

Optikai mikroszkópia

Bereznai Miklós

SZTE Optika és Kvantumelektronikai Tanszék

Vázlat

- A mikroszkópiáról általában
- Lupétól a mikroszkópig (nagyítás)
- Mikroszkóp feloldási határa
- Lencsehibák
- Fejezetek a mikroszkópia történetéből
- Az optikai mikroszkóp üzemmódjai
 - Transzmissziós
 - Reflexiós (világos/sötét-látóterű)
 - Polarizációs
 - Fluoreszcencia
- Konfokális mikroszkópia
- Digitális képfeldolgozás alapok

A KÉP

A valós világ egy részének valamilyen transzformáció általi leképezése

Tárgy
(objektum)

- egzakt (matematikai)
- nem egzakt

kölcsönhatás
által

Kölcsönhatások:

- fény
- elektromágneses
- mechanikai
- elektron
- kvantummechanikai



Anyag

Mikroszkópia:

- optikai
- röntgen, SNOM
- AFM
- elektron
- STM

Kölcsönhatás módja:

- nem lokális = nyalábkölcsönhatás
- lokális = pásztázó üzemmód

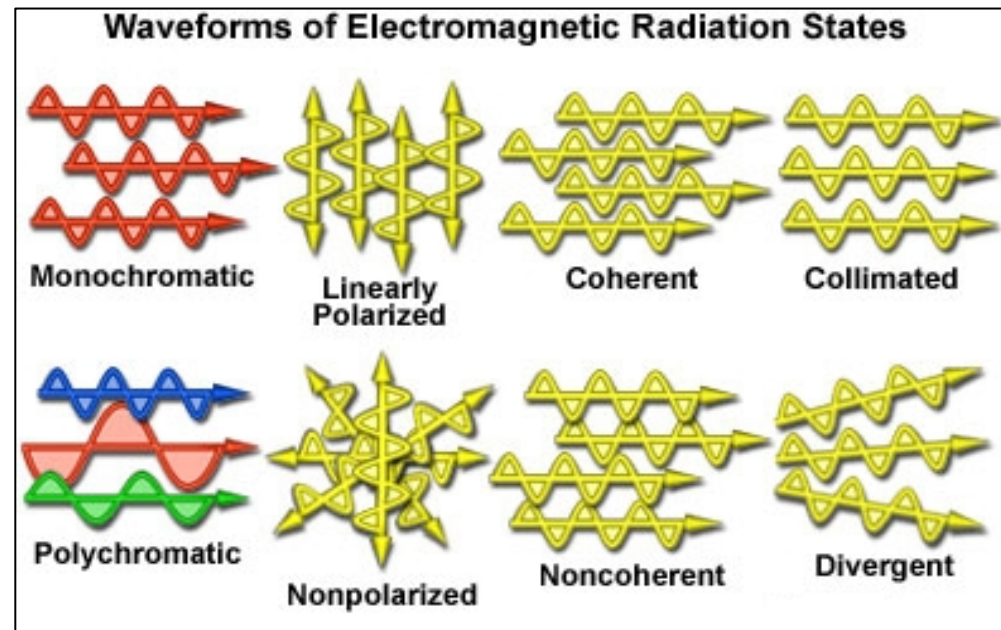
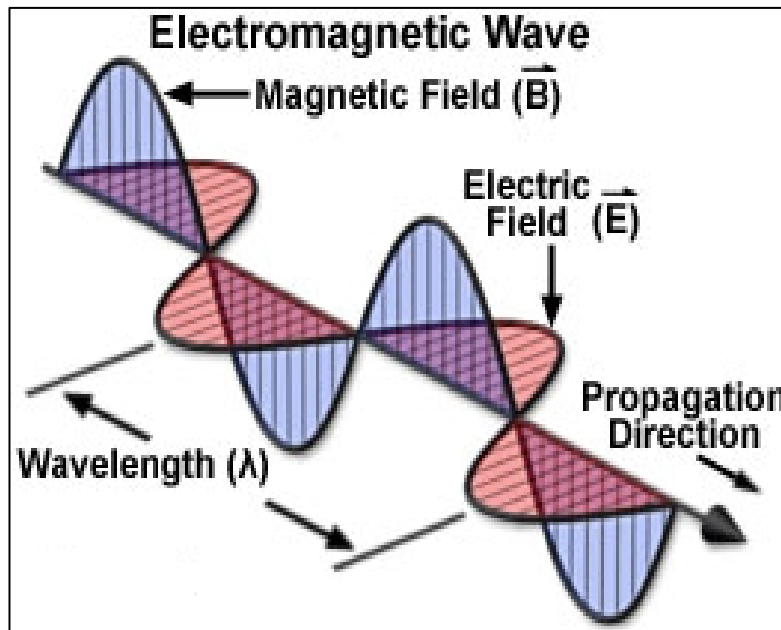
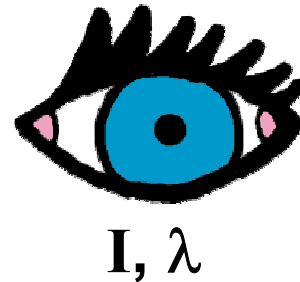
A fény fizikai tulajdonságai

Fény-anyag kölcsönhatás során az információ kódolva van a fény valamelyik fizikai tulajdonságában. pl:

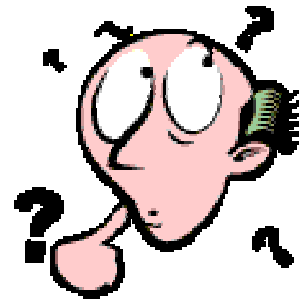
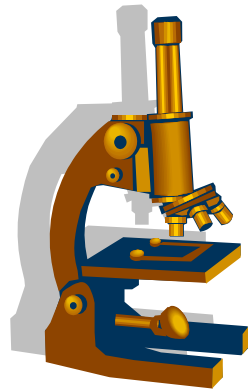
- irányában
- amplitúdójában
- fázisában
- frekvenciájában
- polarizációs állapotában

üzemmódok:

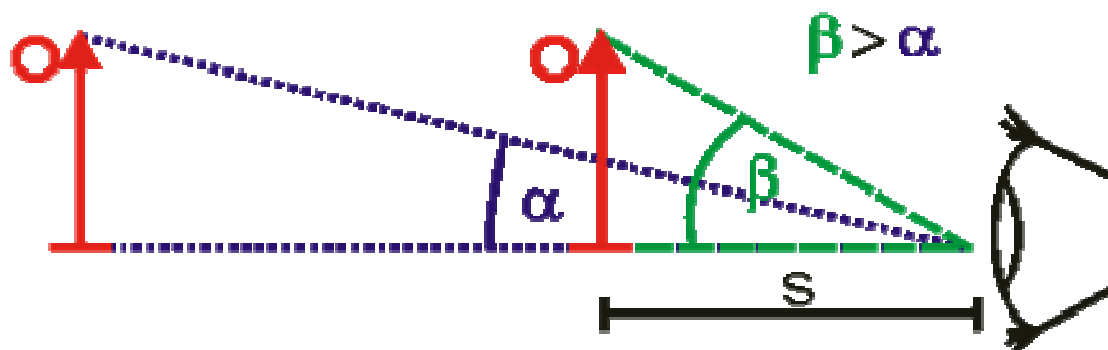
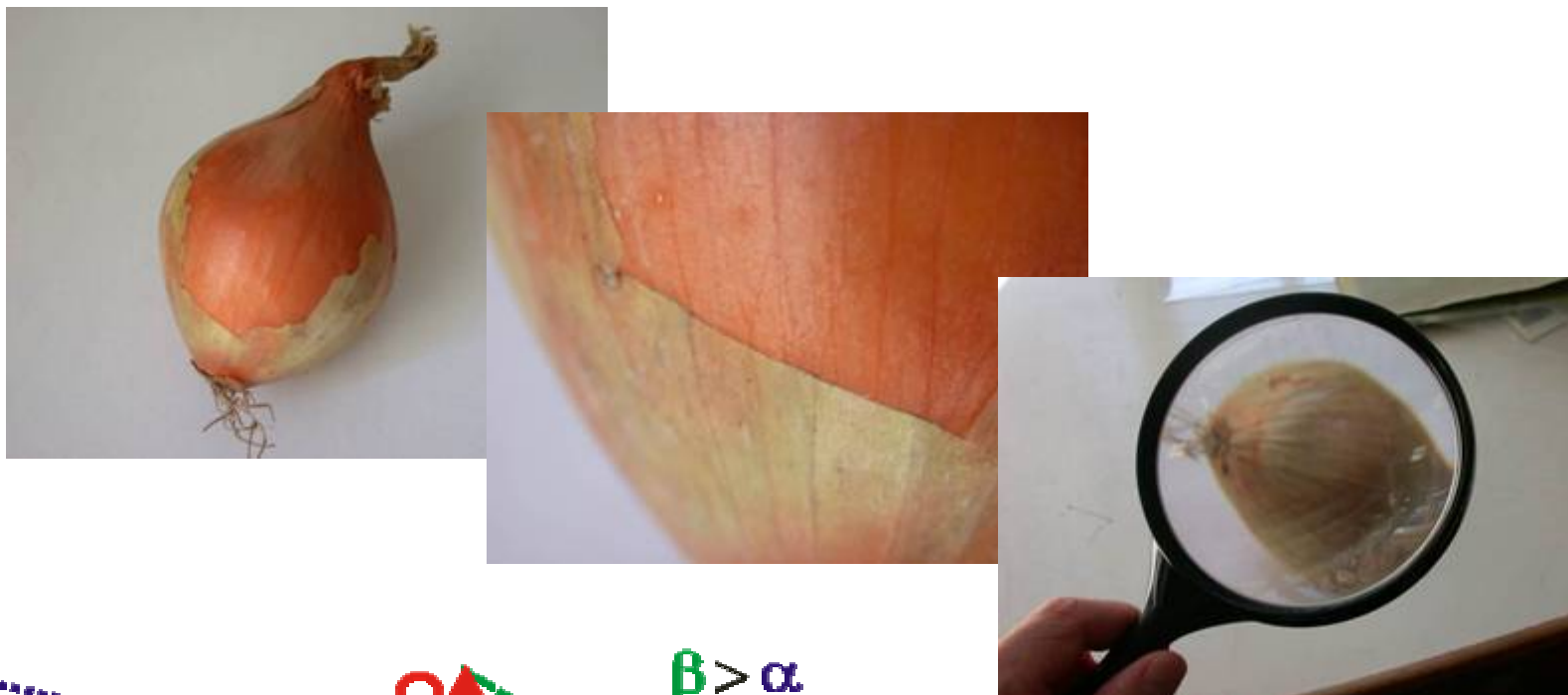
- reflexió
- transzmisszió
- fáziskontraszt
- fluoreszcens
- polarizációs



Mire jó a mikroszkóp?



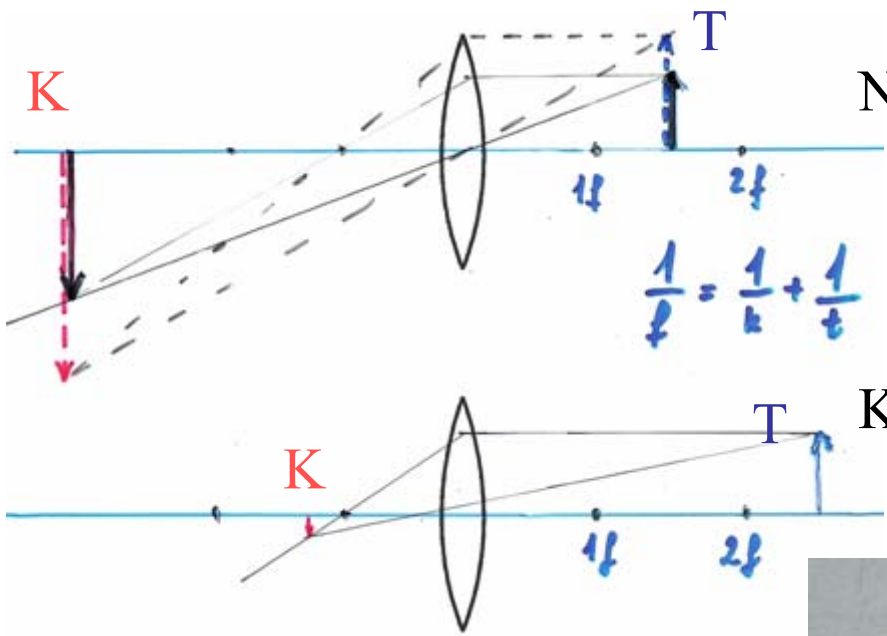
Látószög, tisztalátás távolsága:



látószög-határ: $\alpha > 0^{\circ}1'$

tisztalátás távolsága: $s \sim 25\text{-}30\text{ cm}$

Gyűjtő (domború) lencse képalkotása:



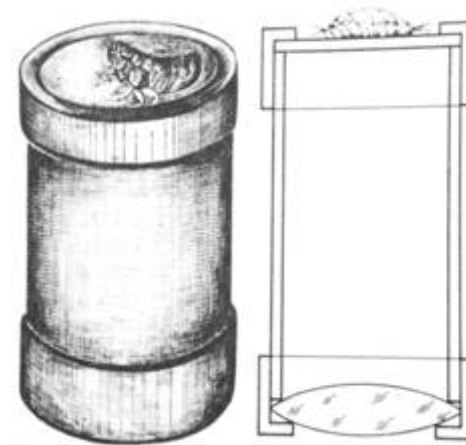
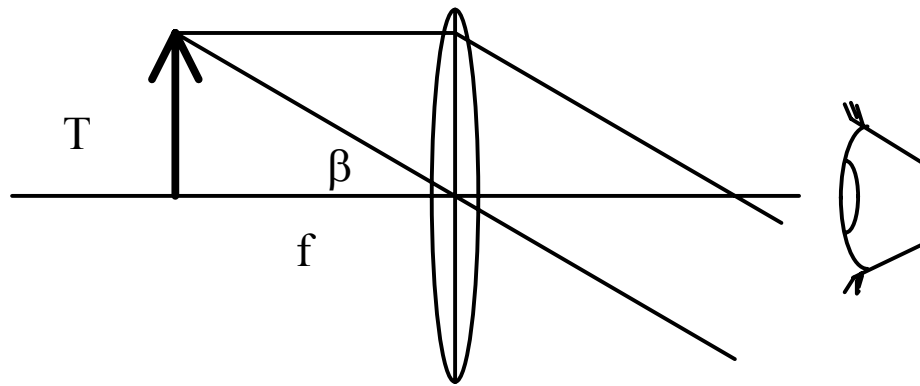
Nagyított, fordított állású kép

