

0.1 MIK - New Versuchsanleitung

Änderungen und Bemerkungen

MIK	MIKROSKOPIE
-----	-------------

0.2 Einleitung

Das Sehen ist die womöglich leistungsfähigste, komplexeste und auch eindruckvollste unserer Sinneswahrnehmungen, die ein unmittelbares Erkennen und Verstehen von Situationen, Sachzusammenhängen und Umständen möglich macht. Ein Bild sagt mehr als tausend Worte, sagt eine chinesische Spruchweisheit, was auch in Wortzusammenhängen wie anschaulich und Bich ein Bild von der Sache machenßum Ausdruck kommt.

Unter einem klassischen, optischen Bild versteht man eine in eine Ebene projizierte Darstellung eines Gegenstandes durch ein optisches System, die die geo-metrische Struktur und das farbliche Aussehen des Gegenstandes wiedergibt. In den modernen Wissenschaften werden die Begriffe Bild und Bildgewinnung darüber hinaus für alle Methoden verwandt, mit denen Naturerscheinungen für das Auge erfassbar gemacht werden. Sei es, dass die zu beobachtenden Strukturen sehr klein und Licht zum Abtasten zu grob ist, so dass die Strukturen im Licht kein klassisches Bild mehr erzeugen und auch kein klassisches Aussehen mehr besitzen (Ultramikroskope, wie Elektronenmikroskop, Tunnel-Mikroskop), oder dass die Untersuchungsgegenstände optisch unzugänglich sind (Bildgewinnung aus Organismen).

Strukturen von Gegenständen kleiner als etwa 0.02 mm können vom menschlichen Auge nicht mehr erkannt werden. Zur vergrößernden Betrachtung solcher Gegenstände wird als optisches Instrument eine Lupe oder ein Mikroskop eingesetzt. In beiden Fällen wird auf der Netzhaut (Retina) des Auges ein gegenüber der Betrachtung ohne Instrument vergrößertes Bild erzeugt. Mikroskope werden im medizinischen Labor zur Darstellung kleiner Strukturen wie Zellen oder Zellorganellen, zur Untersuchung ihrer physiologischen Funktion oder pathologischen Veränderungen benutzt. Auch Bakterien als bestimmte Krankheitserreger können noch mit Hilfe eines Lichtmikroskops identifiziert werden. Um bestimmte Strukturen sehen zu können, werden in der Regel bestimmte Färbemethoden verwendet. Strukturen kleiner als etwa 300 nm und damit kleiner als etwa eine halbe Wellenlänge des beleuchtenden Lichts können lichtmikroskopisch nicht mehr aufgelöst werden.

Für die Sichtbarmachung noch kleinerer Strukturen wie beispielsweise Viren dient das Elektronenmikroskop.

Trotz aller modernen Entwicklungen gehört das klassische Licht-Mikroskop weiterhin zu den wichtigen und elementaren Arbeitsgeräten der Naturwissenschaften und besonders der Biowissenschaften zur Herstellung von Bildern kleiner Objekte und feiner Strukturen. Der vorliegende Versuch soll die grundsätzliche Funktionsweise des Mikroskops und die durch Beugungerscheinungen bedingte Begrenzung des Auflösungsvermögens und der Vergrößerungsmöglichkeiten mit Licht vermitteln.

0.3 1 Aufgaben

1. Mikroskopischer Strahlengang: Aufbau eines einfachen Mikroskops aus einer Objektivlinse und einer Okularlinse auf einer optischen Bank. Experimentelle Bestimmung der Vergrößerung für drei verschiedene Tubuslängen ($t = 100 \text{ mm}$, 150 mm und 200 mm) und Vergleich der Ergebnisse mit den theoretisch erwarteten Werten.

2. Okularmikrometer: Einsetzen einer Skala in die Zwischenbildebene des Mikroskops als Okularmikrometer (Messokular). Kalibrierung des Messokulars und Bestimmung des Linienabstandes eines Kreuzgitters (Gitterkonstante).

