

# МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ

- ОПТИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ
- РЕНТГЕНОВСКАЯ МИКРОСКОПИЯ
- ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

# ОПТИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ

Отнюдь не исчерпывается всем хорошо знакомыми приборами, о которых мы говорили на прошлой паре. Методы оптической микроскопии можно классифицировать по тому, каким образом *контрастируется* изображение. **Контрастированием называется визуальное выделение объекта на фоне среды.**

По разным методам контрастирования можно выделить следующие виды оптической микроскопии:

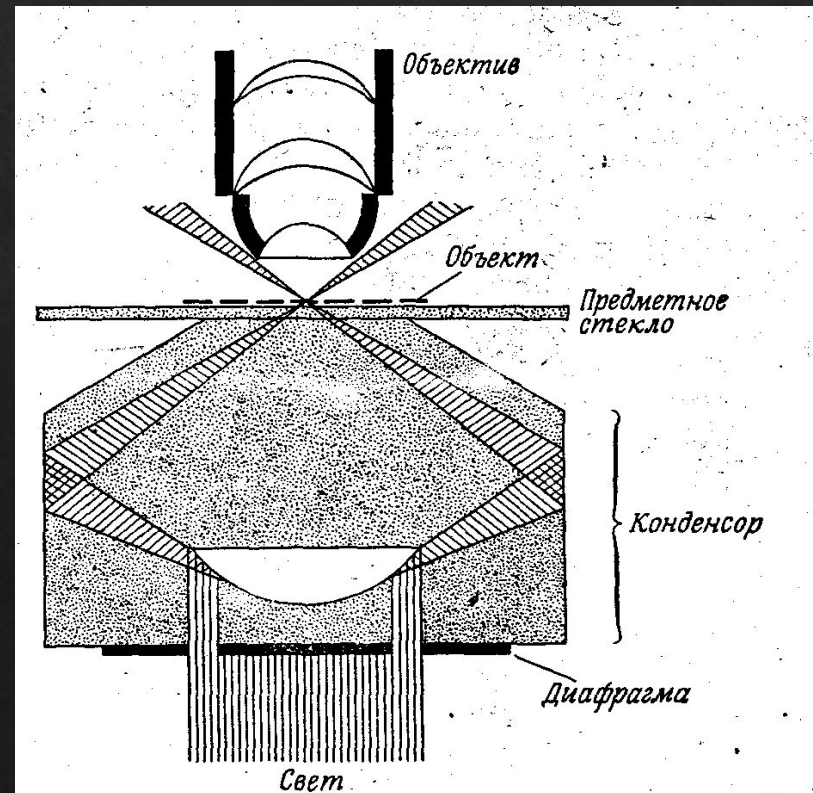
- ◆ Светлопольная
- ◆ Темнопольная
- ◆ Люминесцентная
- ◆ Поляризационная
- ◆ Фазово-контрастная

О светлопольной микроскопии мы с вами говорили в прошлый раз, но это — лишь верхушка айсберга...

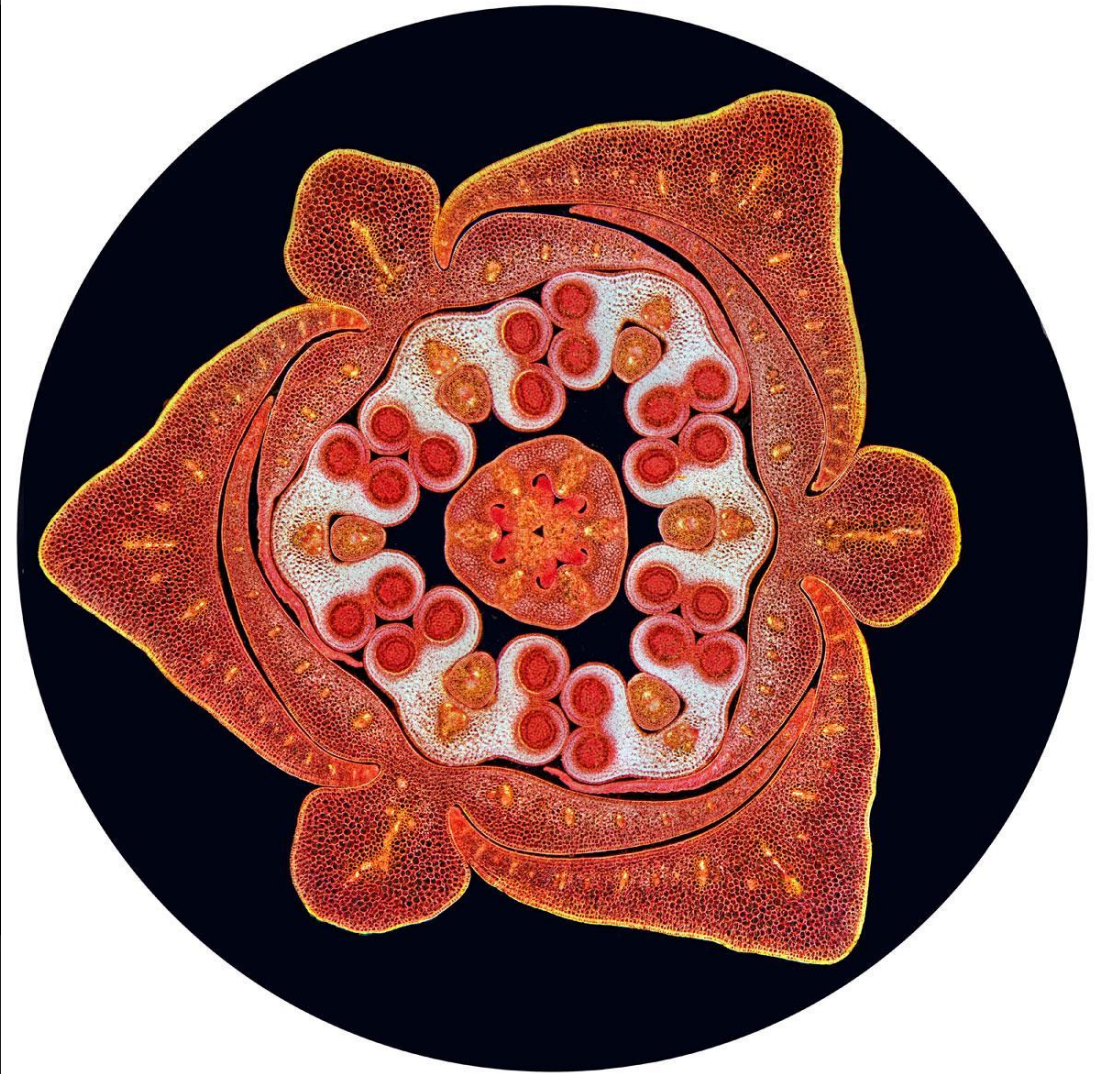
# ТЕМНОПОЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Контраст изображения увеличивают за счет регистрации только света, рассеянного изучаемым образцом.

