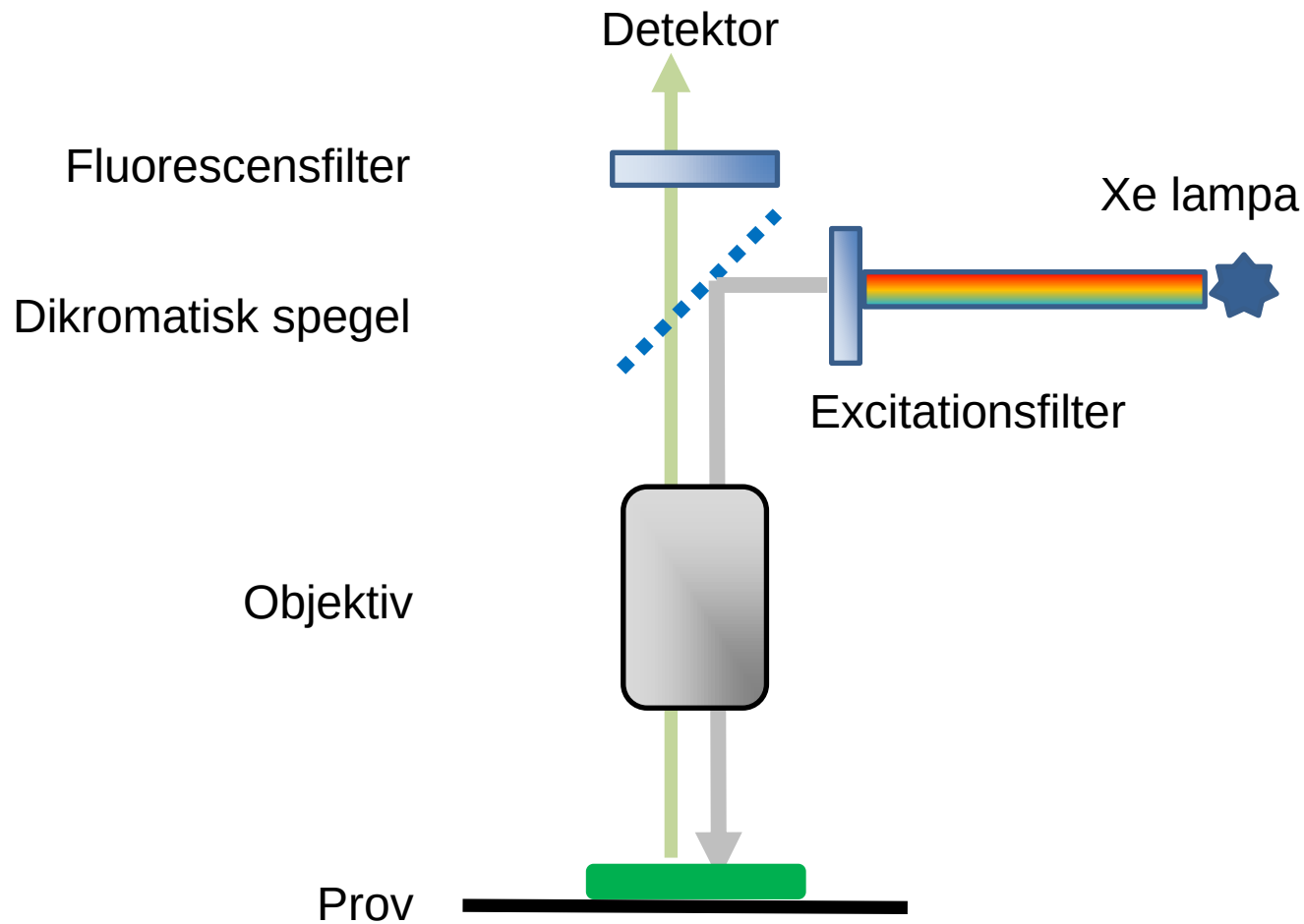
Marvin Minsky 1955



Skarp djupprofil.
Klar bild.



