

Физические методы исследования состава и структуры веществ

Оптическая микроскопия: Лекция 4

Традиционный и конфокальный
оптический микроскопы:
увеличение и разрешение



Павел В. Зинин



Геометрическая оптика против волновой оптики

Геометрическая оптика полезна

- для понимания концепции увеличения
- для понимания принципов работы микроскопии
- для проектирования оптической системы
- для лабораторных экспериментов
- для понимания концепции преломления света

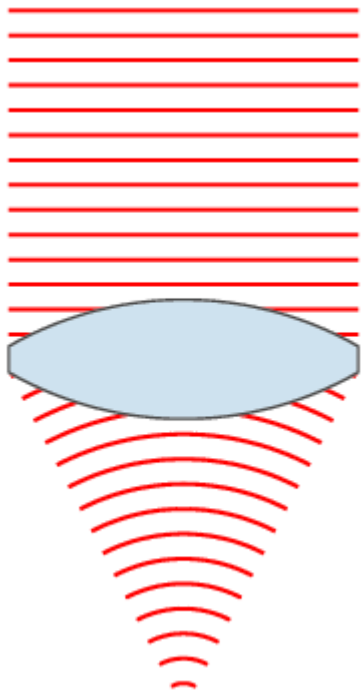
Когда геометрическая оптика не может быть полезна:

- чтобы понять дифракцию из тонкой щели
- для определения разрешающей способности микроскопа или любой системы визуализации
- сформулировать математическую теорию формирования изображений в оптической микроскопии

Волновой фронт в линзе

Самым древним артефактом линз является линза Нимруда, датируемая 2700 годами (7 век до н. э.) до древней Ассирии. Дэвид Брюстер предположил, что её можно было использовать в качестве увеличительного стекла

Тонкая линза преобразует плоский волновой фронт в сферический



From Wikipedia

Апертурный угол : угол между крайним лучом конического светового пучка на входе (выходе из) оптической системы и её оптической осью.

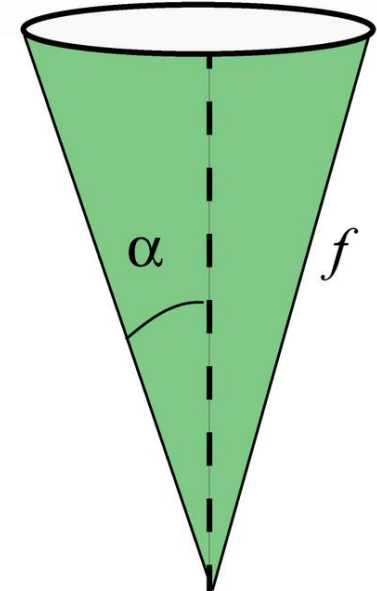
Числовая апертура

$$NA = n \cdot \sin(\alpha),$$

Где n - показатель преломления. NA может превышать 1,0 при использовании других иммерсионных жидкостей включая воду(1.333) или масло (1.51).

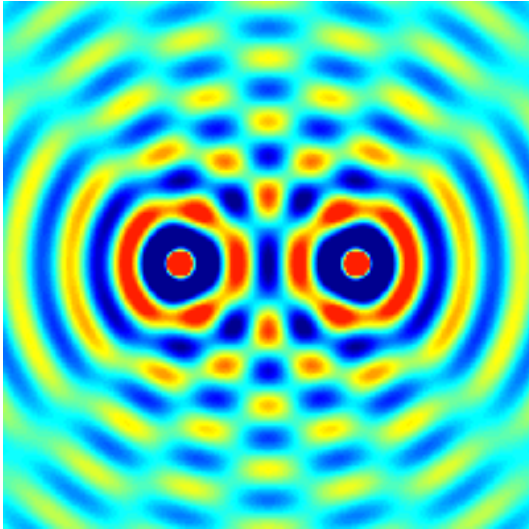


Линза Нимруда — оптическая линза, созданная в 750—710 годах до н. э. и найденная при раскопках в городе Нимруд.



Light cone

Интерференция волн на водной поверхности



Анимация интерференции волн, поступающих от двух точечных источников



Волны на поверхности воды в бочке



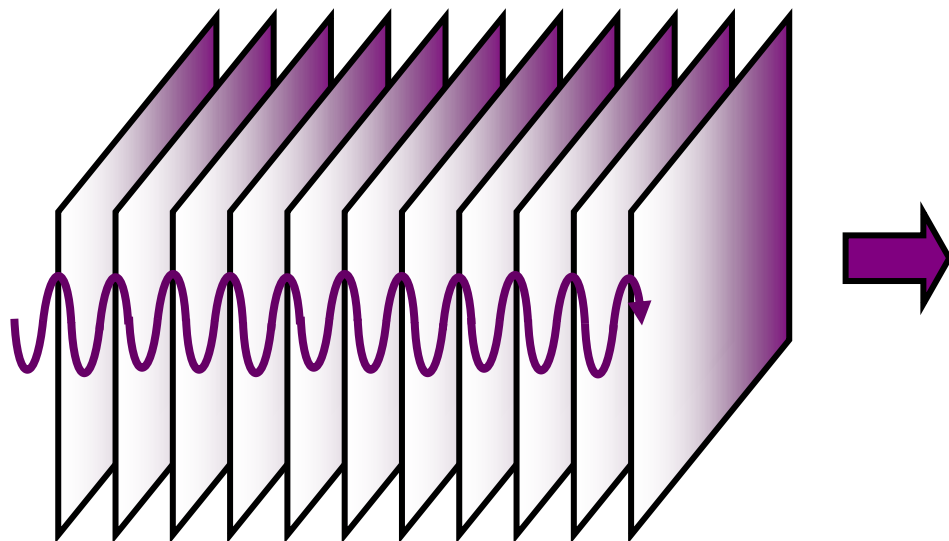
Интерференция волн на северном берегу. Оаху, Гавайи.

Волны в океане



Плоская волна

Определение: плоская волна - это волна, в которой волновой фронт является плоской поверхностью. Фронт плоской волны неограничен по размерам, вектор фазовой скорости перпендикулярен фронту.



Уравнение любой волны является решением дифференциального уравнения, называемого волновым. Волновое уравнение для функции A записывается в виде

$$\Delta\Phi(\vec{r}, t) = \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t^2}$$

https://www.youtube.com/watch?v=eWT4bM_cxA4

$$\phi = A e^{i(k_x x + k_y y + k_z z - \omega t)}$$

Где k – волновой вектор: $|k| = 2\pi/\lambda = \omega/v$, λ – длина волны, Большая стрелка – это вектор, ω – циклическая частота, v – скорость волны. Волновой вектор который определяет направление распространения волны по ее ориентации перпендикулярно волновым фронтам. Мы можем представить себе волновой фронт как линию вдоль гребня волны.

где Δ – оператор Лапласа,

$\Phi(\vec{r}, t)$ волновая функция,

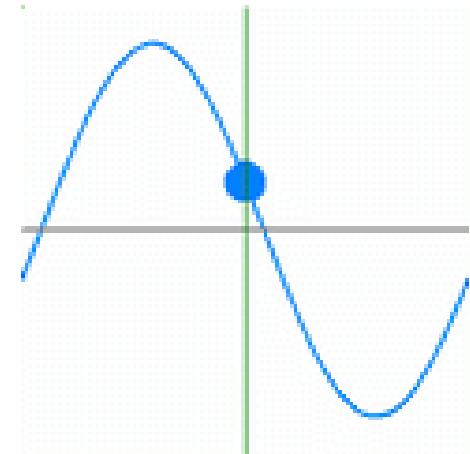
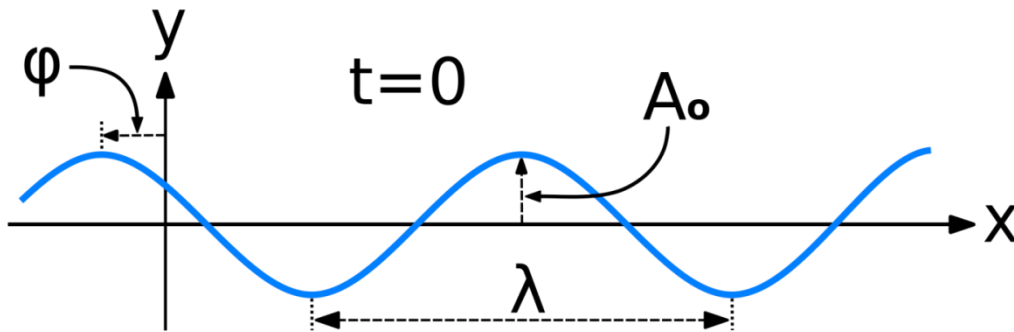
r – радиус вектор,

v – скорость волны; t – время.

Плоская монохроматическая волна

Определение: Волна, у которой направление распространения одинаково во всех точках пространства. Простейший пример — однородная монохроматическая, незатухающая плоская волна (<https://gufo.me/dict/physics>). Монохроматической волной называется волна, вызывающая колебания в среде по гармоническому закону (по закону синуса или косинуса) одной определённой частоты.

$$\Phi = e^{i(k_x x - \omega t)}; \quad \omega = \frac{2\pi}{T}, T - \text{период колебаний}; \quad (k_x x - \omega t) - \text{фаза волны}$$



Однородная плоская волна, занимающая всё бесконечное пространство, является идеализацией, однако любое волновое поле, сосредоточенное в конечной области (напр., направляемое линиями передачи или волноводами), можно представить как суперпозицию П. в. с тем или иным пространств. спектром k . *Источник: <https://gufo.me/dict/physics>*

Преобразование Фурье

Фурье-анализ назван в честь Джозефа Фурье, который показал, что представление функции тригонометрическим рядом значительно упрощает изучение распространения тепла.

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \exp(-i\omega t) dt$$

$$f(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} F(\omega) \exp(i\omega t) d\omega$$



Jean Baptiste Joseph Fourier
(1768 – 1830)

Формула Эйлера $e^{ix} = \cos x + i \sin x$, $e^{-i\omega t} = \cos \omega t - i \sin \omega t$

где t – это время, ω – это циклическая частота; $\omega = 2\pi f$, а f – это частота.

$F(\omega)$ называется преобразованием Фурье функции $f(t)$. Он содержит информацию, эквивалентную той, что содержится в $f(t)$. Мы говорим, что $f(t)$ определено во “временной области”, а $F(\omega)$ – в “частотной области”.

Размер фотона

Соотношение неопределённости в квантовой физике гласит

$$\Delta p \cdot \Delta z \cong 2\pi\hbar$$

Но при рождении фотона $\Delta p = p$, где p – его импульс. Таким образом, его длина

$$\Delta z \cong \frac{2\pi\hbar}{p} \approx \frac{2\pi}{k} = \lambda$$

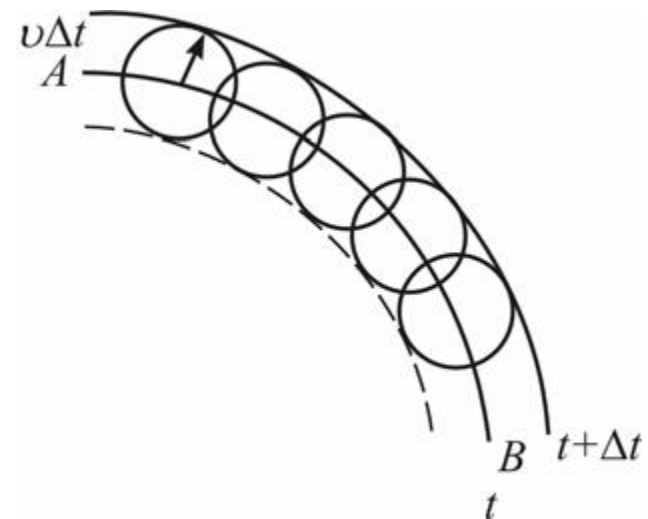
где λ – длина волны фотона и его «размер».

О. Н. Крохин. Интерференция одиночных фотонов. *Краткие сообщения по физике ФИАН*. 4. с. 44-47 (2014).
А. П. Канавин, О. Н. Крохин, «Что такое фотон: структура и волновая функция», *Квантовая электроника*, **48**(8). 711–714 (2018).

Принцип Гюйгенса

Согласно принципу Гюйгенса каждая точка среды, до которой дошло возмущение, сама становится источником вторичных волн. Для того чтобы, зная положение волновой поверхности в момент времени t , найти ее положение в следующий момент времени $t + \Delta t$, нужно каждую точку волновой поверхности рассматривать как источник вторичных волн. Поверхность, касательная ко всем вторичным волнам, представляет собой волновую поверхность в следующий момент времени.

Принцип Гюйгенса не объяснял, почему положение волновой поверхности даёт именно передняя огибающая вторичных волн и какой смысл задней огибающей поверхности. Это объяснил французский физик Огюстен Френель (1788—1827), который добавил к принципу Гюйгенса положение о том, что вторичные сферические волны являются когерентными и интерферируют между собой. В результате интерференции этих волн амплитуда результирующих колебаний везде равна нулю, кроме точек, которые находятся на огибающей, построенной с учётом направления распространения волны.

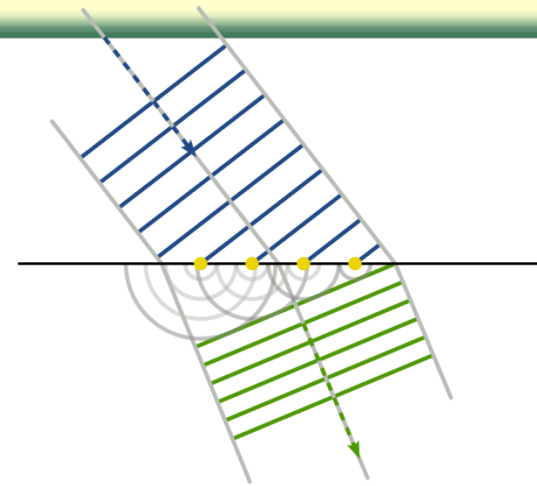


Принцип Гюйгенса

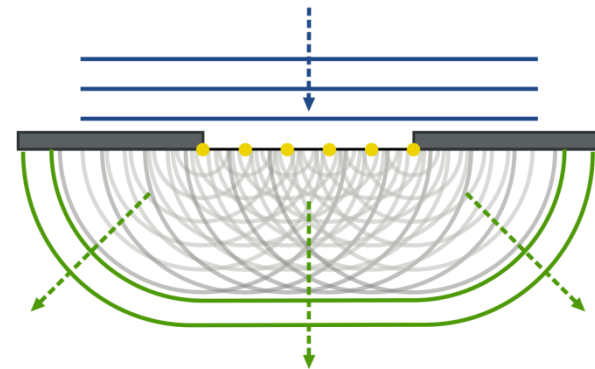
Принцип Гюйгенса: каждая точка фронта волны является самостоятельным источником вторичных сферических волн, огибающая которых даёт новое положение волнового фронта.

Френель в 1815 году дополнил принцип Гюйгенса, введя представления о когерентности и интерференции элементарных волн, что позволило рассматривать на основе принципа Гюйгенса — Френеля и дифракционные явления.

