

Mikroskopie (Licht-)

1. Grundlagen (s. Bergmann/Schäfer Bd. III)
2. Phasenkontrastmikroskopie (s. Bergmann/Schäfer Bd. III)
3. Fluoreszenzmikroskopie
4. Instrumentierung
5. Einzelmolekülmikroskopie
6. Konfokale Mikroskopie
7. Nahfeldmikroskopie

1. Grundlagen

Notwendige Voraussetzungen, um ein Objekt im Lichtmikroskop zu sehen:

- 1) detektierbare Wechselwirkung mit Licht
(Absorption, Streuung, Beugung, Fluoreszenz)
- 2) Auflösung, Fähigkeit Objekt von umgebenden Objekten zu differenzieren
- 3) Sensitivität (Zeit, Signalstärke)
Bewegung < Zeit für Bildaufbau
Signal > $(1+1/3)$ Rauschen

Zweck: Objekt größer sehen:

- Position (z. B. Antikörper mit *Label*)
- Bewegung
- Form

Vergrößerung \Leftrightarrow Auflösung

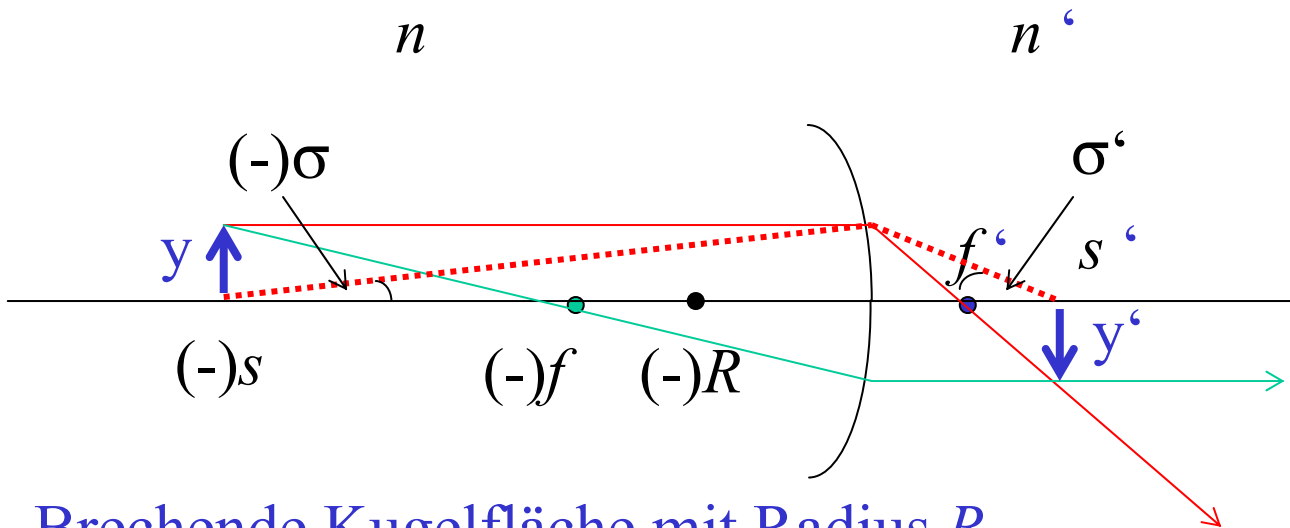
Man lege Objekt auf Kopierer und vergrößere 2 mal, wiederhole die Vergrößerung oft genug und sieht schließlich einzelne Atome?!

Förderliche Vergrößerung nur soweit, bis Beugungsscheibchen der Objektpunkte vom Auge bzw. von der empfindlichen Kameraschicht gerade noch aufgelöst werden.

Optische Vergrößerung (transversal)

An einer brechenden Kugelfläche gelten für paraxiale Strahlen die folgenden Formeln, aus denen viele in der Mikroskopie nützliche Gleichungen hergeleitet werden können.

Man beachte die dabei geltenden Vorzeichenregeln (Strecken mit Vorzeichen, nach rechts positiv, Ursprung im Scheitelpunkt der Kugelfläche, etc.)



