

Lehrerfortbildung Nanobiotechnologie

Grundlagen der Lichtmikroskopie

Juliane Ißle

03.04.03

Universität des Saarlandes

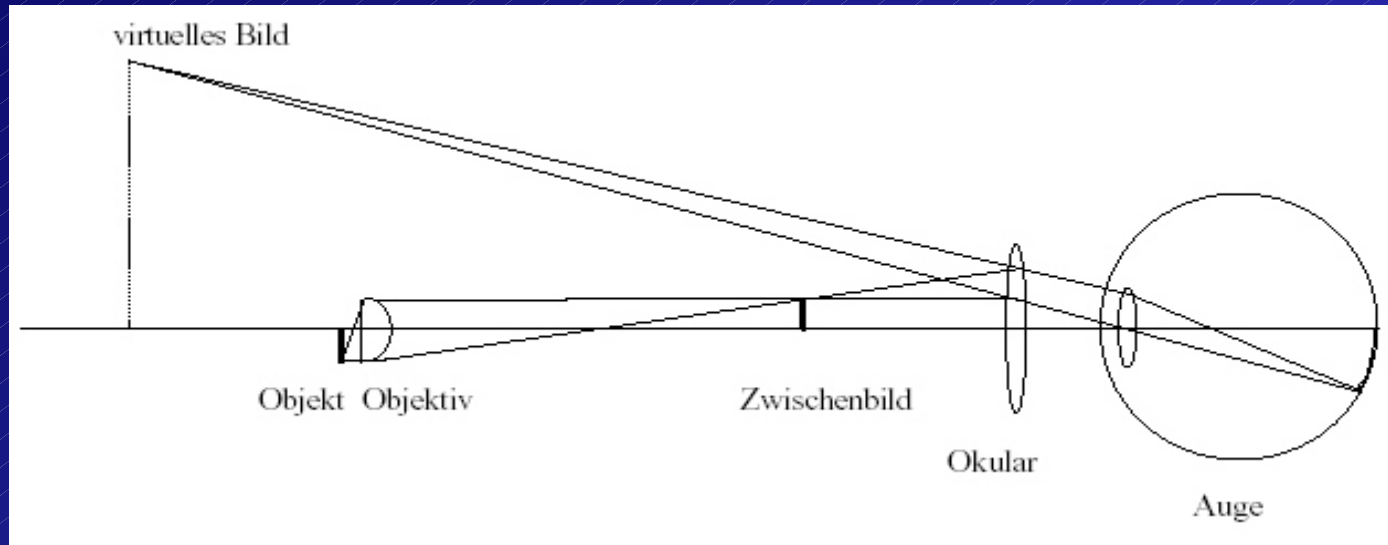
Fachrichtung Experimentalphysik



Inhalt

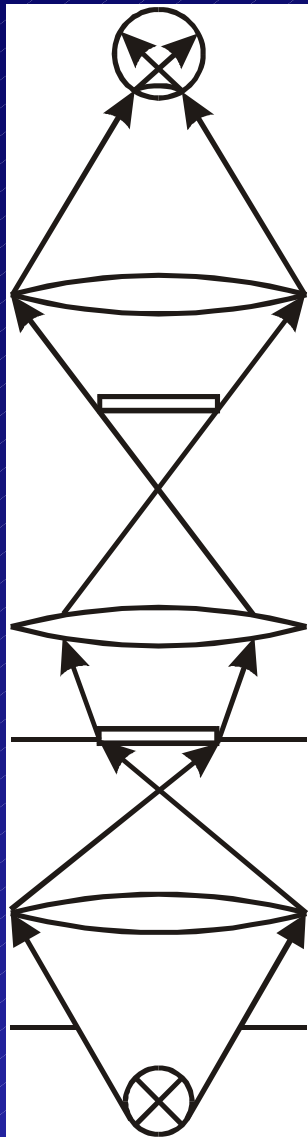
- Prinzipieller Mikroskopaufbau
- Köhler'sche Beleuchtung
- Eigenschaften mikroskopischer Objekte
- Verschiedene Mikroskopiemodi:
 - Hellfeld-/Dunkelfeldmodus
 - Phasenkontrast
 - Polarisationsmikroskopie
 - Differentieller Interferenz Kontrast (DIC)
- Zusammenfassung und Referenzen

Konstruktionsstrahlengang



- einfachster Aufbau: Objektiv und Okular
- Zwischenbild in vorderer Brennebene des Okulars
- Strahlenbündel eines Objektpunktes hinter Okular parallel
- virtuelles Bild
- Vergrößerung bestimmt durch Winkel zwischen Begrenzungsstrahlengang und optischer Achse