Принцип Гюйгенса — Френеля: Каждый элемент волнового фронта можно рассматривать как центр вторичного возмущения, порождающего вторичные сферические волны, а результирующее световое поле в каждой точке пространства будет определяться интерференцией этих волн.

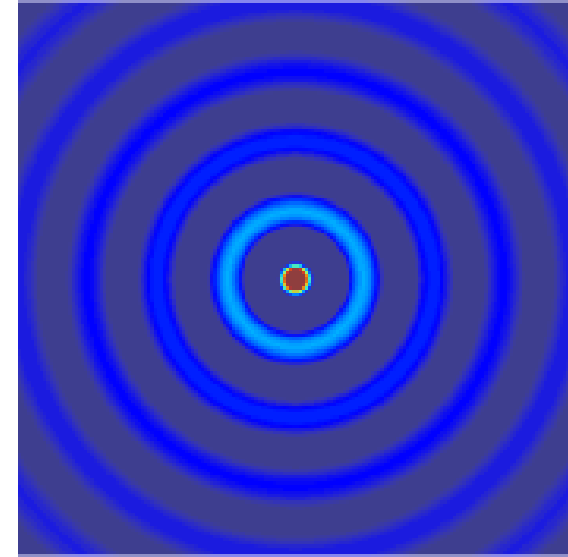
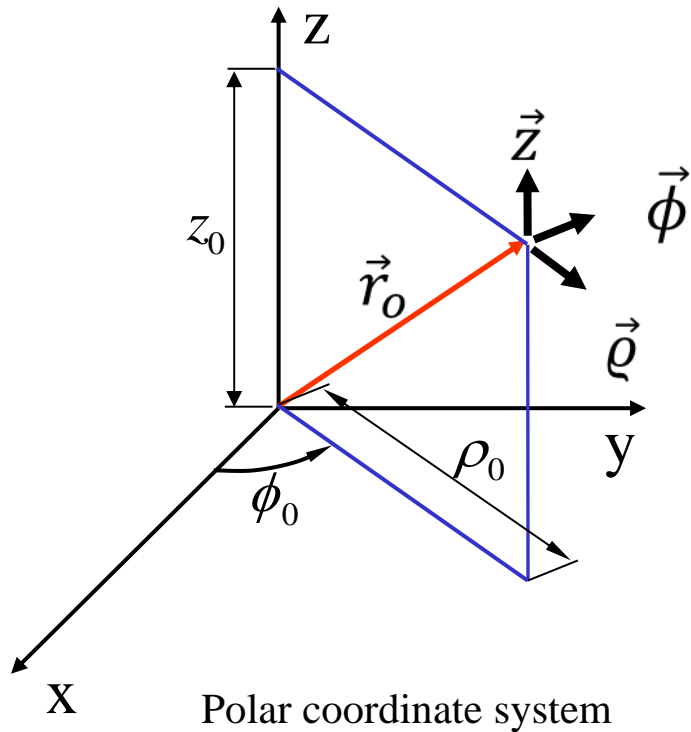


Рефракция волн по Гюйгенсу: синие линии и синяя стрелка — фронты падающей волны и направление вектора фазовой скорости в первой среде



Дифракция волны на прямоугольном отверстии в непрозрачном экране по Гюйгенсу

Сферический волновой фронт и волна



$$\phi = A \frac{e^{i(kr_0 - \omega t)}}{r_0}$$

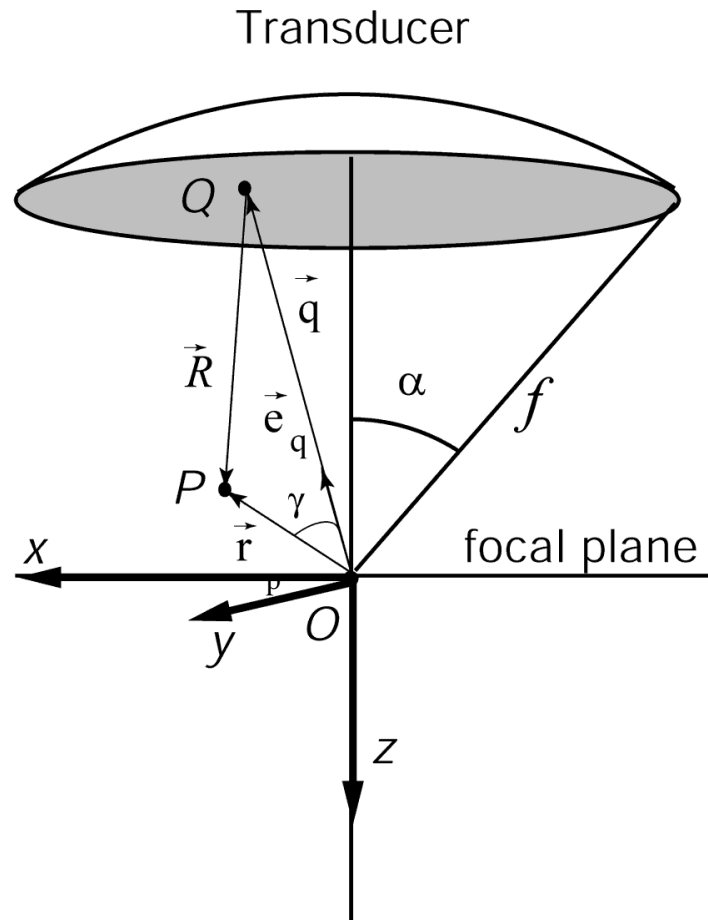
k - волновое число

r_0 - расстояние между центром системы координат и заданной точкой

t - время

ω - циклическая частота

Расчёт поля в фокальной области сферического излучателя



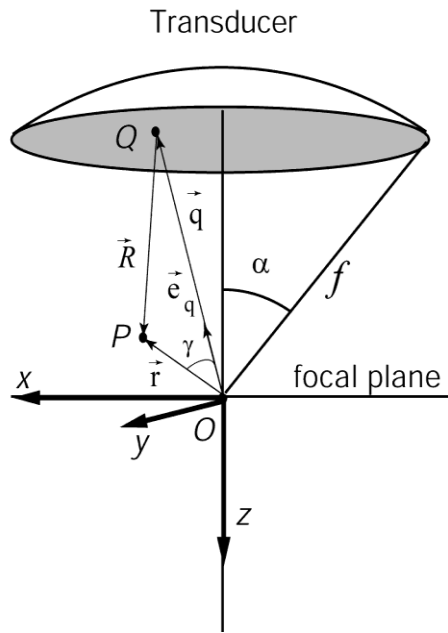
Модель сферического преобразователя, используемая для расчета: сферический преобразователь с фокусным расстоянием f ; трехмерный объект, расфокусированный на Z и сдвинутый в сторону на R , r_p - расстояние между точкой P и центром системы координат, O .

Рассчитаем распределение потенциала поля (смещения) в фокальной плоскости. При применении принципа Гюйгенса-Френеля поле Φ в точке \mathbf{r}_p , расстояние которой от фокусной точки мало по сравнению с фокусным расстоянием f преобразователя, задается по формуле

$$\Phi(\vec{R}) = \frac{u_o}{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^\alpha \frac{e^{ik\vec{R}}}{R} dS \quad (1)$$

где R - расстояние между точкой Q на поверхности преобразователя и точкой вблизи фокуса P , $|\vec{R}| = |\mathbf{r} - \mathbf{q}|$, $|\mathbf{q}| = f$, константа u_o - это смещение поверхности преобразователя. Жирные буквы используются для обозначения векторов.

Приближение Дебая



Для взятия интеграла (1) будем использовать приближение Дебая, предполагая, что $r_p \ll f$. В приближении Дебая мы можем записать $1/R \sim 1/f$ в знаменателе интеграла(1). Остается выписать выражение для экспоненту в (1), которую можно получить с помощью теоремы косинуса

$$R = \sqrt{f^2 + r_p^2 - 2fr_p \cos \gamma} \approx f \left(1 - \frac{r_p}{f} \cos \gamma\right),$$

где γ -угол между векторами \mathbf{q} и \mathbf{r} . Следовательно при условии $r_p \ll f$ можно записать $R \sim f - r_p \cos \gamma$.

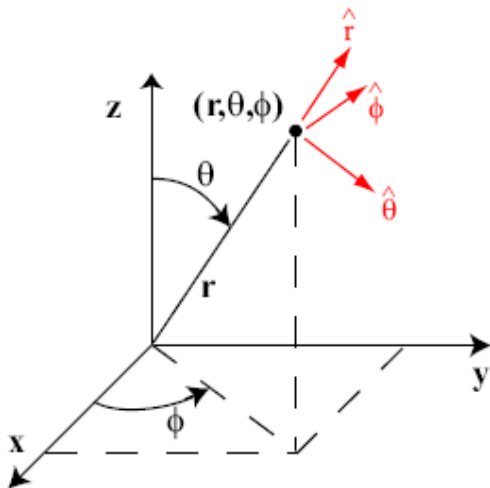
Введем сферическую систему координат с началом координат в точке O. Тогда $dS = f^2 \sin \theta d\theta d\varphi$ - элемент площади поверхности на преобразователе, θ и φ - полярный и азимутальные углы. В сферической системе координат интеграл имеет вид

$$\Phi(\vec{r}_p) = \frac{u_o f e^{-ikf}}{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^\alpha e^{ikr_p \cos \gamma} \sin \theta d\theta d\varphi \quad (2)$$

В сферической системе координат

$$\cos \gamma = \cos \theta \cos \theta_p + \sin \theta \sin \theta_p \cos(\varphi - \varphi_p)$$

Рис. 2. Сферическая система координат



Расчет поля в фокальной области

Интеграл (2) имеет приобретает вид

$$\Phi(\vec{\mathbf{r}}_p) = \frac{u_o f e^{-ikf}}{2\pi} \int_0^\alpha \int_0^{2\pi} e^{ikr_p [\cos\theta \cos\theta_p + \sin\theta \sin\theta_p \cos(\varphi - \varphi_p)]} \sin\theta d\theta d\varphi \quad (3)$$

Если ввести полярные координаты, $z_p = r_p \times \cos\theta_p$ and $\rho_p = r_p \times \sin\theta_p$, где z_p и ρ_p – это проекции радиус вектора r_p на фокальную плоскость и ось z . Интеграл (3) может быть переписан

$$\Phi(\vec{\mathbf{r}}_p) = \frac{u_o f e^{-ikf}}{2\pi} \int_0^\alpha e^{ikz_p \cos\theta} \sin\theta d\theta \int_0^{2\pi} e^{ik\rho_p \sin\theta \cos(\phi - \phi_p)} d\phi$$

Интеграл по углу ϕ может быть вычислен и равен $2\pi J_0(k\rho_p \times \sin\theta)$. Тогда интеграл (3) приобретает вид:

$$\Phi(z_p, \rho_p) = u_o f e^{-ikf} \int_0^\alpha e^{ikz_p \cos\theta} J_0(k\rho_p \sin\theta) \sin\theta d\theta \quad (4)$$

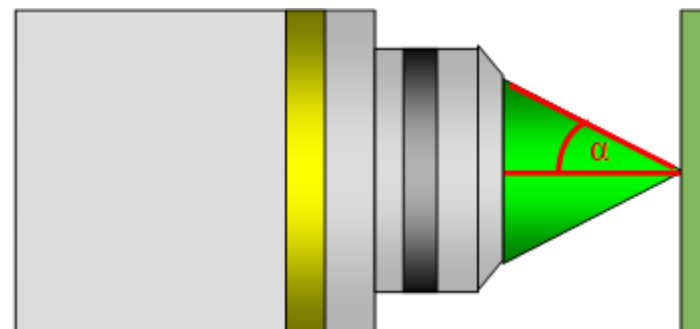
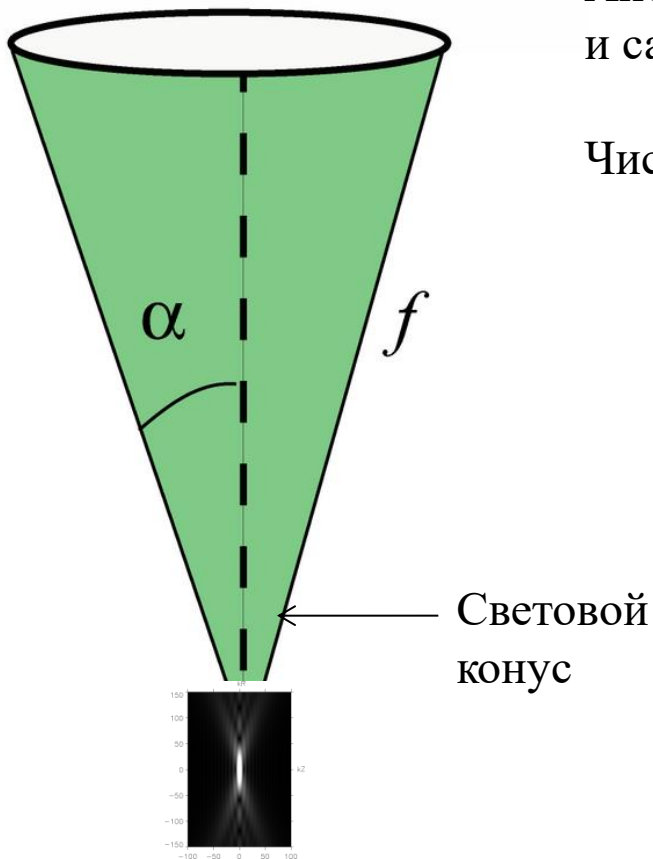
Выражение (4) описывает распределение поля вблизи фокуса фокусирующей системы и обсуждается в книге : Борн М., Вольф Э., Основы оптики, section 8.8, 1973.

