

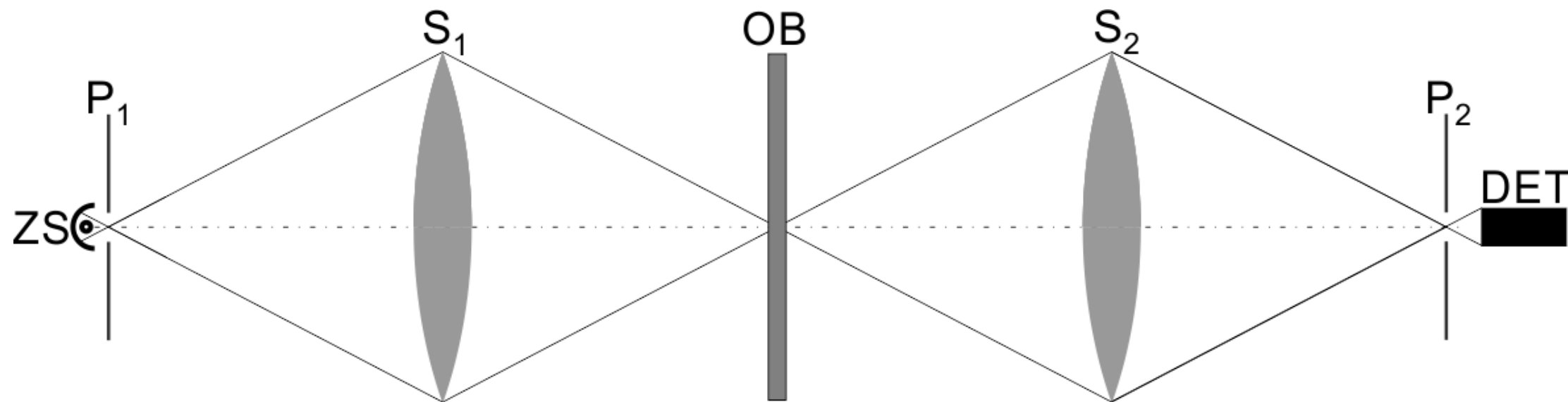
Mikroskop konfokalny

Piotr Kurzynowski

Katedra Optyki i Fotoniki

Politechnika Wrocławska

Zasada działania



ZS – źródło światła

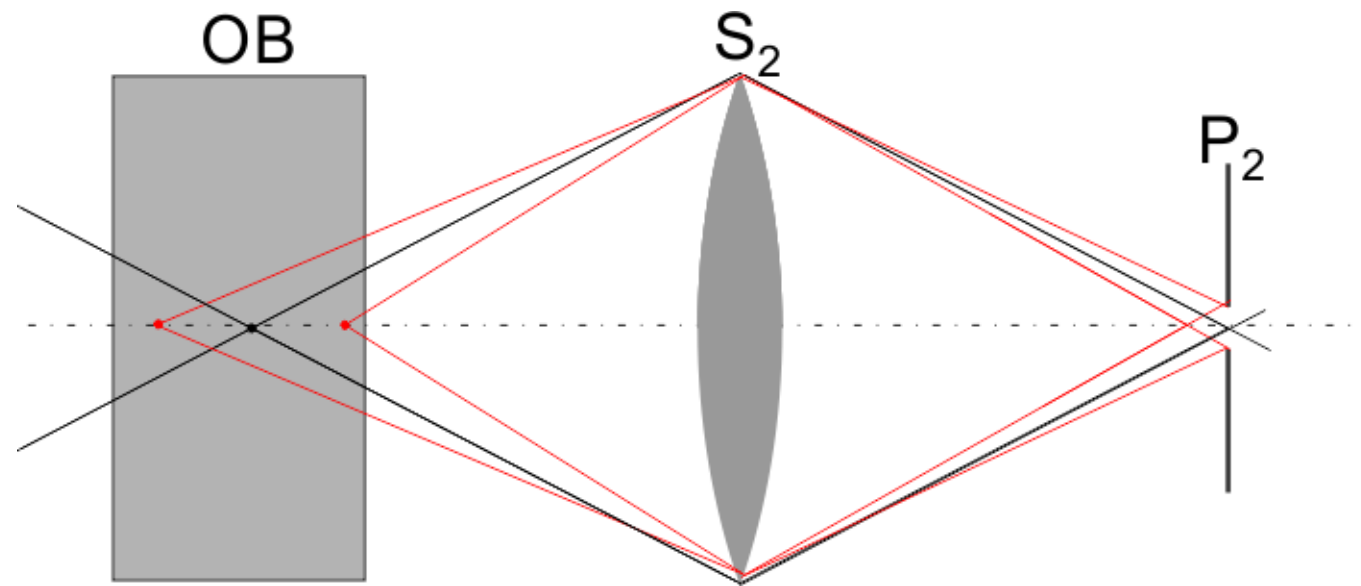
P₁, P₂ – przesłony punktowe