Kicsinyített, fordított állású kép

Valódi képek →
ernyőn felfoghatók



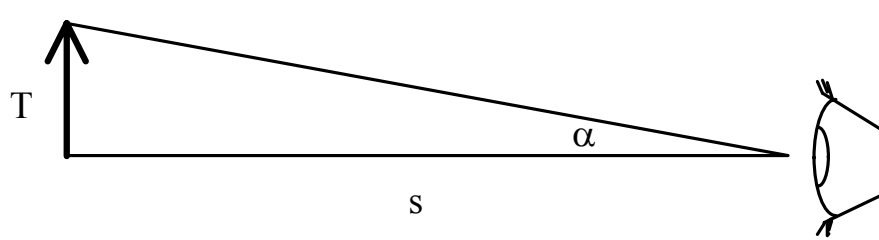
Egyszerű nagyító (lupe):



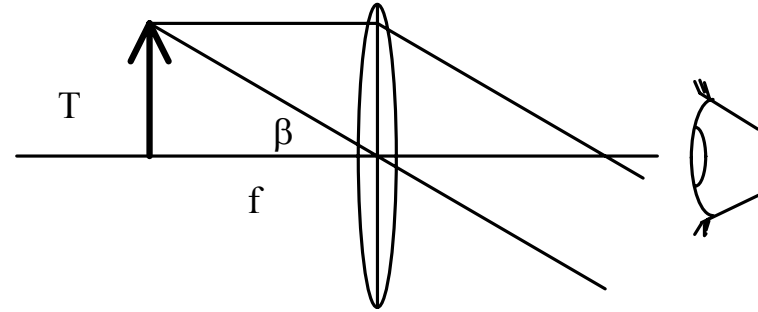
Nagyított, egyenes állású, virtuális kép

Bolhanézó üveg
(16.sz. vége)

A lupe nagyítása:



$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{T}{s}$$

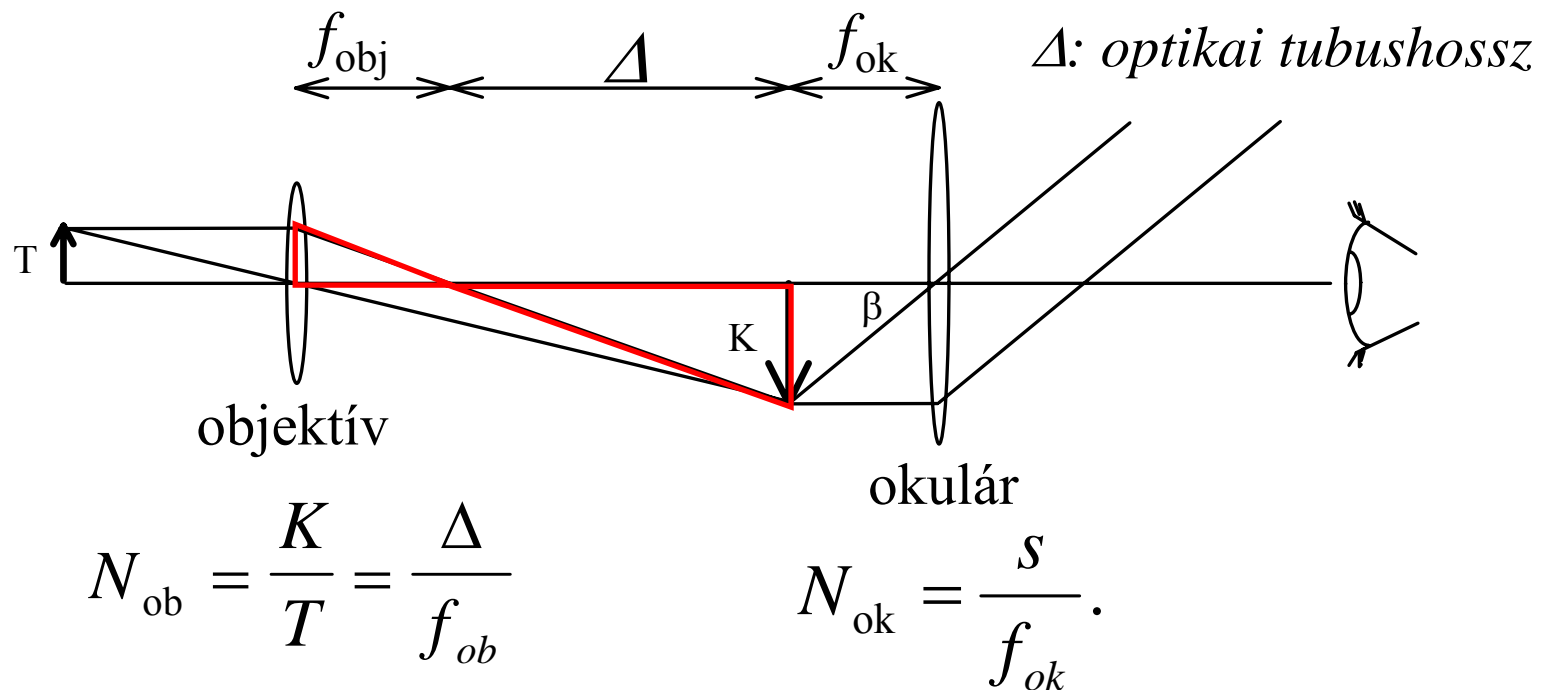


$$\operatorname{tg} \beta = \frac{T}{f}$$

Kis szögek esetén a szögnagyítás az alábbi formulával közelíthető:

$$N = \frac{\beta}{\alpha} \approx \frac{\operatorname{tg} \beta}{\operatorname{tg} \alpha} = \frac{s}{f} \quad \sim 5\times$$

Mikroszkóp nagyítása:



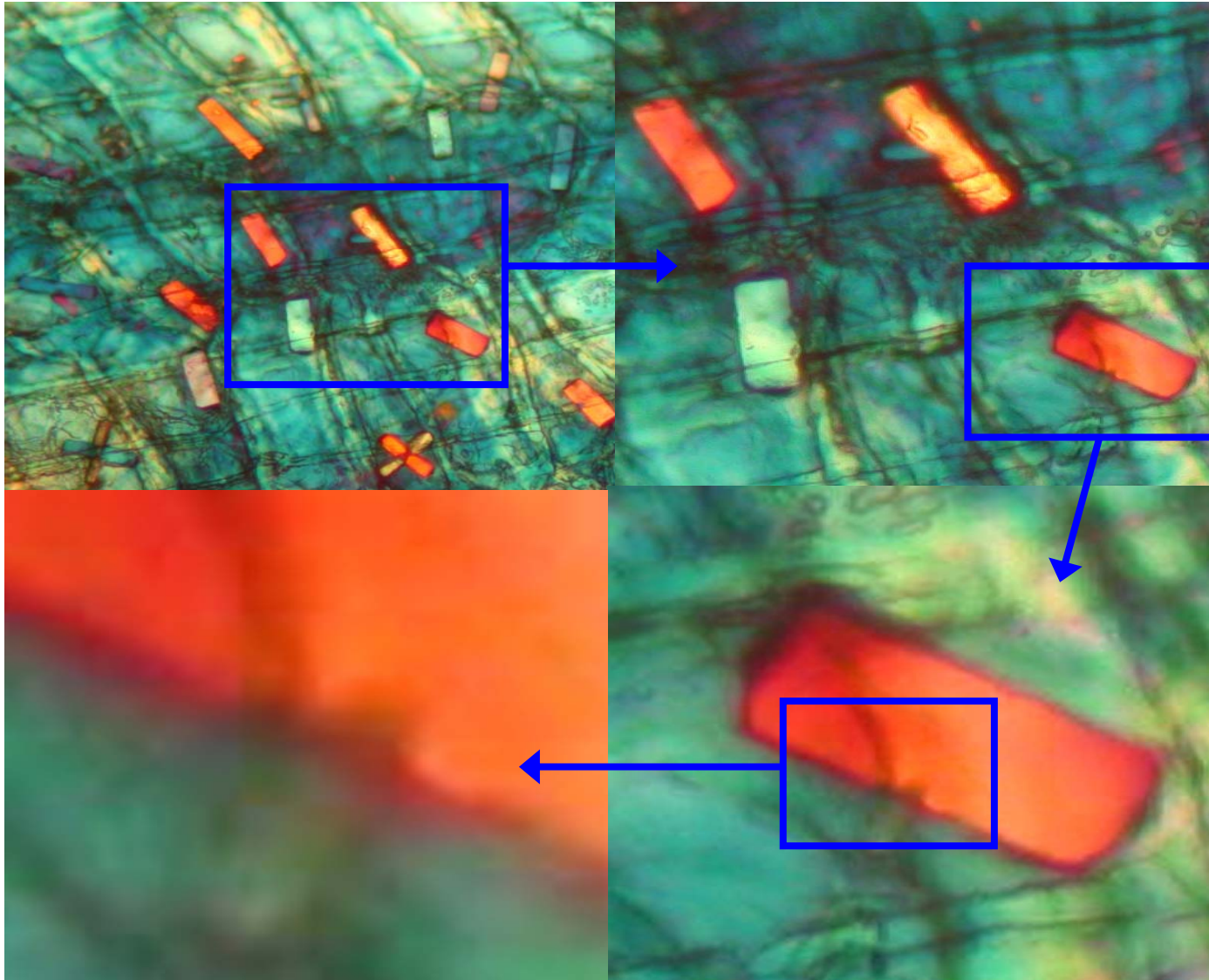
A tárgyról (T) az *objektív* nagyított, valódi és fordított állású, ún. közbülső képet (K) ad, amelyet az *okulár*, azaz egy lupe tovább nagyít.

Ha az okulárt úgy helyezzük el, hogy objektív által előállított valódi kép az okulár fókusz síkjában legyen, akkor a végső kép virtuális, a tárgyhoz viszonyítva fordított állású, erősen nagyított lesz.

$$N_{\ddot{o},n\acute{e}vl} = N_{ob} N_{ok} = \frac{\Delta}{f_{ob}} \frac{S}{f_{ok}}$$

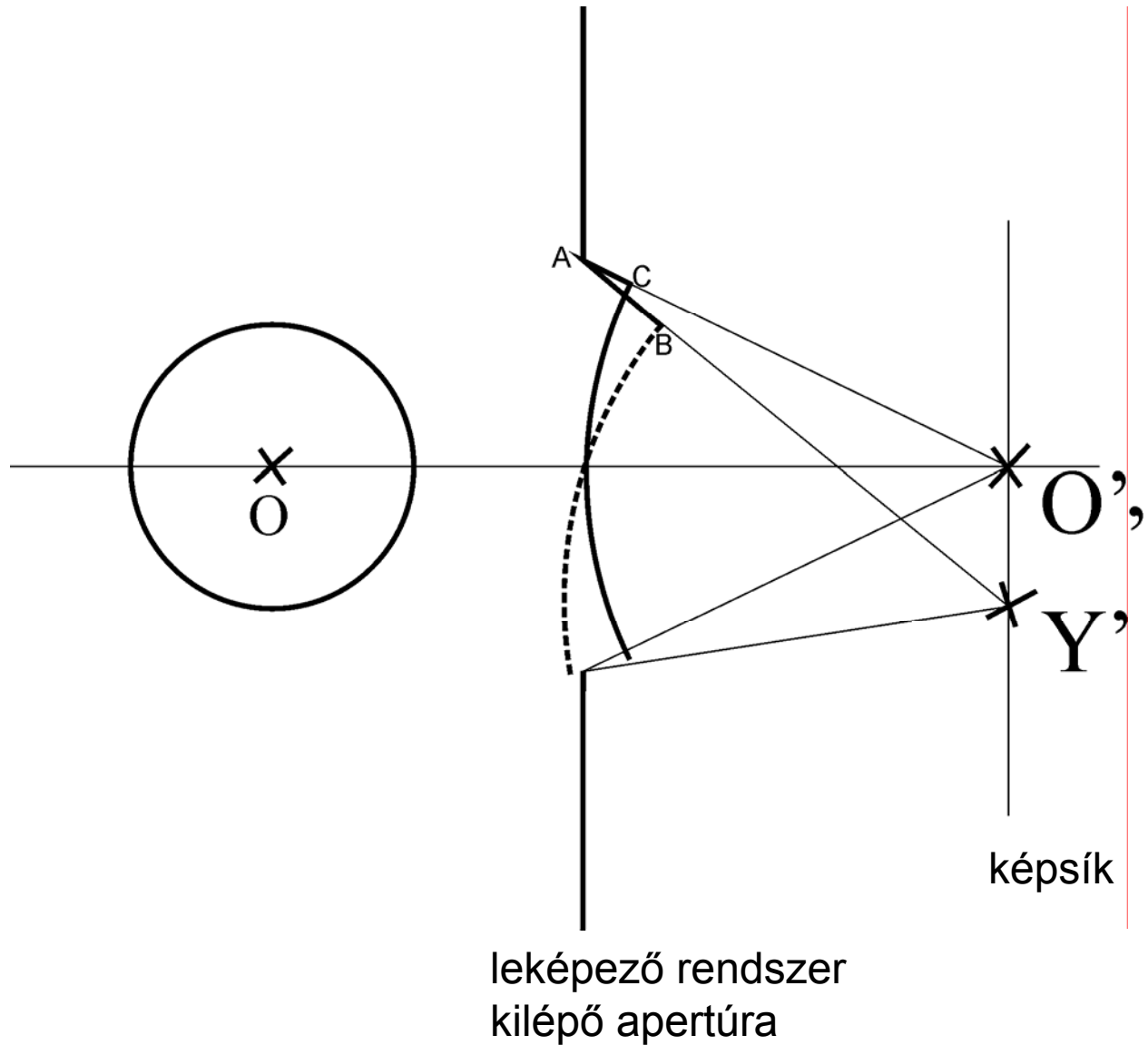
**~50-
1000x**

„Üres” nagyítás



A mikroszkóp feloldása

Rayleigh:

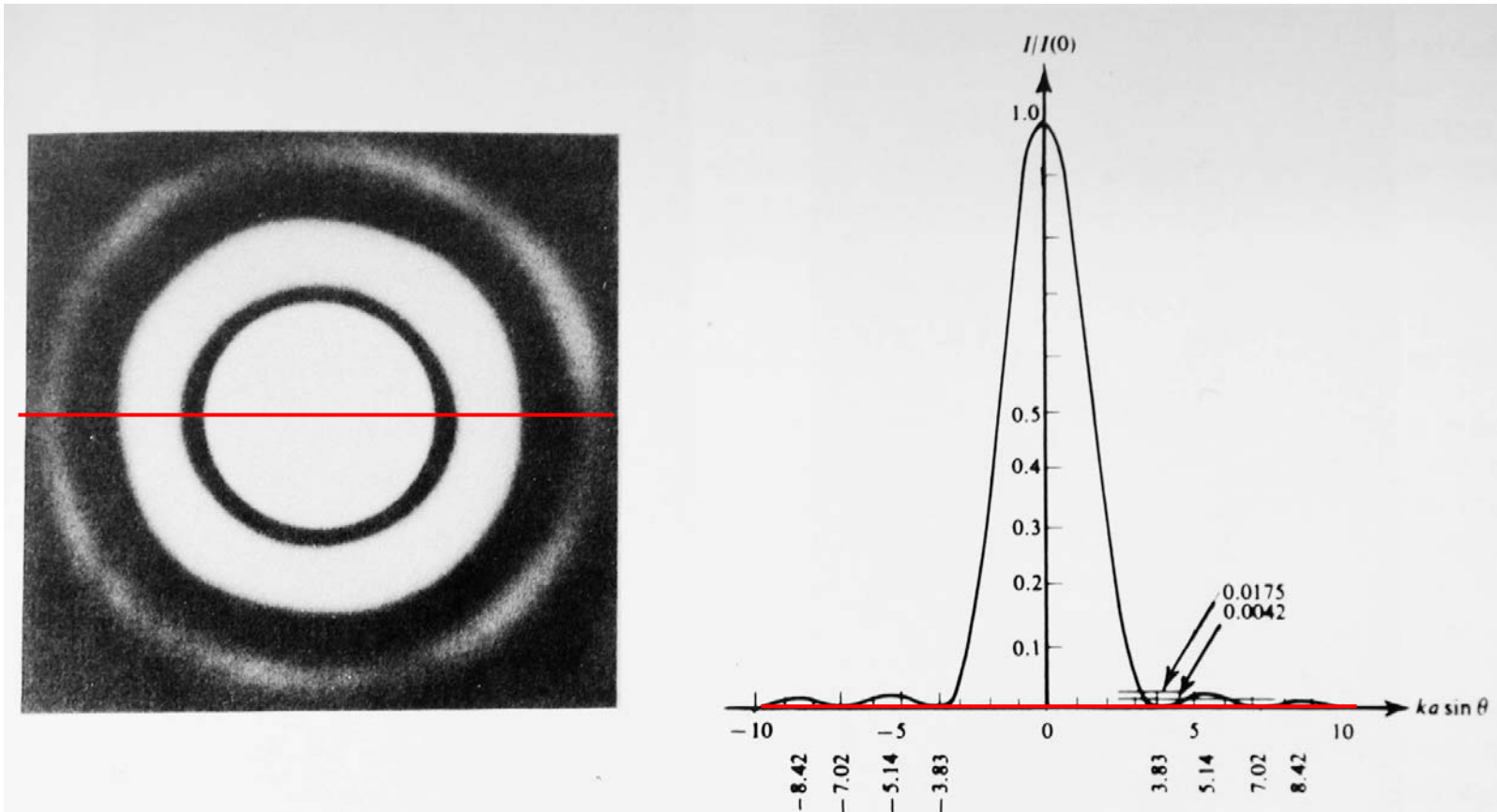


Diffrakciós Airy-folt

Egy pontszerű fényforrás képe az Airy-folt.

A relatív fényintenzitás változást 0-ad rendű Bessel függvény adja meg, melynek alakja:

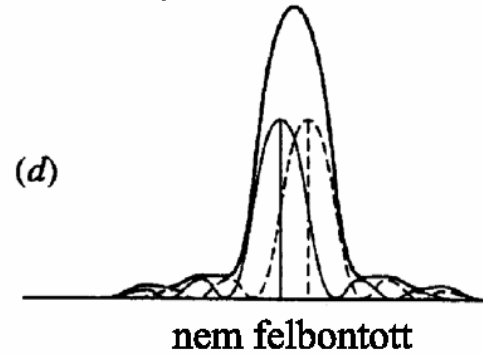
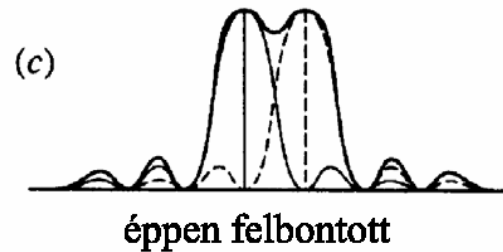
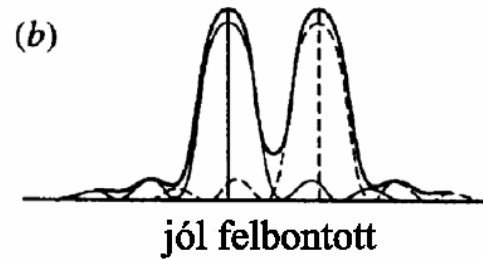
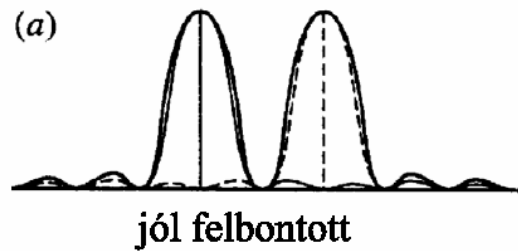
$$I(x) = \left(\frac{\sin x}{x} \right)^2$$



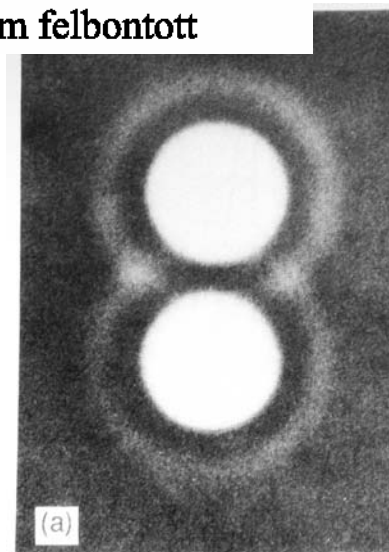
■ A felbontóképesség Rayleigh-féle kritériuma

Rayleigh féle
feloldóképesség:

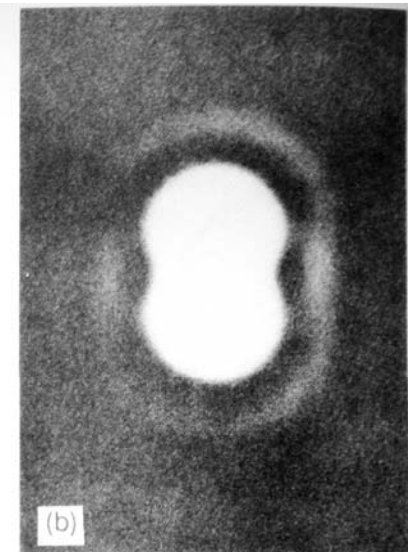
$$R = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$



A két elhajlási korongot még éppen elkülönítettnek tekintjük, ha az egyik intenzitás minimuma a másik intenzitás maximumára esik. (c.)

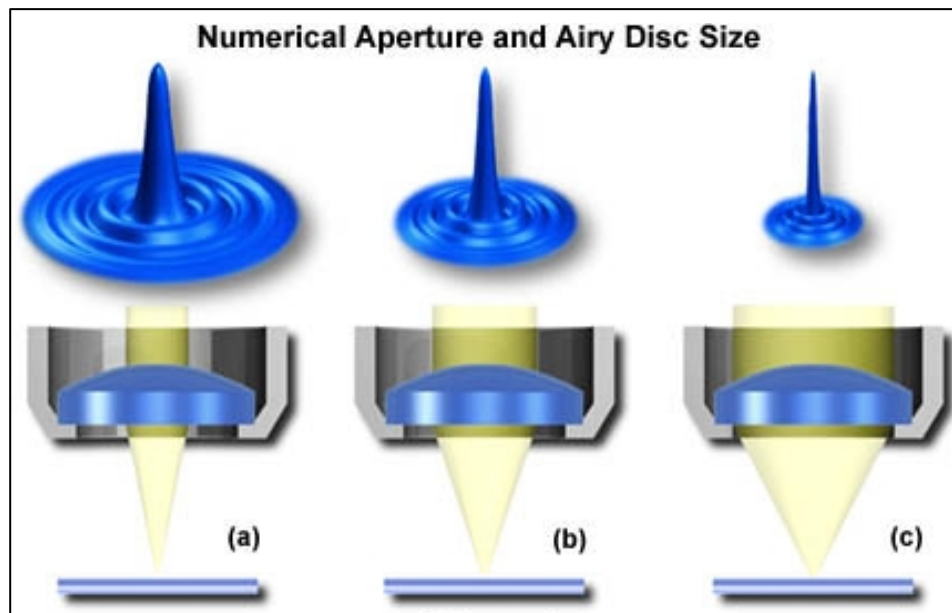
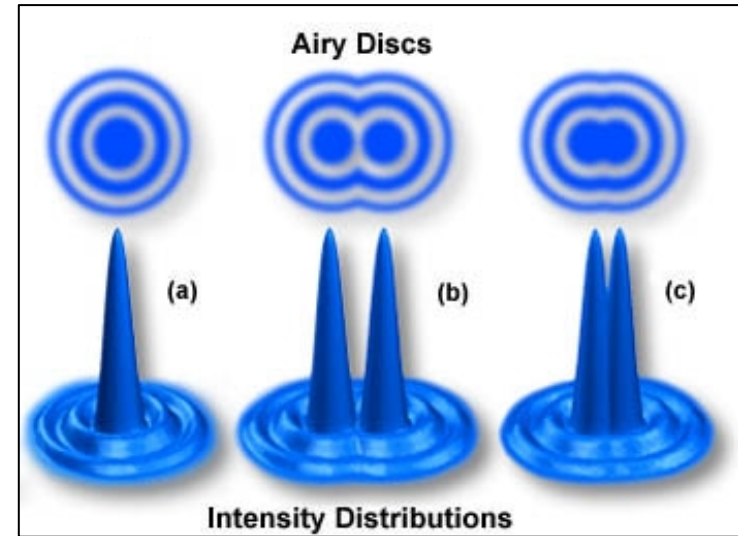
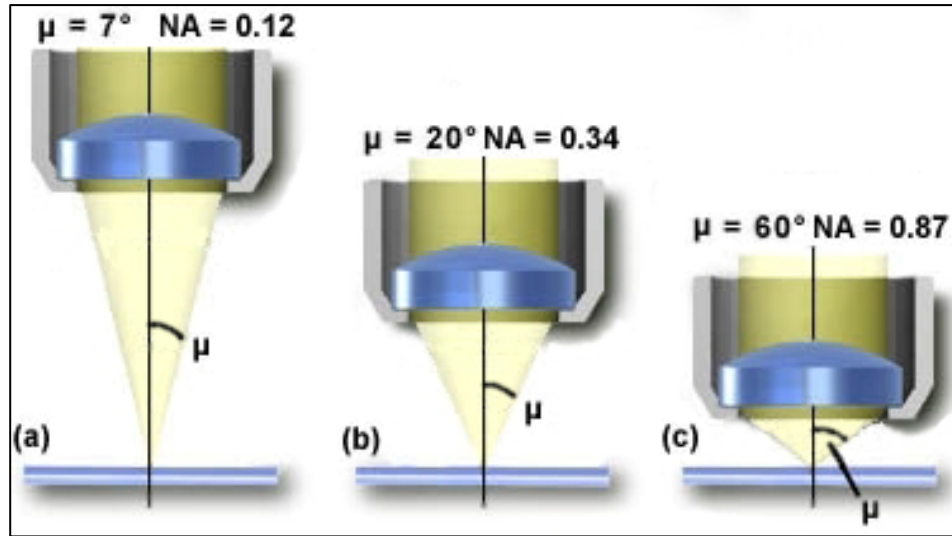


Teljesen feloldva



Rayleigh-kritérium szerint még feloldva

Diffrakciós Airy-folt

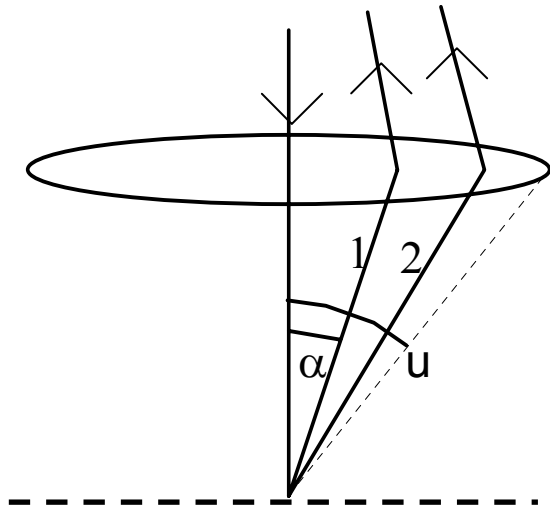


Abbe: $d = \frac{\lambda}{NA}$

Rayleigh: $d = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$

A mikroszkóp feloldásának határt szab a fényelhajlás jelensége:

Abbe elmélete szerint egy d rácsállandójú rácsnál két karcolás akkor bontható fel (látható külön), ha legalább az első rendben elhajló sugarak átmennek az objektíven.



Elhajlási trv. az első rendre:

$$\sin \alpha = \frac{\lambda}{d}$$

A d távolság tehát felbontható, ha:

$$\sin u \geq \sin \alpha \quad \Longrightarrow \quad \sin u \geq \frac{\lambda}{d}$$

Ha a tárgy és a lencse között n törésmutatójú közeg van, a hullámhossz λ/n -re változik, így a feloldási határ:

$$d = \frac{\lambda}{n \cdot \sin u}$$

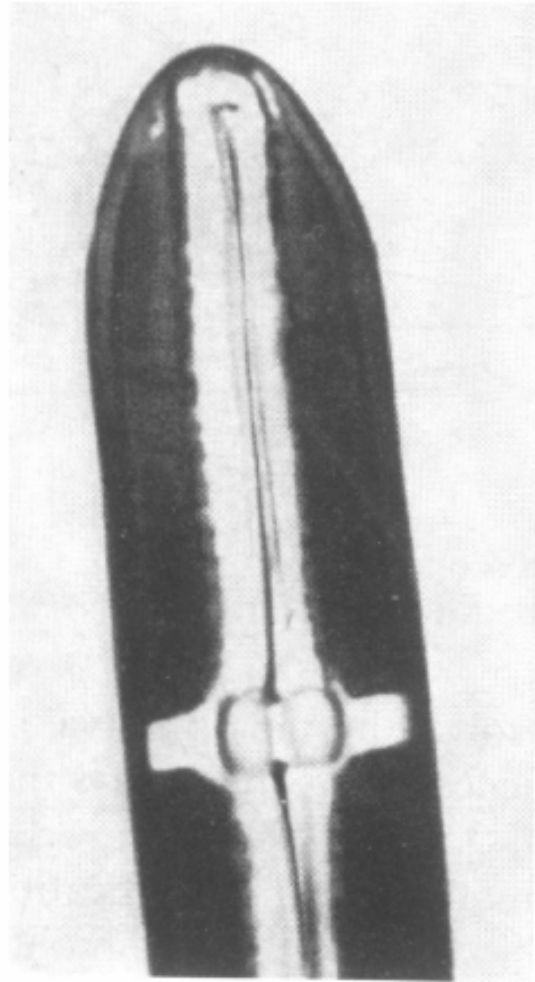
Az objektív feloldási határát döntően meghatározó $NA = n \cdot \sin u$ mennyiséget az *objektív numerikus apertúrájának* nevezik.

