

Ćwiczenie nr 4 Podstawowe konfiguracje mikroskopu optycznego

CEL ĆWICZENIA:

- zapoznanie z budową i obsługą mikroskopu optycznego pracującego w trybie transmisyjnym,
- pomiar apertury numerycznej mikroskopu,
- określenie wpływu długości fali stosowanego oświetlenia na zdolność rozdzielczą,
- określenie jego zdolności rozdzielczej oraz powiększenia,
- przygotowanie oraz obserwacja preparatów mikroskopowych.

1. WPROWADZENIE TEORETYCZNE

Mikroskopy optyczne są instrumentami optycznym, które tworzą powiększone obrazy bliskich przedmiotów [1, 2, 3]. Każdy optyczny układ mikroskopowy składa się z następujących elementów:

- układu oświetlacza wraz ze źródłem światła,
- obiektywu,
- okularu,
- detektora, którym może być oko (mikroskopy wizualne) lub kamera cyfrowa (mikroskopy cyfrowe),
- stolika przedmiotowego z poprzeczną i osiową regulacją położenia,
- zestawu filtrów spektralnych do poprawy jakości rejestrowanych obrazów.

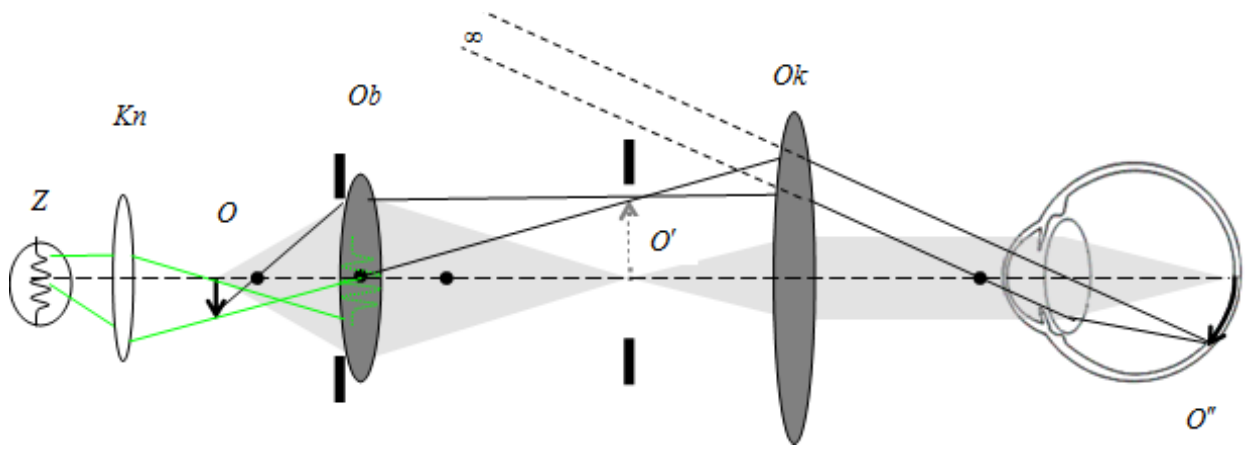
Obiektyw odpowiedzialny jest za utworzenie rzeczywistego, odwróconego obrazu pośredniego badanego obiektu w przedmiotowej płaszczyźnie ogniskowej okularu, który dla okularu staje się przedmiotem i będzie dalej odwzorowywany. Z kolei okular działa jak lupa i jest odpowiedzialny za odwzorowanie obrazu pośredniego obiektu i utworzeniu jego powiększonego, odwróconego obrazu końcowego w płaszczyźnie detekcji. Przesłona

aperturowa, która w zasadzie pokrywa się z oprawą obiektywu wpływa na wartość apertury numerycznej mikroskopu, a tym samym na jego zdolność rozdzielczą. Z kolei przesłona polowa, zlokalizowana w przedmiotowej płaszczyźnie ogniskowej okularu, ogranicza pole widzenia mikroskopu. Powyższe stwierdzenia, odnośnie przesłony aperturowej oraz polowej, są słuszne, lecz nie uwzględniają rodzaju zastosowanego oświetlacza. W zależności od konstrukcji oświetlacza możemy regulować zarówno aperturę numeryczną, jak i pole widzenia mikroskopu, bezpośrednio poprzez zmianę średnicy przesłon oświetlacza, co zostanie pokazane w dalszej części wprowadzenia.

