

# Přednášky z lékařské biofyziky

Biofyzikální ústav Lékařské fakulty  
Masarykovy univerzity, Brno

# MIKROSKOPIE



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Obsah přednášky

- Optický mikroskop a jeho varianty
- Optické skenovací mikroskopy
  - Laserový konfokální skenovací mikroskop
- Elektronová mikroskopie
  - Transmisní elektronový mikroskop
  - Skenovací elektronový mikroskop
  - Skenovací tunelový mikroskop
- Mikroskopy založené na jiných fyzikálních principech
  - ATM - Atomic force microscopy
  - Akustická mikroskopie

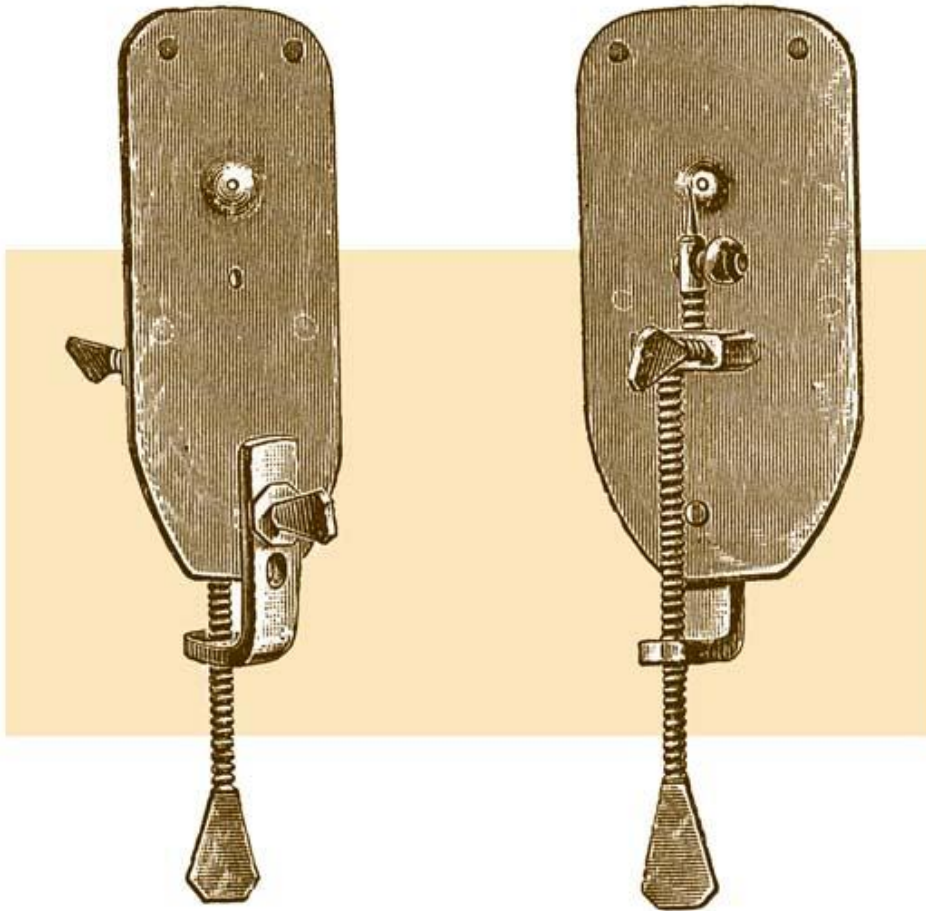
# Úvod

- 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.

# Úvod

- První mikroskop byl vyroben v Nizozemsku na konci 16. století. Anthony van Leewenhoek (1632-1723) zdokonalil jeho konstrukci po roce 1650 (rozlišení může být kolem 2000 čar na mm).
- 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.

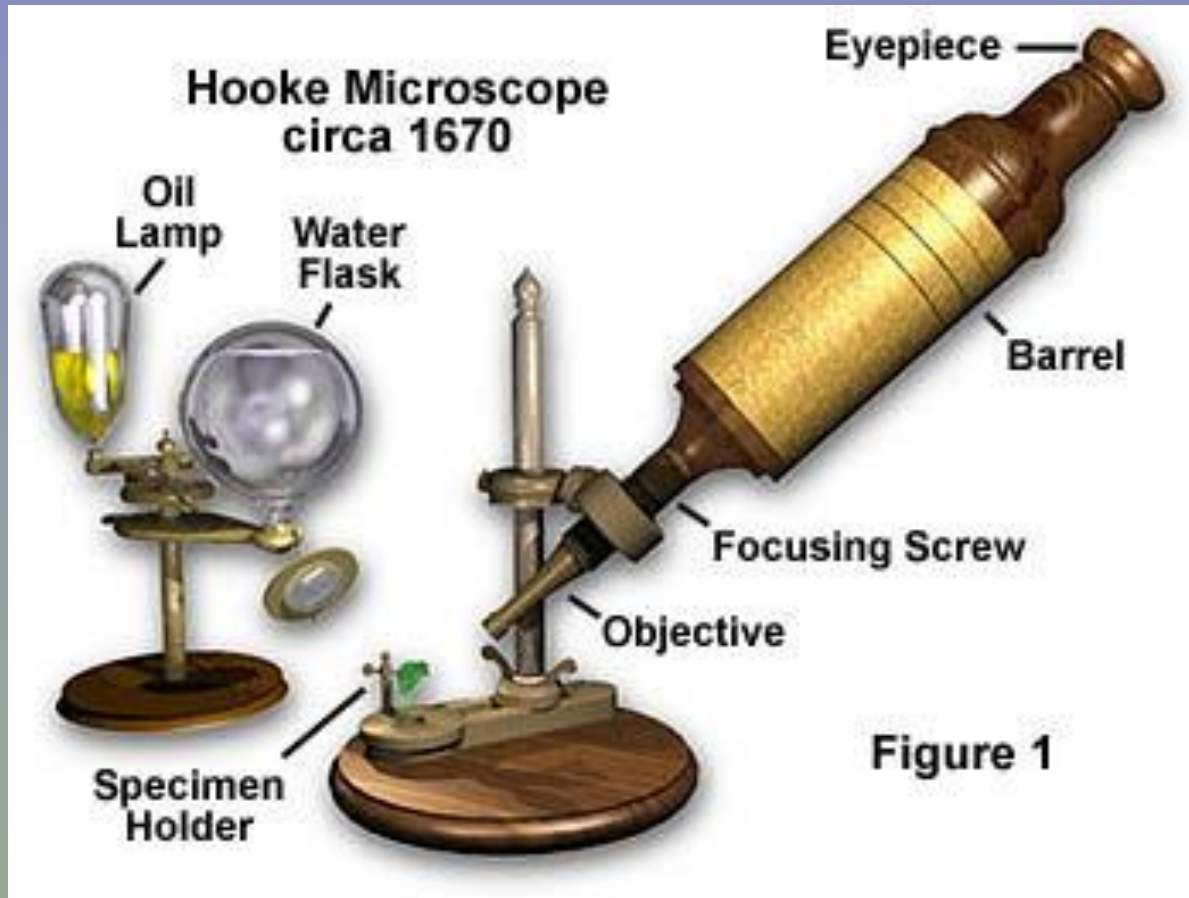
# První použitelný mikroskop (17. století)



[www.arsmachina.com/images/loeuwenhoek\\_thmb.jpg](http://www.arsmachina.com/images/loeuwenhoek_thmb.jpg)

# První mikroskop

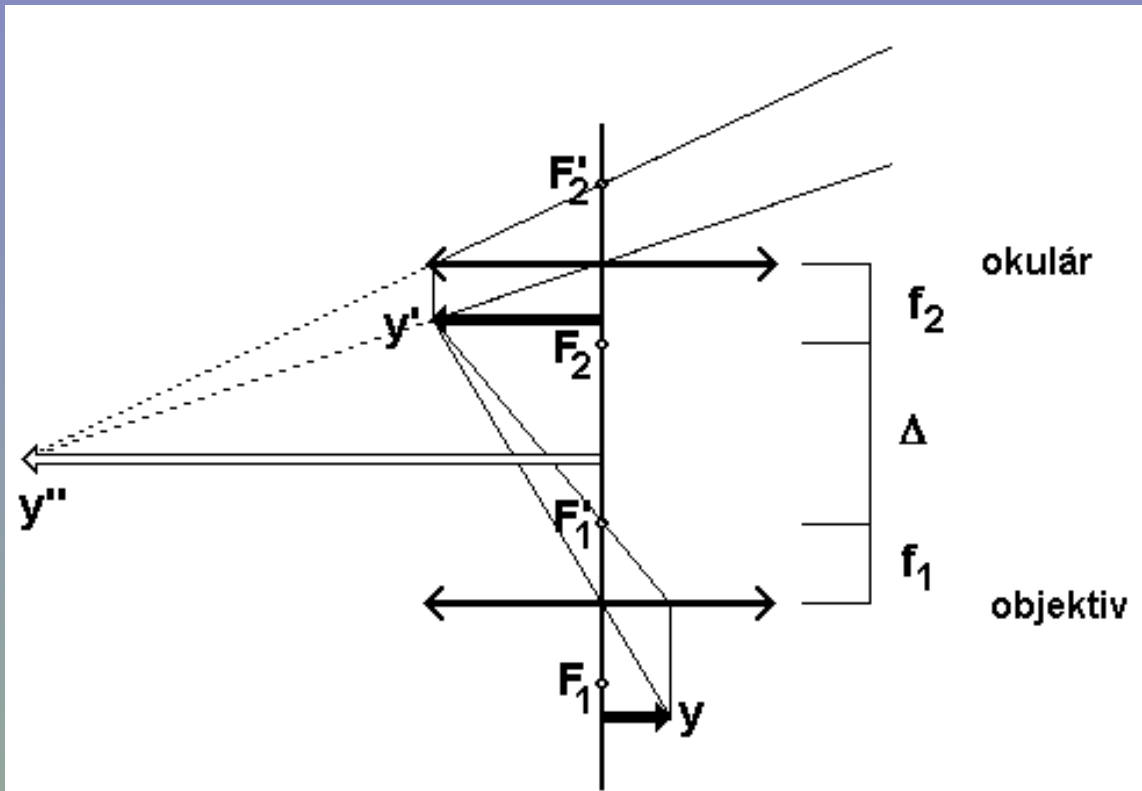
- Robert Hook 1670



# 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 okulem se nazývá **tubus**. Obraz vytvořený objektivem (umístěný hned za předmětové ohnisko okuláru) je pozorován **okulem** jako jednoduchou lupou. Výsledkem je velmi zvětšený, převrácený a neskutečný obraz.
- **Kondensor** je optickým systémem soustřeďujícím světlo na pozorovaný objekt, zajišťuje jeho dokonalé osvětlení.

# Optické schéma a zvětšení mikroskopu



$F$  – ohniska,

$f$  – ohniskové vzdálenosti,

$y$  - předmět,

$y'$  – skutečný obraz  
předmětu tvořený  
objektivem,

$y''$  – neskutečný obraz  
viděný v okulárem,

$\Delta$  – optický interval  
mikroskopu.

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

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

$\Delta$  – optický interval mikroskopu,

$f_{ob}$  a  $f_{ep}$  jsou ohniskové vzdálenosti objektivu  
a okuláru.

# Objektivy mikroskopů



# Objektivy mikroskopů



Různé objektivy vybavené apochromatickou korekcí optických vad objektivu

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

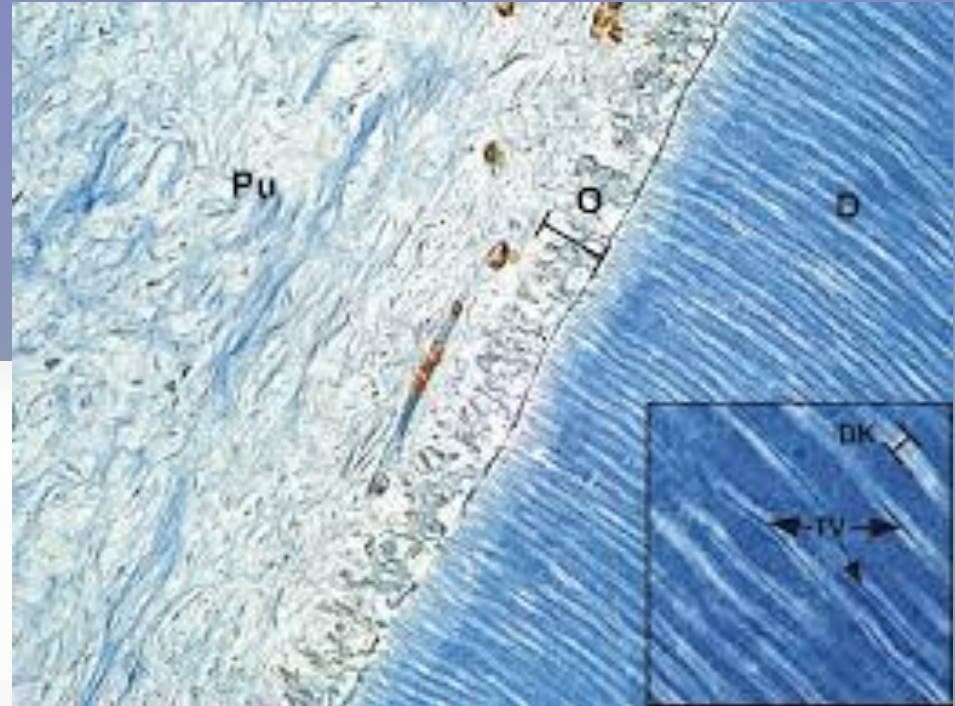
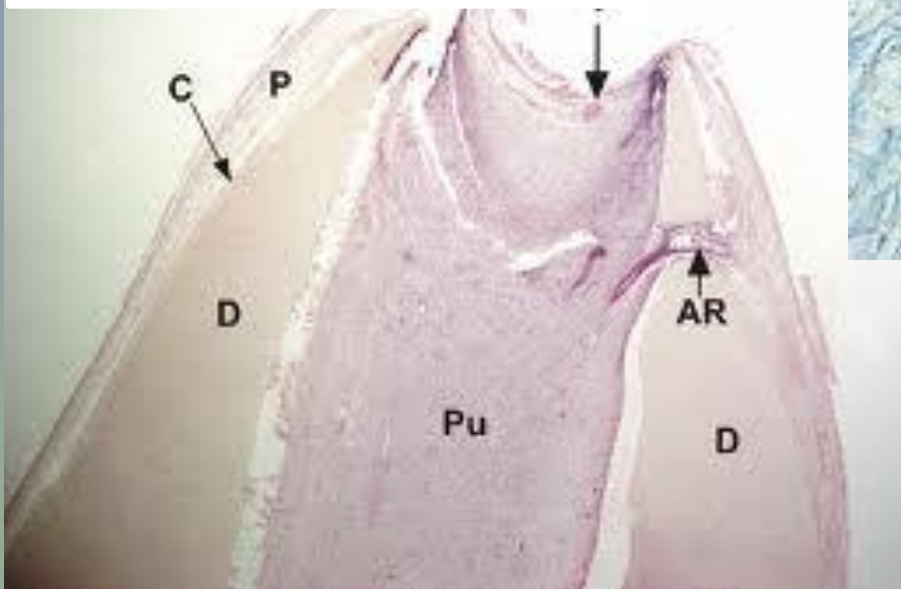
**Korekce optických vad - Achro a Achromat** (achromatické), **Fl, Fluar, Fluor, Neofluar, Fluotar** (fluoritové čočky, lepší odstranění kulové a barevné vady), **Apo** (apochromatické, nejvyšší stupeň korekce kulové a barevné vady), **Plan-** korekce zklenutí zorného pole ( zaostření rovinného objektu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