Числовая апертура

Апертурный угол (α): угол между нормальным лучом и самым дальним лучом, входящим в систему.

$$\text{Числовая апертура} = \text{NA} = n (\sin \alpha)$$

(n = индекс рефракции)

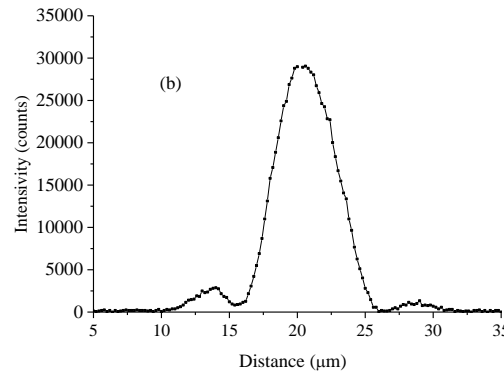
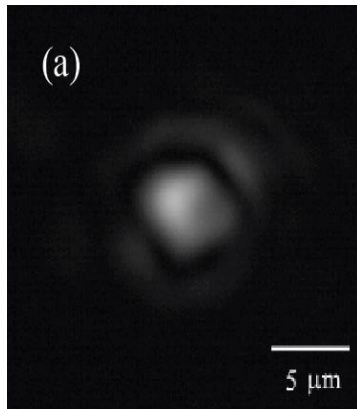


Схематичное изображение объектива.
(Г.Н. Виноградова, В.В. Захаров Основы микроскопии.
ИТМО 2018)

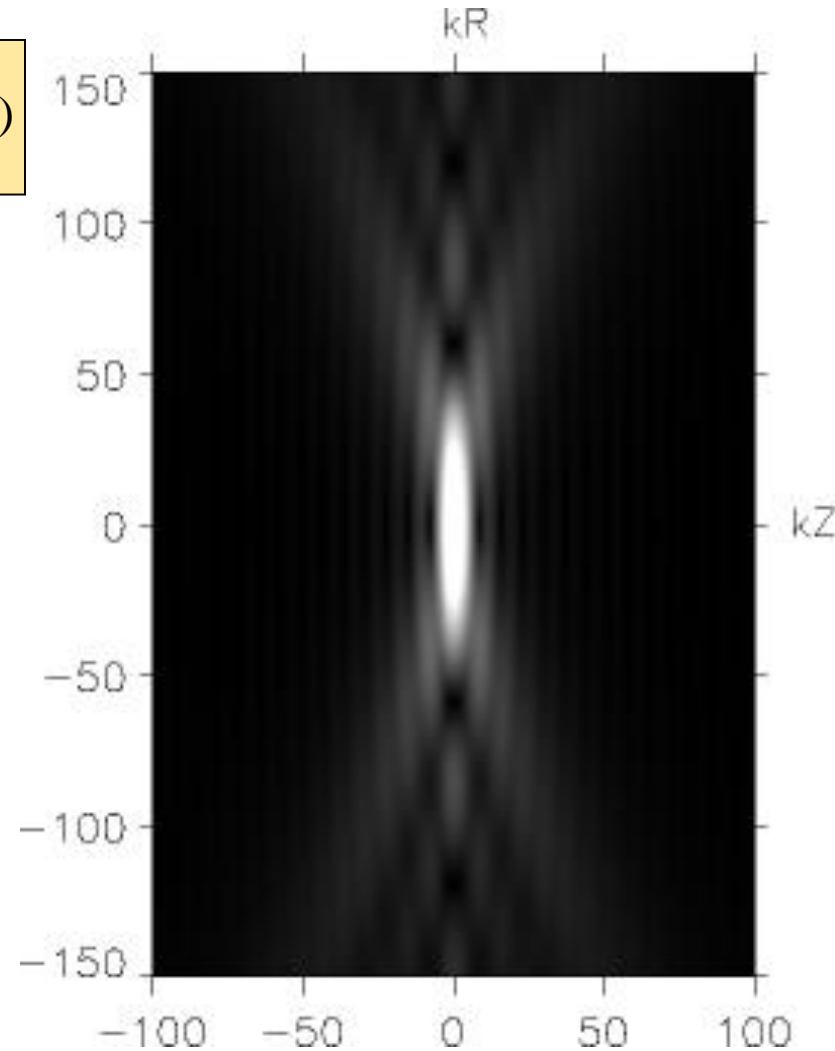
NA может превышать 1,0 при использовании других погружных жидкостей включая воду (1.333) or oil (1.51).

Структура фокуса

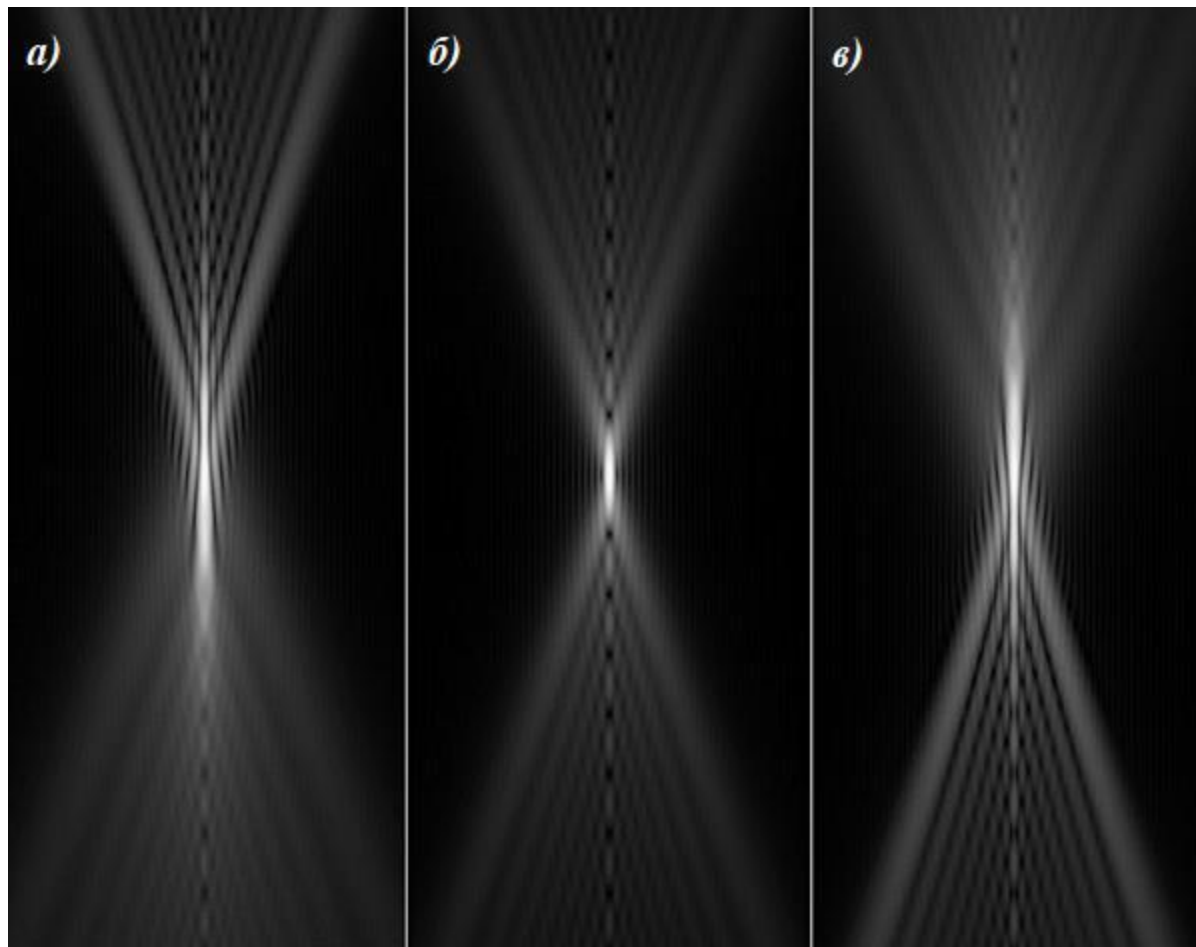
$$\Phi(z_p, \rho_p) = u_o f e^{-ikf} \int_0^\alpha e^{ikz_p \cos\theta} J_o(k\rho_p \sin\theta) \sin\theta d\theta \quad (4)$$



2-D distribution of the IR laser beam intensity on the steel gasket in a DAC at 1 GPa (the pressure was measured before and after laser heating) when the position of the π -shaper rim (PSR) was set at (PSR) = -1 mm. (b) Distribution of the IR laser beam intensity along the line crossing the center of the fig a. The laser power was 2 W.



Распределение поля в фокусе



Изображение точечного источника света вдоль оптической оси Z. а) *отрицательная сферическая абберация*; б) *с коррекцией аббераций* ($dz = 4\lambda/\lambda^2$); в) *положительная сферическая абберация*. (Г.Н. Виноградова, В.В. Захаров Основы микроскопии. ИТМО 2018)

Интеграл Дебая

Можно получить аналитическое выражение интеграла (4) для фокальной плоскости ($z = 0$). В фокальной плоскости интеграл (4) в приближении Дебая можно записать

$$\Phi(\rho) = u_o f \exp(-ikf) \int_0^\alpha J_0(k\rho \sin \theta) \sin \theta d\theta$$

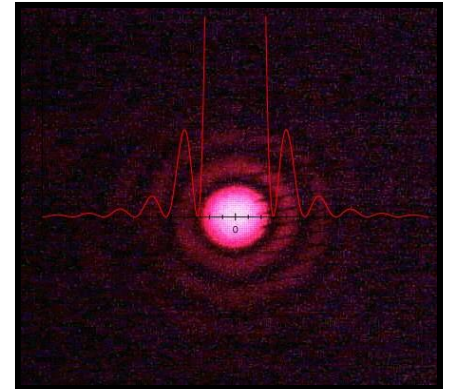
Этот интеграл вычисляется как ряд функции Бесселя. Его можно упростить для малого α и больших углов для которых $\cos \theta \sim 1$, тогда

$$\Phi(\rho) = u_o f \exp(-ikf) \int_0^\alpha J_0(k\rho \sin \theta) \sin \theta \cos \theta d\theta$$

После введения новой переменной $x = \sin \theta$, интеграл можно переписать в виде

$$\begin{aligned} \Phi(\rho) &= u_o f \exp(-ikf) \int_0^{\sin \alpha} J_0(kr x) x dx = \\ &= u_o f \exp(-ikf) \frac{1}{(k\rho)^2} k\rho \sin \alpha J_1(k\rho \sin \alpha) = \\ &= u_o f \exp(-ikf) \sin^2 \alpha \left[\frac{J_1(k\rho \sin \alpha)}{k\rho \sin \alpha} \right] \end{aligned}$$

$$\Phi(\rho) = A \frac{J_1(k\rho \sin \alpha)}{k\rho \sin \alpha}$$



Приближение Дебая

Можно получить аналитическое выражение интеграла (4) для фокальной плоскости ($z = 0$). В фокальной плоскости интеграл (4) в приближении Дебая можно записать

$$\Phi(\rho) = u_o f \exp(-ikf) \int_0^\alpha J_0(k\rho \sin \theta) \sin \theta d\theta$$

Этот интеграл вычисляется как ряд функции Бесселя. Его можно упростить для малого α и больших углов для которых $\cos \theta \sim 1$

$$\Phi(\rho) = u_o f \exp(-ikf) \int_0^\alpha J_0(k\rho \sin \theta) \sin \theta \cos \theta d\theta$$

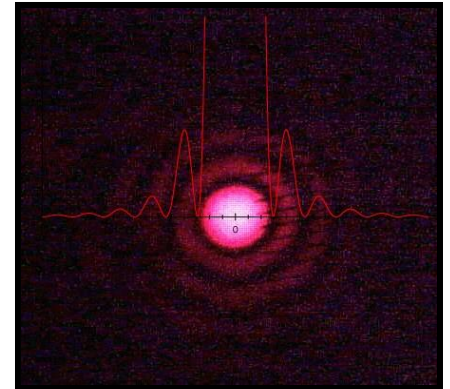
После введения новой переменной $x = \sin \theta$, интеграл можно переписать в виде

$$\Phi(\rho) = u_o f \exp(-ikf) \int_0^{\sin \alpha} J_0(kr x) x dx =$$

$$vf \exp(-ikf) \frac{1}{(k\rho)^2} k\rho \sin \alpha J_1(k\rho \sin \alpha) =$$

$$u_o f \exp(-ikf) \sin^2 \alpha \left[\frac{J_1(k\rho \sin \alpha)}{k\rho \sin \alpha} \right]$$

$$\Phi(\rho) = A \frac{J_1(k\rho \sin \alpha)}{k\rho \sin \alpha}$$



Распределение поля в фокусе. Интенсивность вдоль оси

Интеграл (4) можно упростить для $\rho = 0$.

$$\Phi(z) = u_o f \exp(-ikf) \int_0^\alpha \exp(ikz \cos \theta) \sin \theta d\theta =$$
$$\frac{u_o f \exp(-ikf)}{kz} [\exp(ikz) - \exp(ikz \cos \alpha)]$$

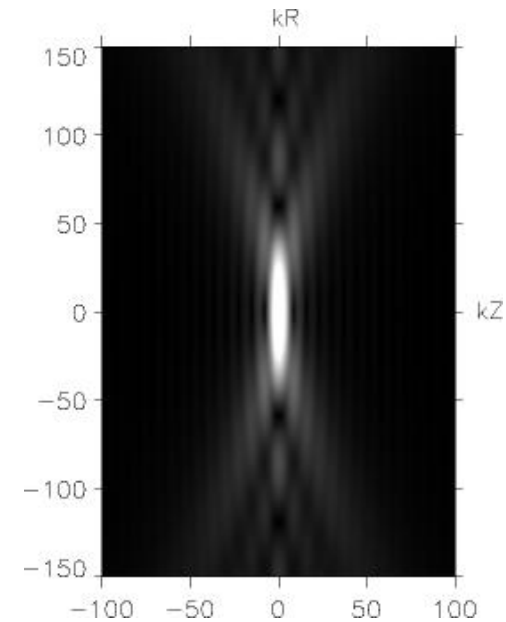
Осевое распределение поля (поле вдоль осей z : $x = 0, y = 0$) описывается функцией *sinc*:

$$\Phi(z) = B \frac{\sin[0.5kz(1 - \cos \alpha)]}{0.5kz(1 - \cos \alpha)}$$

PSF: Функция рассеяния точки

Для небольших углов, $\cos \alpha \sim 1 - 0.5 \sin^2 \alpha$ и $NA = \sin \alpha$, тогда

$$\Phi(z) = B \frac{\sin[kz \sin^2 \alpha / 4]}{kz \sin^2 \alpha / 4} = B \frac{\sin[kz \times NA^2 / 4]}{kz \times NA^2 / 4}$$

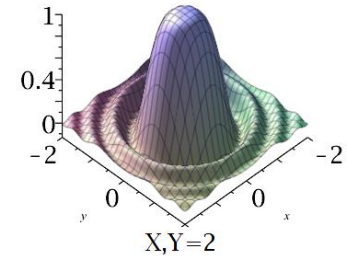


Аксиальное и осевое разрешение

Определение латерального разрешения:

латеральное боковое разрешение определяется нулём функции $\Phi(\rho)$

$$\Phi(\rho) = A \frac{J_1(k\rho \sin \alpha)}{k\rho \sin \alpha}$$



$$r_{Airy} = \frac{0.61\lambda}{\sin(\alpha)} = \frac{0.61\lambda_o}{n \sin(\alpha)} = \frac{0.61\lambda_o}{NA}$$