3. Auflösungsgrenze: Beobachtung der Auflösungsgrenze des Mikroskops an dem Kreuzgitter und Bestimmung der numerischen Apertur des Objektivs für diesen Grenzfall. Berechnung des damit auflösbaren kleinsten Punktabstandes nach der Abbeschen Beugungstheorie und Vergleich mit der tatsächlichen Gitterkonstante.

4. Rechenaufgabe Auflösungsvermögen des menschlichen Auges: Berechnen Sie aus einer Pupillenöffnung von 4 mm den kleinsten auflösbaren Punktabstand in deutlicher Sehweite und daraus den minimalen Sehwinkel. Bestimmen Sie weiterhin eine sinnvolle Zäpfchendichte im Gelben Fleck auf der Retina. Vergleichen Sie mit Literaturwerten (im Text dieses Skripts).

0.4 2 Physikalische Grundlagen

Voraussetzungen für das Verständnis der Versuchsdurchführung sind gute Kenntnisse über die Abbildungseigenschaften dünner Linsen (Brechung durch Linsen und Brennpunkteigenschaft: Definition von Brennpunkt und Brennweite; Abbildungen: Konstruktion von Abbildungen, reelle und virtuelle Bilder, Abbildungsgleichung, Vergrößerung und Verkleinerung, Abbildungsmaßstab) (Demtröder: Experimentalphysik 2, Springer-Verlag).

0.4.1 2.1 Optische Systeme

Optische Linsensysteme liefern Abbildungen von Objekten. Schematisch können Abbildungen durch Strahlengänge konstruiert werden: Ein von einem Objektpunkt ausgehender, parallel zur optischen Achse (Symmetrieachse) des Systems verlaufender Strahl (Parallelstrahl) wird beim Durchgang durch eine Sammellinse derart gebrochen, dass er auf der anderen Seite durch deren Brennpunkt geht (Brennstrahl). Umgekehrt wird ein Brennstrahl so gebrochen, dass er zum Parallelstrahl wird. Ein Strahl durch den Linsenmittelpunkt (Mittelpunktstrahl) geht ungebrochen weiter. Diese Konstruktionsvorschrift gilt streng genommen nur für dünne Linsen, d.h. Linsen mit einer Dicke, welche klein gegenüber ihren Krümmungsradien ist, und nur für nahe der optischen Achse verlaufende Strahlen. Für dicke Linsen, achsenferne Strahlen und bei Verwendung von aus verschiedenen Wellenlängen gemischtem (z.B. weißem) Licht treten Abweichungen von der oben geschilderten strahlenoptischen Abbildung auf, die sogenannten Abbildungsfehler. Diese Abbildungsfehler können durch entsprechende geometrische Korrekturen der Linse oder Kombination mehrerer Linsen zwar vermindert, aber nie ganz ausgeschaltet werden. Das Abbildungsverhalten eines entsprechend korrigierten Linsensystems wird einfach beschrieben durch die Abbildungsgleichung

mit Brennweite f , Gegenstandsweite g und Bildweite b . Aus geometrischen Überlegungen lässt sich aus Abb. 1 direkt die Beziehung

angeben, mit welcher der Abbildungsmaßstab, der als das Verhältnis von Bildgröße B zu Gegenstandsgröße G definiert ist, durch den Quotienten aus Bildweite und Gegenstandsweite ausgedrückt werden kann.

0.4.2 2.2 Menschliches Auge

Beim menschlichen Auge ist die Bildweite durch die Abmessung des Augenkörpers zu ca. 22 mm vorgegeben und die Gegenstandsweite liegt durch die Entfernung des Gegenstands von der Augenlinse fest. Um ein scharfes Bild des Gegenstands auf der Retina zu erhalten, wird die Brennweite der Augenlinse so verändert, dass die obige Abbildungsgleichung erfüllt ist. Dieser Vorgang heißt Akkommodation und er geschieht durch die Veränderung der Linsenkrümmung durch die Ziliarmuskeln. Wird der zu betrachtende Gegenstand näher an das Auge herangeführt, so wird auch sein Bild auf der Retina größer (Abb. 1). Die minimale, noch zu einer Abbildung führende Entfernung vom Auge beträgt circa 5 cm. Für noch kleinere Entfernungen reicht das Krümmungsvermögen der Augenlinse nicht mehr zur Erzeugung eines scharfen Bildes auf der Retina aus. Die Betrachtung bei derart kleinen Entfernungen ist allerdings sehr anstrengend; ermüdungsfrei können von den meisten Augen Gegenstände in einer Entfernung von etwa 25 cm betrachtet werden. Diese Entfernung bezeichnet man als deutliche Sehweite s_0 . *Abb. 1: Zur Definition des Schwinkels $\langle m \rangle$ vorepsilon*