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

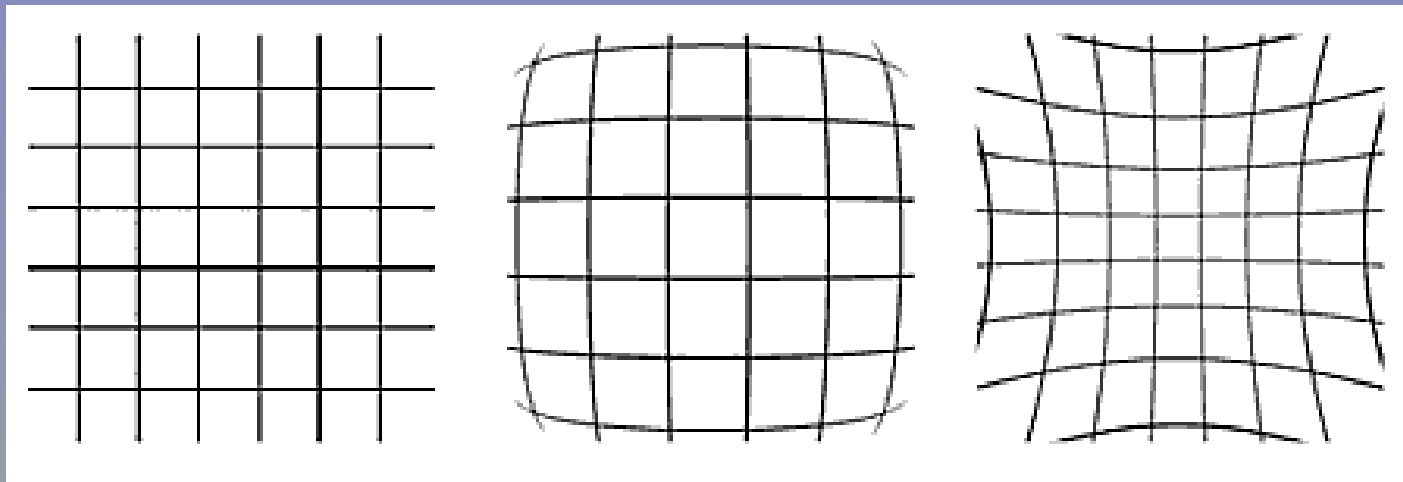
# Preparát zubu svět. mikroskop

[www.ultrastruktura.upol.cz](http://www.ultrastruktura.upol.cz)



[www.lfp.cuni.cz](http://www.lfp.cuni.cz)

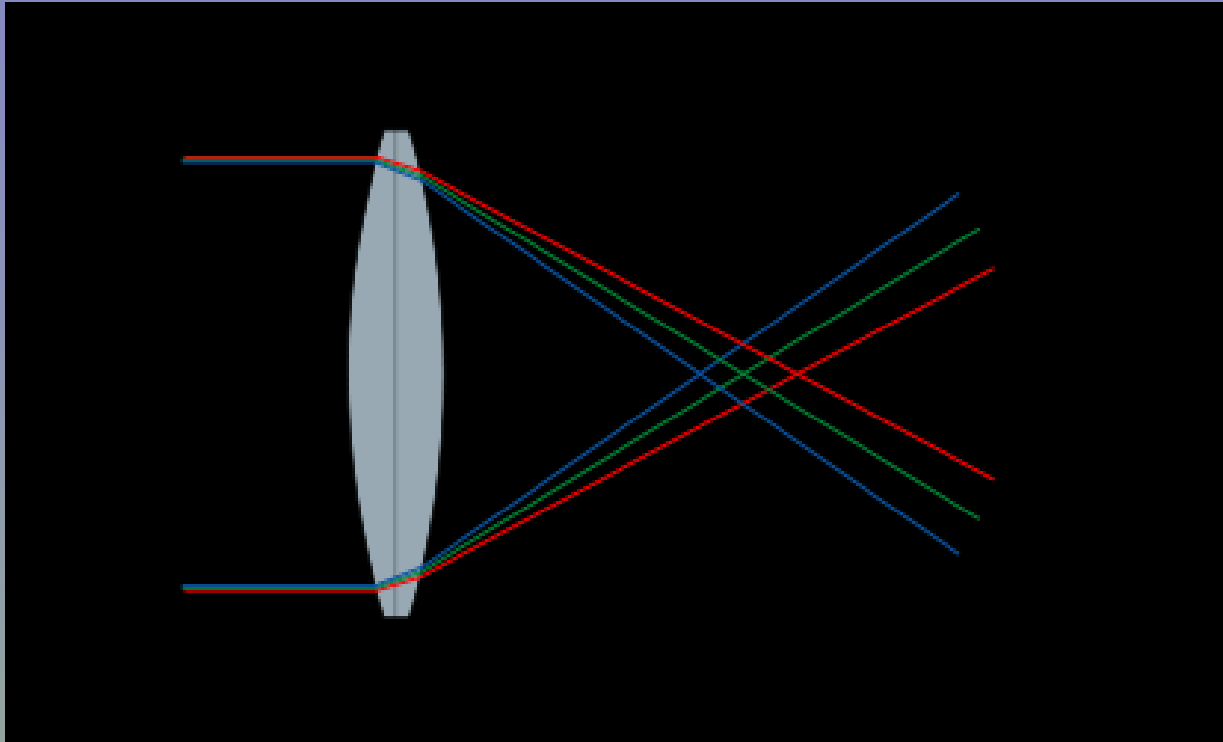
# Sférické vady



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

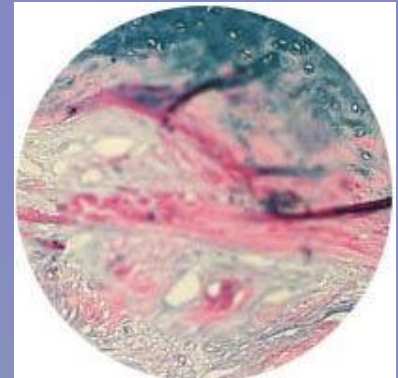
- <http://apfyz.upol.cz/ucebnice/down/optmikro.pdf>

# Barevné vady

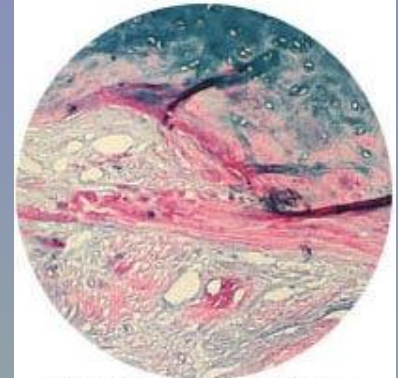


Rozklad bílého světla na barevné spektrum, korekce na 2 až 3 barvy, nejčastěji žlutá, zelená a červená oblast.

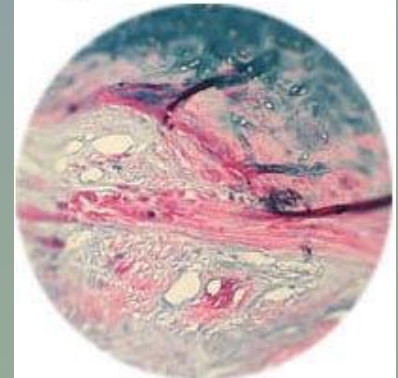
<http://cs.wikiversity.org/wiki/MedFyz>



(a) Edges in focus



(b) Entire viewfield in focus



(c) Center in focus

Figure 2

# Objektivy mikroskopů



# 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),

$$NA = n \cdot \sin \alpha$$

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

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

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

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

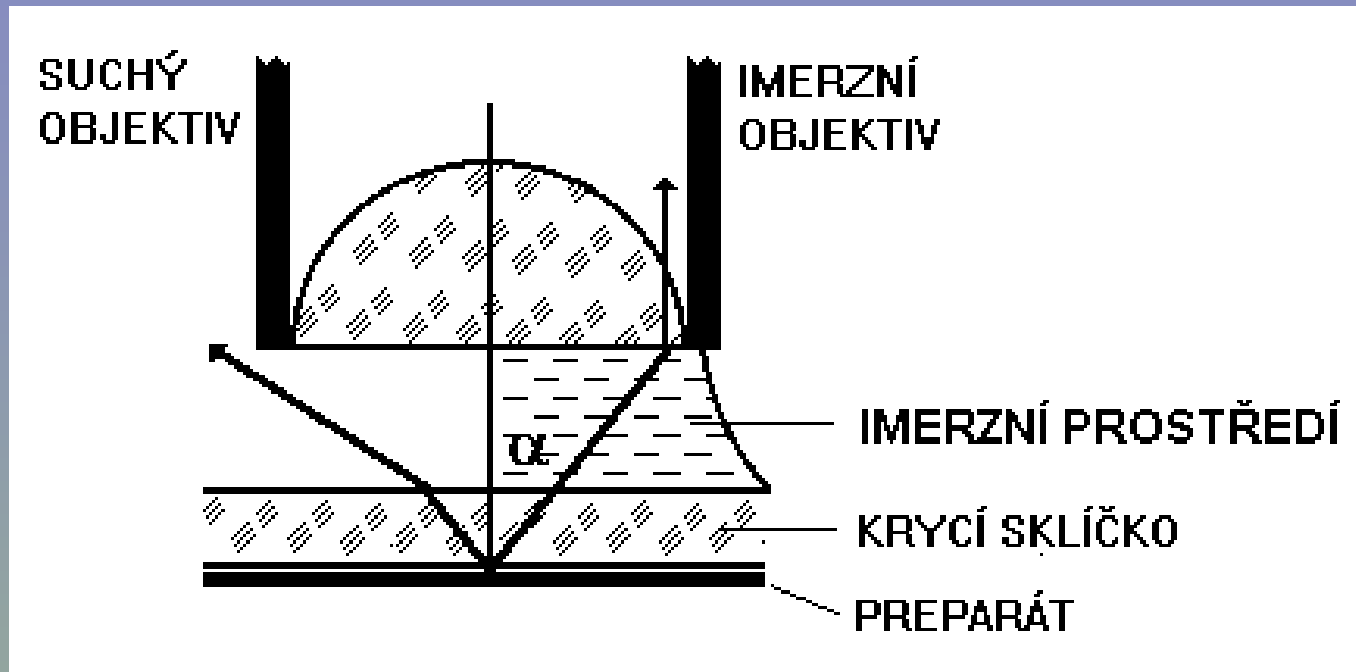
$$n_{\text{cedrový olej}} = 1,515$$

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

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

- NA maximální hodnota je kolem 1,5

# Použití imersního 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 imersního prostředí (jež má index lomu podobný jako sklo mezi 1,5 -1,9), nemění svůj směr a podílí se na tvorbě obrazu.

# Mez prostorové rozlišovací schopnosti mikroskopu

- Mezní rozlišovací schopnost je úměrná **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 ( $NA = n \cdot \sin \alpha$ , 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).

# 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.

# Speciální optické mikroskopy

- 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 délka objektivu se může plynule měnit - zoom – různé prostorové rozlišení.
- Moderní badatelské mikroskopy jsou vybaveny digitálními fotoaparáty pro **mikrofotografii** nebo **mikrokinematografii (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 umísťování elektrod do buněk, separování organel atd.

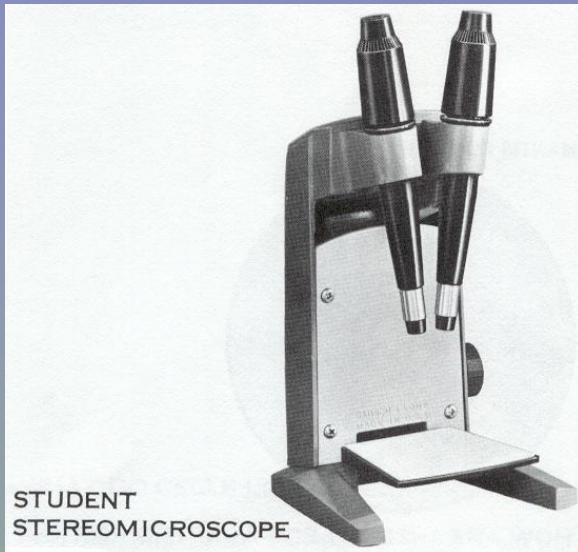
# Stereomikroskop

[www.dentalcare.cz](http://www.dentalcare.cz)



[www.stomateam.cz](http://www.stomateam.cz)

# Stereomikroskop



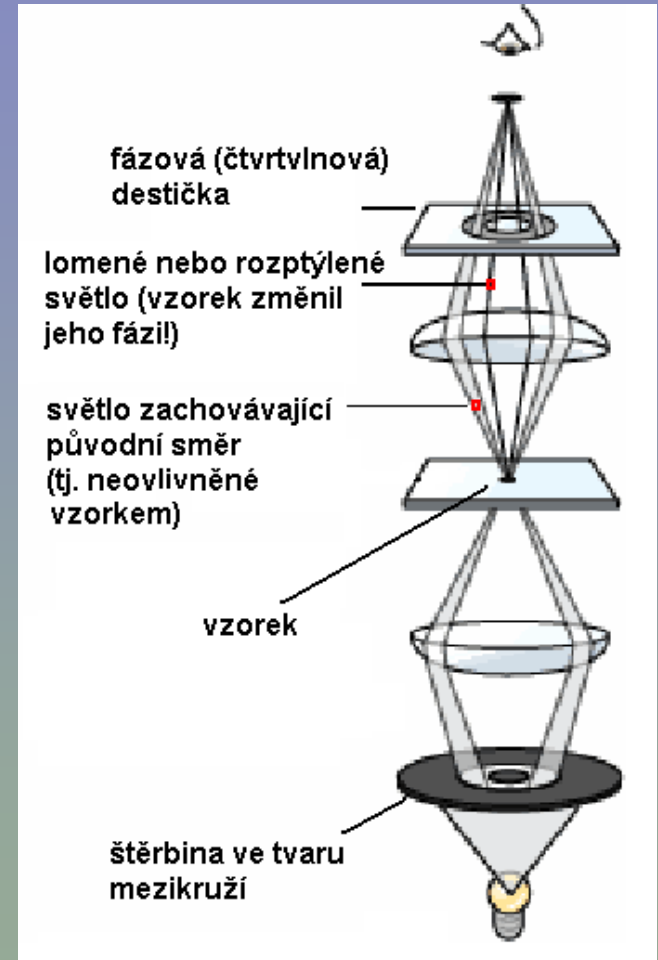
- The **OPMI® Vario/NC 33** surgical microscope