Mikroskopaufbau



Auge oder Kamera

Okular als Lupe
(2. Vergrößerung)

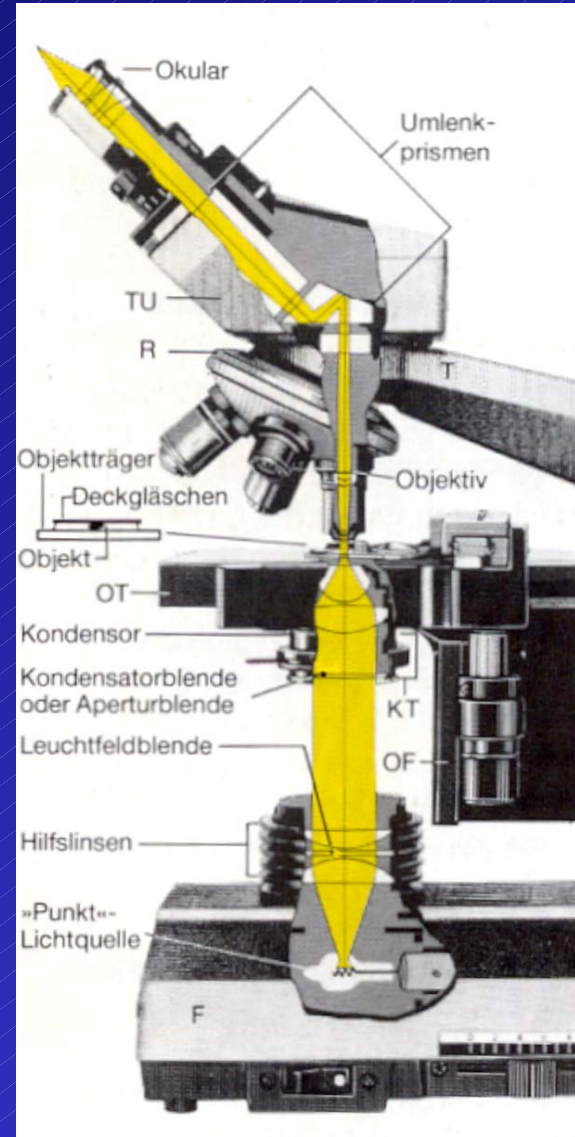
Zwischenbild

Objektiv
(1. Vergrößerung, variabel)

Präparat

Kondensator

Beleuchtung mit Blende



Mikroskopaufbau

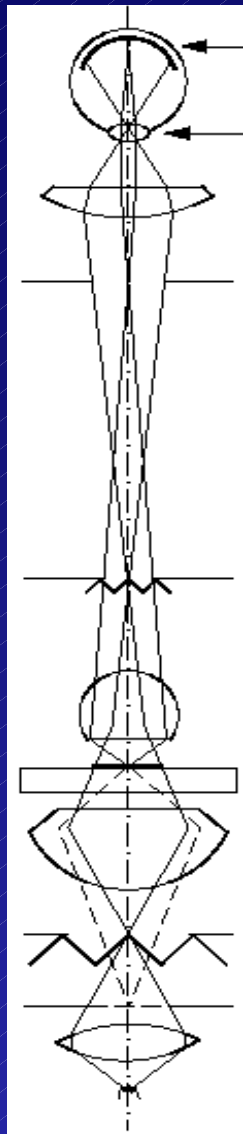
- Justierung: Mittelstrahl des beleuchtenden Strahlenkegels parallel zur optischen Achse
- Linsen begrenzen Vergrößerung
- wichtiges Bauteil: Kondensor
 1. Ausleuchten des Objektfeldes
 2. Verschiedene Kondensoren für verschiedene Objektfeldgrößen
 3. Bei Durchlicht: eigene Einheit
 4. Bei Auflicht: Objektiv wirkt als Kondensor
 5. Beleuchtungsapertur

Theorie

Die Güte eines mikroskopischen Bildes hängt ab von:

- Auflösung: $d = \lambda / (A_0 + A_k)$, λ Wellenlänge
 A_0 numerische Apertur des Objektivs
 A_k Beleuchtungsapertur
- Kontrast: -Absorptions- oder Amplitudenobjekte
-Verzögerungs- oder Phasenobjekte

