

4. Mikroskope

4.1 Historie & Aufbau

4.2 Abbildungsleistung

4.3 Beleuchtungsarten

- Mikroskope dienen der Beobachtung **kleinster Strukturen**
- Die Abbildung erfolgt **zweistufig** über ein **vergrößertes reelles Zwischenbild**, welches mit einem Okular als Lupe betrachtet wird.
- Mikroskope bilden daher ein System mit **hoher Gesamtvergrößerung**
- Die Auflösung des Mikroskops ist limitiert durch die **numerische Apertur NA**.
- Mikroskopobjektive sind stets **beugungsbegrenzt** korrigiert.

4. Mikroskope

4.1 Historie & Aufbau

4.2 Abbildungsleistung

4.3 Beleuchtungsarten



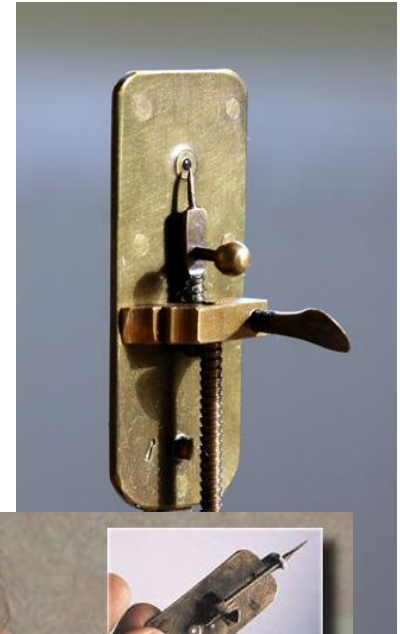
Wie erreicht man eine möglichst hohe Vergrößerung ?
Lupe (Einzellinse) → van Leeuwenhoek



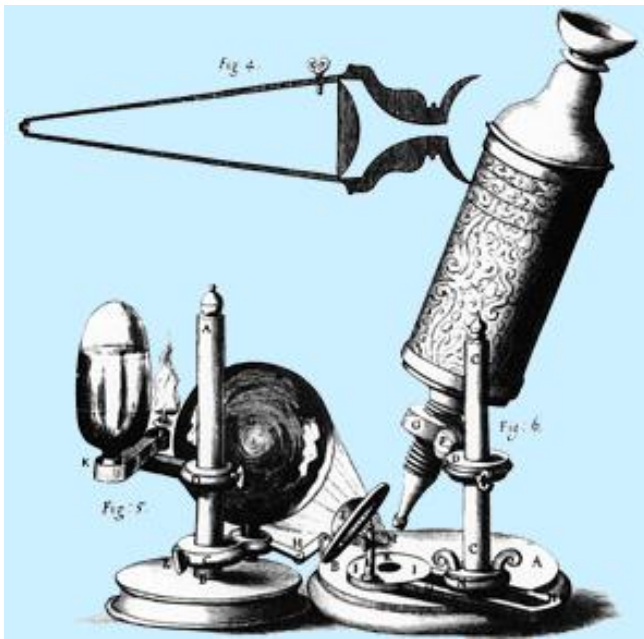
Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723)
<http://garaa2.files.wordpress.com/2010/03/39-a-antony-van-leeuwenhoek-1632-1723.jpg>

Leeuwenhoek's Mikroskop

<http://www.history-of-the-microscope.org/images/van-Leeuwenhoek-microscope1.jpg>



Zusammengesetzte Systeme



Die Abbildung zeigt eines der ersten Zusammengesetzten Mikroskope von Robert Hooke (1635-1703) aus der Zeit um 1665. Für die Beleuchtung wird das Licht eines Öllämpchens über eine mit Wasser gefüllte Glaskugel und eine zusätzliche Linse auf das Präparat gelenkt.

http://www.mikroskopie.de/pfad/grundlagen/animationen/hooke_b.jpg

Prinzip des Mikroskops



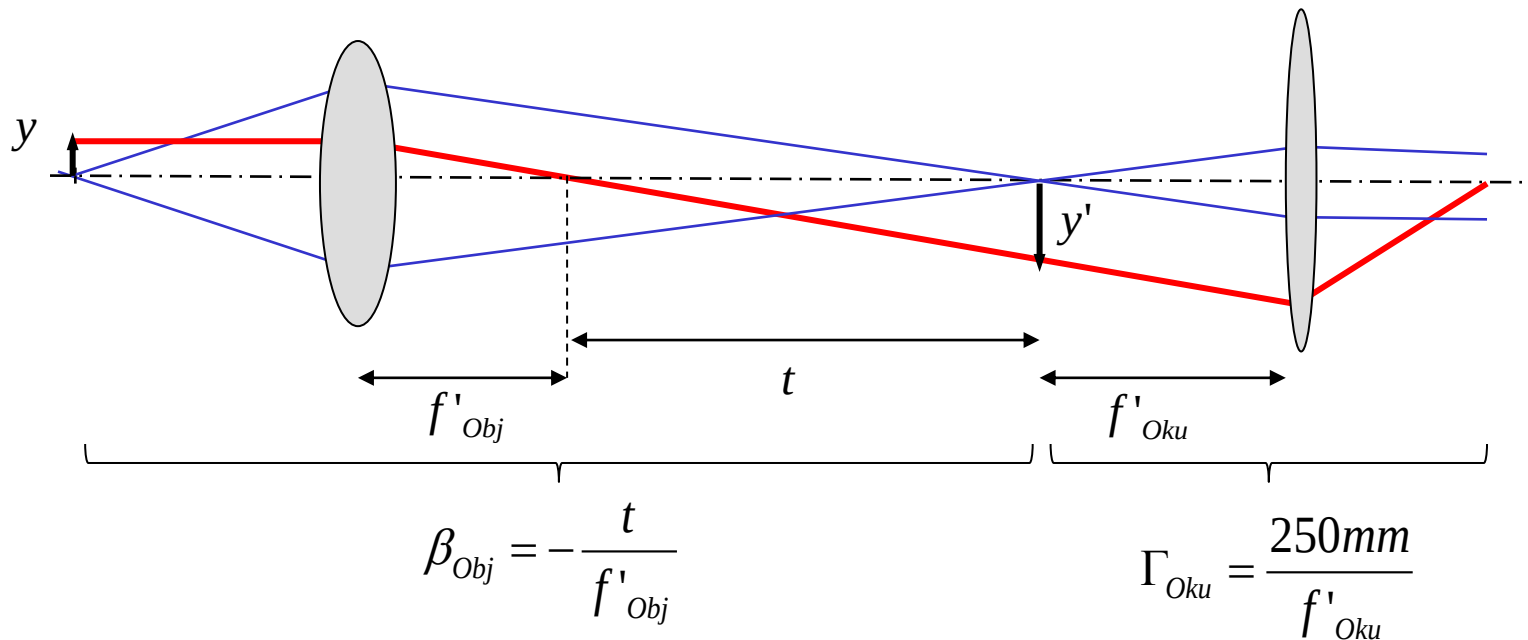
Klassischer Aufbau:

- Objektiv erzeugt **reelles Zwischenbild**
- Betrachtung durch **Okular** als Lupe

Vergrößerung der **zweistufigen** Abbildung:

$$\Gamma_{\text{mikro}} = \beta_{\text{Obj}} \cdot \Gamma_{\text{Oku}} = - \overbrace{\frac{t}{f'_{\text{Obj}}}}^{\text{Obj.}} \cdot \overbrace{\frac{250 \text{ mm}}{f'_{\text{Oku}}}}^{\text{Okular}}$$

(4.1)



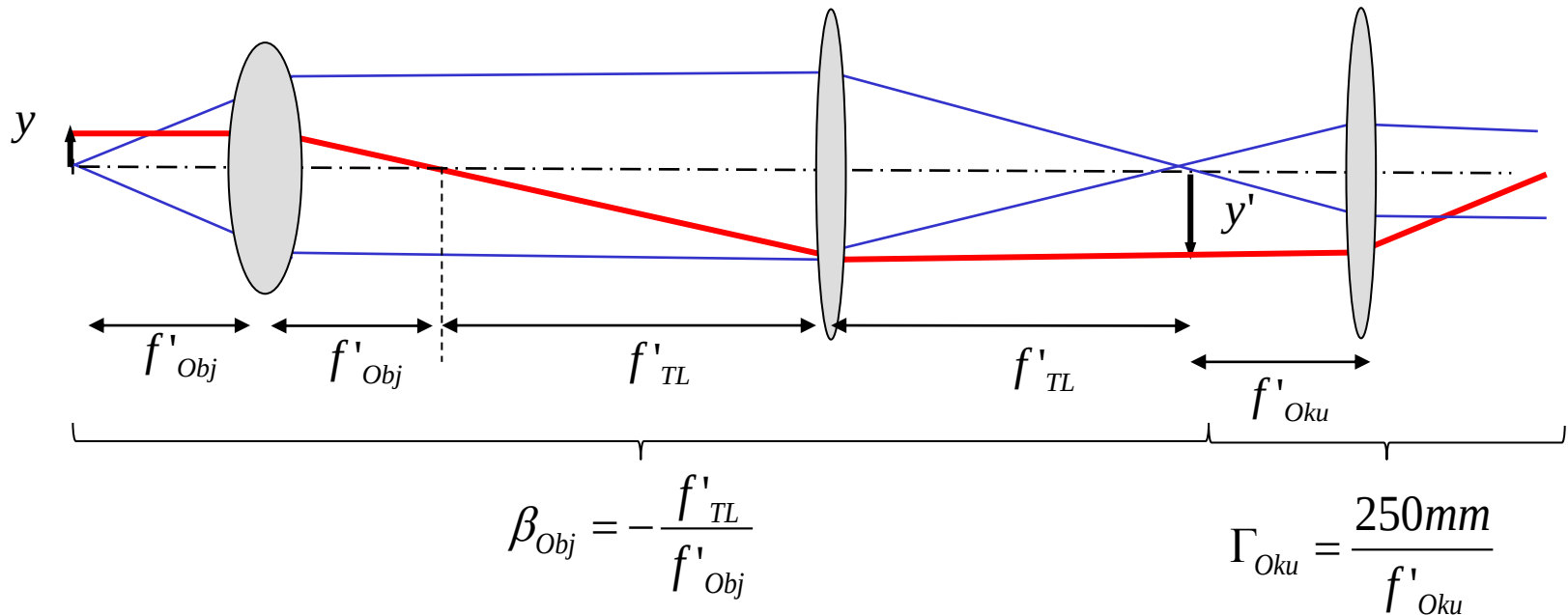
Mikroskop mit Unendlich-Strahlengang

Mikroskopsysteme mit **Unendlich**-Strahlengang und **Tubulinse**

Vergrößerung des Systems:

$$\Gamma_{\text{mikro}} = \beta_{\text{Obj}} \cdot \Gamma_{\text{Oku}} = \overbrace{-\frac{f'_{\text{TL}}}{f'_{\text{Obj}}}}^{\text{Obj.}} \cdot \overbrace{\frac{250 \text{ mm}}{f'_{\text{Oku}}}}^{\text{Okular}}$$

(4.2)

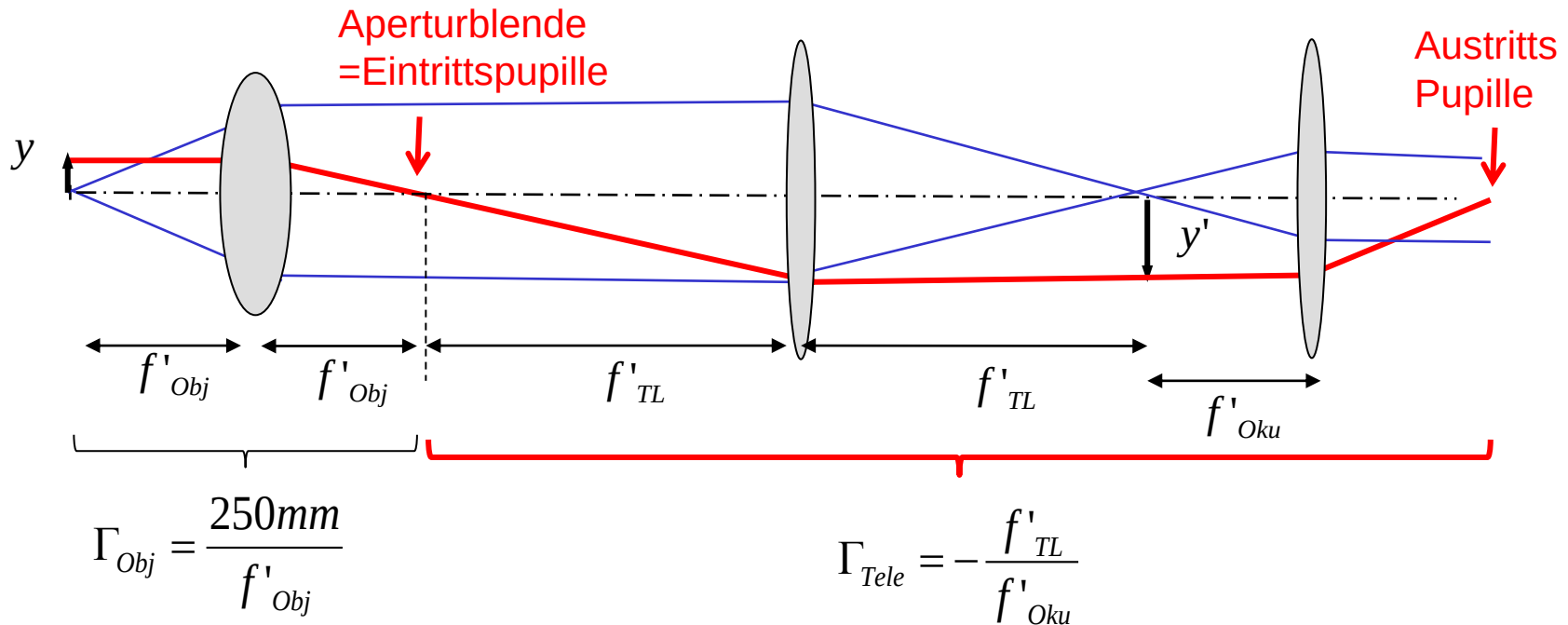


Mikroskop als Fernrohrlupe

Mikroskopsysteme mit **Unendlich**-Strahlengang und **Tubulinse** kann auch als **Fernrohrlupe** interpretiert werden:

Vergrößerung des Systems:

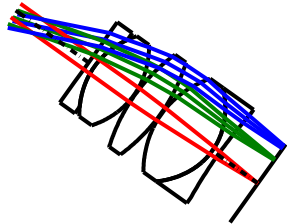
$$\Gamma_{\text{mikro}} = \Gamma_{\text{Obj}} \cdot \Gamma_{\text{Tele}} = \overbrace{\frac{250\text{mm}}{f'_{\text{Obj}}}}^{\text{Obj.}} \cdot \overbrace{-\frac{f'_{\text{TL}}}{f'_{\text{Oku}}}}^{\text{Teleskop}}$$