# Mikroskop s fázovým kontrastem

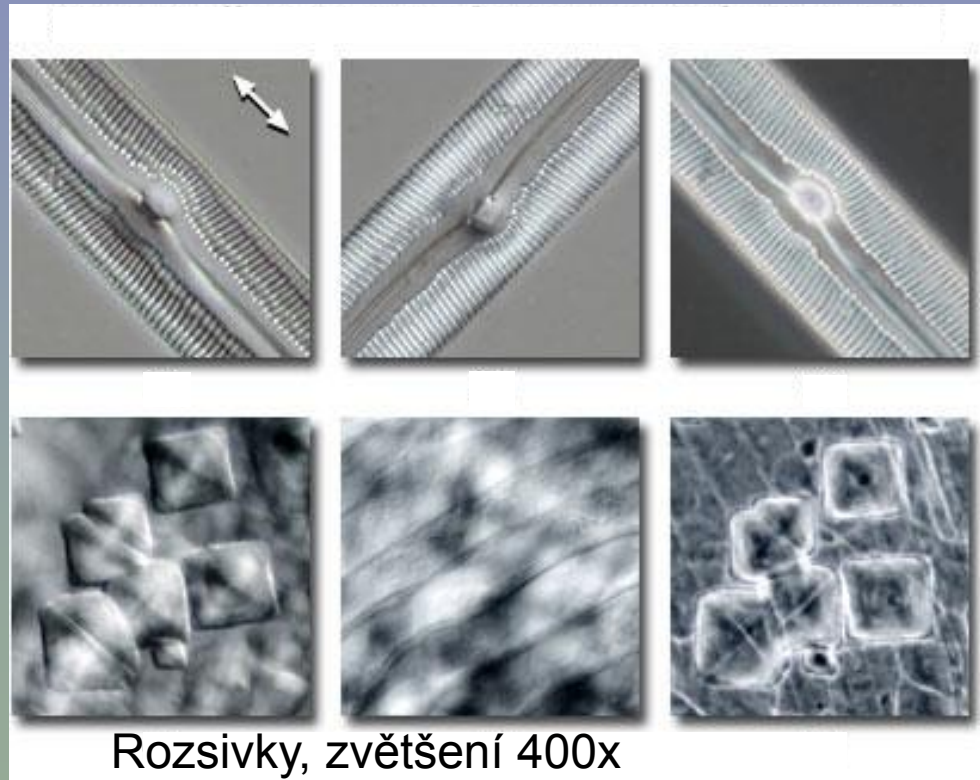
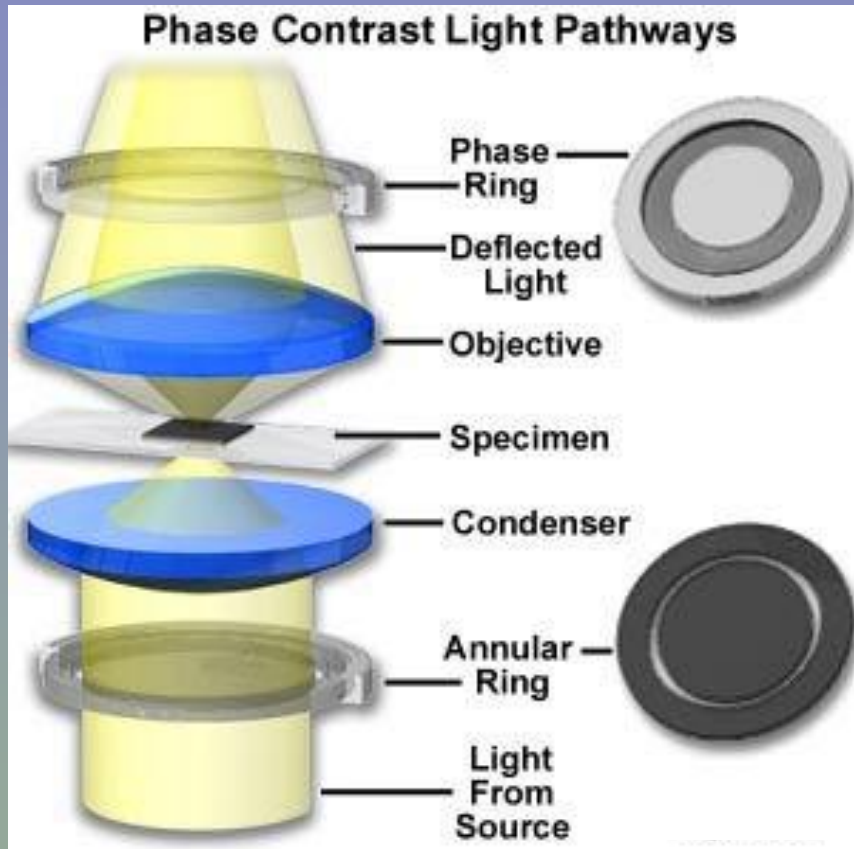
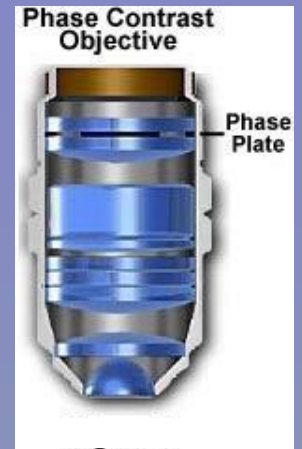
- Tato technika vytváří kontrastní obrazy např. živých buněk, jejichž struktury mají podobný útlum (jsou rovnoměrně průsvitné a proto málo kontrastní v mikroskopu zobrazujícím rozdíly v amplitudě procházejícího světla), avšak lehce se liší svým indexem lomu (v důsledku čehož dochází k fázovým posunům).
- *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.*

# 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.
- V obrazové ohniskové rovině objektivu se nachází **fázová destička**, opět ve tvaru mezikruží, jež posune 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).

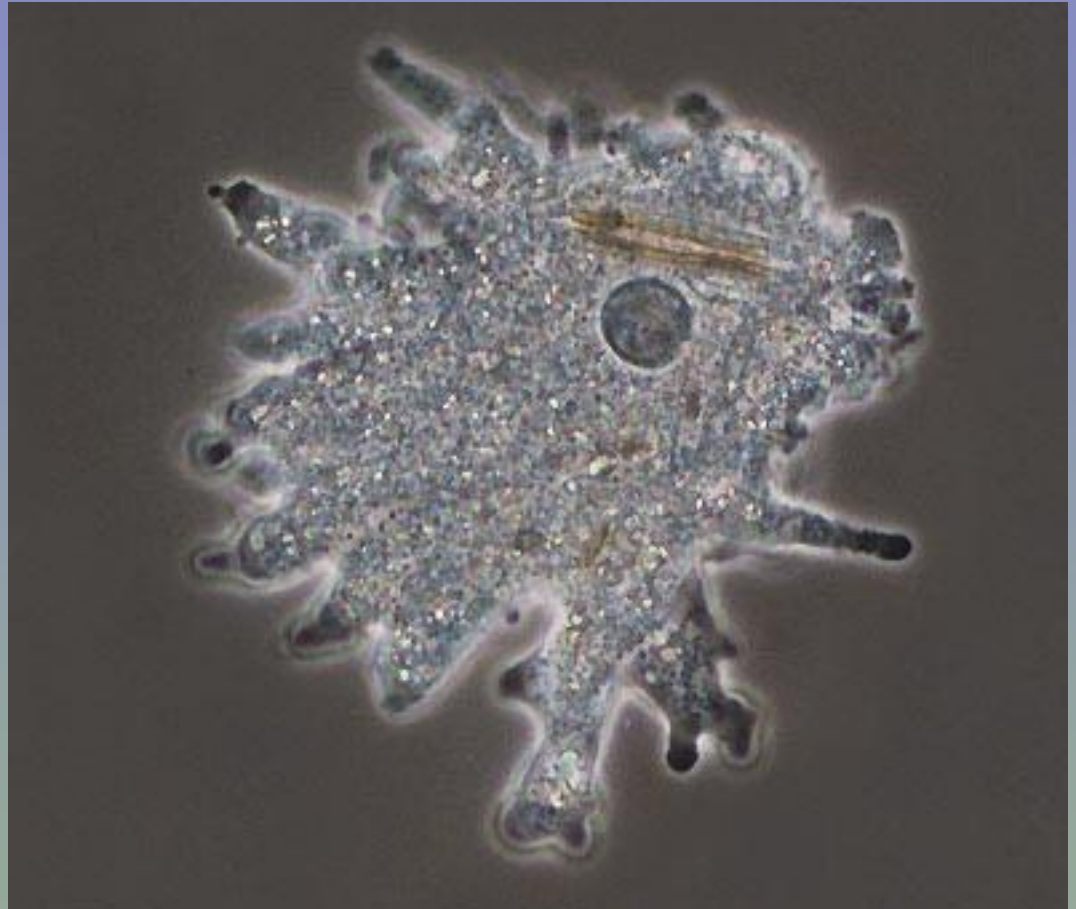


# Mikroskop s fázovým kontrastem



# 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.

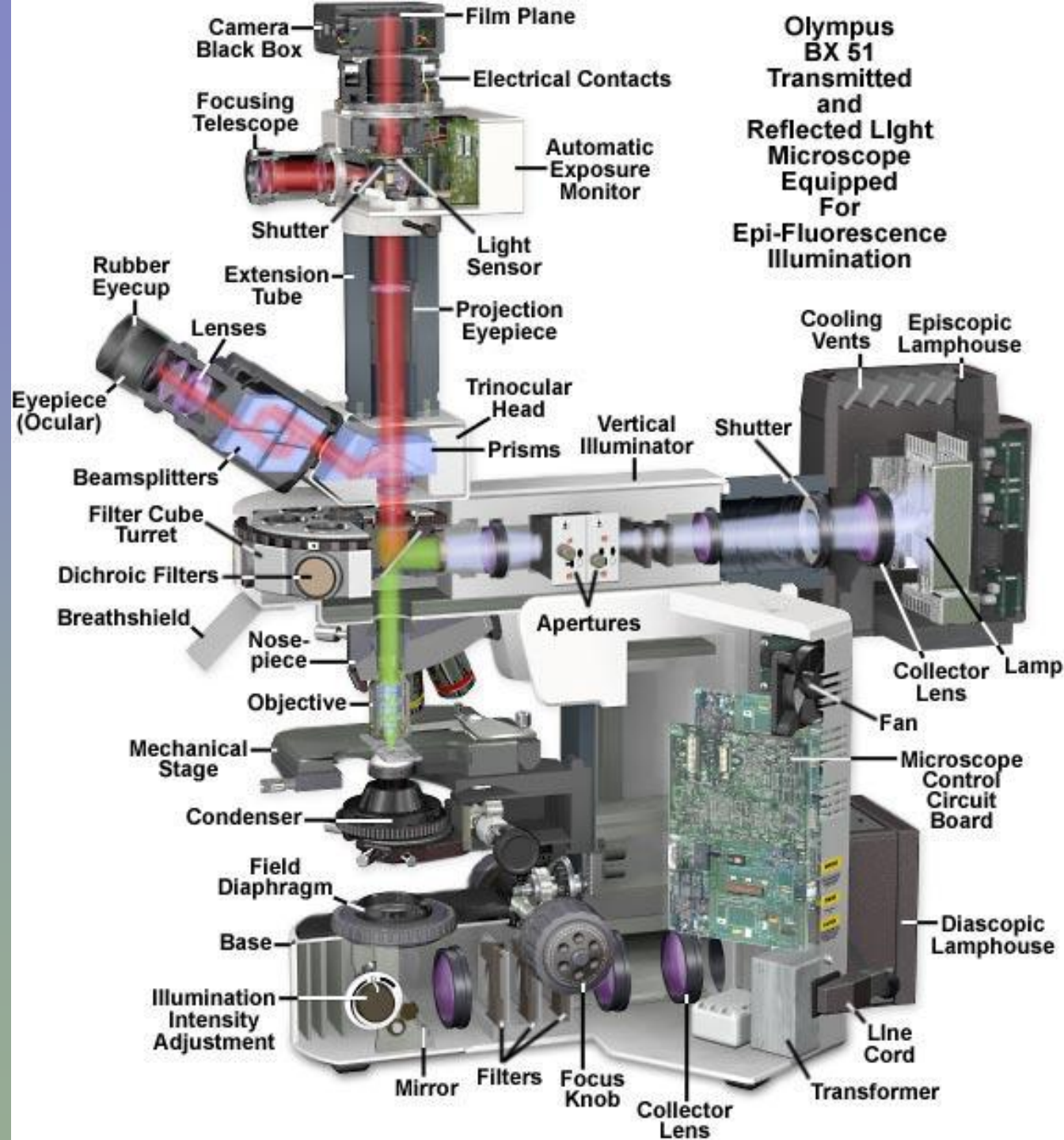


Améba ve fázovém kontrastu,  $Z = 250\times$   
([www.durr.demon.co.uk/colour.html](http://www.durr.demon.co.uk/colour.html).)

# 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, kazivcové 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 **protilátku** specifickou pro některou bílkovinu. Tato imunofluorescenční metoda může selektivně zviditelnit např. cytoskelet, chromatin či různé membránové bílkoviny.

