

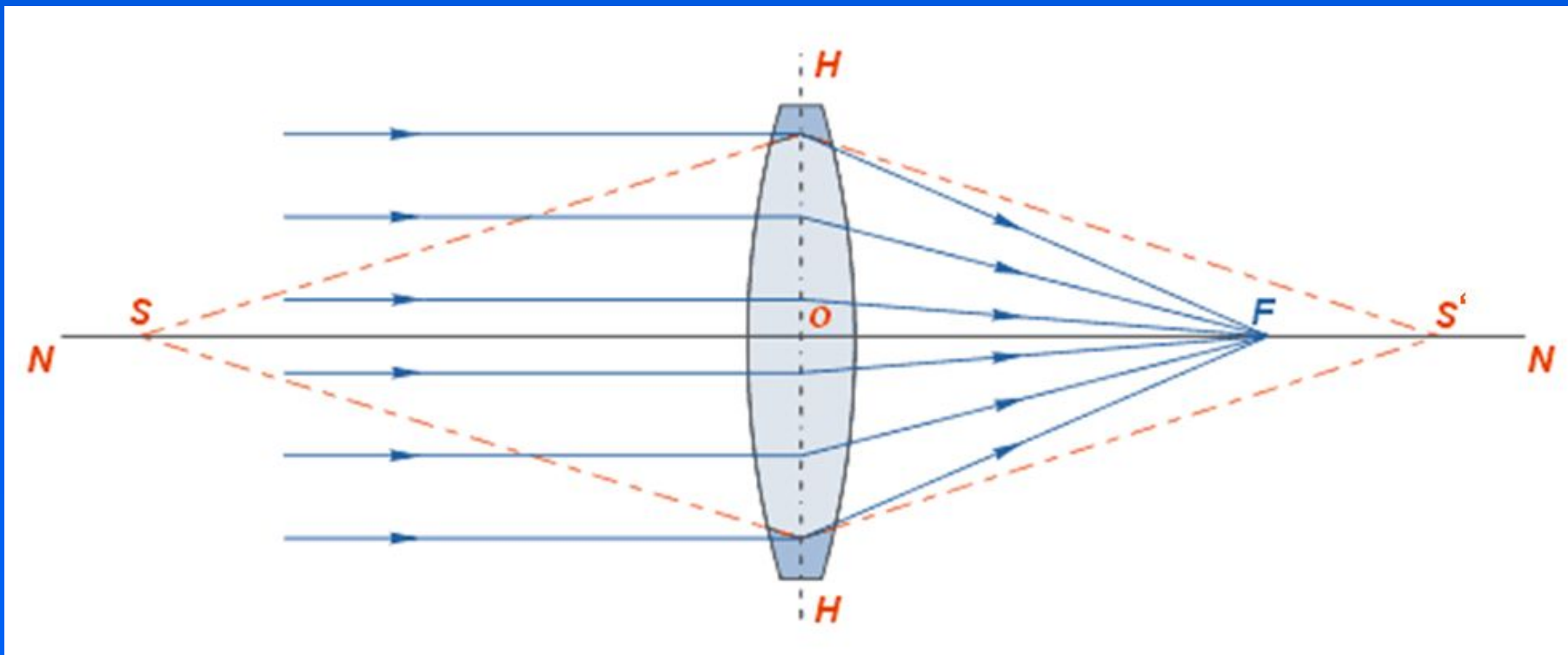
Лекция 1

Основные компоненты микроскопа

Методы усиления контраста

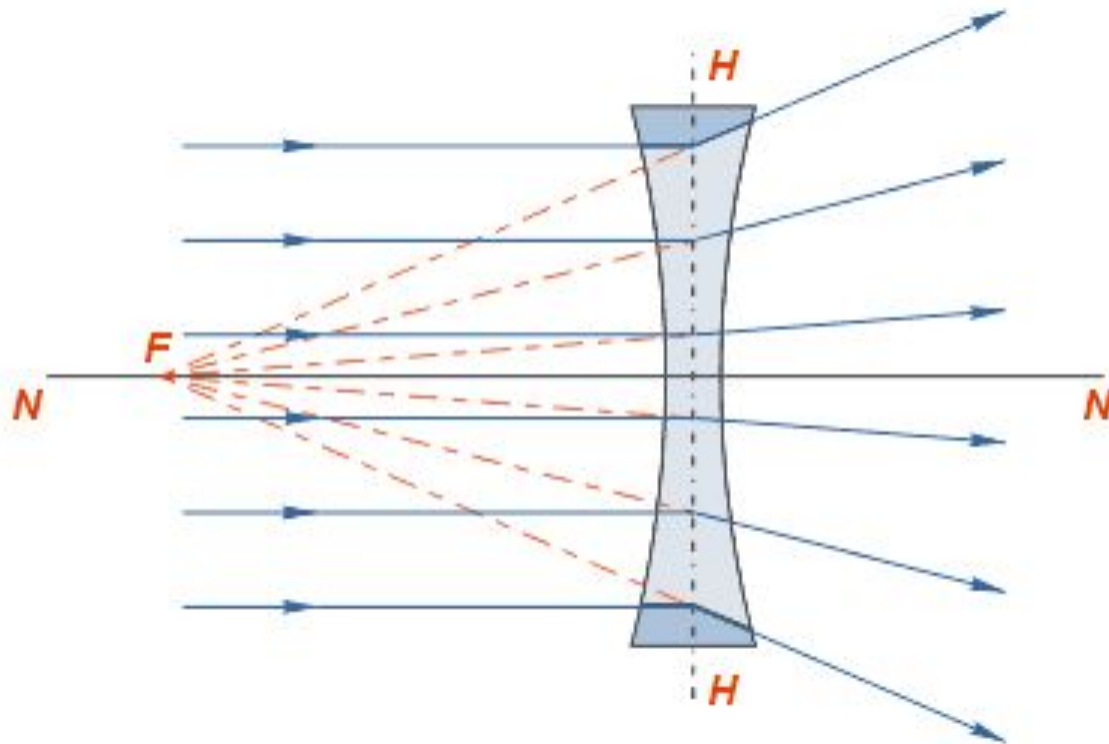
Флуоресцентная микроскопия

Собирающая линза



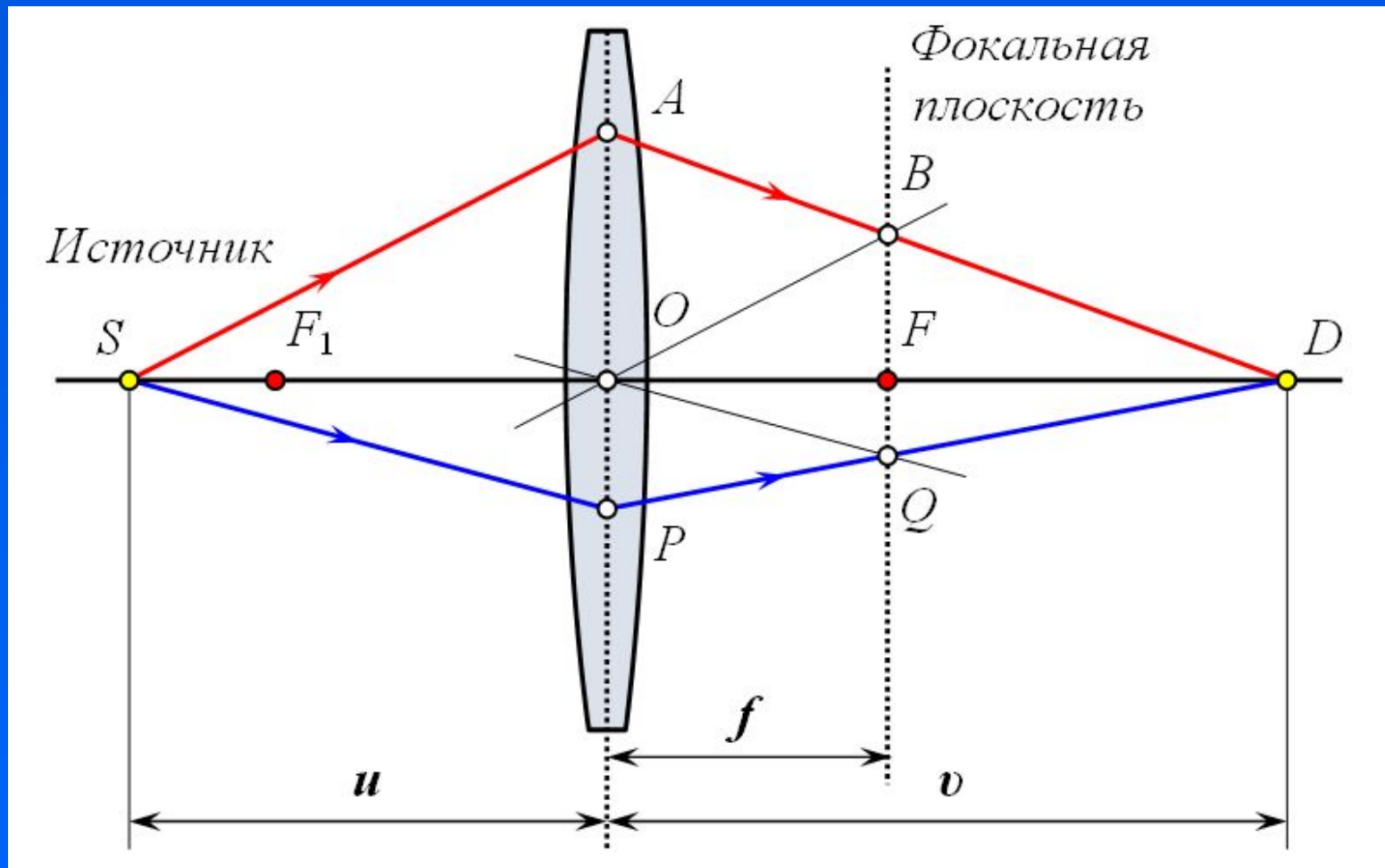
Параллельный пучок собирается в фокусе (F).
Расходящийся пучок из точки позади фокуса (S)
собирается позади фокуса (S')

Рассеивающая линза



Параллельный пучок расходится из мнимого фокуса (F)

Формула тонкой линзы



Изображение точки: $1/u + 1/v = 1/f$

Простые сферические линзы

«Формула тонкой линзы»:

$$1/u + 1/v = 1/f,$$

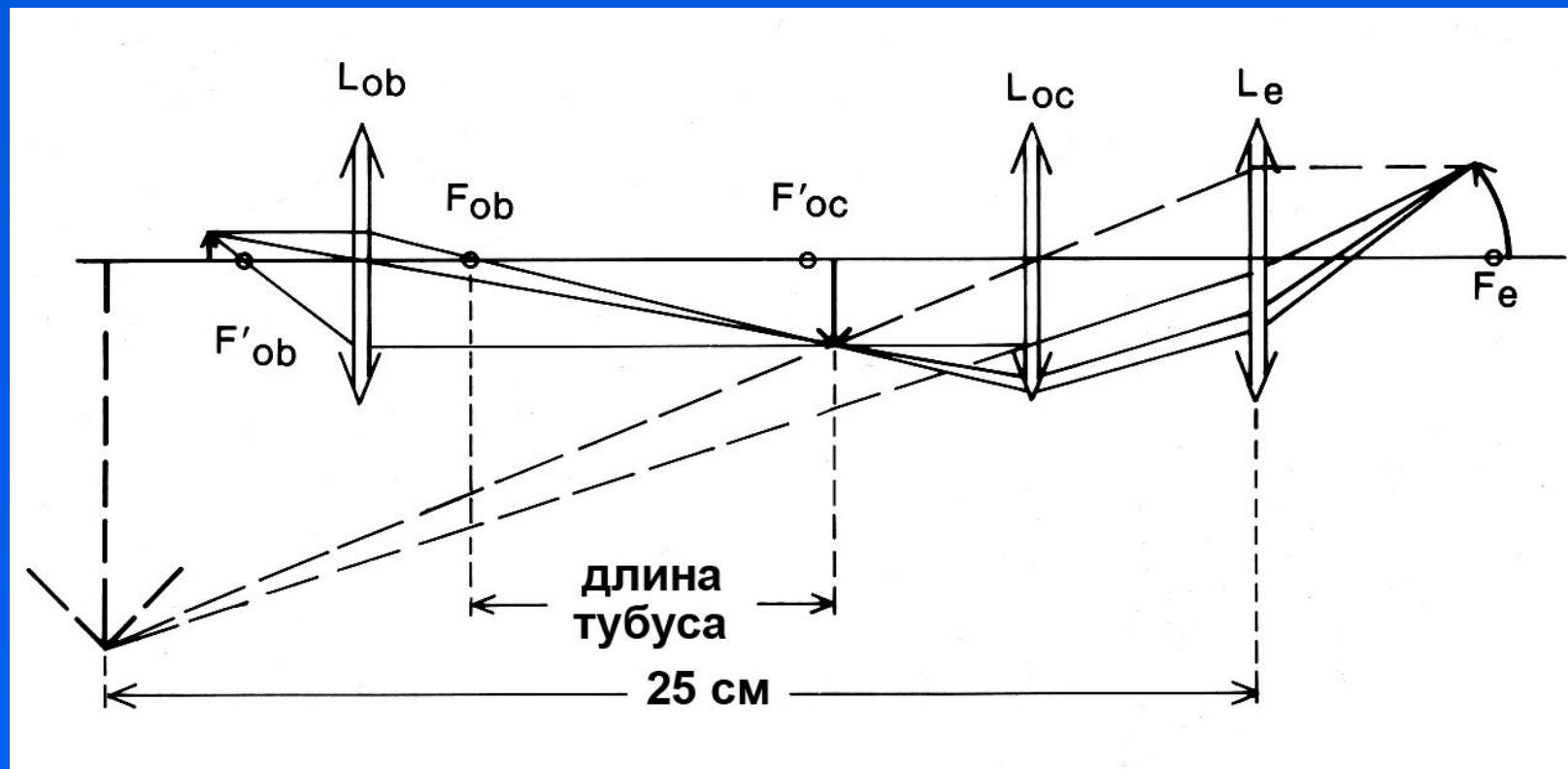
где **U** и **V** расстояния от линзы до предмета и его изображения; **f** – фокусное расстояние линзы.

Следствие: линза дает увеличенное перевернутое изображение объекта только тогда, когда он расположен между фокусом и двойным фокусом линзы.

Собирающая линза (толщина в центре больше, чем по краю) – $f > 0$;
фокус действительный

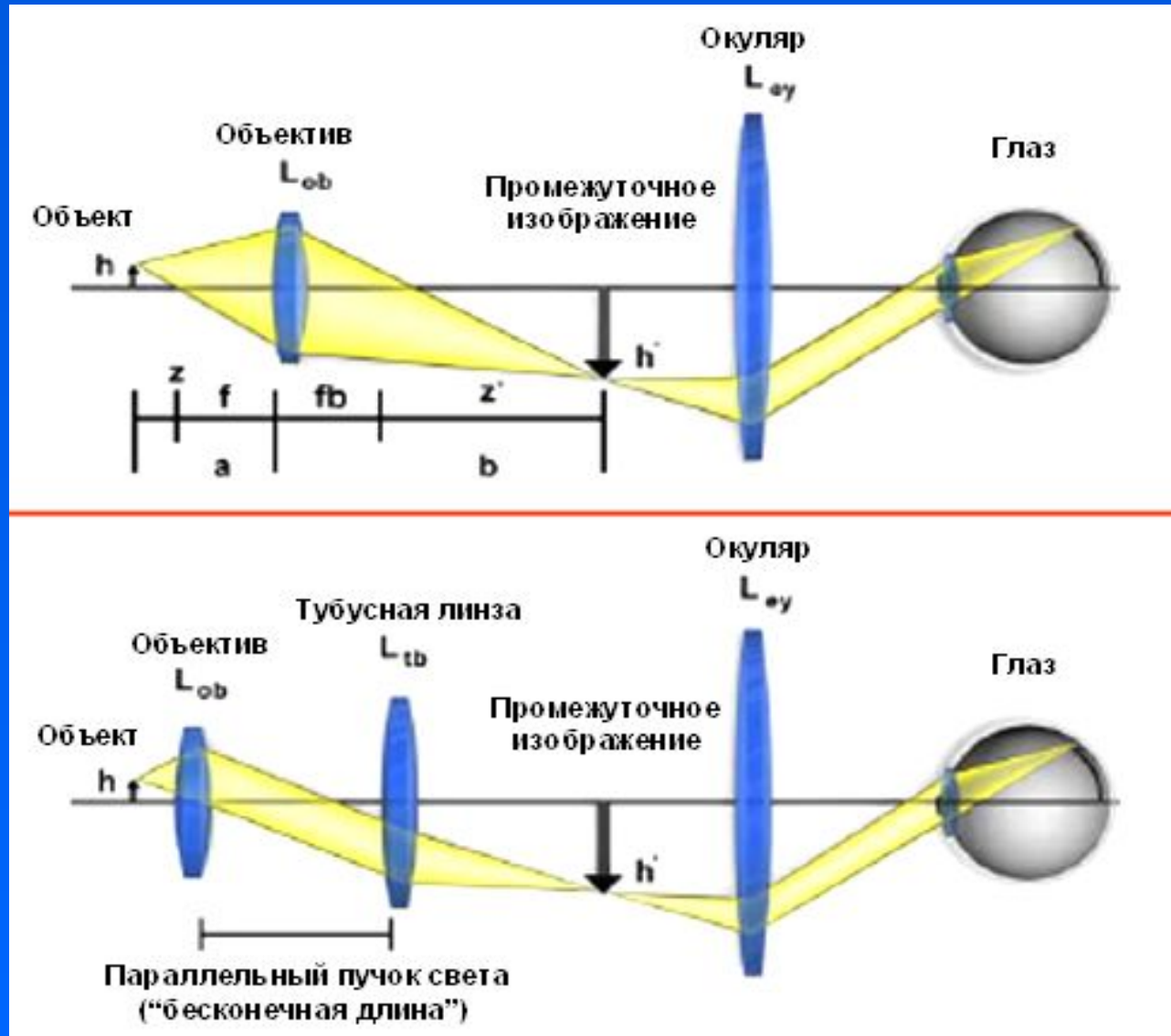
Рассеивающая линза (толщина в центре меньше, чем по краю) – $f < 0$;
фокус мнимый