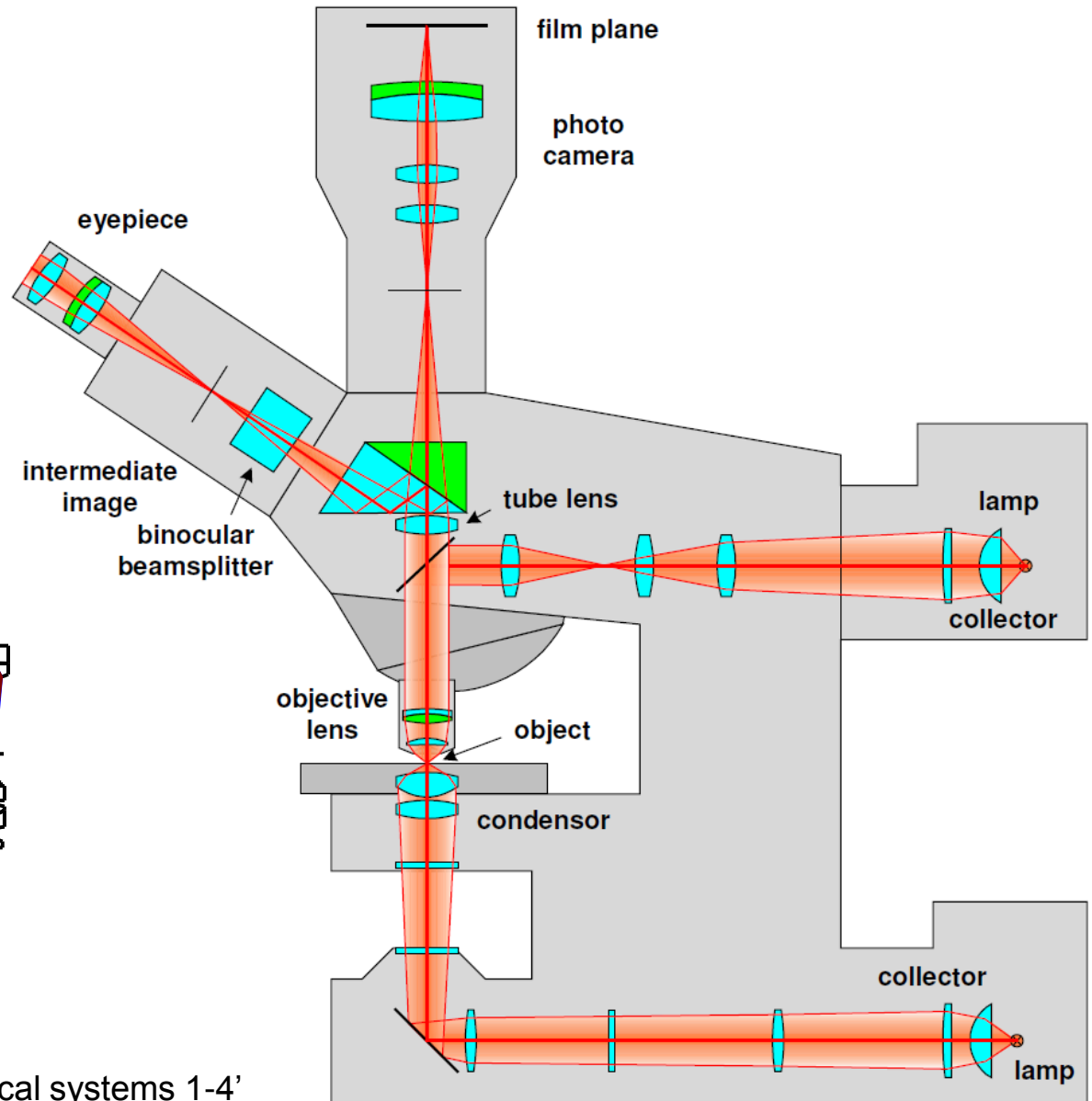
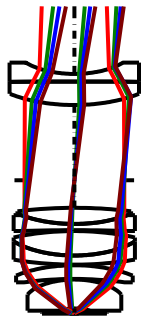
Aufbau des Mikroskops

Prinzipieller Aufbau

Okular (e.g. 10X/12mm)



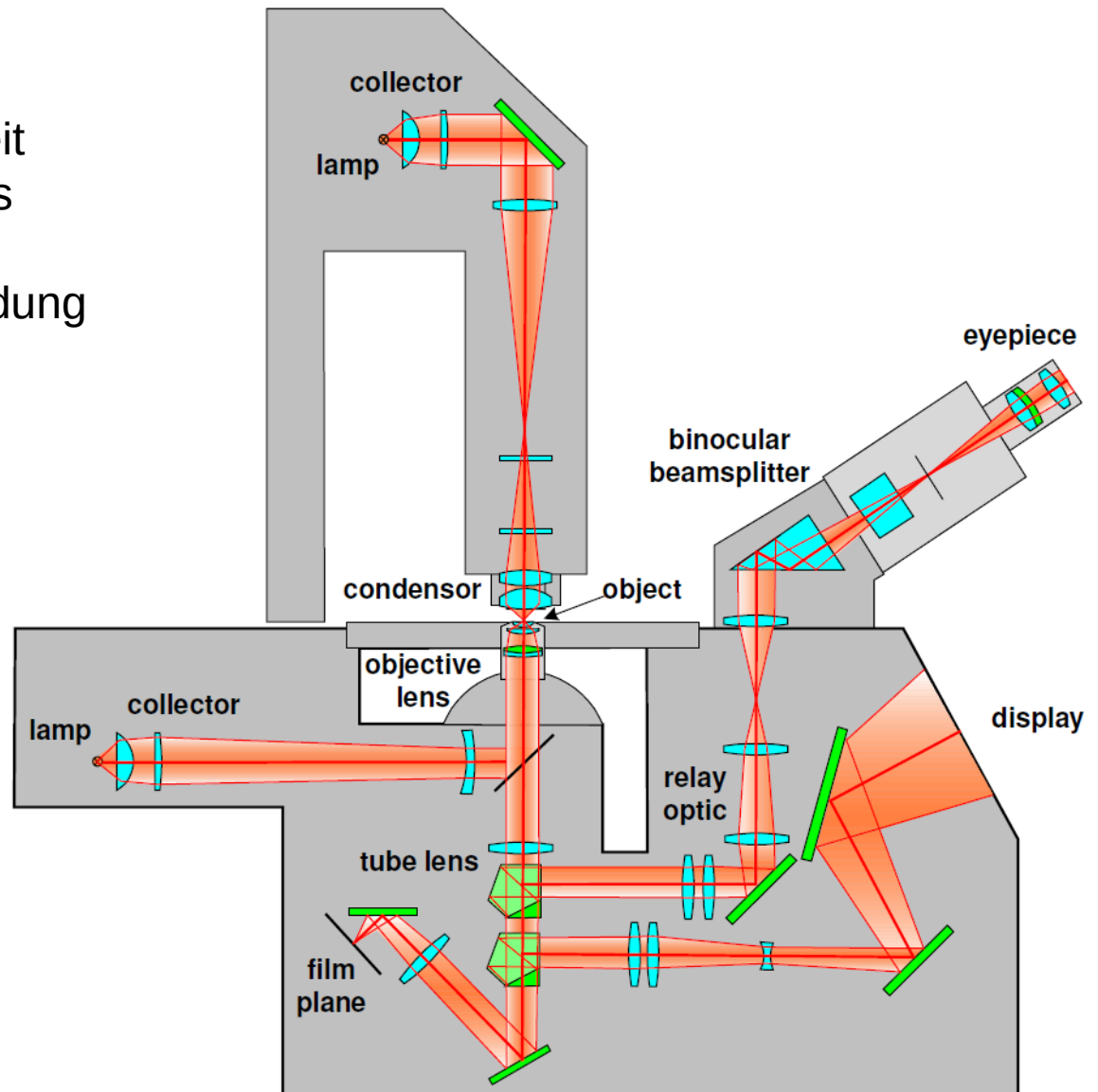
Objektiv
(e.g. 100X/0.9)



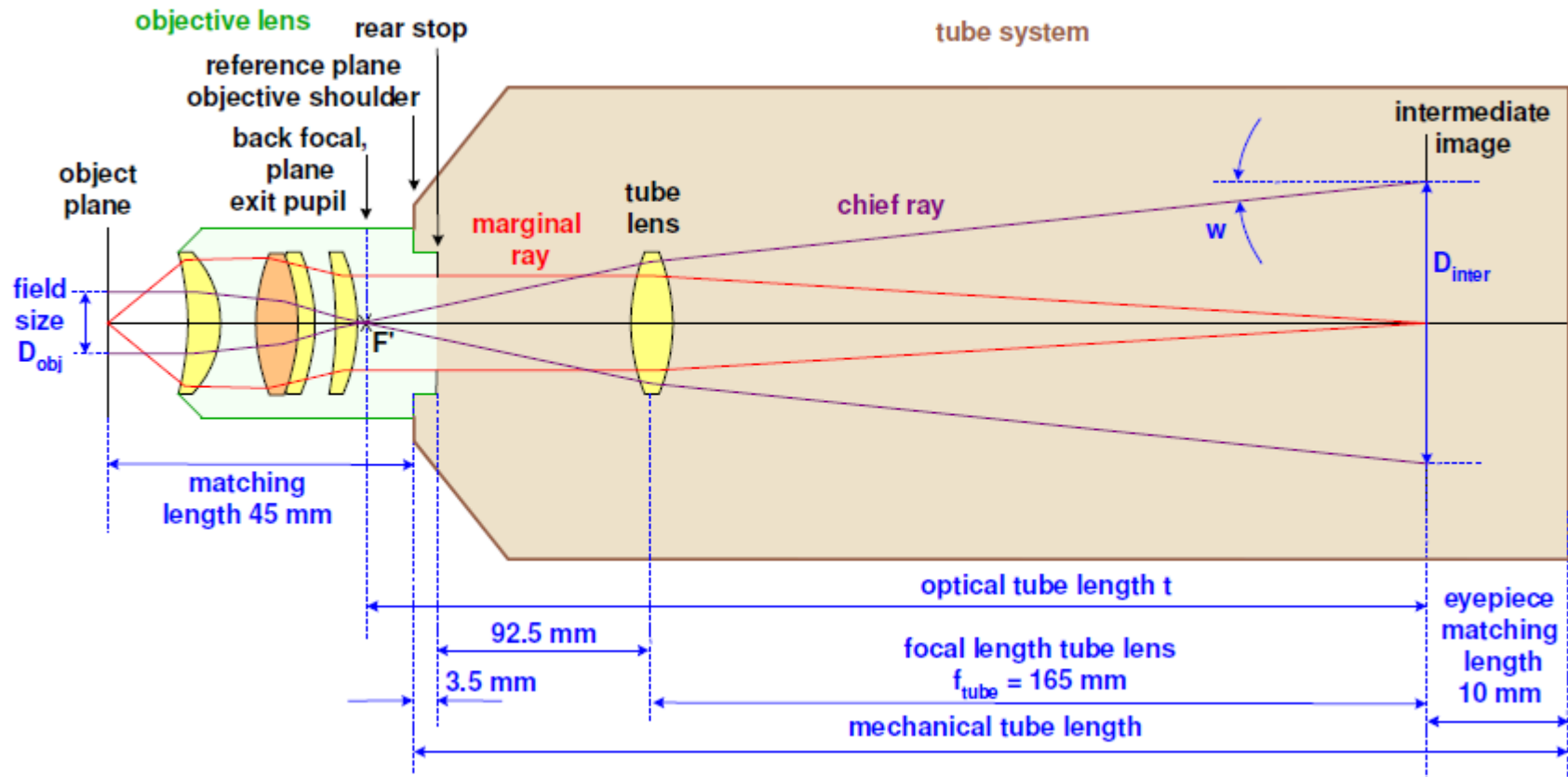
Quelle: H. Gross, 'Handbook of optical systems 1-4'

Inverses Mikroskop

- Für Objekte in Flüssigkeit
- Beobachtung durch Glas
- Zusätzliche Relay-Abbildung



Standardabmessungen für Baulängen und Tubulinse



Quelle: H. Gross, 'Handbook of optical systems 1-4'

Mikroskop Kennzeichnung

Name: z.B. „Plan-Neofluar“

→ Grobe Einteilung nach Farbkorrektur und Bildfeld-Ebnung

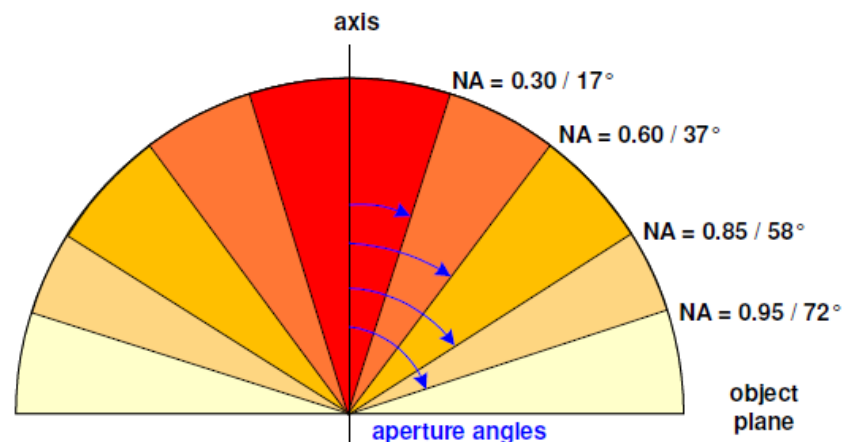
Vergrößerung / NA:

→ z.B. 100x / 0.95
(evtl. weitere Angaben)

Farb-Kodierung:

Vergrößerung und Immersion

Colour	Magnification
black	1x
grey	2x
red	4x
yellow	10x
green	20x
bright blue	40x
blau	50x
dark blue	60x
white	100x



1. Achromate

Einfachste und kostengünstigste Objektivvariante

2. Planachromate

Geebnete kostengünstige Objektive für Photomikroskopie und große Felder

3. Neofluare

Verbesserte Farbkorrektion

4. Planneofluare

Verbesserte Korrektion von Farbe und Bildfeldwölbung, gute Transmission und Korrektion auch für kurze Wellenlängen nahe am UV-Bereich