# FM

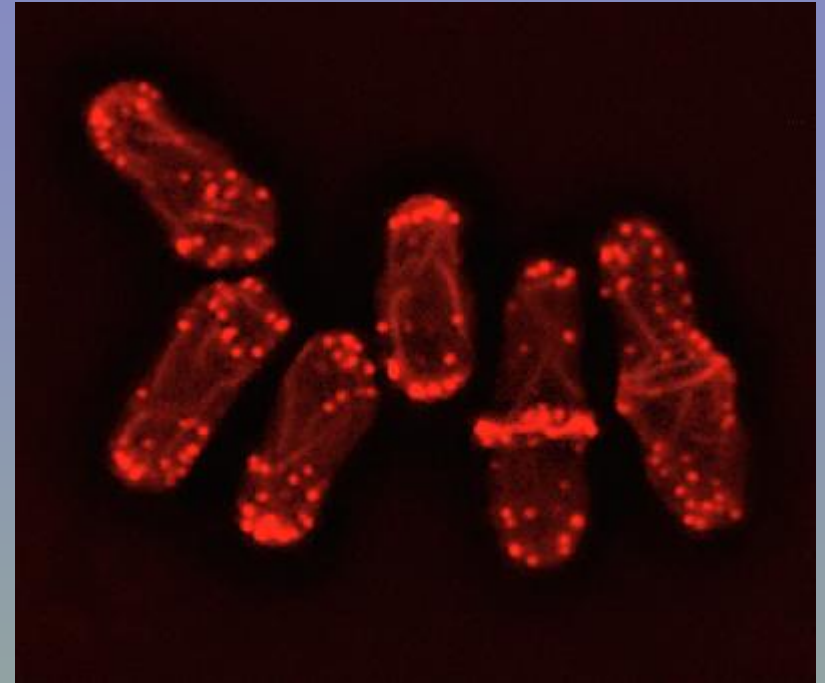


# Fluorescenční mikroskop



Viriony v infikované buňce -

<http://usa.hamamatsu.com/sys-biomedical/slcn2400/slcn-smpl.htm>

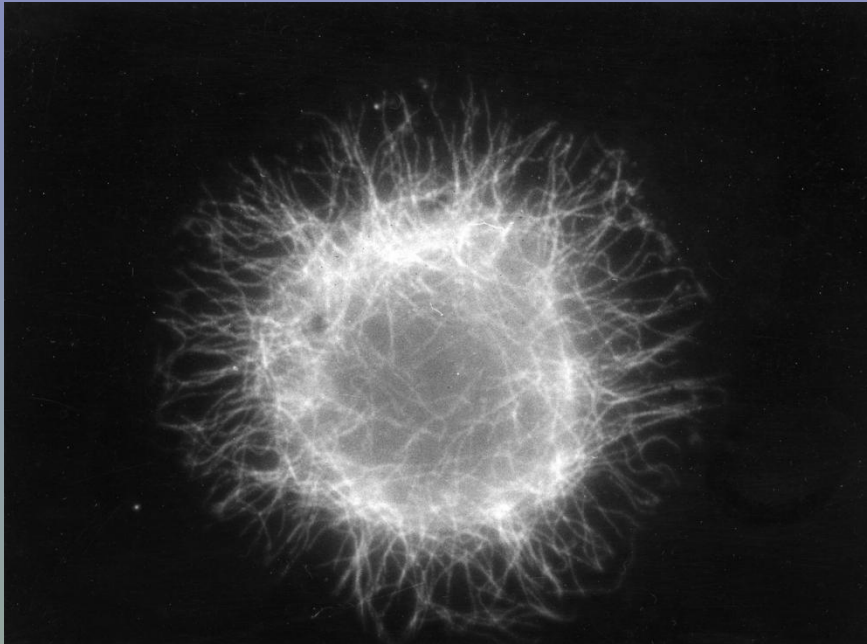


Aktinová vlákna kvasinek zviditelněná fluorescenční mikroskopií – barveno rhodaminem-phalloidinem

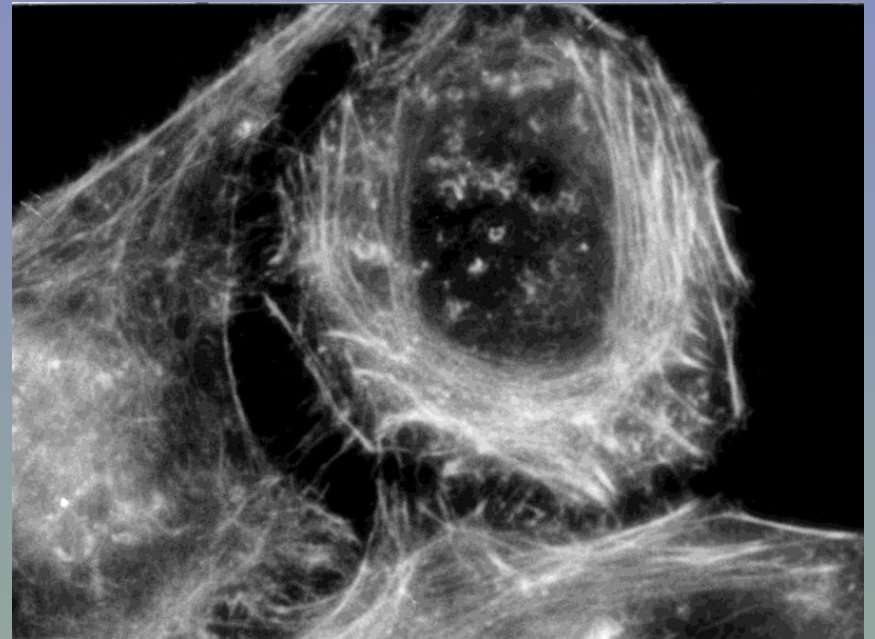
[www.paulgyoung.com/.../fission\\_yeast\\_actin\\_cytoskeleton.htm](http://www.paulgyoung.com/.../fission_yeast_actin_cytoskeleton.htm)

# Fluorescenční mikroskop

Cytoskelet zviditelněný imunofluorescenční metodou



Mikrotubuly HeLa  
buněk



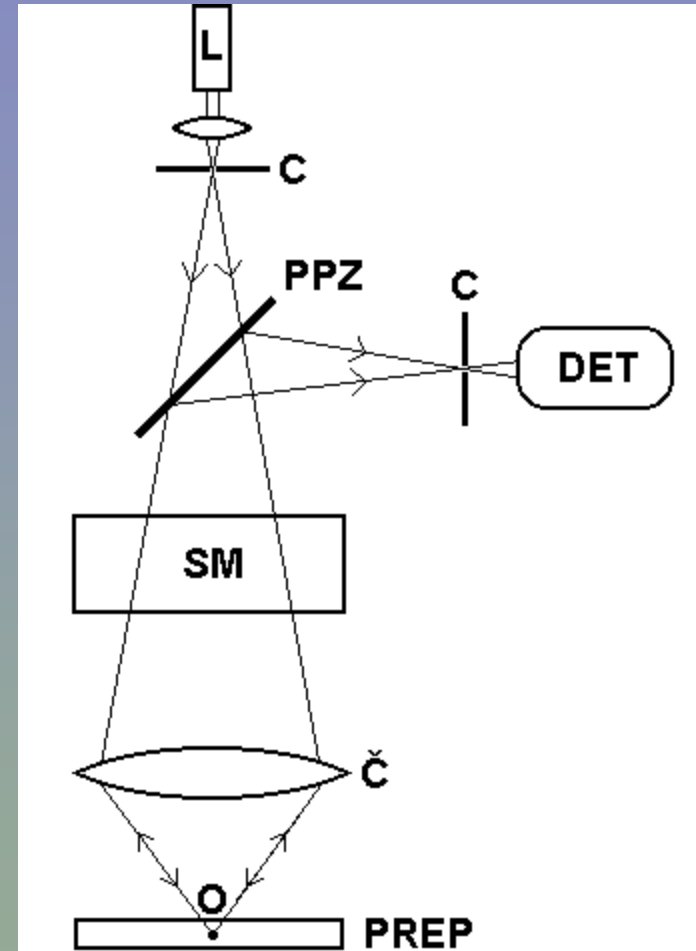
Mikrofilamenta HeLa  
buněk

# Optické skenovací mikroskopy

## Konfokální laserový skenovací mikroskop

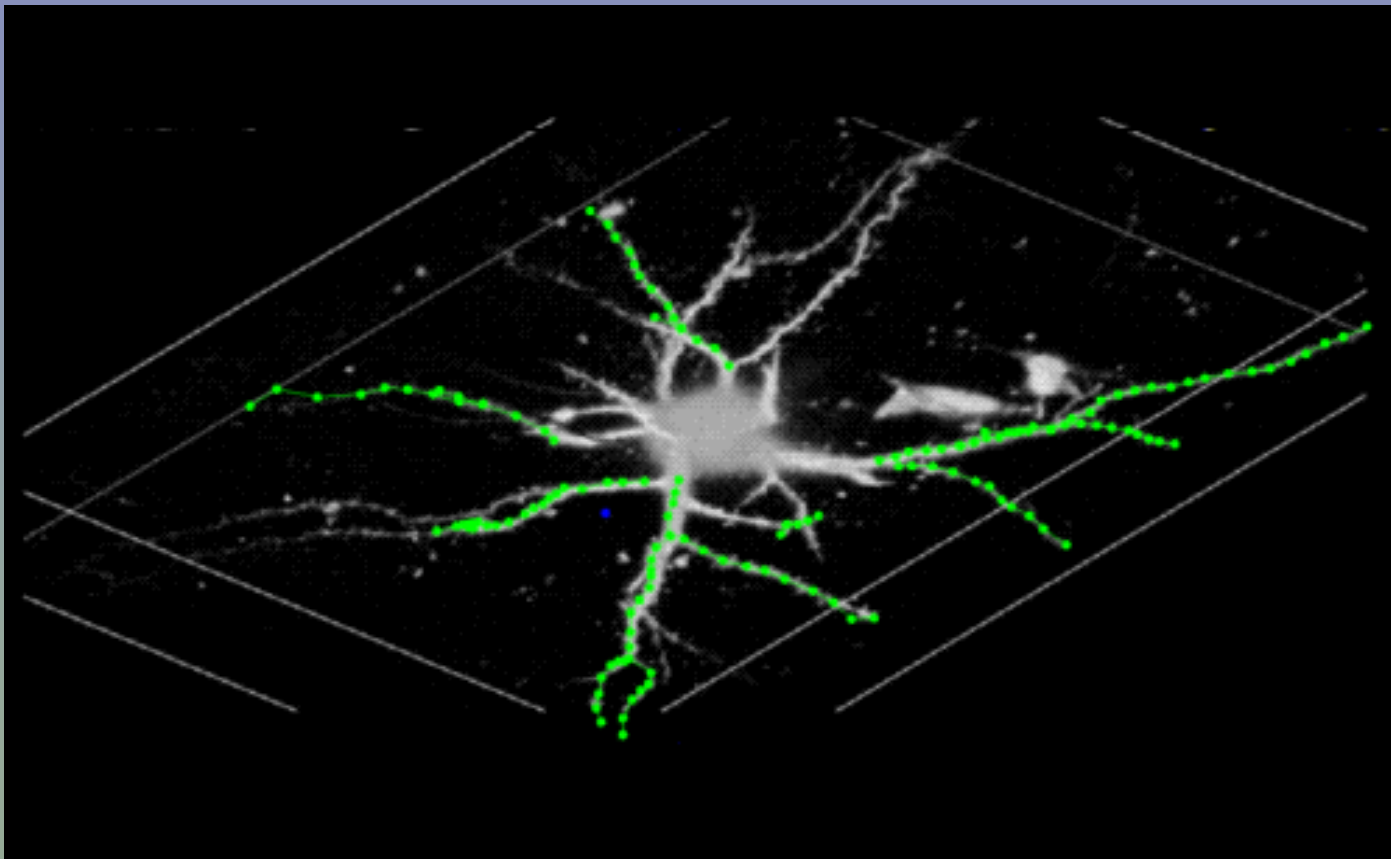
- L - laser, C – clony s malými kruhovými otvory, PPZ – polopropustné zrcadlo, DET – detektor světla (fotonásobič), SM – skenovací mechanismus, Č – čočka objektivu (projektivu), O – bodový předmět, PREP – preparát (řez).

- 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 imuno značení pro specifikaci pozorovaných struktur, zvýraznění chromozomů, membránových receptorů.



3D obraz neuronu - <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.
- Některé parametry SP2 AOBS :  
Laser: červený (HeNe 633 nm/12mW)  
          limetový (DPSS 561 nm/10mW)  
          modrý (Ar 458 nm/7mW, 476 nm/10mW,  
              488 nm/35mW, 496 nm/10mW,  
              514nm/35mW)  
VIS celé spektrum  
UV (Ar 351 nm/20mW, 364 nm/20mW)  
UV (lampa) celé spektrum
- Plně automatický, CO<sub>2</sub> atmosféra, vyhřívání
- Digitalizace obrazu, sledování a nahrávání na kameru, atd.



Leica, SP2 AOBS

# Konfokální laserový skenovací mikroskop

- Souběžné použití spektrofotometru jako součást konfokálního mikroskopu, náhrada běžného laseru za „bílý laser“ tj. laser s plynule laditelnými vlnovými délkami v rozmezí 470-670 nm, určené k spektrofotometrickým analýzám = určení koncentrace léčiva uvnitř tkáně během kultivace.
- Ramanův spektrometr- bezkontaktní, nedestruktivní chemická analýza materiálu; (viz přednáška o přístrojových metodách molekulární biofyziky)

# Optické skenovací mikroskopy

## Skenovací mikroskopie v blízkém optickém poli

(near field optical scanning microscopy - NFOSM)

NFOSM = NSOM = SNOM

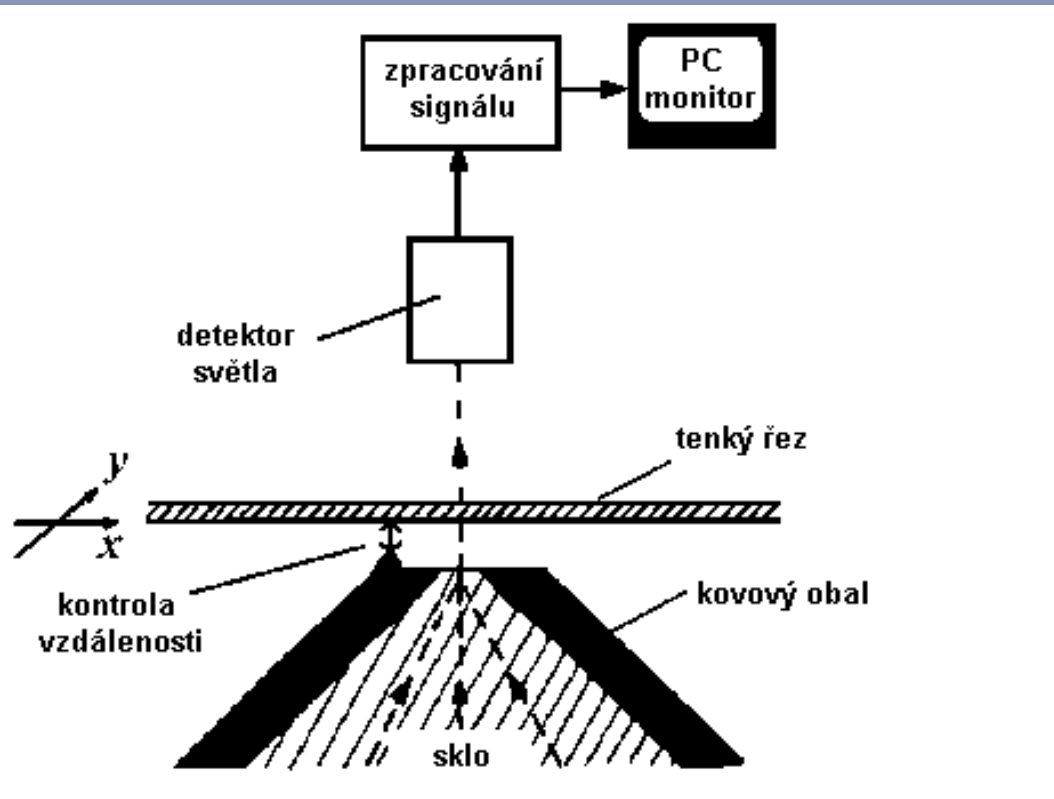
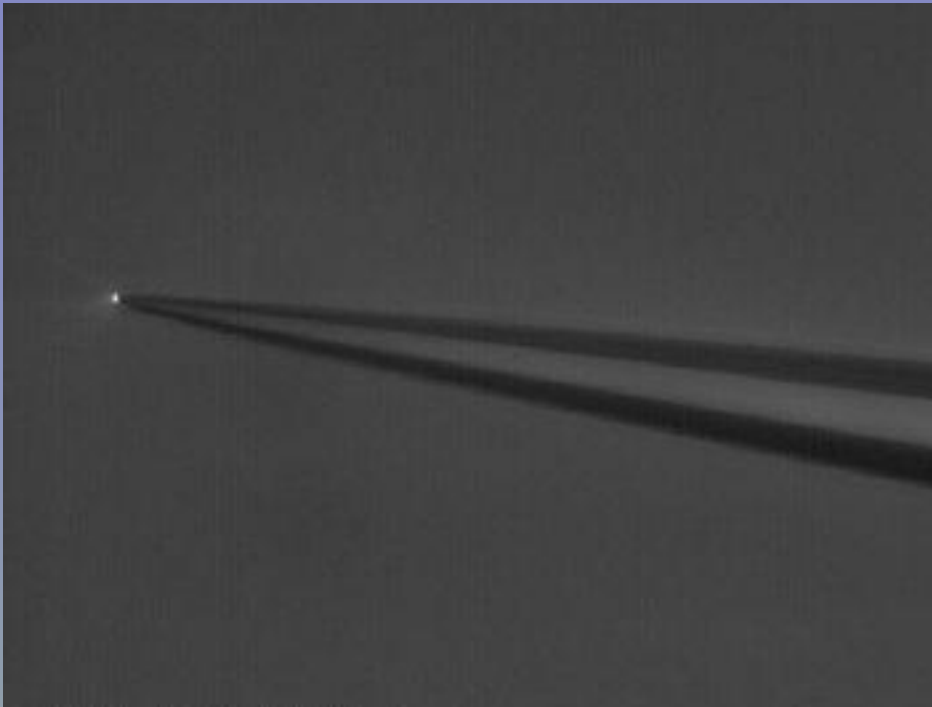
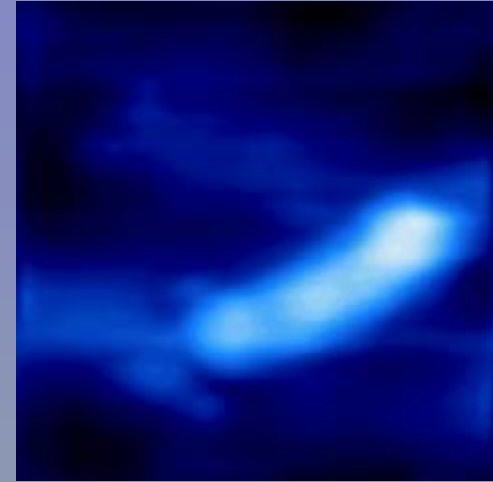