Увеличение микроскопа

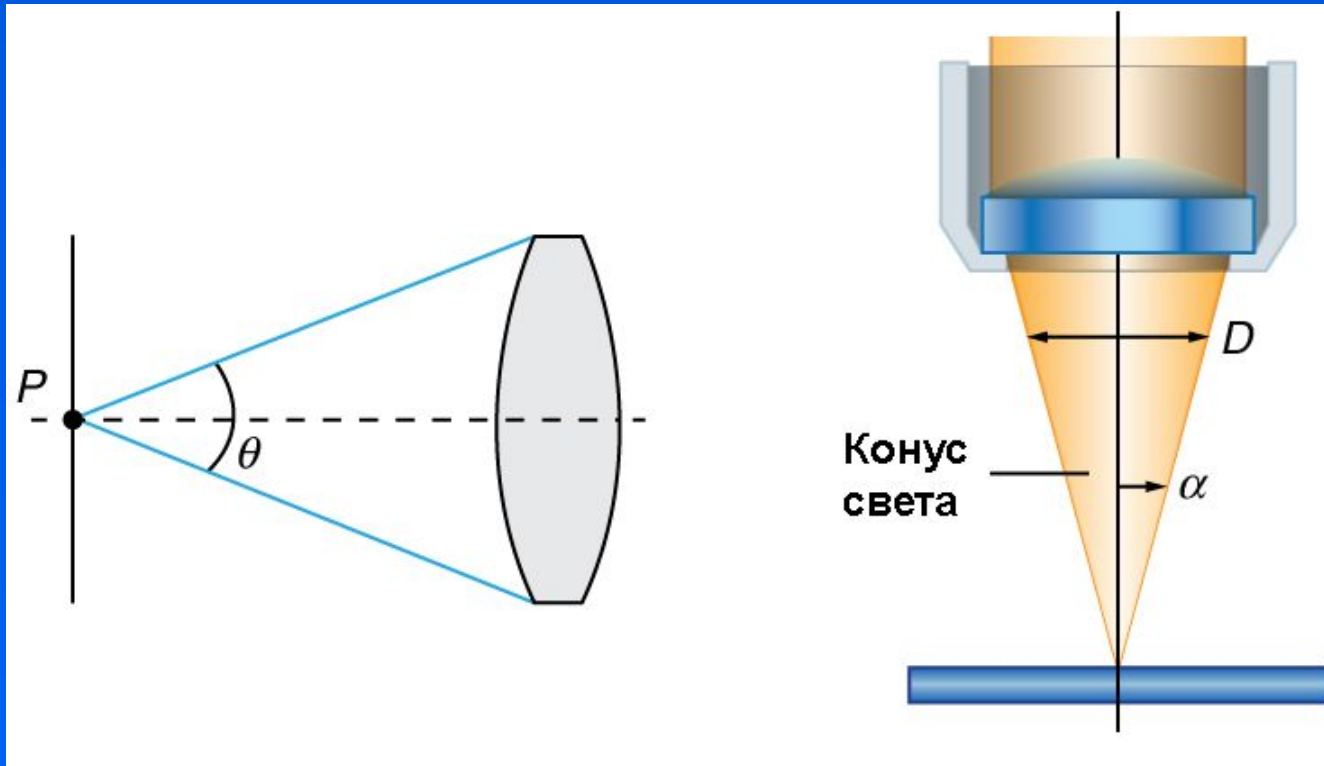


Если рассматривать микроскоп как пару тонких линз, то промежуток Δ (длина тубуса) – 160 мм; $F_{об}$ (объектива) – 2-20 мм (в зависимости от увеличения); F_{oc} (окуляра) – расстояние отрицательное. Расчетное изображение (мнимое) находится на расстоянии 250 мм от глаза наблюдателя.

Ход лучей в микроскопах с конечной и бесконечной оптической длиной тубуса



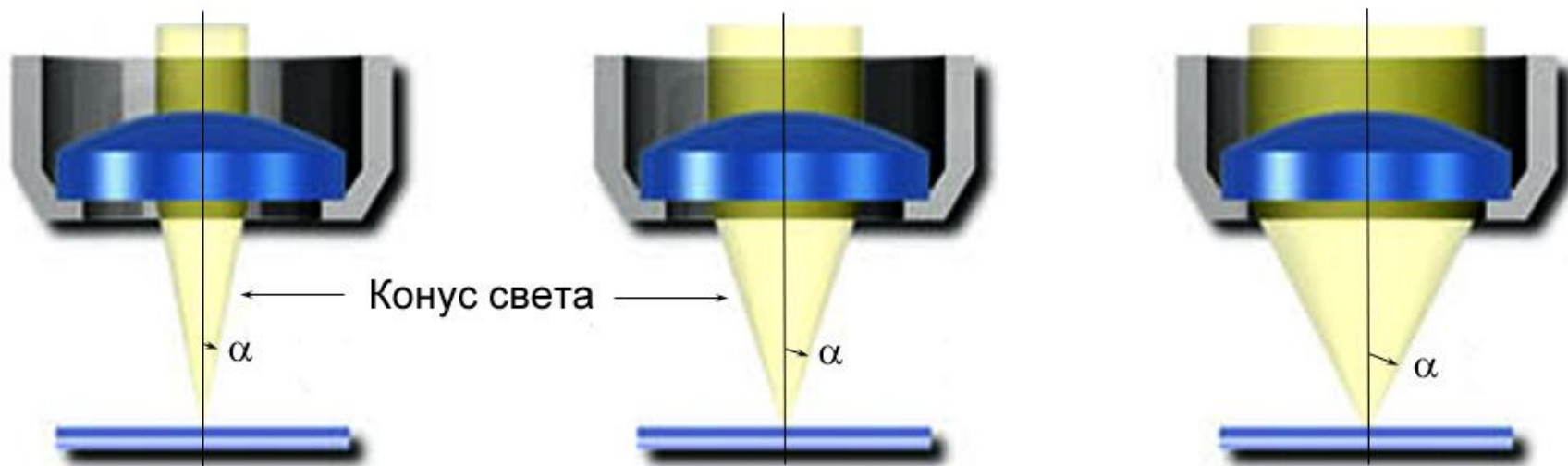
Апертура объектива



Апертура объектива микроскопа – угол (θ) конуса света, собираемого объективом от предмета, расположенного вблизи фокуса. Апертура определяется соотношением между фокусным расстоянием объектива и диаметром его входного зрачка (D).

Числовая апертура объектива определяется как $NA = \sin(\theta/2)$.

Числовая апертура объектива



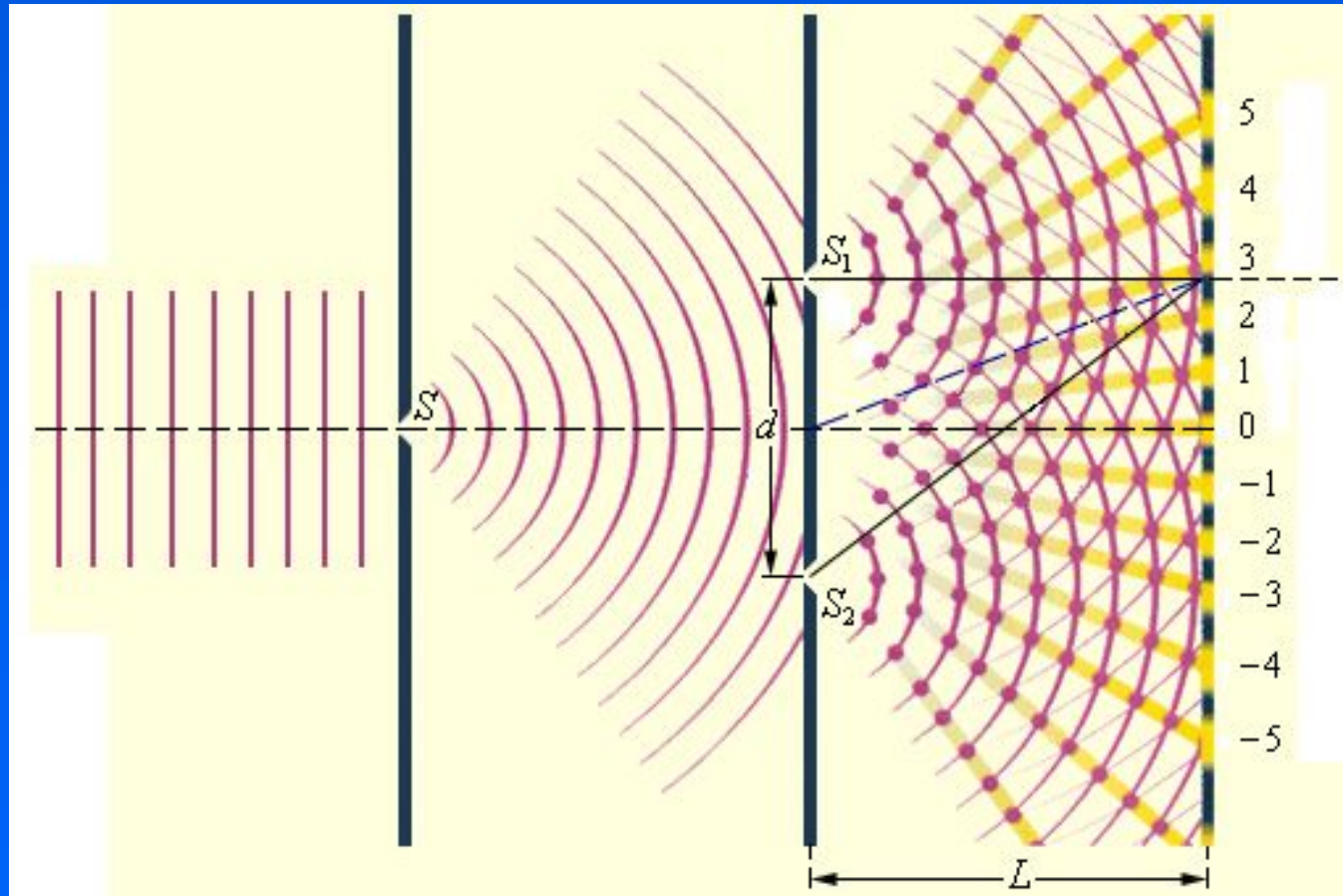
Апертура определяется соотношением между фокусным расстоянием объектива и диаметром его входного зрачка (D).

На рисунке приведены примеры различных апертур – от малой (слева) до большой (справа). По техническим причинам, которые будут рассмотрены в дальнейшем, объективы с большой апертурой имеют короткое фокусное расстояние.

Маркировка объектива



Опыт Юнга – создание интерференционной картины



Свет, последовательно проходящий через одну, а затем две щели (S ; S_1 и S_2) создает на экране сложную картину чередующихся полос различной яркости.

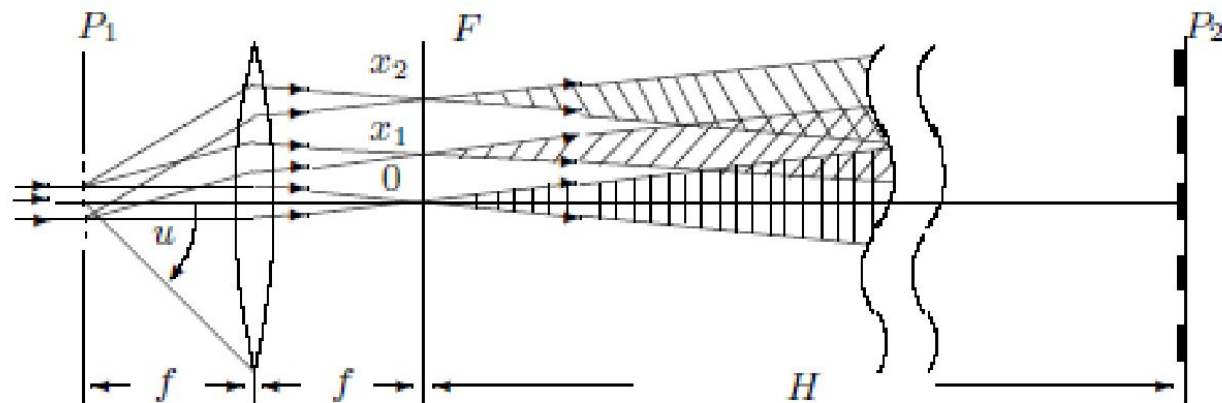


Рис. 2. Образование изображения в объективе микроскопа. P_1 — плоскость предмета, F — задняя фокальная плоскость объектива, P_2 — плоскость, сопряженная с предметной плоскостью. В плоскости P_2 световые пучки сильно перекрываются

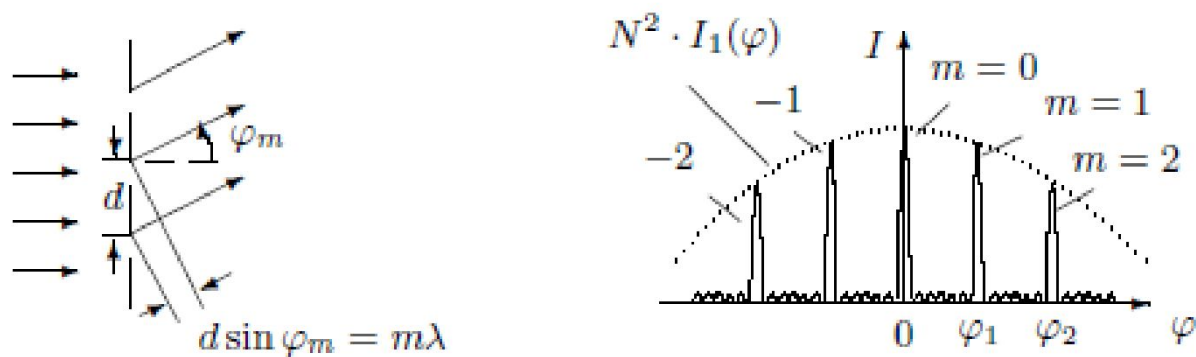


Рис. 3. Спектр амплитудной решетки. $I_1(\varphi)$ — распределение интенсивности при дифракции света на одиночной щели, N — число щелей решетки

Разрешающая способность микроскопа по Аббе

Для дифракционной решетки угол первого дифракционного максимума α рассчитывается по формуле:

$$\sin \alpha = \lambda / d,$$

где λ – длина волны, d – период решетки.

Согласно условию Аббе, разрешающая способность микроскопа определяется максимальным углом отклонения дифрагированного света, попадающего в объектив. То есть,

$$\sin \alpha \leq NA_{об.},$$

откуда получаем разрешающую способность объектива при освещении параллельным пучком света:

$$\lambda / NA_{об.},$$

где λ – длина волны света, NA – числовая апертура объектива. При использовании косого освещения по критерию Аббе разрешающая способность возрастает вдвое и составит для поглощающих объектов $0.5 \lambda / NA$.

Разрешающая способность объектива микроскопа

Согласно критерию Рэлея, разрешение свободного от аберраций оптического прибора может быть вычислено по формуле:

$$R = 0,61 \lambda / \sin \alpha,$$

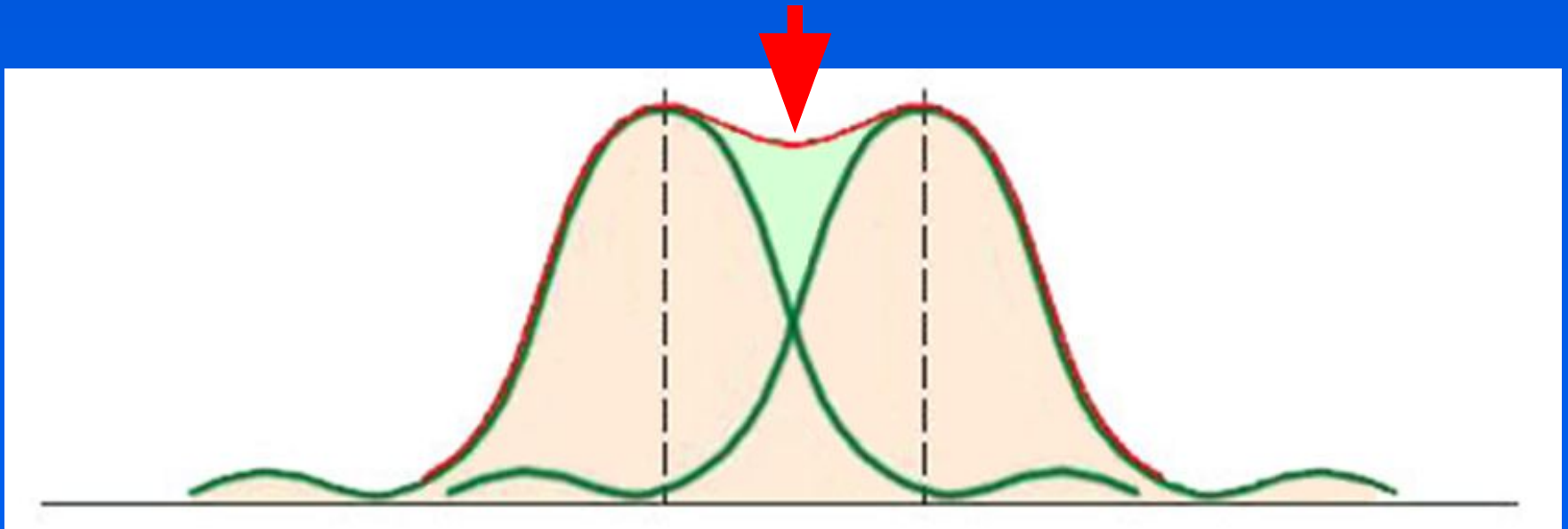
где R – минимальное разрешаемое расстояние между точками, α – максимальный угол, под которым отклоняющийся от оси свет попадает в линзу.