S₁, S₂ – soczewki

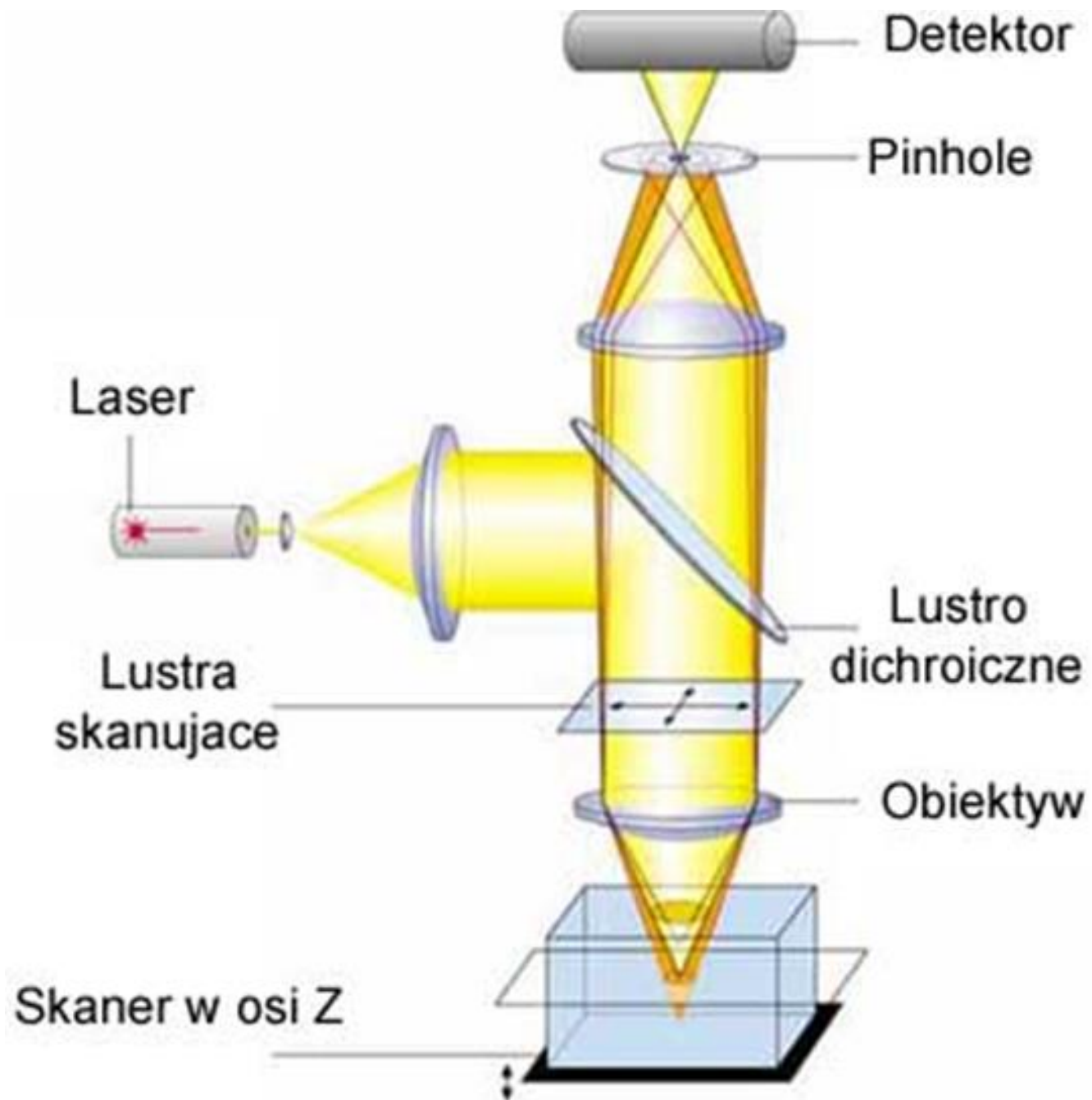
OB – obiekt badany

DET – detektor

Niedyfrakcja



Schemat układu



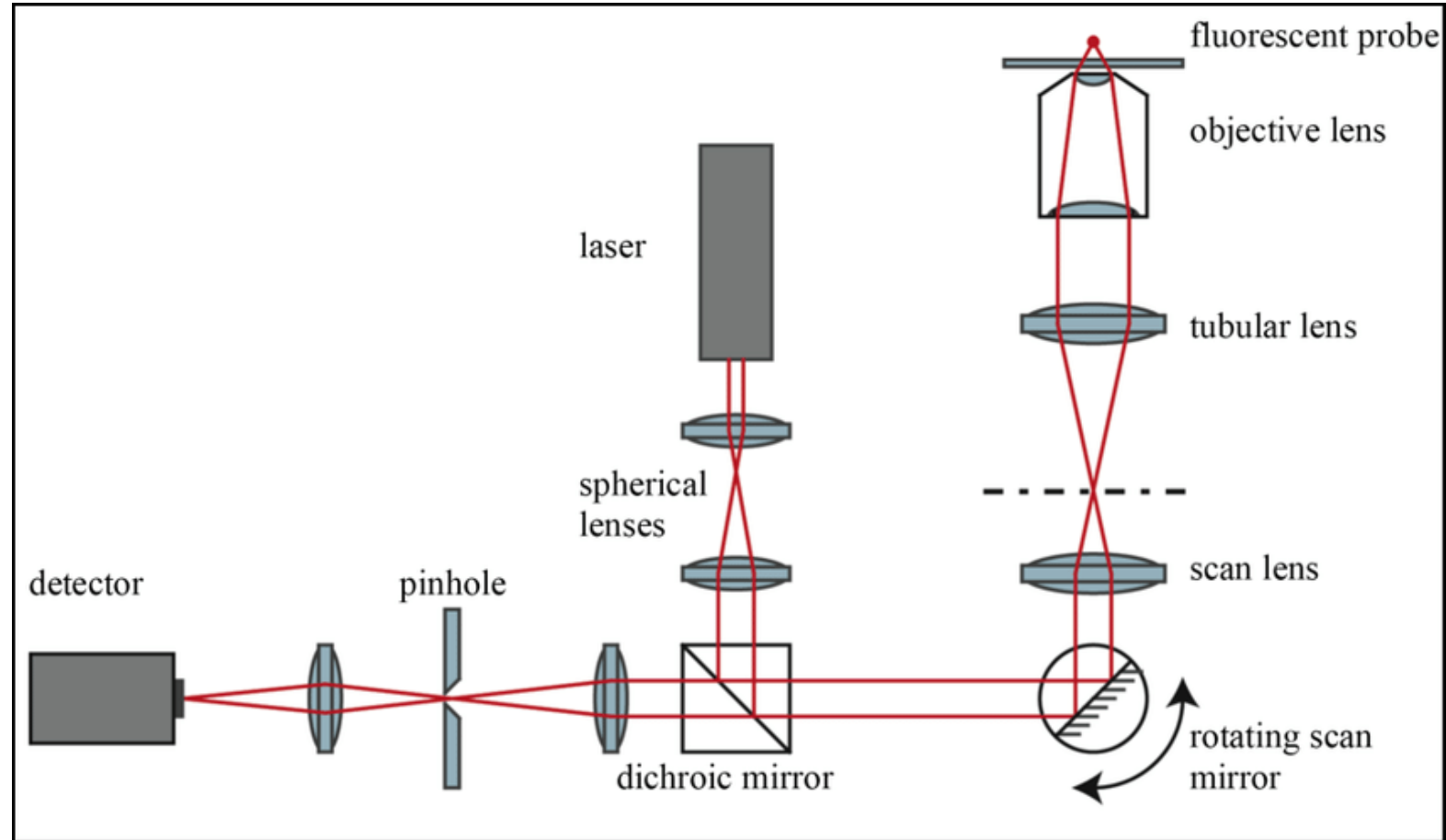
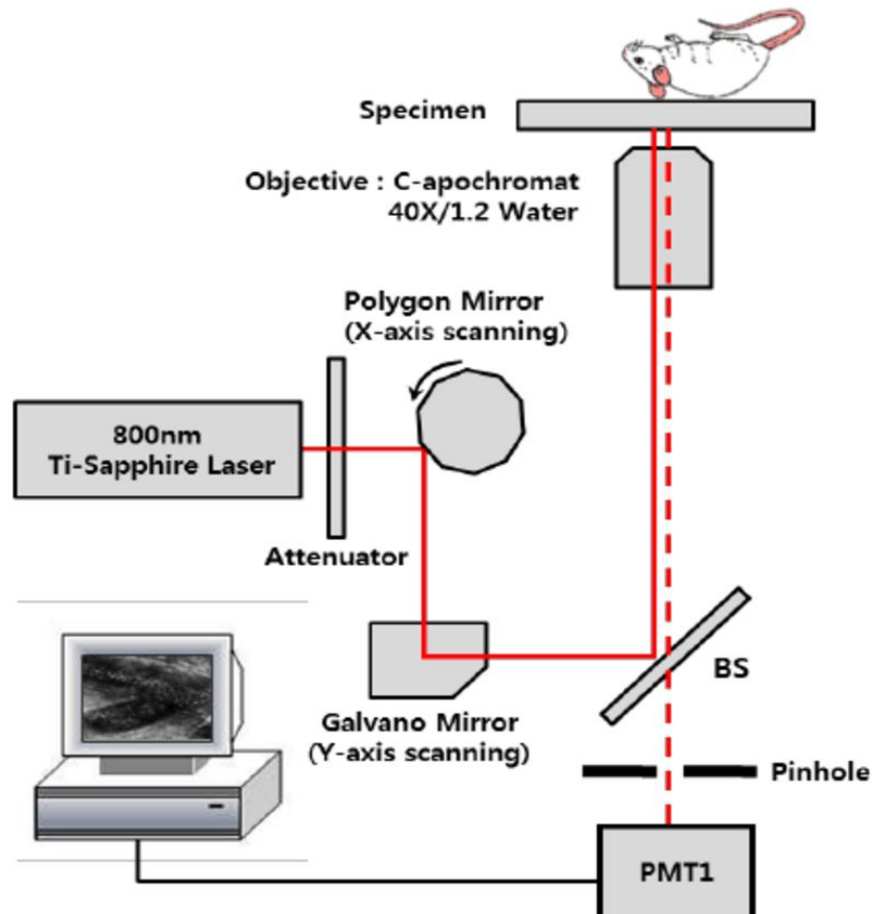
Źródło światła