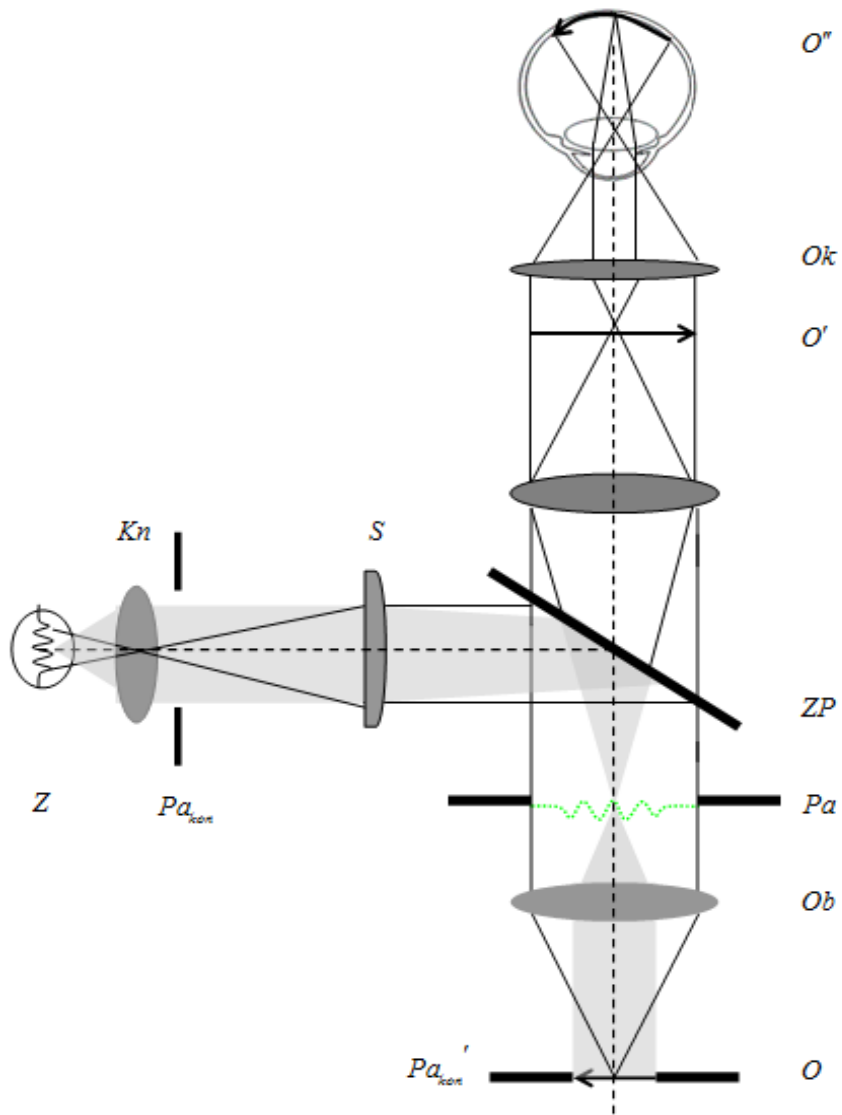
Omawiane instrumenty optyczne są wykorzystywane do inspekcji/ obrazowania bliskich obiektów o niewielkich rozmiarach, których nie jesteśmy w stanie zaobserwować wizualnie, nieuzbrojonym okiem. W zależności od właściwości amplitudowo – fazowych badanych obiektów stosuje się różne konfiguracje mikroskopów optycznych uwzględniające lokalizację oświetlacza (umożliwiająca obrazowanie w świetle odbitym lub/i przechodzącym), zastosowanie dodatkowych elementów przekształcających w odpowiedni sposób wiązkę oświetlającą przedmiot (np. w mikroskopie ciemnego pola), użycie filtrów spektralnych lub zwierciadeł dichroicznych (np. w mikroskopie fluorescencyjnym), zestawu przesłon pierścieniowych (np. w mikroskopii kontrastu fazowego), lub też przesłon typu pinhol (np. w mikroskopie konfokalnym).