Schéma mikroskopu pro pozorování v blízkém optickém poli. Úzký svazek světla argonového laseru prochází velmi malým otvorem ( $\varnothing$  5 – 10 nm) v kovem pokrytém skleněném hrotu. Tenký řez se pohybuje nad otvorem v konstantní vzdálenosti. Podle Rontó a Tarjána (1994).



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)

# 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:

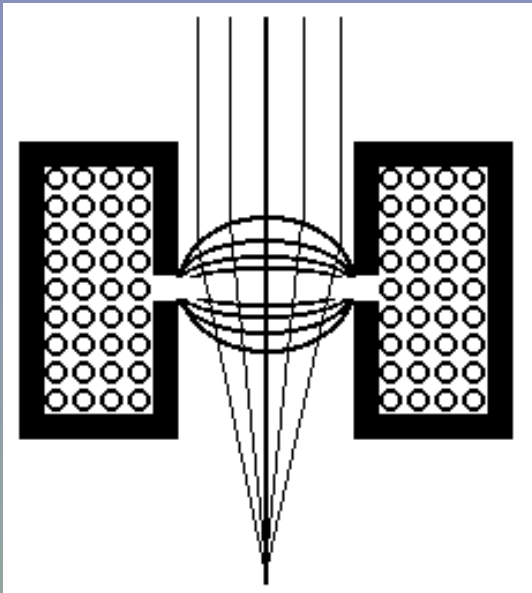
$$\lambda = \frac{h}{m \cdot v}$$

$$e \cdot U = \frac{1}{2} m \cdot v^2$$

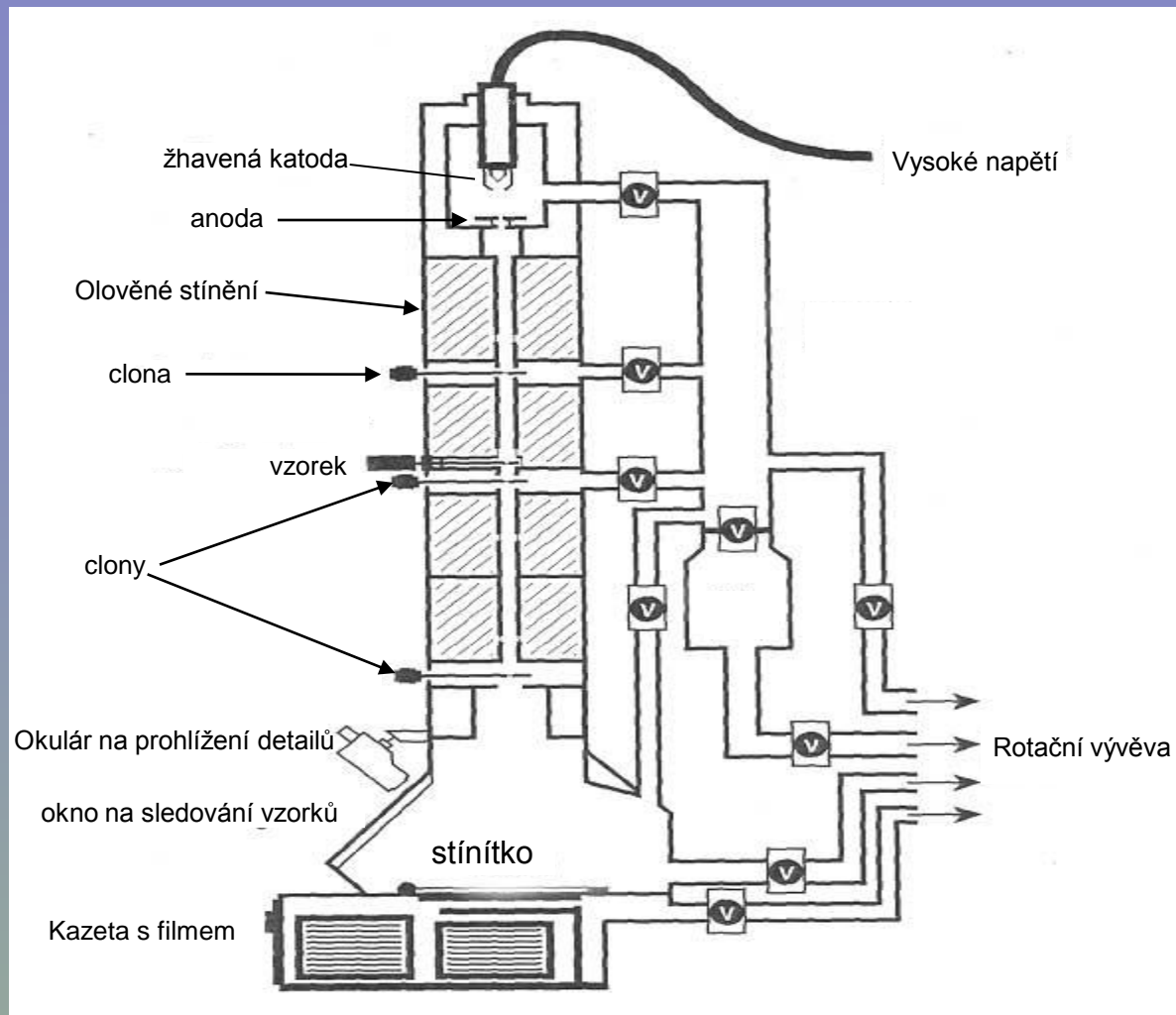
$\lambda$  je vlnová délka,  $h$  Planckova konstanta,  $m$  relativistická hmotnost elektronu,  $v$  jeho rychlost,  $e$  – jeho elektrický náboj a  $U$  je urychlovací napětí. Je-li velikost pozorovaných objektů srovnatelná s  $\lambda$ , dochází k difrakci a vytvoření obrazu je znemožněno. Elektron s energií 1,5 eV má vlnovou délku 1 nm. Pomocí urychlených elektronů dosahujeme zhruba  $10^5$ -krát kratších  $\lambda$ . Viz  $\delta = \lambda/n \cdot \sin \alpha$ . 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

# 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)

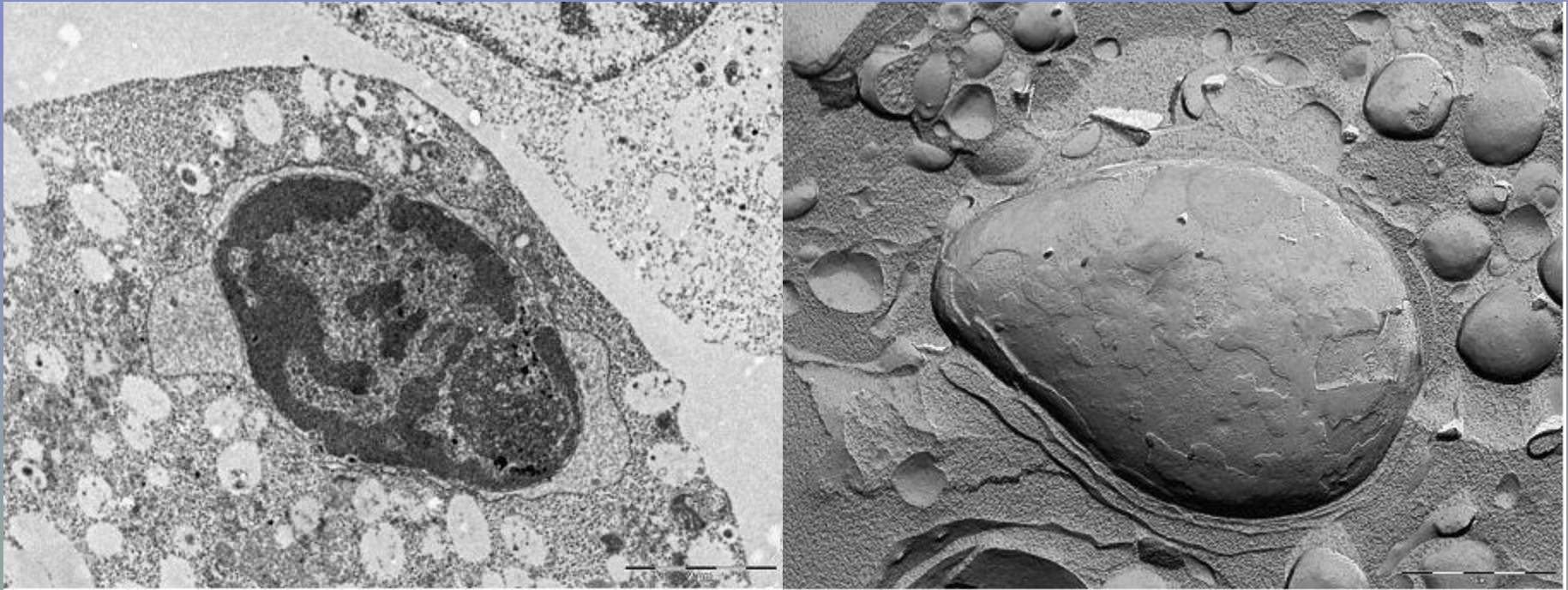
# TEM – příprava a barvení řezů

- Potřeba velmi tenkých řezů (50-300 nm) a umísťování řezů do vakua vyžaduje speciální metody přípravy.
- Nativní (vlhké) řezy mohou být pozorovány pouze nejmodernějšími tzv. environmentálními EM, v nichž jsou řezy umístěny do prostředí s relativně vysokým tlakem a za použití nízkého urychlovacího napětí.
- Biologické materiály musí být připraveny pomocí chemické fixace a impregnovány různými látkami (epoxidové pryskyřice) před rozřezáním.
- Aby se zvýšil rozptyl elektronů na vzorku, používají se soli nebo oxidy těžkých kovů (osmium, wolfram, uran), tzv. kontrastování membránových struktur.

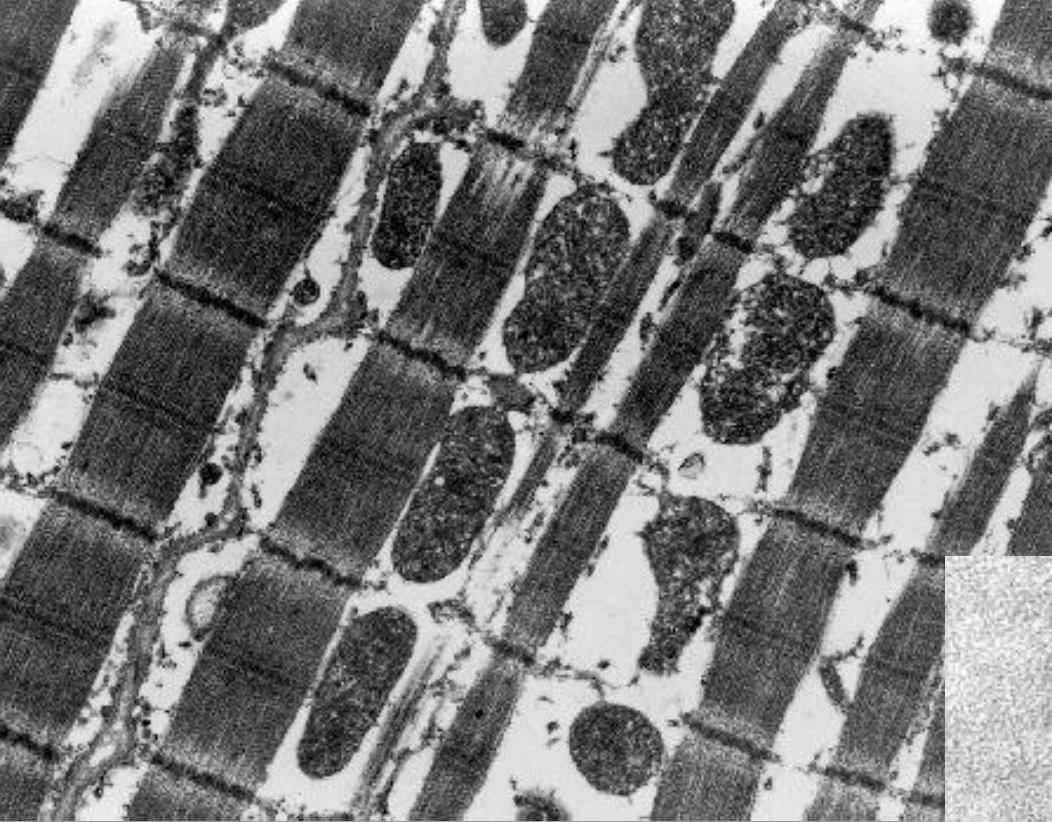
# TEM – příprava a barvení řezů

- **Kryofixace** = snaha o nahrazení pomalé chemické fixace rychlejší fixací mrazem
- Prudké zmrazení nativního vzorku v komoře pod vysokým tlakem (MPa) a při teplotě kolem  $-190^{\circ}\text{C}$
- Nevýhoda: při manipulaci se vzorkem nutno použít chlazené přístroje ( $-190^{\circ}\text{C}$  až  $-4^{\circ}\text{C}$ ), TEM je chlazen tekutým dusíkem
- **Metoda freeze-etching**: kovové repliky povrchů membránových struktur buněk
- Vzorek rozlámaný ve vysokém vakuu ( $10^{-5}\text{ Pa}$ ) a při teplotě  $-100^{\circ}\text{C}$ . Na odhalené struktury je napařena vrstva těžkého kovu (Pt, Ta) pod úhlem ( $45^{\circ}$ ), tím se vystínují vyvýšené struktury, a pod úhlem  $90^{\circ}$  je přidána vrstva C, který struktury fixuje na místě
- Celková síla vrstvy je kolem 25 nm
- Biologický materiál musí být chemicky odstraněn