Köhler'sche Beleuchtung



Netzhaut

Pupille

Okular

Zwischenblende

Objektivbrennebene

Objektiv

Präparat

Kondensorlinse

Kondensorblende

Leuchtfeldblende

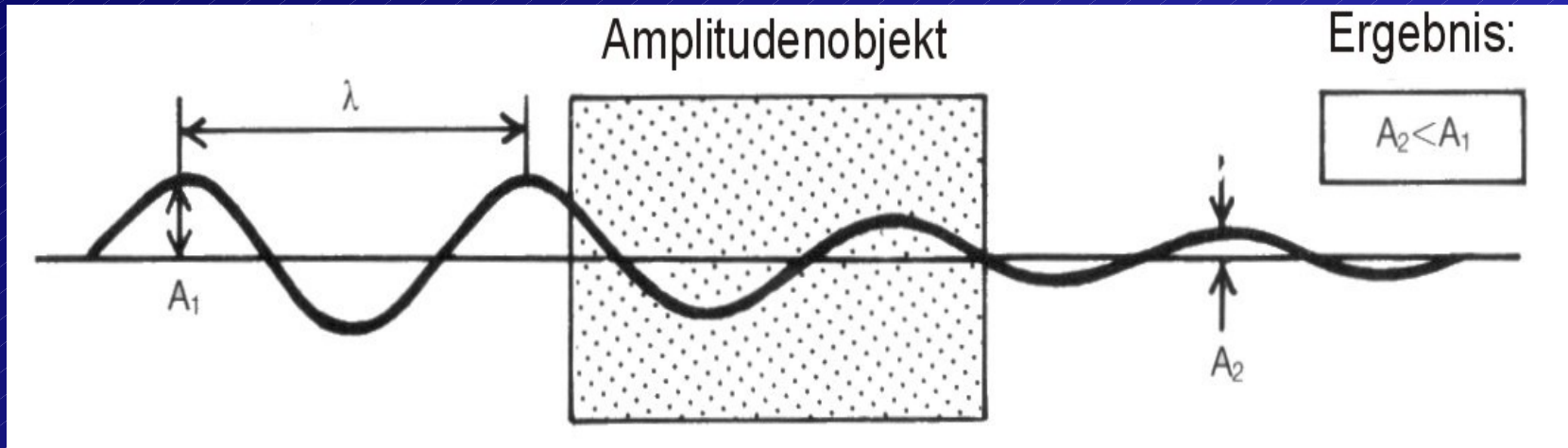
Lampenlinse

Lampenwendel

Konjugierte Bildebenen

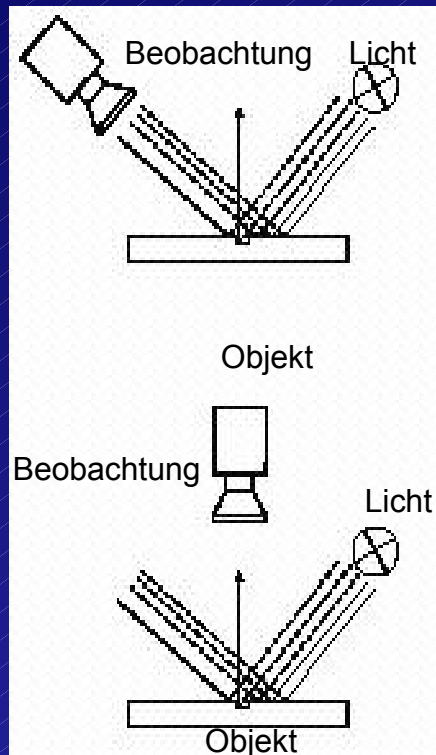
- Vermeidung der kritischen Beleuchtung
 - Abbildung der Lampenwendel in Ebene der Kondensorblende (damit in Objektivbrennebene)
 - Abbildung der Leuchtfeldblende in Objektebene und Zwischenbildebene
- ⇒ optimale Ausleuchtung
- ⇒ jedes Strahlenbündel volle Objektbeleuchtung

Eigenschaften mikroskopischer Objekte



- Amplitudenobjekte: - dicke oder gefärbte Schnitte
- schwächen das durchstrahlende Licht