W zależności od przezroczystości badanych próbek, czyli innymi słowy od ich właściwości transmisyjnych, wyróżnić możemy dwie podstawowe konfiguracje mikroskopów optycznych:

- transmisyjną (patrz Rys. 1a), w której obiektyw mikroskopu odwzorowuje obiekt w świetle przez niego przechodzącym. Oznacza to, iż w tym przypadku oświetlacz oraz obiektyw znajdują się po przeciwnych stronach badanego obiektu.
- odbiciową (patrz Rys. 1b), w której oświetlacz umieszczony jest zazwyczaj za obiektywem, lub też w jego pobliżu tak, iż obiekt jest oświetlony od strony obiektywu. W tym przypadku badany przedmiot jest odwzorowywany z wykorzystaniem światła odbitego. Zazwyczaj wykorzystuje się w tym celu zwierciadło półprzepuszczalne ZP, które umożliwia wprowadzenie wiązki oświetlającej przedmiot bezpośrednio do tubusa mikroskopu w taki sposób, iż obiekt jest oświetlany bezpośrednio przez obiektyw mikroskopu.



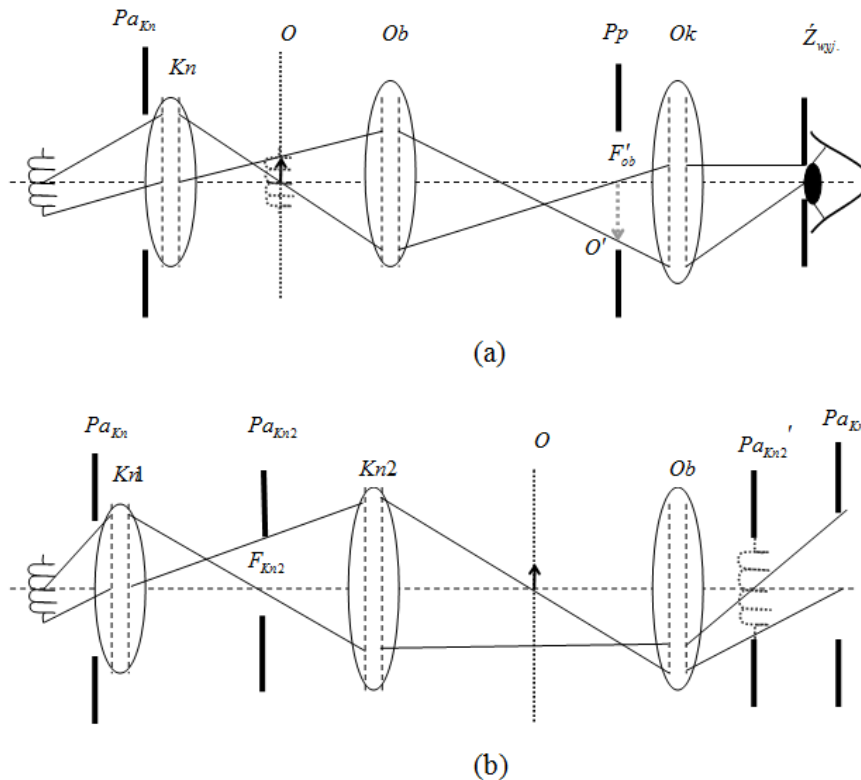
(a)



(b)

Rys. 1 Schemat układu mikroskopowego: (a) transmisyjnego (pracującego w świetle przechodzącym),
(b) odbiciowego (pracującego w świetle odbitym).

W obu przedstawionych na powyższym rysunku konfiguracjach mikroskopu zastosowano ten sam rodzaj oświetlacza Köhlera, który tworzy obraz źródła oświetlającego w płaszczyźnie przesłony aperturowej (źrenicy wejściowej) obiektywu. W ogólnym przypadku, w układach mikroskopowych stosowane są dwa podstawowe typy układów oświetlacza: oświetlacz krytyczny oraz oświetlacz Köhlera [3] (patrz Rys. 2).



Rys. 2 Przykładowy bieg promieni w mikroskopie transmisyjnym z: (a) oświetlaczem krytycznym, (b) oświetlaczem Köhlera.

W przypadku oświetlacza krytycznego (patrz Rys. 2a) obraz źródła światła jest odwzorowany przez kondensor w płaszczyźnie przedmiotowej. Jego zastosowanie umożliwia regulację przesłony aperturowej mikroskopu poprzez zmianę apertury kondensora Pa_{Kn} wchodzącego w skład układu oświetlacza. Przysłona polowa Pp ogranicza pole widzenia mikroskopu. Źrenica wyjściowa pokrywa się z źrenicą oka obserwatora. W celu równomiernego oświetlenia badanego przedmiotu w całym polu widzenia, wykorzystywane źródło światła powinno być rozciągnięte i mieć stałą luminancję na całej powierzchni [3]. Z uwagi na trudności związane z realizacją tych wymogów, obecnie w praktyce stosuje się drugi rodzaj układu oświetlającego- oświetlacz Köhlera (patrz Rys. 2b). W tym przypadku źródło światła odwzorowane jest za pomocą kondensora $Kn1$ w płaszczyźnie przysłony aperturowej Pa_{Kn2} kondensora $Kn2$ znajdującej się w jego płaszczyźnie ogniskowej, a następnie w płaszczyźnie przesłony aperturowej obiektywu Pa_{ob} . W płaszczyźnie przedmiotowej powstaje obraz