Препарат освещается пучком света шире, чем «входное отверстие» (*апертура*) объектива. Оптически неоднородные детали объекта рассеивают падающий свет, и в объектив попадают только преломлённые объектом лучи; свет, не отразившийся от объекта, в такой микроскоп не виден.



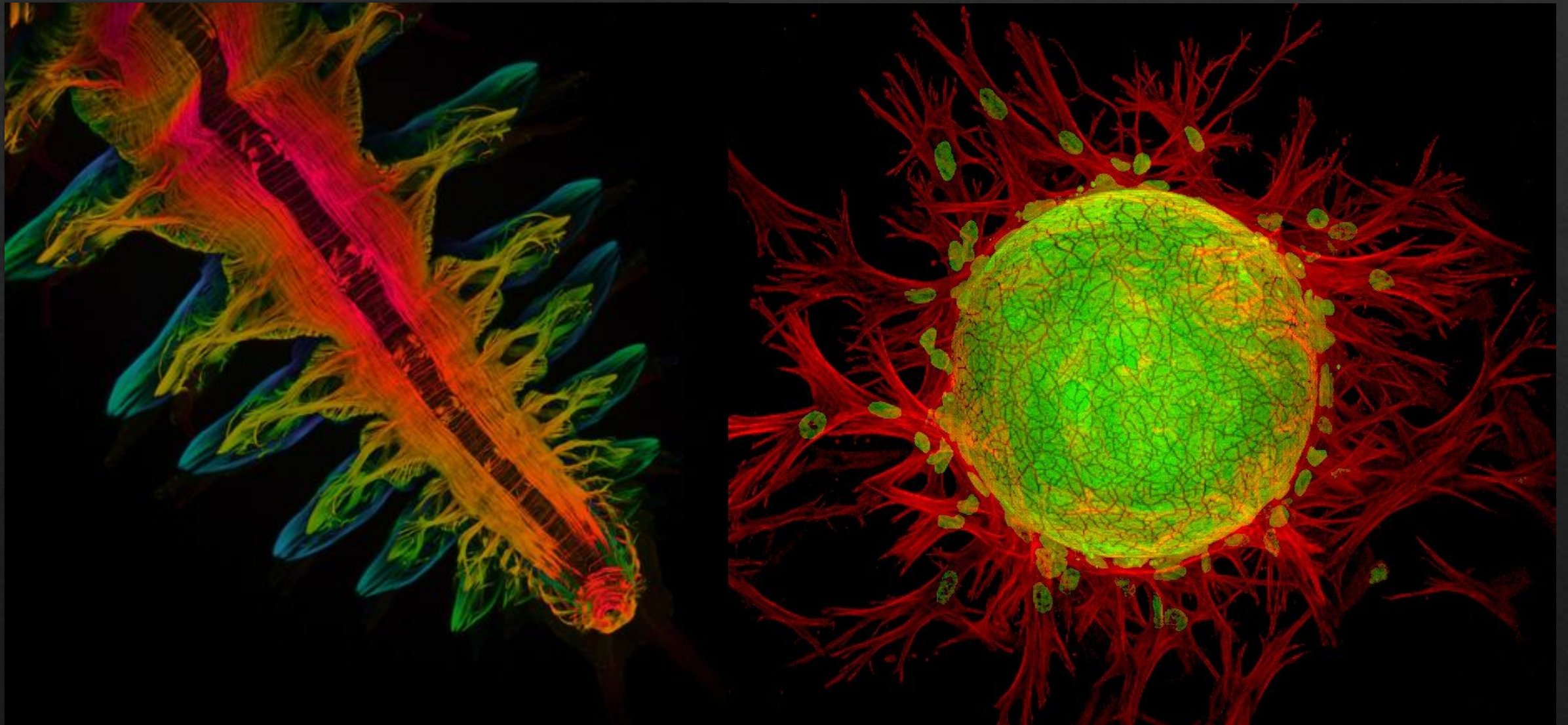
# ТЕМНОПОЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ



# ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Она же флуоресцентная. Основной принцип — регистрация люминесценции окрашенных «светящимся» красителем структур в ультрафиолетовом излучении. Используемые красители как правило специфически связываются с определёнными молекулами. Флуоресцентным так же является *конфокальный* микроскоп, о котором мы поговорим позднее.

# ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ



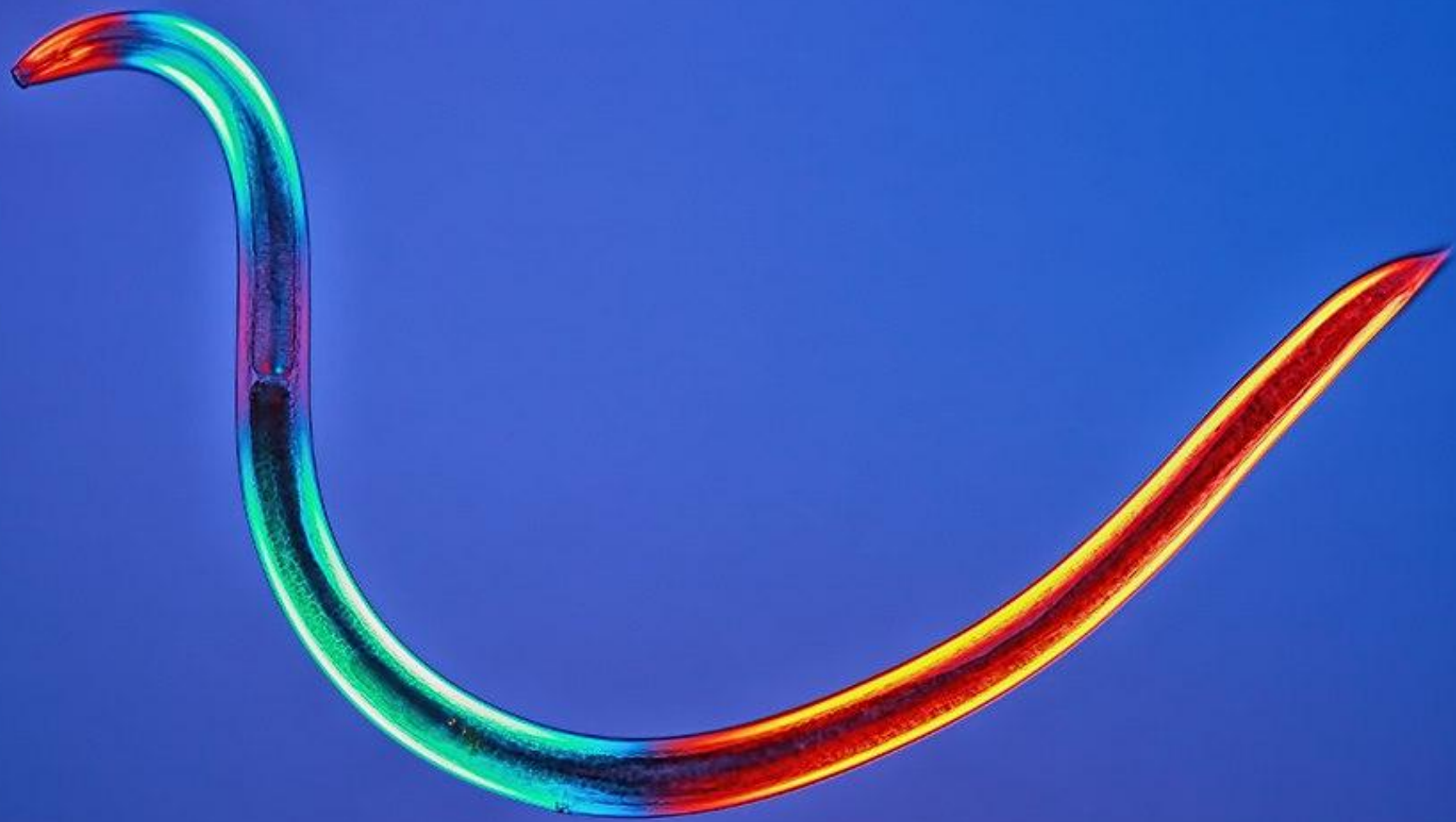
# ПОЛЯРИЗАЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Основной принцип работы – через пару поляризационных фильтров проходит только тот свет, который соответствующим образом изменит свою поляризацию при отражении от определённых участков объекта. Участки, не меняющие поляризацию света, остаются затемнёнными.

# ПОЛЯРИЗАЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ





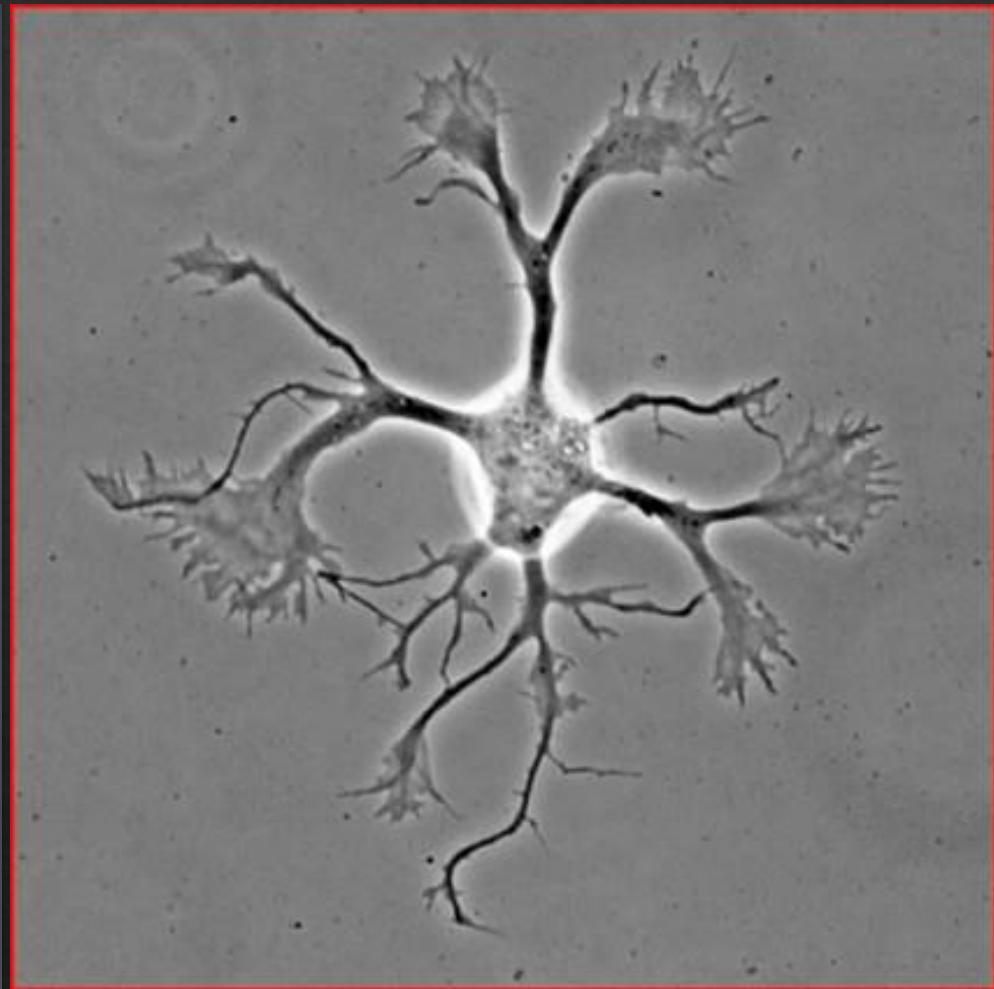


# ФАЗОВО-КОНТРАСТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Использует интерференцию световых лучей. Сквозь объект проходит два когерентных световых луча; если эти лучи не преломляются, они гасят друг друга за счёт интерференции. При преломлении этих лучей во время прохождения сквозь различные структуры объекта изменяется оптический путь света, а соответственно — фаза колебания этой электромагнитной волны, и когерентные лучи перестают интерферировать.

Используется для наблюдения за объектами *in vivo*, так как не требует их окраски.

# ФАЗОВО-КОНТРАСТНАЯ МИКРОСКОПИЯ



# РЕНТГЕНОВСКАЯ МИКРОСКОПИЯ

Используется для изучения объектов, размеры которых сопоставимы с длиной рентгеновской волны.

В прозрачных для данного излучения средах рентгеновские лучи практически не преломляются, что делает невозможным их фокусировку с помощью линз. По способу решения этой проблем рентгеновскую микроскопию делят на:

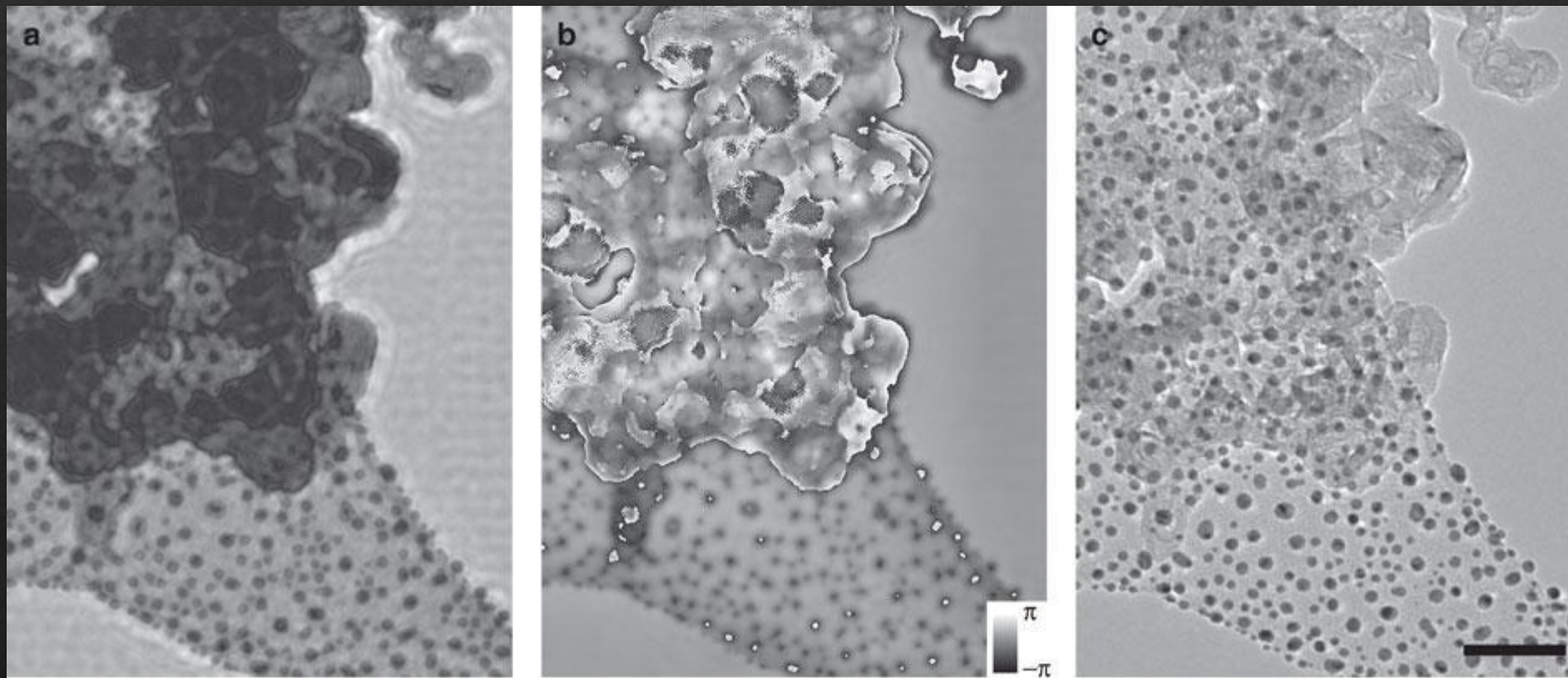
- ◆ Проекционную
- ◆ Отражательную

Также рентгеновское излучение само по себе не видно человеческому глазу. Поэтому в рентгеновской микроскопии используется фототехника или *электронно-оптические преобразователи*, способные преобразовывать рентгеновское излучение в видимое глазу.