- Źródła światła białego z filtrami monochromatycznymi
- Laser:
 - Bardzo mała szerokość wiązki emisyjnej
 - Duża moc wiązki w wybranym obszarze widma
 - Punktowe źródło światła

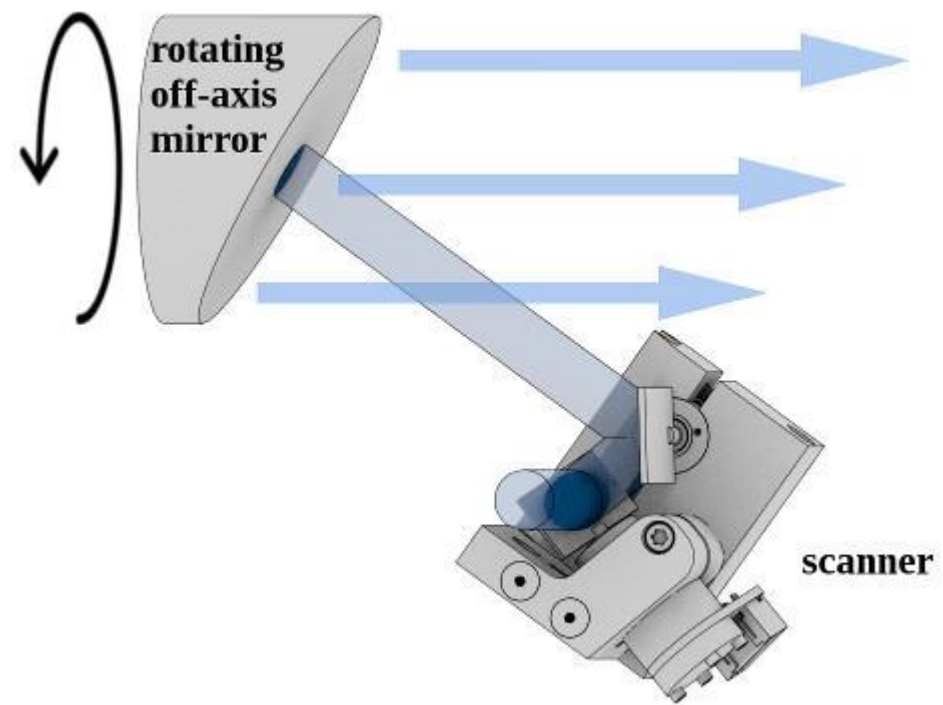
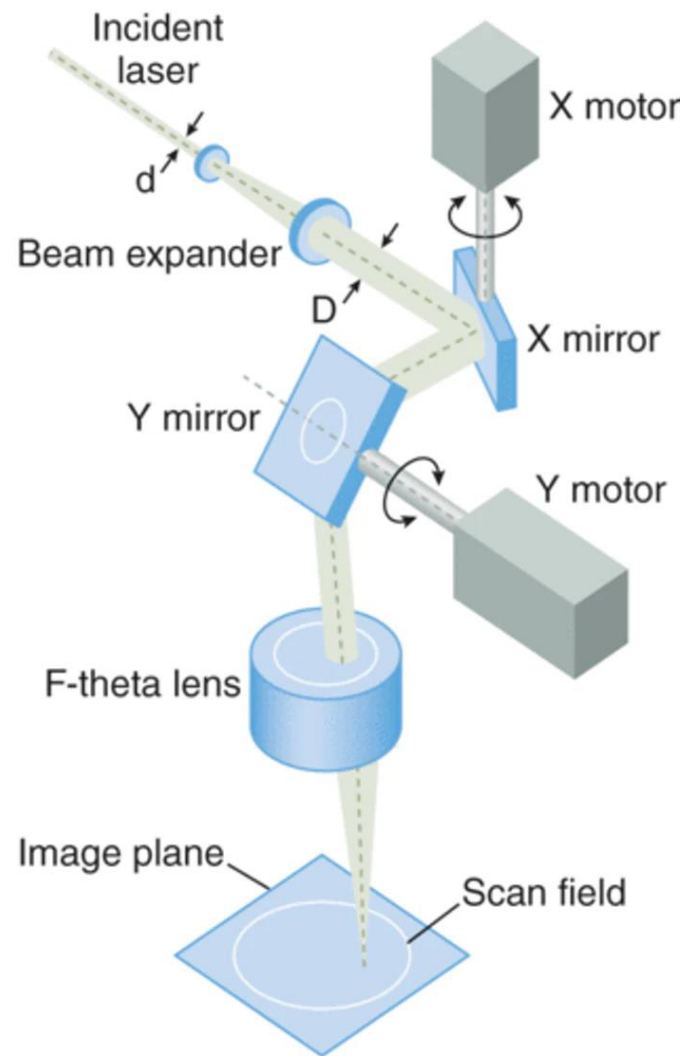
Elementy skanujące

- **skanujące laserowe mikroskopy konfokalne** (*ang. Scanning Laser Confocal Microscopes*)
- **mikroskopy konfokalne z wirującym dyskiem** (*ang. Spinning-Disk Confocal Microscopes*)
- **PAM** (*ang. Programmable Array Microscopes*).