Для объектива микроскопа, где диаметр диска Эри определяется апертурой объектива, получаем

$$0.61 \lambda / NA,$$

где NA – числовая апертура объектива.

Критерий Рэлея



Когда диски Эри частично перекрываются, то суммарная интенсивность в минимуме (указан стрелкой) растет по мере сближения объектов, и затем минимум исчезает вовсе.

При выполнении критерия Рэлея интенсивность центрального минимума составляет $\sim 73,7\%$ от соседних максимумов.

Конструкция микроскопа (оптические элементы)

Для настройки света необходимо различать подвижные и неподвижные элементы микроскопа.

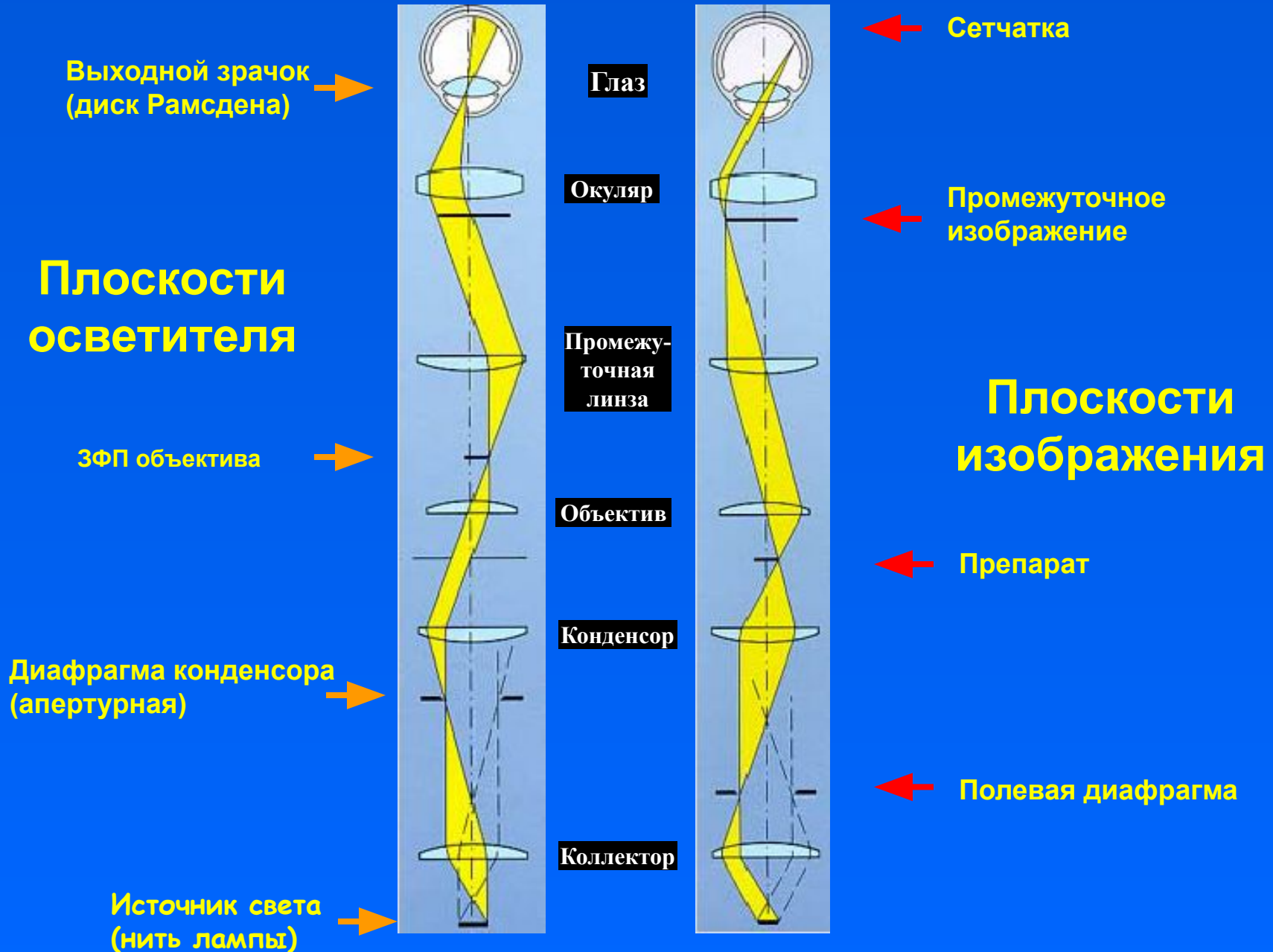
Неподвижные элементы микроскопа: объектив и окуляр.

Подвижные элементы микроскопа: осветитель (лампа); конденсор, диафрагмы (полевая и апертурная), предметный столик.

Микроскоп для работы в проходящем свете представляет собой набор из 4 собирающих сложных линз: коллектор (линза перед осветителем); конденсор (линза перед препаратом), объектив и окуляр.

Перед осветителем и перед конденсором устанавливаются регулируемые диафрагмы – полевая и апертурная. Эти диафрагмы нужны для настройки максимальной контрастности изображения.

Сопряженные плоскости



Сопряженные оптические плоскости в микроскопе

1 группа:

- спираль лампы
- апертурная диафрагма (конденсора)
- задняя фокальная плоскость объектива
- входной зрачок глаза (диск Рамсдена)

2 группа:

- полевая диафрагма (осветителя)
- препарат
- диафрагма поля зрения (передний фокус) окуляра
- сетчатка глаза

Установка света по Келеру

1. Фокусировка лампы и центрировка осветителя.
2. Фокусировка полевой диафрагмы.
3. Центрировка диафрагмы конденсора с помощью вспомогательного микроскопа.
4. Окончательная настройка осветителя.
5. Согласование полевой и апертурной диафрагм с используемым объективом.
6. Максимальное разделение по оси z двух групп сопряженных плоскостей.

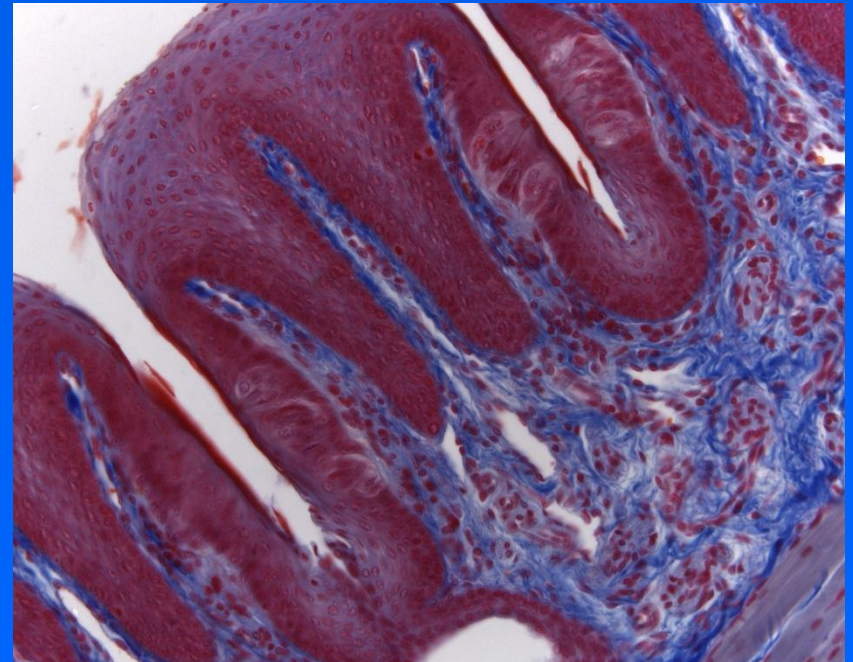
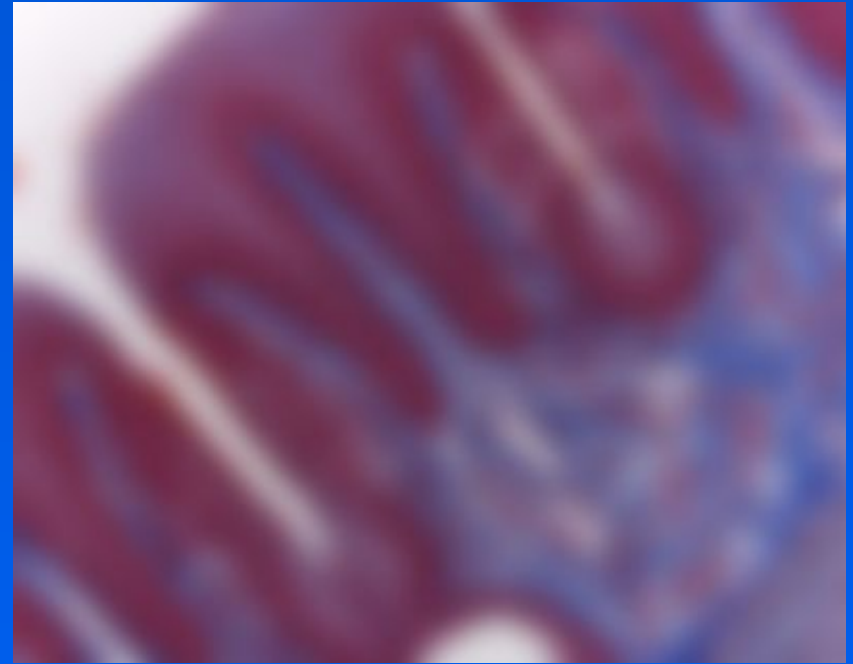
Необходимые элементы для установки света по Келеру

В микроскопе должны быть:

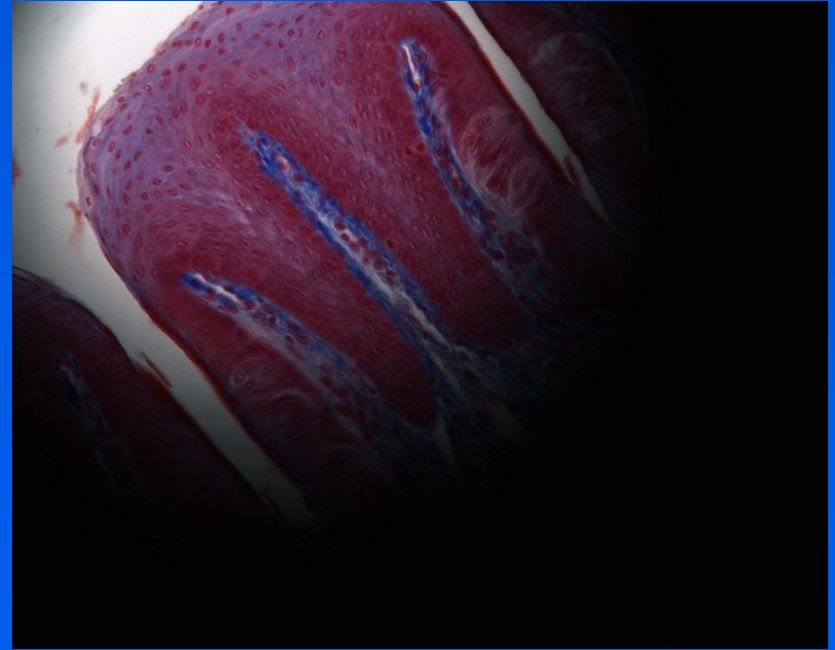
- Регулируемая полевая диафрагма (осветителя)
- Регулируемая и центрируемая апертурная диафрагма (конденсора)
- Перемещающийся вдоль трех осей конденсор

Последовательные шаги:

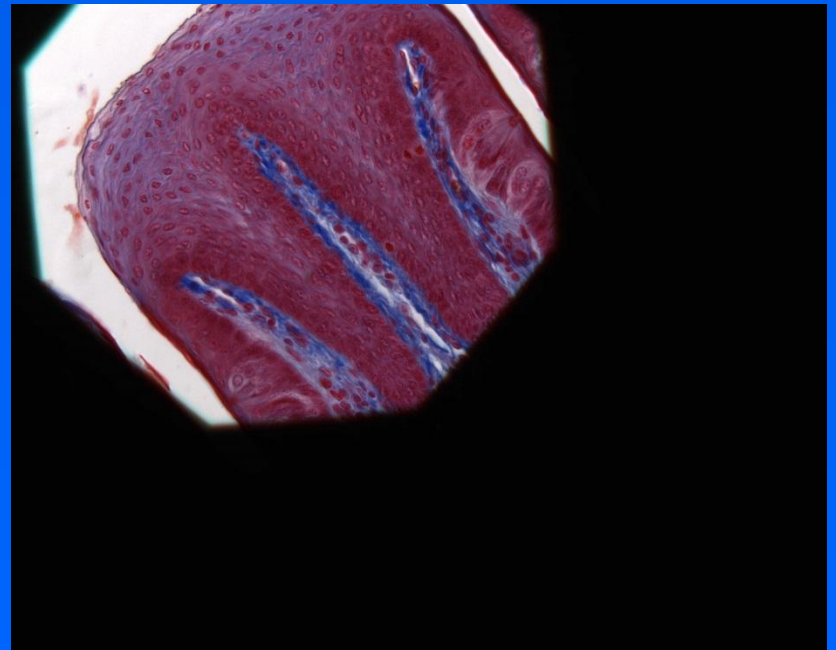
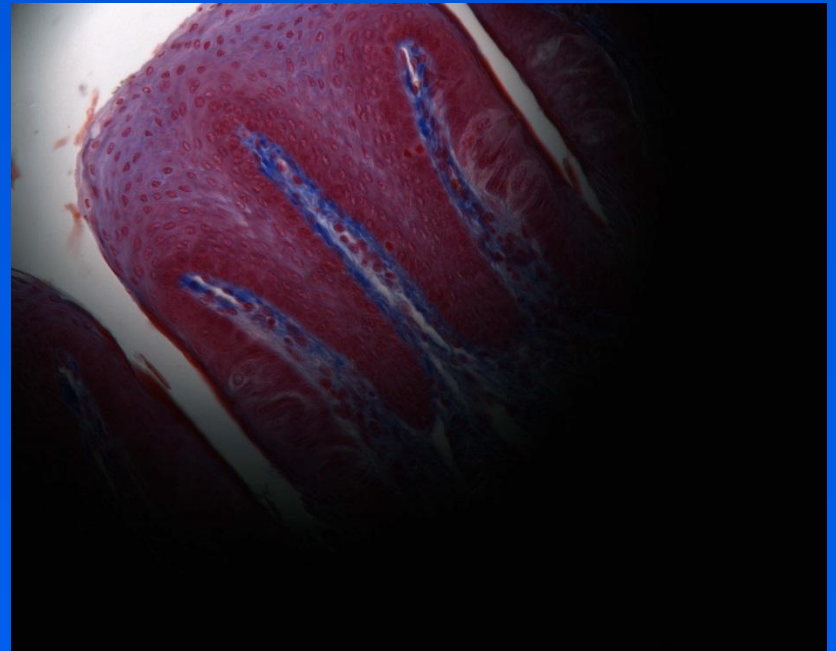
- 1) Полностью открыть полевую и апертурную диафрагмы, увидеть препарат
- 2) Сфокусироваться на препарат
 - Закрывать полевую диафрагму
 - Сфокусировать изображение диафрагмы перемещая конденсор вверх-вниз
 - Центрировать полевую диафрагму, затем открыть ее до освещения поля зрения
 - Вставить вспомогательный микроскоп
 - Закрывать апертурную диафрагму до $4/5$ апертуры объектива