Fluorescensmikroskopi



Fluorescensmikroskop

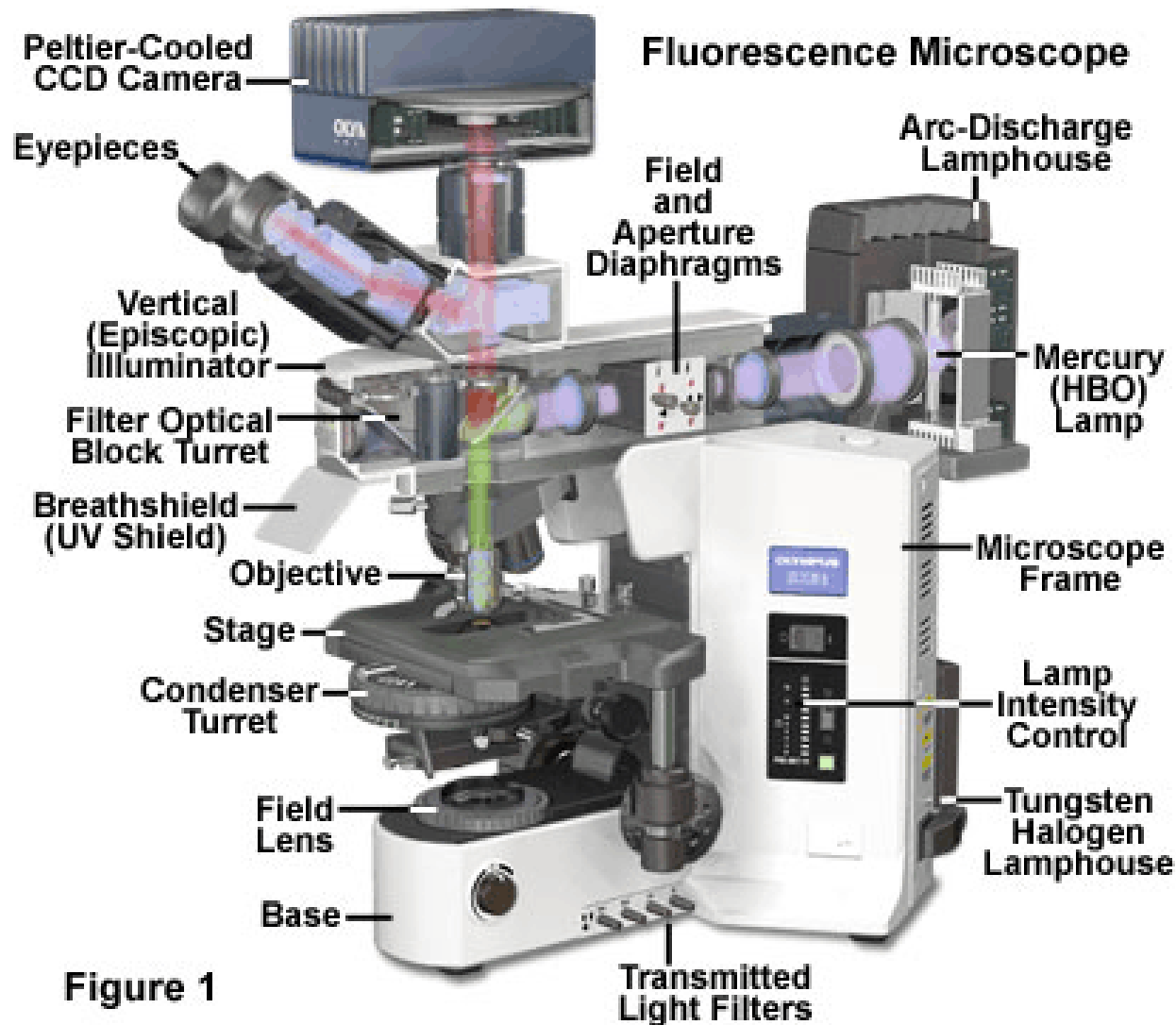
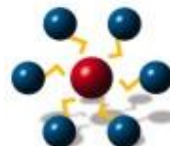
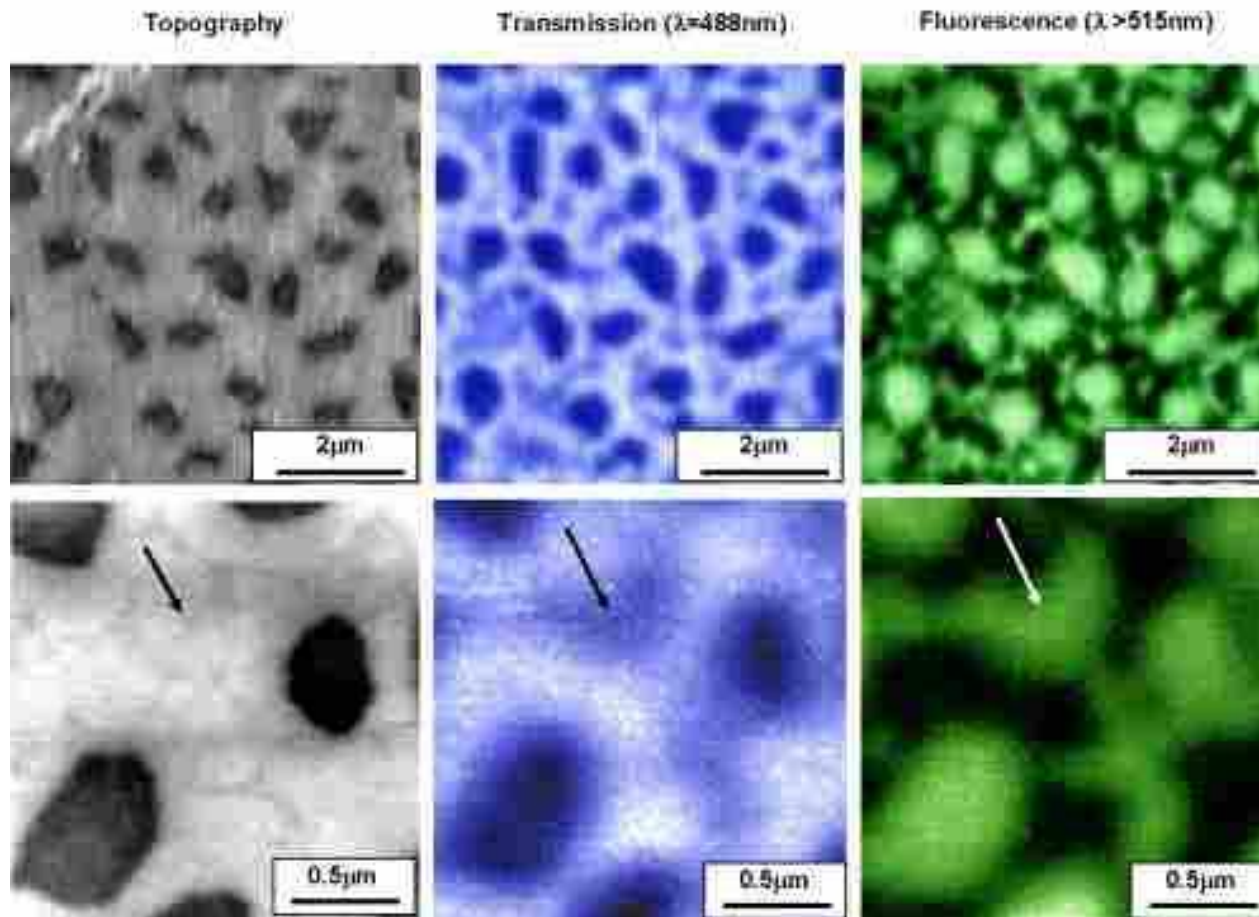