przesłony kondensora, która ogranicza powierzchnię oświetlonego obiektu. Przedmiot jest oświetlany przez szereg równoległych wiązek, których źródłami są punkty przestrzeni ograniczone przez przesłonę Pa_{Kn2} dlatego też umożliwia jednorodne oświetlenie badanego przedmiotu. Regulację rozmiaru apertury mikroskopu możemy uzyskać poprzez zmianę średnicy przysłony aperturowej Pa_{Kn2} kondensora $Kn2$. Z kolei pole widzenia możemy regulować poprzez zmianę średnicy przysłony Pa_{Kn1} . Widzimy zatem, iż w przypadku zastosowania oświetlacza Köhlera w układzie mikroskopowym, wielkość jego apertury oraz pola widzenia jest zdeterminowana przez oświetlacz.

W celu uzyskania prawidłowego oświetlenia za pomocą oświetlacza Köhlera należy znaleźć ostry obraz preparatu i odwzorować obraz przysłony polowej w płaszczyźnie preparatu. Użycie tego rodzaju oświetlacza umożliwia eliminację światła rozproszonego na niejednorodnościach preparatu zlokalizowanych poza polem widzenia mikroskopu. Za płaszczyznę preparatu uważamy takie położenie stolika mikroskopowego wraz z preparatem względem osi optycznej mikroskopu, dla którego uzyskujemy ostry obraz badanego preparatu. W celu sprawdzenia czy obraz przysłony polowej jest prawidłowo odwzorowany w płaszczyźnie preparatu, należy zmniejszyć średnicę przysłony tak, aby w obrazie mikroskopowym widoczne były jej krawędzie. Prawidłowe wyjustowanie układu mikroskopowego będzie miało miejsce, gdy obraz przysłony polowej jest ostro odwzorowany na tle ostrego obrazu preparatu [4].

W starszych konstrukcjach oświetlaczy mikroskopowych w celu oświetlenia przedmiotu w świetle przechodzącym stosowano zazwyczaj zwierciadła płaskie lub wklęsłe, które kierowały na preparat światło z źródła zewnętrznego. Wielkość oraz położenie obrazu tego źródła światła, jak również kąt aperturowy, w takich układach były niezdefiniowane, więc obraz w mikroskopie był niejednorodnie oświetlony. Dlatego też w dalszych konstrukcjach zdecydowano się na zastosowanie układów oświetlających zawierających zwierciadła płaskie oraz kondensory soczewkowe.

Mikroskopy są instrumentami silnie powiększającymi odwzorowywane obiekty. Powiększenie poprzeczne mikroskopu P w bezpośredni sposób zależy od powiększenia poprzecznego obiektywu P_{Ob} i powiększenia poprzecznego okularu P_{Ok} :

$$P = P_{Ob} P_{Ok} .$$

Powiększenia poprzeczne wyżej wymienionych elementów optycznych wchodzących w skład układu optycznego mikroskopu możemy wrazić w następujący sposób:

$$P_{Ob} = -\frac{L}{f'_{Ob}}$$

oraz

$$P_{Ok} = -\frac{D}{f'_{Ok}},$$

gdzie poszczególne wielkości oznaczają:

L – długość optyczna tubusu mikroskopu, w mm (odległość pomiędzy ogniskiem obrazowym obiektywu a ogniskiem przedmiotowym okularu),

D – odległość najlepszego widzenia (250 mm),

f'_{Ob} – obrazowa odległość ogniskowa obiektywu,

f'_{Ok} – obrazowa odległość ogniskowa okularu.

Znaki minus w powyższych wzorach oznaczają, że zarówno obiektyw, jak i okular, tworzą obrazy odwrócone w stosunku do odwzorowywanego przedmiotu (obrazu).