5. Planapochromate

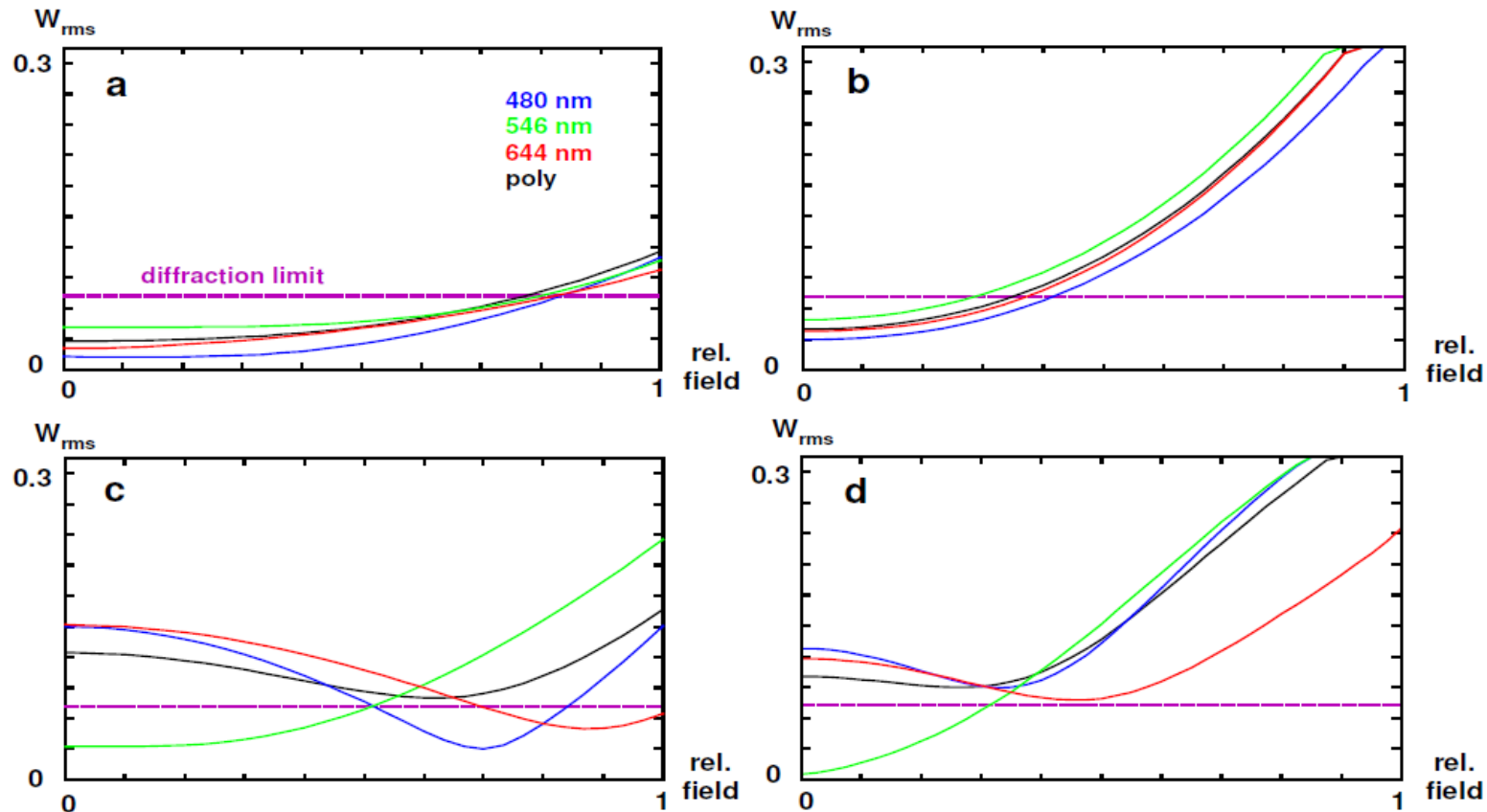
Bestmögliche Korrektion von Farbfehlern und Bildfeldwölbung

6. Epiplane

Spezielle Objektive für Reflexionsmikroskopie ohne Immersion und mit großen Arbeitsabständen

7. Ultrafluare

Speziell breitbandig korrigierte Objektive mit guter Qualität von 230 nm bis 700 nm



Wellenfrontfehler (RMS) über Farbe und Bildfeld

- a) Farbkorrektur und Bildfeldebnung
- c) Bildfeldebnung

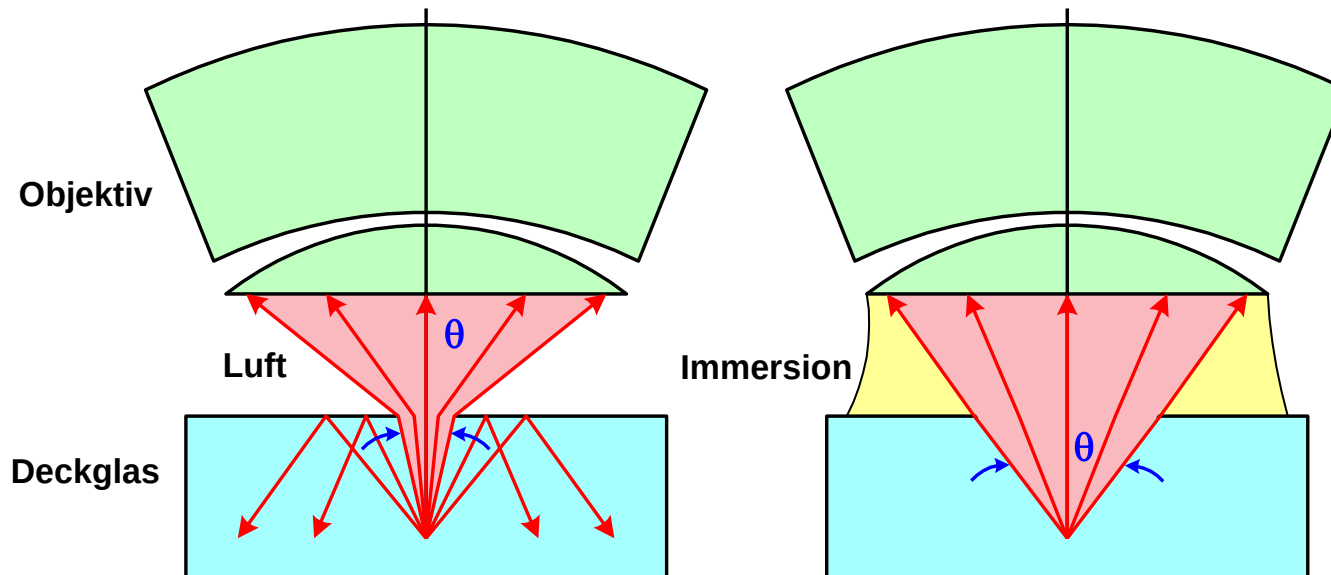
- b) nur Farbkorrektur
- d) ohne Farb- und Bildfeldkorrektur

Typunterscheidung bei Mikroskopobjektiven:

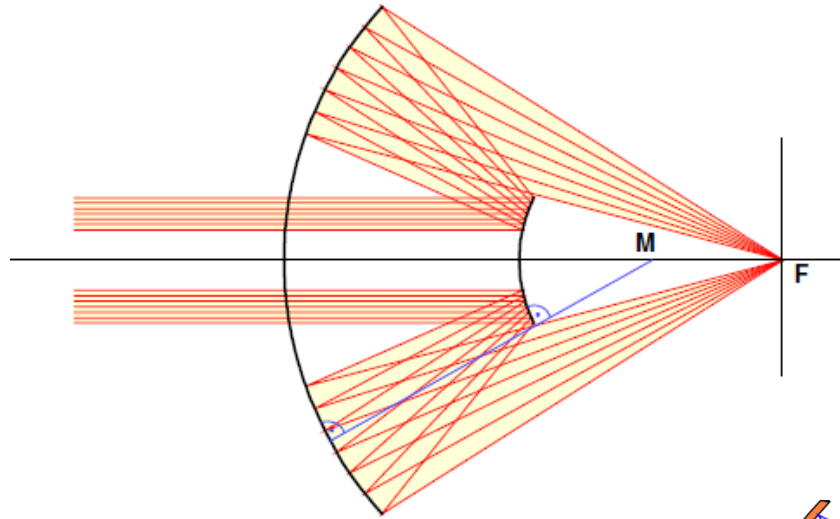
1. Objektive **ohne Deckglas**
2. Objektive **mit Deckglas (Angabe der Dicke)**
3. Objektive mit Deckglas in **Immersion** für hohe Aperturen

Immersion (Flüssigkeit zwischen Deckglas und Objektiv)

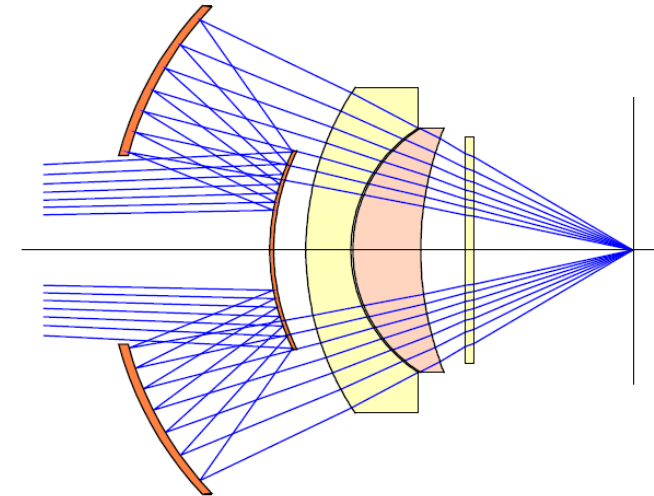
- Vergrößerung des tatsächlich wirksamen Winkels des Öffnungskegels
- Größere numerische Apertur bedingt höhere Auflösung
- Vermeidung von Totalreflexion an der Deckglasoberfläche



Spiegelobjektive



Katadioptrische Objektive (Linsen & Spiegel)

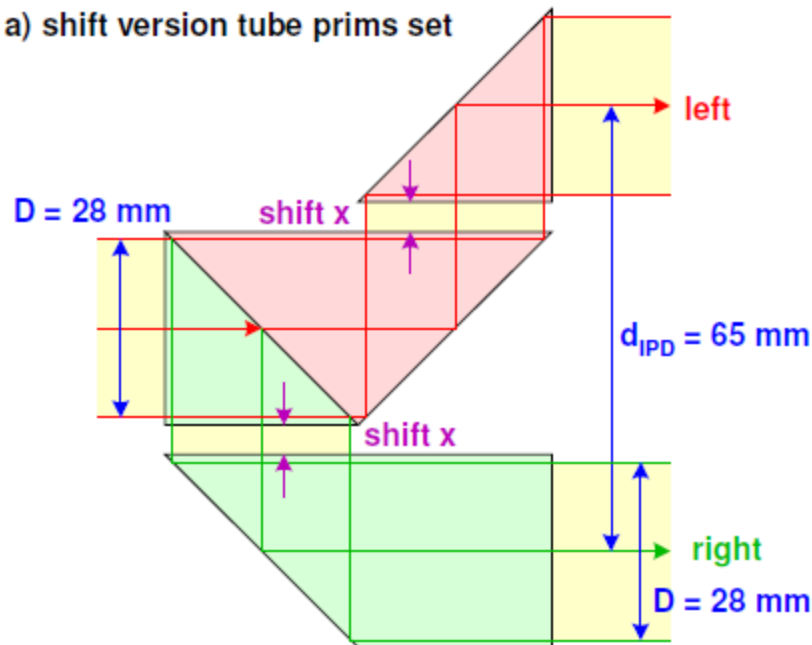


Vorteil: Farbkorrektur

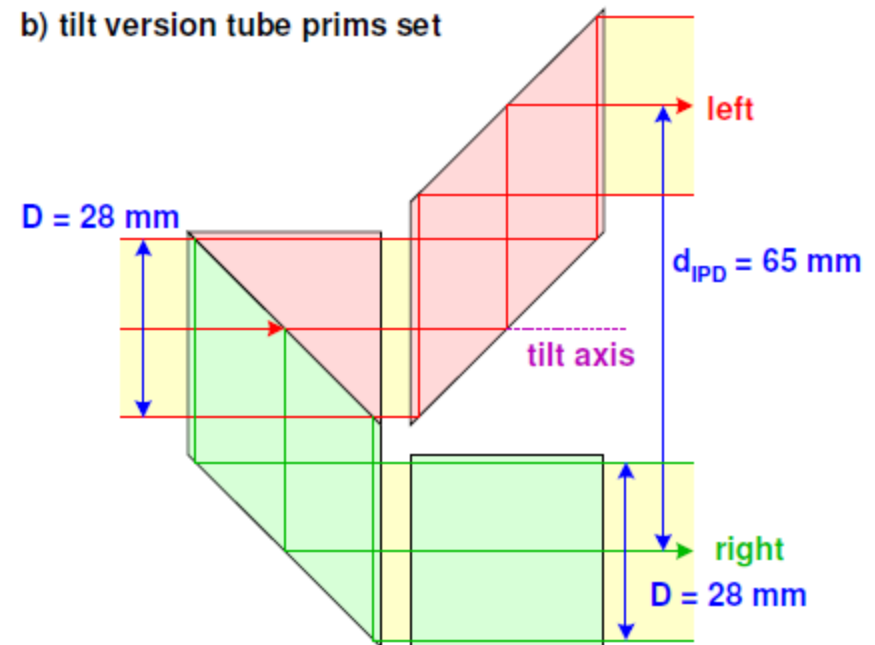
Nachteil: **Mittenabschattung**

- Tube prism systems to generate two binocular channels
- Adjustable pupillary distance required
- Two versions: shift / tilt movement