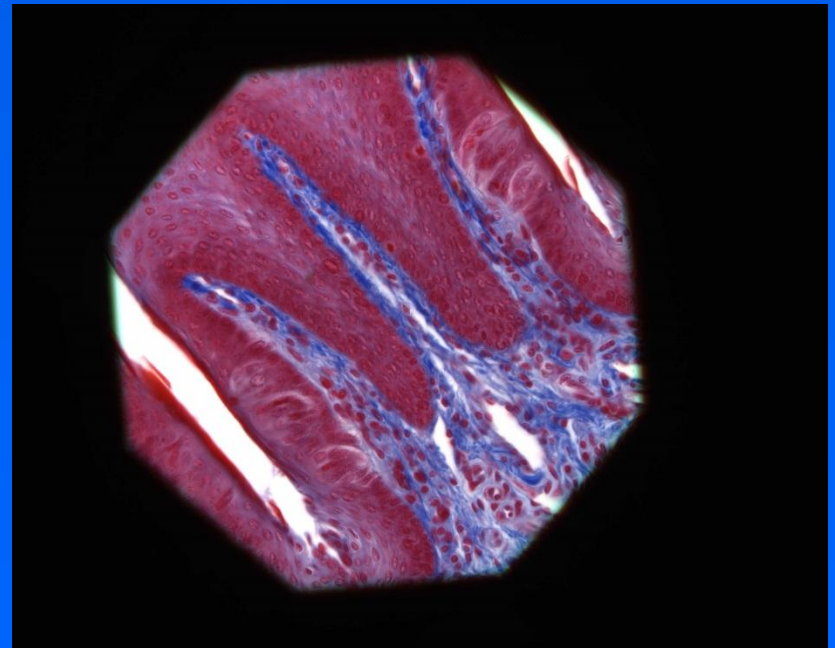
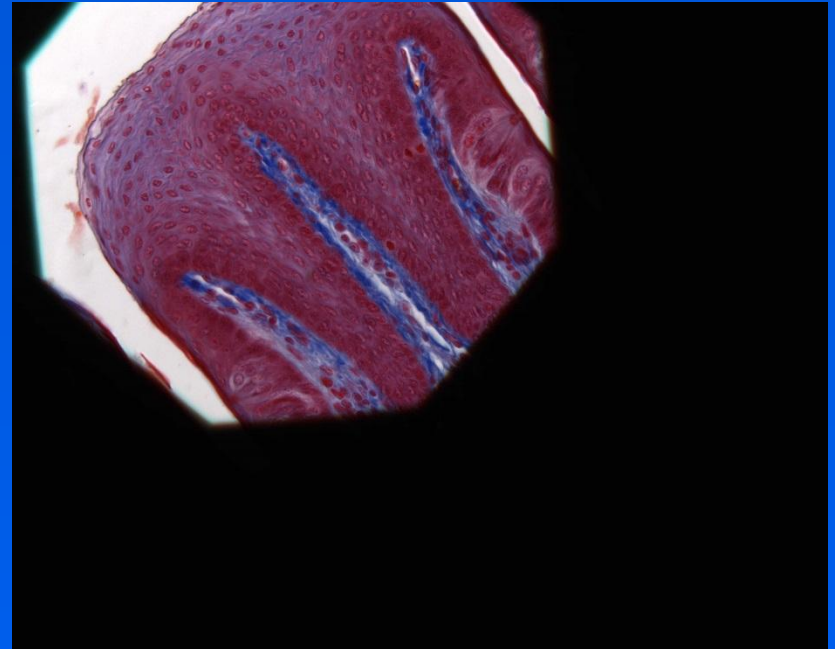
- 1) Открыть полевую и апертурную диафрагмы
- 2) Сфокусировать препарат
- 3) Закрывать полевую диафрагму
 - Сфокусировать изображение диафрагмы перемещая конденсор вверх-вниз
 - Центрировать полевую диафрагму, затем открыть ее до освещения поля зрения
 - Вставить вспомогательный микроскоп
 - Закрывать апертурную диафрагму до $4/5$ апертуры объектива



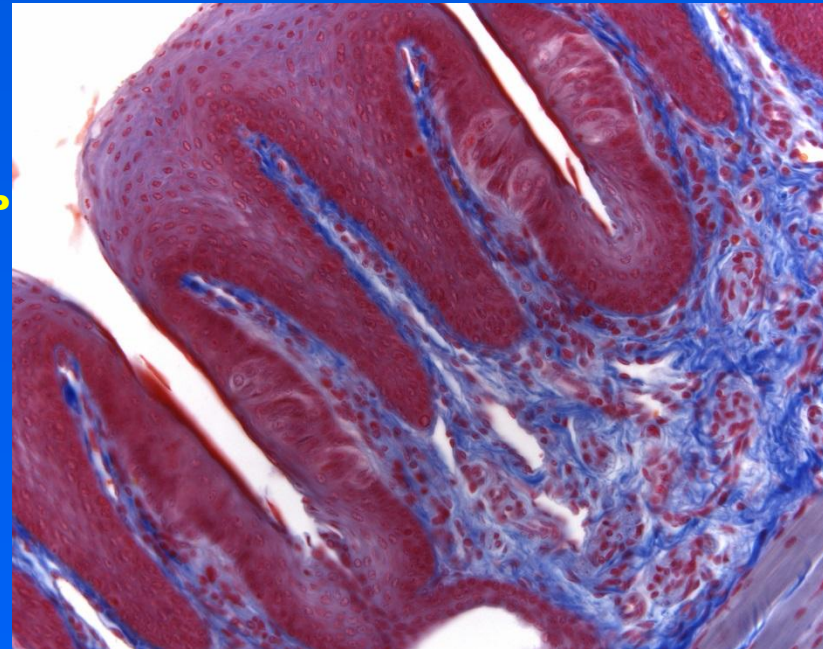
- 1) Открыть полевую и апертурную диафрагмы
 - 2) Сфокусировать препарат
 - 3) Закрывать полевую диафрагму
 - 4) Сфокусировать изображение диафрагмы, перемещая конденсор вверх-вниз
- Центрировать полевую диафрагму, затем открыть ее до освещения поля зрения
 - Вставить вспомогательный микроскоп
 - Закрывать апертурную диафрагму до $4/5$ апертуры объектива



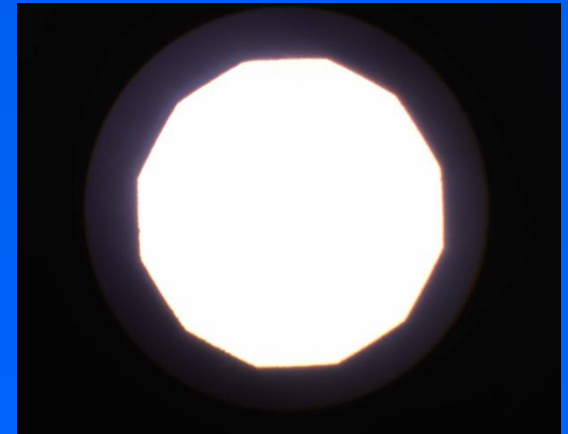
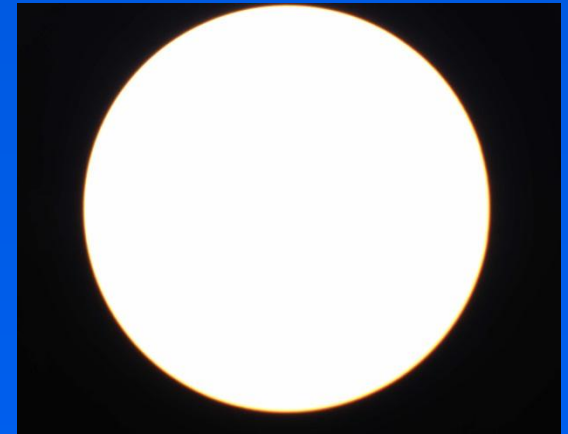
- 1) Открыть полевую и апертурную диафрагмы
- 2) Сфокусировать препарат
- 3) Закрыть полевую диафрагму
- 4) Сфокусировать изображение диафрагмы перемещая конденсор вверх-вниз
- 5) Центрировать полевую диафрагму
 - затем открыть ее до освещения поля зрения
 - Вставить вспомогательный микроскоп
 - Закрыть апертурную диафрагму до $\frac{4}{5}$ апертуры объектива



- 1) Открыть полевою и апертурную диафрагмы
 - 2) Сфокусировать препарат
 - 3) Закрывать полевою диафрагму
 - 4) Сфокусировать изображение диафрагмы перемещая конденсор вверх-вниз
 - 5) Центрировать полевою диафрагму
 - 6) Открыть ее до освещения поля зрения
- Вставить вспомогательный микроскоп
 - Закрывать апертурную диафрагму до $4/5$ апертуры объектива



- 1) Открыть полевую и апертурную диафрагмы
- 2) Сфокусировать препарат
- 3) Закрыть полевую диафрагму
- 4) Сфокусировать изображение диафрагмы перемещая конденсор вверх-вниз
- 5) Центрировать полевую диафрагму
- 6) Открыть ее до освещения поля зрения
- 7) Вставить вспомогательный микроскоп
- 8) Закрыть апертурную диафрагму до $\frac{4}{5}$ апертуры объектива



Преимущества установки света по Келеру

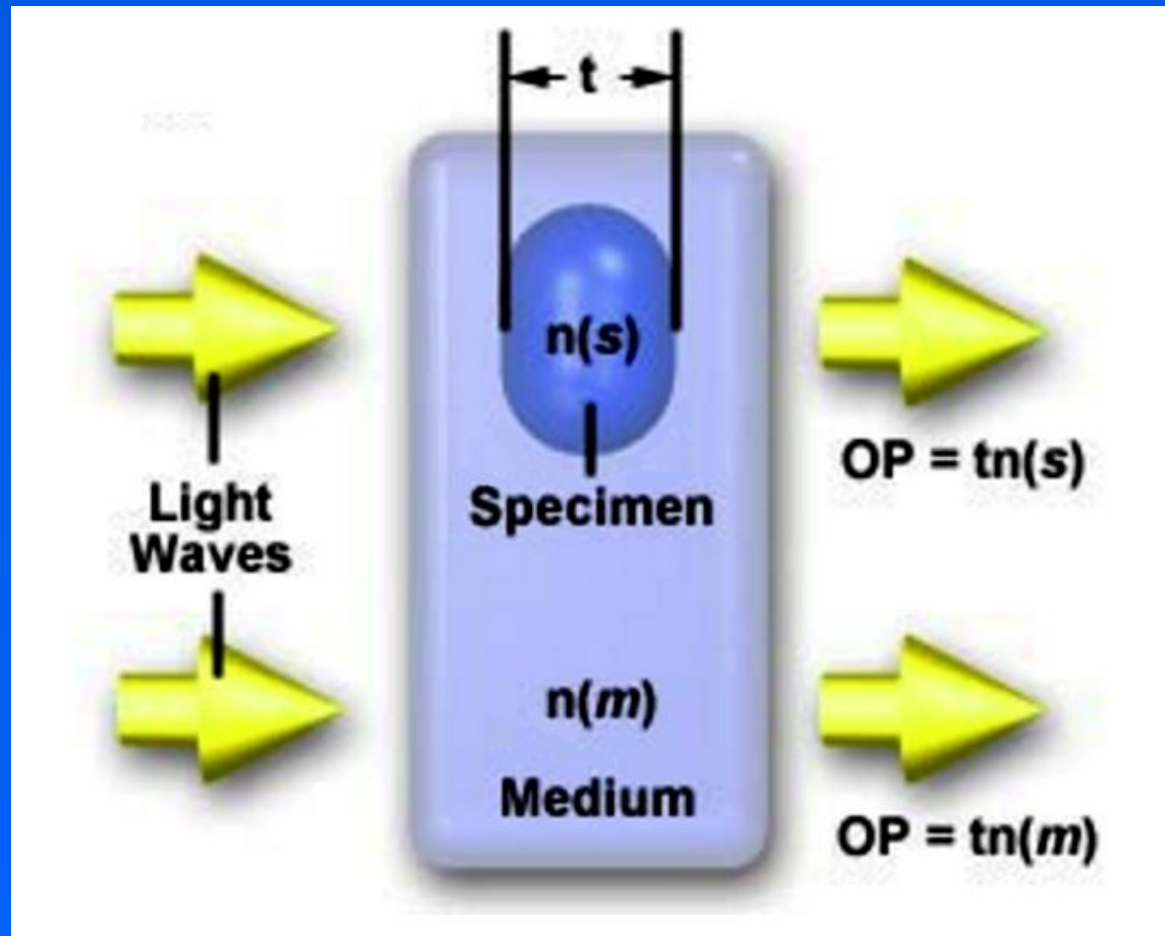
1. Гомогенное освещение поля зрения.
2. Численная апертура конденсора и величина освещенного поля на столике микроскопа могут регулироваться независимо друг от друга.
3. Плоскость переднего фокуса конденсора передается в заднюю фокальную плоскость объектива. Это создает минимум рассеянного света в оптическом пути микроскопа и оптимальные условия для усиления контраста изображения.
4. Достигается максимальное латеральное (x-y) и осевое (z) разрешение микроскопа.

Методы усиления контраста в проходящем свете

Фазовый объект

Фазовый объект пропускает весь свет, но сдвигает оптический фронт на величину, пропорциональную разности показателей преломления и толщины объекта.

Цернике показал, что на границе раздела фаз прозрачный объект также преломляет свет, который падает на его поверхность под углом отличным от 90° , и сдвигает его фазу на четверть длины волны.



Фазовый контраст

Принцип метода:

Падающий свет проходит через кольцевую диафрагму конденсора, и интенсивность прямого света ослабляется кольцевой канавкой, вытравленной и напыленной в объективе.

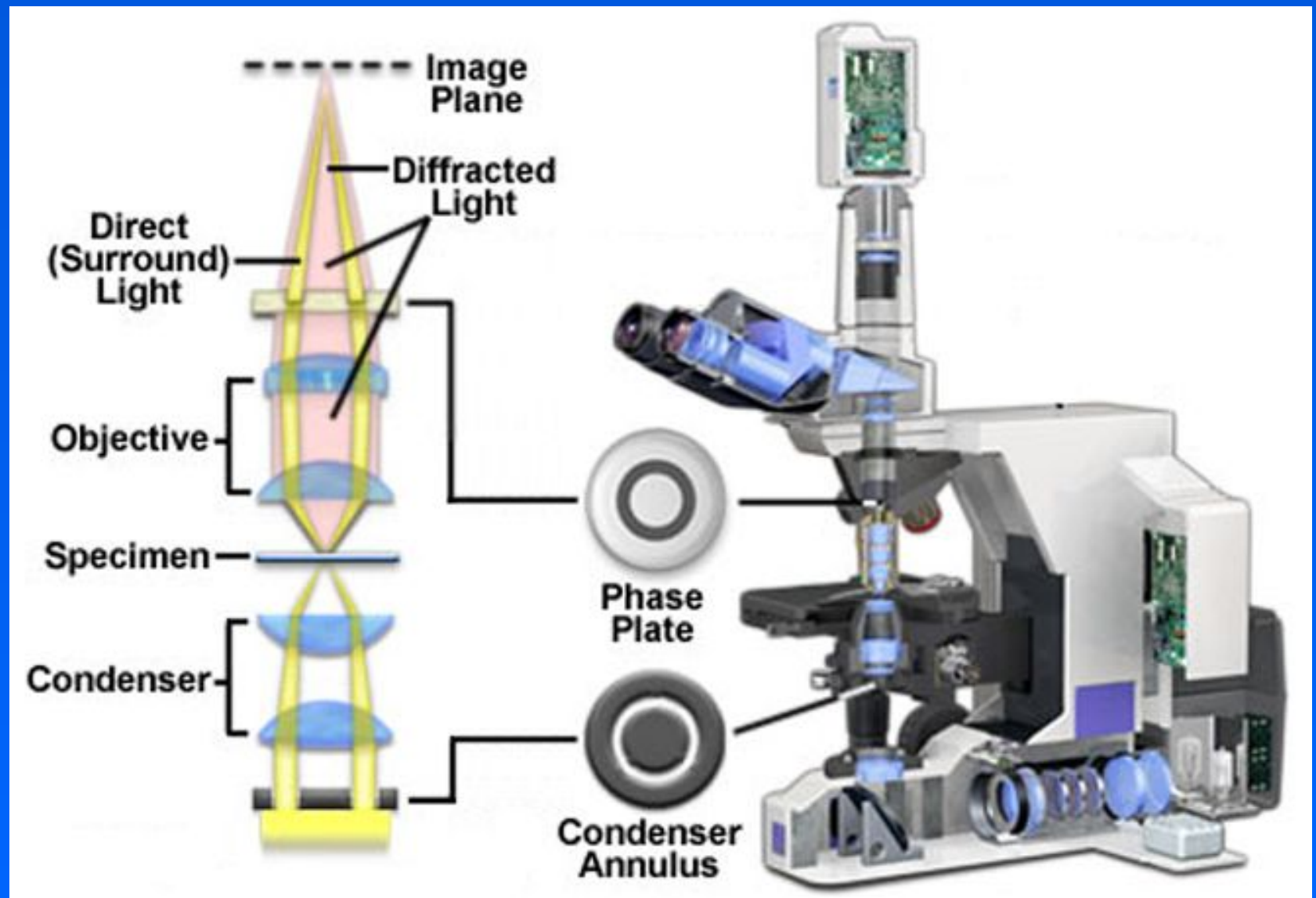
Для эффективной интерференции преломленный объектами свет дополнительно замедляется на $\frac{1}{4}$ длины волны.

Изображение формируется как результат интерференция двух волновых фронтов: прямого света и света, преломленного объектом, которые сдвинуты по отношению друг к другу примерно на $\frac{1}{2}$ длины волны.

Примечание:

Для окрашенных объектов интерференция неэффективна, поэтому метод ФК для них непригоден.

Фазовоконтрастный микроскоп



Строение фазового кольца объектива

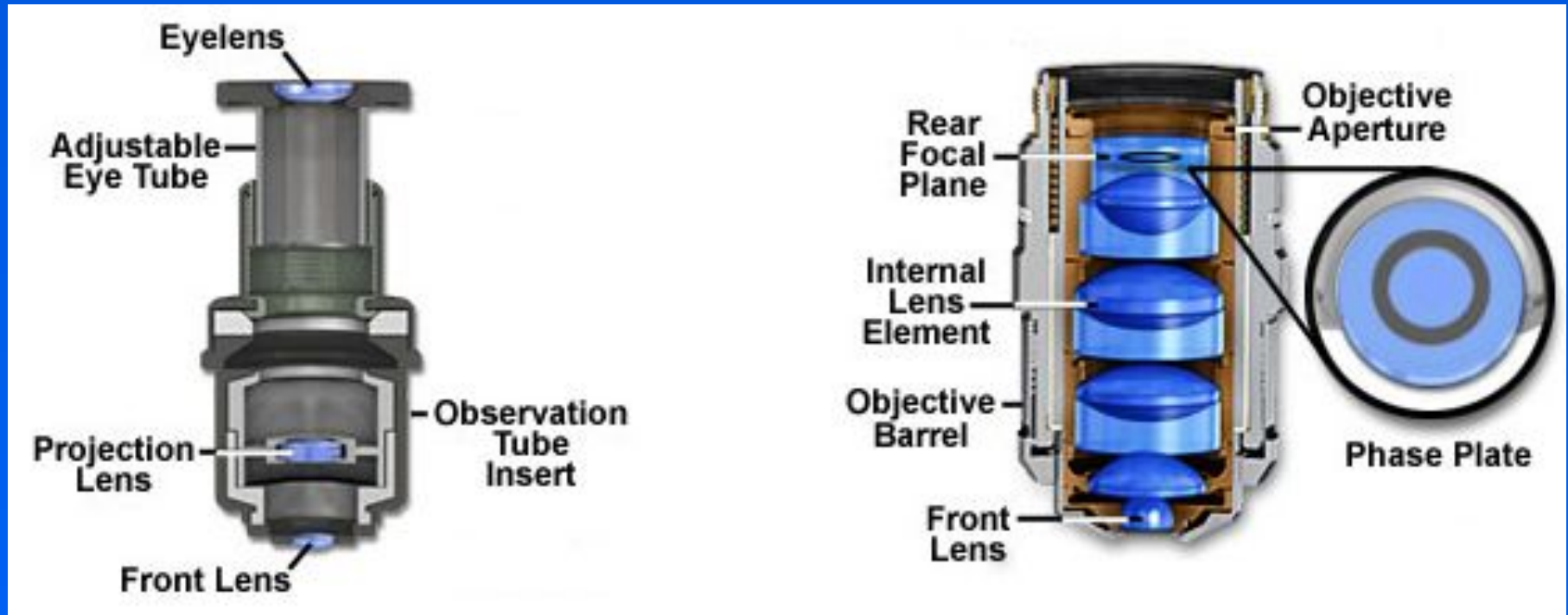


Поглощающий слой (серебро) напыляется на поверхность вытравленной канавки. Глубина канавки рассчитывается исходя из коэффициента преломления стекла (линзы объектива) и длины волны зеленого света – 546 нм.