Ezzel tehát a *feloldási határ*:

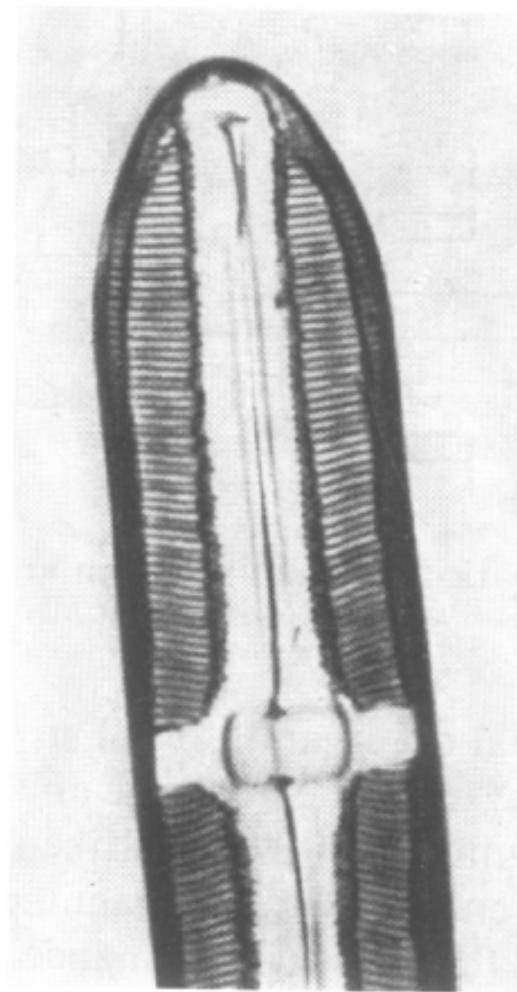
$$d = \frac{\lambda}{NA}$$

**Egy alga mikroszkóppal készített képe
1000-szeres nagyításban**

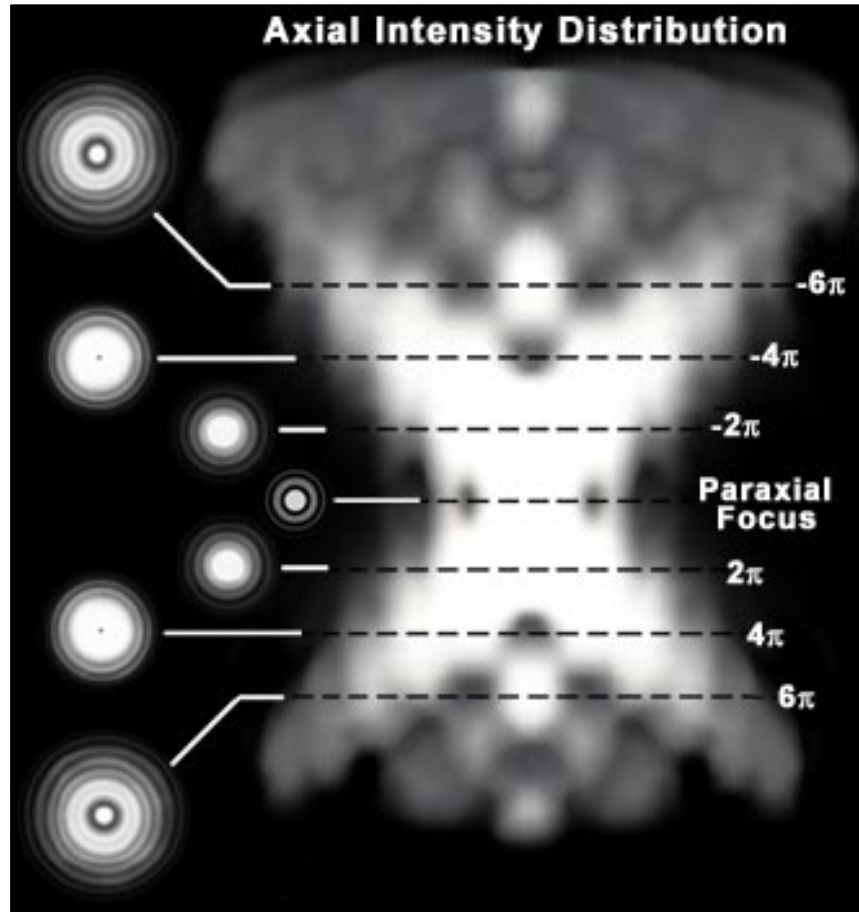
**vörös fényel készítve
($\lambda = 680 \text{ nm}$)**



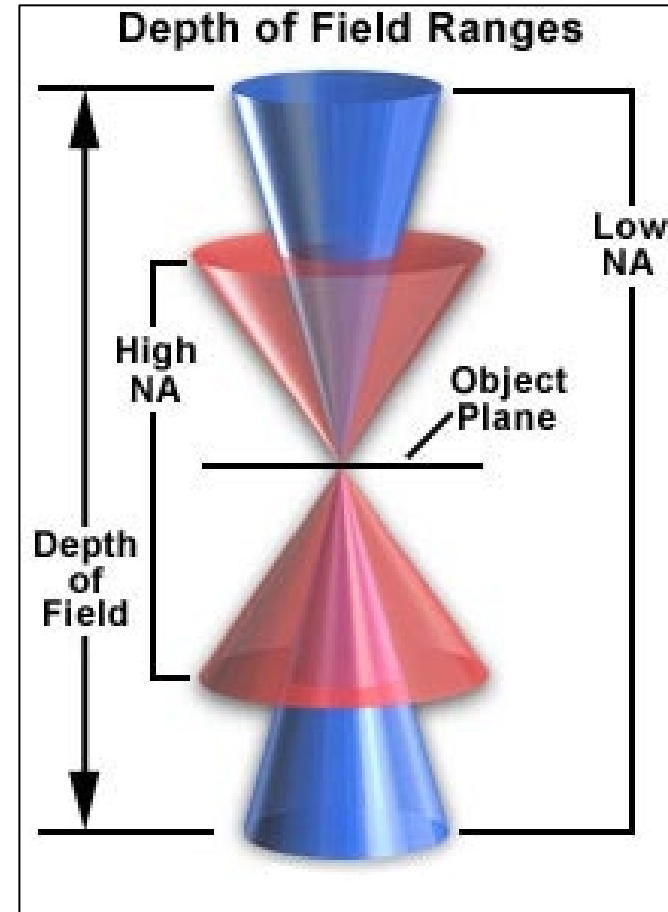
**kék fényel készítve
($\lambda = 458 \text{ nm}$)**



Mélységélesség



**3D diffraction pattern
(Point Spread Function)**



$$DOF \sim \frac{\lambda}{NA^2}$$

Élesség:



Mélységélesség:

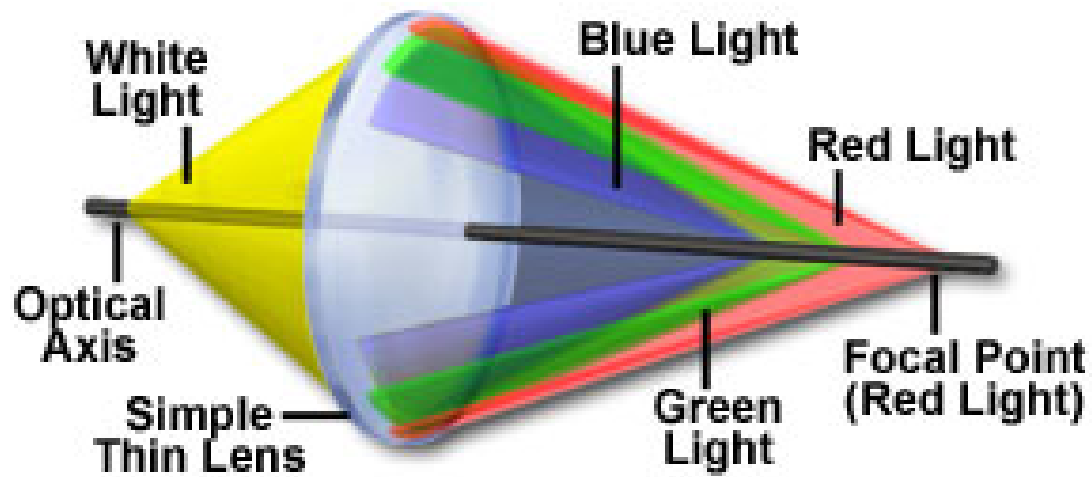


Eddig ideális leképezést
tételeztünk fel,
de a valóság más...

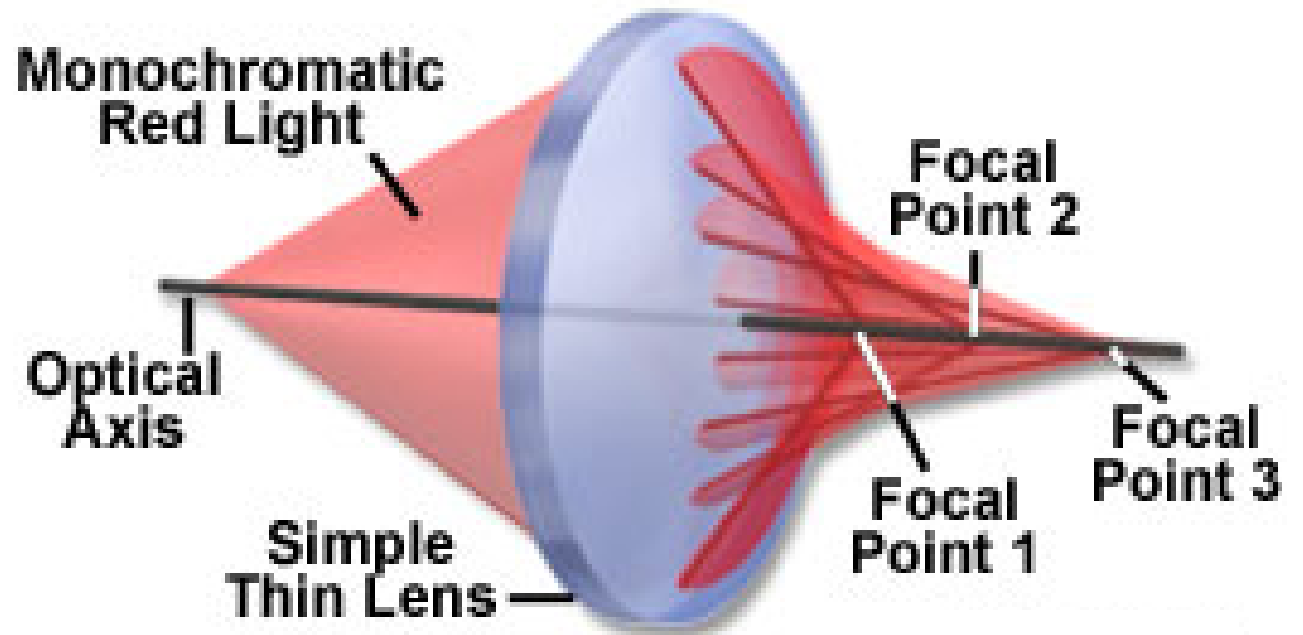
Lencsehibák (aberrációk)

- **on-axis** lencse hibák
 - **kromatikus** és **szférikus** aberráció,
- **off-axis** lencse hibák
 - **kóma**, **asztigmatizmus** és **képmező görbület**.
- **geometriai torzítások**
 - **hordó** és **párna torzítás**.