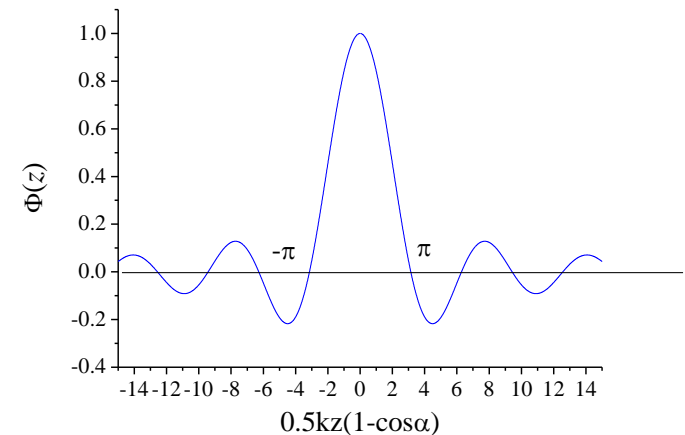
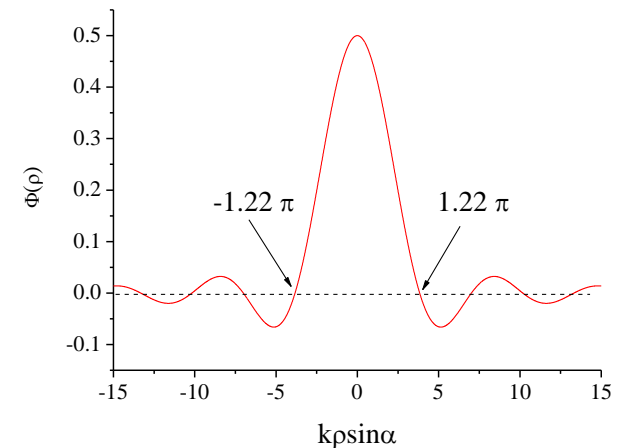
λ_o длина волны света в вакууме

Определение осевого разрешения: осевое разрешение определяется нулем функции $\Phi(z)$

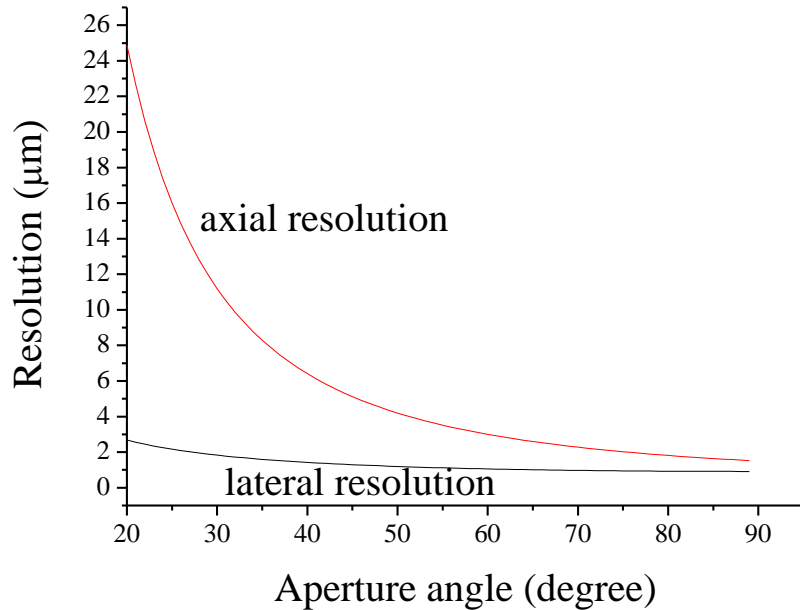
$$\Phi(z) = B \frac{\sin[0.5kz(1 - \cos \alpha)]}{0.5kz(1 - \cos \alpha)}$$

$$z_{axial} = \frac{\lambda}{[1 - \cos(\alpha)]} \approx \frac{2\lambda}{\alpha^2} = \frac{2n\lambda_o}{NA^2}$$

Чем меньше NA, тем больше фокусное пятно и тем меньше полученное разрешение

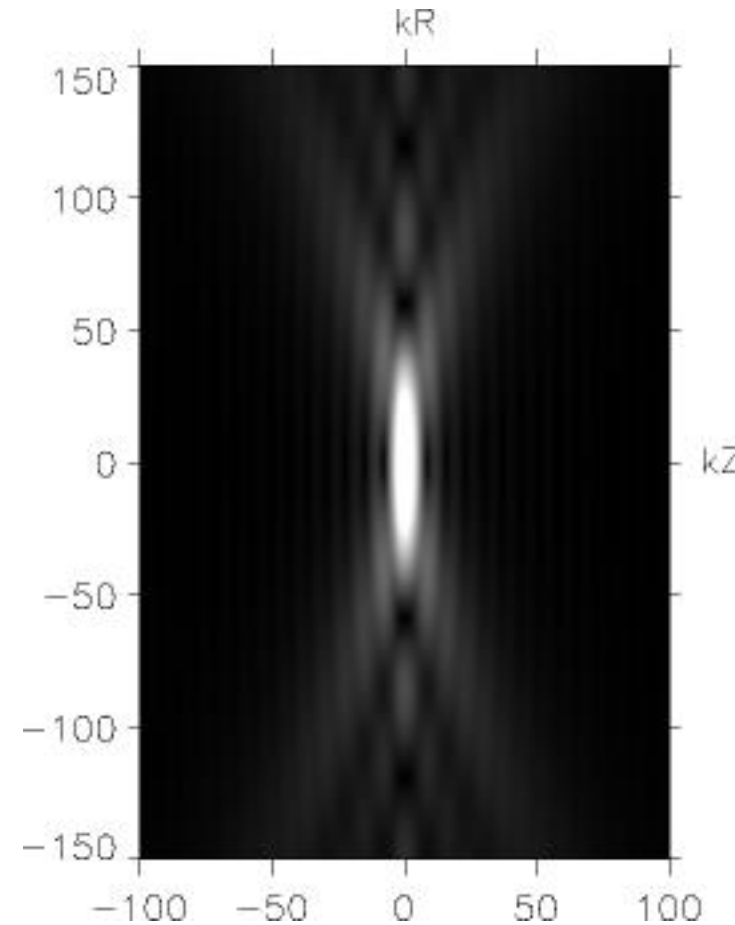


Структура фокуса



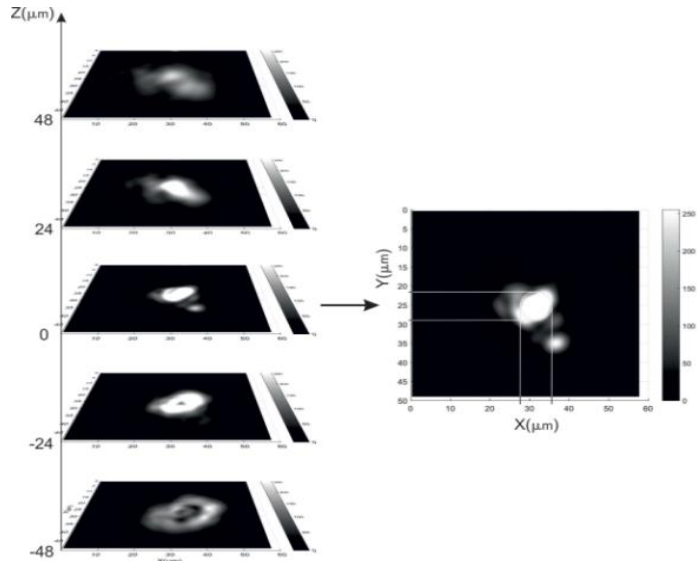
Латеральное и осевое разрешения рассчитанное согласно уравнениям (5) и (6), для акустического микроскопа с рабочей частотой 1 ГГц в зависимости от угла апертуры. В качестве иммерсионной жидкости для моделирования была выбрана вода.

(from P. Zinin and W. Weise, T. Kundu ed., *Ultrasonic Nondestructive Evaluation: Engineering and Biological Material Characterization*. CRC Press, Boca Raton, chapter 11, 654-724 (2004).



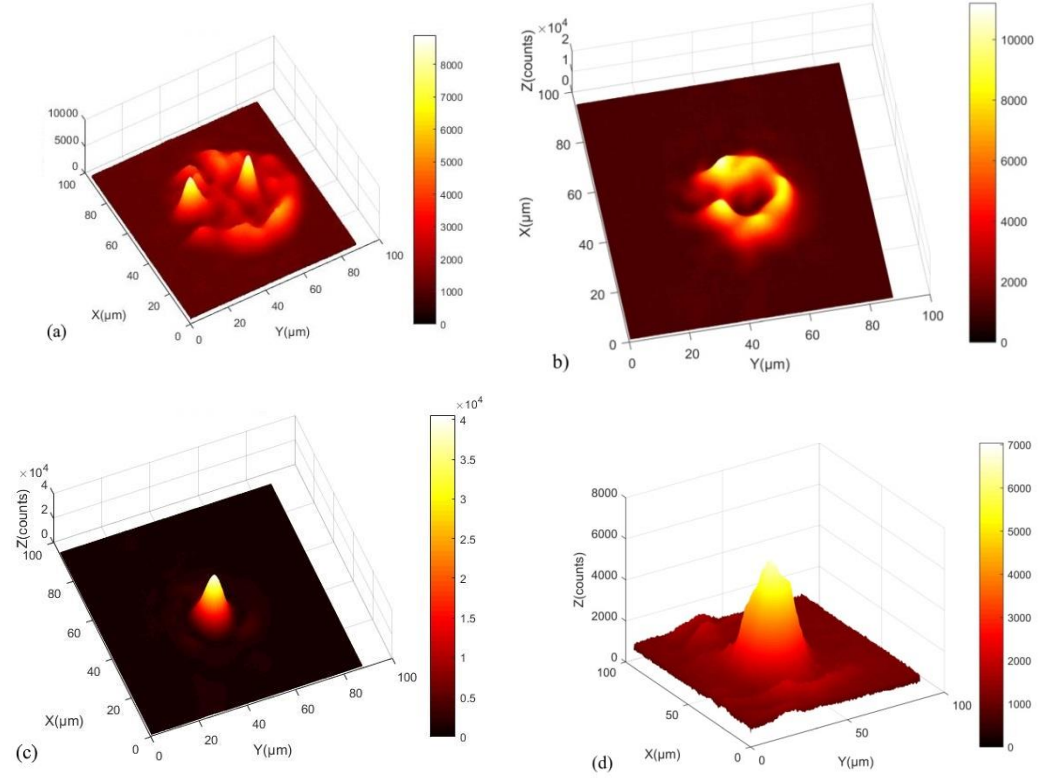
Рассчитанное акустическое поле вблизи фокуса (x - z срез) объектива акустического микроскопа с апертурным углом $\alpha = 20^\circ$.

Структура фокуса



Lateral scans of 1070 nm laser beam taken by TAOTF at 1038 nm taken at different z position without the π -Shaper. Position $z = 0$ corresponds to focusing of the laser on the surface of the Pt plate. The power of the laser was 5 W.

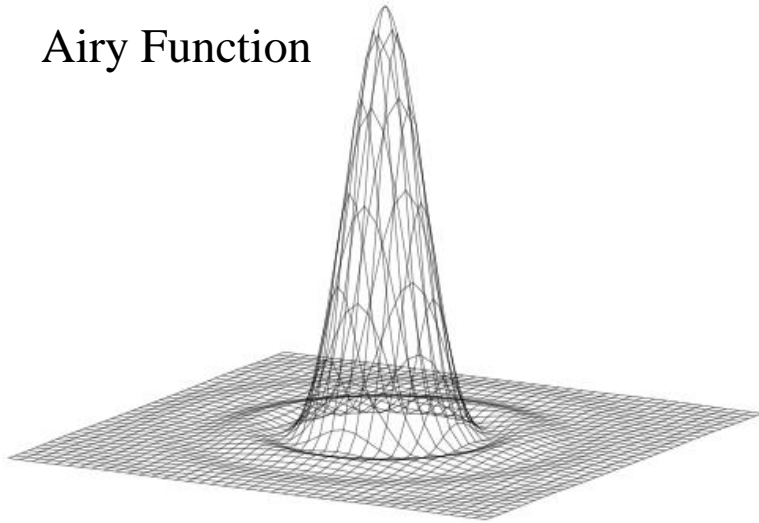
K. M. Bulatov, P.V. Zinin, Y.V. Mantrova, A. A. Bykov, M.I. Gaponov, A. S. Machikhin, I. A. Troyan, I. B. Kutuza. Simultaneous measurements of the two dimensional distribution of infrared laser intensity and temperature in a diamond anvil cell for geophysical applications. *Comptes rendus Geoscience*. **351**(2-3), 286-294 (2019).



Quasi-2D distribution of the power of the IR laser on the steel gasket in a DAC at 1GPa (the pressure was measured before and after laser heating) as a function of the focus position when setting of the π -Shaper was $\text{PSR} = -1 \text{ mm}$: (a) $Z = -100 \mu\text{m}$; (b) $Z = -60 \mu\text{m}$; (c) $Z = 0 \mu\text{m}$; (d) $Z = 100 \mu\text{m}$.

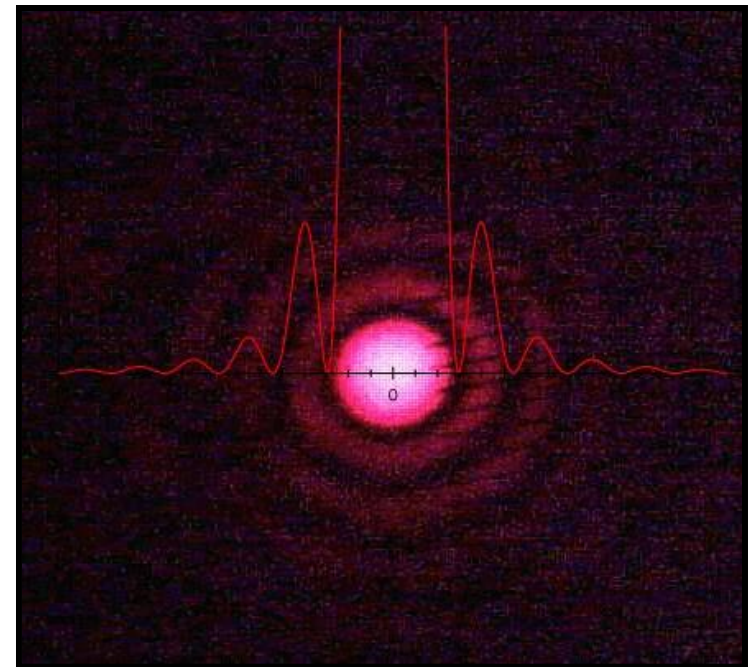
Функции рассеяния точки (Point Spread Function)

Airy Function

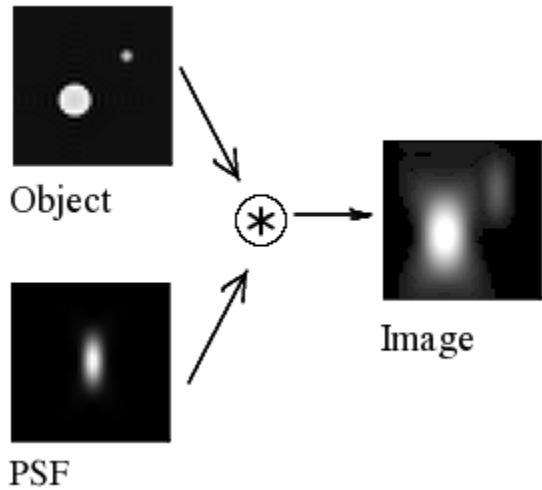


Дифракционная теория точечных функций распространения впервые была изучена Эйри в девятнадцатом веке. Он разработал выражение для амплитуды и интенсивности функции точечного распространения совершенного инструмента, свободного от aberrаций (так называемый Эйри).