Комплект для фазового контраста



Фазовый телескоп и объектив

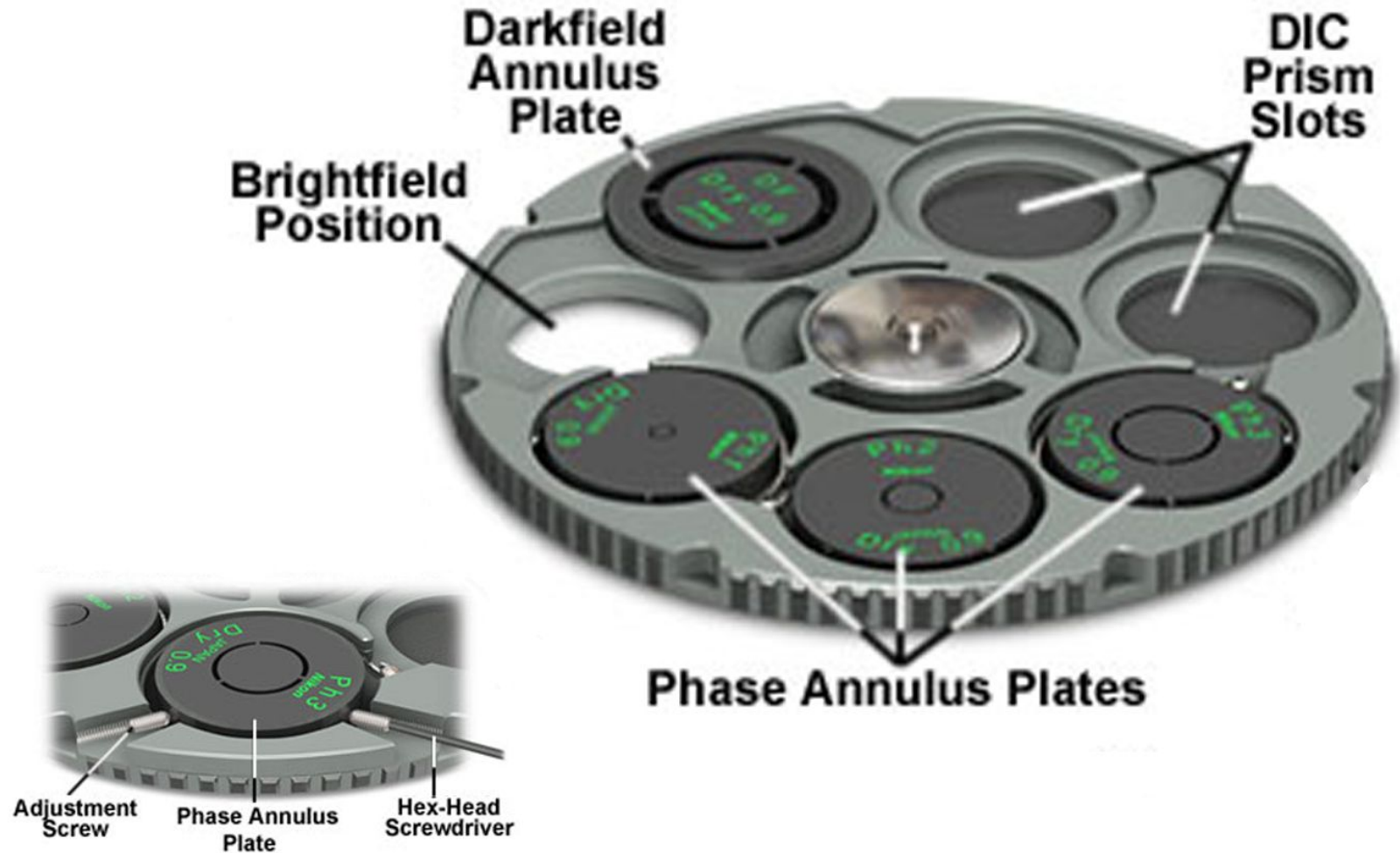


Фазовый «телескоп» - специальный микроскоп, который вставляется в тубус вместо окуляра и фокусируется на з.ф.п. объектива

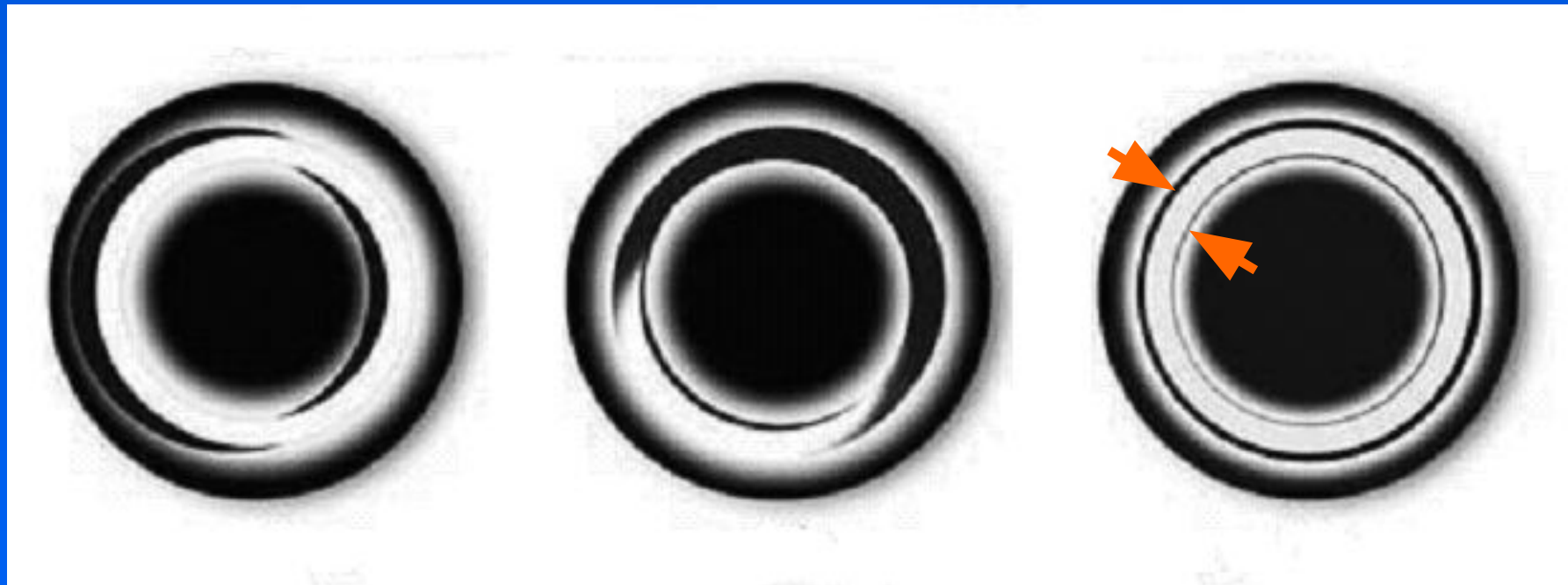
Установка света в фазовом контрасте

1. Установите полупрозрачный и достаточно тонкий препарат на столик микроскопа и конденсор в режим светлого поля. Для наведения на фокус вам может понадобиться закрыть апертурную диафрагму конденсора.
2. Установите в микроскопе свет по Келеру. Изображение станет практически невидимым.
3. Выньте окуляр, и установите вместо него вспомогательный микроскоп. Сфокусируйте вспомогательный микроскоп на заднюю фокальную плоскость объектива. На светлом поле будет резко видна серая кольцевая пластинка – фазовое кольцо объектива.
4. Полностью откройте апертурную диафрагму конденсора. Установите в ход лучей в конденсоре кольцевую (фазовую) диафрагму, соответствующую выбранному объективу. Диафрагма конденсора будет иметь вид яркого светлого кольца.
5. Юстировочными винтами фазового кольца конденсора совместите два изображения. Светлое кольцо (конденсора) должно расположиться полностью внутри темного кольца (объектива). Если видимая ширина светлого кольца равна или больше, чем ширина темного кольца, то первую можно несколько уменьшить, перемещая конденсор вверх или вниз.

Револьвер конденсора

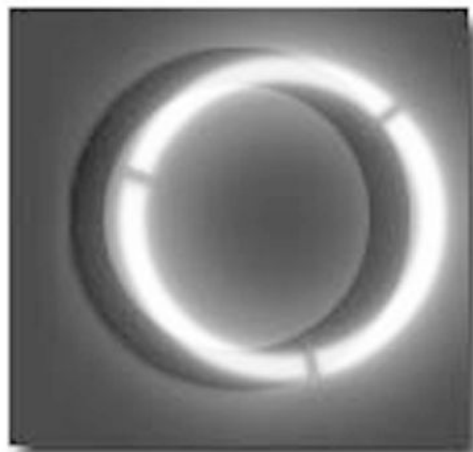


Центрировка фазового кольца

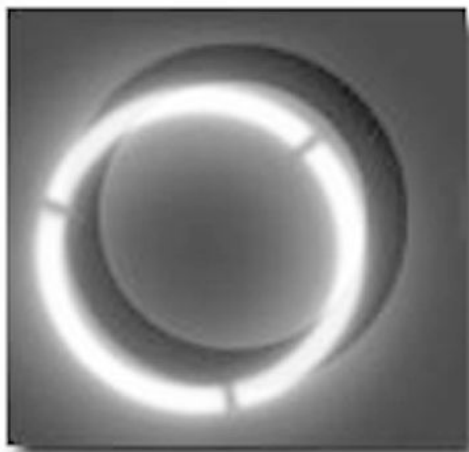


При правильной установке фазового контраста в з.ф. п. объектива светлое кольцо должно полностью находиться внутри темного кольца. Чем больше ширина темных ободков между границами светлого и темного колец, тем выше контраст.

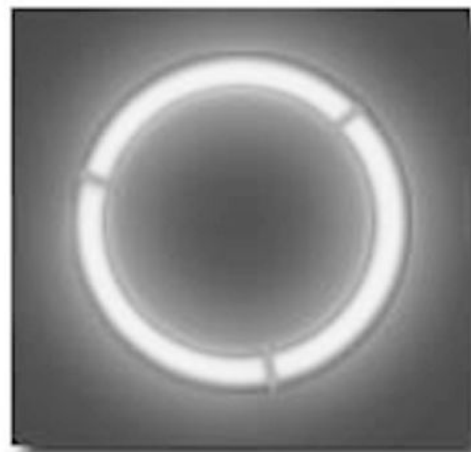
Центрировка фазового кольца



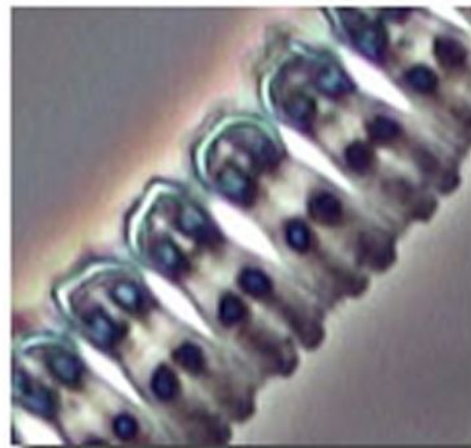
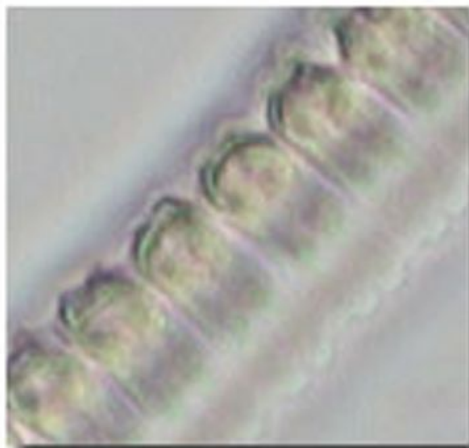
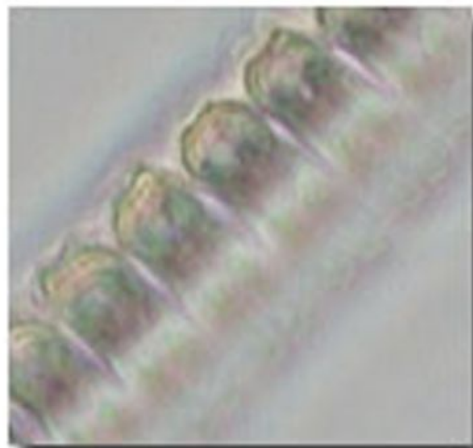
a



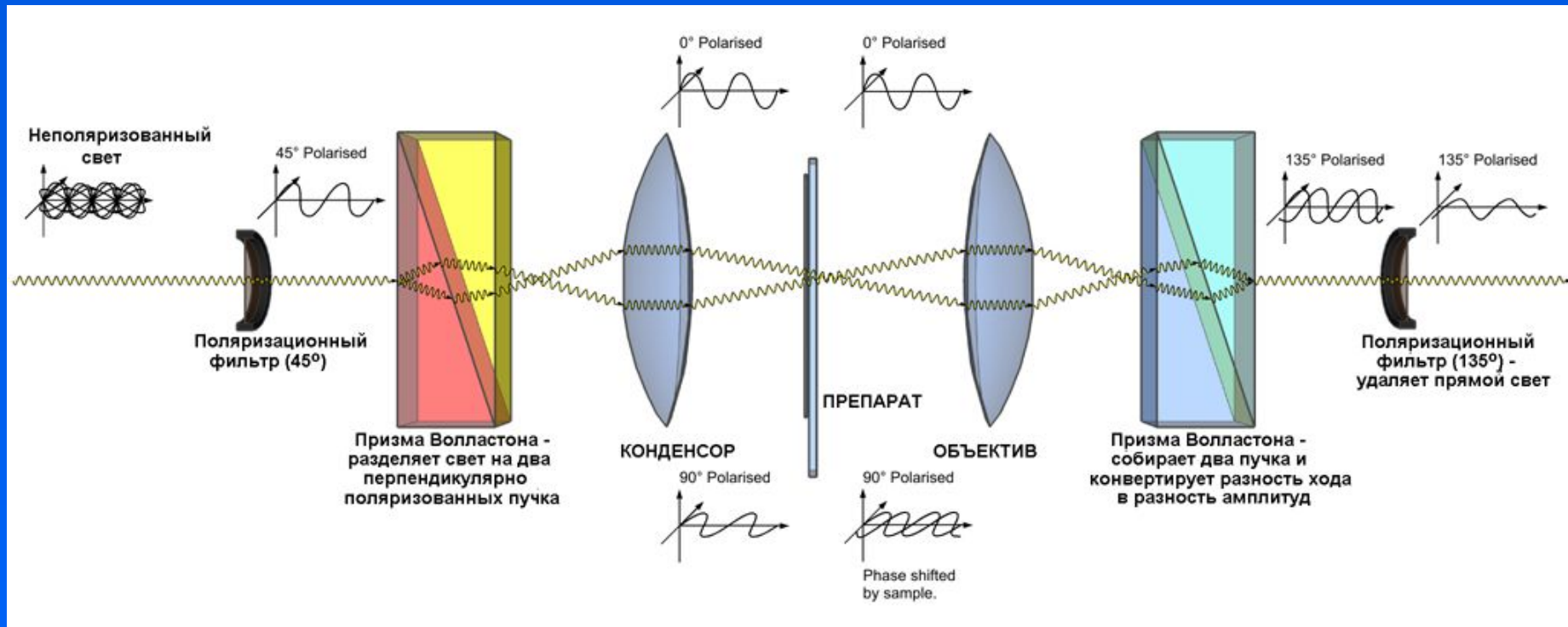
b



c



Ход лучей при дифференциальном интерференционном контрасте



Поляризатор и анализатор повернуты под углом 45° к плоскости разделения лучей призмами Волластона и под углом 90° друг к другу. Это обеспечивает равную интенсивность двух волновых фронтов и позволяет получить максимально эффективную интерференцию двух фронтов.

Дифференциальный интерференционный контраст

Сдвиг волнового фронта преобразуется в разность амплитуд в результате интерференции двух почти совпадающих фронтов, создаваемых за счет двулучепреломляющей системы.