Hell-/Dunkelfeldmodus

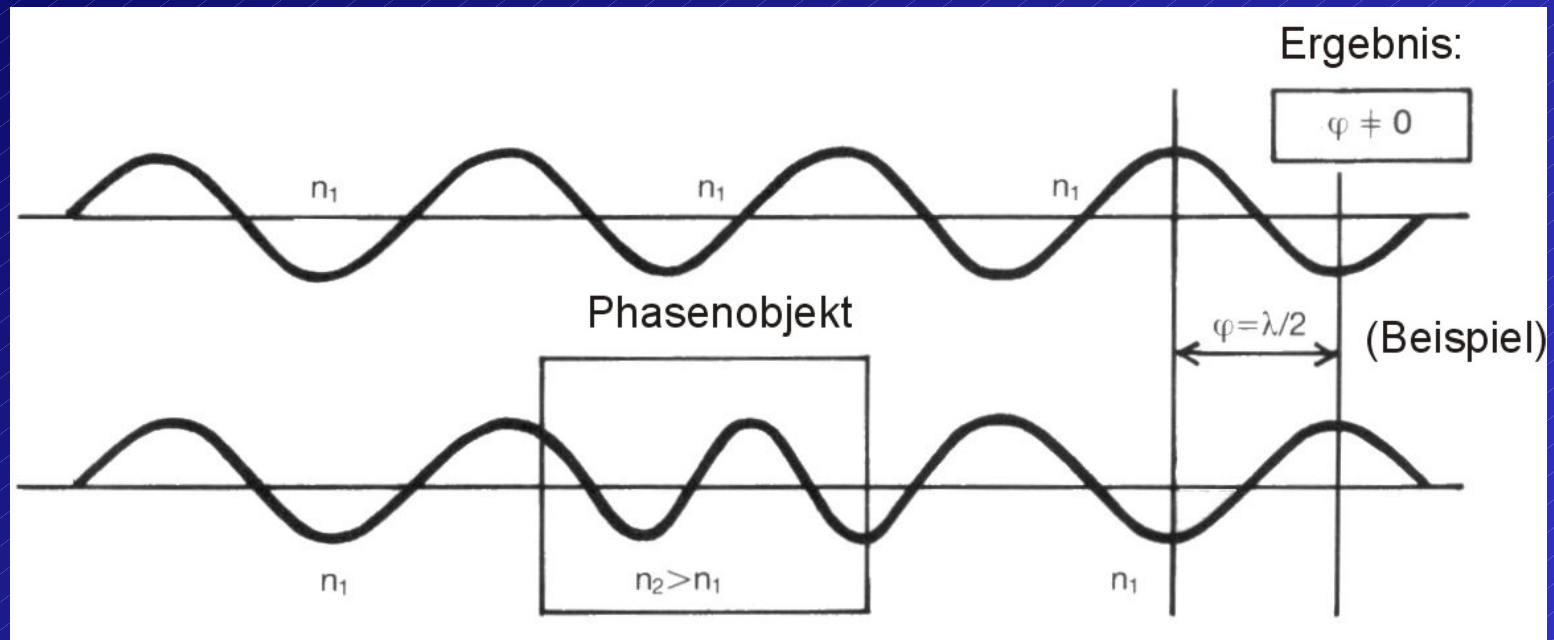


Vorteil Hellfeld: Geringere Einflüsse von Linsenfehlern

Vorteil Dunkelfeld: Strukturen unter der Auflösungsgrenze sichtbar

Bücherskorpion: oben: Hellfeld
unten: Dunkelfeld

Eigenschaften mikroskopischer Objekte

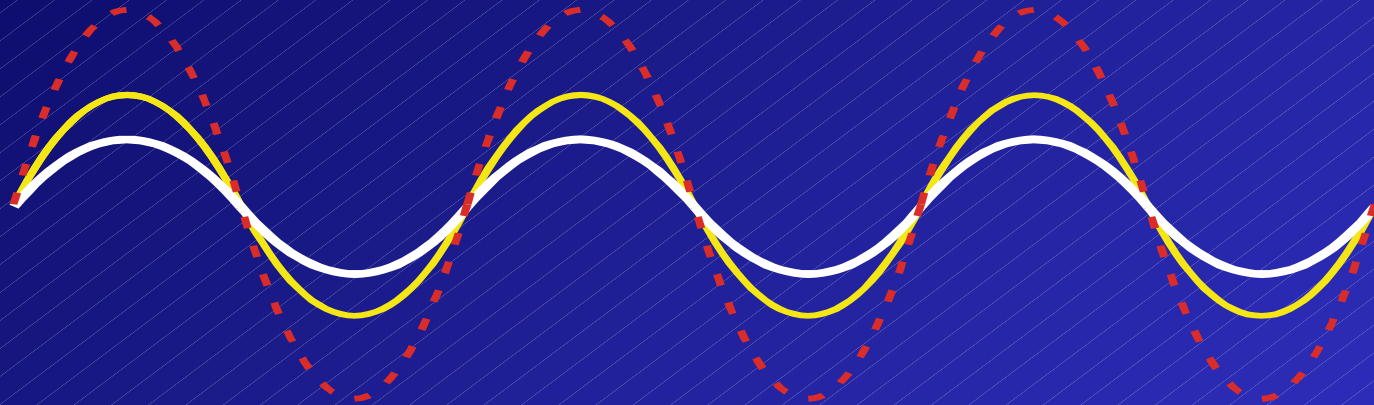


Phasenobjekte: - dünne, ungefärbte Präparate

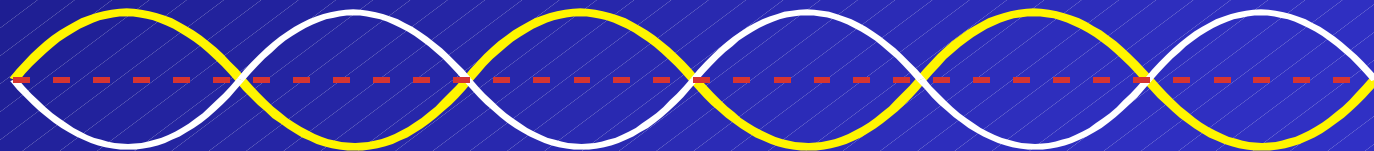
- verschieben die Phase des durchstrahlenden Lichts