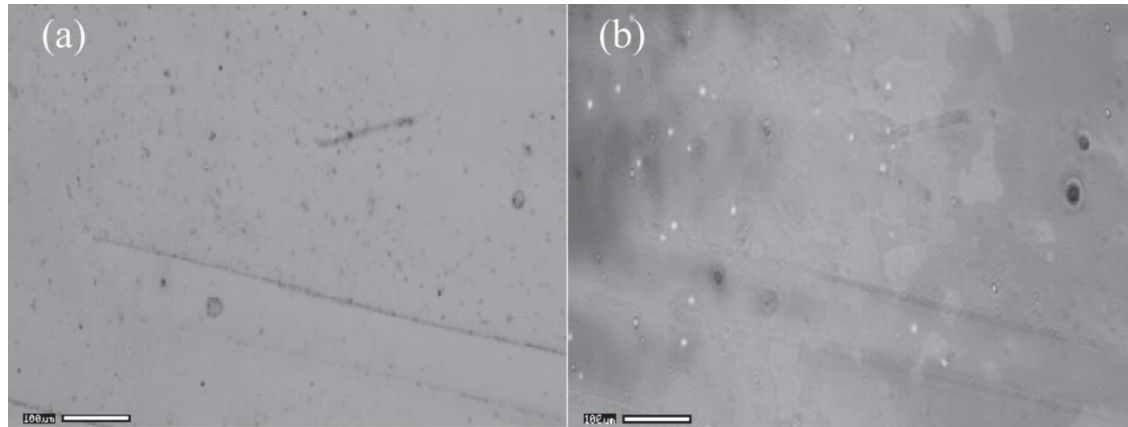
Определение: **Функции рассеяния точки** (**ФРТ**) описывает отклик системы формирования изображения к точечному источнику или точечному объекту. (Wikipedia, 2010).



Функции рассеяния точки (Point Spread Function)

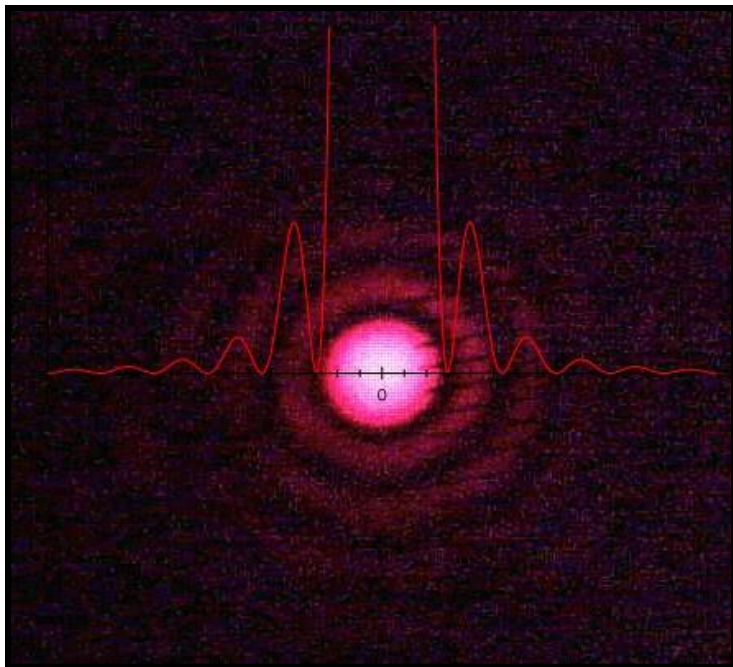


Формирование изображения в конфокальном микроскопе: центральный продольный срез. Полученное трёхмерное распределение является результатом свёртке реальных источников света и ФРТ.



SAM image made by OXSAM of a standard epoxy layer on aluminum at 300 MHz: (a) $Z = 0$; (b) $Z = -26 \mu\text{m}$

Критерий Рэля: условие оптического разрешения



Lateral Intensity Distribution

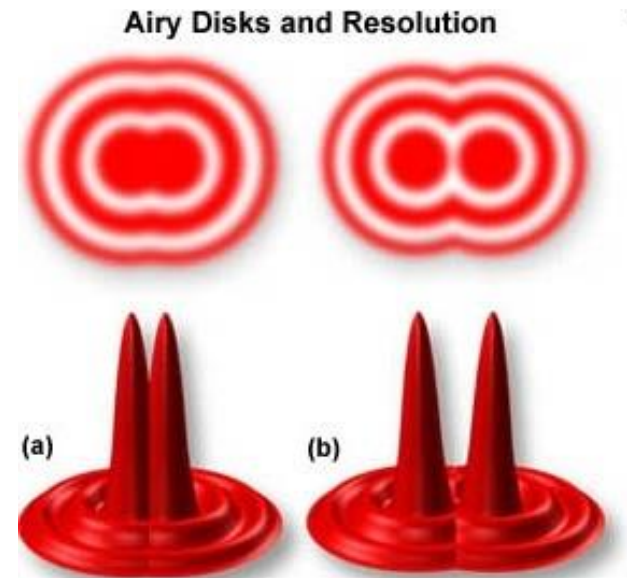


Figure 10

Изображения двух различных точек считаются разрешенными, когда главный дифракционный максимум одного изображения совпадает с первым минимумом другого (Born, Wolf. “Principle of Optics”).

Использование лазеров

Лазер-это устройство, которое излучает свет (электромагнитное излучение) через процесс, называемый стимулированным излучением. Термин лазер является аббревиатурой для усиления света за счет стимулированного излучения

Николай Басов и Александр Прохоров из Советского Союза независимо работали над квантовым генератором и решили проблему систем непрерывного вывода с использованием более чем двух энергетических уровней и создали первый мазер. Эти системы могли бы высвободить стимулированное излучение, не переходя в основное состояние, тем самым поддерживая инверсию численности населения. В 1955 году Прохоров и Басов предложили оптическую накачку многоуровневой системы в качестве метода получения инверсии населенности, которая впоследствии стала одним из основных методов лазерной накачки.

В 1953 году Чарльз Х. Таунс и аспиранты Джеймс П. Гордон и Герберт Дж. Зейгер создали первый микроволновый усилитель-устройство, работающее на принципах, сходных с лазерным, но усиливающее микроволновое, а не инфракрасное или видимое излучение

Таунс, Басов и Прохоров разделили Нобелевскую премию по физике в 1964 году "за фундаментальную работу в области квантовой электроники, которая привела к созданию генераторов и усилителей на основе принципа мазер-лазера."



Nikolay Basov



Aleksandr Prokhorov



Charles H. Townes

Свойства лазеров



Слева направо: АМ. Прохоров, Ч. Таунс, Н.Г. Басов (ФИАН, 1967 г.).

Что касается лазерного излучения, то здесь, пожалуй, можно (условно, конечно) выделить четыре главных фактора: (1) высокую временную когерентность, $\Delta\omega/\omega \sim 10^{-16} - 10^{-17}$, (2) получение сверхкоротких импульсов ($\sim 10^{-15}$ с), (3) высокую мощность (и плотность мощности), до 10^{15} Вт, и (4) большой коэффициент преобразования электрической энергии в световую ($\sim 70\%$), что стало возможным после развития технологии диодных лазеров. (О.Н. Крохин. «К 50-летию создания лазера. Лазер — источник когерентного света». Успехи физических наук. **181**(1) 1-7 (2011).

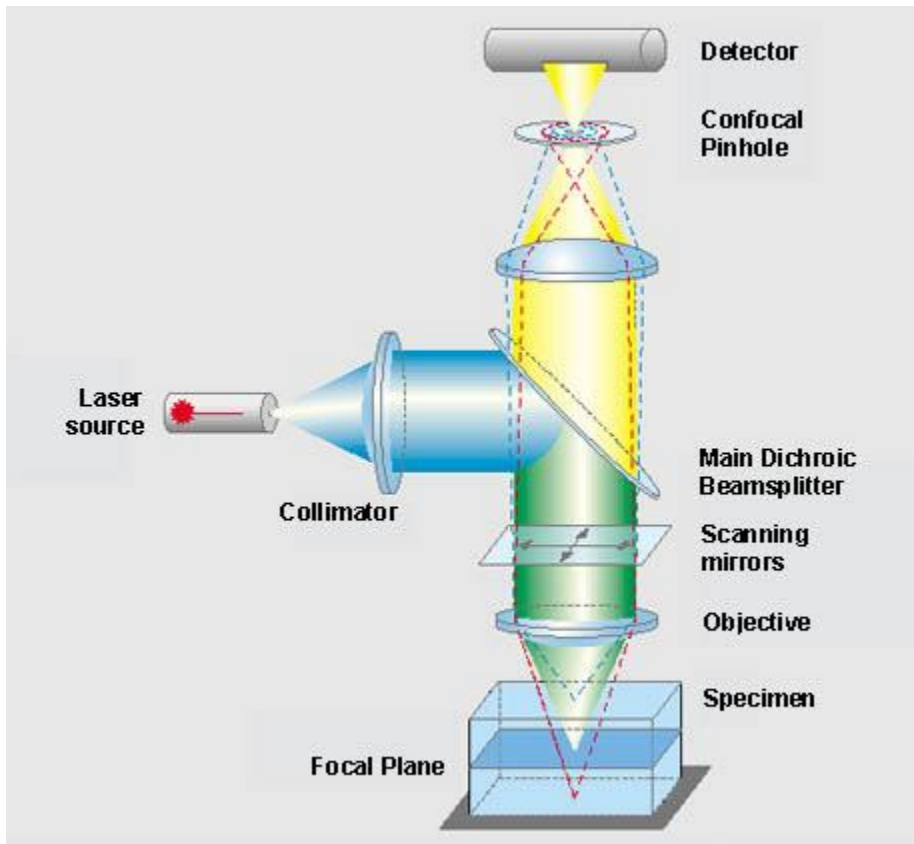
Направленность: На Луне (384 400 км) лазерный луч имеет диаметр 3 км

Монохроматичность: Спектральная ширина может быть узкой до 1 Гц (несущая частота 1015 Гц)

Яркость: Мощность света от 100-ваттной лампы, проходящей через 2-мм щель на расстоянии 1 м, составляет всего 0,05 МВт, в то время как лазер CD-плеера даёт 5 МВт

Способность фокусировать излучение: Лазерный луч может быть сфокусирован на пятно размером с длину волны ($\sim 0,5$ мкм)

Конфокальный лазерный микроскоп



Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (CLSM или LSCM)-это метод получения оптических изображений высокого разрешения с глубинной селективностью. Ключевой особенностью конфокальной микроскопии является ее способность получать изображения в фокусе с выбранных глубин, процесс, известный как оптическое секционирование. Изображения получаются точно и реконструируются с помощью компьютера, что позволяет проводить трехмерные реконструкции топологически сложных объектов

<http://www.olympusfluoview.com/theory/1>

В 1943 году Зюн Коана опубликовала конфокальную систему. В 1951 году Хирото Наора, коллега Коаны, описал конфокальный микроскоп в журнале *Science* для спектрофотометрии. В 1969 и 1971 гг. учёные Дэвид Эггер и Пол Давидович из Йельского университета опубликовали пионерские работы, описывающие первый конфокальный лазерный сканирующий микроскоп. Это был точечный сканер, то есть генерировалось только одно пятно освещения. Они использовали эпи-подсветку в отражённом свете для наблюдения нервной ткани. В качестве источника когерентного излучения использовался 5 мВт гелий-неоновый лазер с длиной волны 633 нм.

Конфокальный лазерный микроскоп



В 1977 году Колин Дж. Р. Шеппард и Амарджиоти Чоудхури опубликовали теоретический анализ конфокальных и лазерно-сканирующих микроскопов. Вероятно, это явилось первой научной публикацией, в которой использовался термин «конфокальный микроскоп».

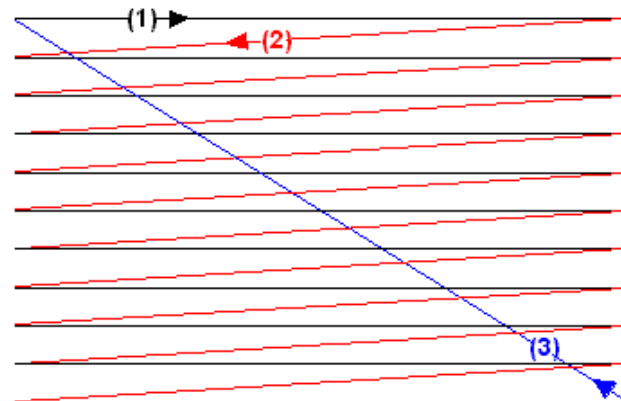
В 1978 и 1980 годах оксфордская группа Колина Шеппард и Тони Уилсона описала конфокальную систему с лазерной подсветкой, сканирующим предметным столиком и фотоумножителями в качестве детекторов. Столик мог перемещаться вдоль оптической оси, что позволяло проводить трёхмерное оптическое послойное секционирование. В 1979 году Фред Бракенхофф и его коллеги продемонстрировали, что теоретические преимущества оптического секционирования и улучшение оптического разрешения действительно достижимы на практике. В 1983 году И. Кокс и Ш. Шеппард опубликовали первую работу, в которой конфокальный микроскоп управлялся персональным компьютером.

Конфокальный лазерный микроскоп

Генерация изображений методом сканирования в основном отличается от функциональности обычного оптического микроскопа, который является самым старым типом микроскопа. Обычный микроскоп можно рассматривать как систему параллельной обработки, в которой мы можем видеть все точки объекта одновременно. В отличие от этого, конфокальный микроскоп представляет собой последовательную систему визуализации, в которой лазерный луч фокусируется на образце. Лазерный луч рассеивается образцом, а рассеянный свет регистрируется фотоприемником. Выходной сигнал - это всего лишь одно напряжение. При сканировании образца напряжение регистрируется в каждом положении сканирования фокуса и генерируется изображение в оттенках серого.

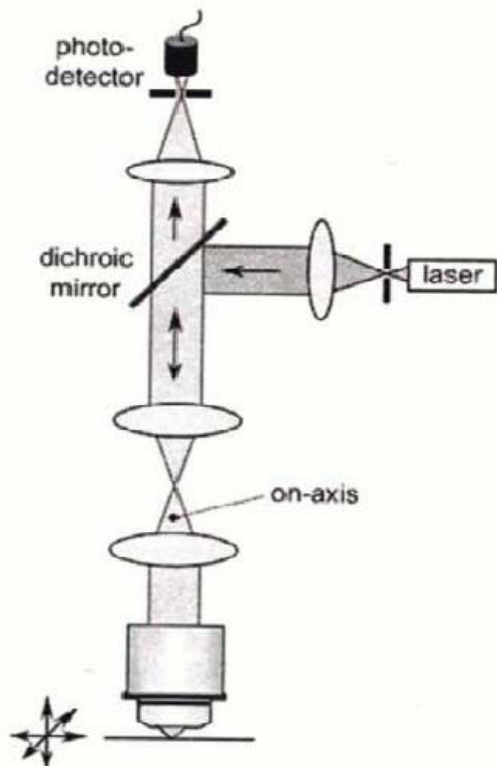
Трассировка растрового сканирования: начиная с верхнего левого края экрана и переходя к нижнему правому краю, электронный луч одновременно включается на линию (1), затем выключается, чтобы вернуться к следующей линии (2), а затем снова выключается, чтобы вернуться к верхней части (3).