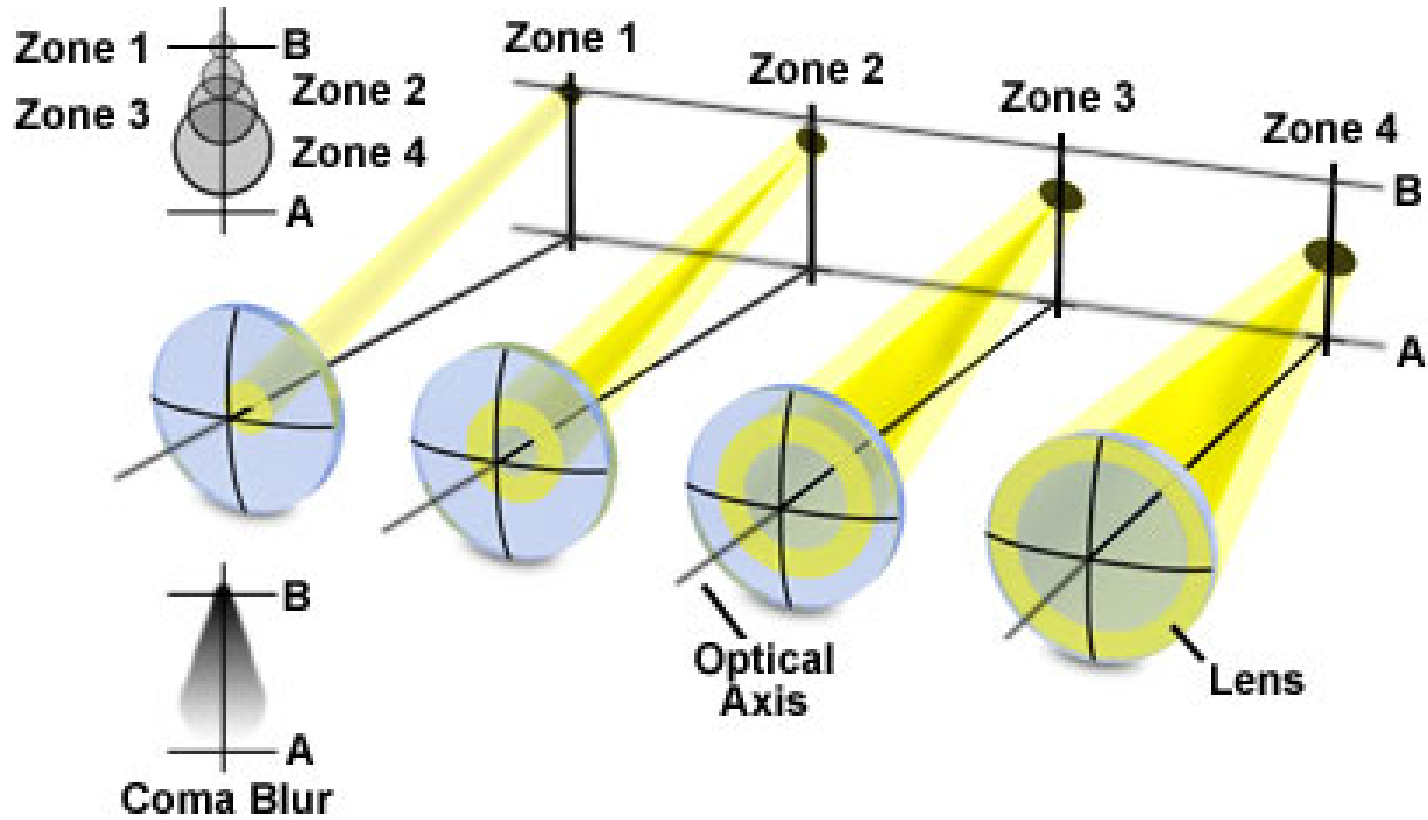
Axial Chromatic Aberration



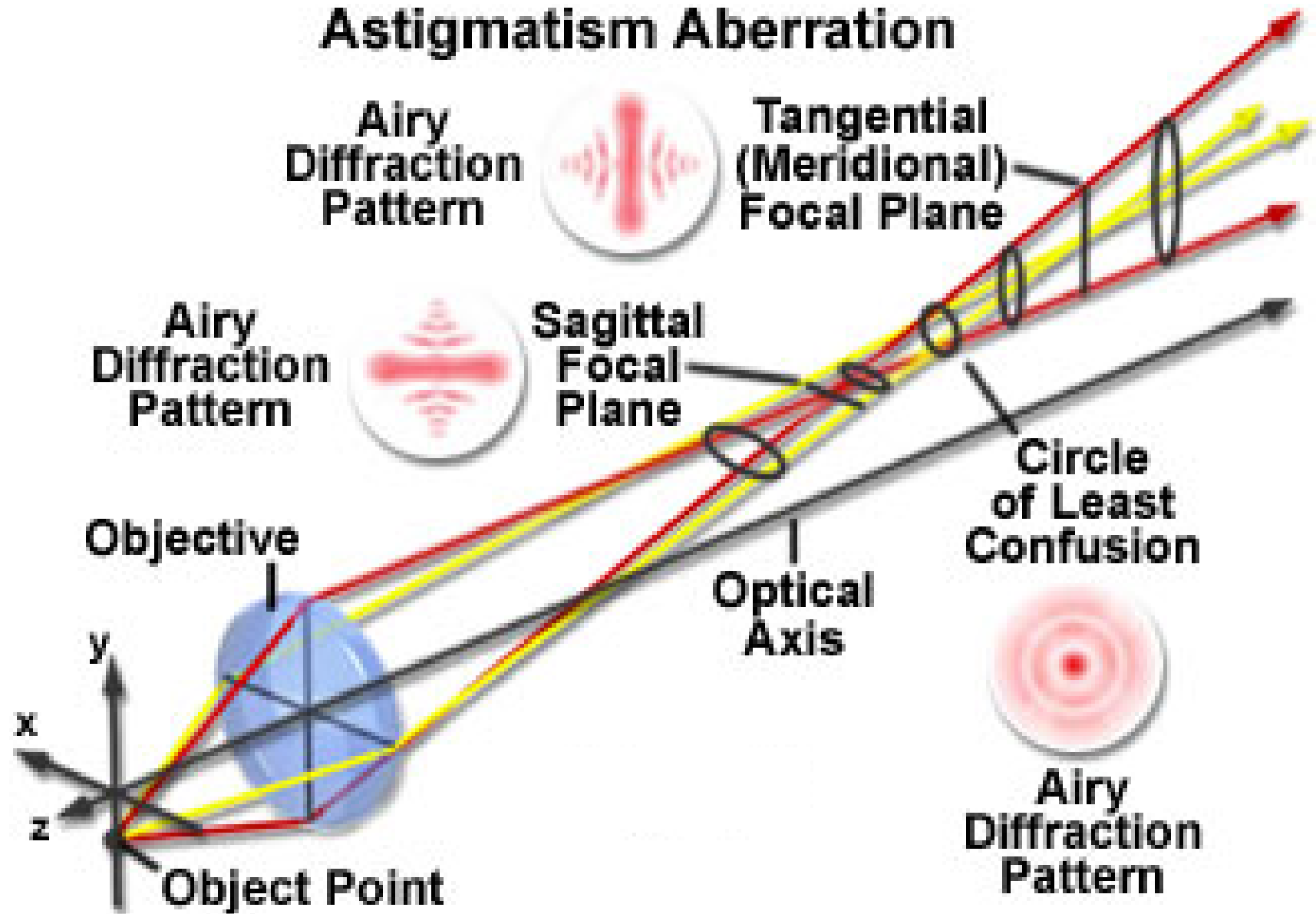
Spherical Aberration



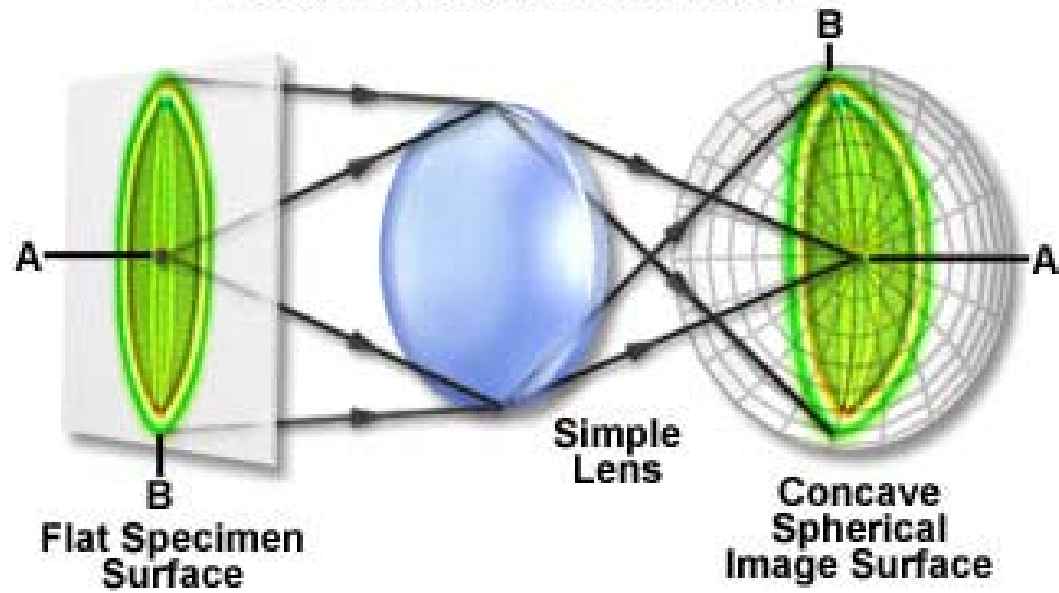
Off-Axis Coma Aberration



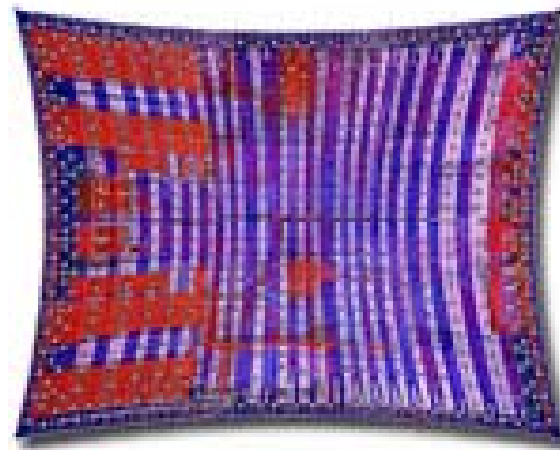
Astigmatism Aberration



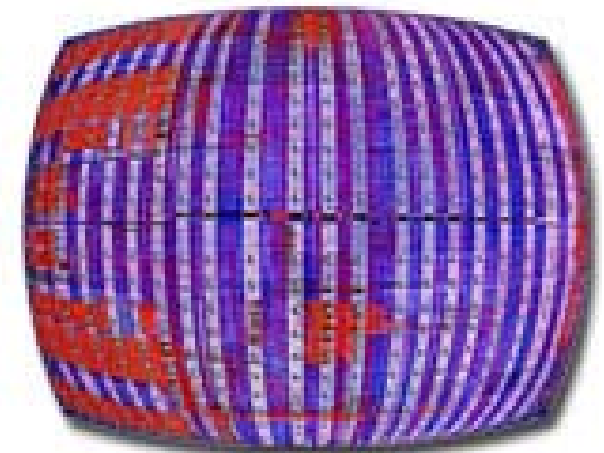
Field Curvature Aberration



Geometric Distortion

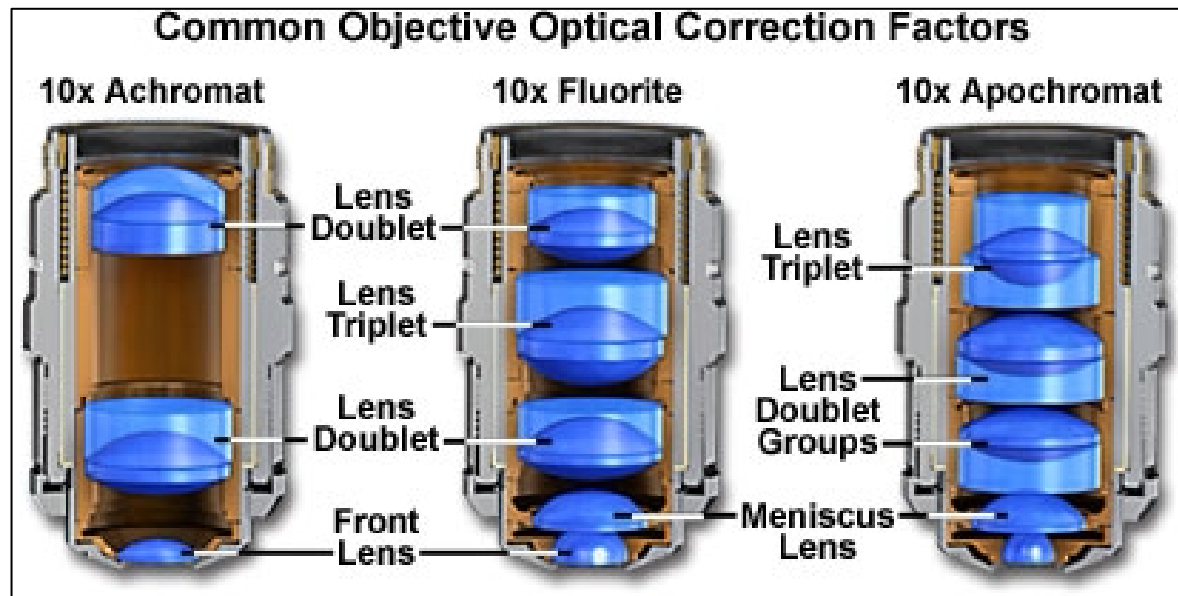


Pincushion



Barrel

Nagy teljesítményű objektívek



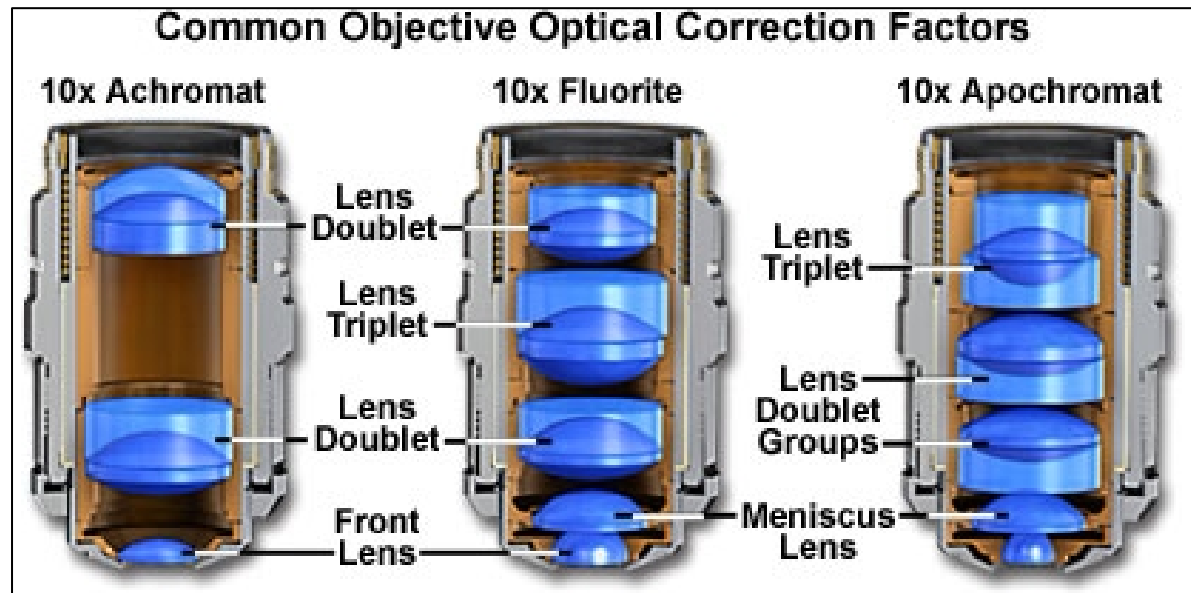
Objective Type	Spherical Aberration	Chromatic Aberration	Field Curvature
Achromat	1 Color	2 Colors	No
Plan Achromat	1 Color	2 Colors	Yes
Fluorite	2-3 Colors	2-3 Colors	No
Plan Fluorite	3-4 Colors	2-4 Colors	Yes
Plan Apochromat	3-4 Colors	4-5 Colors	Yes



Nikon gyártmányú,
korszerű, optikai
mikroszkóp



Nikon gyártmányú
objektívek



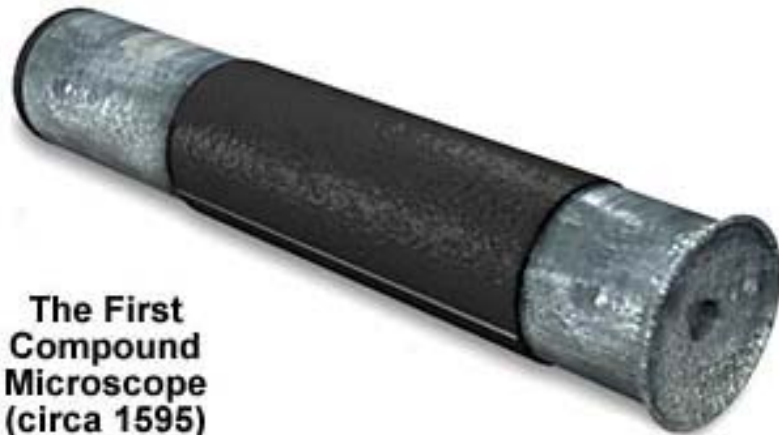
A mikroszkópia történetéből...