W przypadku mikroskopów cyfrowych tzn. mikroskopów optycznych, w których rolę detektora pełni kamera cyfrowa, a powiększony obraz zostaje wyświetlony na monitorze, powiększenie poprzeczne jest określone w nieco odmienny sposób. W tego rodzaju mikroskopach nie występuje okular, a obiektyw ma za zadanie odwzorować pomniejszony obraz przedmioty na powierzchni matrycy kamery. Następnie za pomocą każdy piksel obrazu cyfrowego jest powiększany w zależności od rozdzielczości monitora wyświetlającego obraz. W tym przypadku, powiększenie poprzeczne cyfrowego mikroskopu optycznego określa ilokrotnie większy obraz przedmiotu zostanie wyświetlony na ekranie.

Jakość odwzorowania optycznego, podobnie jak wszystkich układów optycznych, w głównej mierze ograniczona jest przez efekty dyfrakcyjne. Określa ją zdolność rozdzielcza definiująca najmniejszą odległość pomiędzy dwoma punktami przedmiotowymi emitującymi światło (np. punktowymi źródłami światła), których obrazy uważane za rozdzielone. W przypadku mikroskopu możemy ją określić w następujący sposób:

$$d = \frac{\lambda}{2NA_{Ob}},$$

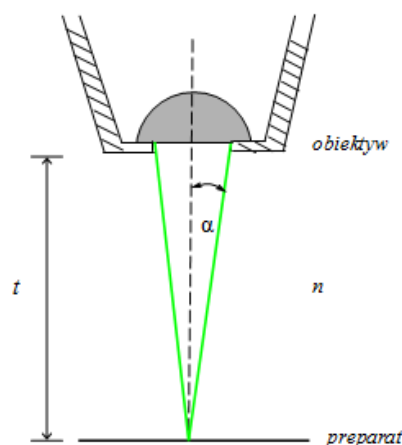
gdzie poszczególne wielkości oznaczają:

λ – długość fali światła stosowanego w obserwacji,

d – najmniejsza odległość pomiędzy dwoma obiektami przedmiotu, które w obrazie mikroskopowym mogą być jeszcze rozróżniane jako oddzielne,

NA_{ob} – apertura numeryczna obiektywu, charakteryzuje możliwość efektywnego wykorzystania obiektywu dla uzyskania obrazu o możliwie największej ilości szczegółów.

Powyzsze równanie może być stosowane jedynie w sytuacji, gdy apertury numeryczne obiektywu oraz kondensora (stanowiącego układ soczewkowy oświetlacza mikroskopowego) są sobie równe. W przypadku, gdy apertury tych elementów są różne, wówczas konieczna jest również uwzględnienie również apertury numerycznej kondensora. Jakość odwzorowania realizowanego przez mikroskop zależy bezpośrednio od długości fali stosowanego światła oraz apertury numerycznej obiektywu lub też apertury numerycznej obiektywu oraz kondensora. W celu zwiększenia zdolności rozdzielczej mikroskopu należy zmniejszyć długość fali światła lub też zwiększyć aperturę numeryczną obiektywu oraz kondensora. Z kolei, aby zwiększyć aperturę numeryczną obiektywu należy zwiększyć współczynnika załamania światła przestrzeni pomiędzy obiektywem a przedmiotem, np. poprzez użycie cieczy immersyjnej. W przypadku mikroskopów wizualnych zmiana długości fali światła stosowanego do oświetlenia preparatu, nie wpłynie znacząco na poprawę rozdzielczości, ponieważ będzie jej towarzyszyła również zmiana czułości oka, która drastycznie zmniejsza się dla fal krótkich.



Rys. 3 Apertura numeryczna obiektywu mikroskopowego.