Die Vergrößerung eines optischen Instruments wäre eigentlich das Verhältnis der Größe des Gegenstandsbildes auf der Retina unter Verwendung des Instruments zur Größe des Gegenstandsbildes auf der Retina, wenn sich der Gegenstand ohne Instrument in einer Bezugsentfernung, welche zu s_0 gewählt wird, befände. Da die Größenbestimmung von Bildern auf der Retina praktisch nicht möglich ist, definiert man die Vergrößerung über die Schwinkel, d. h. die Winkel, unter denen die Endstrahlen des Gegenstandes durch den Mittelpunkt der Augenlinse verlaufen. Da diese Mittelpunktstrahlen ja nicht gebrochen werden, sind die Schwinkel stets proportional zur Bildgröße auf der Retina. Die Schwinkelvergrößerung ist dann definiert als

Hierbei ist der Schwinkel des Gegenstands mit Instrument und der Schwinkel, unter dem der Gegenstand in einer Entfernung s_0 dem Auge ohne Instrument erscheinen würde (siehe auch Abb. 2). Die Näherung gilt für kleine Winkel, was bei den hier diskutierten Problemen praktisch immer erfüllt ist, und wird für weitere Berechnungen benötigt. Die Schwinkelvergrößerung ist im Allgemeinen nicht dasselbe wie der Abbildungsmaßstab.

Um feine Strukturen eines Gegenstands noch erkennbar machen zu können, muss sein Bild zumindest noch einige lichtempfindliche Elemente auf der Retina überdecken. Die Grenze für die Erkennung von Strukturen ist damit durch die Packungsdichte der Zapfen gegeben, die im Gelben Fleck (fovea centralis) mit ca. 14000/mm² am größten ist. Zwei Gegenstandspunkte können dann noch getrennt wahrgenommen werden, wenn die von ihnen gezogenen Mittelpunktstrahlen einen Winkel von mindestens 1' einschließen, was einem Mindestabstand von 70 μm in deutlicher Sehweite entspricht.

0.4.3 2.3 Lupe

Eine Lupe ist eine Sammellinse, die derart zwischen Auge und Gegenstand gehalten wird, dass dieser innerhalb der Brennweite f bzw. in der Brennebene ($g = f$) dieser Sammellinse liegt. Aus einfachen, der Abb. 2 entnehmbaren, geometrischen Beziehungen folgt

(4).

D. h. die Sehwinkelvergrößerung hängt nur von der Brennweite der Lupenlinse ab. Wird diese Brennweite kleiner als 1 cm, so werden die oben erwähnten Abbildungsfehler zu groß. Dadurch liegt die maximal ausnutzbare Lupenvergrößerung bei etwa 25.

Abb. 2: Zur Sehwinkelvergrößerung bei Betrachtung durch eine Lupe.

0.4.4 2.4 Mikroskop

Das Mikroskop besteht im Prinzip aus zwei Sammellinsen, einer Projektionslinse (Objektiv) und einer Lupe (Okular). Das Objekt befindet sich zwischen einfacher und doppelter Brennweite des Objektivs, so dass an einer festliegenden Stelle im Tubus (Rohr, welches die Linsen trägt) des Mikroskops ein reelles, umgekehrtes, vergrößertes Zwischenbild des Objekts entsteht. Das Zwischenbild wird mit dem Okular als Lupe betrachtet. Das Bild wird scharf gestellt, indem durch Heben oder Senken des Tubus die Gegenstandsweite g zwischen Objekt und Objektiv verändert wird. Die Größen f und b sind dabei durch Objektiv bzw. Tubuslänge t (Abstand zwischen den innenliegenden Brennpunkten) fest vorgegeben (Abb. 3).