From Computer Desktop Encyclopedia
© 2001 The Computer Language Co. Inc.



Сканирование в конфокальной лазерной микроскопии

Specimen scanning



Laser scanning

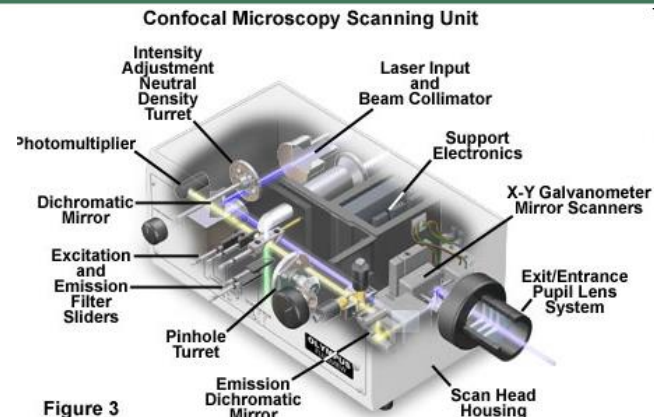
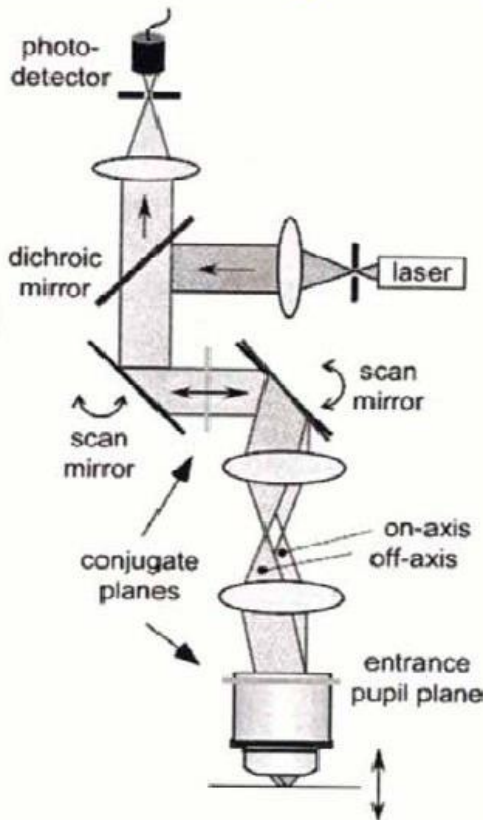


Figure 3

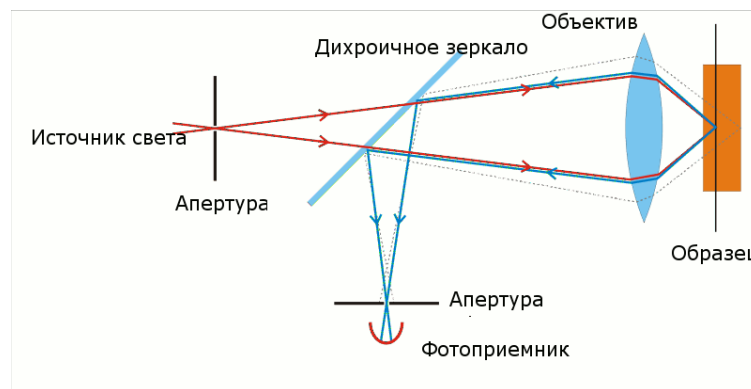
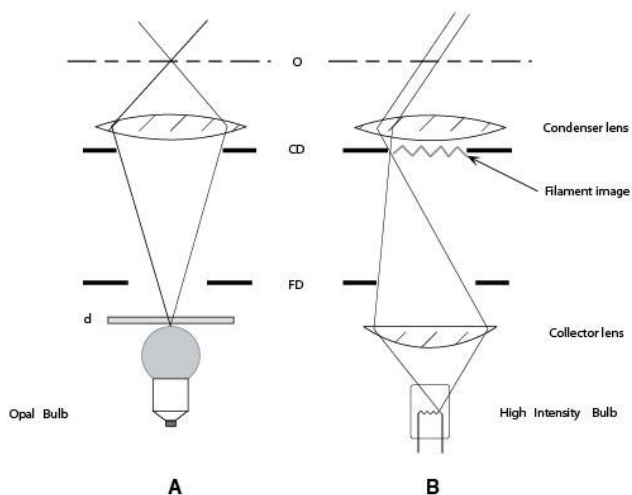
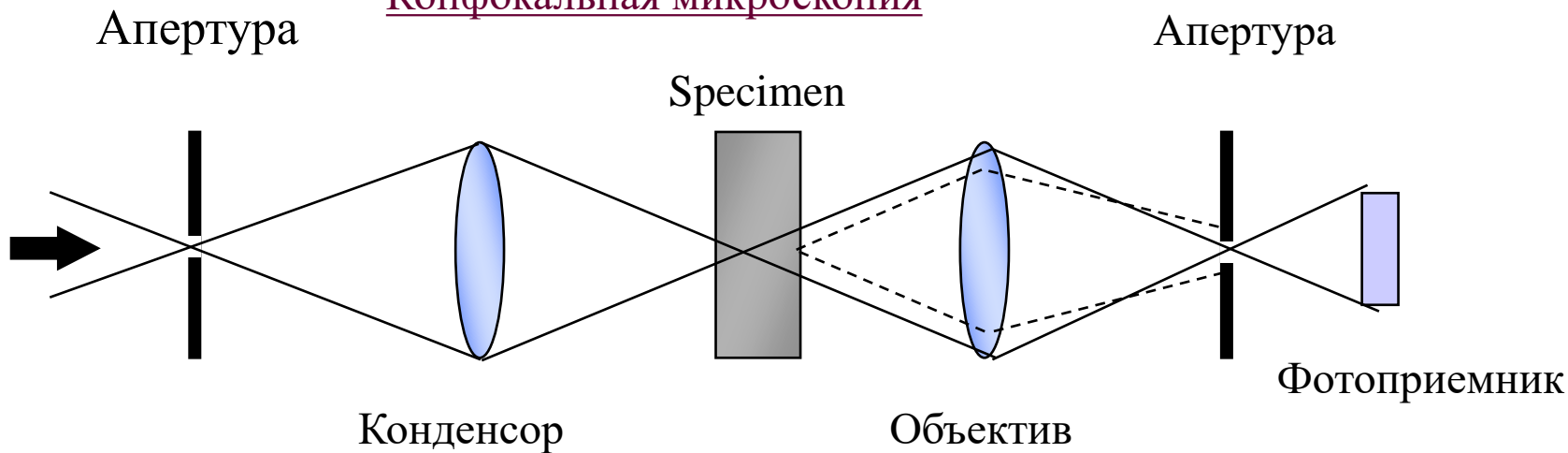
www.zeiss.de

Генерация изображения при сканировании принципиально отличается от функциональности обычного оптического микроскопа

Обычный микроскоп можно рассматривать как систему параллельной обработки, в которой мы можем видеть все точки объекта одновременно. В отличие от этого, сканирующий оптический микроскоп представляет собой последовательную систему визуализации, в которой лазерный луч направляется на образец. Луч рассеивается образцом, а рассеянный лазерный луч обнаруживается детектором. Выходной сигнал - это всего лишь одно напряжение. При сканировании образца напряжение записывается в каждом положении сканирования фокуса и генерируется изображение в оттенках серого

Как формируется изображение в конфокальном микроскопе

Конфокальная микроскопия



Традиционный микроскоп

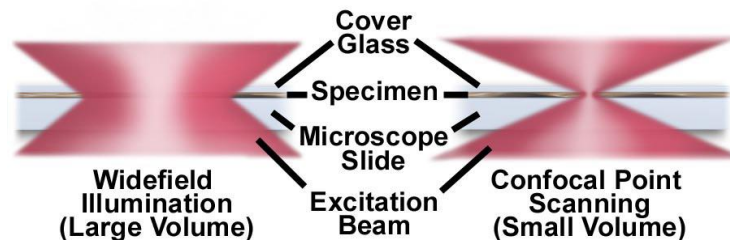
Широкопольная по сравнению с конфокальной микроскопией освещает объемы, демонстрируя разницу в размерах между точечным сканированием и широкопольным возбуждением световых пучков..

Функция рассеяния точки конфокального акустического микроскопа

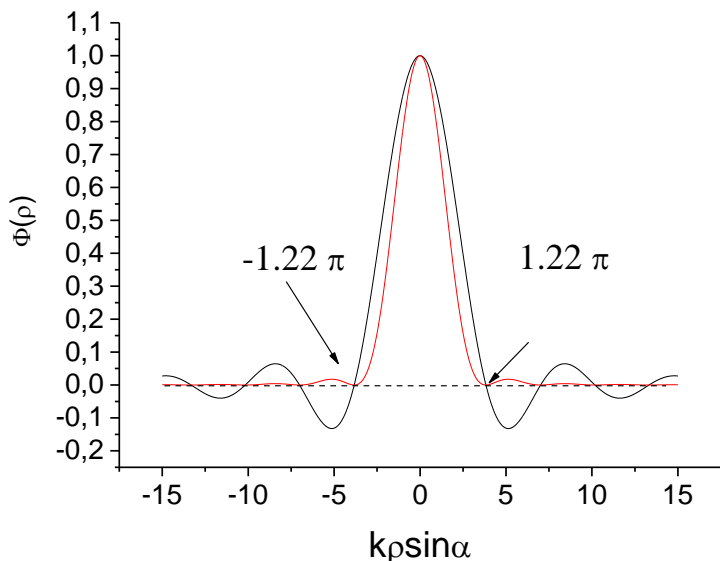
$$PFS_{tot}(x, y, z) = PFS_{ill}(x, y, x) \bullet PFS_{ill}(x, y, x)$$

В микроскопе, работающем в режиме на отражение

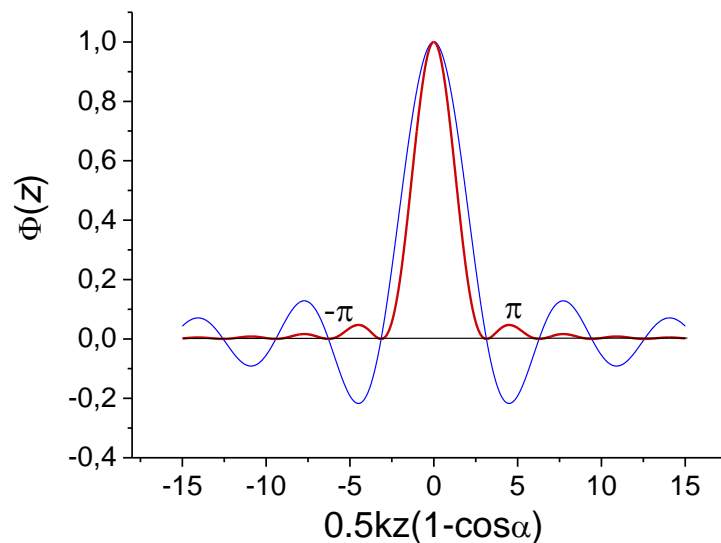
$$PFS_{tot}(x, y, z) = [PFS_{ill}(x, y, x)]^2$$



При возведении в квадрат функции рассеянии точки, положение нулей функции не меняется.