# ПРОЕКЦИОННАЯ РЕНТГЕНОВСКАЯ МИКРОСКОПИЯ

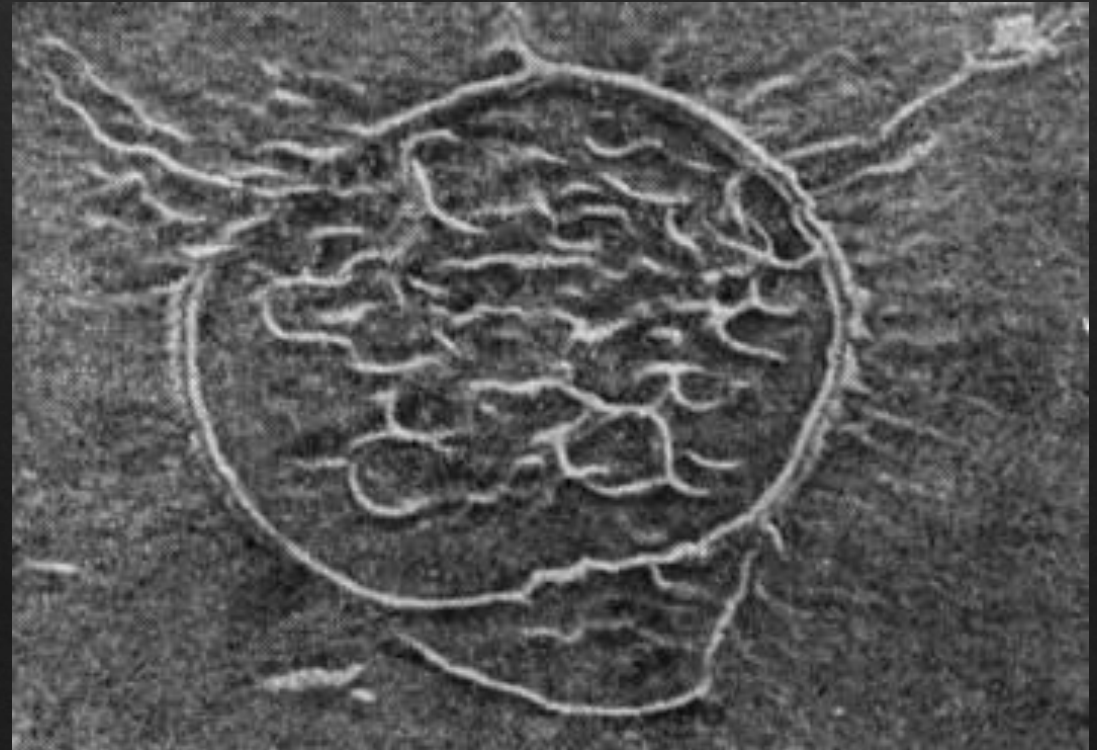
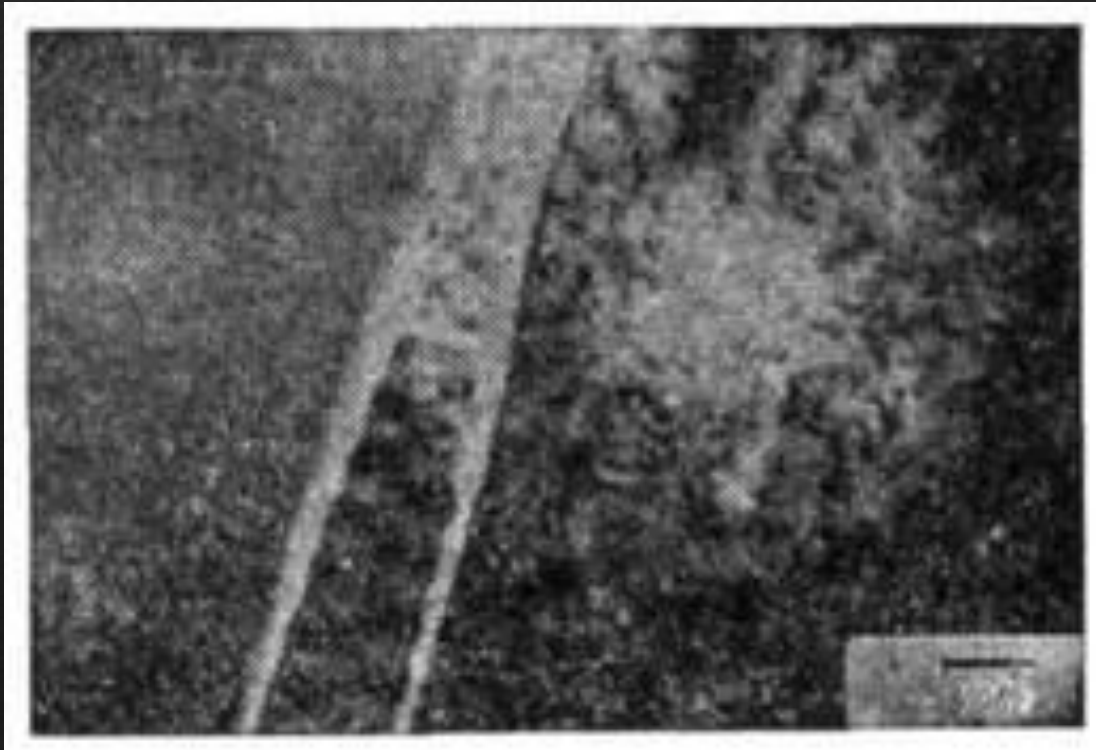
использует поглощение проходящего через объект рентгеновского излучения. По поглощающей способности можно определить не только структуру объекта, но и его химический состав. Для фокусировки излучения после прохождения через объект используются зонные пластинки Френеля, поглощающие один луч из пары когерентных, что позволяет исключить интерференцию и таким образом заменить собирающую линзу. Разрешающая способность таких микроскопов достигает 30 Нм.