Brechende Kugelfläche mit Radius R

$$\Phi = \frac{n' - n}{R} = \frac{n'}{s'} - \frac{n}{s}$$

Brechkraft

$$f' = \frac{n'}{\Phi} = \frac{n'}{n' - n} R$$

bildseitige Brennweite

$$f = -\frac{n}{\Phi} = -\frac{n}{n'} f'$$

objektseitige Brennweite

$$n \left(\frac{1}{R} - \frac{1}{s} \right) = n' \left(\frac{1}{R} - \frac{1}{s'} \right)$$

Abbe-Invariante

$$ny\sigma = n'y'\sigma'$$

Helmholtz-Lagrange-Invariante

$$\frac{f'}{s'} + \frac{f}{s} = 1$$

Abbildungsgleichung

$$M \equiv \frac{y'}{y} = \frac{n}{n'} \frac{s'}{s}$$

Abbildungsmaßstab/
Vergrößerung

Bezieht man die Lage des Objekts auf den objektseitigen Brennpunkt F , d.h.

$$s = f + x$$

und die Lage des Bildes auf den bildseitigen Brennpunkt F' , d. h.

$$s' = f' + s',$$

dann erhält man die Newton'sche Abbildungsgleichung

$$f \cdot f' = x \cdot x'$$

und den Abbildungsmaßstab

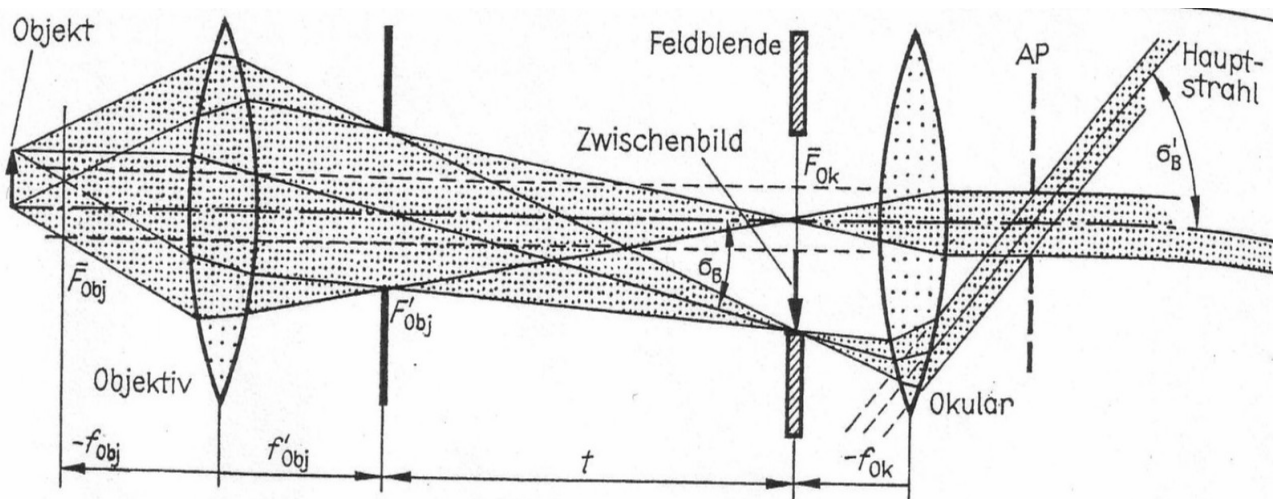
$$M = \frac{ns'}{n's} = -\frac{x'}{f'} = -\frac{f}{x}$$

Die Bildweite kann als Produkt von Abbildungsmaßstab, Brechzahlverhältnis und Gegenstandsweite dargestellt werden:

$$s' = -\frac{f}{x} \cdot \frac{n'}{n} \cdot s$$

Vergrößerung Mikroskop

Abbildung mit zwei Sammellinsen.



Strahlengang im Mikroskop

Mit dem Objektiv wird ein reelles Zwischenbild erzeugt, das mit dem Okular (oder einem Projektiv) nachvergrößert wird.

Okulare dienen der visuellen Beobachtung.

Das virtuelle Bild liegt im Unendlichen (Normalvergrößerung) oder in der deutlichen Sehweite ($s_d = 25 \text{ cm}$). Häufig verwendet werden Okulare mit 10- bzw. 20-facher Vergrößerung.