# TEM- rozdíl řez x replika



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

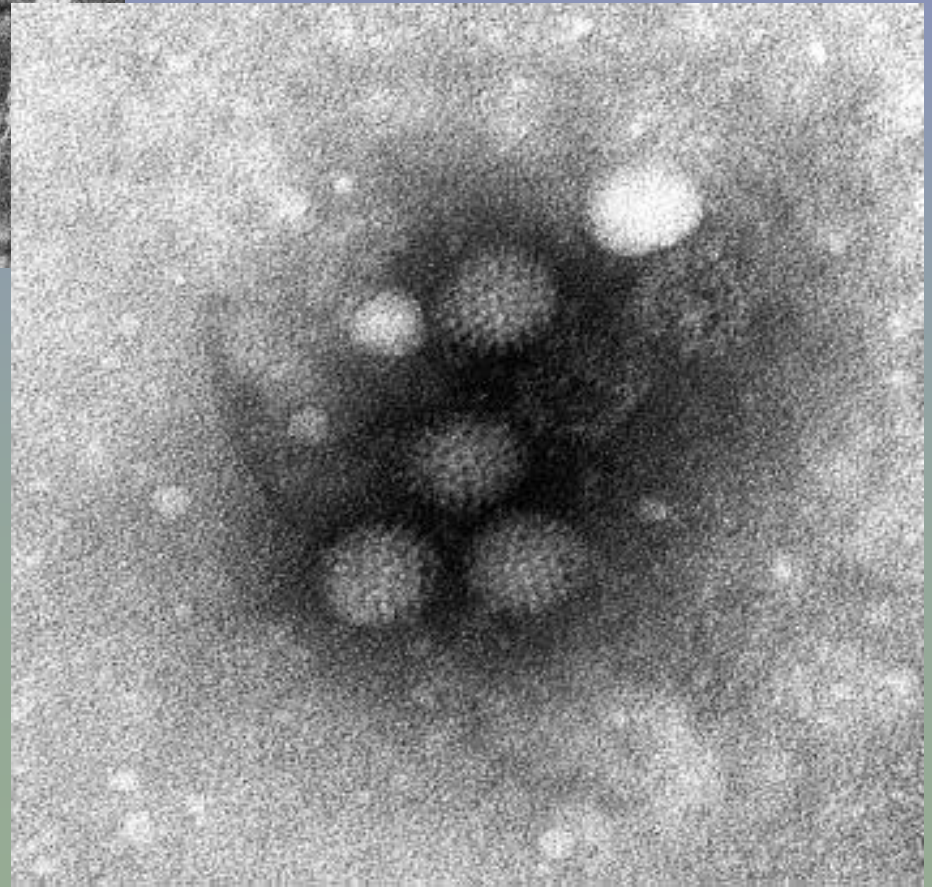


# TEM -

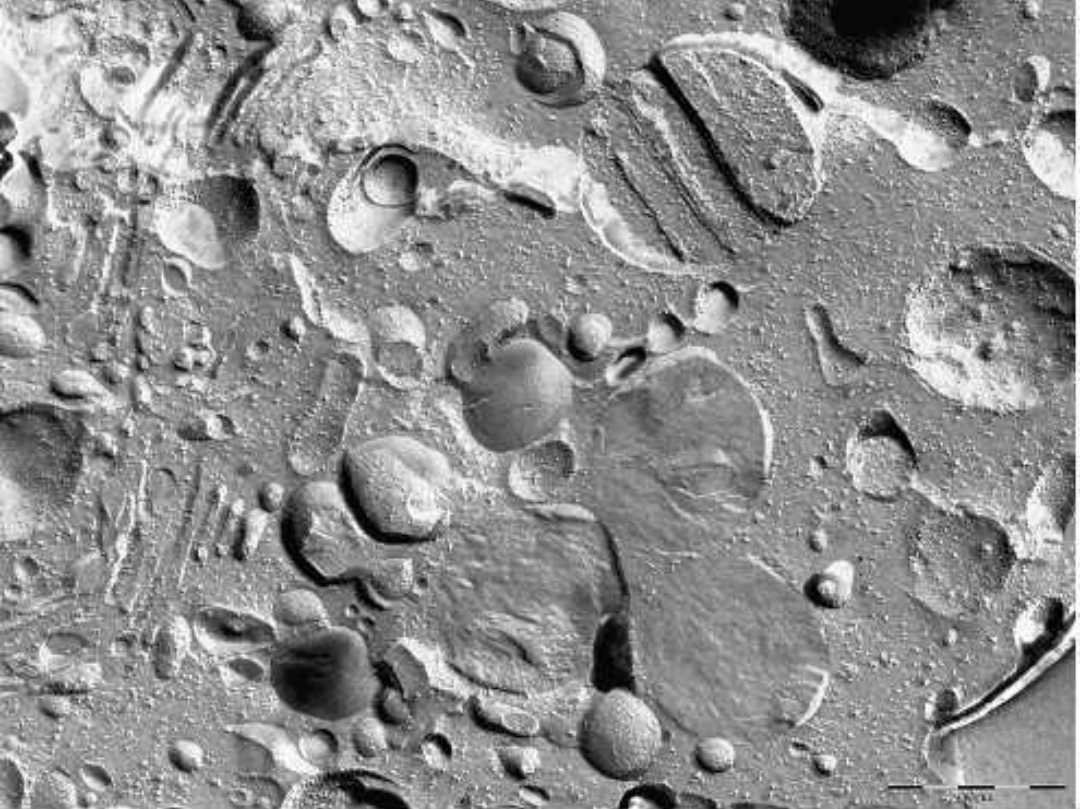
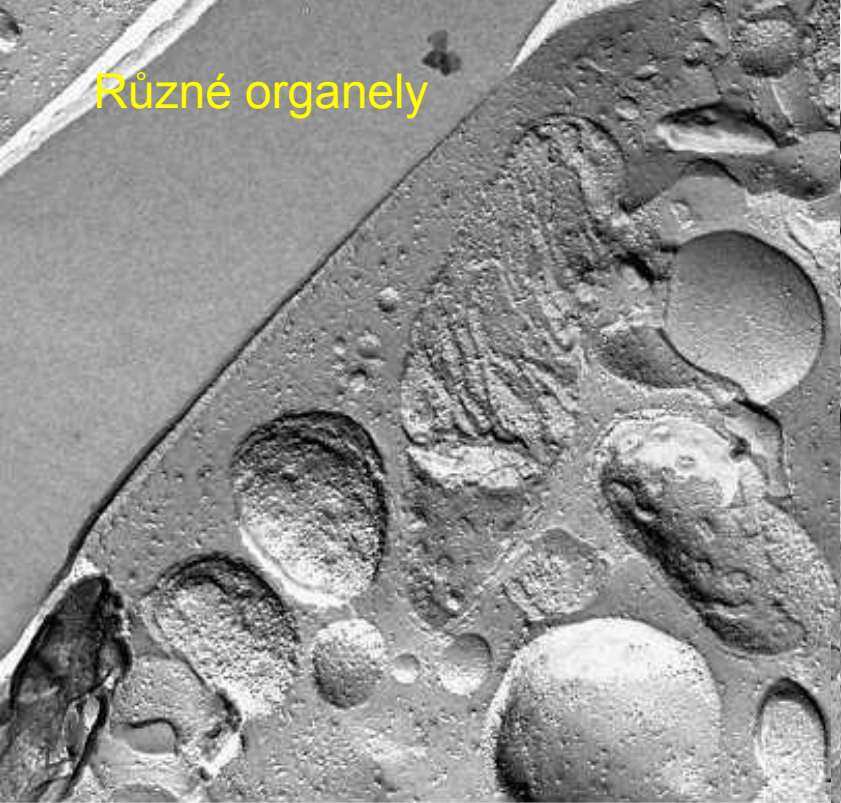
<http://www.ualberta.ca/~mingchen/tem.htm>

Buňky břišního svalu ↑

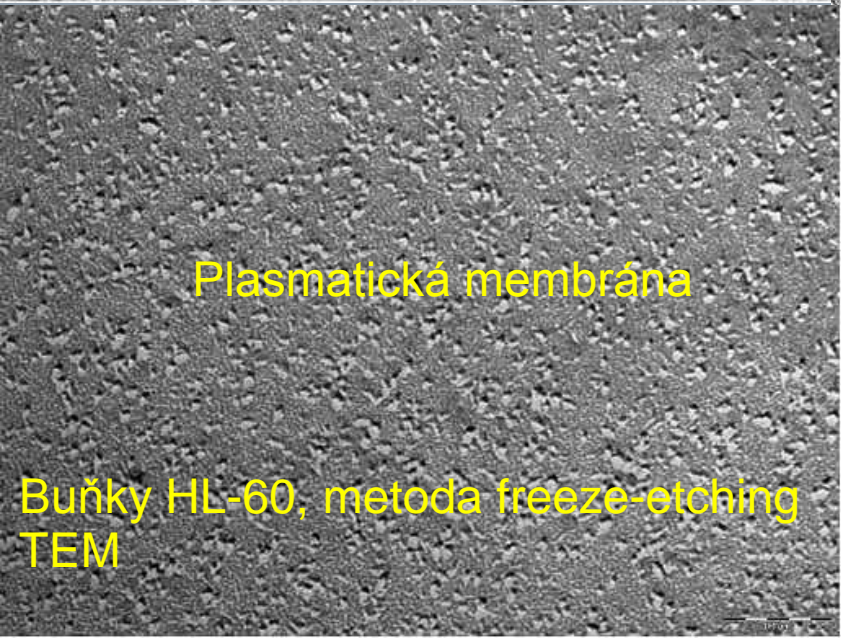
Corona virus, negativní  
barvení →



Různé organely



Plasmatická membrána



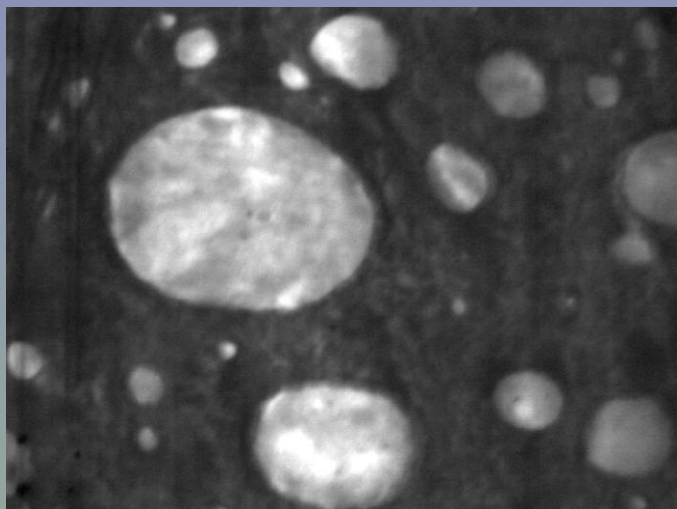
Jaderná membrána



Buňky HL-60, metoda freeze-etching  
TEM

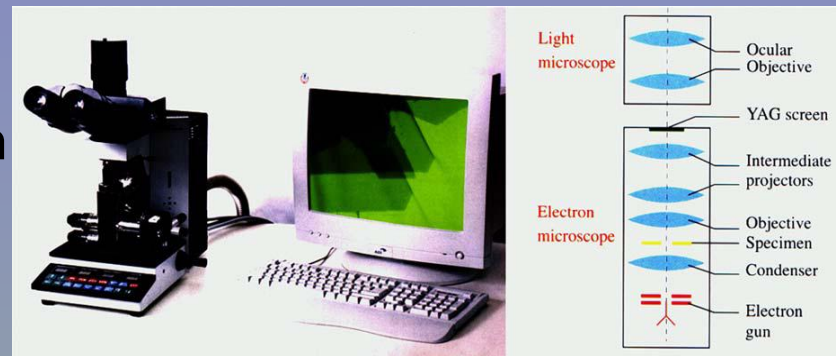
# TEM pracující při nízkém urychlovacím napětí LV-STEM vers. LV-TEM

- Relativně silnější ultratenké řezy: 30-40 nm pro biologický materiál,
- Není nutno kontrastovat těžkými kovy
- Rozlišovací schopnost LV-STEM 1-2 nm

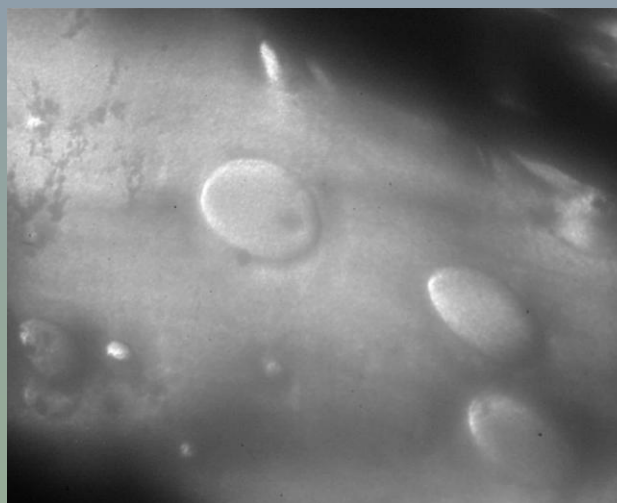


Snímek z LV-STEM, krystaly polypropylenu,  
šířka rámečku 9,7  $\mu\text{m}$ , urychlovací napětí 25 kV.

Převzato z Lednický at all., Polymer 41, 2000.



LV-EM vyvinutý firmou Delong Instruments



Snímek z LV-TEM, krystaly polypropylenu,  
šířka rámečku 6,3  $\mu\text{m}$ , urychlovací napětí 5 kV.