Die Gesamtvergrößerung des Mikroskops lässt sich wie folgt berechnen:

wobei durch den Abbildungsmaßstab B / G und durch die Lupenvergrößerung s_0 / f_2 gegeben sind. Beide Angaben sind bei handelsüblichen Linsensystemen auf den jeweiligen Fassungen eingraviert. In der Praxis werden Objektive mit Vergrößerungen von 1 (Übersichtsbetrachtungen des Präparats) bis 100 (i. A. mit Öl-Immersion, s.u.) und Okulare mit 5- bis 25-facher Vergrößerung eingesetzt.

Abb. 3: Grundprinzip des Strahlengangs im Mikroskop.

0.4.5 2.5 Auflösungsvermögen des Objektivs, Abbesche Theorie der Abbildung

Nach den erläuterten Regeln der bislang betrachteten geometrischen Optik wäre dem Auflösungsvermögen eines Mikroskops keine Grenze gesetzt. Allerdings lassen sich die Regeln dieser Strahlenoptik nicht mehr kritiklos bei der Bildkonstruktion von Objekten verwenden, deren Größe im Bereich der Wellenlänge des verwendeten Lichtes liegt. Bei derart kleinen Objekten können bei der Betrachtung der Strahlengänge die beiden für Wellenausbreitung typischen Erscheinungen von Beugung und Interferenz nicht mehr vernachlässigt werden. Beleuchtet man beispielsweise einen Doppelspalt mit Spaltabstand $d = 500$ nm mit parallelem Licht einer einzigen Wellenlänge und fängt das Licht hinter dem Spalt auf einem Schirm auf, so sieht man das sogenannte Beugungsbild des Spaltes: Der zentrale Lichtstreifen als "Beugungsmaximum nullter Ordnung" der Intensität I_0 ist von parallelen, rasch dunkler werdenden zusätzlichen Lichtstreifen, den "Beugungsmaxima m Ordnung" der Intensitäten I_m begleitet, wobei m natürliche Zahlen sind. Diese hellen Streifen sind durch dunkle Streifen getrennt. Die Winkel m zwischen diesen gebeugten Lichtstrahlen und der Einfallrichtung hängt von der Spaltbreite und der Wellenlänge des verwendeten (monochromatischen) Lichtes ab:

Diese Gleichung lässt sich anhand des Huygens'schen Prinzips (s. Abb. 4) verstehen, nach dem jeder Punkt einer Wellenfront Ausgangspunkt einer neuen Elementarwelle (Kugelwelle) ist, welche in der Folge interferieren und sich überlagern additiv (Superpositionsprinzip). Trifft ein Wellenberg (positive Amplitude) auf den Wellenberg einer anderen Elementarwelle, verstärken sich die Intensitäten. Trifft ein Wellenberg auf ein Wellental (negative Amplitude), löschen sich die Wellen aus. Die Bedingung für das Auftreten eines Intensitätsmaximums auf dem Schirm ist also, dass der Gangunterschied der Strahlen aus den beiden Spalten, $s = d \cdot \sin$, gleich einem Vielfachen der Wellenlänge sein muss. Daraus folgt Gleichung (7).

Abb. 4 Zum Huygens'schen Prinzip und zur Berechnung des Gangunterschieds interferierender Strahlen.

Wird nun das Licht verschiedener Beugungsordnungen durch eine Linse wieder gesammelt, so ergibt sich die Lichtverteilung im Bild des Gegenstands durch die Interferenz der verschiedenen Beugungsordnungen. Eine genauere Betrachtung (Ernst Abbe um 1870) ergibt, dass neben der nullten Ordnung wenigstens noch die erste Beugungsordnung in die Linse eintreten muss, damit überhaupt statt einer gleichmäßig hellen Fläche ein Bild entsteht (Abb. 5).