Aperturę numeryczną obiektywu możemy wyznaczyć w następujący sposób

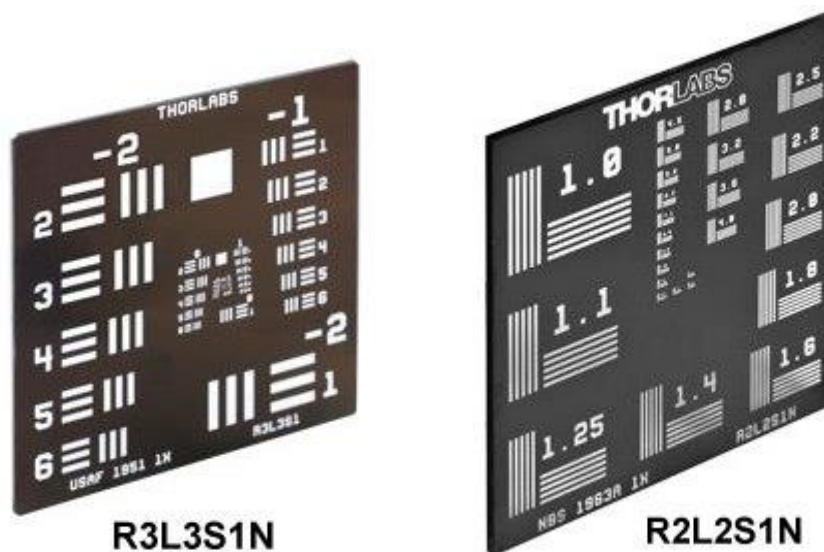
$$NA_{Ob} = n \sin \alpha$$

gdzie:

n – współczynnik załamania światła ośrodka w jakim umieszczony jest obiektyw (np. dla powietrza $n = 1$, dla oleju immersyjnego $n=1,5$)

α – kąt pomiędzy osią optyczną obiektywu a najbardziej skrajnym promieniem aperturowym wpadającym do obiektywu i jeszcze odwzorowywanym przez niego, po ugięciu światła na preparacie.

W praktyce laboratoryjnej do określenia zdolności rozdzielczej instrumentów optycznych stosuje się najczęściej specjalne testy (patrz Rys. 4), które pozwalają na bezpośrednie określenie rozdzielczości układu rozumianą jako ilość rozdzielnie widzianych linii przypadających na 1 mm płaszczyzny obrazowej lub też wartości częstości przestrzennej obrazów linii przypadających na 1 mm płaszczyzny obrazowej



Rys. 4 Przykładowe testy rozdzielczości: (a) zdolność rozdzielcza wyrażona jest w liczbie linii/mm (lines/mm); (b) zdolność rozdzielcza wyrażona w **największej częstości przestrzennej linii/ mm (cycles/mm)** [5]

W celu odczytania zdolności rozdzielczej na podstawie dostarczonych przez Prowadzącego testów należy skorzystać z informacji dostępnych na stronie www ich producenta:

http://www.thorlabs.de/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=4338

2. UKŁAD POMIAROWY

Zadaniem Studentów będzie samodzielna konstrukcja przykładowej konfiguracji mikroskopu optycznego pracującego w świetle przechodzącym (trybie transmisyjnym) z następujących elementów optomechanicznych udostępnionych przez Prowadzącego:

- aluminiowy, gwintowany blat optyczny
- skolimowany oświetlacz mikroskopowy LED (cold white) wraz ze sterownikiem i zasilaczem,
- skolimowany oświetlacz mikroskopowy LED (405 nm) wraz ze sterownikiem i zasilaczem,
- przysłona irysowa o średnicy 69 mm,
- pryzmat odbiciowy,
- dyfuzor o średnicy 25 mm generujący kołową wiązkę o jednorodnym rozkładzie natężenia,
- statyw na preparaty oraz testy,
- uchwyty oraz pręty mocujące,
- Kamera CCD (1280x1040 pikseli, rozmiar piksela: 4,65 μm) wraz z kablem USB i obiektywem

UWAGA: W czasie konstrukcji układu optycznego należy zachować szczególną ostrożność i nie dotykać bezpośrednio powierzchni elementów optycznych, które w bezpośredni sposób biorą udział w odwzorowaniu optycznym.