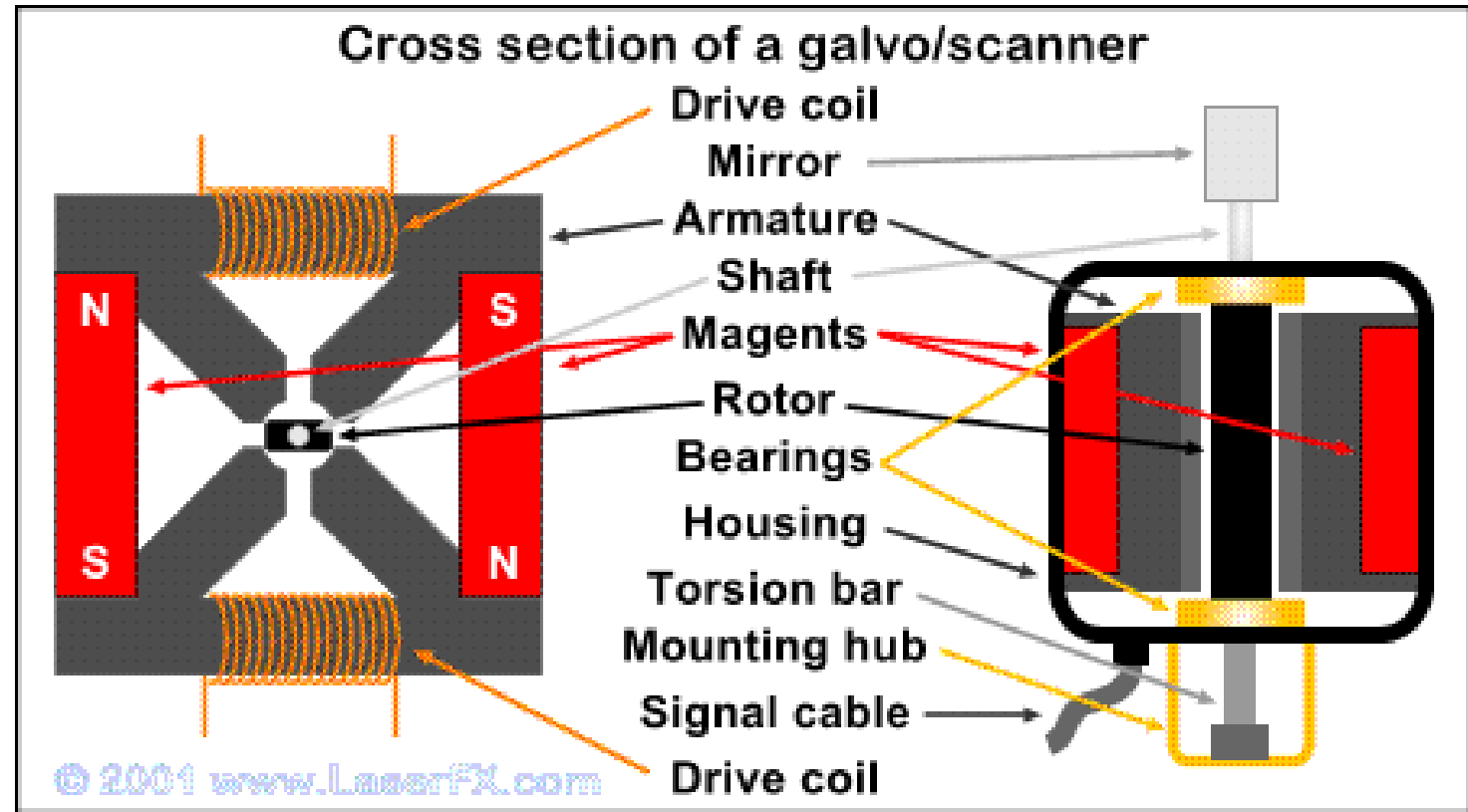
SLC



SLC

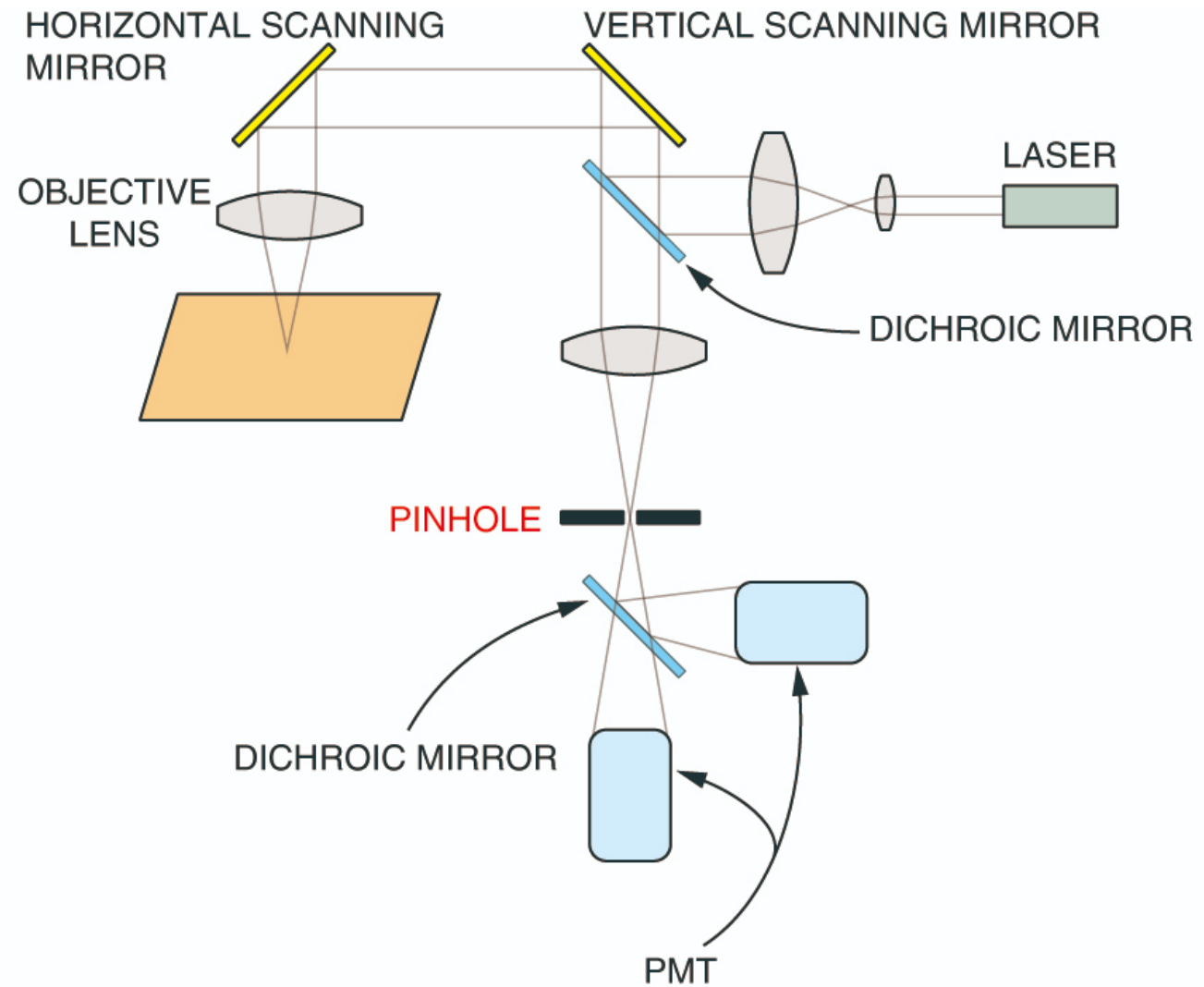


Galvo



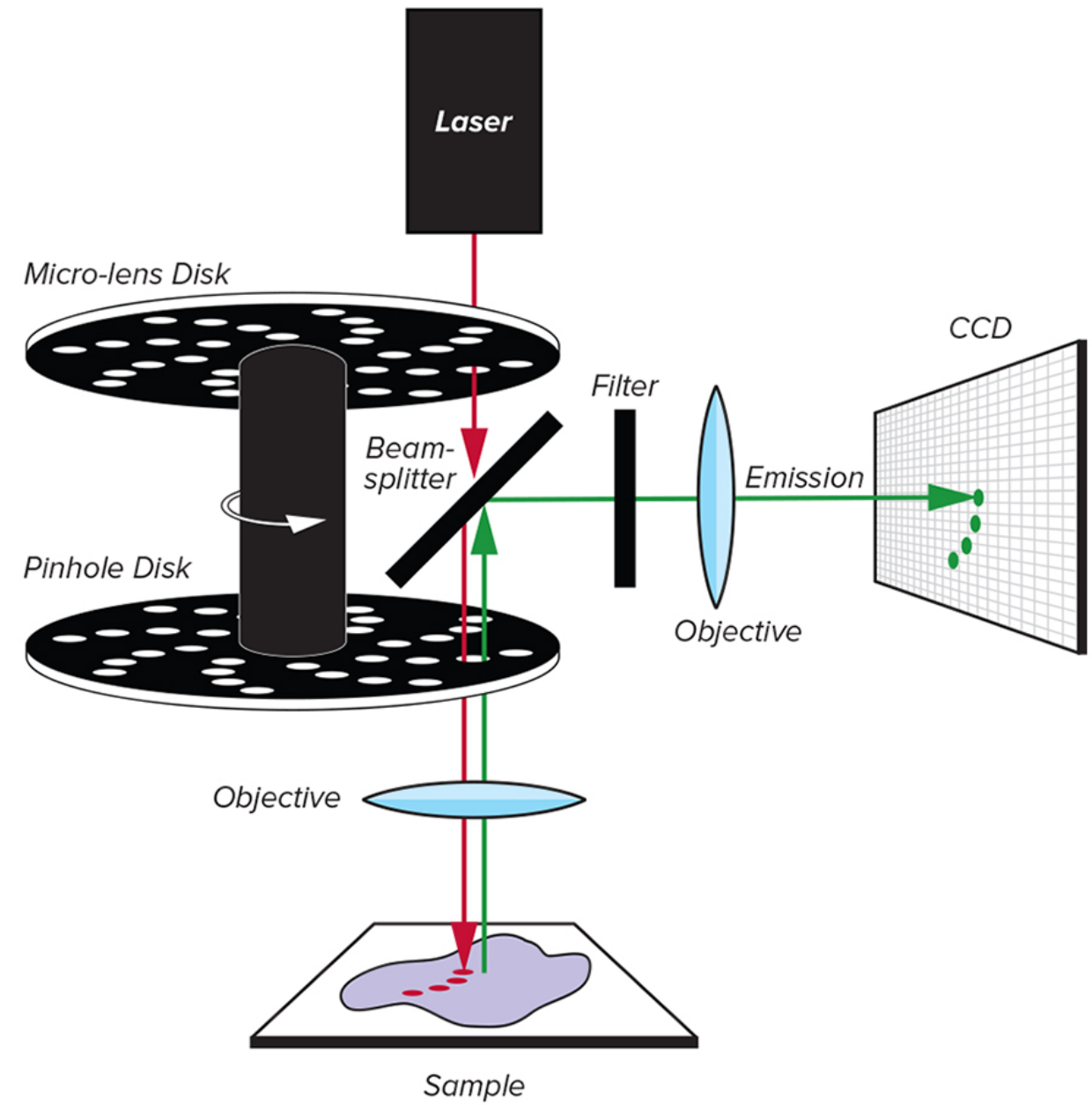