Projektive erzeugen reelle Endbilder. Sie werden für Mikrofotografie (CCD-Kamera) eingesetzt. Die Güte eines Mikroskops wird wesentlich durch die Mikroskopobjektive bestimmt. In der Regel gehören mehrere Objektive zum Mikroskop, deren Abbildungsmaßstäbe (z. B. 5x, 10x, 20x, 40x, 60x, 100x) und numerische Aperturen abgestuft sind. Die resultierende Brennweite f'_M eines Mikroskops (bestehend aus den beiden Linsensystemen mit den Brennweiten f'_{Obj} und f'_{Ok}) beträgt

$$f'_M = \frac{f'_{\text{Obj}} \cdot f'_{\text{Ok}}}{\Delta}$$

mit der Tubuslänge Δ (Abstand zwischen den beiden Brennpunkten von Objektiv und Okular, in der Abb. mit t bezeichnet).

Bei Beobachtung mit nichtakkommodiertem Auge ergibt sich als Normalvergrößerung des Mikroskops

$$V = \frac{\beta}{\alpha} = \frac{250 \text{ mm}}{f'_{\text{M}}} = \frac{250 \text{ mm}}{f'_{\text{Ok}}} \cdot \frac{\Delta}{f'_{\text{Obj}}}$$

Sie ist das Produkt aus der Vergrößerung des Okulars und dem Abbildungsmaßstab des Objektivs.

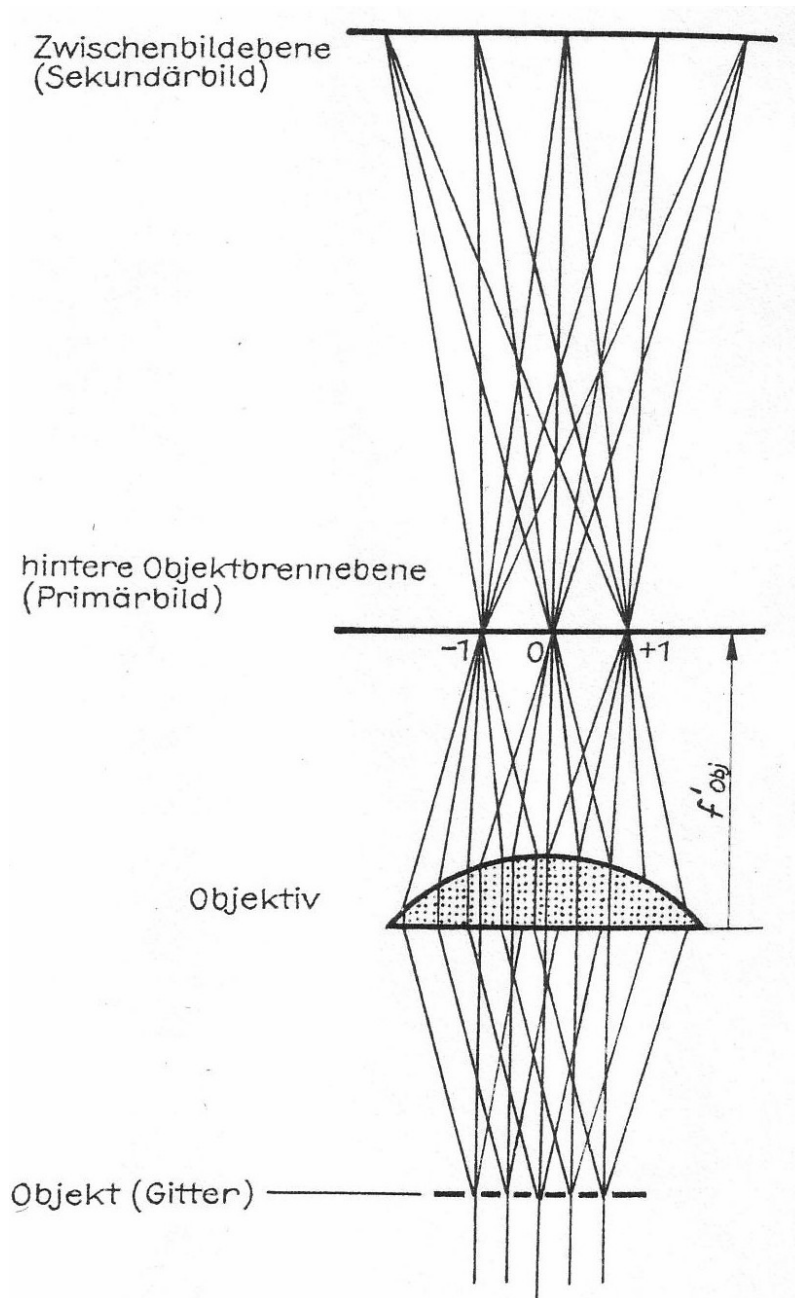
α ist der Winkel, unter denen das Objekt in der deutlichen Sehweite dem Auge erscheint und β ist der Winkel, unter dem die im Unendlichen liegende Abbildung des Objekts vom Auge gesehen wird.