- kein Bild im Hellfeld, da alle Strahlen in einem Bildpunkt gesammelt werden

Eigenschaften mikroskopischer Objekte



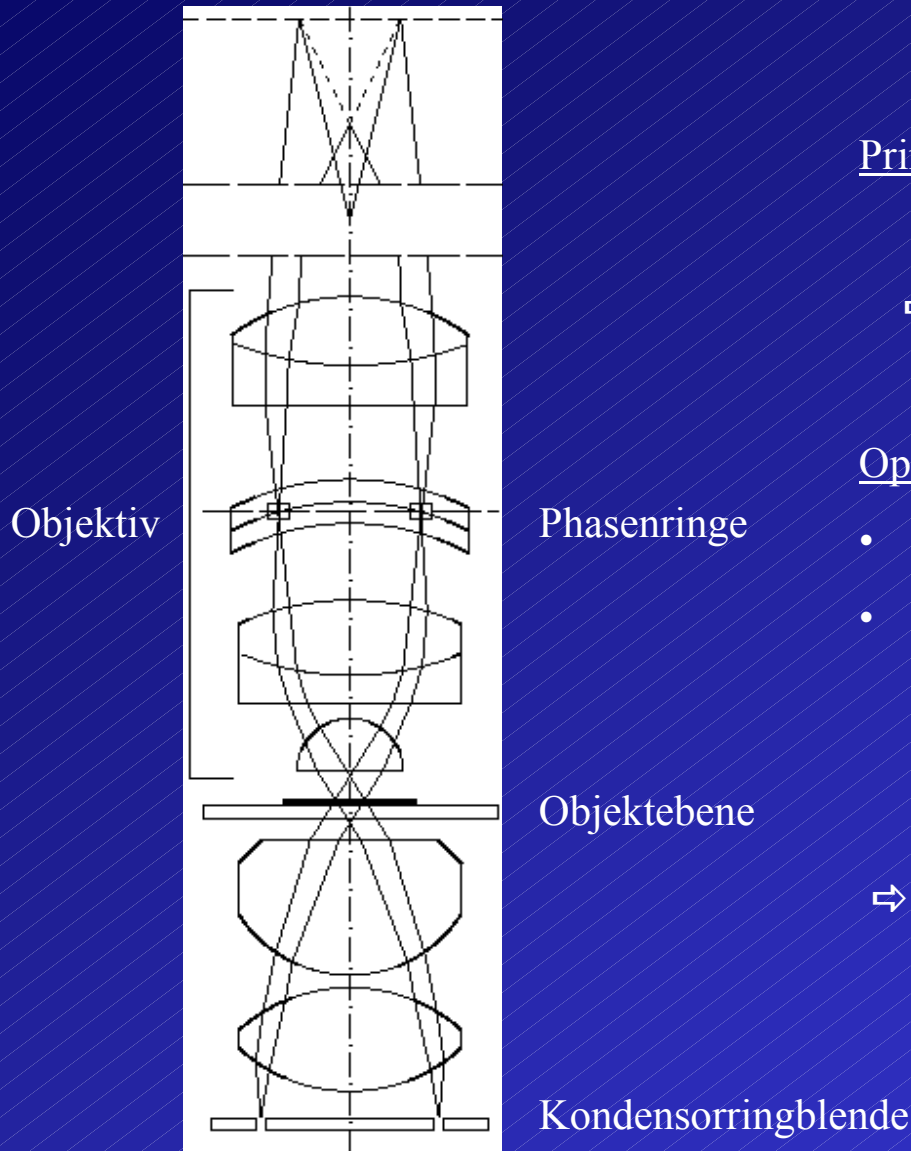
Konstruktive Interferenz



Destruktive Interferenz

Phasenkontrast

Fritz Zernike (1932)



Prinzip: Dichteunterschiede ergeben

Phasenverschiebung, Brechung, Streuung