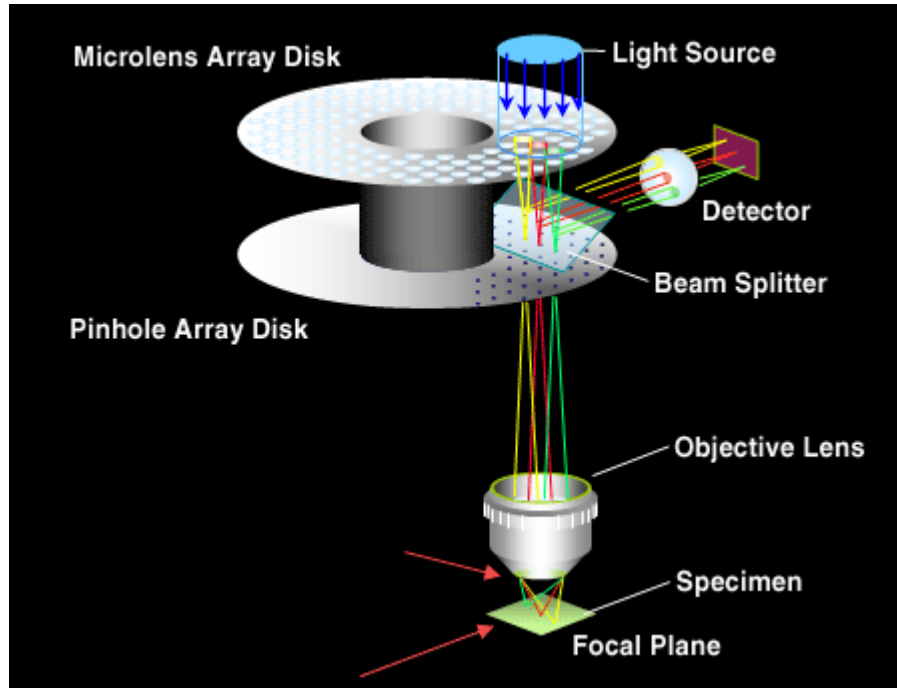
<http://www.laserfx.com/Works/Works3S.html>

SLC



<https://www.hamamatsu.com/eu/en/applications/laser-scanning-microscope/index.html>