# ПРОЕКЦИОННАЯ РЕНТГЕНОВСКАЯ МИКРОСКОПИЯ



# ОТРАЖАТЕЛЬНАЯ РЕНТГЕНОВСКАЯ МИКРОСКОПИЯ

Для фокусировки используется система зеркал. Не получили широкого распространения из-за сложности в конструировании и эксплуатации при большом количестве различных помех, искажающих изображение.



# ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Вместо светового пучка используется пучок электронов, что позволяет увеличить разрешающую способность до одного ангстрема. Фокусировка осуществляется с помощью магнитных линз, управляющих движениями электронов.

Выделяется:

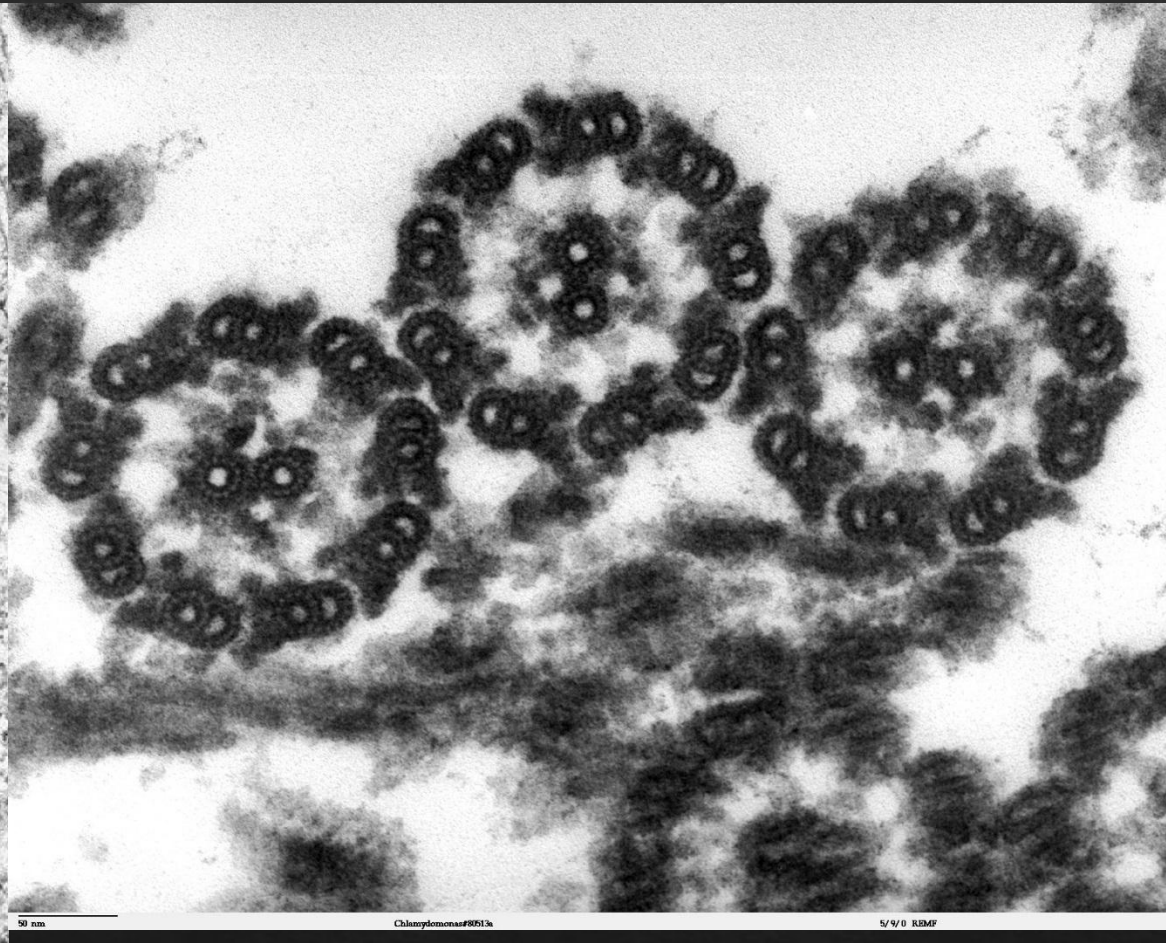
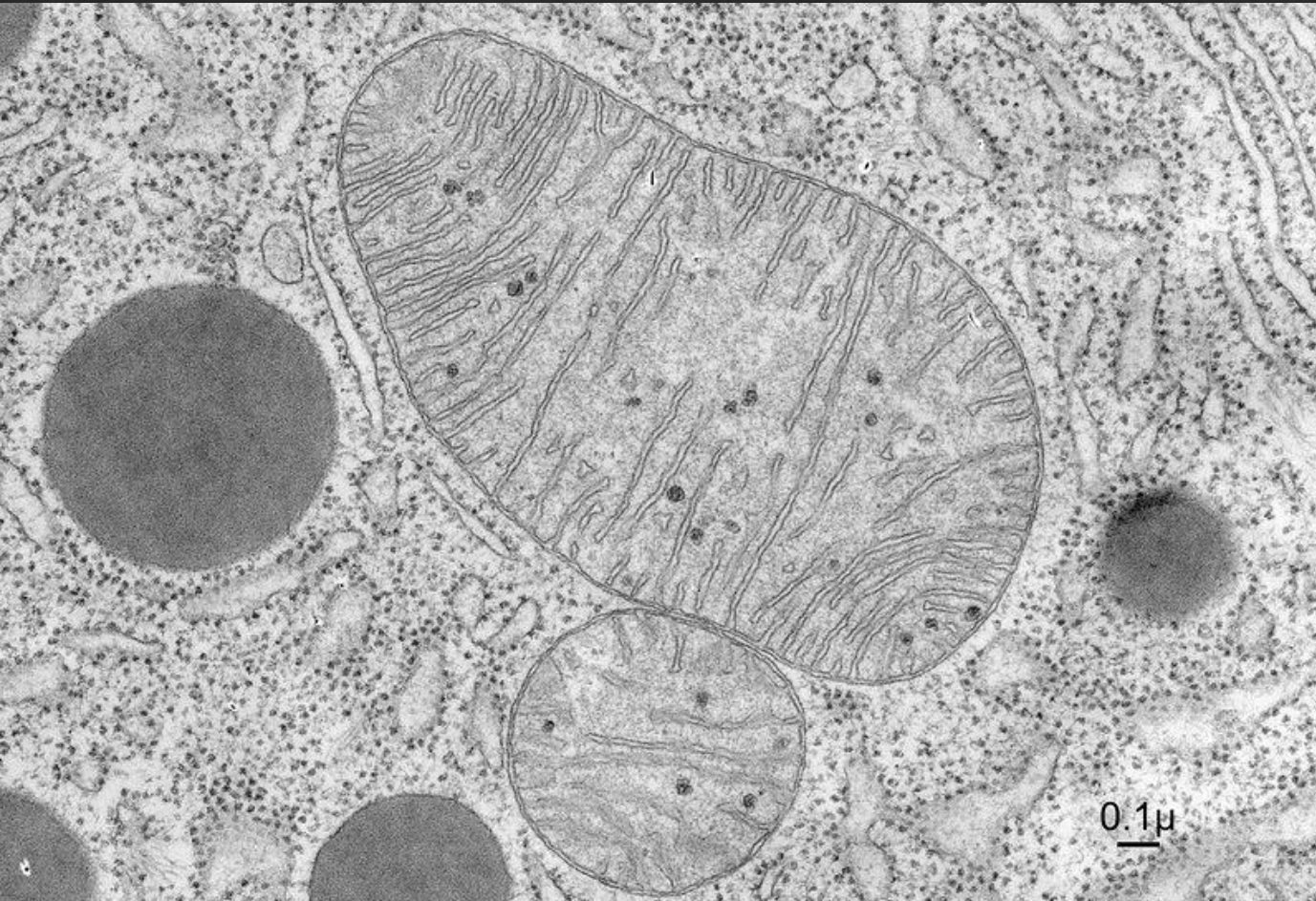
- ◆ Просвечивающая электронная микроскопия
- ◆ Растровая (сканирующая) электронная микроскопия