Die Werte für V liegen im Bereich von 50 ... 2000. Die im konkreten Fall noch sinnvolle

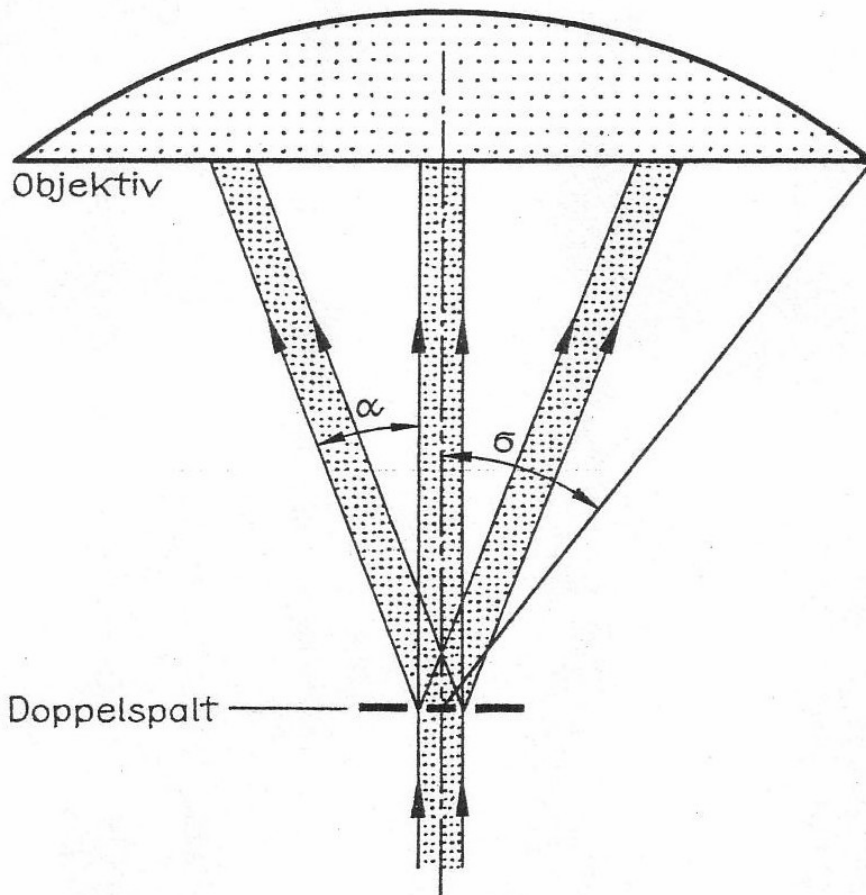
Vergrößerung hängt von der Auflösungsgrenze des Mikroskops ab.

Auflösungsvermögen

Nach Abbe (1873) müssen zum genaueren Verständnis der Bildentstehung im Mikroskop die Beugungs- und Interferenzeffekte des Lichts betrachtet werden.



Ein Objekt, das aus zwei dicht benachbarten Gitterspalten im Abstand d_{\min} besteht, wird dann noch aufgelöst, wenn mindestens die ersten Beugungsordnungen ($m = +1, 0, -1$) in das Objektiv gelangen:



Begrenzung des Auflösungsvermögens durch die numerische Apertur

Die **numerische Apertur**

$$A_{\text{Obj}} = n \sin \sigma$$

muss dazu größer oder mindestens gleich dem Sinus des Beugungswinkels α des ersten Nebenmaximums sein:

$$A_{\text{Obj}} = n \sin \sigma \geq \sin \alpha = \frac{\lambda}{d_{\text{min}}}$$

n ist die Brechzahl des Mediums zwischen Objekt und Objektiv. Der kleinste auflösbare Abstand beträgt daraus

$$d_{\text{min}} \geq \frac{\lambda}{A_{\text{Obj}}}$$

Das entstandene Bild ist jedoch nicht objektreu.

Trockensysteme (Luft zwischen Objekt und Objektiv, $n = 1$) haben eine maximale numerische Apertur $A_{\text{Obj}} = 0.95$, entsprechend einem (halben) Öffnungswinkel $\sigma \approx 72^\circ$.