SDC



SDC

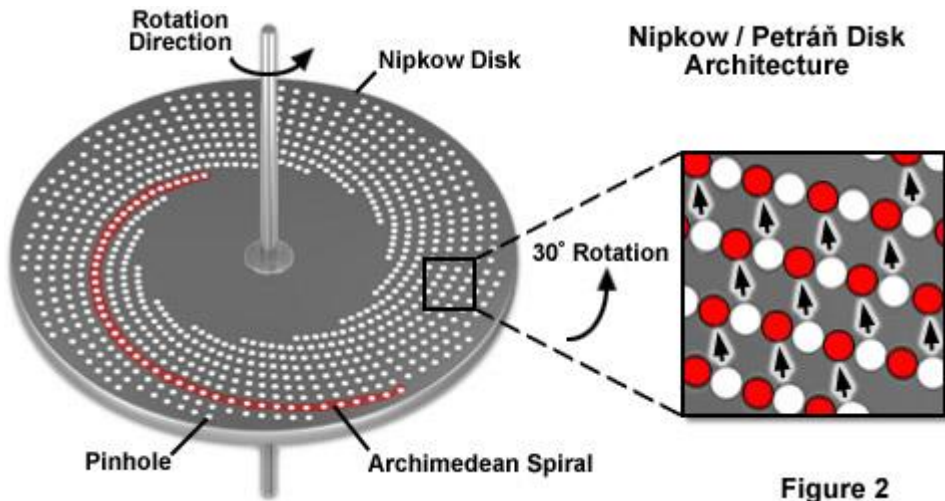


Figure 2

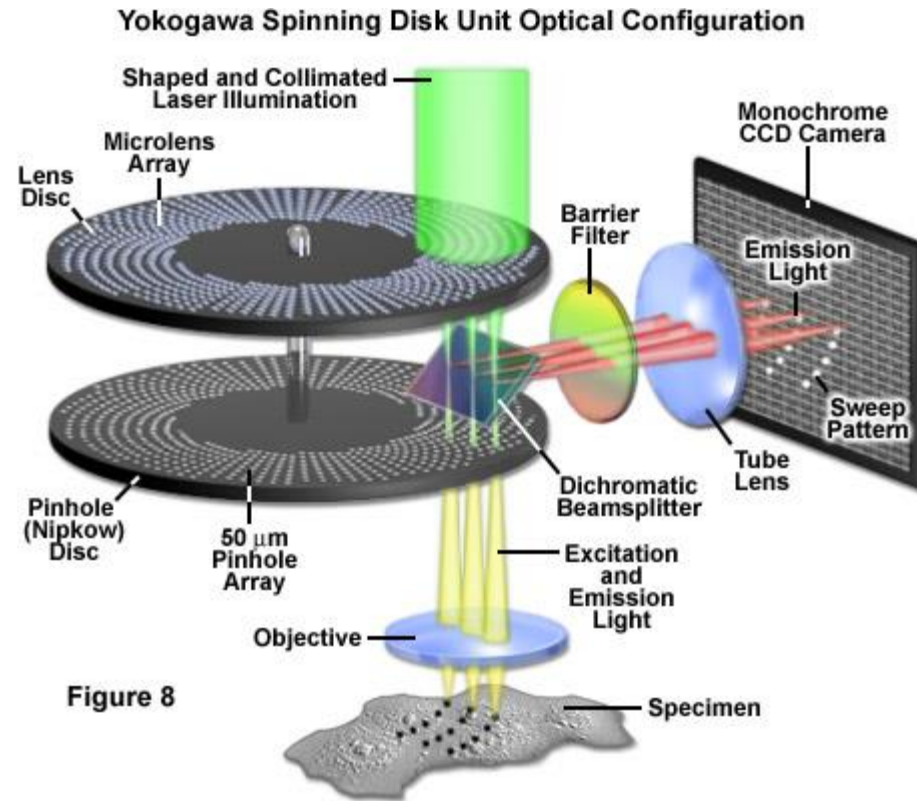
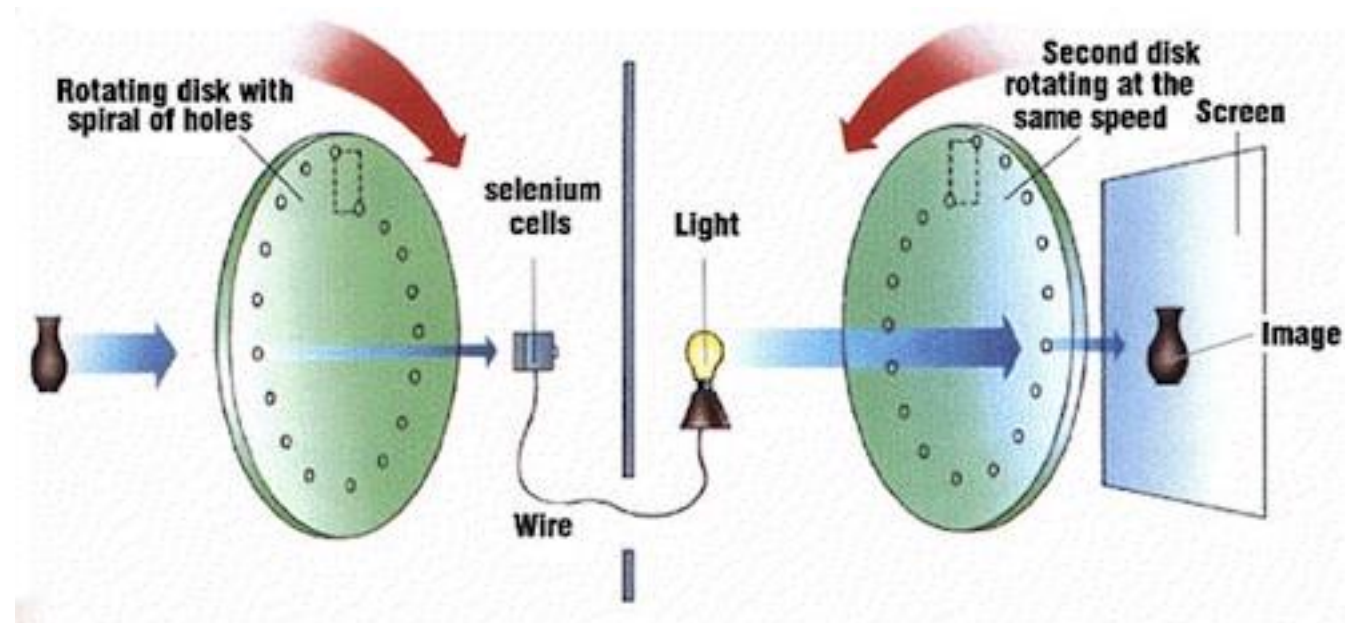