XVI–XVII. század.

Az első ismert mikroszkópot Zacharias és Hans Janssen az 1590-es években készítette.

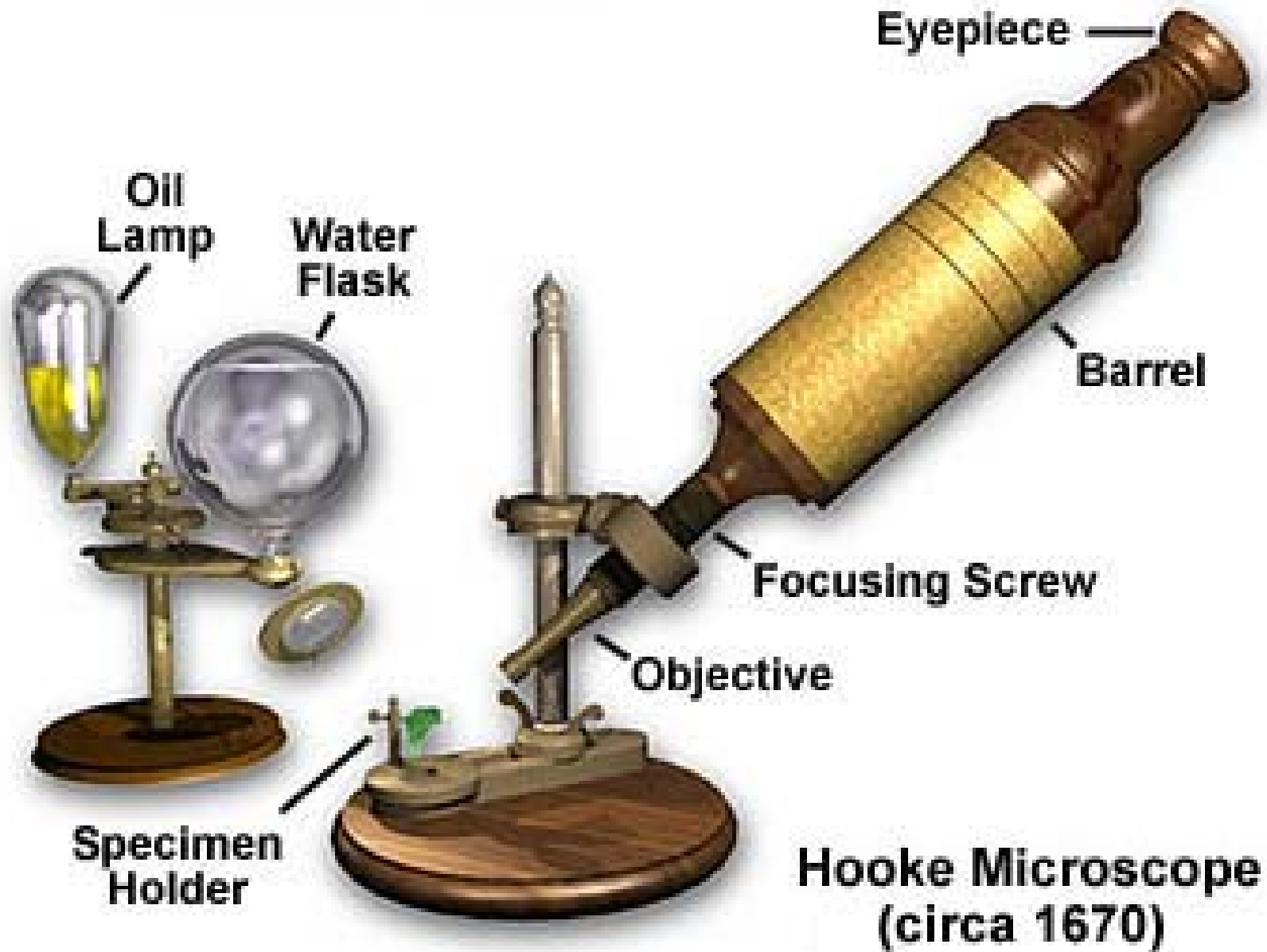
Ebben az időszakban az egyszerű nagyítók után megjelennek az első mikroszkópok.

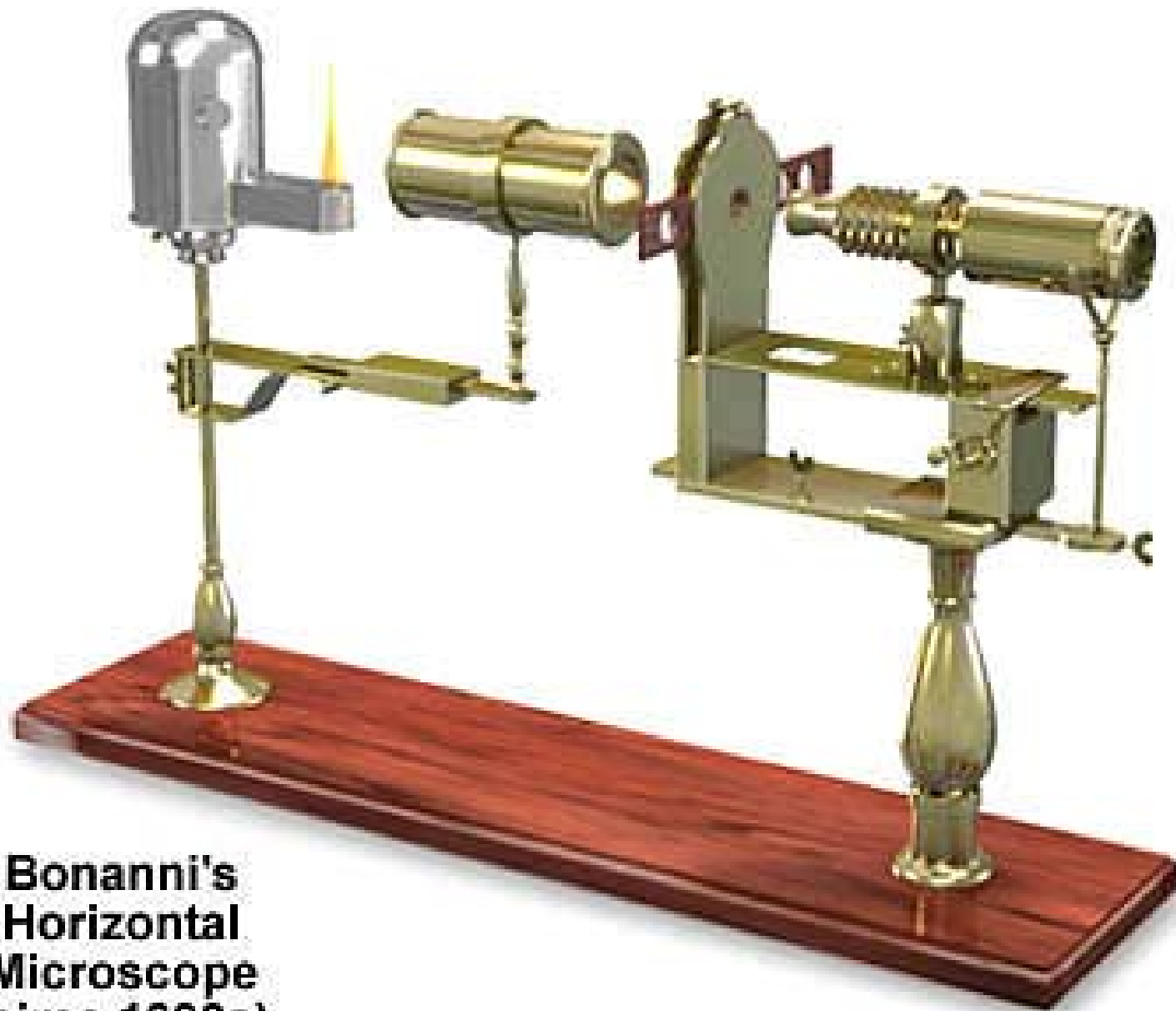
Különösen a holland, angol, olasz mesterek voltak aktív mikroszkóp készítőik ebben az időszakban.



**The First
Compound
Microscope
(circa 1595)**

Régi reflexiós mikroszkóp





**Bonanni's
Horizontal
Microscope
(circa 1690s)**

Mikroszkópok a XVIII. században

- A század kezdetén a brit készülék készítőik egyre kifinomultabb mikroszkópváltozatokat készítenek el.

- Az egymást követő mechanikai fejlesztések egyre stabilabb, erősebb állványzatú készülékeket eredményeztek, de a mikroszkópok képe optikai leképezési hibák miatt az egész században homályos maradt...

Jones' Most Improved Compound Microscope (circa late 1700s)



Mikroszkópok a XIX. századból:

A század első felében az optika drámai fejlődésen ment keresztül: létrehozták az **akromatikus** objektíveket van Deijl, Amici, és Lister. Zeiss, Schott és Abbe új típusú üvegei utat törtek az első **apokromát** objektívek megalkotásához. A fényképezés megjelenésével a **fotomikrográfia** is debütált a század közepén. A megfelelő **kivilágítást** August Köhler módszere tette lehetővé, ami Abbe **jó felbontású objektívjeinek** alkalmazásával a képminőség robbanásszerű javulásához vezetett.

**Nachet
Polarizing
Microscope
(circa 1833)**



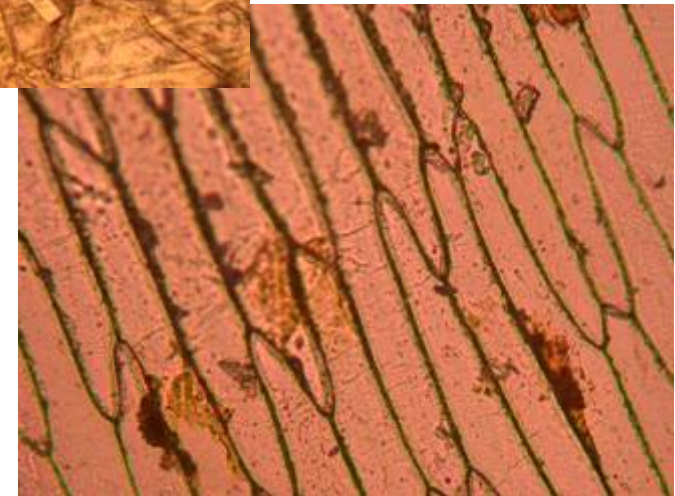
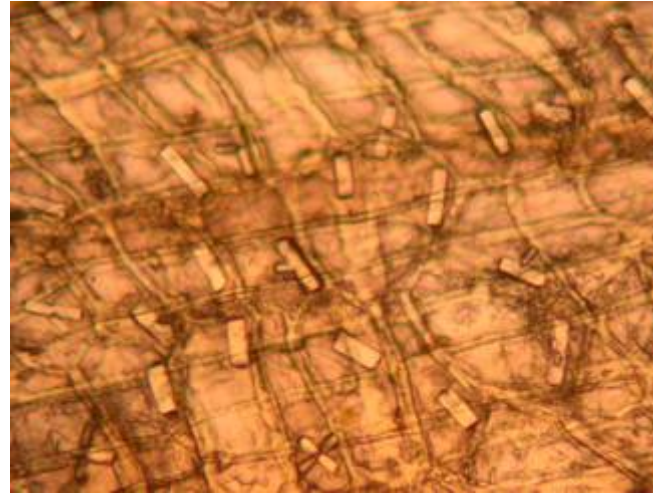
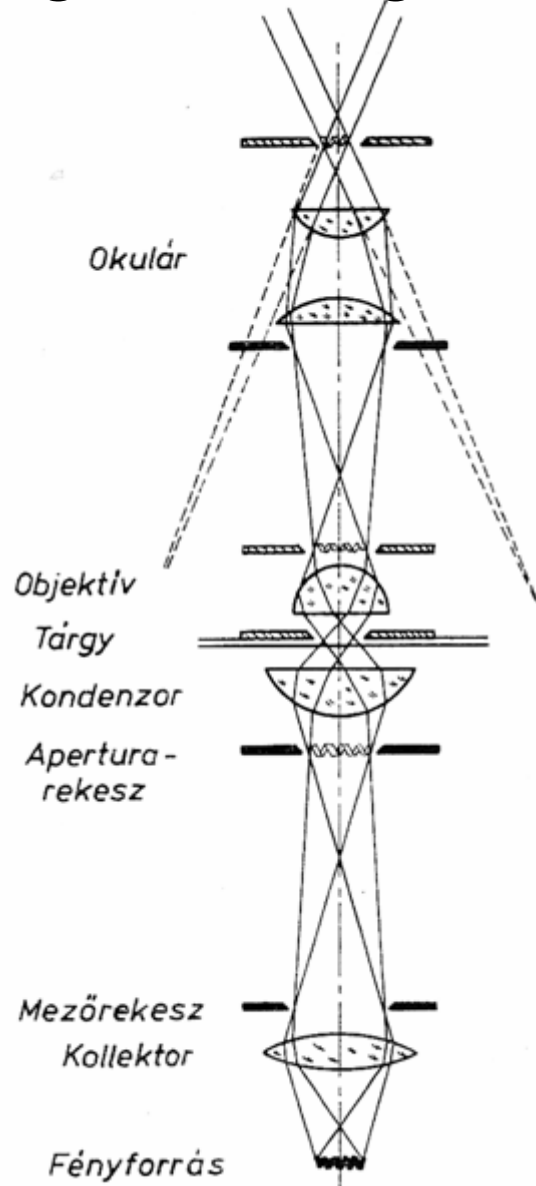
A XX. század mikroszkópjai – A XX. században a mikroszkópia a reneszánszát élte, mivel a század elején számos kontrasztnövelő eljárást dolgoztak ki. Ilyen pl. a fáziskontraszt eljárás (Zernike 1934, 1953 Nobel díj), a Hoffman féle modulációs kontraszt, a differenciális interferencia kontraszt és a fluoreszcencia mikroszkópia. A film és fényképezési technikák kimagaslóan jó képminőséget értek el, de a számítástechnika megjelenésével a digitális képfeldolgozás került előtérbe...

This state-of-the-art microscope contains accessories for DIC, fluorescence, polarized light, phase contrast, and photomicrography using several film formats and digital image capture.

The Olympus Provis AX-70 (circa 1998)

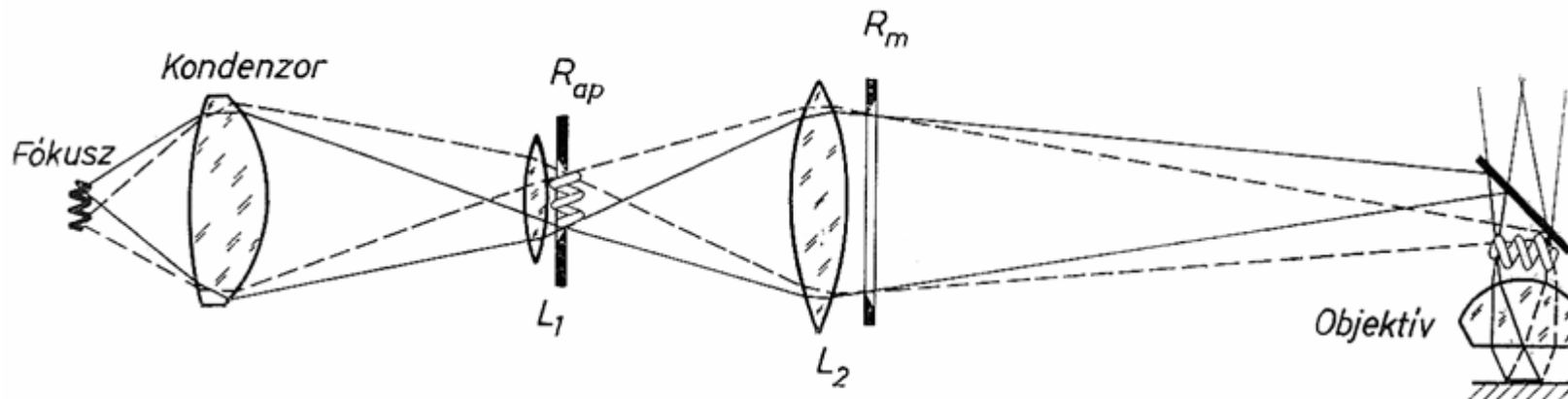


Transzmissziós mikroszkóp geometriai sugármenete

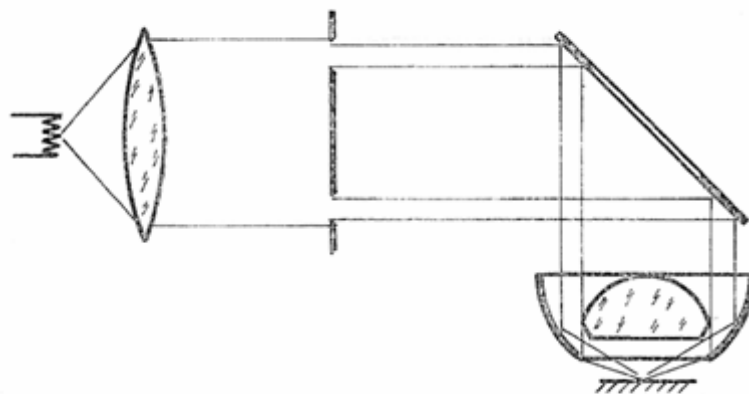


**Transzmissziós felvételek
hagymalevelelről és hártyáról**

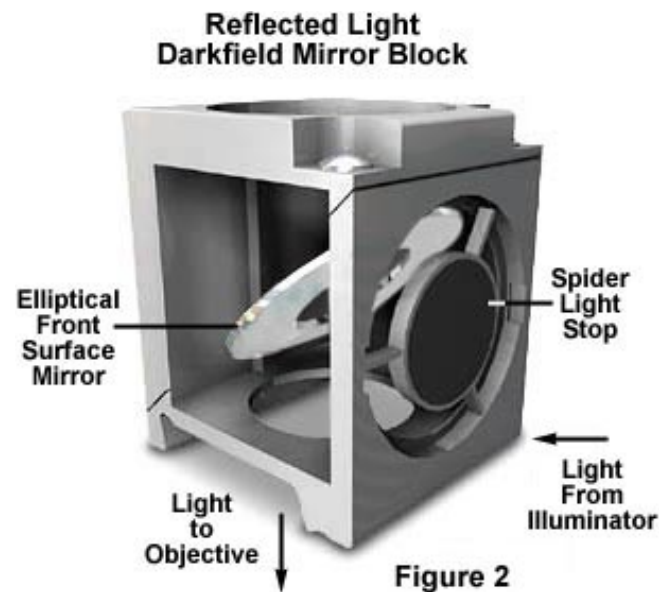
Reflexiós mikroszkóp (világos-, és sötét-látótér üzemmód)



Világos látóterű felsőmegvilágítás szigorú KÖHLER-elve



3.25. ábra. Sötét látóterű felsőmegvilágítás

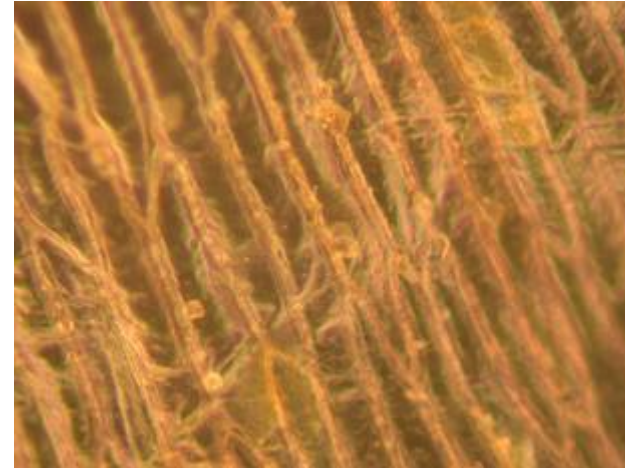
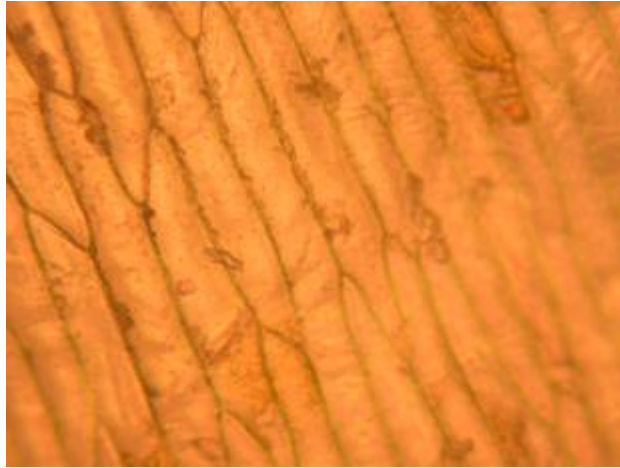


Reflexiós mikroszkóp felvételek

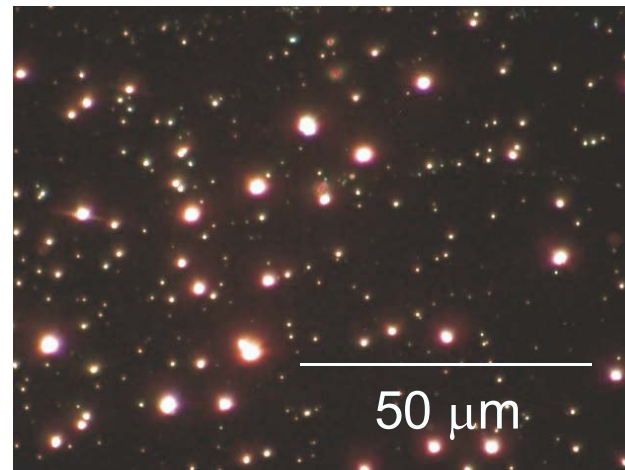
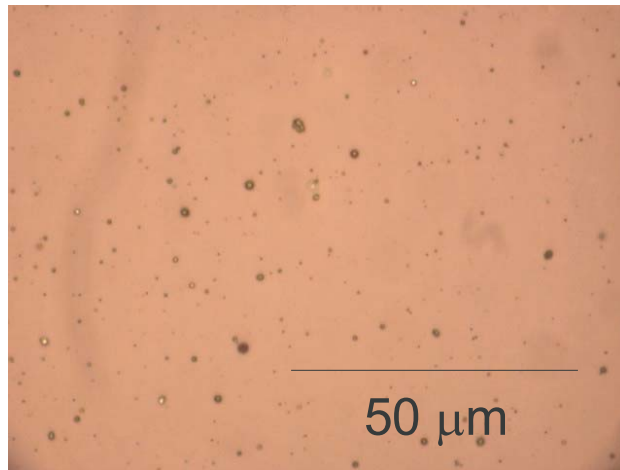
Világos látótér (BF)

Sötét látótér (DF)

Hagymalevél
hártya



Mo₂N
vékonyréteg



Optikai mikroszkópia

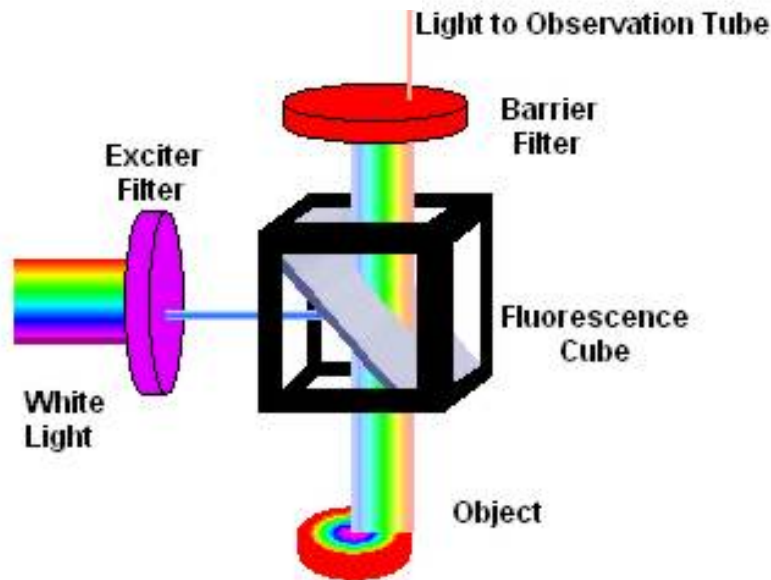
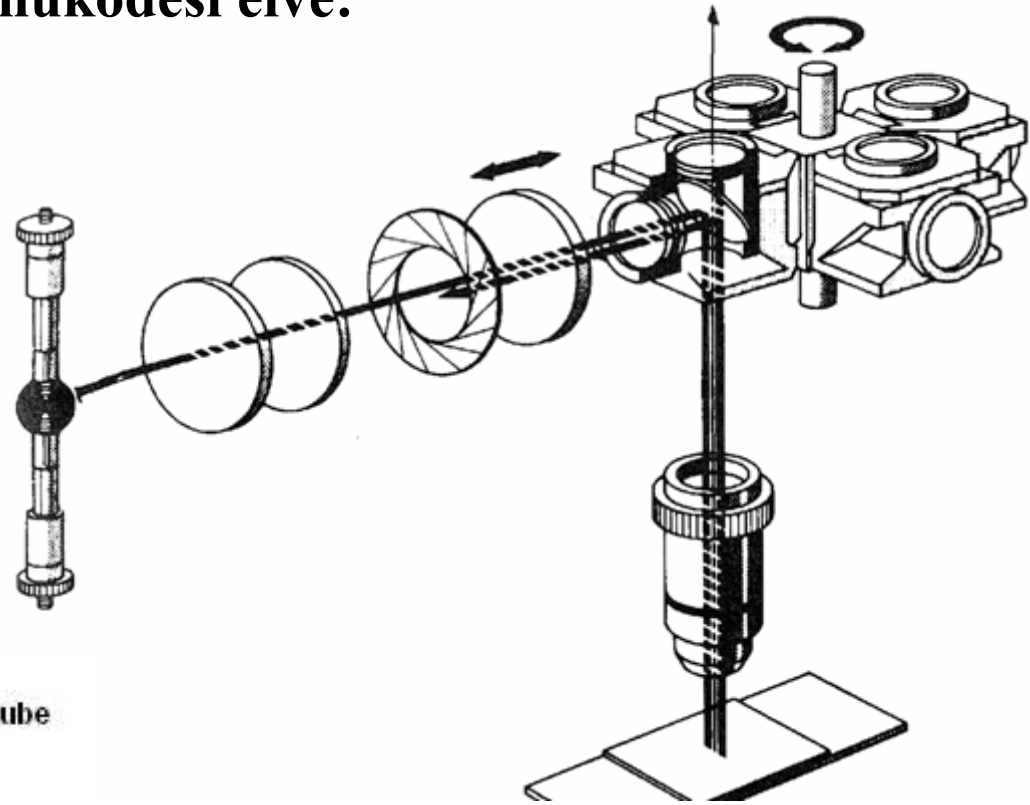
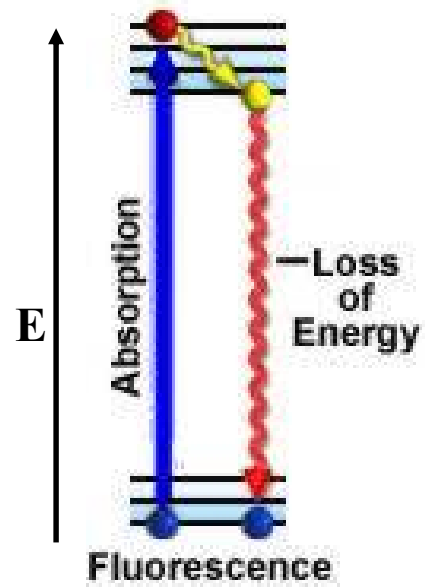
Fény-anyag kölcsönhatás során az információ kódolva van a fény:

- irányában
- amplitúdójában
- fázisában
- **frekvenciájában**
- polarizációs állapotában