Abb. 5: Zur Abbeschen Theorie der Bildentstehung.

Dies bedeutet, dass der Ablenkungswinkel der ersten Beugungsordnung kleiner gleich dem Öffnungswinkel der Objektivlinse sein muss, also \leq , was mit (7) auf

führt. Dabei ist der Öffnungswinkel der Linse durch den Linsendurchmesser D und die Gegenstandsweite bestimmt:

Bei gegebener Linsenöffnung, Wellenlänge und Brechzahl n ist also der auflösbare Spaltabstand d nach unten begrenzt. Um möglichst kleine Objekte erkennen zu können, wird zwischen Objekt und Objektiv eine Immersionsflüssigkeit mit der Brechzahl n eingebracht, wodurch sich die Wellenlänge auf n verkleinert. Mit der Definition der Numerischen Apertur $N = n \sin$ (welche auf Objektiven angegeben ist) lässt sich deshalb schreiben:

worin der kleinste noch auflösbare Abstand ist.

Das Auflösungsvermögen $1/d$ kann durch Vergrößerung der Apertur N und durch Verkleinerung der Wellenlänge gesteigert werden. Im Prinzip wird letztere Möglichkeit beim Elektronenmikroskop benutzt, da das Elektron eine gegenüber dem sichtbaren Licht viel kleinere Wellenlänge hat.

0.4.6 2.6 Förderliche Vergrößerung

Liegt die Vergrößerung eines Mikroskops unter etwa $= 500 N$, so ist die Abbildung des durch das Objektiv erzeugten reellen Bildes auf der Retina des Auges zu klein als dass alle vom Objektiv her noch unterscheidbaren Strukturen aufgelöst werden können. In diesem Fall ist die vom Okular als Lupe erzeugte Vergrößerung zu klein und man kann durch Verwendung eines stärkeren Okulars weitere Objektdetails unterscheiden. Umgekehrt erscheinen Objektteile unscharf, wenn die Gesamtvergrößerung mehr als etwa $= 1000 N$ beträgt, da dann durch das Objektiv nicht mehr aufgelöste Details auf der Retina zu große Bereiche überdecken. Der Begriff der „förderlichen Vergrößerung“ nimmt also auf die physiologisch bedingte Auflösungsgrenze des Auges Bezug: Gegeben werden hier die Grenzen eines durch die Angabe der Numerischen Apertur N charakterisierten Objektivs im Bereich

Stärkste Immersionsobjektive haben eine numerische Apertur von etwa 1,4. Daraus lässt sich die förderliche Vergrößerung optischer Mikroskope bei einer mittleren Lichtwellenlänge von $= 550 \text{ nm}$ berechnen. Andersherum lassen sich mit (1.11) die Herstellerangaben von manchmal bis zu 1000-facher Vergrößerung bei einfachen Mikroskopen als wenig sinnvoll einstufen, da diese die beugungsbedingte Auflösungsgrenze ignorieren.

Zusammenfassend sei angemerkt, dass den Betrachtungen zum Auflösungsvermögen insgesamt Näherungen zugrunde liegen, so dass die abgeleiteten Ergebnisse den Charakter einer Abschätzung haben. Die praktisch erreichbare Auflösungsgrenze hängt über diese Überlegungen hinaus von den gesamten vorliegenden Abbildungsbedingungen und zusätzlich von physiologischen Faktoren des Beobachters ab. So haben z.B. große Linsen beugungstheoretisch ein gutes Auflösungsvermögen, ihre praktischen Qualitäten werden aber durch sogenannte Abbildungsfehler stark beeinträchtigt.

0.4.7 2.7 Quantitative Messung an mikroskopischen Präparaten

Biologische Strukturen lassen sich mit Hilfe entsprechender Färbemethoden durch die spezifische Färbung qualitativ unterscheiden.