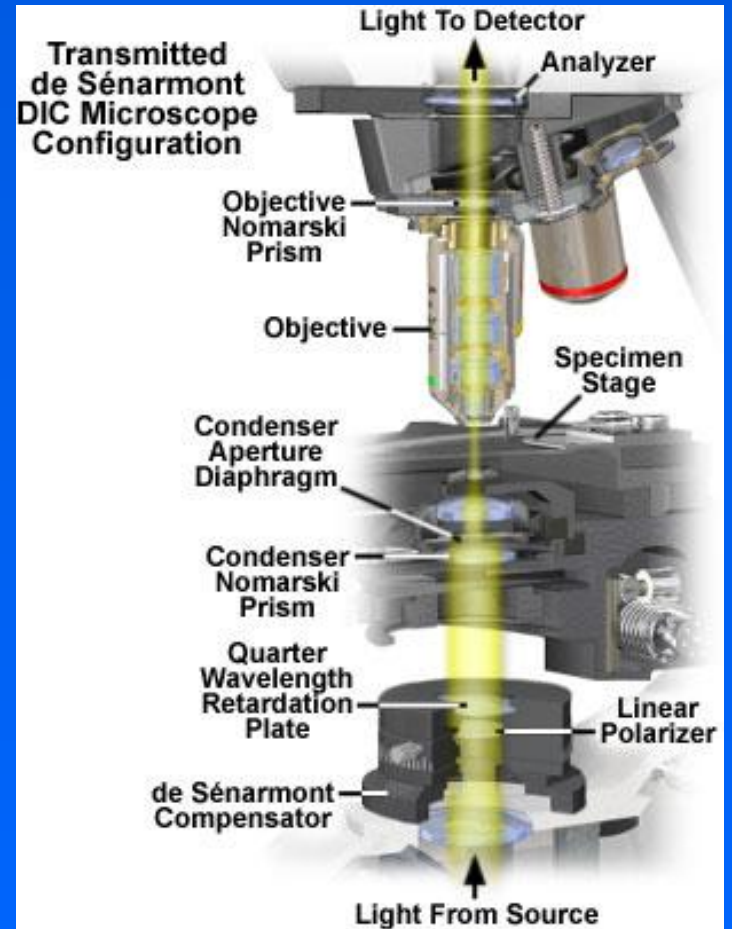
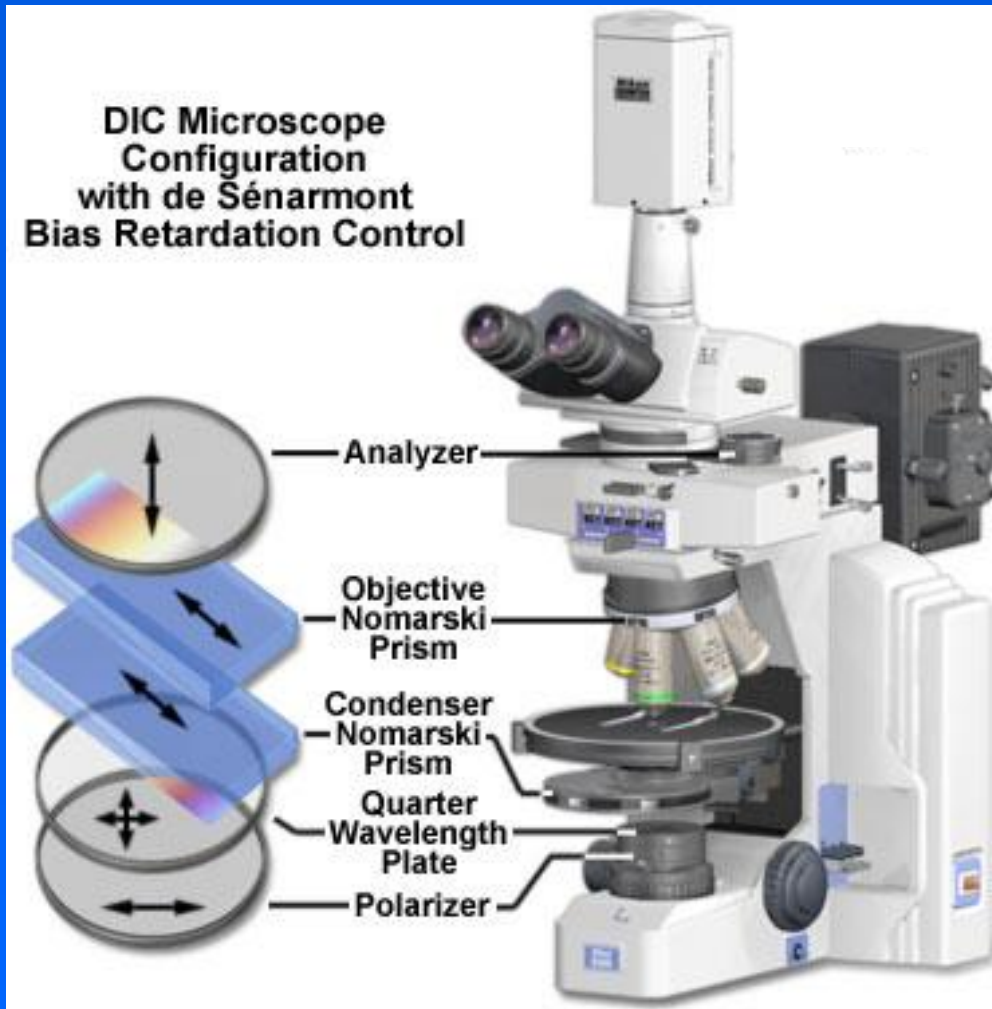
Прямой проходящий свет подавляется с помощью скрещенных поляризатора и анализатора.

Направление и величина сдвига одного фронта относительно другого регулируются настройками призм Волластона (Номарского) в микроскопе.

Фактически DIC контраст отражает градиент изменения оптической плотности внутри препарата.

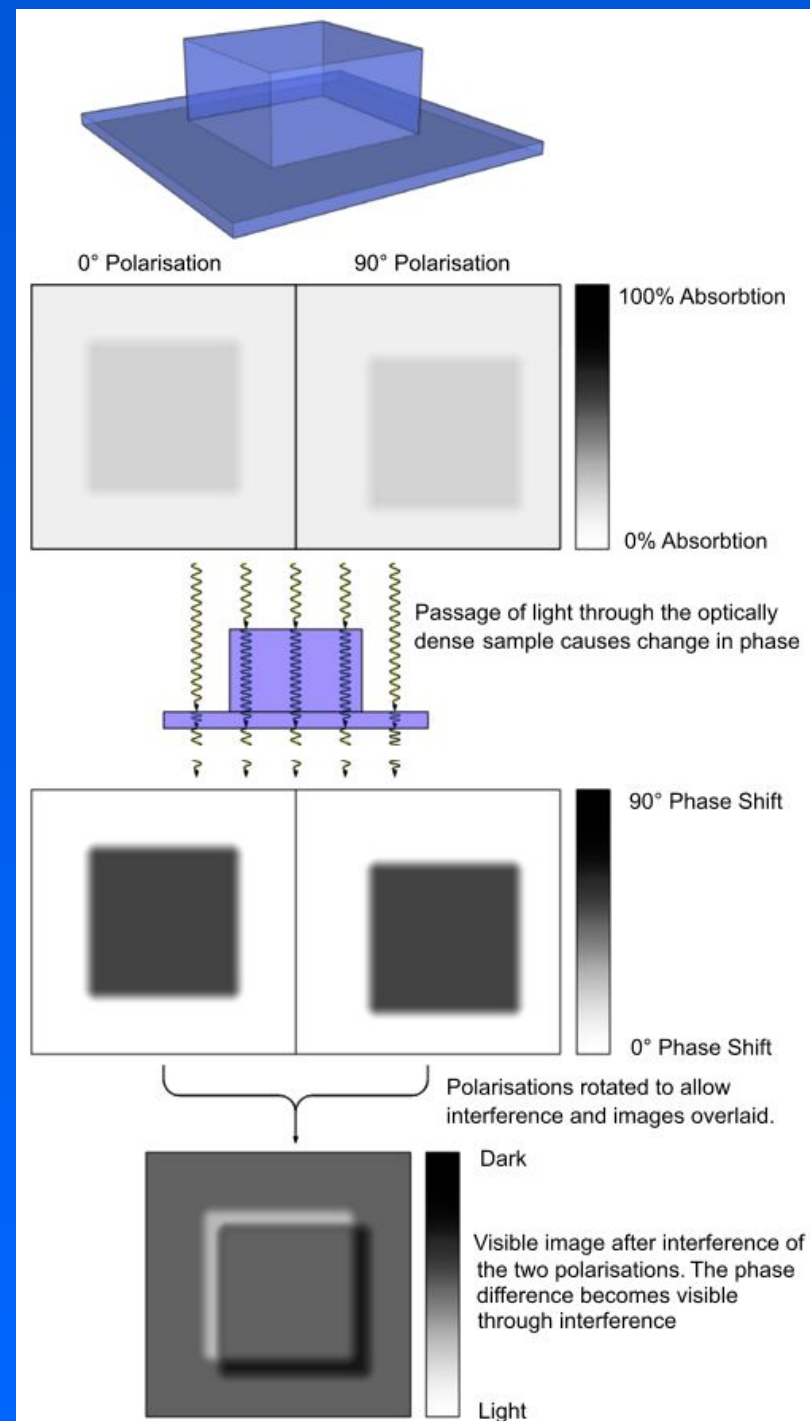
Интерференционный контраст

DIC Microscope Configuration with de Sénarmont Bias Retardation Control

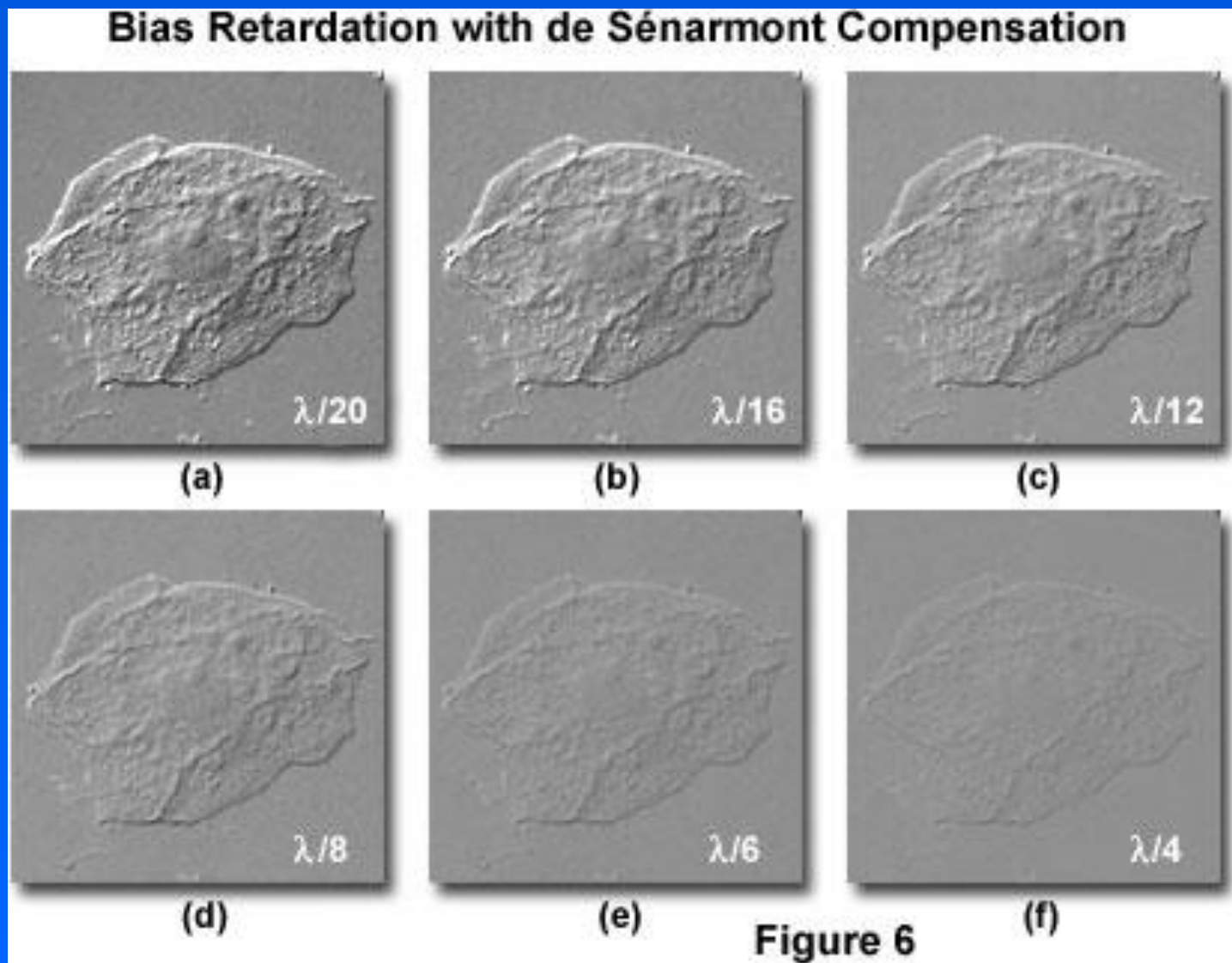


Формирование изображения в DIC микроскопии

- 1) Плоскополяризованный свет входит в призму Номарского и разделяется на два луча, плоскости поляризации которых взаимно ортогональны.
- 2) Два луча фокусируются конденсором на препарат и проходят через две соседние точки образца, расстояние между которыми соответствует разрешению микроскопа ($0.2 \mu\text{m}$). Таким образом, образец освещается двумя когерентными волновыми фронтами, один из которых имеет поляризацию 0° , а другой 90° .
- 3) Путь, проходимый одним лучом, слегка отличается от пути, который проходит второй луч, и это является причиной изменения фазы одного луча относительно другого. Прохождение двух лучей через пары соседних точек образца формируют изображение. Возникает множество изображений, слегка смещенных друг относительно друга.
- 4) Далее два луча попадают в объектив, позади которого вторая призма Номарского соединяет их в один, что приводит к интерференции. Затемненное или более яркое изображение в точке является результатом разности оптических путей двух лучей.

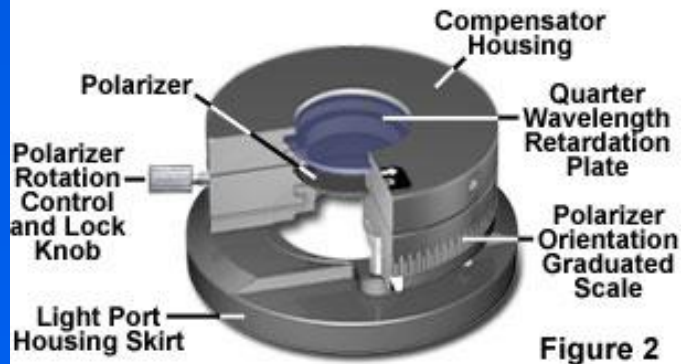


Кадры с различным сдвигом



Комплектующие к DIC

Base Mounted de Sénarmont Compensator



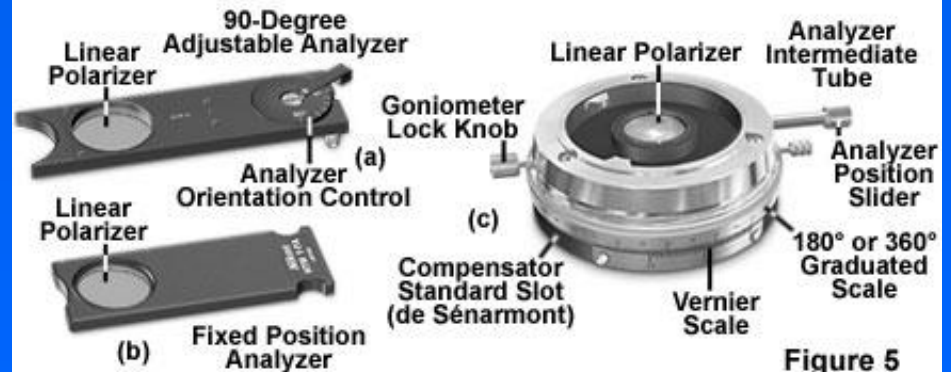
Universal Condenser Turret DIC Configuration



Fixed Nomarski Objective Prisms



de Sénarmont DIC Microscope Analyzer Configurations



Флуоресцентная микроскопия и система эпиосвещения

Явление флуоресценции

Время поглощения кванта света молекулой составляет около 10^{-15} секунды. Диапазон энергий поглощаемых квантов определяется структурой электронных оболочек в молекуле.