a) shift version tube prism set



b) tilt version tube prism set



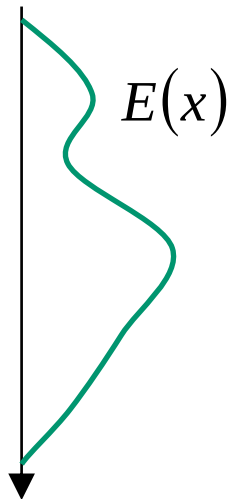
4. Mikroskope

4.1 Historie & Aufbau

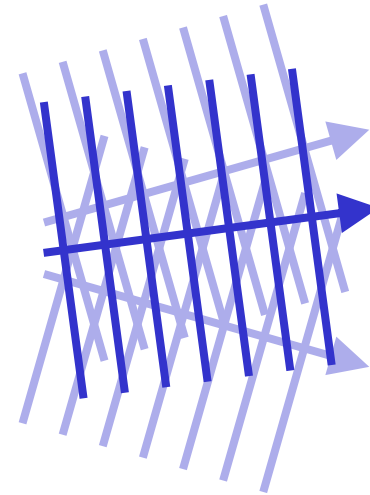
4.2 Abbildungsleistung

4.3 Beleuchtungsarten

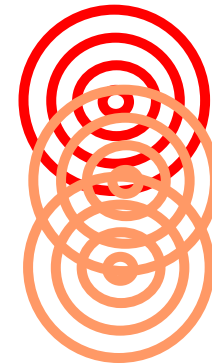
Lichtwelle



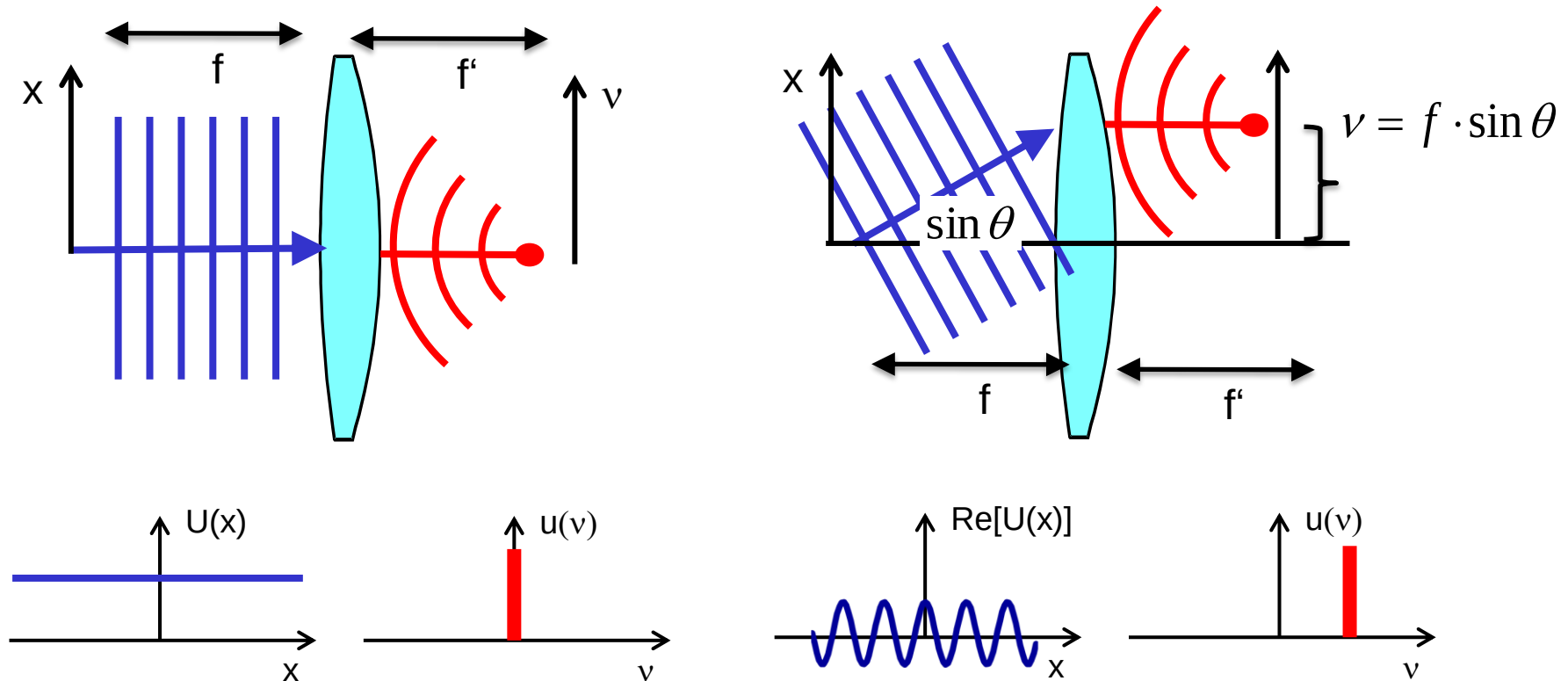
Zerlegung nach
„Ebenen“ Wellen
→ Fourier-Optik



Zerlegung nach
Kugelwellen
→ Huygens-Fresnel



Einzellinse mit Brennweite f, f'



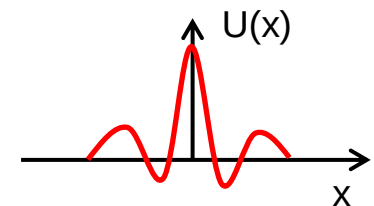
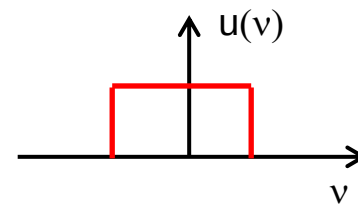
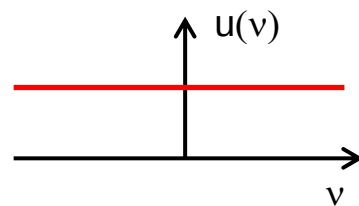
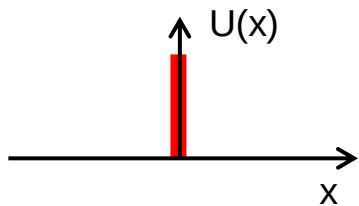
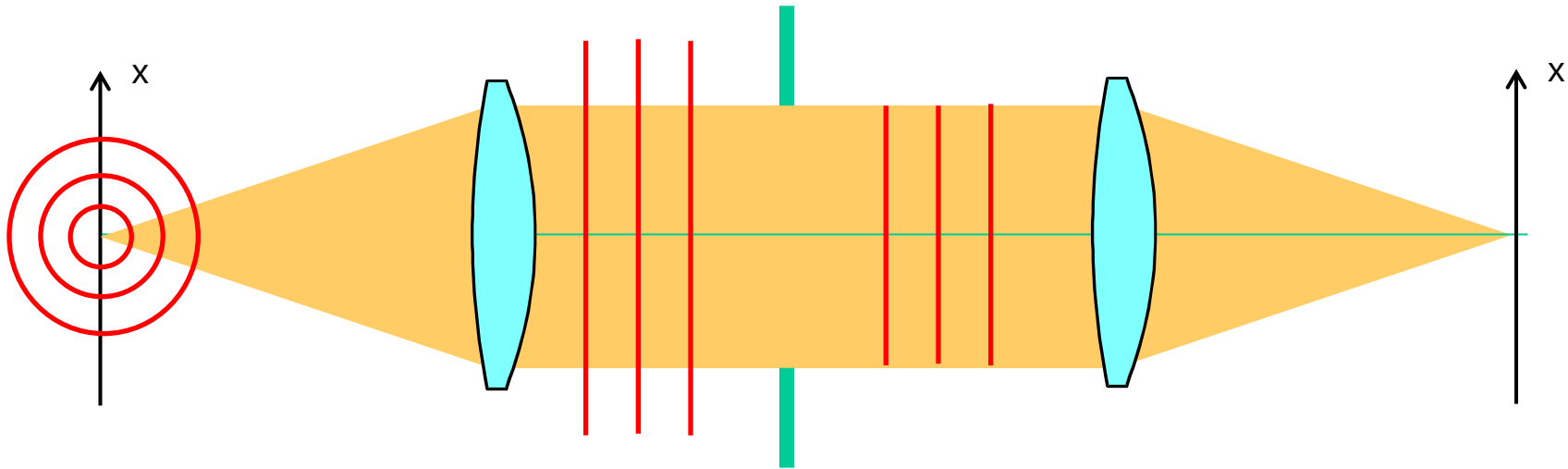
Einzellinse verhält sich genau wie Fouriertransformation

➔ Linse übersetzt Winkel in Ort und umgekehrt

Abbildungssystem als Frequenzfilter



Betrachte Abbildungssystem als Folge von Fouriertransformationen



$U(x) \xrightarrow{\mathcal{F}} u(v)$

$u'(v) \xrightarrow{\mathcal{F}} U'(x)$

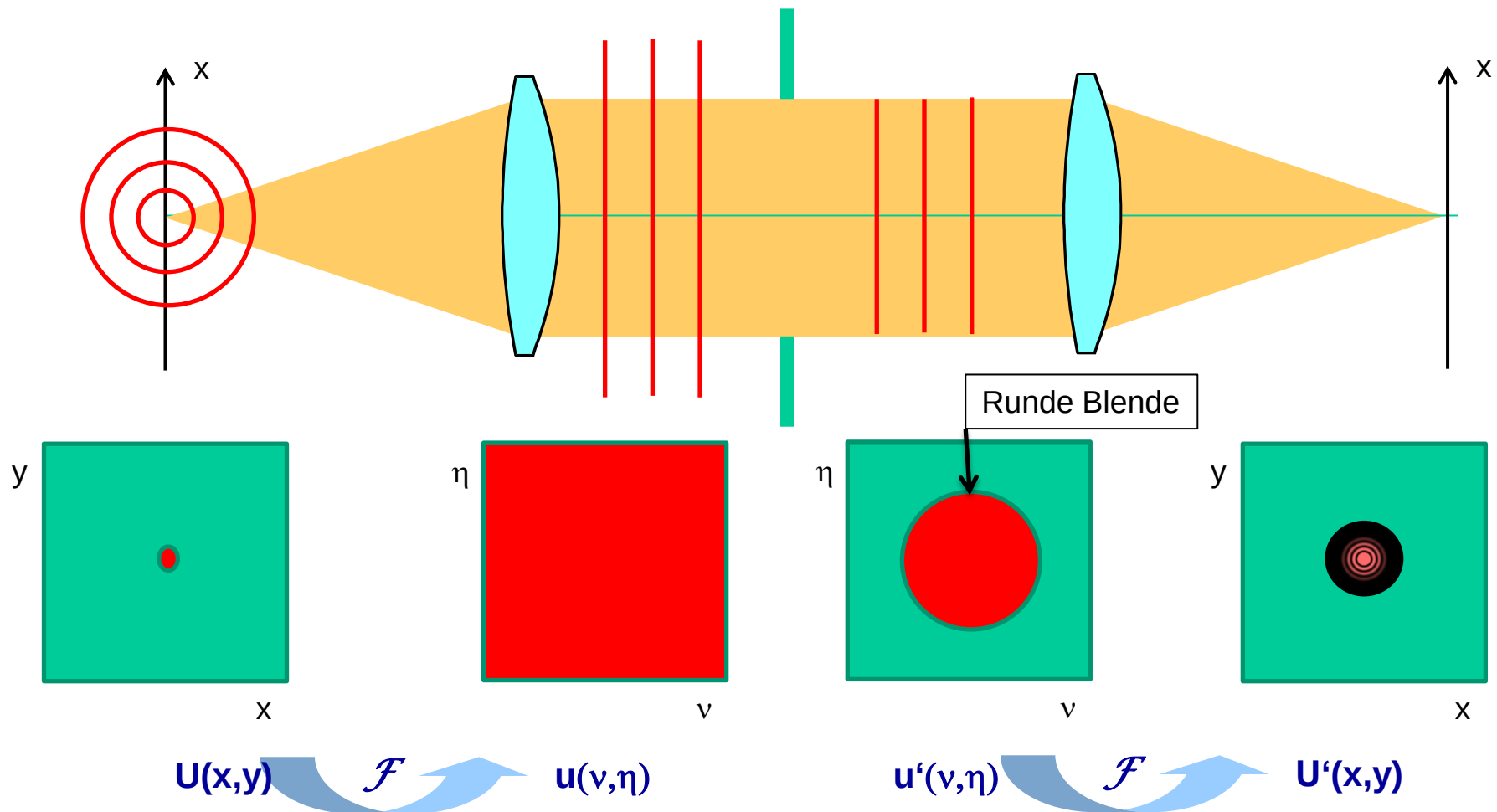
Ortsraum

Winkelraum

Ortsraum

Airy-Scheibchen / Auflösungsgrenze

Betrachte 2-Dimensionales System mit **runder Blende**

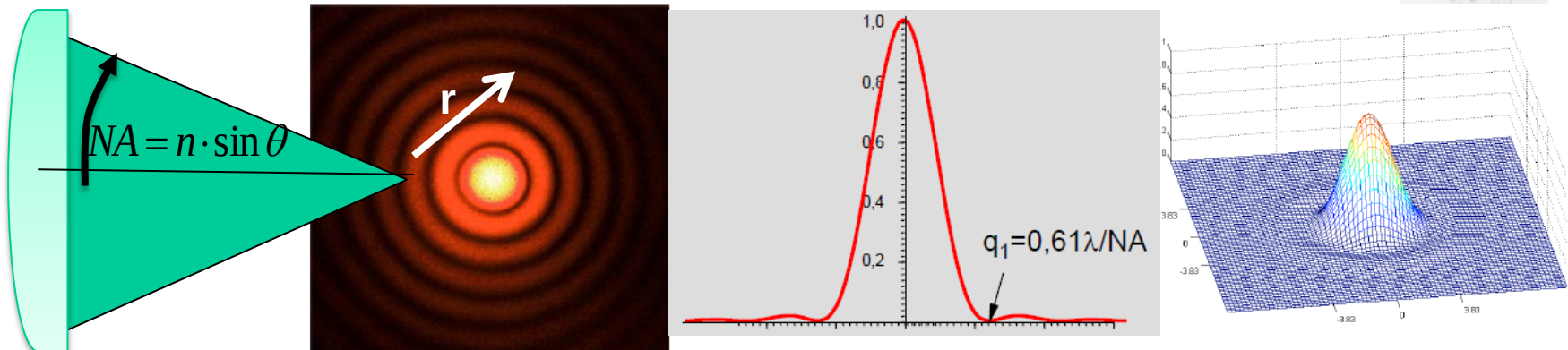


$$I(r) \propto \frac{J_1^2(2\pi \cdot r \cdot NA / \lambda)}{r^2}$$

$$r = \sqrt{x^2 + y^2}$$

J_1 = Besselfunktion 1.Ord.