Durch Übergang zu **Immersionsobjektiven**, bei denen sich eine Immersionsflüssigkeit zwischen Objekt und Objektiv befindet, kann die numerische Apertur und damit das Auflösungsvermögen des Mikroskops vergrößert werden.

Immersionsflüssigkeiten sind z. B.

Wasser ($n = 1,33$)

Glyzerin-Wasser ($n = 1,45$)

Zedernholzöl ($n = 1,52$) (Vorsicht, Verharzung!).

Die numerische Apertur läßt sich bei Verwendung entsprechender Immersionsflüssigkeiten auf Werte bis zu etwa $A_{\text{Obj}} \approx 1,6$ steigern, was im blauen Licht $\lambda = 480 \text{ nm}$ der Auflösung eines minimalen Abstands von

$$d_{\text{min}} = \frac{\lambda}{A_{\text{Obj}}} = \frac{480 \text{ nm}}{1,6} = 300 \text{ nm} \quad \text{entspricht.}$$

Zur optimalen Ausnutzung des Mikroskops müssen die u.U. verwendeten Deckgläschen auf das Objektiv abgestimmt (Brechzahl, Dicke) sein.

Geschichte der Mikroskopie:

- Zeitpunkt und Urheberschaft umstritten
- 1538 G. Fracastero, Prinzip erwähnt
- 1590 Hans u. Zacharias Janssen, Instrument
- 17. Jh. A. van Leeuwenhoek
- 1869 Ernst Abbe, Theorie mikr. Abb., Ölimmersion

2. Phasenkontrastmikroskopie

Problem:

- Normale Mikroskope detektieren Amplitudenobjekte, d. h. Objekte, die z. T. Licht absorbieren („Schattenwurf“)
- Biologische Zellen sind weitgehend transparent (80% Wasser) und daher schlecht im Mikroskop sichtbar.

Bis 1932 wurden biologische Proben zum Mikroskopieren angefärbt. Die Farbstoffe schädigen häufig das Präparat. Einen Ausweg fand F. Zernike 1932 durch die Entwicklung des Phasenkontrastmikroskops. Für diese Leistung erhielt er 1953 den Nobelpreis für Physik.

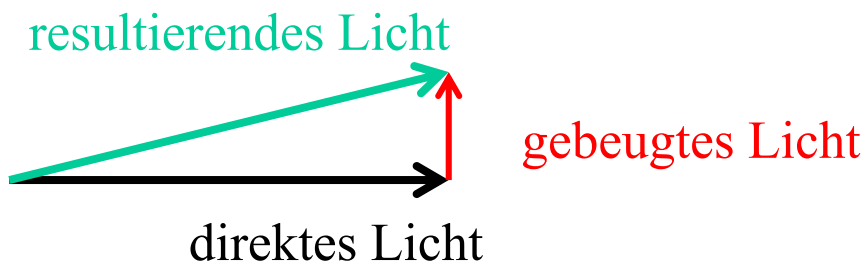
Idee zum Phasenkontrast

Erzeuge durch Eingriff in das primäre Bild des Phasenobjekts (in der bildseitigen Brennebene des Objektivs) solche Amplituden- und Phasenverhältnisse, wie sie bei einem Amplitudenpräparat auftreten.

Ein **„Amplitudenobjekt“** absorbiert einen Teil des auf ihn fallenden Lichts. Wird nur die nullte Beugungsordnung im Mikroskop durchgelassen, wird die Zwischenbildebene gleichmäßig beleuchtet. Werden alle Beugungsordnungen durchgelassen, dann interferieren diese in der Zwischenbildebene mit der nullten Beugungsordnung, wobei beim Bild des Amplitudenobjekts die Helligkeit abnimmt. Das Licht der höheren Beugungsordnungen des Amplitudenobjekts besitzt also eine Phase, die um 180°

gegenüber der Phase des Lichts der nullten Beugungsordnung verschoben ist.

Bei einem reinen **Phasenobjekt** wird kein Licht absorbiert, es ergeben sich in der Zwischenbildebene kaum Helligkeitsunterschiede beim Bild des Objekts im Vergleich zur Umgebung. Der Einfluss des Objekts auf das durchgehende Licht besteht in einer (geringen) Verschiebung der Phase bei gleicher Amplitude. Dies kann man so interpretieren, dass das gebeugte Licht (die höheren Beugungsordnungen) eine um etwa 90° gegenüber der Phase des direkten Lichts (nullte Beugungsordnung) verschobene Phase besitzt (Vektordarstellung).