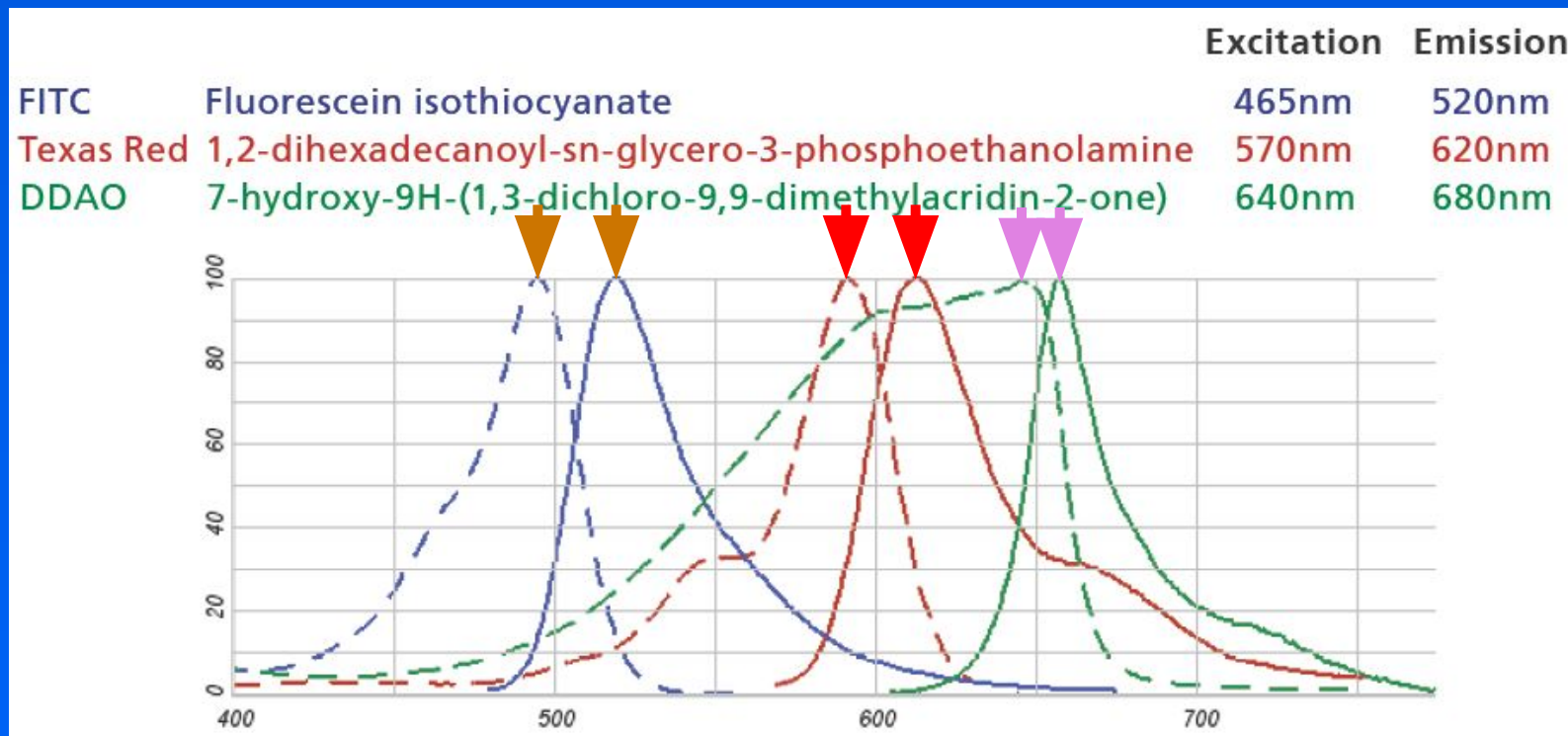
Энергия поглощенного кванта света распределяется в молекуле (возбуждение), а затем новый квант света высвечивается (флуоресценция). В альтернативе возбужденная молекула может претерпеть химическую модификацию (переход в триплетное состояние).

Запаздывание высвечивания кванта составляет порядка 10^{-9} секунды. Эмиссия происходит равновероятно по всем направлениям.

Сдвиг средней энергии высвечиваемого кванта (сдвиг Стокса) обусловлен потерей энергии за счет внутренних колебаний на разрешенных электронных уровнях поглощающей молекулы.

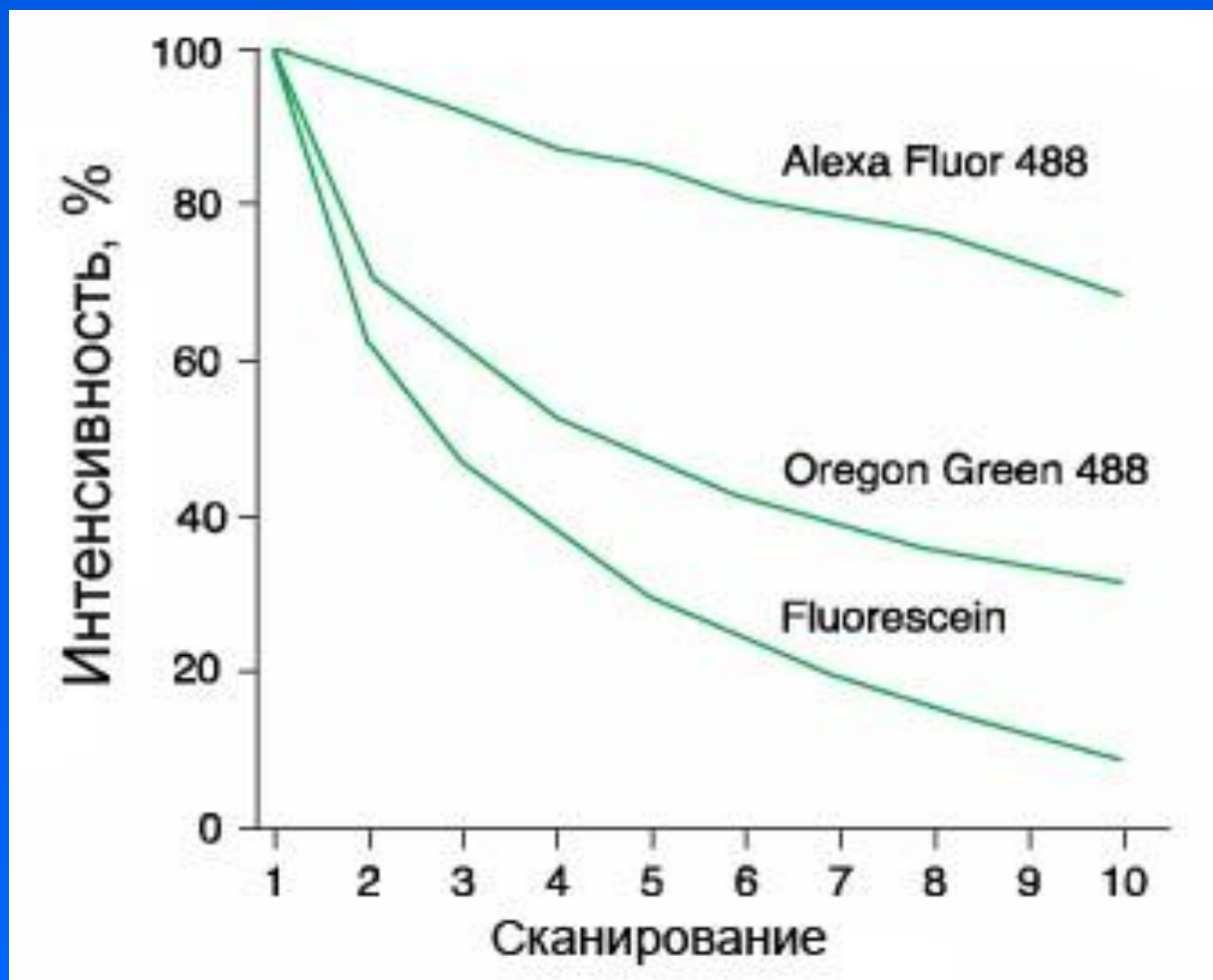
Наиболее яркие органические флуорохромы – вещества с чередующимися двойными связями.

Примеры спектров некоторых красителей



Сдвиг Стокса, как правило, невелик (10-30 нм).
Спектры поглощения и эмиссии у органических красителей асимметричны. Спектры испускания имеют «красный» хвост, спектры возбуждения – «синий» хвост.

Стабильность флуоресцентных красителей



Принцип флуоресцентной микроскопии

Сдвиг Стокса используется для эффективного выделения полос возбуждающего света и света эмиссии из общего спектра.

Интенсивность эмиссии составляет не более 10^{-4} от интенсивности возбуждающего света, а часто значительно меньше.

Для эффективного наблюдения флюоресценции необходимо подавить возбуждающий свет, попадающий в окуляр, с коэффициентом не менее, чем 10^8 , желательно - 10^{10}

Для разделения возбуждающего света и света флуоресценции используется система интерференционных светофильтров.

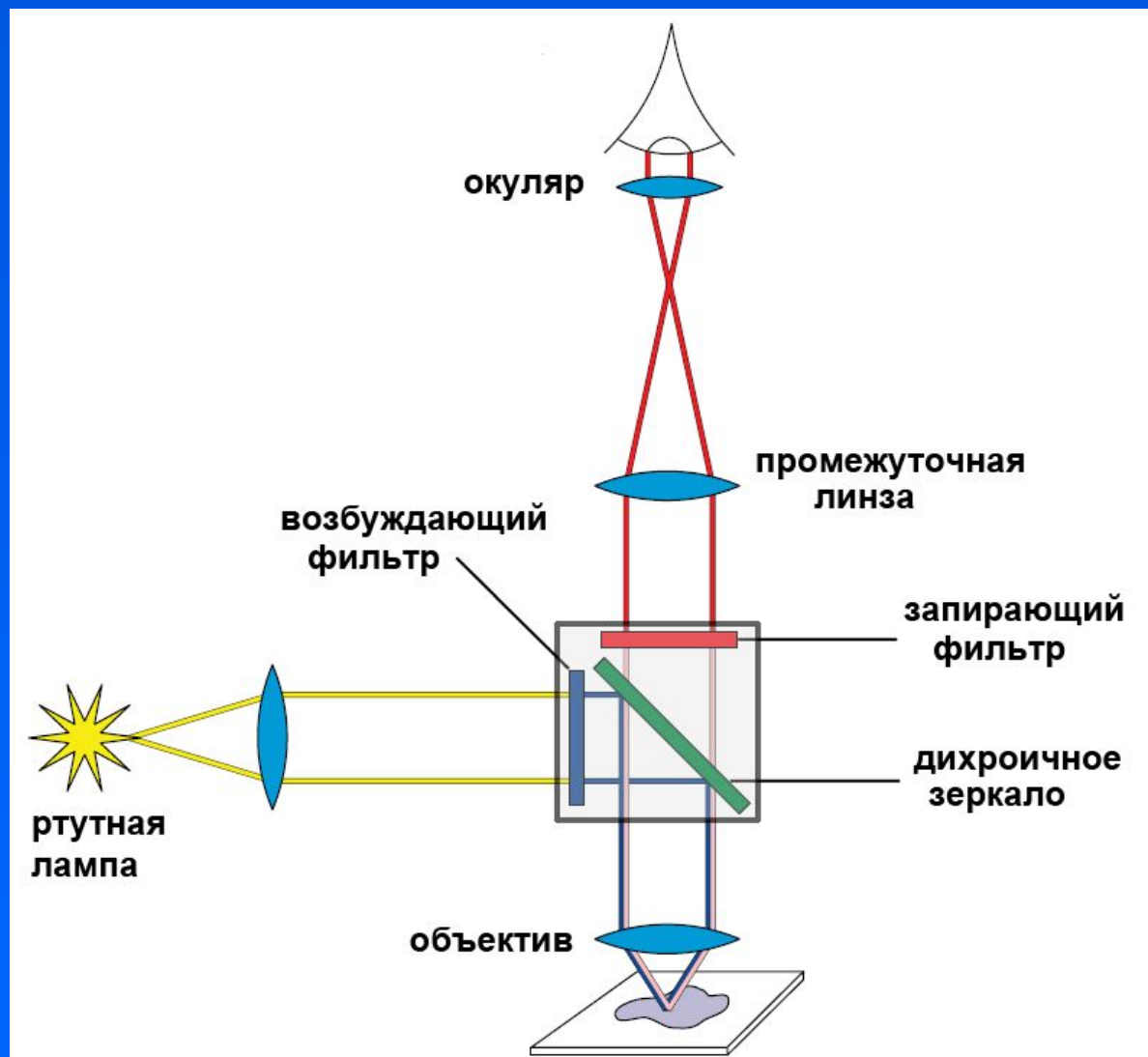
Разделение возбуждающего света и света флуоресценции

Эпиосвещение — объектив одновременно служит конденсором. Возбуждающий свет и свет флуоресценции проходят через один и тот же объектив, но в противоположных направлениях. Это позволяет свести к минимуму эффект проходящего света.

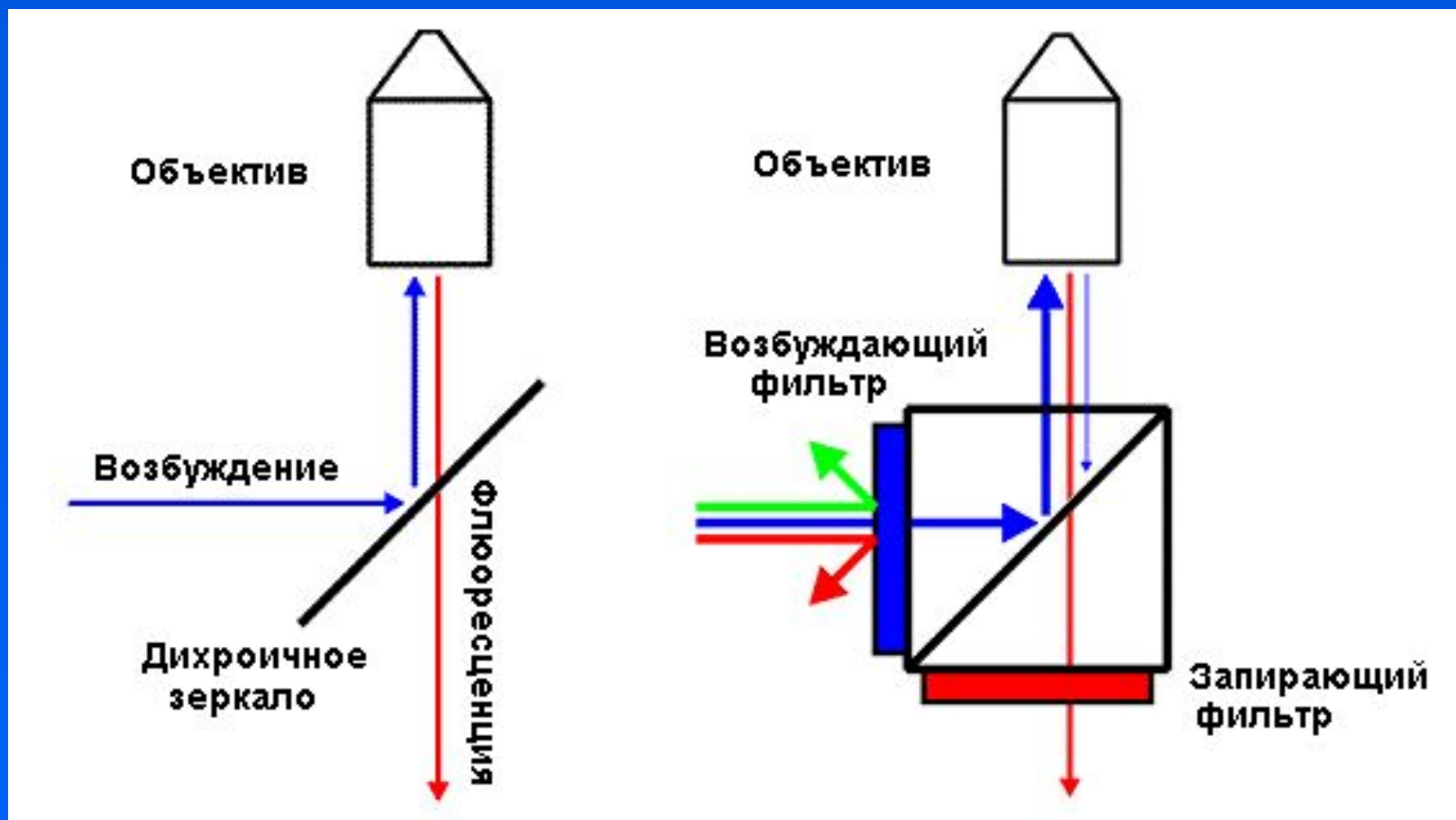
Куб светофильтров позволяет подавить нежелательный свет (отраженный препаратом и рассеянный) с эффективностью более, чем 10^7 за счет последовательного применения двух фильтров — светоделительного зеркала и запирающего светофильтра.