Beugungsbild: sog. Airy-Scheibe (Sir Airy 1801-1892)



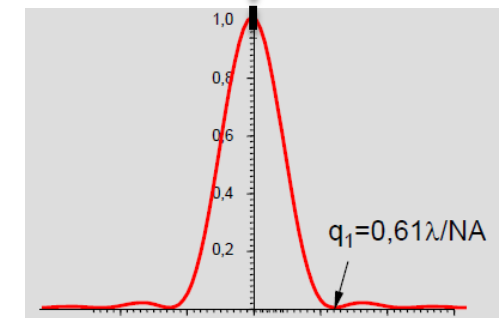
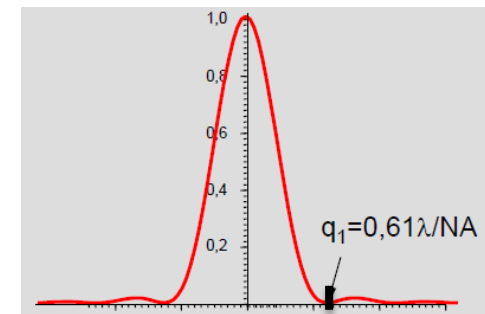
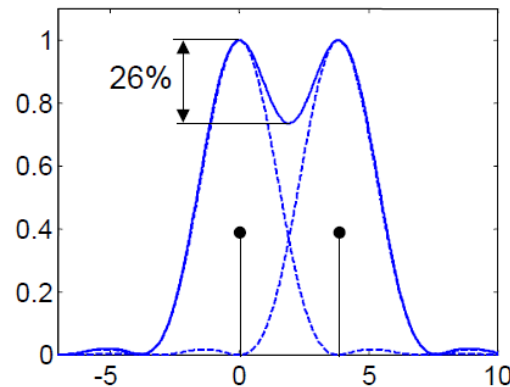
Nullstellen bei $r = \pm 0.61 \cdot \frac{\lambda}{NA}$

→ Breite des beugungsbegrenzten Punktbildes
(bei runder Blende)

$$d_{\text{Airy}} = 1.22 \cdot \frac{\lambda}{NA}$$

(4.3)

Rayleigh-Kriterium: 2 Objektpunkte werden als aufgelöst betrachtet, wenn Maximum des Beugungsscheibchens des einen in erstes Minimum des Beugungsscheibchens des anderen Objektpunkts fällt



→ **Rayleigh-Auflösungsgrenze** bei Abstand

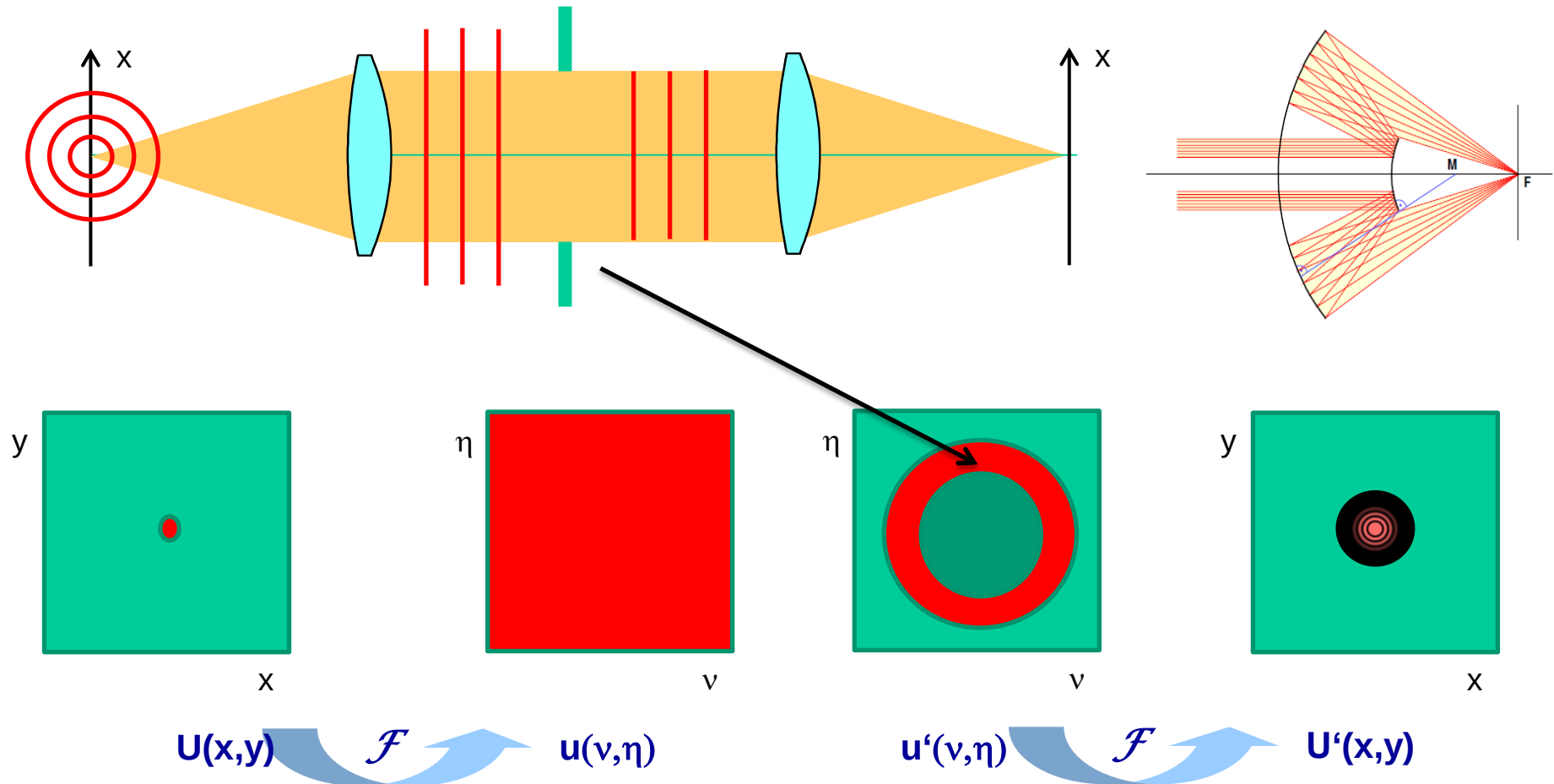
$$\Delta x = 0.61 \cdot \frac{\lambda}{NA}$$

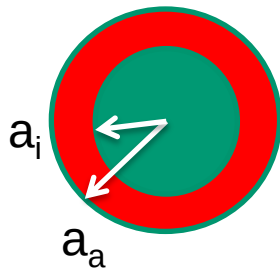
(4.4)

PSF bei Mittenabschattung



Betrachte 2-Dimensionales System mit **runder Blende und Mittenabskuration** (z.B. bei Spiegelobjektiven oder katadioptrischen Objektiven)

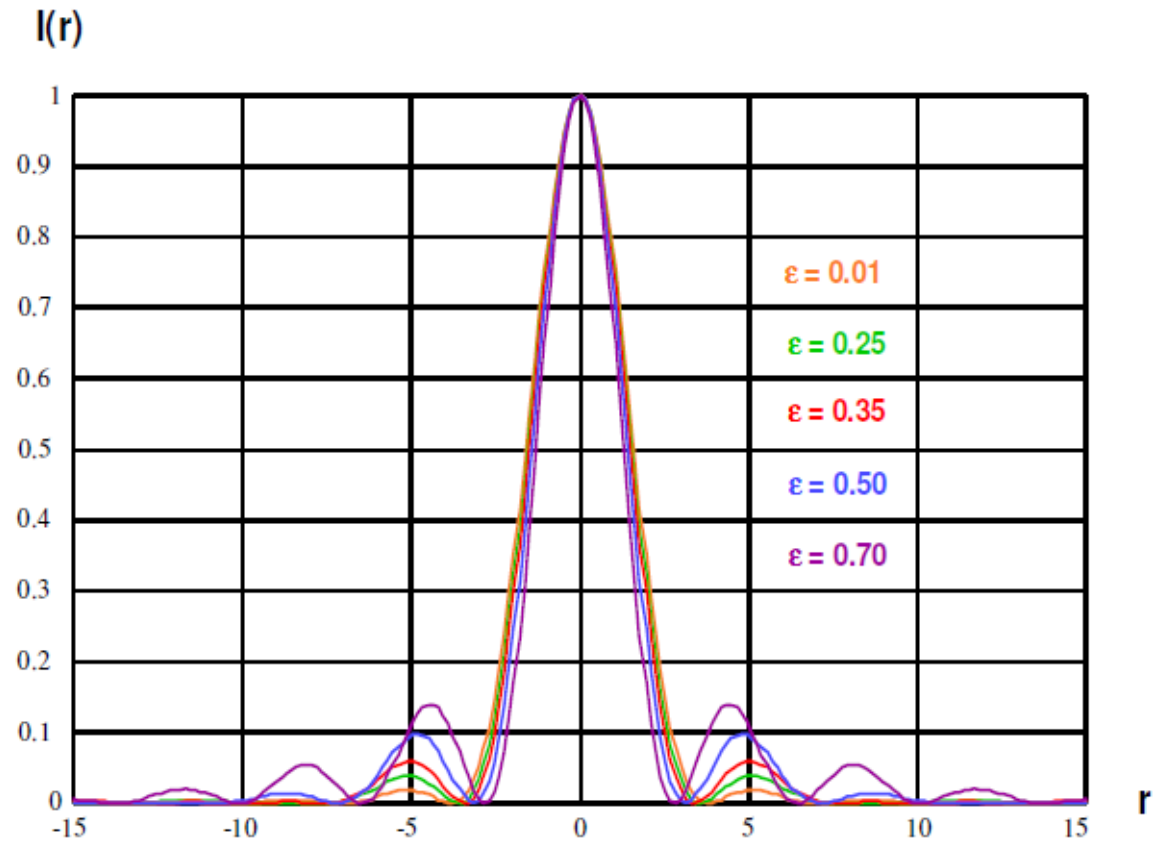




Außenradius a_a

Innenradius a_i

Parameter $\varepsilon = \frac{a_i}{a_a} < 1$

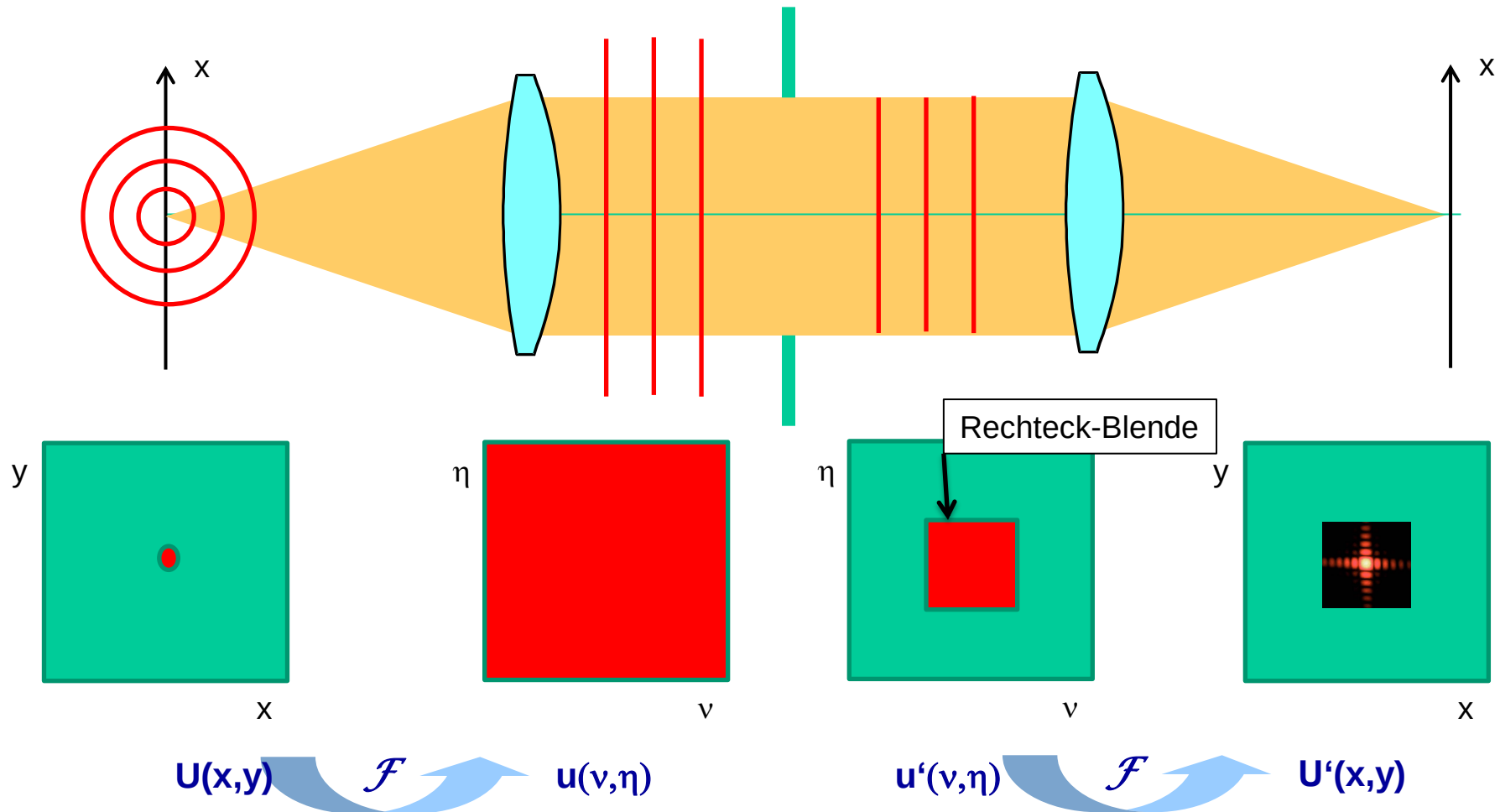


$$I(x) = \frac{1}{(1 - \varepsilon^2)^2} \left[\frac{2J_1(x)}{x} - \varepsilon^2 \cdot \frac{2J_1(\varepsilon x)}{\varepsilon x} \right]^2$$

2 dimensionales Punktbild (Rechteckblende)



Betrachte 2-Dimensionales System mit **Rechteckblende**



2 dimensionales Punktbild (Rechteckblende)



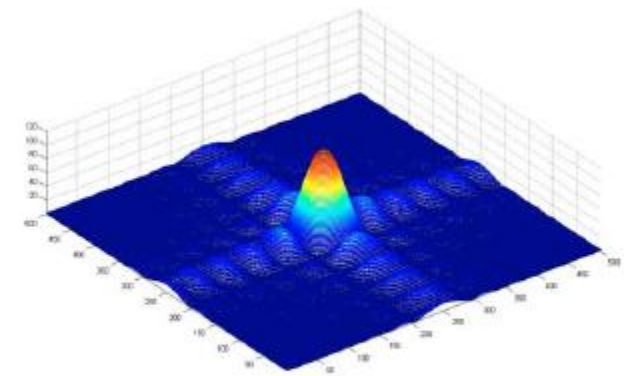
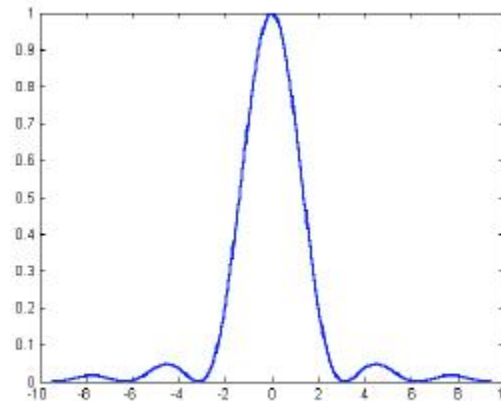
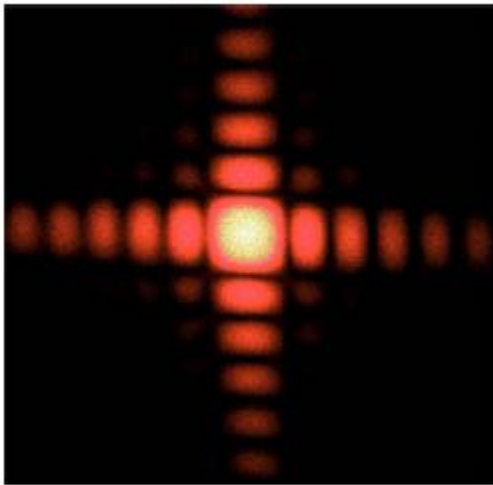
$$U(x, y) \propto \text{sinc}(2\pi \cdot x \cdot NA_x / \lambda) \cdot \text{sinc}(2\pi \cdot y \cdot NA_y / \lambda)$$

Intensität = Amplitudenquadrat

$$I(x, y) \propto \text{sinc}^2(2\pi \cdot x \cdot NA_x / \lambda) \cdot \text{sinc}^2(2\pi \cdot y \cdot NA_y / \lambda)$$

$$dx_{PSF} = \frac{\lambda}{NA_x}$$

$$dy_{PSF} = \frac{\lambda}{NA_y}$$



Das beugungsbegrenzte Punktbild beschreibt die ideale Intensitätsverteilung eines perfekten Abbildungssystems.