Quantitativ lassen sich vor allem Längen messen, wenn eine Eichung des optischen Systems vorgenommen wurde. Zur Eichung verwendet man ein Präparat mit konstanten Abschnitten (beispielsweise $10 \mu\text{m}$). Durch Vergleich mit einer beliebigen Skala am Ort des Zwischenbildes, dem Okularmikrometer, kann das Okular geeicht werden. Natürlich muss diese Eichung für jedes Objektiv getrennt vorgenommen werden.

Für diese Eichung lässt sich ein Umrechnungsfaktor mit der Dimension $[\] = \mu\text{m}/\text{Skt}$ einführen, so dass sich der Messwert in μm als Produkt aus und dem Ablesewert in Skalenteilen (Skt) berechnen lässt.

0.5 3 Versuchsdurchführung

Zur Versuchsdurchführung wird aus sehr einfachen optischen Komponenten (einfache Sammellinsen als Objektiv und Okular) auf einer optischen Bank (Dreikantschiene) ein mikroskopischer Strahlengang selbständig aufgebaut. Das so realisierte „offene“ Mikroskop hat im Vergleich zu kommerziellen Geräten zwar sehr schlechte und unkomfortable Abbildungseigenschaften, aber es ermöglicht einen anschaulichen und verständnisfördernden experimentellen Umgang mit der Apparatur. Auf der anderen Seite ergeben sich dadurch zum Teil schwierigere Messbedingungen, und es kann nicht die sonst im Praktikum übliche Messgenauigkeit erreicht werden.

Folgende optische Komponenten sind vorhanden:

1. Zwei Linsen ($f = (40 \pm 1) \text{ mm}$),
2. Blendscheibe zum Abblenden des Objektivs,
3. eine μm -Skala auf Glasträger ($10 \mu\text{m}$ -Teilung) als Okularmikrometer,
4. eine halbdurchlässige Glasplatte zum Einspiegeln einer Vergleichsskala,
5. ein Kreuzgitter (Drahtnetz) und
6. zwei beleuchtete Skalen (mm-Teilung).

Zu Aufgabe 1 (Mikroskopischer Strahlengang)

Die Tubuslänge des Mikroskops kann bequem durch den Abstand der beiden Linsen unter Berücksichtigung der Brennweiten eingestellt werden. Direkt hinter die Objektivlinse wird zusätzlich eine Lochblende gestellt, die den Strahlengang auf den achsennahen Bereich einschränkt und dadurch die Abbildungsqualität des Strahlenganges erhöht (Kontrast, Verzeichnung). Zur Bestimmung der Vergrößerung wird vor die Okularlinse eine halbdurchlässige Glasplatte im Winkel von etwa 45° gestellt und damit eine zweite, gleiche Skala im Abstand von $s_0 = 250 \text{ mm}$ vom Auge eingespiegelt. Die Vergrößerung erhält man direkt aus dem Vergleich beider Skalen (Abb. 6).

Abb. 6: Aufbau zur Bestimmung der Vergrößerung.

Während bei einem handelsüblichen Mikroskop der Tubus zur Scharfstellung relativ zum Objekt bewegt wird, bietet es sich hier an, die beleuchtete Skala als Objekt relativ zum zuvor eingestellten Tubus zu bewegen.

Zu Aufgabe 2 (Messmikroskop)

Die Tubuslänge wird auf 300 mm eingestellt, um eine ausreichende Vergrößerung zum Ausmessen des Drahtnetzes zu erhalten. In die Zwischenbildebene des Mikroskops wird eine kleine Glasskala als Okularmikrometer eingesetzt und durch Vergleich mit der mm-Skala als Objekt kalibriert. Anschließend wird sowohl der Abstand der Drähte als auch die Drahtstärke eines Drahtnetzes ausgemessen.

Zu Aufgabe 3 (Auflösungsgrenze)

Mit den Lochblenden (verschiedene Durchmesser) kann der wirksame Bereich des Objektivs zur Beobachtung der Auflösungsgrenze verkleinert werden. Da die Strahlen durch die Objektivlinse kollimiert werden, bevor sie die Lochblende passieren, kann (9) zur Berechnung der Linsenöffnung verwendet

praktikum@physik.fu-berlin.de 2008/09/18 12:08