# Elektronová mikroskopie

## Skenovací elektronová mikroskopie

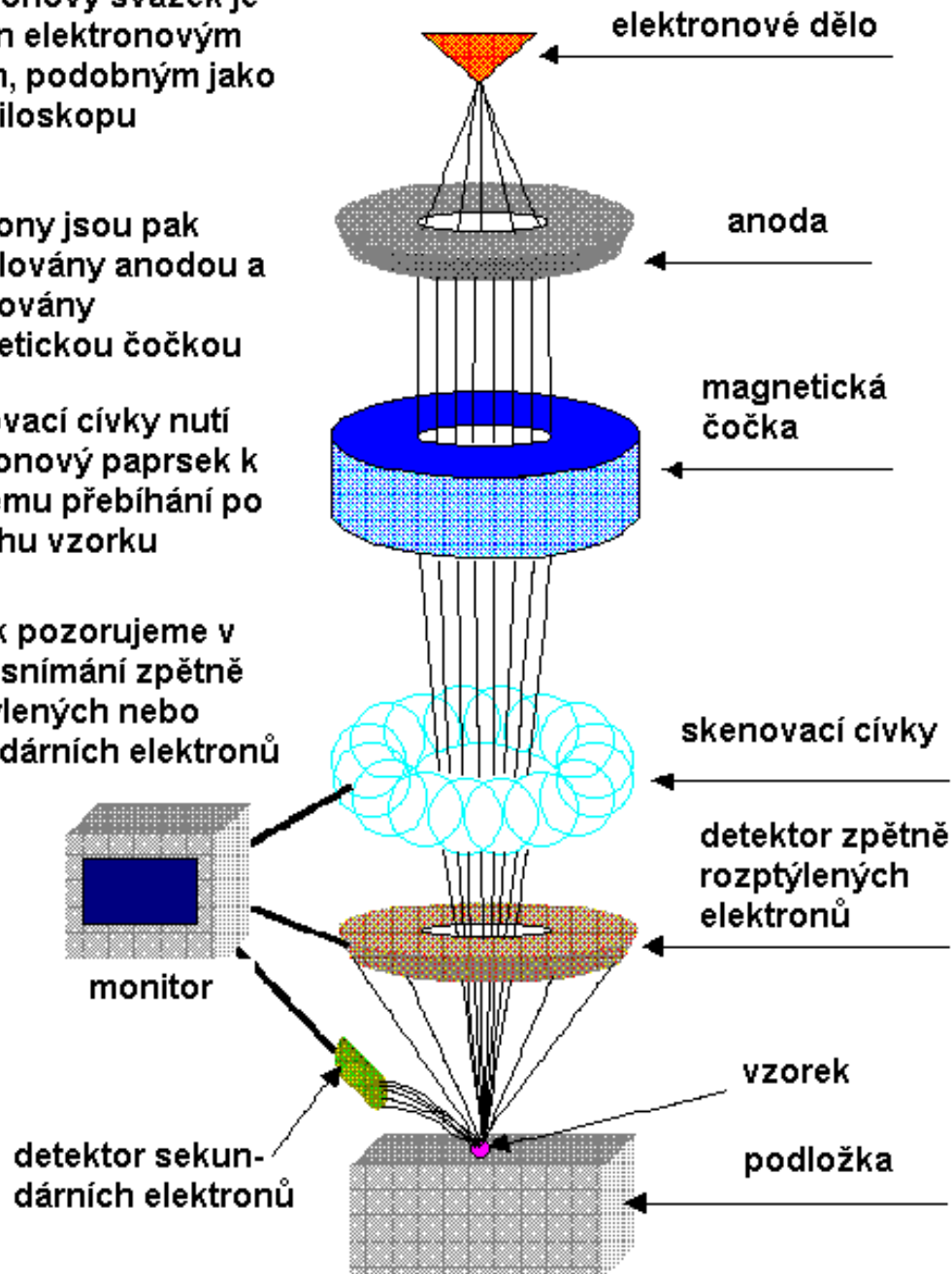


elektronový svazek je tvořen elektronovým dělem, podobným jako v osciloskopu

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

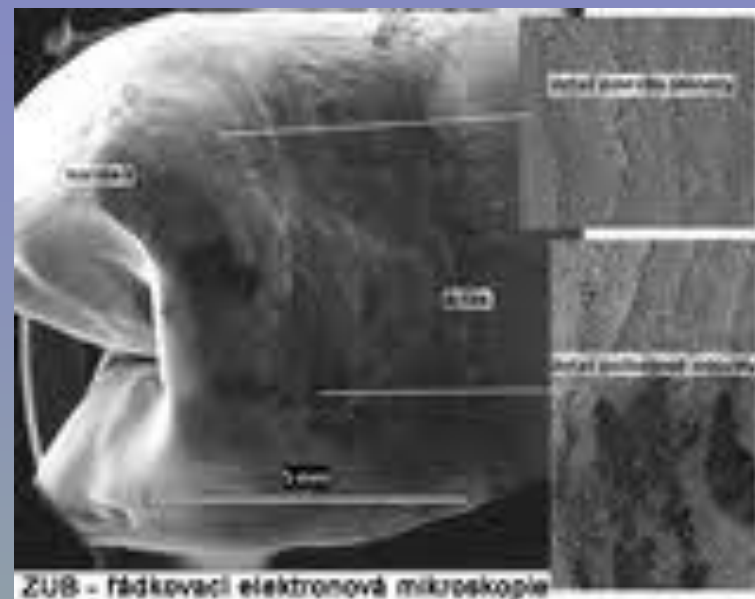
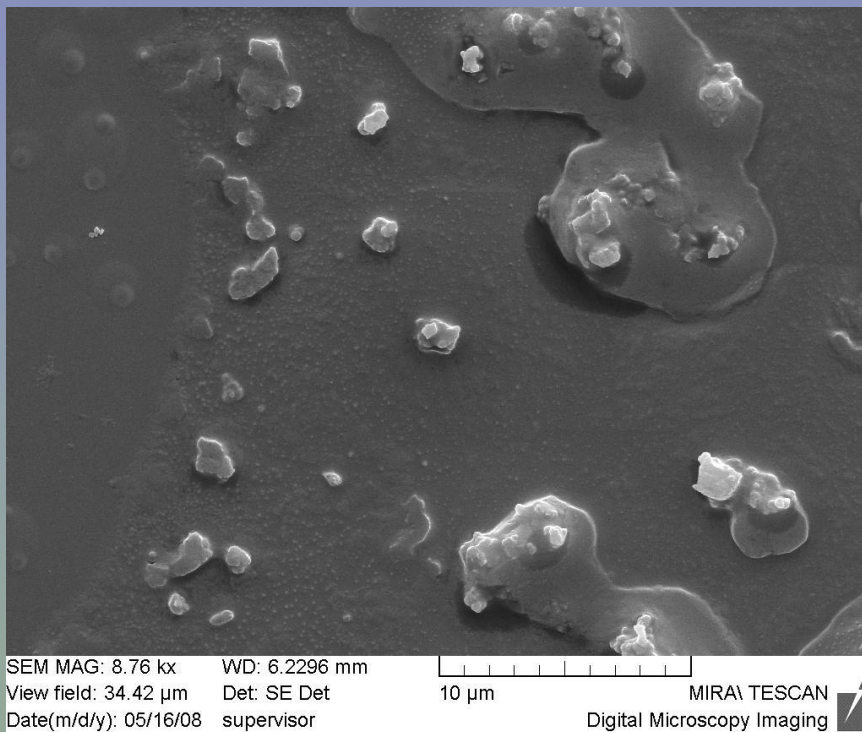


# SEM

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

# SEM- příprava vzorků

- Biologické vzorky i materiály je nutné vysušit v kritickém bodě v CO<sub>2</sub> atmosféře
- Nevodivý materiál je nutné pokrýt vrstvou kovu (Au, C, Ag) „naprášením“ kovu
- Mikroskopy s nízkým urychlovacím napětím - přednosti: méně artefaktů, menší poškození vzorků, menší nebo žádná vrstva kovu (MIRA firmy TESCAN)
- Možnost studia chemického složení vzorku rentgenovou spektrometrií (strukтуры větší než 200nm)
- Vývoj mikroskopů umožňujících současné skenování povrchu materiálu a řezání materiálu



zub

[www.lfp.cuni.cz](http://www.lfp.cuni.cz)

Krystaly neznámé látky připravené pro RTG  
analýzu

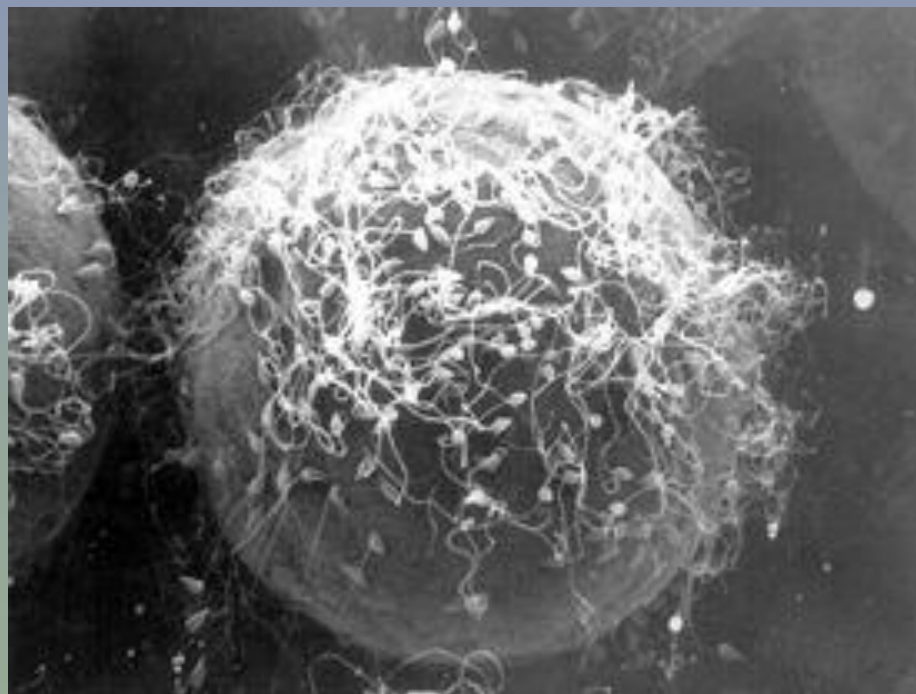


- Detail nohy mravence v SEM

<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>

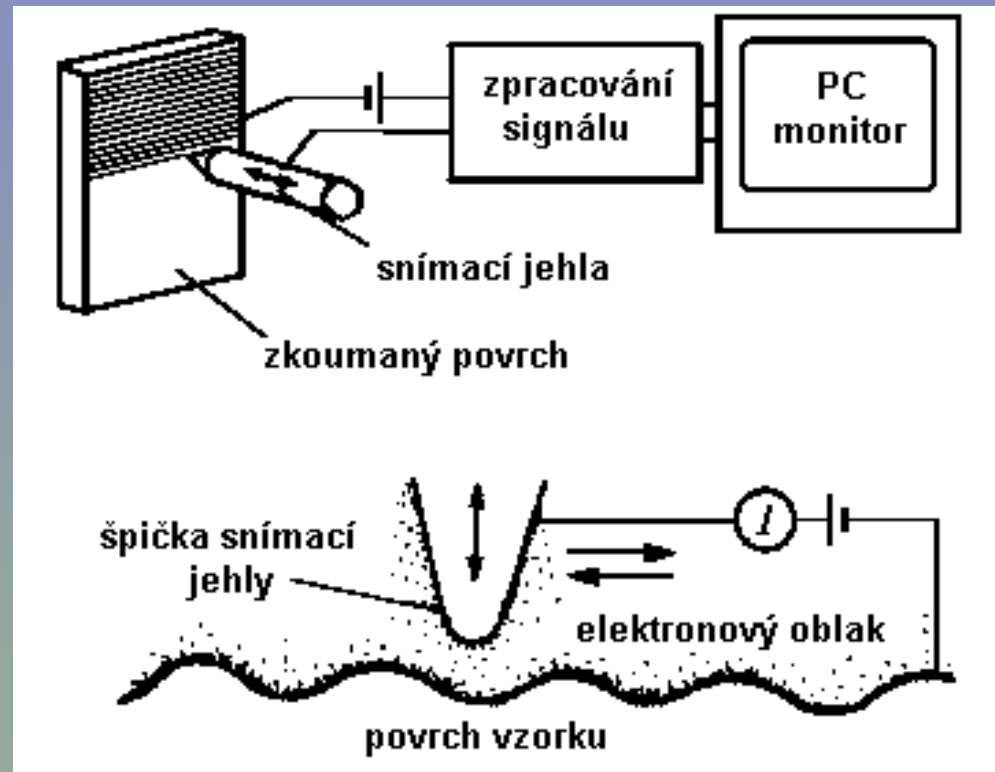


# Elektronová mikroskopie

## Skenovací tunelový mikroskop (STM)

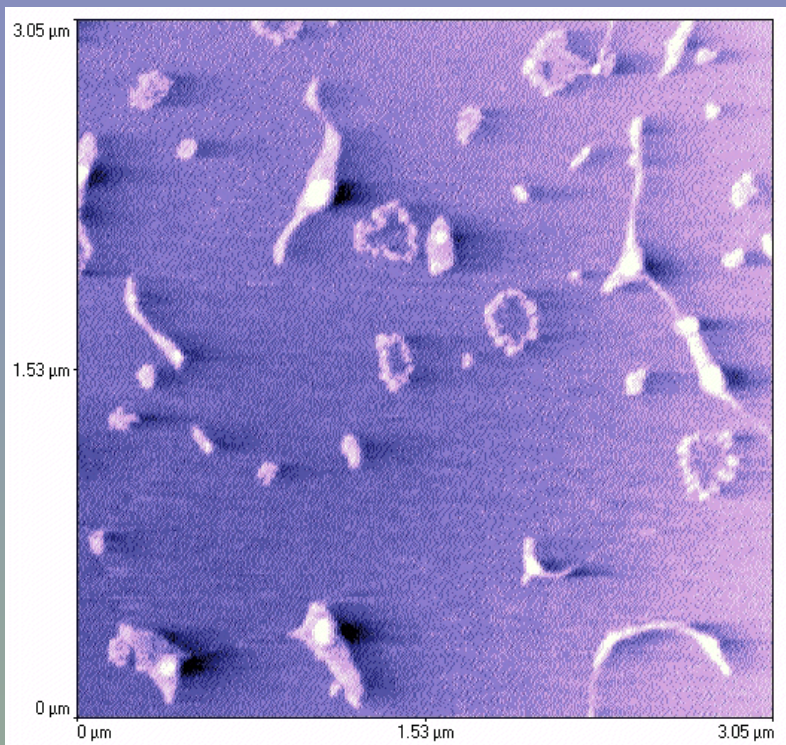
Schéma skenovacího tunelového elektronového mikroskopu (STM). Dole detail kovové detekční jehly. Kladně nabitá jehla kopíruje povrch vzorku.

Podle Rontó a Tarjána (1994).