Принцип просвечивающей электронной микроскопии такой же, как у светопольной оптической, вся разница — в используемом излучении и способе фокусировке. Ну и конечно же в разрешающей способности микроскопа 😊



# ПРОСВЕЧИВАЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

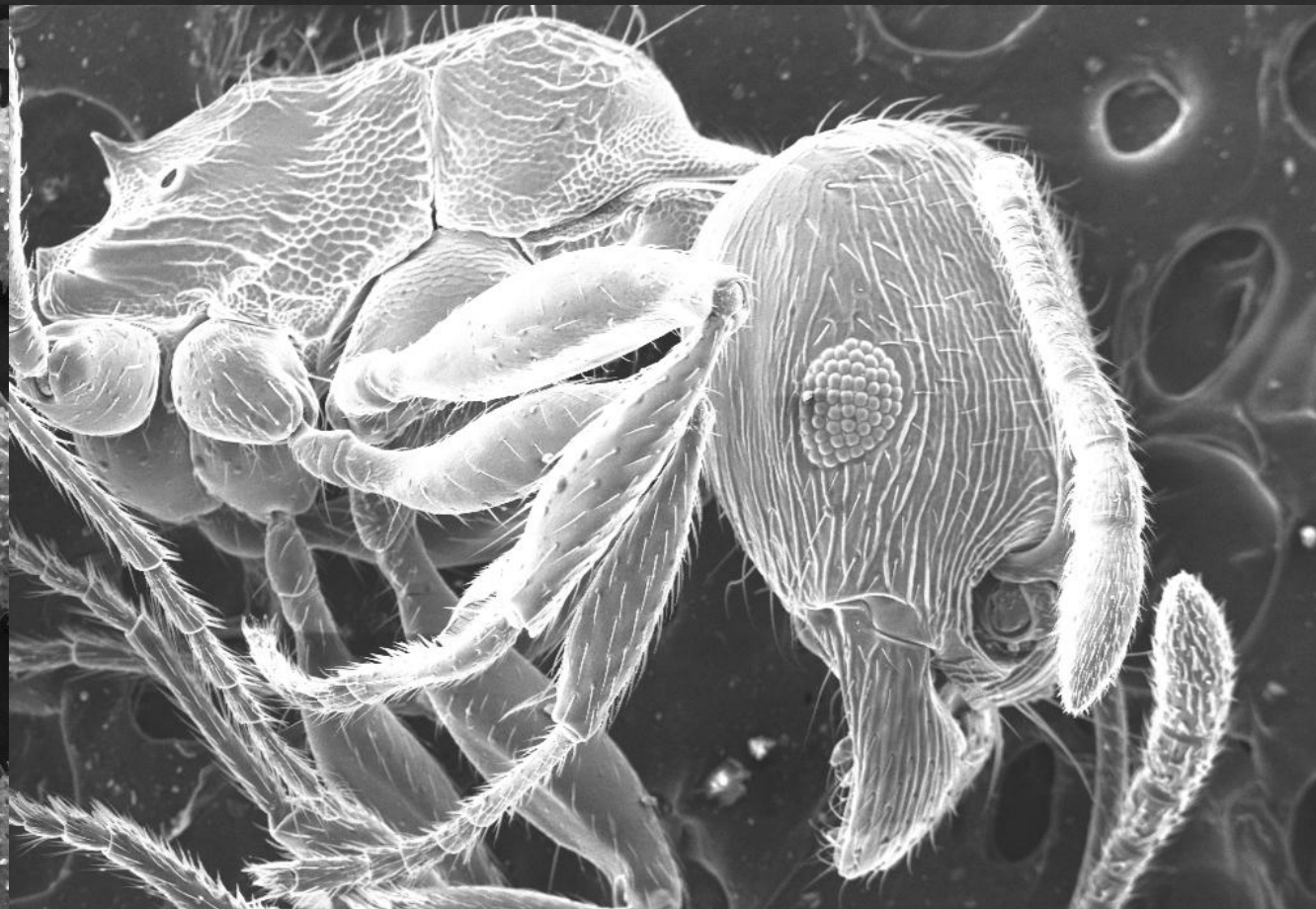
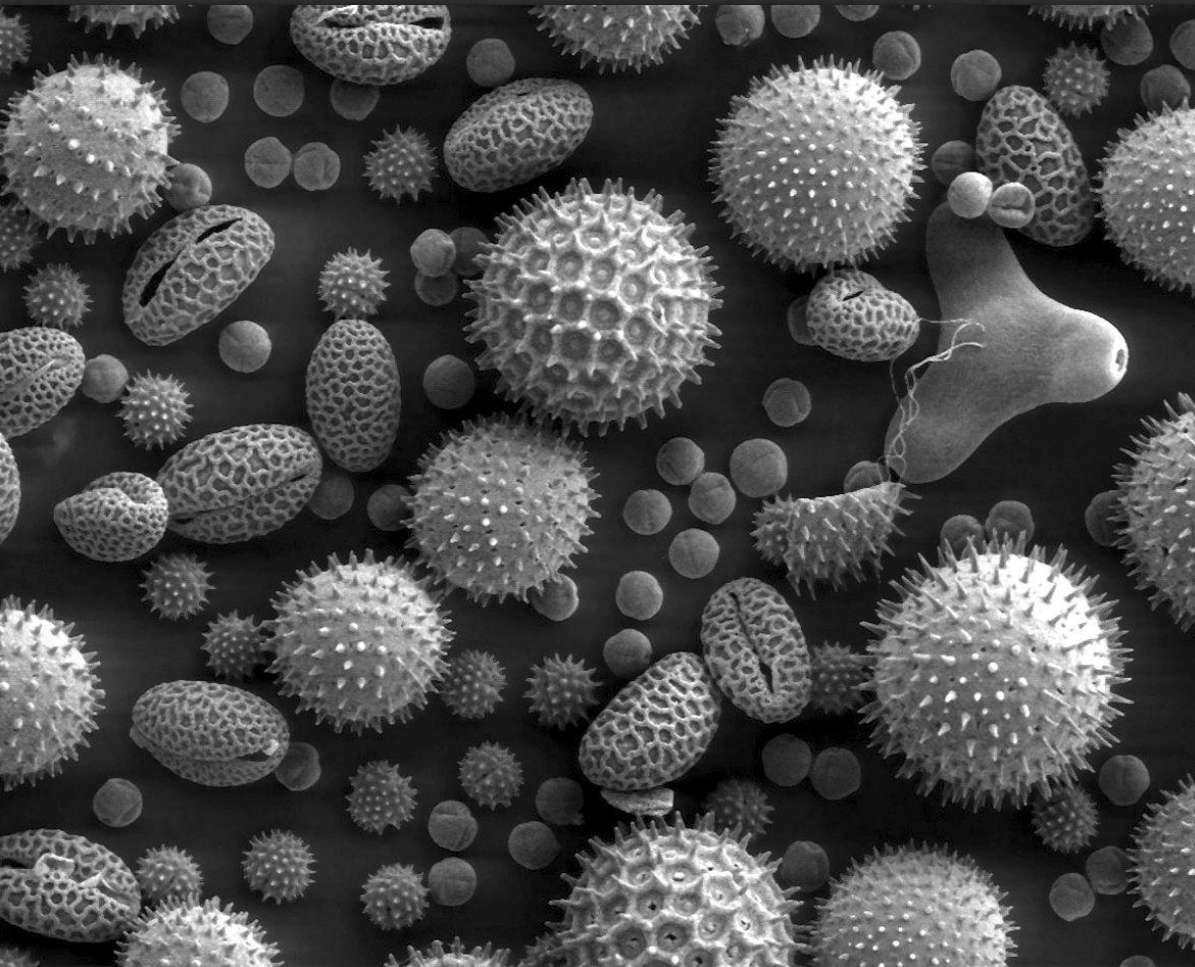
Она же - трансмиссионная



# СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Используется для получения изображения поверхности объекта. При попадании пучка электронов на поверхность объекта генерируются низкоэнергетичные вторичные электроны, которые собираются детектором. По интенсивности электрического сигнала детектора определяется топография особенностей рельефа поверхности образца.

# СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ



20 KV 71.1 X 1 mm KYKY-EM3900 SN:1052

# КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Также, как и люминесцентная, использует свечение окрашенных структур. В отличие от флуоресцентного, конфокальный микроскоп возбуждает люминесценцию объекта с помощью лазера, что позволяет увеличить разрешающую способность. С помощью конфокального микроскопа получают изображения объекта с серии *фокальных плоскостей* (серия оптических срезов). Затем эти изображения «склеивают» на компьютере друг с другом и получают трёхмерное изображение объекта.

# КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ