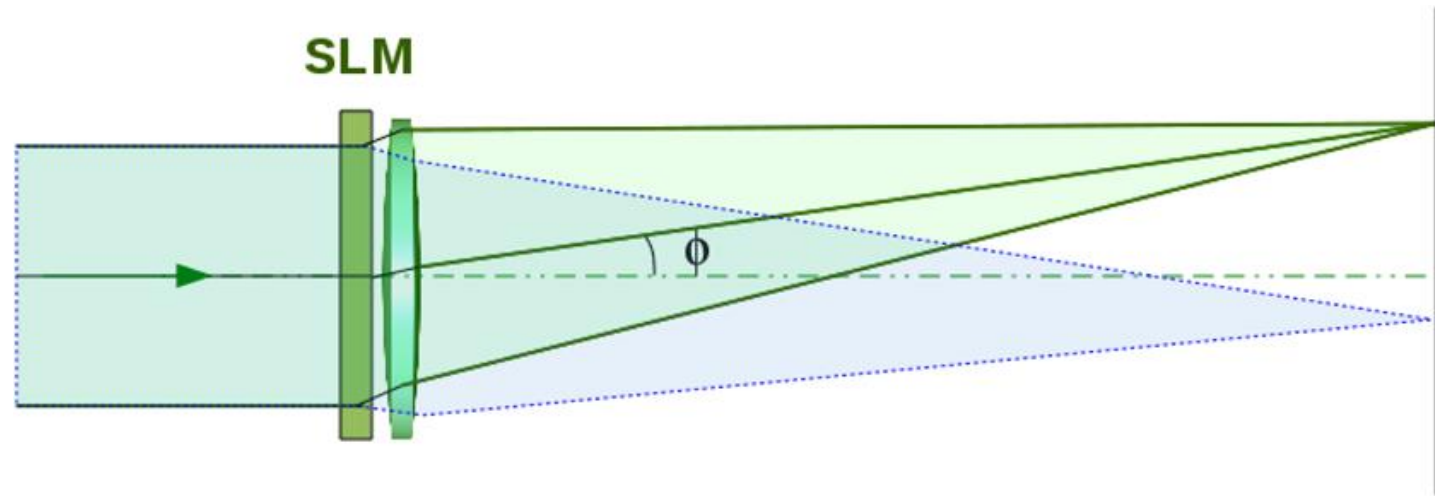
Figure 8

<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spinningdisk/introduction.html>

Dygresja: telewizja mechaniczna



PAM



- Przestrzenny modulator światła (Spatial Light Modulator)
- Matryca komórek ciekłokrystalicznych
- Kontrolowana dyfrakcja światła poprzez przykładanie odpowiedniego napięcia

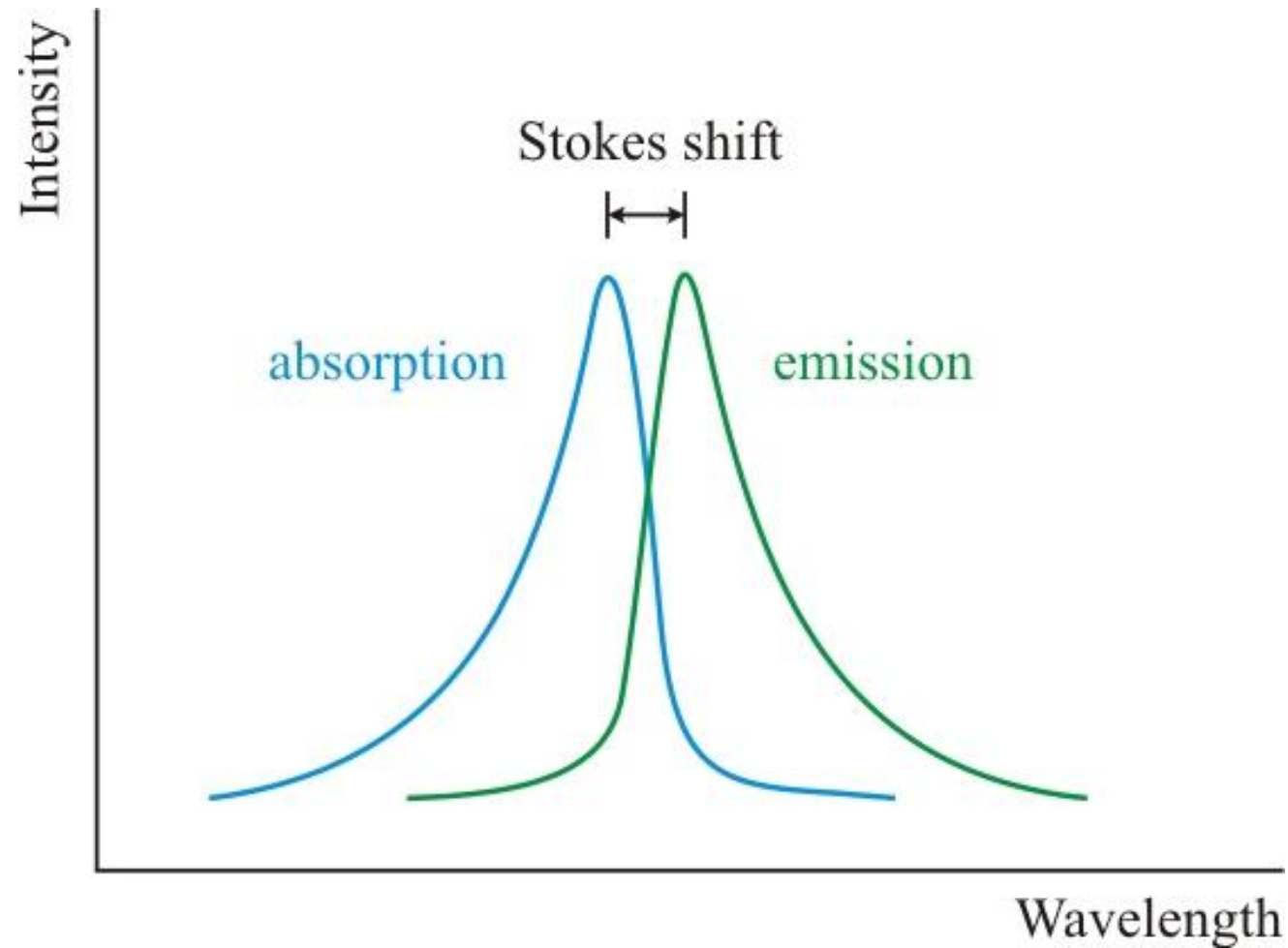
Fluorescencja

Fluorescencja – jeden z rodzajów **luminescencji** – zjawisko emitowania **światła** przez wzbudzony atom lub cząsteczkę. **Zjawisko** uznaje się za fluorescencję, gdy po zaniku czynnika pobudzającego następuje szybki zanik emisji w czasie około 10^{-8} s. Gdy czas zaniku jest znacznie dłuższy, to zjawisko jest uznawane za **fosforescencję**.

Padający foton wzbudza **elektron** w cząsteczce lub **atomie**. Wzbudzenie to wiąże się z przejściem elektronu do wzbudzonego stanu singletowego. Przy przejściu elektronu ze wzbudzonego stanu singletowego do stanu podstawowego następuje emisja światła. Długość fali promieniowania (wyemitowanego światła) jest dłuższa od długości fali zaabsorbowanej. Wynika to z degradacji części energii podczas przejść termicznych i bezpromienistych. Jest to tzw. **przesunięcie Stokesa**.

Fluorescencja próbki może być pochodzenia naturalnego (np. fluorescencja **chlorofilu**) lub być wynikiem dołączenia (kwalencyjnie lub poprzez jakikolwiek inny typ oddziaływań fizyko-chemicznych między substancjami) do elementów obserwowanej próbki **fluoroforów**, czyli **substancji chemicznych**, które fluoryzują po wzbudzeniu światłem o określonej długości. Drugi sposób jest najczęściej wykorzystywanym w **biologii**, a w szczególności w **biologii molekularnej**, gdyż pozwala, poprzez znajomość oddziaływań, na wyznakowanie interesujących elementów **komórki** (np. **białek**, czy **organelli**), **fluoroforami** o zadanych właściwościach (np. barwie emisji).

Fluoroscencja

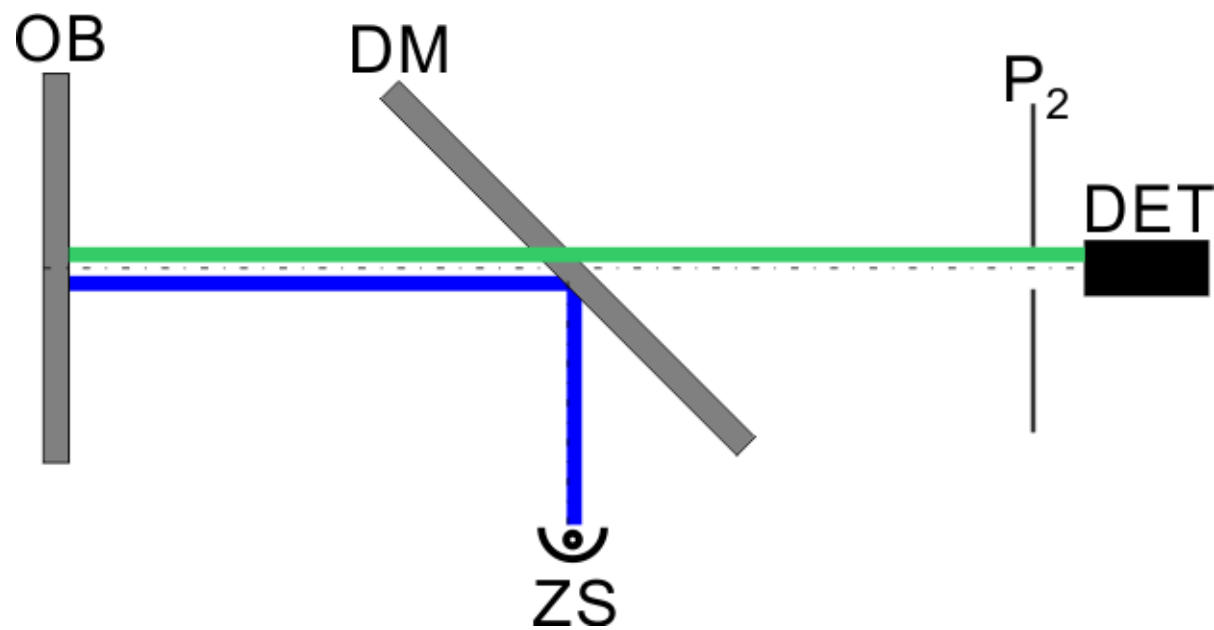


$$\lambda_{emitowana} > \lambda_{pochłaniana}$$

Utrata energii na skutek:

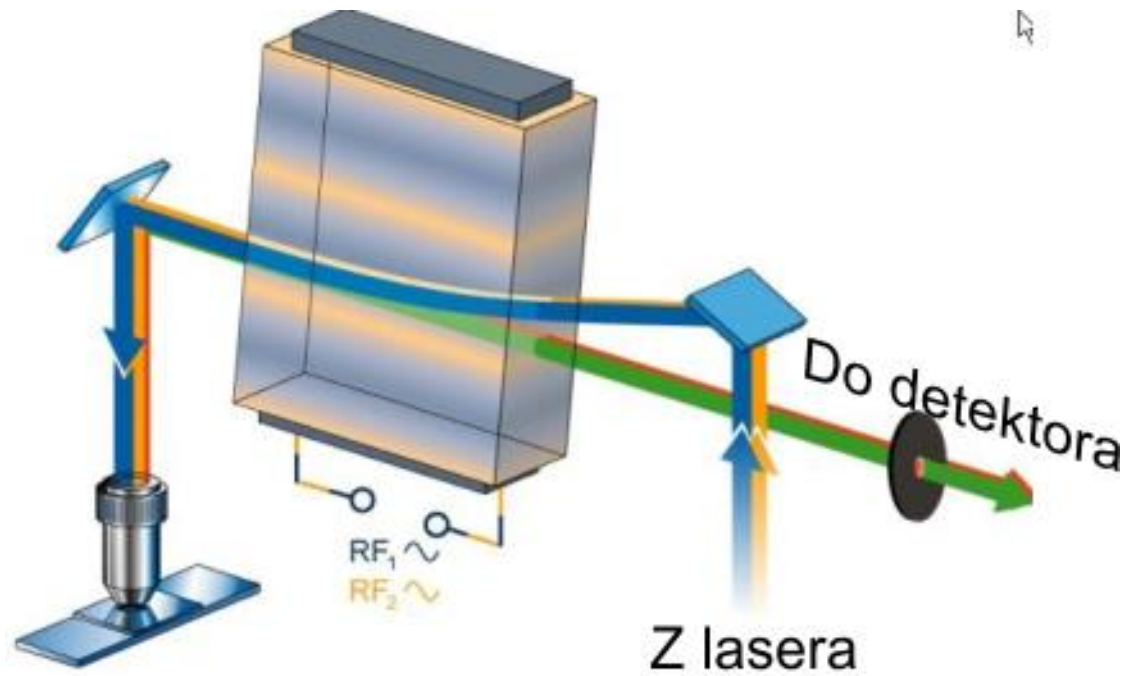
- relaksacji wibracyjnej
- reorganizacji rozpuszczalnika

Zwierciadło dichroiczne



AOBS

- AOBS (Acousto Optical Beam Splitter)



Fotopowielacz

Aby wykryć słabe światło emitowane przez fluorochromy z punktu oświetlonego laserem na pojedynczej płaszczyźnie optycznej preparatu, detektory w mikroskopach konfokalnych muszą się odznaczać dużą czułością określaną przez wysoki współczynnik sygnału do szumu – powszechnie stosowane fotopowielacze/fotodiody lawinowe.