Figure 1



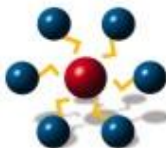
Fluorescensmikroskopi



Topologi: AFM

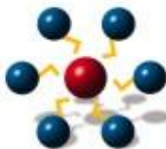
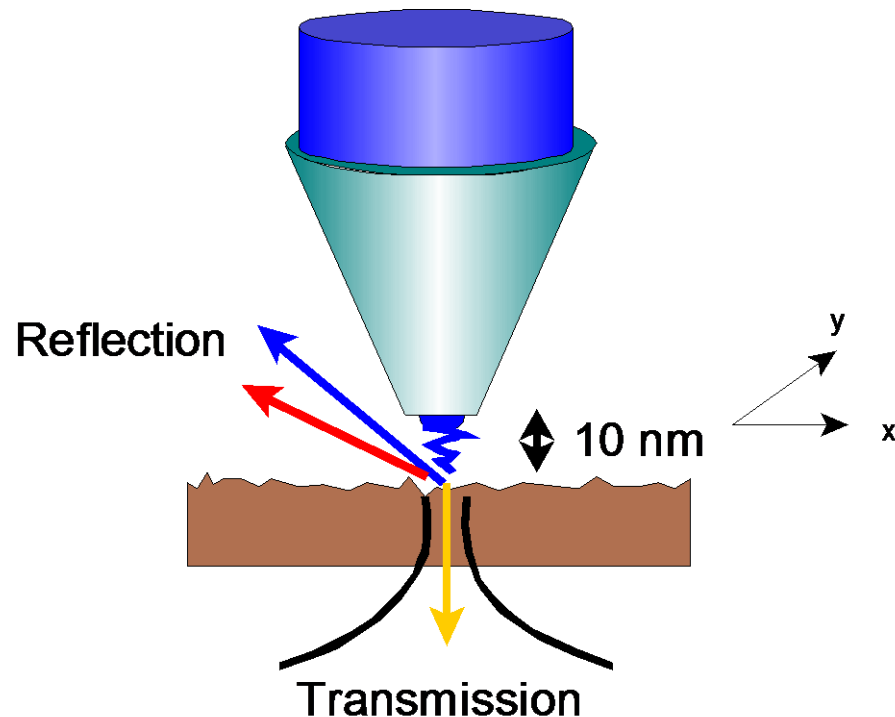
Transmission

Fluorescens



Närfältmikroskopi

⇒ Endast totala intensiteten mäts. Nålens position ger en kartlägger ytan



Bildanalys