In der Realität wird die Punktbildverteilung davon abweichen.

Einflussgrößen sind:

- Bildfehler (Wellenfrontfehler)
- Defokussierung

Als Qualitätskriterium dient die sog.

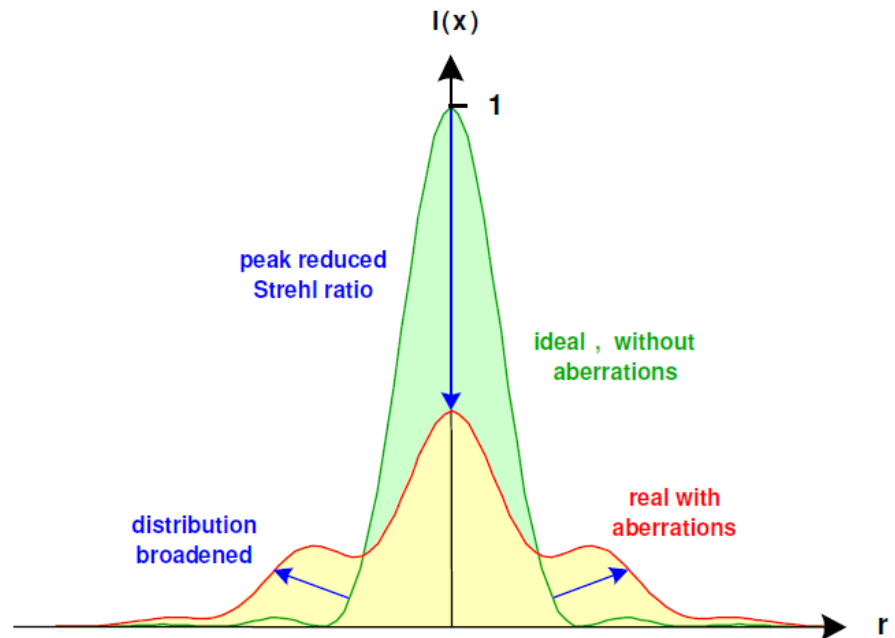
Strehl-Definitionshelligkeit D_S

= Verhältnis der Peakintensität im Punktbild real vs. ideal

$$D_S = \frac{I_{PSF}^{(real)}(0,0)}{I_{PSF}^{(ideal)}(0,0)}$$

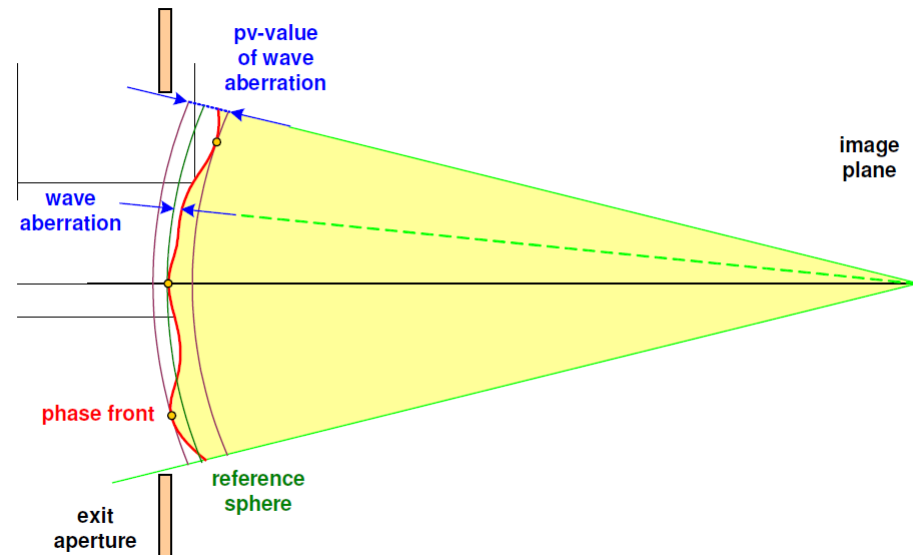
Für $D_S > 0.8$ sind keine merklichen Qualitätseinbußen feststellbar

→ **Abbildung ist beugungsbegrenzt**



Es gilt folgender
näherungsweise Zusammenhang
(Marechal-Näherung)
zwischen Wellenfrontfehler und
Strehl-Definitionshelligkeit:

$$D_s = 1 - 4\pi^2 \left(\frac{W_{rms}}{\lambda} \right)^2$$



Als Daumen-Regel gilt deshalb, dass ein „beugungbegrenztes“ Abbildungssystem (d.h. $D_s > 0.8$) einen maximalen Wellenfrontfehler von

$$W_{rms} < 0.07\lambda$$

Bzw. da PV und RMS mit ca. 3.5x skalieren

$$W_{PV} < \frac{\lambda}{4}$$

Lichtverteilung in beliebigen z-Ebenen

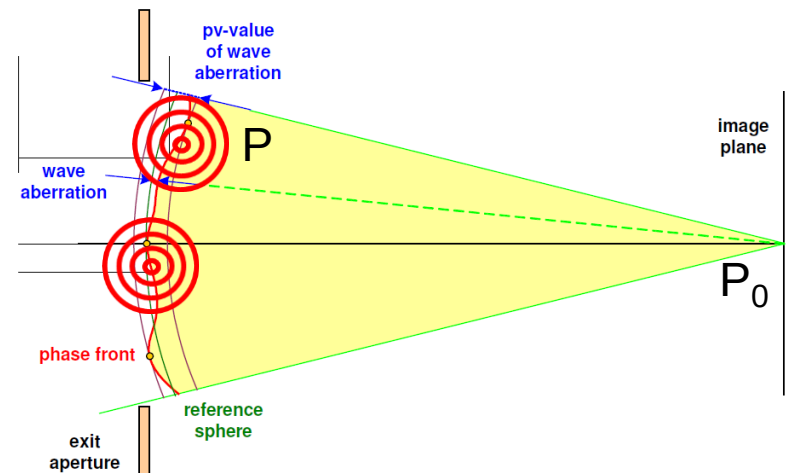
Fourier-Optik: Einfache Berechnung der Lichtverteilung für Feld und Pupillenebene (Fouriertransformation)

Huygens-Fresnelsches Prinzip

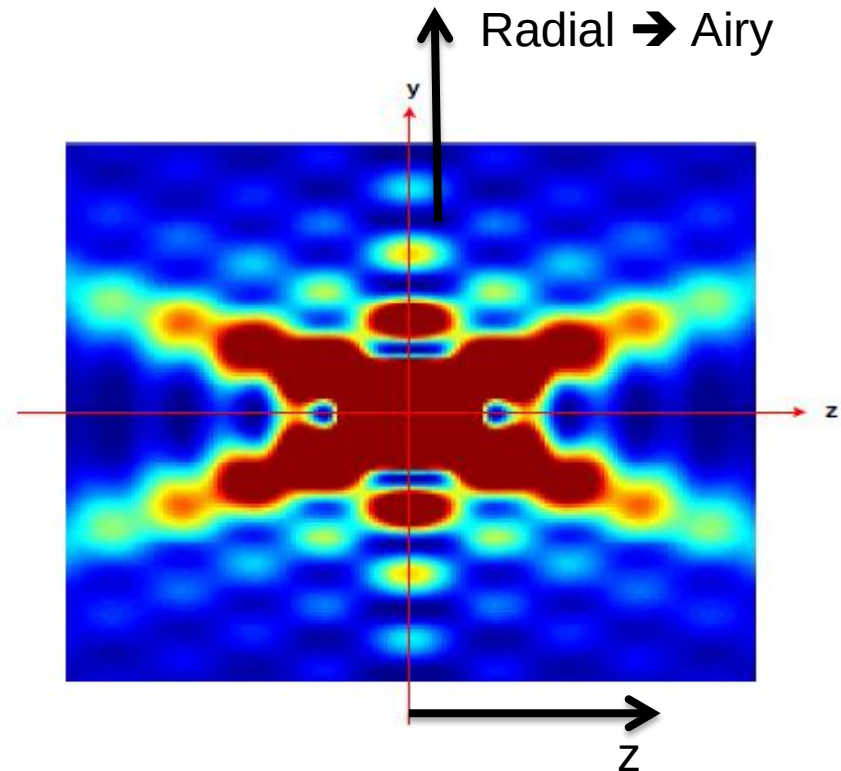
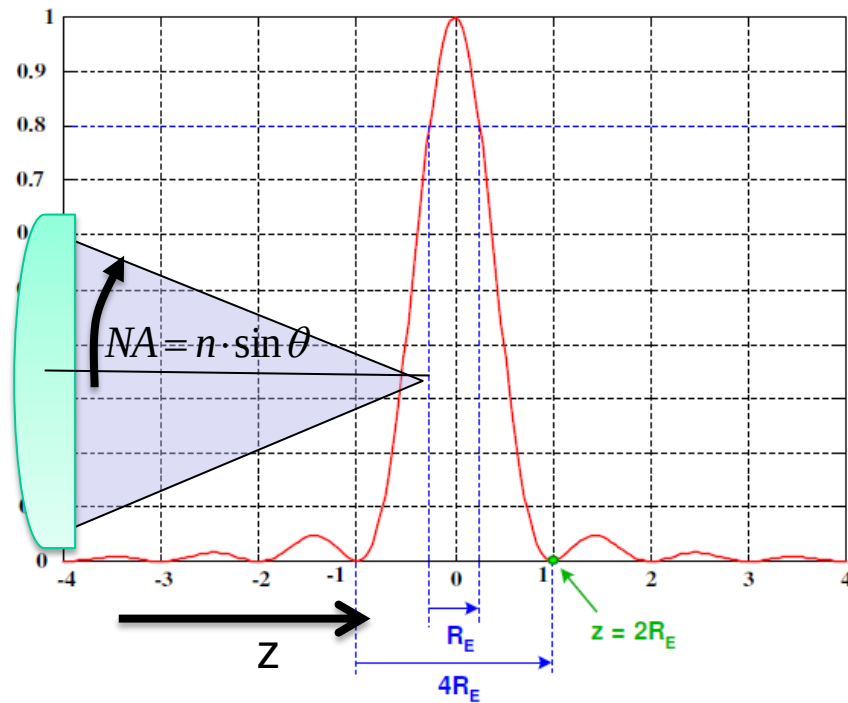
Die auf die beugende Öffnung fallende Kugelwelle $U(P)$ pflanzt sich so fort, als ob von jedem Element df dieser Öffnung eine Kugelwelle $U'(P)$ ausgeht, deren Amplitude und Phase durch die einfallende Welle $U(P)$ gegeben sind. (Jeder Punkt eines Wellenfeldes ist Erregungszentrum einer sekundären Kugelwelle.)

$$U(P_0) = \frac{1}{i\lambda} \iint_{\Sigma} U'(P) \frac{\exp(-ikr_{P_0})}{r_{P_0}} \cos \theta \, df$$

→ Berechnung von beliebigen
Lichtverteilungen möglich



Aus dem Huygens-Fresnel Prinzip kann die Lichtverteilung auch vor/nach der optimalen Bildebene berechnet werden (axiale Verteilung)



$$I(\bar{z}) \propto \sin^2(\bar{z})$$

Rayleighlänge

$$R_E = \frac{\lambda}{NA^2} \quad (4.5)$$

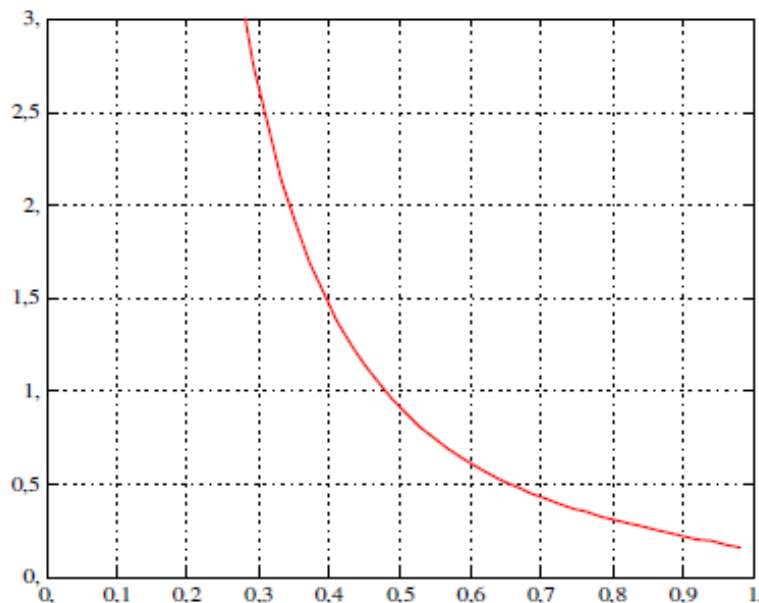
$\rightarrow$ Wellenoptische Schärfentiefe = $\pm 0.5 R_E$