⇒ Interferenz von ungestreutem und gestreutem
Licht

Optische Elemente:

- Ringblende
- Phasenring
 - Verschiebt ungestreutes Licht um $\lambda/4$
 - Verringert Amplitude des ungestreuten Lichts

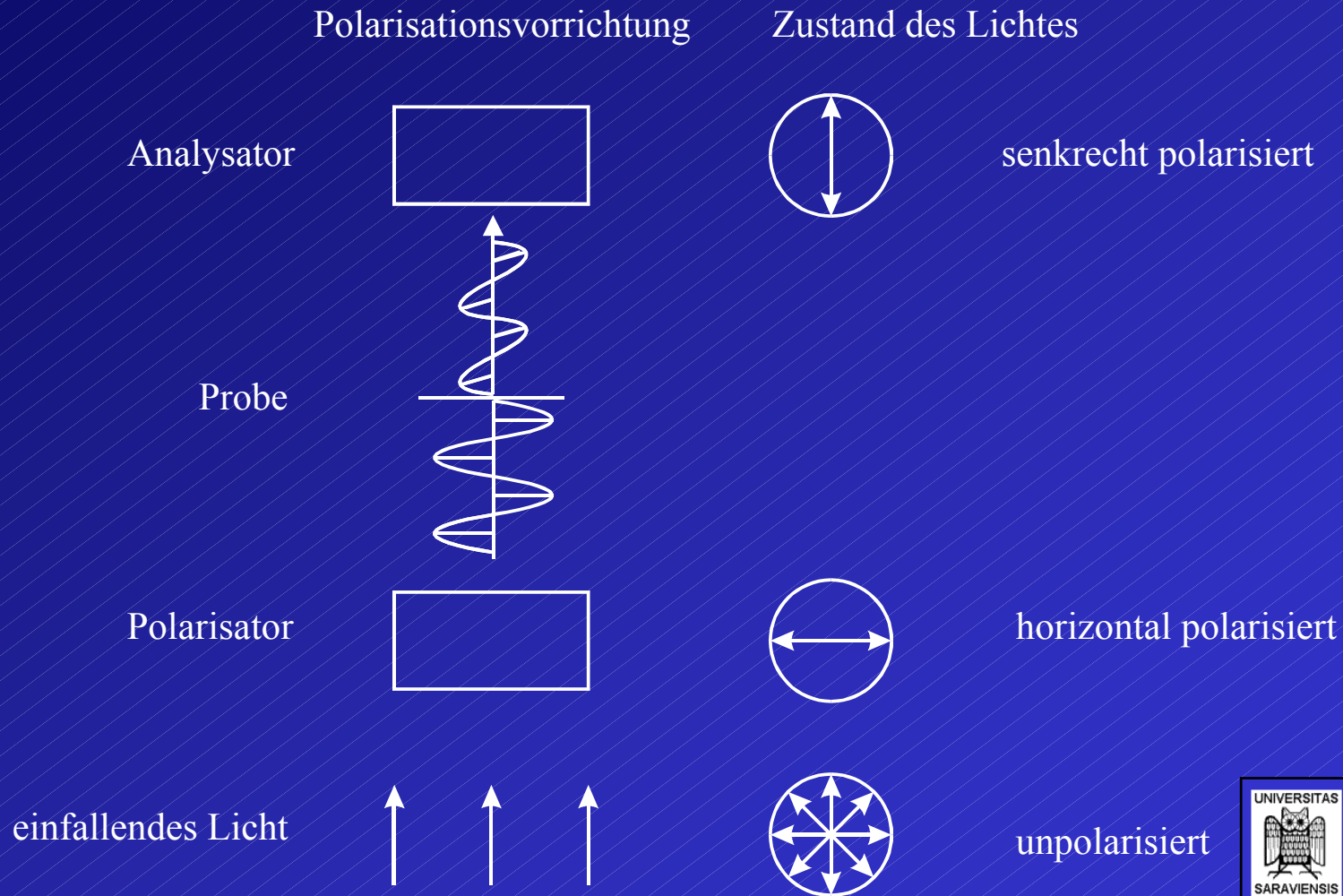
⇒ Auslöschung, bis auf Interferenz des ungestreuten Lichts mit dem phasenmodulierten Licht