Коэффициент запираения светоделительного зеркала — не более, чем 10^2 , у запирающего светофильтра — не менее 10^5 (хорошие фильтры имеют коэффициент 10^6 и более)

Эпифлуоресцентный микроскоп, схема

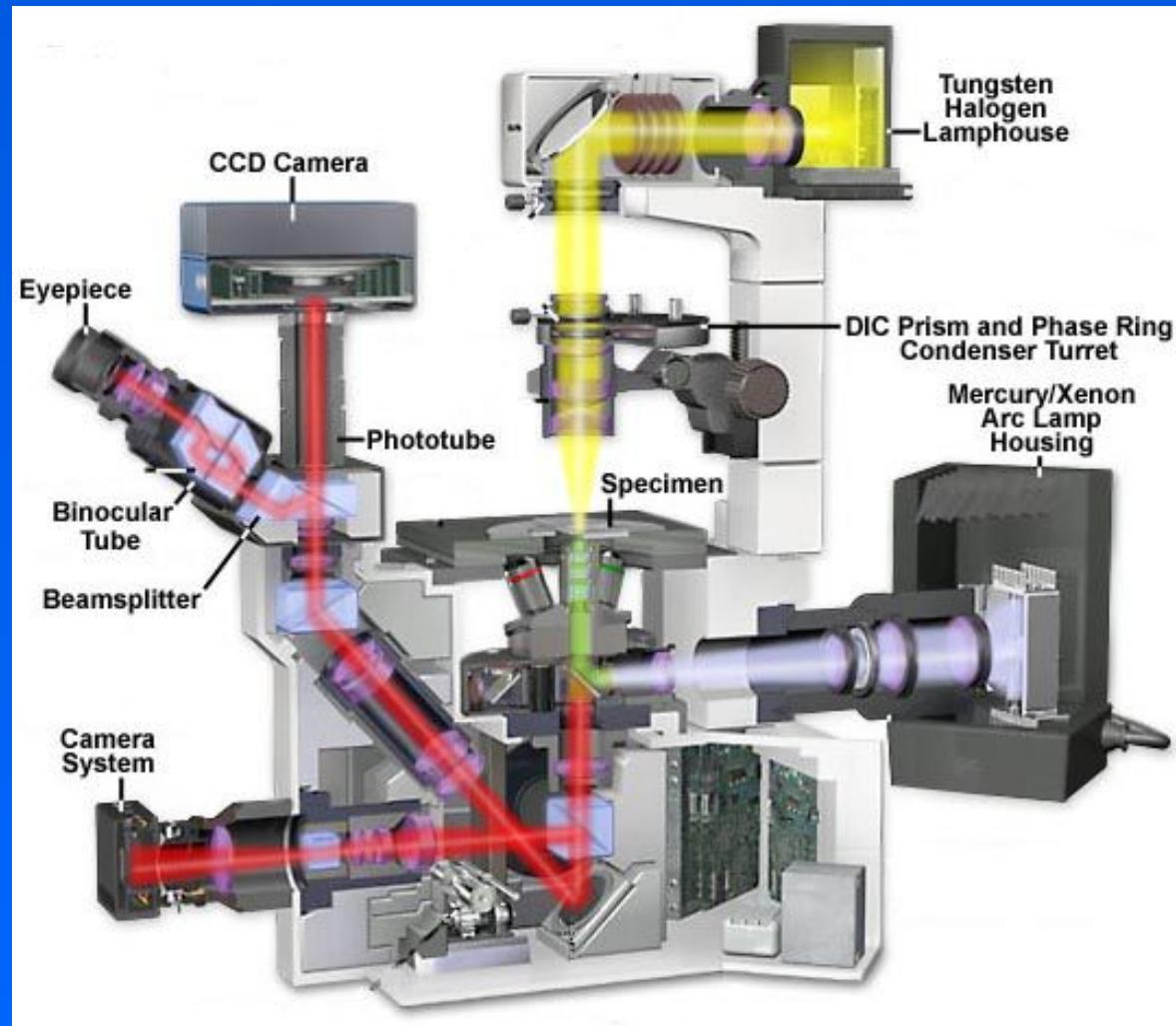


Куб светофильтров - схема

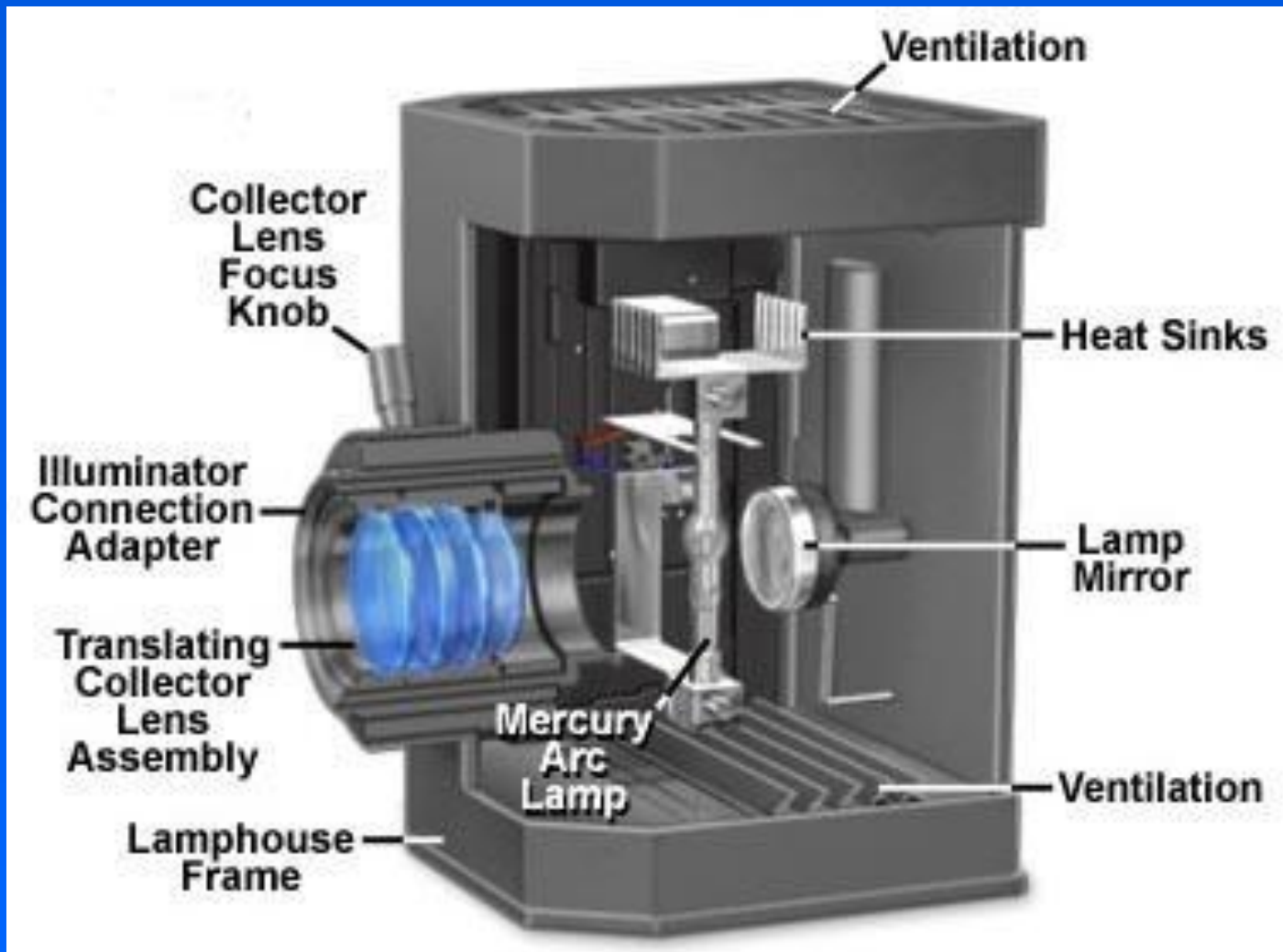


Примечание Куб светофильтров изображен в своем положении на инвертированном микроскопе. Лампа и окуляр находятся за пределами схемы.

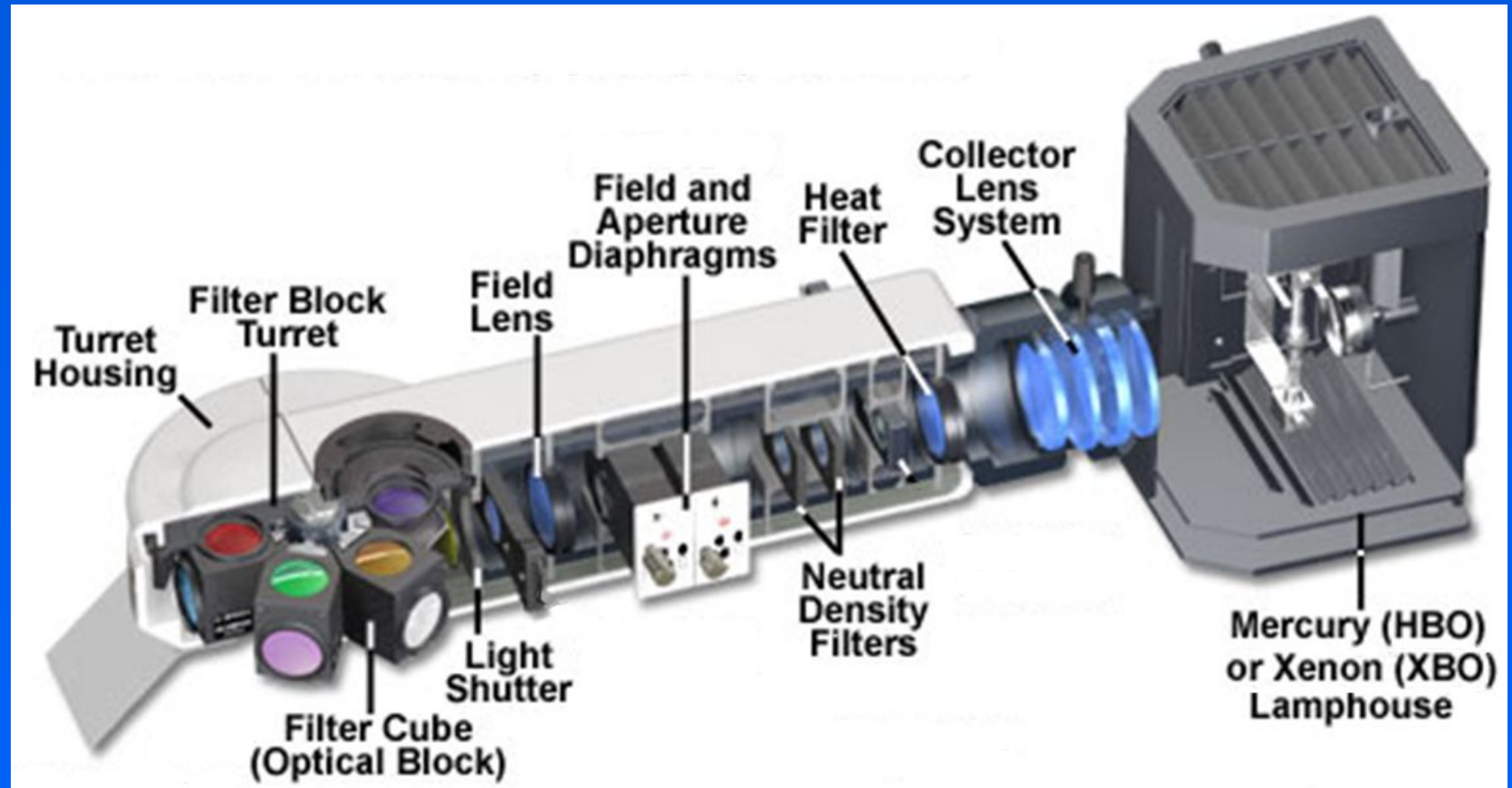
Инвертированный флуоресцентный микроскоп



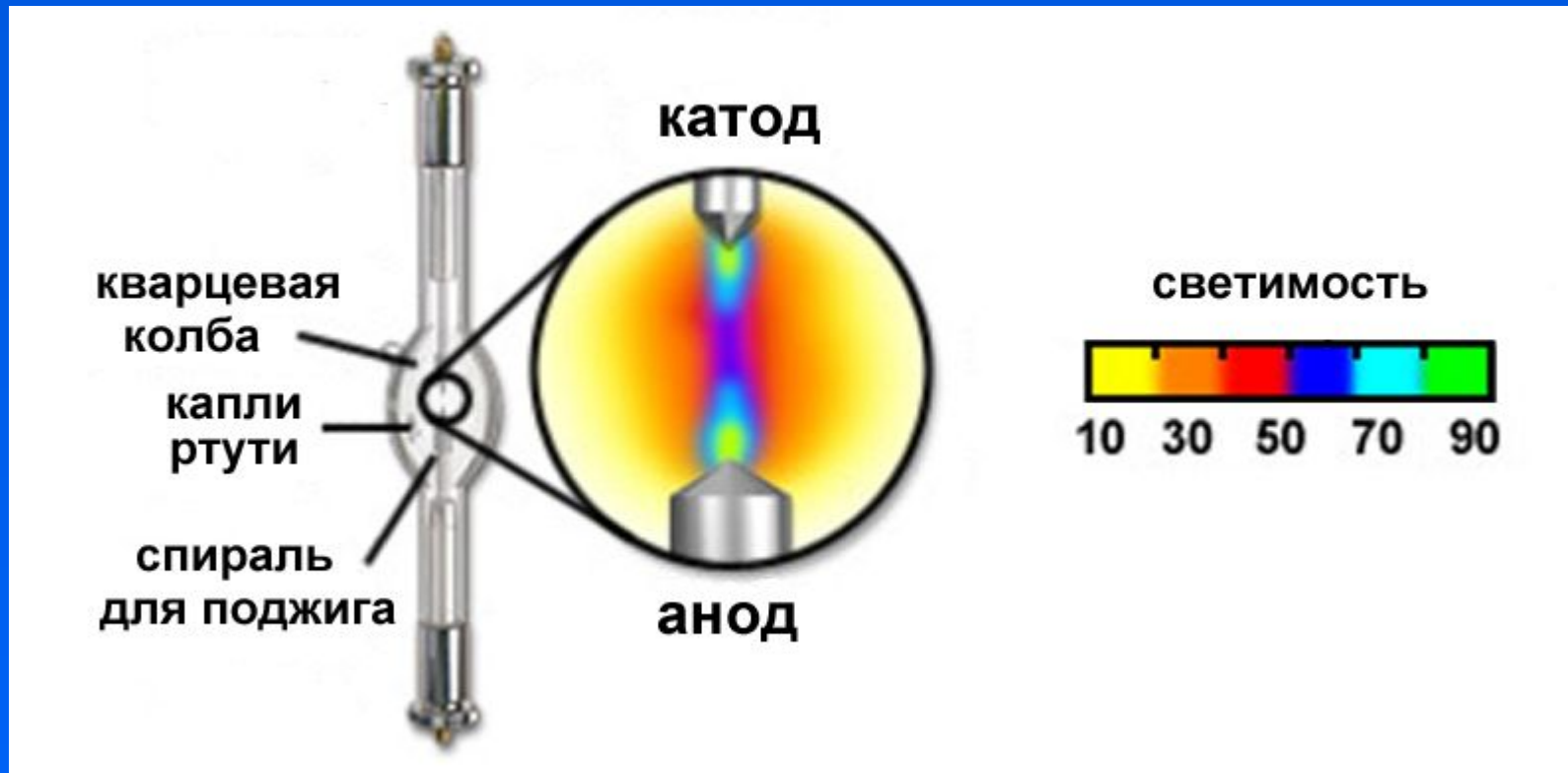
Домик ртутной лампы



Эпиосветитель



Дуговая ртутная лампа сверхвысокого давления



Источник света – пары ртути в дуговом разряде.
Колба – плавленый кварц. Электроды – вольфрам.
Рабочее давление – около 30 атм. Мощность – 100 Вт.

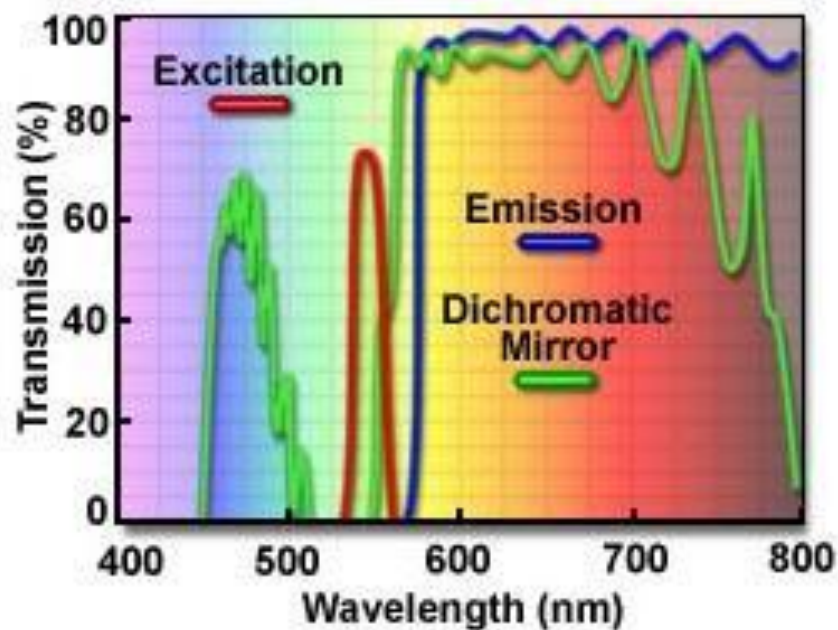
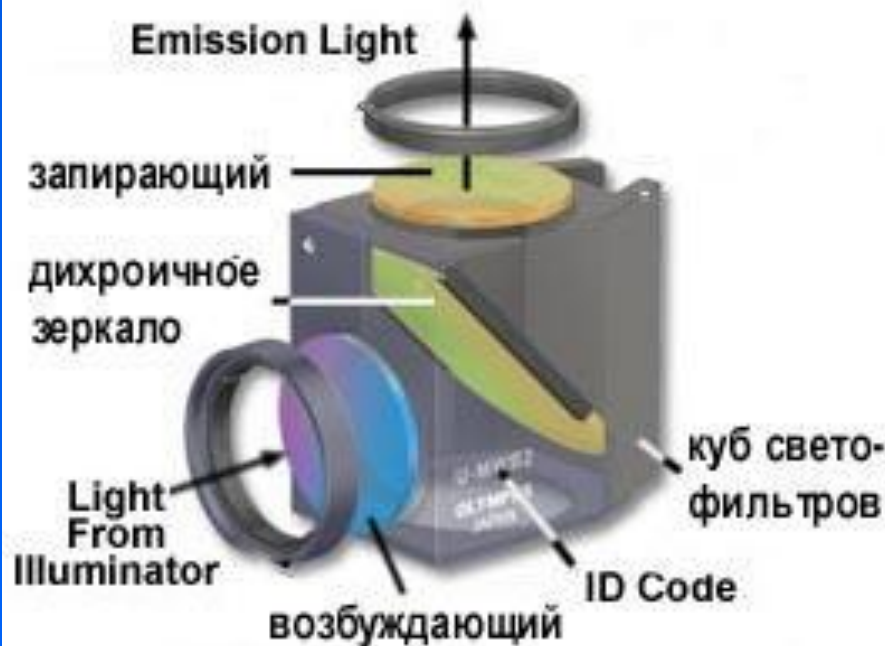
Куб светофильтров - примеры



Возбуждающий светофильтр расположен слева,
запирающий светофильтр – сверху.

В правом кубе светофильтры вынуты. Дихроичное
зеркало устанавливается по диагонали куба.

Куб светофильтров - светопропускание



Комбинированное изображение – флюоресценция и DIC