Punktbild

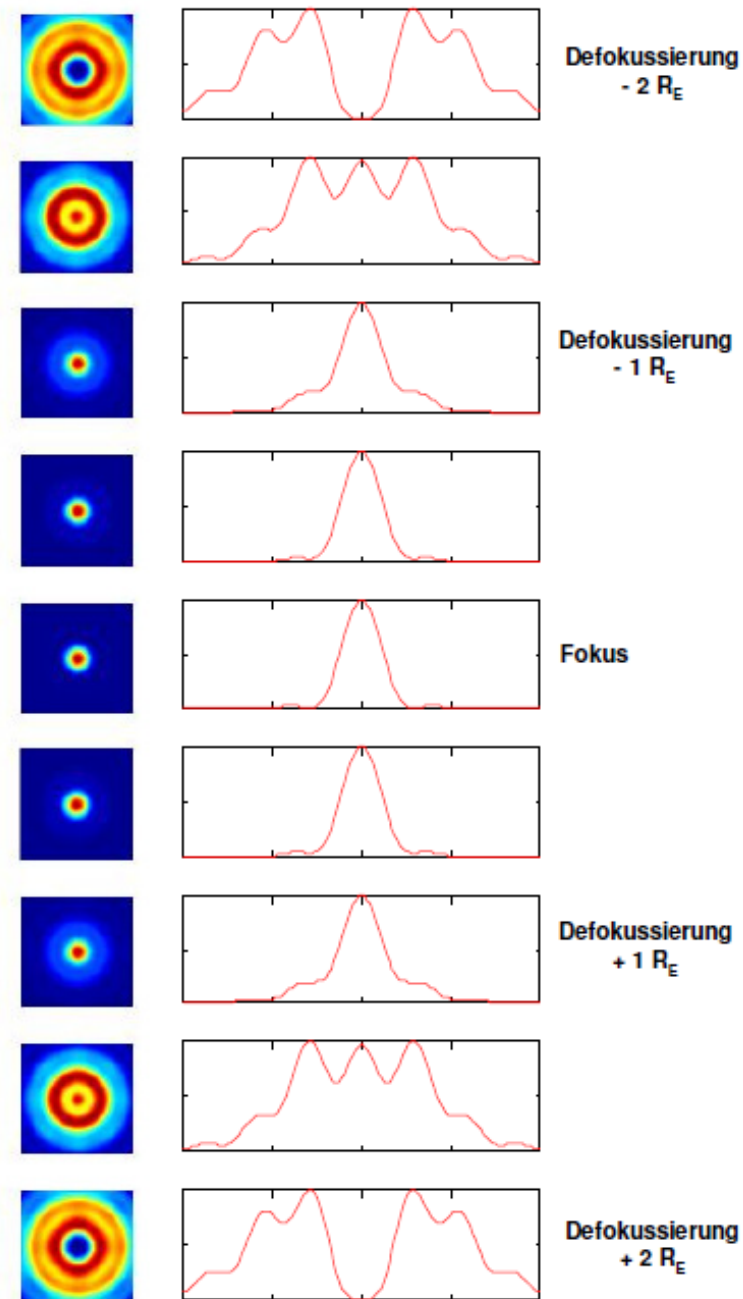
Psf bei Defokussierung

- Außerhalb des Fokus :
 - Psf verbreitert sich
 - es entsteht Ringsystem
- Schärfentiefe :
wächst mit abnehmender numerischer Apertur

Δz in μm

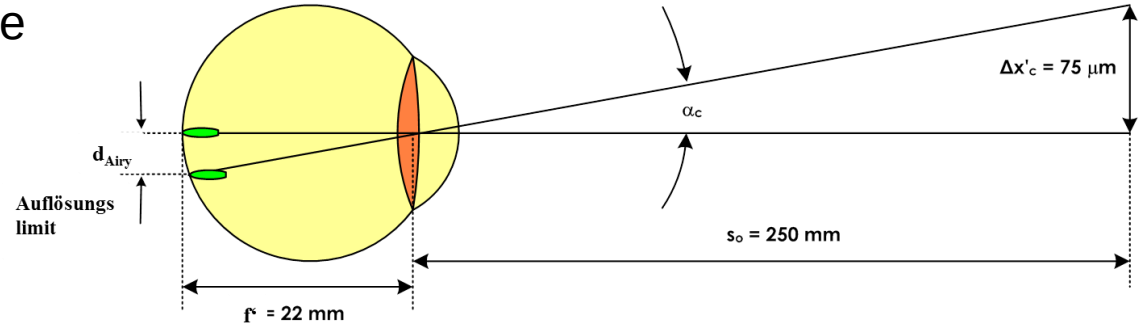


NA



Auge und Mikroskop

Bei der **visuelle Beobachtung** mit einem Mikroskop sind die **Eigenschaften des Auges** mit zu betrachten:



Winkelauflösung Auge

(folgt aus Airy-Scheibchen bei mittl. Pupillendurchmesser)

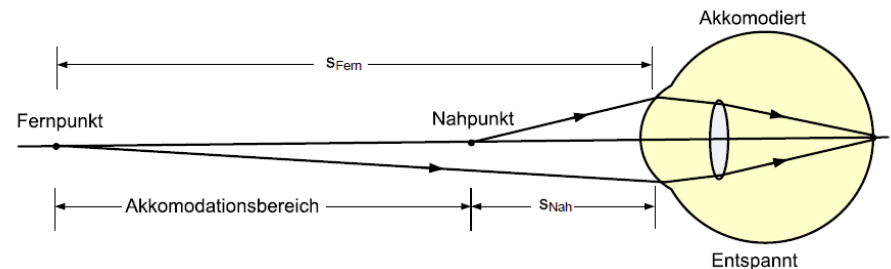
$$\alpha_c \approx 0.3 \text{ mrad} = 1'$$

(4.6)

Akkommodationsbreite Auge

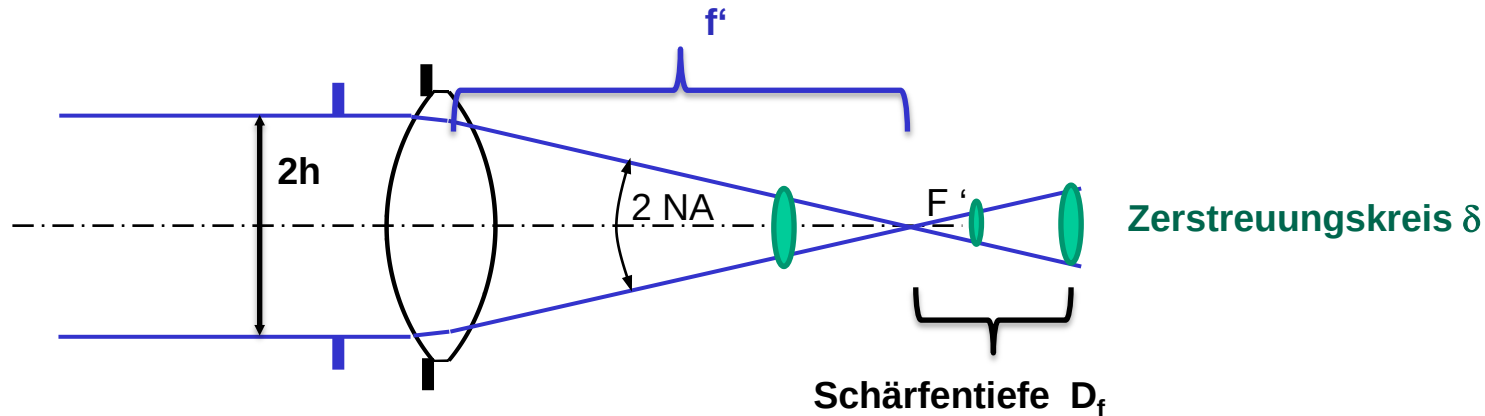
(Fokussierfähigkeit des Auges)

$$\Delta D_{akk}^{(Breite)} = \frac{1}{s_{fern}} - \frac{1}{s_{nah}}$$



Typische Werte: 1-10 dptr (Altersabhängig)

Schärfentiefe für visuelle Beobachtung



Für visuelle Beobachtung gilt
Näherungsweise:

Beugungsopt. Term

Geometrischer Term
Unschärfekreis 4.7' am Auge
(Empirischer Wert)

$$2D_f = \frac{0.5 \cdot \lambda}{NA^2} + \frac{\delta}{NA} + \text{Akkommodation}$$

$$2D_f = \frac{\lambda}{NA^2} + \frac{0.34mm}{NA \cdot \Gamma_{Mikro}} + \frac{(250mm)^2}{\Gamma_{Mikro}^2} \left(\frac{1}{s_{Fern}} - \frac{1}{s_{Nah}} \right) \quad (4.7)$$

Hilfsformeln:

$$\delta = f \cdot \Delta w = \frac{250mm \cdot 4.7'}{\Gamma_{Mikro}} = \frac{0.34mm}{\Gamma_{Mikro}} \quad \Gamma_{OPMI} = \frac{250mm}{f_{OPMI}} \quad s' \approx f' - \frac{f'^2}{s} \quad \text{für } s \gg f'$$

Förderliche Vergrößerung

→ Winkelauflösung Mikroskop (Mikroskop = Lupe)

$$\Delta w = \frac{\Delta y}{f_{\text{Mikro}}} = \frac{0.61 \cdot \lambda}{NA \cdot f_{\text{Mikro}}} = \frac{0.61 \cdot \lambda}{NA \cdot 250\text{mm}} \cdot \Gamma \quad \text{mit} \quad \Gamma = \frac{250\text{mm}}{f_{\text{Mikro}}}$$

→ Förderliche Vergrößerung

Winkelaufkl. Instrument = (2x - 4x) Winkelaufkl. Auge

$$\Delta w = (2...4) \cdot \alpha_C$$

$$\frac{0.61 \cdot \lambda}{NA \cdot 250\text{mm}} \cdot \Gamma_{\text{Förd.}} = (2...4) \cdot \alpha_C$$

$$\Gamma_{\text{Förd.}} = (2...4) \cdot \frac{250\text{mm} \cdot \alpha_C}{\Delta y} = (2...4) \cdot \frac{250\text{mm} \cdot 0.0003}{0.61 \cdot \lambda} \cdot NA \approx 500...1000 \cdot NA$$

(4.8)

4. Mikroskope

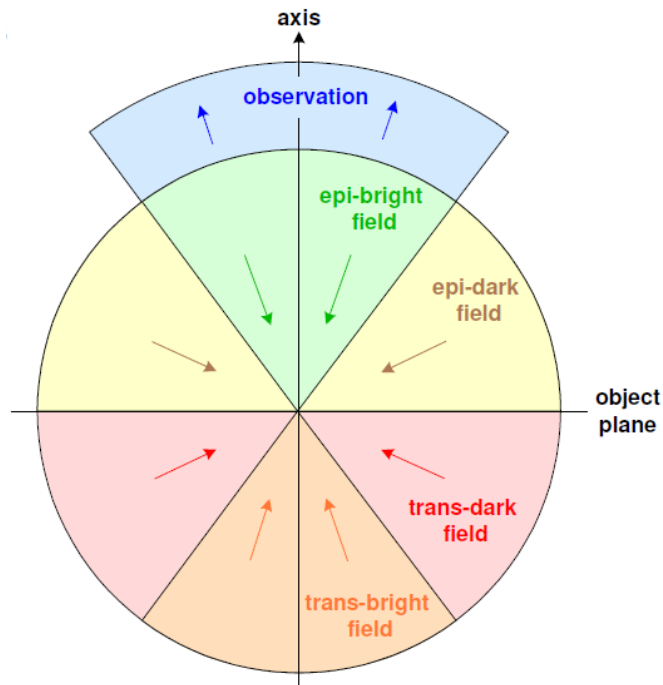
4.1 Historie & Aufbau

4.2 Abbildungsleistung

4.3 Beleuchtungsarten

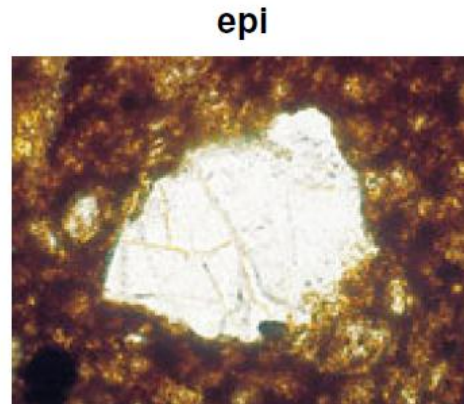
Beleuchtungsarten in der Mikroskopie

Die Art der Beleuchtung hat in der Mikroskopie einen wesentlichen Einfluss auf das Bild:

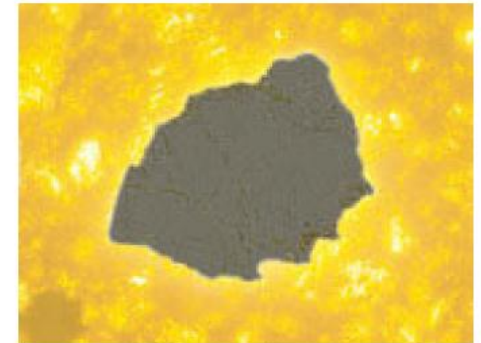


Bezeichnungen

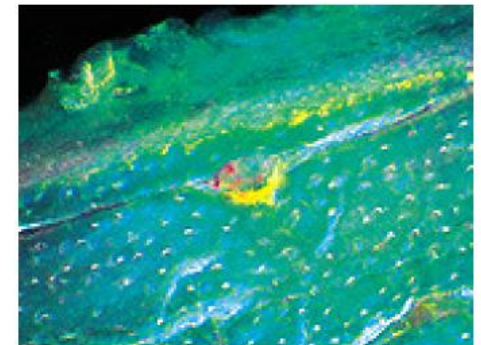
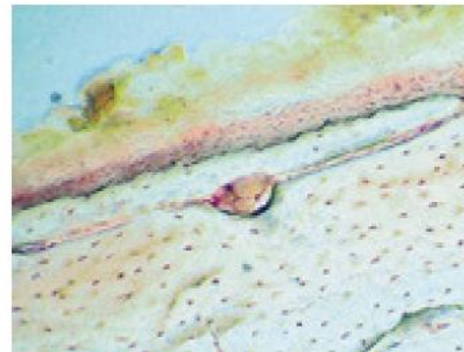
bright



trans



dark

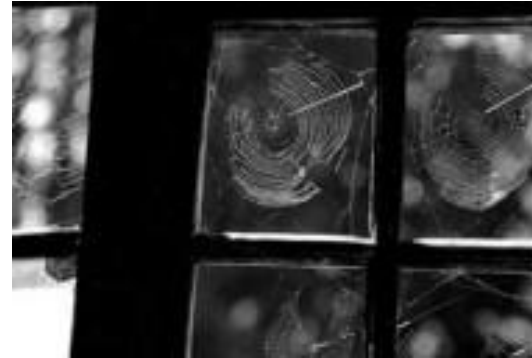


Bilder für versch. Beleuchtungsarten

Beispiel Dunkelfeld:



Spinnennetz im Gegenlicht



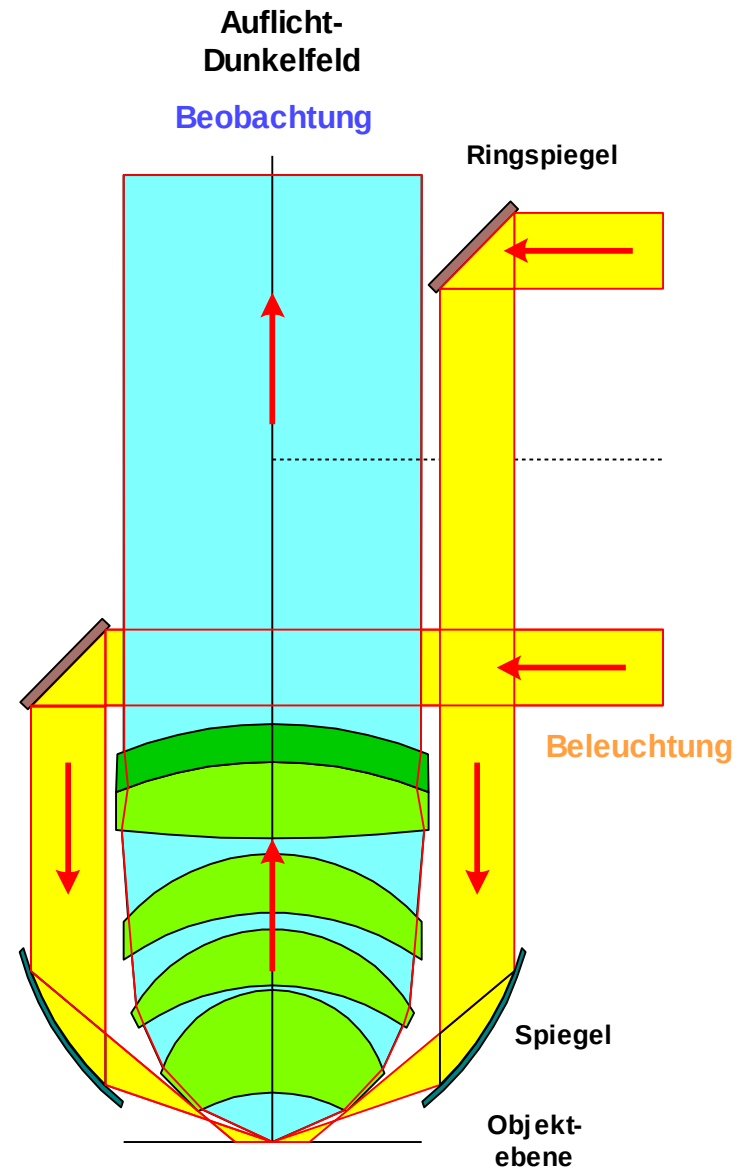
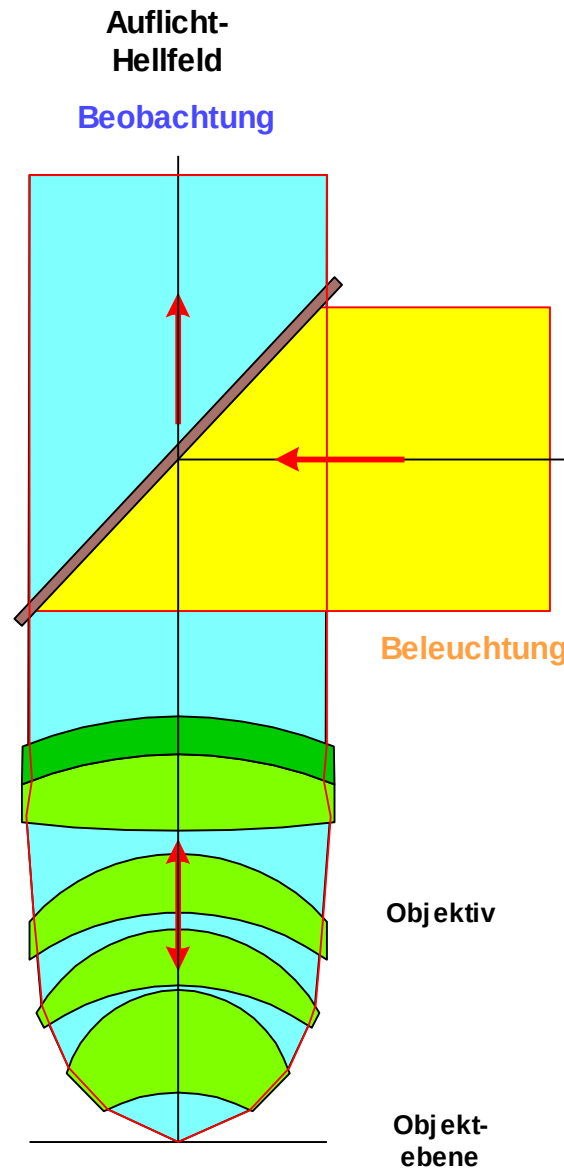
Spinnennetz im „Dunkelfeld“

Auflicht-Beleuchtung

Auflicht-
Beleuchtung:

1. Hellfeld

2. Dunkelfeld

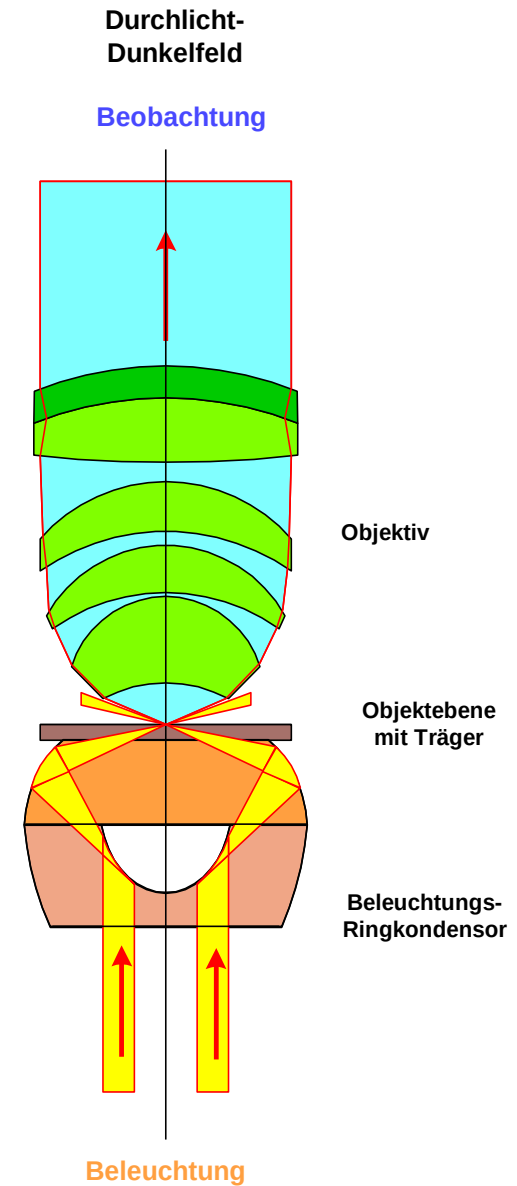
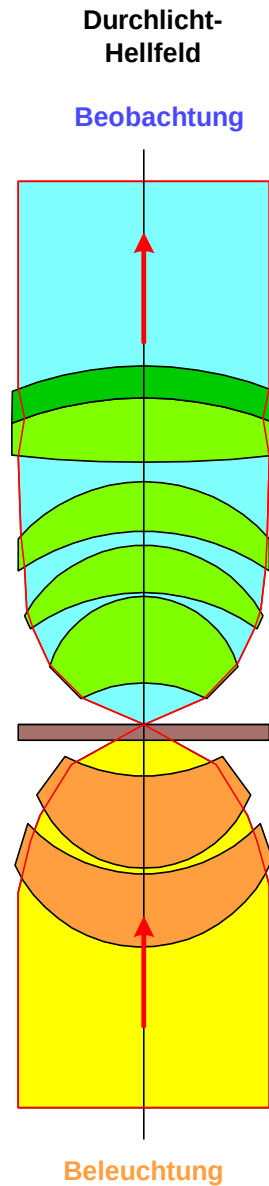


Durchlicht-Beleuchtung

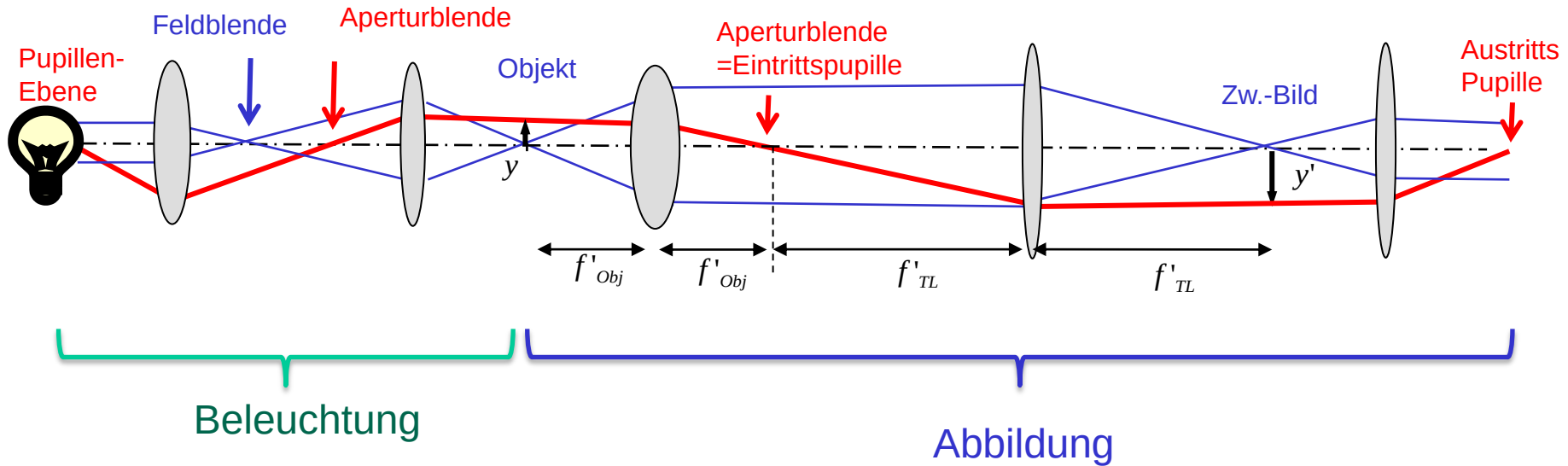
Durchlicht-
Beleuchtung:

1. Hellfeld

2. Dunkelfeld

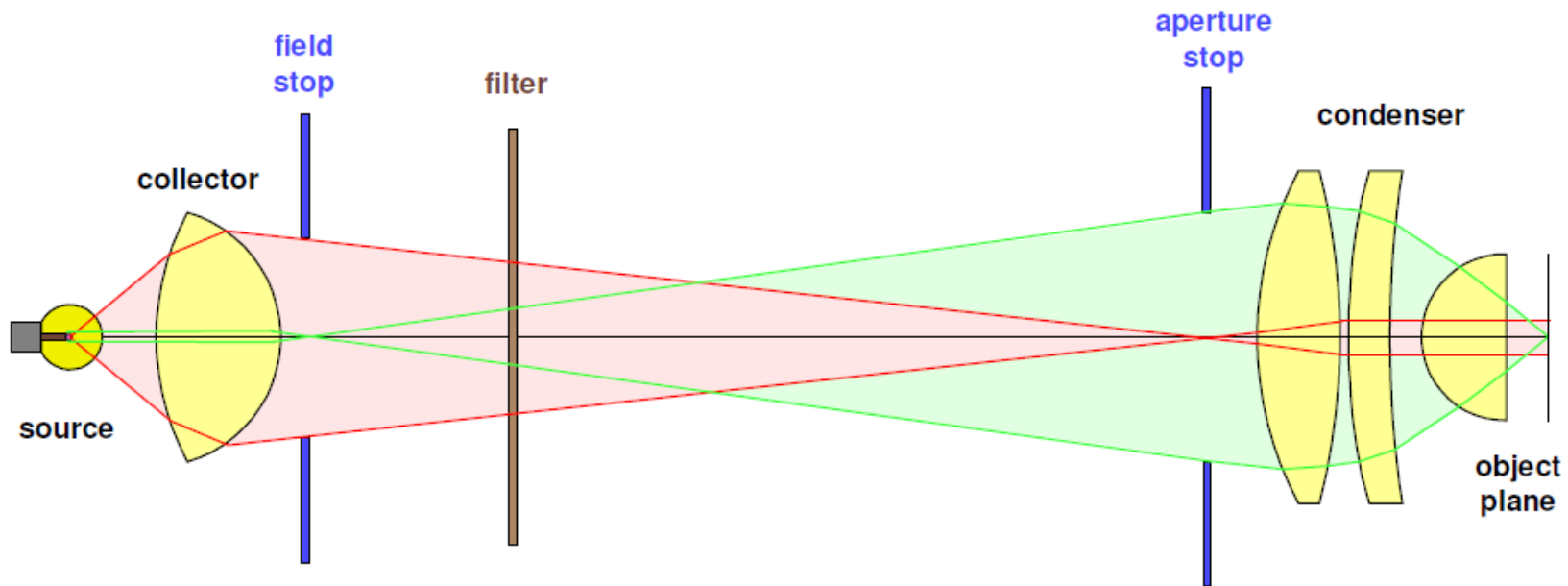


Feldblenden und Aperturblenden Beleuchtung



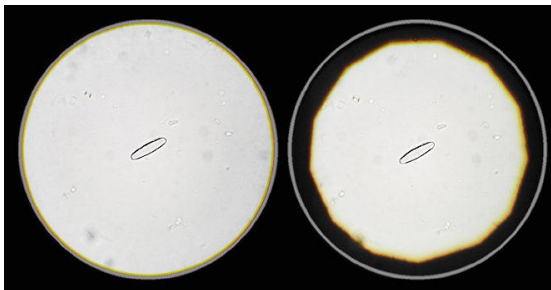
Konjugiert zu den Feld und Pupillenebenen im Abbildungsstrahlengang existieren (Leucht)-Feldblenden und Aperturblenden im Beleuchtungssystem.

Bei Köhler-Beleuchtung sitzt die Lichtquelle in einer Pupillenebene.



Leuchtfeldblende:

Definiert beleuchtetes Objektfeld
(Regel: nicht mehr als nötig- Streulicht)



<http://212.80.228.216/sites/f.schaefer/mikbel3.jpg>

Aperturblende Beleuchtung:

Definiert Beleuchtungs-Apertur
(siehe: Auflösungsvermögen)



Hier: z.B. Dunkelfeldblende

Die Lichtquelle (z.B. Glühlampe) wird durch das Beleuchtungssystem an eine andere Stelle im System Abgebildet.

Je nach Lage unterscheidet man:

- Köhlersche Beleuchtung (Abbildung in die Pupille)
- Kritische Beleuchtung (Abbildung in das Objektfeld)