Phasenkontrast

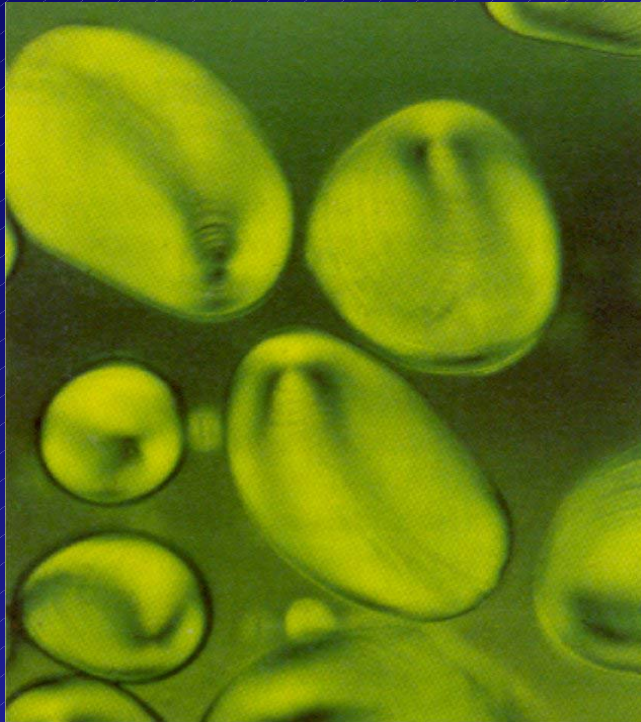


Naupilus-Larve (Hüpferrling) im
Phasenkontrast

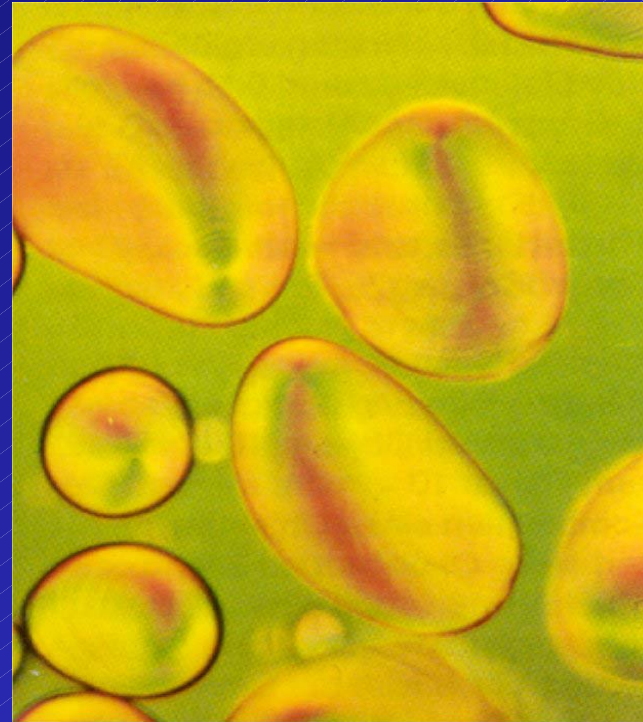
Polarisationsmikroskopie



Polarisationsmikroskopie

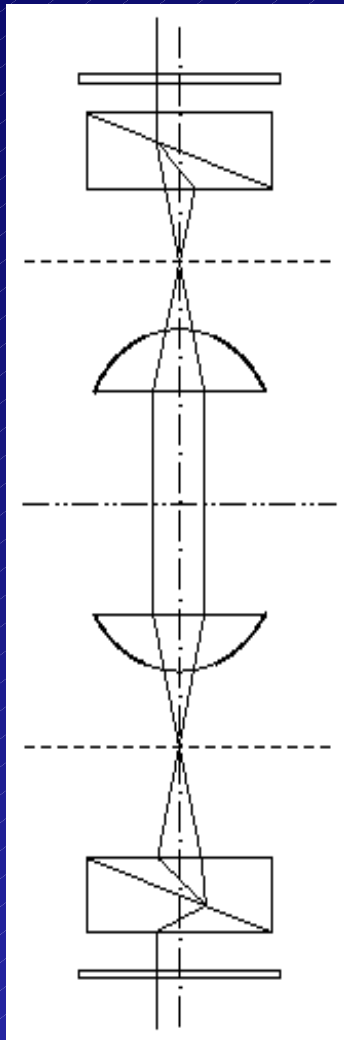


Kartoffelstärke in polarisiertem,
monochromatischem Licht



Kartoffelstärke in polarisiertem,
polychromatischem Licht

Differentieller Interferenz Kontrast (DIC)



Analysator

Wollaston-Prisma

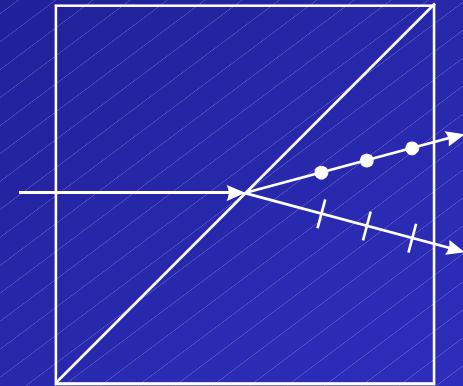
Objektiv

Präparatebene

Kondensor

Wollaston-Prisma

Polarisator



Wollaston-Prisma

Differentieller Interferenz Kontrast (DIC)

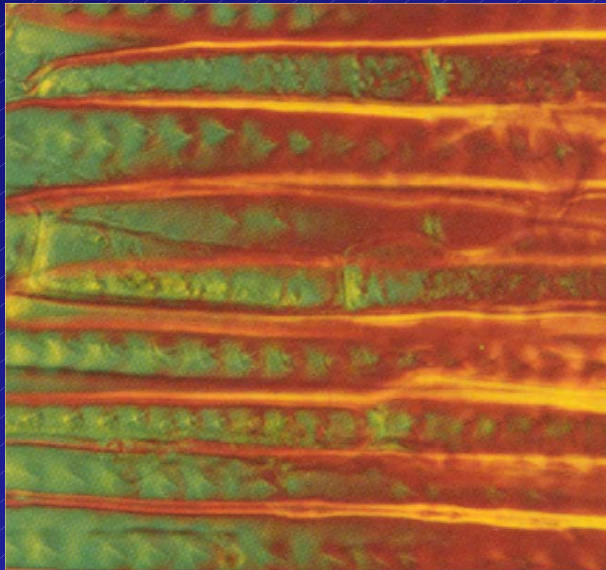
Prinzip:

- Polarisator erzeugt linear polarisiertes Licht.
- Wollastonprisma teilt einfallendes Licht in zwei senkrecht zueinander schwingende Wellen, die räumlich leicht getrennt sind (unter der Auflösungsgrenze des Mikroskops).
- Am Präparat werden Strahlen, die in verschiedenen Ebenen schwingen, verschieden phasenverschoben.