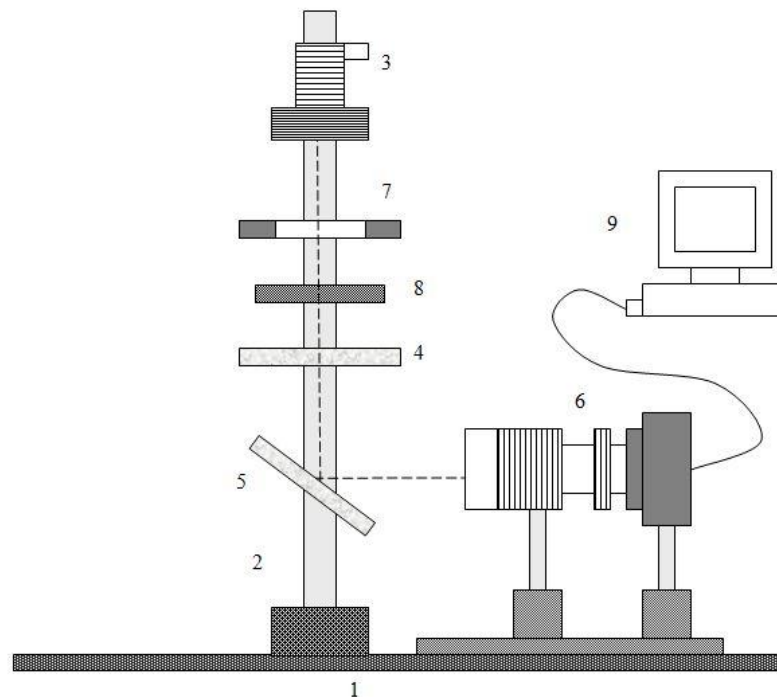
3. PRZEBIEG ĆWICZENIA

3.1. Samodzielna konstrukcja oraz wyjustowanie transmisyjnego układu mikroskopowego

Zgodnie z instrukcjami Prowadzącego oraz korzystając z dostępnych elementów optomechanicznych należy skonstruować posty układ optyczny mikroskopu pracujący w trybie transmisyjnym tzn. odwzorowującym obraz przedmiotu w świetle przez niego przechodzącym. Przykładowy schemat konfiguracji układu został przedstawiony

na Rys. 5. Układ należy skonstruować na aluminiowym gwintowanym blacie optycznym (1), w odpowiednim uchwycie mocującym (2) na blacie montujemy oświetlacz mikroskopowy (3) generujący skolimowaną wiązkę światła, który należy podłączyć do układu sterującego umożliwiającego regulację natężenia źródła światła. Z dostępnych elementów należy zmontować statyw mocujący dla badanych preparatów (4). W kolejnym mocowaniu należy zamocować pryzmat odbiciowy (5), która skieruje wiązkę przedmiotową bezpośrednio do obiektywu kamery CCD (6). Pomiedzy źródłem światła a płaszczyzną przedmiotową należy umieścić przesłonę irysową (7) oraz dyfuzor (8). Kamerę należy za pomocą kabla USB podłączyć do komputera (9). Kamera wraz z obiektywem powinna być umieszczona na ławie optycznej zamontowanej na blacie optycznym.

UWAGA: Z uwagi na fakt, iż płytka światłdzieląca jest wykonana z bardzo cienkiej błony należy szczególnie na nią uważać, gdyż nawet nieznaczne uderzenie może ją zniszczyć



Rys. 5 Przykładowa konfiguracja układu mikroskopowego pracującego w trybie transmisyjnym (opis w tekście).

Wyjustuj układ w taki sposób, aby zarejestrować ostry, powiększony obraz badanego przedmiotu!!!!

3.2. Określenie zdolności rozdzielczej mikroskopu optycznego

Korzystając z testów liniowych udostępnionych przez Prowadzącego należy zarejestrować ostre obrazy najbliższej sobie położonych linii równoległych testu, które można jeszcze od siebie odróżnić. Następnie należy określić zdolność rozdzielczą mikroskopu (korzystając z informacji dostępnych na stronie internetowej producenta testów: http://www.thorlabs.de/newgroupage9.cfm?objectgroup_id=4338).

3.3. Wpływ zmiany długości fali na zdolność rozdzielczą mikroskopu optycznego

Dokonać zmiany oświetlacza LED generującego światło białe, na oświetlacz LED emitujący promieniowanie o długości fali 405 nm. Następnie należy zarejestrować ostre obrazy najbliższej sobie położonych linii równoległych testu, które można jeszcze do siebie odróżnić. Następnie należy określić zdolność rozdzielczą mikroskopu.

UWAGA: Wymiany oświetlaczy należy dokonać w obecności Prowadzącego !!!!

3.4. Określenie powiększenia poprzecznego obiektywu i cyfrowego mikroskopu optycznego

Dla wszystkich obiektywów należy wyznaczyć powiększenie poprzeczne mikroskopu korzystając z udostępnionej przez Prowadzącego skali wzorcowej. W tym celu należy zarejestrować ostry obraz skali wzorcowej za pomocą każdego z obiektywów oraz je zapisać. Następnie korzystając z programu Image J należy określić n liczbę pikseli przypadającą na j pojedynczą podziałkę skali wzorcowej. Dodatkowo, znając wielkość pojedynczego p piksela kamery cyfrowej w jaką wyposażony jest mikroskop należy wyznaczyć powiększenie poprzeczne obiektywy. Analizę należy przeprowadzić w programie ImageJ