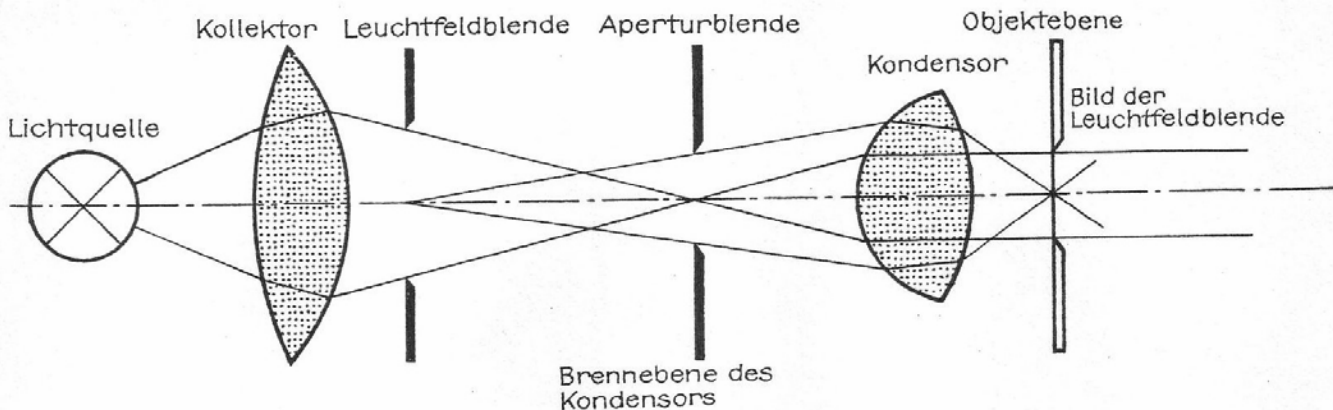


Wenn man also die Phase des direkten Lichts um 90° dreht, und dabei das gebeugte Licht unverändert lässt, dann liegen die Lichtvektoren des direkten und des gebeugten Lichts parallel oder antiparallel zueinander und man hat die gleichen Verhältnisse wie bei Amplitudenobjekten.

Die praktische Umsetzung dieser Idee erfolgt im Phasenkontrastmikroskop durch folgende Anordnung:

Die Objektbeleuchtung erfolgt über eine ringförmige Aperturblende in der vorderen Brennebene des Kondensors