- Wollastonprisma: Wiedervereinigung der beiden senkrecht zueinander schwingenden Strahlen. Phasenverschiebungen führen zu Änderung der Polarisationsrichtung.

Vorteil: Präparate werden reliefartig abgebildet, da Ränder die höchsten Dichteunterschiede aufweisen.

Nachteil: Rotationssymmetrische Objekte werden nicht rotationssymmetrisch, sondern nur in Aufspaltungsrichtung sichtbar, lineare, in Aufspaltungsrichtung verlaufende Strukturen überhaupt nicht.

Differentieller Interferenz Kontrast (DIC)



Schnitt durch Holz



Gelenkregion eines
Milbenbeins

Zusammenfassung

- optimale Ausleuchtung durch *Köhler'sche Beleuchtung*
- *Hellfeld* bei großen, gefärbten Objekten
- *Dunkelfeld* bei kleinen, gefärbten Objekten
- *Phasenkontrast* bei ungefärbten Objekten
- *Polarisations-/Interferenzmikroskopie* bei anisotropen Objekten
- *Interferenzmikroskopie* zur reliefartigen Abbildung

Referenzen

- Handbuch der Mikroskopie; Dr.Hermann Beyer
- Mikroskopieren; Prof. Dr.Werner Nachtigall
- Die Grundzüge der Theorie des Mikroskops; Dr.Kurt Michel