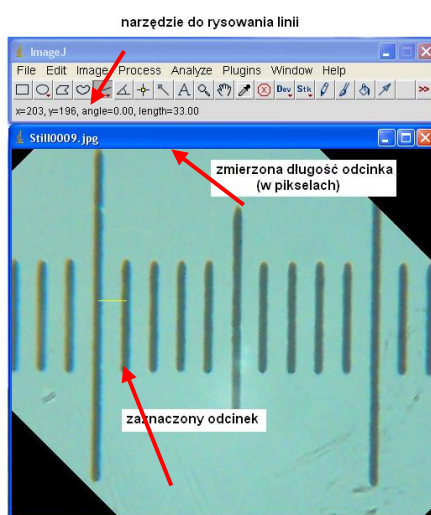
1. Za pomocą narzędzia do rysowania linii należy zaznaczyć odległość między najbliższymi działkami, a dokładniej między środkami linii tworzących

najbliższe działki. Odległość ta będzie wyrażoną w pikselach. Sposób pomiaru zilustrowano na **Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania..**

2. Następnie należy wprowadzić przelicznik skali (określona liczba pikseli odpowiada określonej odległości wyrażonej w μm).

Zakładka *Analyze* > *Set Scale* > przy *Known Distance* wpisać 10, przy *Unit of Length* wpisać μm . UWAGA! Zaznaczyć opcję *Global*, by przelicznik był stosowany przy obróbce wszystkich zdjęć.

3. Otworzyć zdjęcie preparatu i korzystając z narzędzia do rysowania linii zmierzyć określone wymiary komórek.
4. Wyniki pomiarów (w μm zebrać w tabeli i wyliczyć odpowiednie średnie arytmetyczne). Tabelkę zamieścić w sprawozdaniu.



Z kolei, powiększenie poprzeczne mikroskopu optycznego należy wyznaczyć poprzez bezpośrednie porównanie rozmiarów poprzecznych wybranego elementu obrazu przedmiotu np. odległości pomiędzy podziałkami skali wzorcowej wyświetlonej na ekranie monitora z rzeczywistymi rozmiarami poprzecznymi tego przedmiotu tj. rzeczywistą odległością pomiędzy podziałkami tej skali.

3.5. Określenie apertury numerycznej obiektywu

Najpierw należy dokonać pomiaru apertury obiektywu. Po uzyskaniu ostrego obrazu badanego obiektu należy zmierzyć odległość pomiędzy powierzchnią czołową obiektywu oraz płaszczyzną preparatu. Na podstawie powyższych wielkości należy

określić aperturę numeryczną obiektywu: $NA_{Ob} = n \sin \alpha$. Ponieważ nie stosowany jest żaden olejek immersyjny, a ośrodkiem pomiędzy preparatem a obiektywem jest powietrze, zatem zakładamy, że $n=1$

3.6. Obserwacja przygotowanych preparatów mikroskopowych

Należy znaleźć i zarejestrować obrazy wybranych przez prowadzącego gotowych preparatów mikroskopowych oraz zaznaczyć charakterystyczne struktury komórkowe. Jeżeli to możliwe należy określić ich rozmiary poprzeczne. Należy również zaobserwować wpływ przezroczystości preparatów na rejestrowane obrazy mikroskopowe.

4. OPRACOWANIE WYNIKÓW

W sprawozdaniu należy umieścić wyniki wszystkich przeprowadzonych zadań pomiarowych oraz odpowiednio je skomentować. Należy również załączyć i podpisać wszystkie zarejestrowane obrazy. W sprawozdaniu należy umieścić zarejestrowane obraz gotowych preparatów oraz zaznaczyć na nich zidentyfikowane struktury komórkowe.

LITERATURA:

- [1] F. Ratajczyk, *Instrumenty optyczne*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2005.
- [2] E. Hecht, *Optics*, Addison Wesley, San Francisco 2002.
- [3] J. Nowak, M. Zając, *Optyka-kurs elementarny*, Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1998.
- [4] E.U. Kurczyńska, D. Dorowska – Wykręt, *Mikroskopia świetlna w badaniach komórki roślinnej. Ćwiczenia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2007.
- [5] http://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=4338

Opracował: dr inż. Igor Buzalewicz

Katedra Inżynierii Biomedycznej Wydziału PPT Politechniki Wrocławskiej