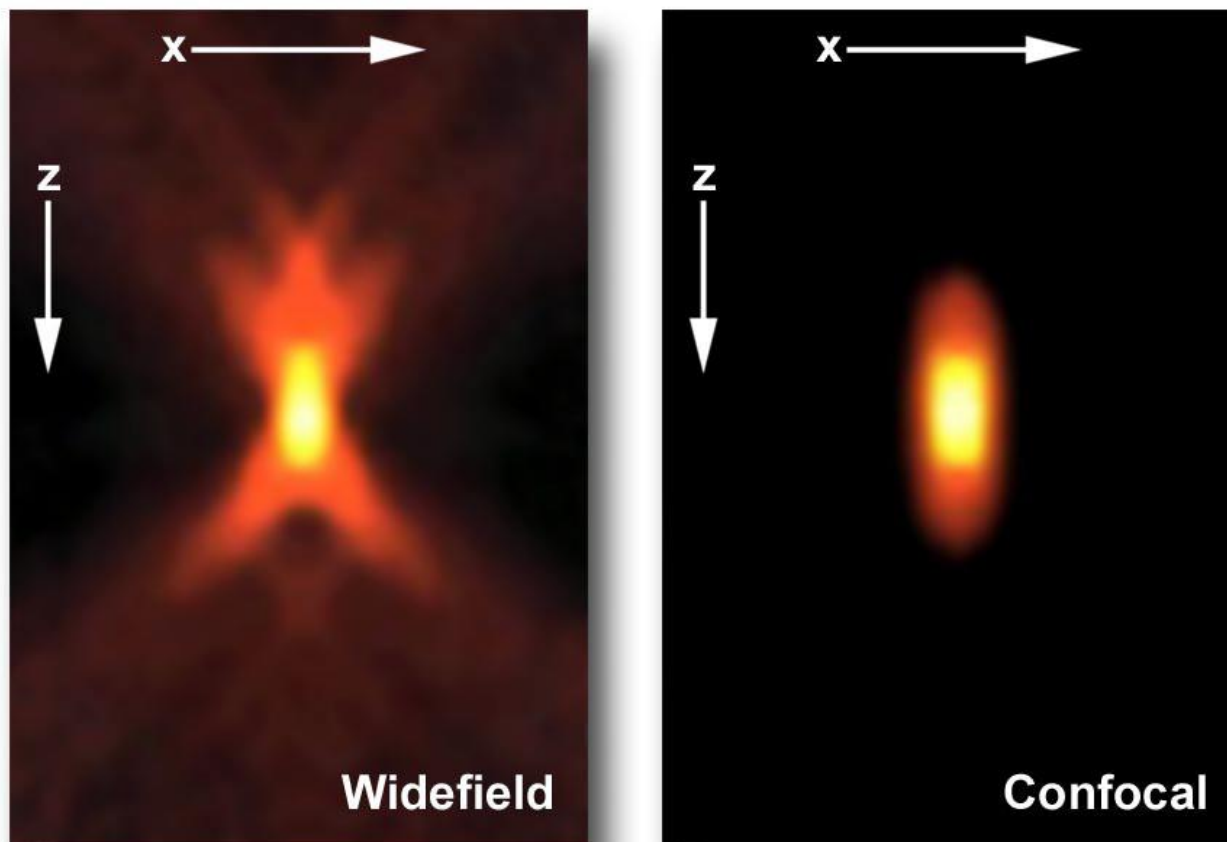


Амплитуда распределения поля в латеральном направлении



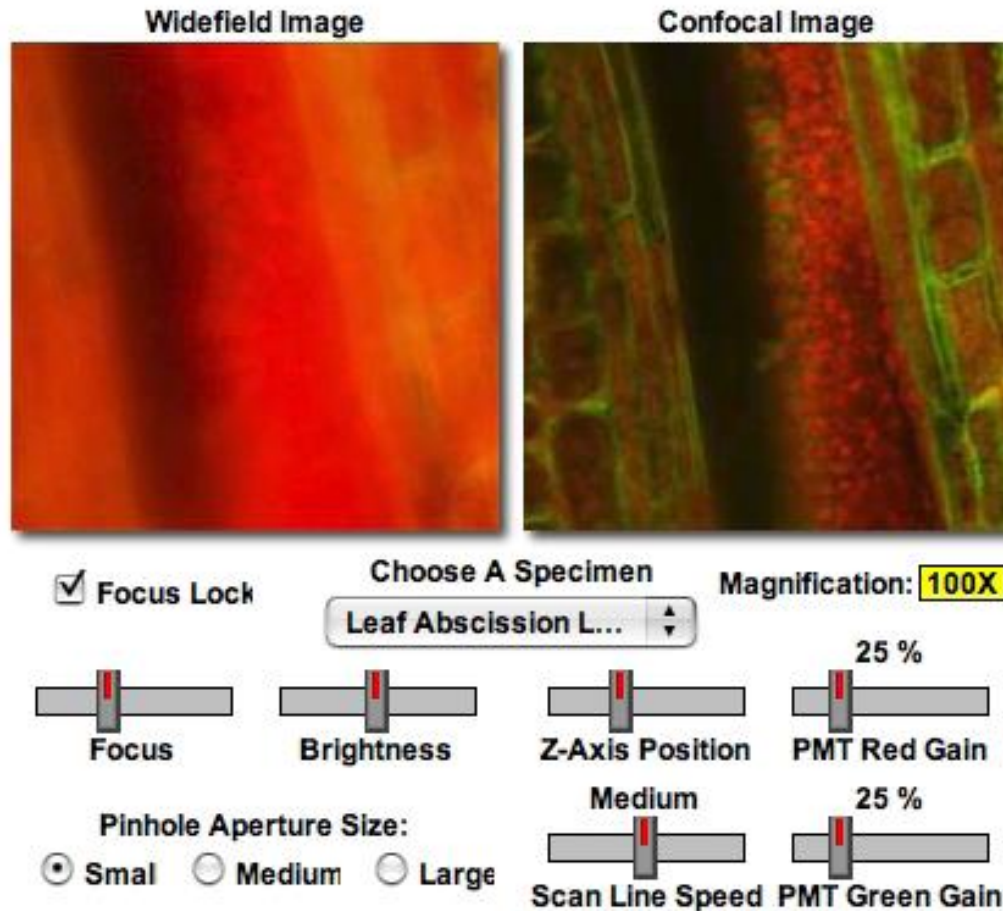
Распределение поля в фокальной области вдоль оси z

Построение трехмерных изображений в конфокальной и широкопольной оптической микроскопии



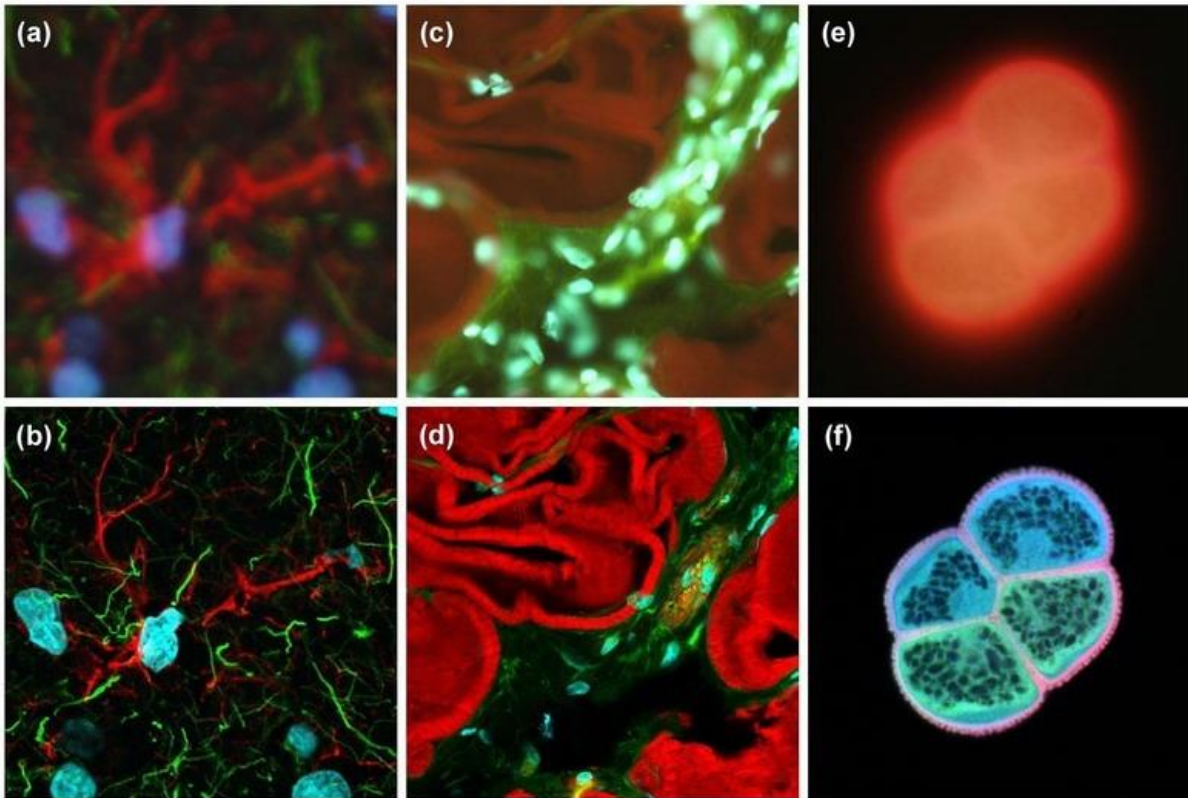
Сравнение структуры функции рассеяния точки широкопольного (слева) и конфокального (справа) оптических микроскопов (from Claxton, Fellers, Davidson, *Confocal Microscopy*).

Эффект апертуры



<http://www.micro.magnet.fsu.edu/primer/virtual/confocal/index.html>

Преимущества конфокальной микроскопии



- Уменьшенное размытие изображения от рассеяния света
- Повышенное эффективное разрешение
- Улучшенное соотношение сигнал / шум
- Четкое исследование толстых образцов
- Сканирование по оси Z
- Восприятие глубины в Z-секционных изображениях
- Увеличение можно регулировать электронным способом

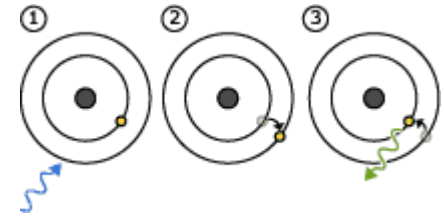
Сравнение изображений широкоугольной (верхний ряд) и лазерной сканирующей конфокальной флуоресцентной микроскопии (нижний ряд). Обратите внимание на значительное количество сигнала в широкопольных изображениях от флуоресцентных структур, расположенных вне фокальной плоскости. (а) и (б) толстый участок гиппокампа головного мозга мыши обработали первичными антителами к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP; красный), нейрофиламентам Н (зеленый) и контр-окрашивали Hoechst 33342 (синий) для выделения ядер. (с) и (d) толстый участок гладкой мускулатуры крысы, окрашенный фаллоидином, конъюгированным с Alexa Fluor 568 (нацеленным на актин; красный), агглютинин зародышей пшеницы, конъюгированный с Орегонским зеленым 488 (гликопротеины; зеленый) и конъюгированный с DRAQ5 (ядра; синий). е) и f) тетрадная автофлуоресценция зерен пыльцы подсолнечника (по данным Клакстона, Феллера, Дэвидсона, конфокальной микроскопии).

Флуоресценция



Флуоресценция - это излучение света веществом, которое поглотило свет или другое электромагнитное излучение другой длины волны. В большинстве случаев испускаемый свет имеет большую длину волны, а следовательно, и меньшую энергию, чем поглощенное излучение(Wikipedia, 2010).

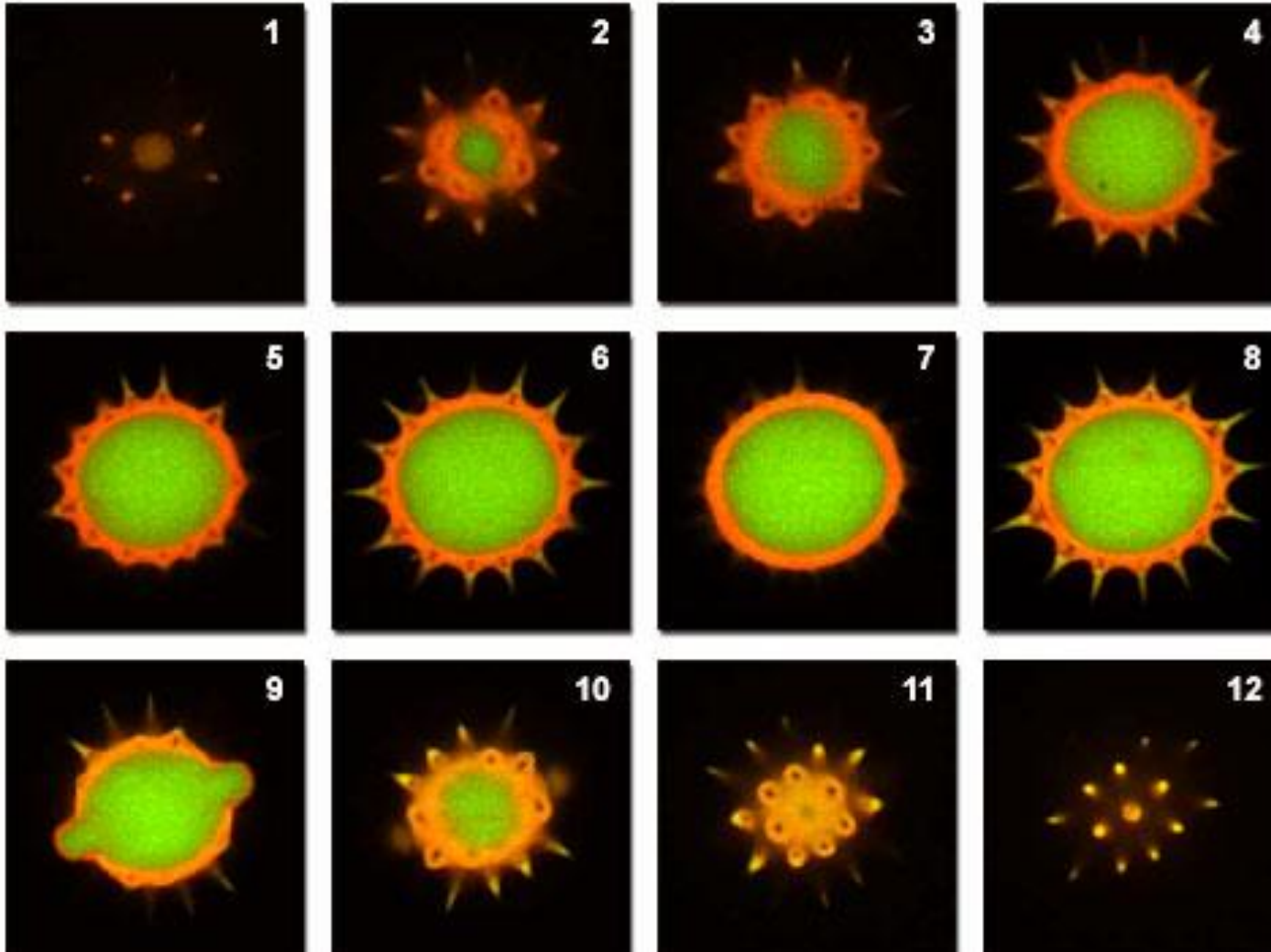
Флуоресцентные минералы излучающие видимый свет при воздействии ультрафиолетового излучения(Wikipedia, 2010).



Принцип флуоресценции
1. Энергия поглощается атомом, который становится возбужденным. 2. Электрон переходит на более высокий энергетический уровень. 3. Вскоре электрон возвращается в основное состояние, испуская фотон (или пакет света) - атом флуоресцирует.

Построение трехмерных изображений в конфокальной оптической микроскопии

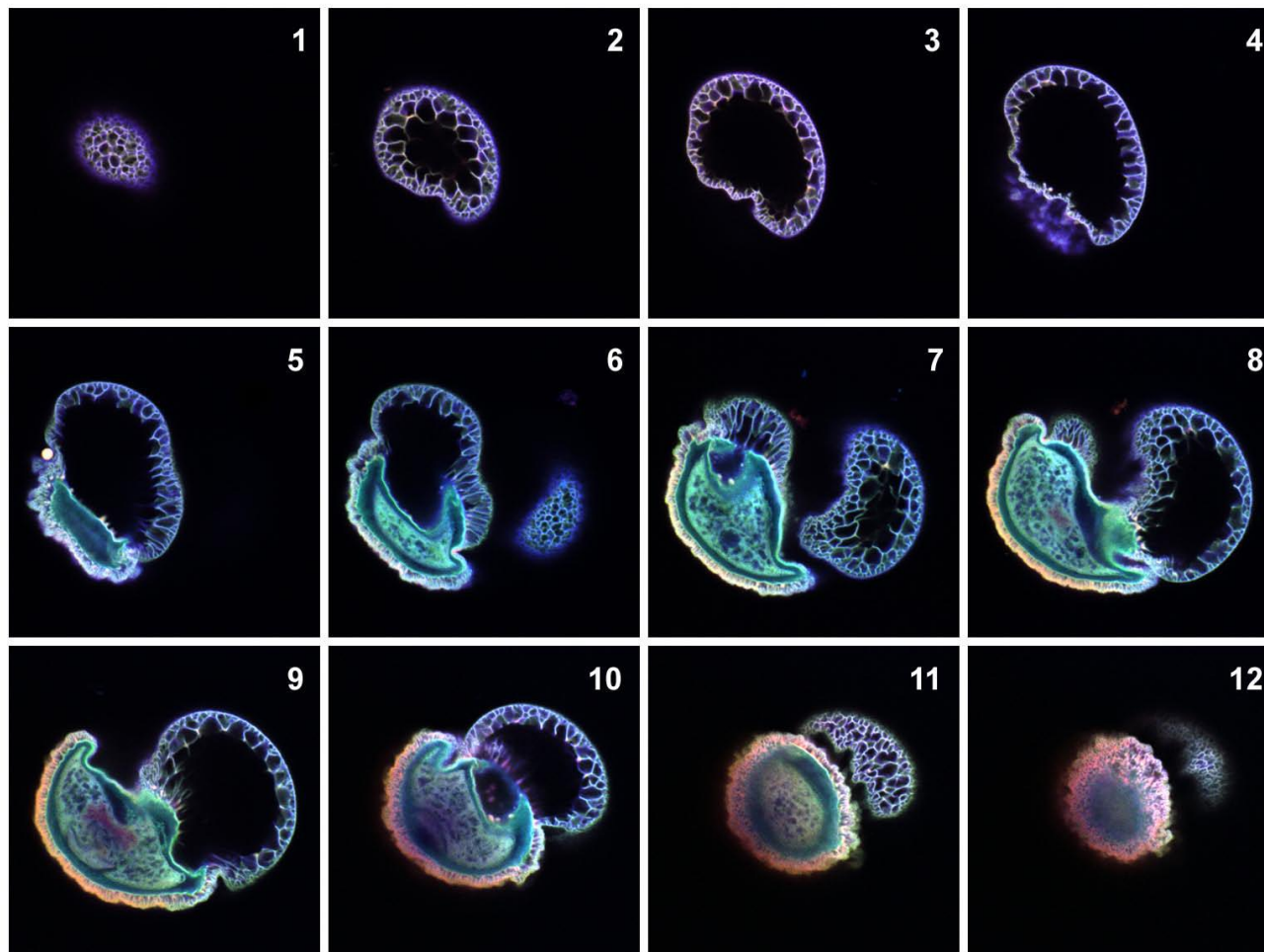
Pollen Grain Serial Optical Sections by Confocal Microscopy