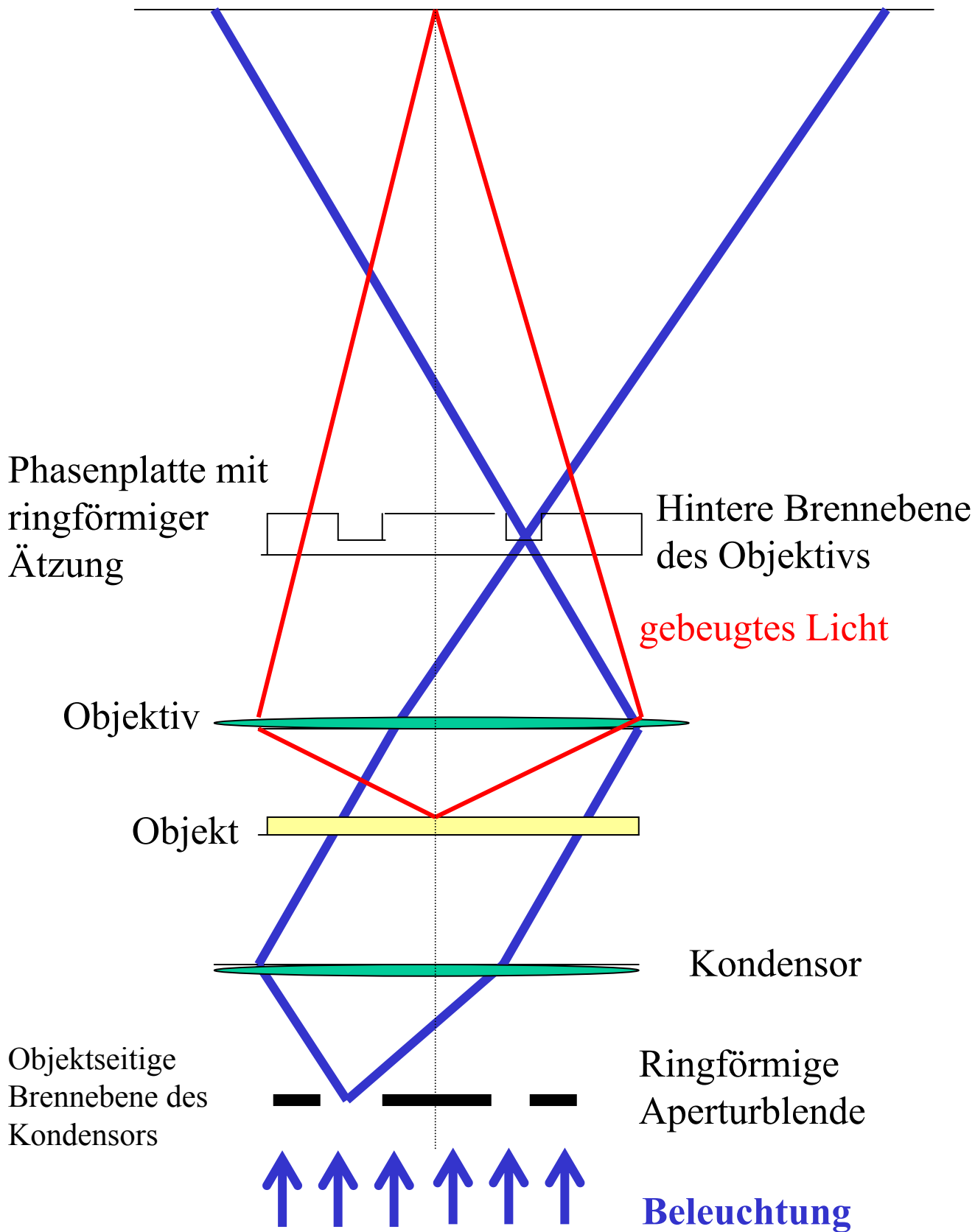
Köhlersches Beleuchtungsprinzip



Dieses Licht durchstrahlt die Probe in Parallellichtbündeln und das Mikroskopobjektiv formt in seiner hinteren Brennebene aus diesem direkten Licht das ringförmige Bild der Aperturblende. In der hinteren Brennebene des Objektivs befindet sich eine planparallele Platte (Phasenplatte), in die eine ringförmige Vertiefung dort eingätzt wurde, wo sich die Abbildung der Aperturblende befindet. Das direkte Licht wird durch diese Anordnung um 90° phasenverschoben.

Das an einem Punkt des Objekts gestreute Licht füllt die gesamte hintere Brennebene des Objektivs aus und wird in der Zwischenbildebene fokussiert, wo es mit dem direkten Licht wegen dessen Phasenverschiebung wie bei einem Amplitudenobjekt interferiert.

Zwischenbildebene



Weitere Durchlichttechniken

- **Dunkelfeldmikroskopie**

Ausblendung des direkten Lichtbündels mittels spezieller Dunkelfeldkondensoren bzw. einer Zentralblende in einem normalen Hellfeldkondensator. Man detektiert nur das von der Probe gebeugte/gestreute Licht

- **Differentieller Interferenzkontrast**

(Hoffmann, Nomarski)

Linear polarisiertes Beleuchtungslicht wird in zwei nahe beieinander liegende senkrecht zueinander linear polarisierte Wellen aufgespalten (1. Wollaston-Prisma), die das Objekt durchlaufen.

Ein zweites Wollaston-Prisma vereinigt die beiden Wellen wieder und bringt sie zur Interferenz.

Dabei wird der Unterschied in der Phase der beiden in der Probe differentiell versetzten Teilwellen detektiert. Dieser Phasenunterschied kommt durch die unterschiedlichen optischen Weglängen nd der versetzten Teilstrahlen in der Probe zustande.

- **Polarisationsmikroskopie** (→Oldenbourg)

Optisch anisotrope mikroskopische Präparate werden mit linear polarisiertem Licht beobachtet (Polarisatoren sowohl im Beleuchtungssystem als auch hinter dem Objektiv).

- **Reflexionsinterferenzkontrast** (Rädler/Sackmann)
(keine Durchlichttechnik, kommt aber ohne Label aus)
Es können damit z.B. Interferenzstreifen gleicher Dicke
(ähnlich Newton'schen Ringen) beobachtet werden, die von
Vesikeln in der Nähe einer Glasoberfläche herrühren.