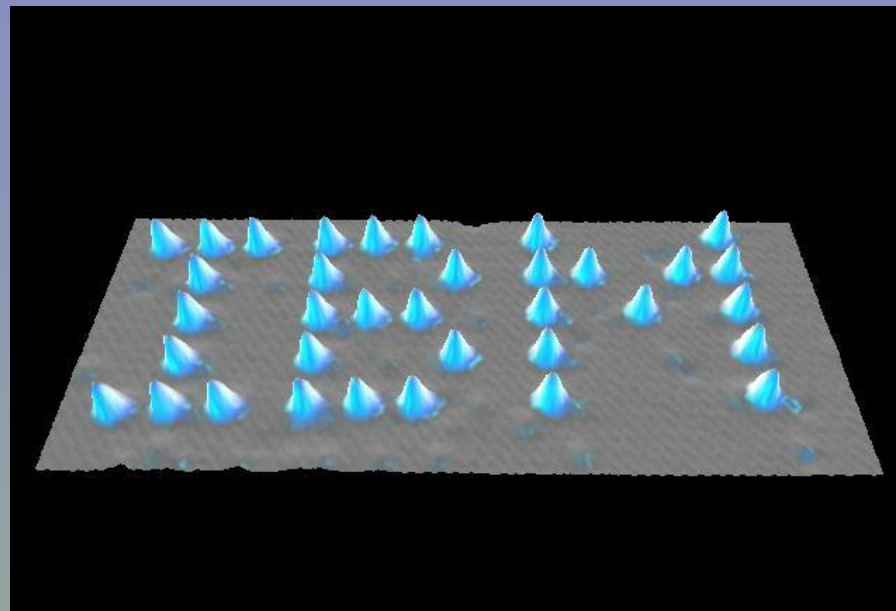
# Elektronová mikroskopie

## STM



Rozštěpené a nenarušené kruhy  
plazmidové DNA

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



Nápis IBM vytvořený z atomů  
xenonu na niklové podložce

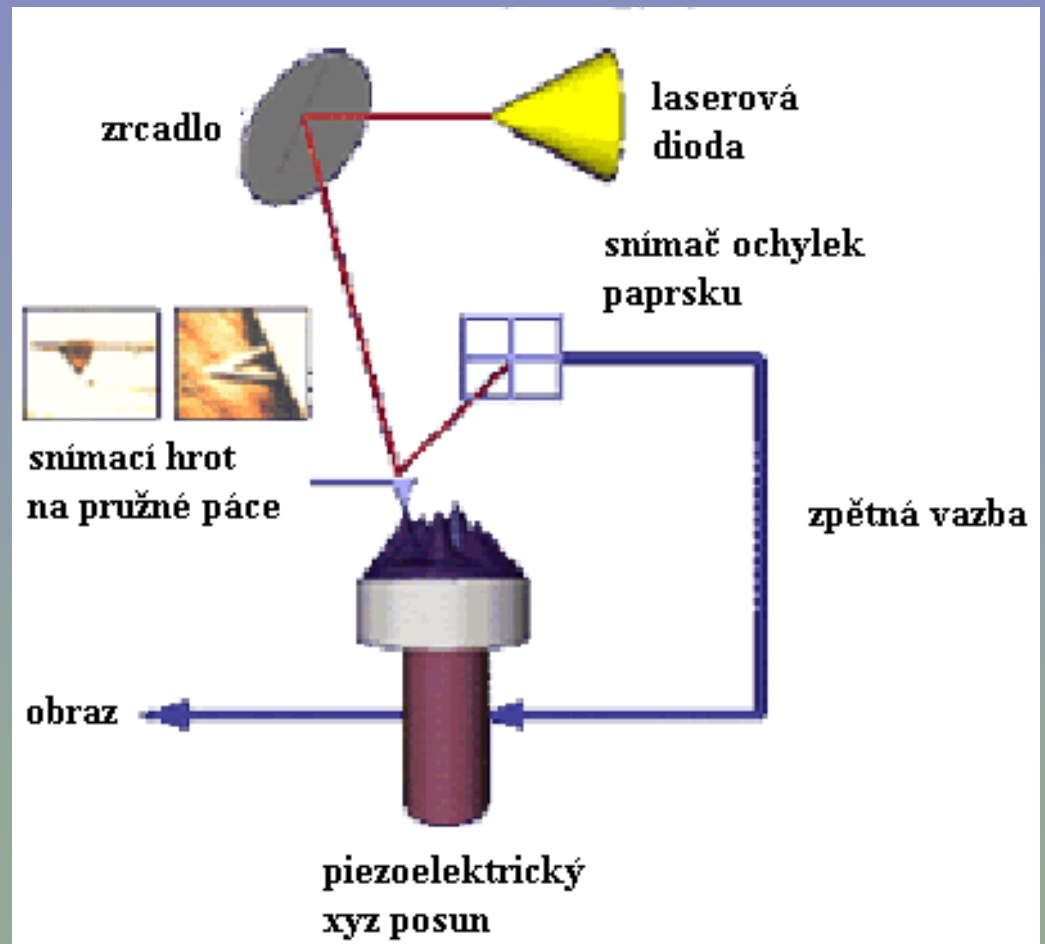
<http://www.almaden.ibm.com/vis/stm/images/stm10.jpg>

# Mikroskopy založené na jiných fyzikálních principech

## Atomic force microscopy

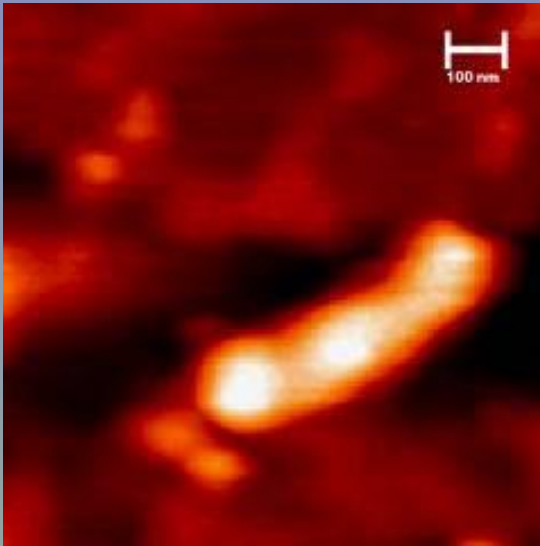
- AFM – Atomic force microscopy – jemný kovový hrot sleduje profil povrchu vzorku.

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



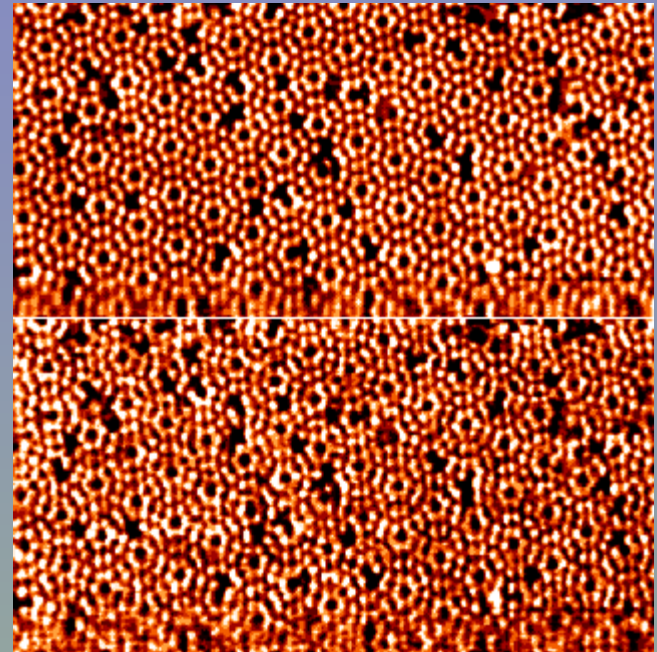
# AFM

AFM – Atomic force microscopy



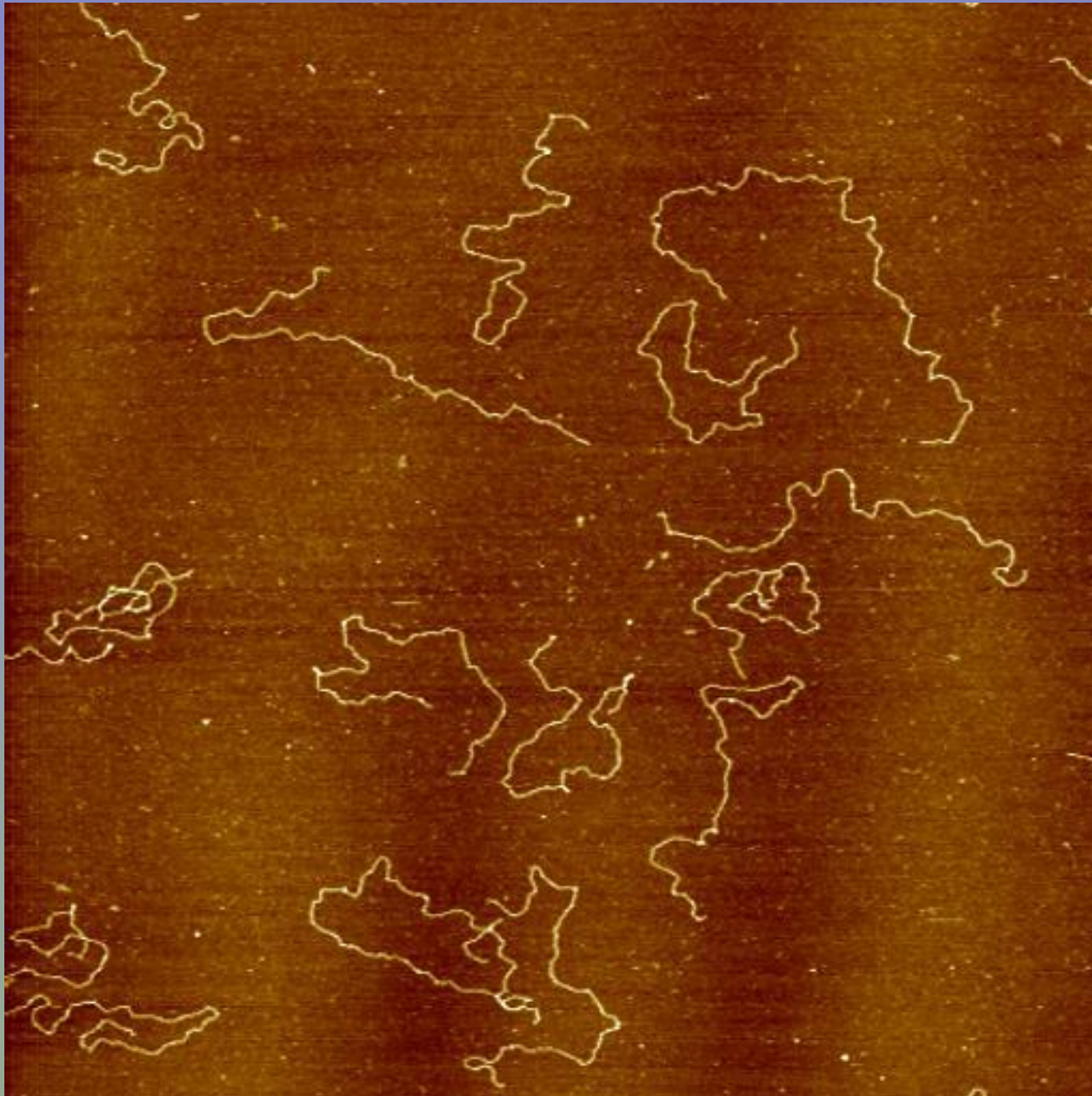
Plazmidová DNA – 10 kb

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



Krystalická struktura křemíku  
– atomární rozlišení

• [http://www.omicron-instruments.com/products/afm\\_stm/r\\_afmst6.html](http://www.omicron-instruments.com/products/afm_stm/r_afmst6.html)

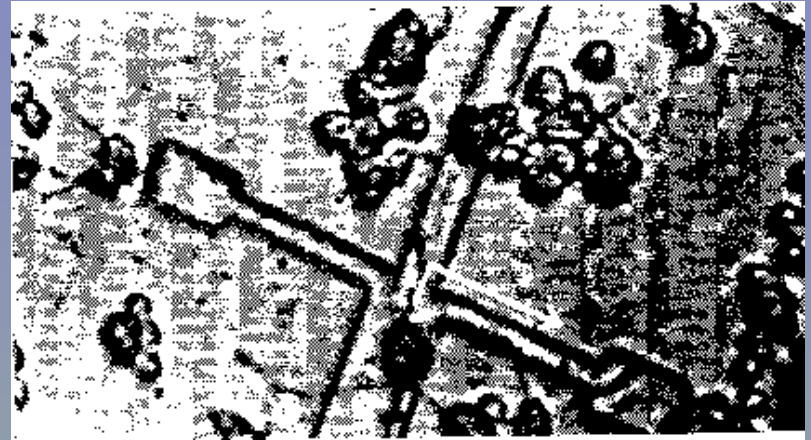
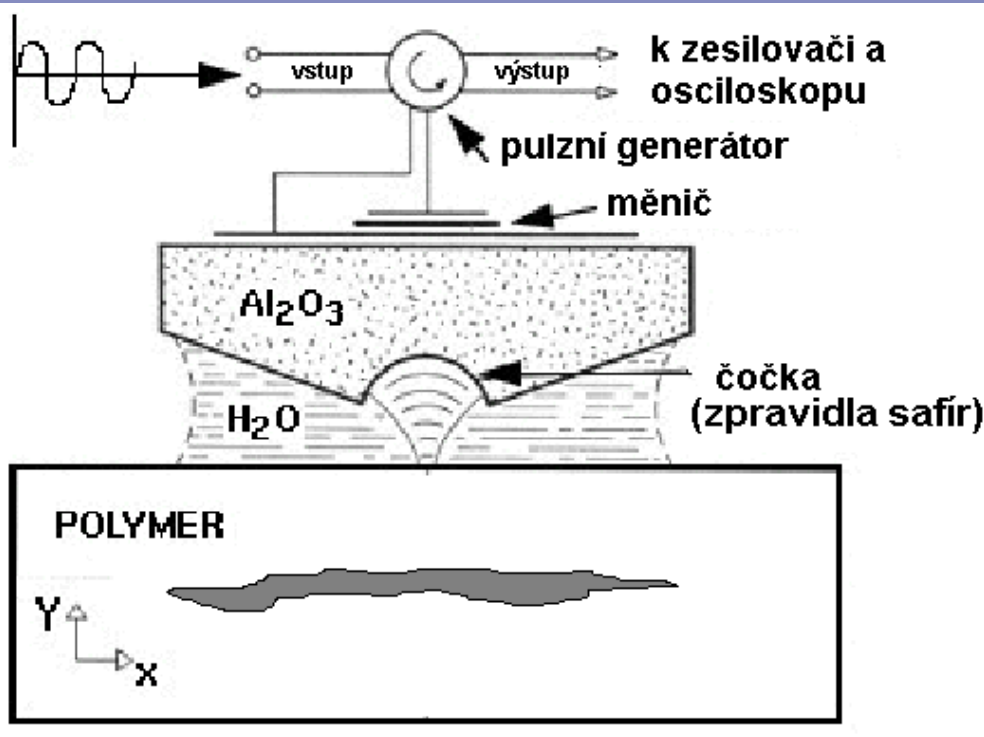


DNA  
pozorovaná  
pomocí  
AFM

<http://spm.phy.bris.ac.uk/research/DNA/images/dna2.jpg>

# Mikroskopy založené na jiných fyzikálních principech

## Akustická mikroskopie



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

- Neurony rostoucí na plastové podložce  
<http://transducers.stanford.edu/stl/Projects/ControlledPatt.htm>

Autoři:  
**Vojtěch Mornstein**  
**Naděžda Vaškovická**

Obsahová spolupráce:  
**Carmel J. Caruana**

Grafika:

-

Poslední revize: listopad 2013