Перемещение Z-
ступени вверх/вниз

- При каждом значении z сканируйте поле x-y, чтобы получить "оптический срез"
- "Стопка" оптических срезов представляет собой объемное (трехмерное) изображение

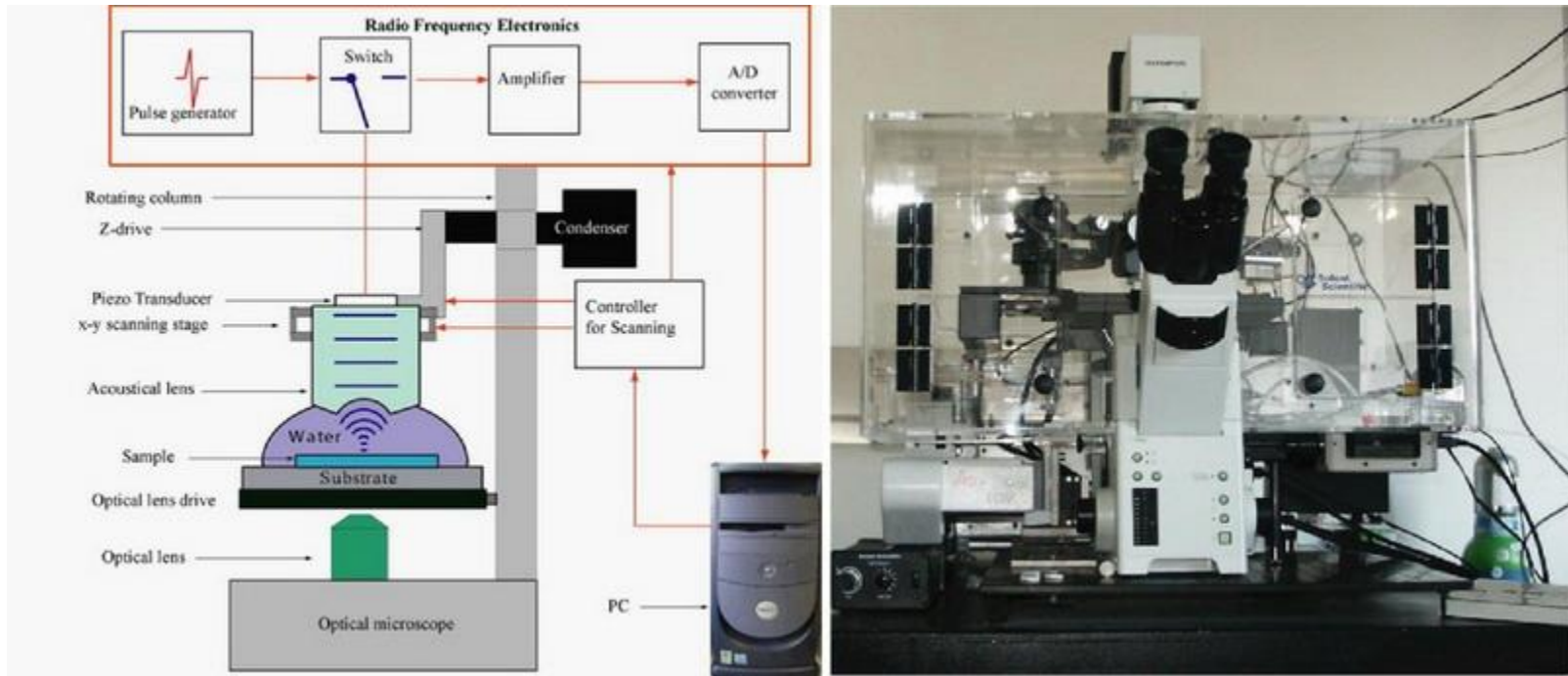
Пыльцевые зерна сосны (*Pinus contorta*)



Частицы пыльцы монтировали с помощью CLSM и снимали с помощью 100-кратного масляного погружного объектива с осевыми шагами 1 микрометр. Каждое изображение в последовательности (1-12) представляет собой вид, полученный с шагом в 3 микрометра (from Claxton, Fellers, Davidson, *Confocal Microscopy*).

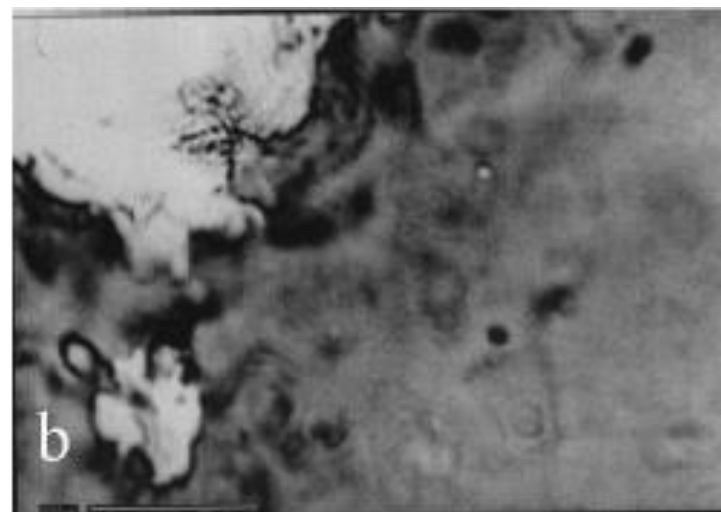
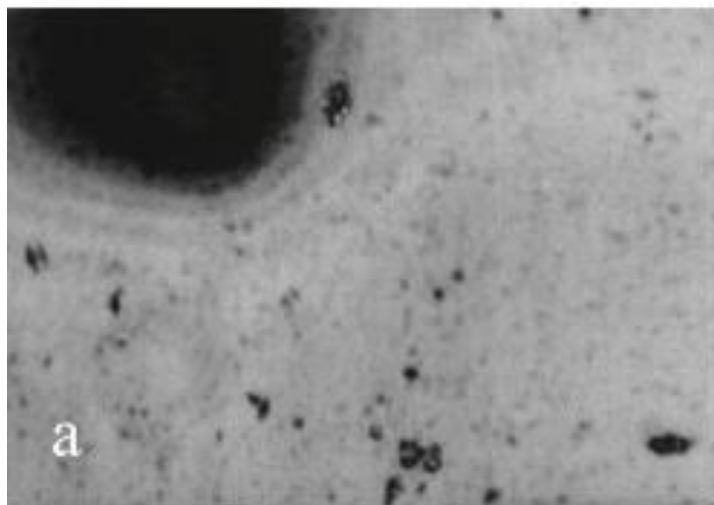
Конфокальный акустический микроскоп

Акустический микроскоп был разработан как инструмент для изучения внутренней микроструктуры непрозрачных твердых тел или биологических материалов. В акустической микроскопии образец изображается ультразвуковыми волнами, и контраст в отражении дает карту пространственного распределения механических свойств



Принципиальная схема комбинированного оптического и акустического микроскопа (Weiss, Lemor, Zinin et al., IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Contr., 54 2257, 2007). Фотография импульсного акустического микроскопа (SASAM) совмещенного с оптическим микроскопом (Olympus IX81), разработанного в Fraunhofer-Institute for Biomedical Technology, St. Ingbert, Germany.

Визуализация подповерхностных структур в акустической микроскопии

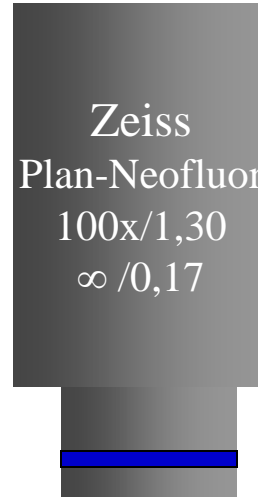
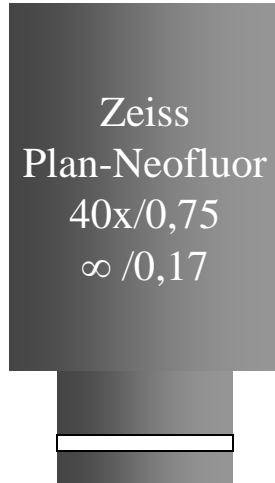


Акустические изображения разрушенного соединения между 15 мкм эпоксидным слоем и 1 мкм оксидным слоем на чистом алюминии. Образец находился в воде 90°C в течение 22 дней. (а) расстояние расфокусировки – 0 мкм, в левом верхнем углу виден поверхностный блистер; (б) расстояние расфокусировки – 65 мкм, в белом квадрате видно начало деградации.

Оптические объективы и их производители

Масляная Иммерсионная Линза

Обычная воздушная линза



Plan Objectives

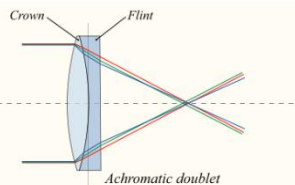
(Планахроматические объективы) В планобъективах исправлена кривизна изображения по полю, что обеспечивает резкое изображение объекта по всему полю наблюдения. Кроме того, объективы имеют и ахроматическую коррекцию, что позволяет их использовать для рутинной работы.

An achromatic lens

Ахроматические объективы рассчитаны для применения в спектральном диапазоне 486–656 нм. Исправление любой аберрации (ахроматизация) выполнено для двух длин волн. В этих объективах устранены сферическая аберрация, хроматическая аберрация положения, кома, астигматизм и частично сфероахроматическая аберрация.

100x/1,30 Lens Magnification / NA
 ∞ /0,17 Tube length / Cover slip thickness
(0,17 = 1½ Cover slip)

Infinity lenses – Бесконечные линзы-в микроскопии термин "бесконечность" означает, что объективы предназначены для проецирования своих изображений на бесконечность, а не на какое-то конечное расстояние. Традиционные микроскопы brightlight имели фиксированную "фокусную точку на 160 мм, установленную стандартом в 1800-х гг. оптическая система infinity обеспечивает "бесконечную" область параллельного света между объективом и окуляром, выталкивая изображение из приближающейся бесконечности.



Оптические объективы и их производители

Reflected Light
Microscope
Tube Length

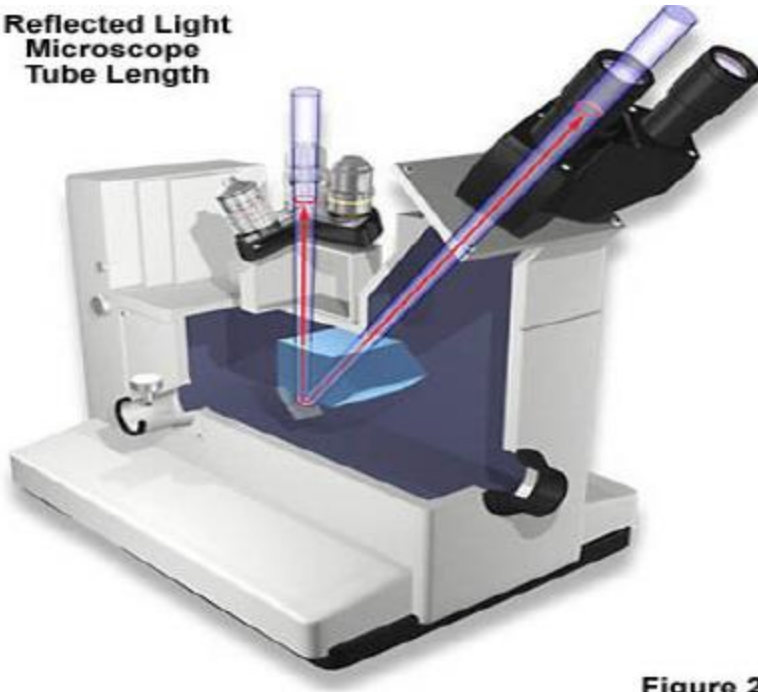


Figure 2

МАРКИРОВКА ОБЪЕКТИВА

АНАТОМИЯ ОБЪЕКТИВА

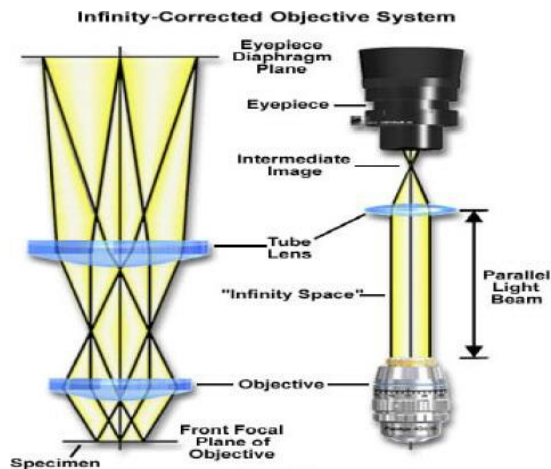


Figure 3

- WD (рабочее расстояние) расстояние между передней линзой объектива и верхней частью покровного стекла
- * NA (числовая апертура)
- ∞: коррекция на бесконечную длину тубуса
- \$ 4,000 ~ \$ 25,000 для исследования нефти или воды

Содержание лекции

- Определение сферических и плоских волн
- Моделирование распределения поля вблизи фокуса с использованием подхода Дебая
- Аксиальное и латеральное разрешение разрешения
- Принципы конфокальной оптической микроскопии
- Принципы конфокальной акустической микроскопии

Домашнее чтение

1. P. Zinin, W. Arnold, W. Weise, S. Berezina, “Theory and Applications of Conventional and Atomic Force Acoustic Microscopies”, in T. Kundu ed., *Ultrasonic Nondestructive Evaluation: Engineering and Biological Material Characterization*. Taylor & Francis, N.Y., chapter 11, second edition, 613-687 (2012).
2. Борн М., Вольф Э., Основы оптики, 1973.
3. Новотный, Л.Б. Хехт, *Основы нанооптики*. 2009, Москва: Физматлит.
4. M. W. Davidson, M. Abramowitz, *Optical Microscopy*, in *Encyclopedia of Imaging Science and Technology*. 2002, John Wiley & Sons.
5. А. Марешаль, М. Франсон. *Структура оптического изображения*. Москва: Мир, 1964.