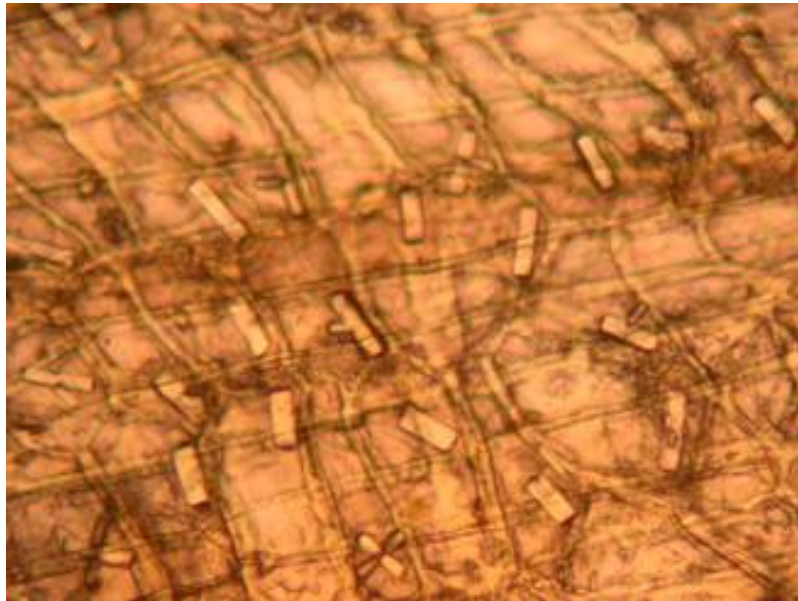
Ennek megfelelően a különböző üzemmódok:

- **fluoreszcens** mikroszkópia
- polarizációs

Fluoreszcencia mikroszkóp működési elve:

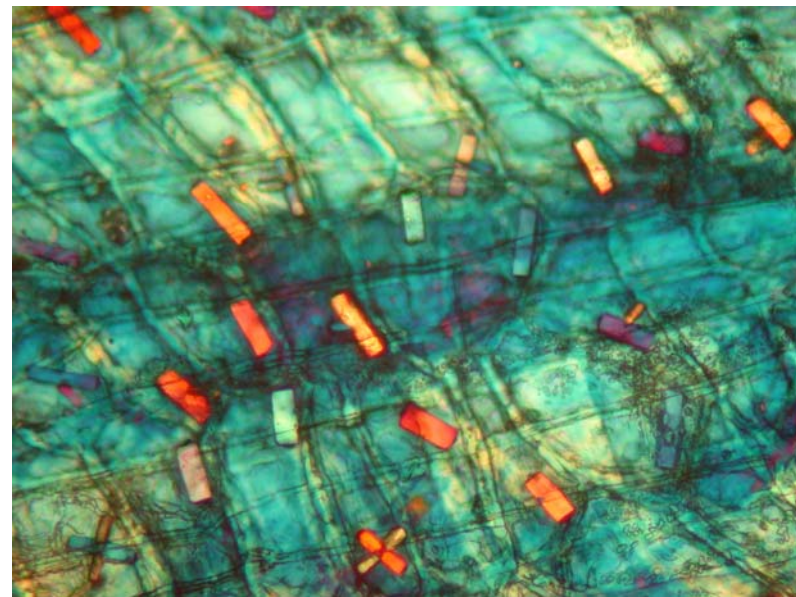


**Transzmissziós felvételek
hagymalevélről**



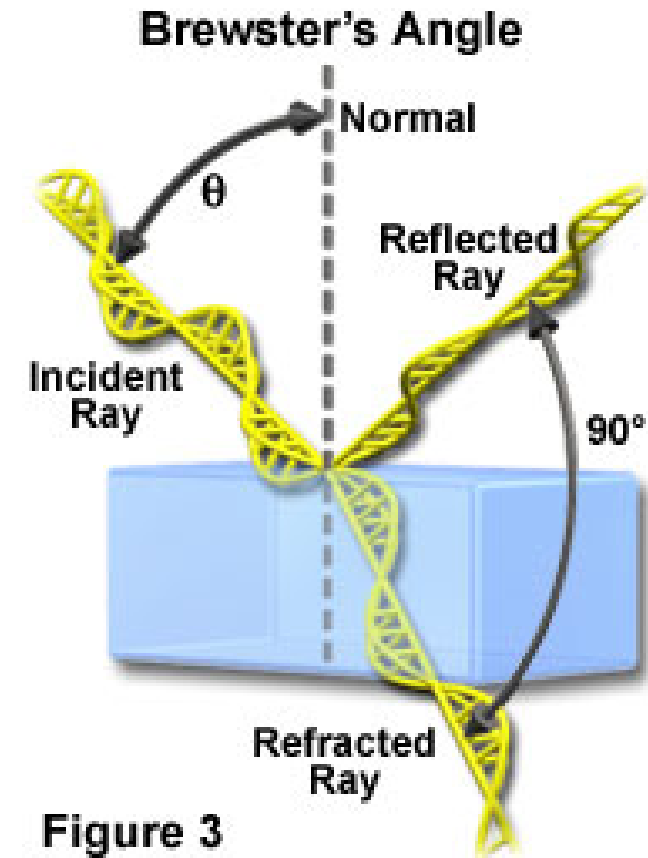
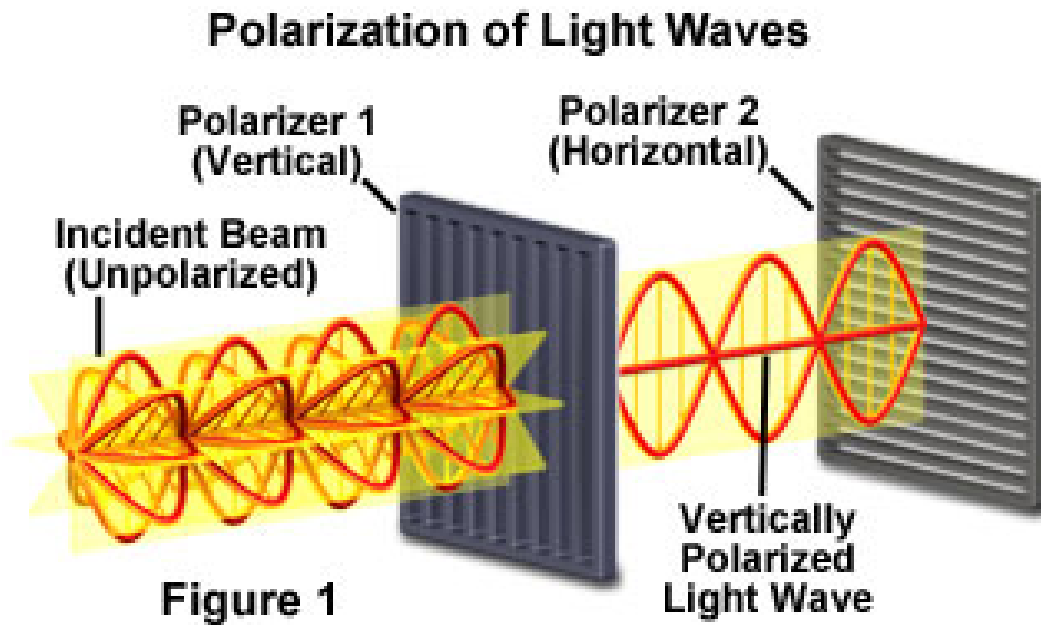
VALÓDI SZÍNEK!

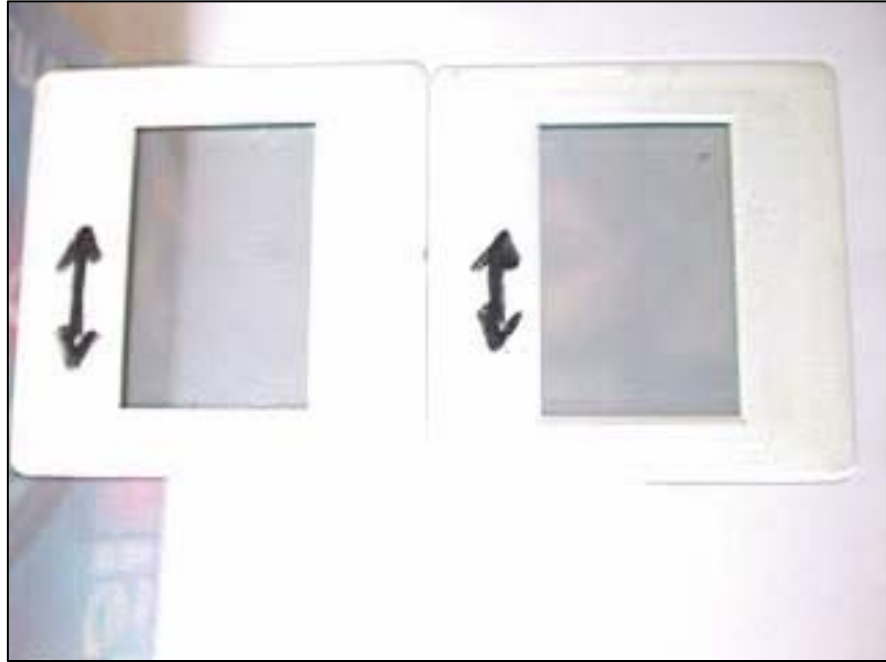
**Polarizációs mikroszkóp felvétel
keresztpolarizációban:**



HAMIS SZÍNEK!

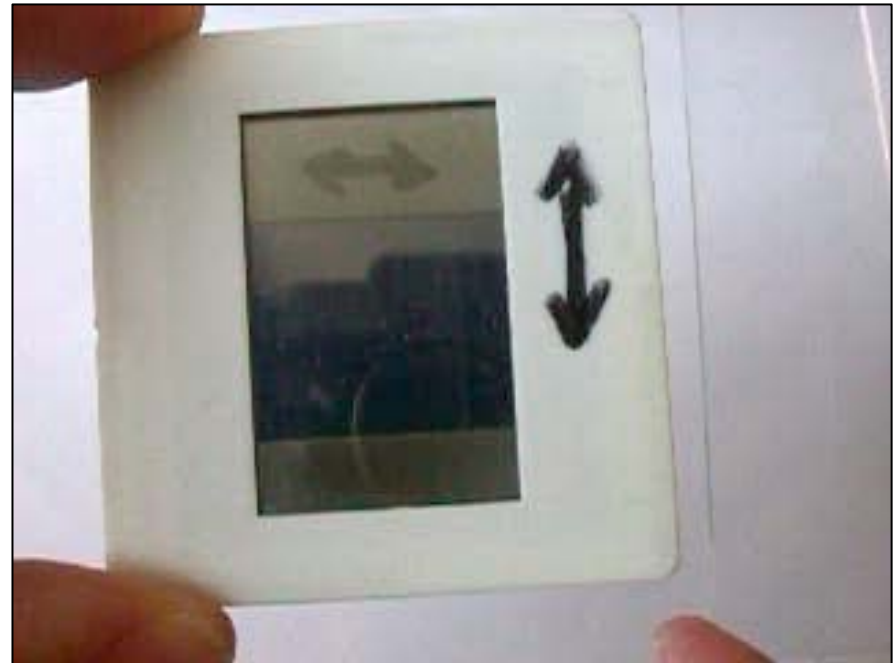
A fény polarizációja





← Két polarizátorlemez

**Keresztpolarizátorok
között elhelyezett
mikroszkóp tárgylemez →**

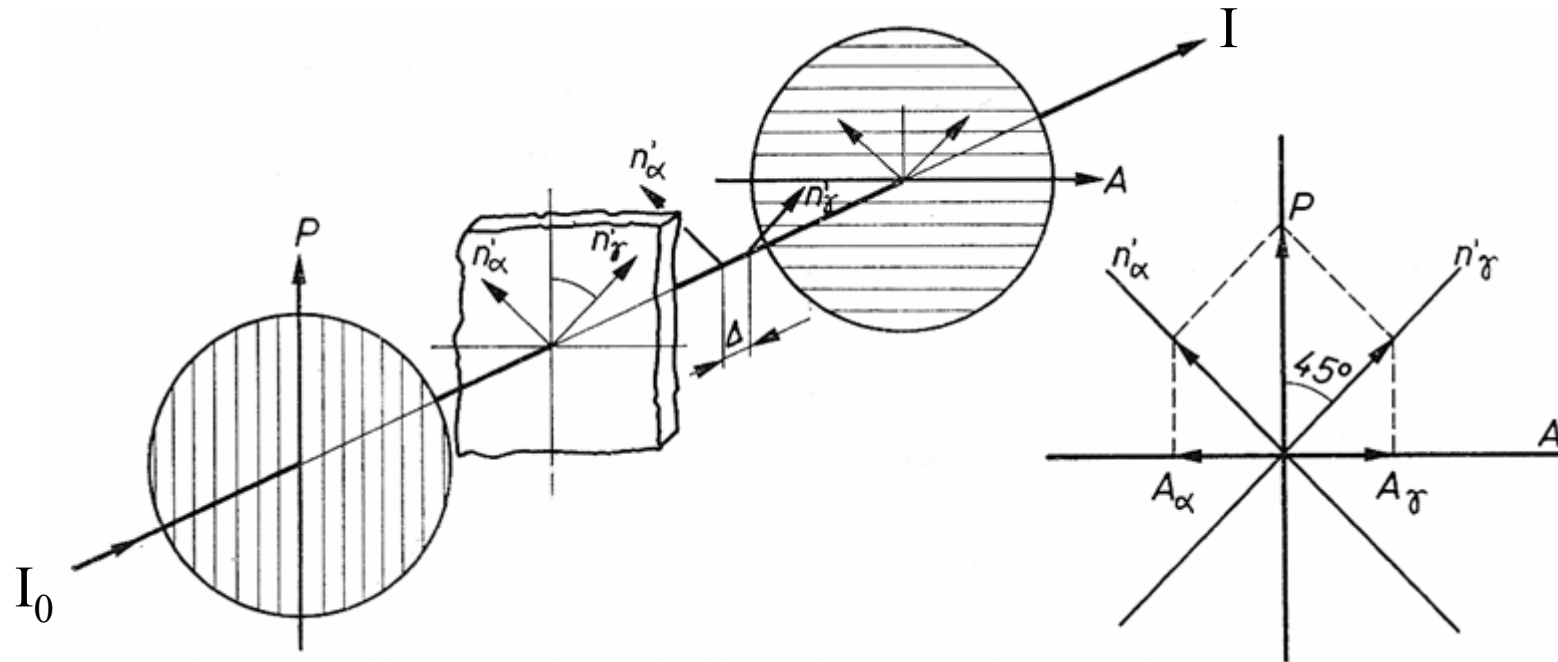


kettős törés



Kalcit kristály

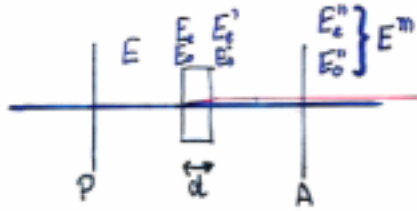
Polarizációs mikroszkóp működési elve:



A. Fresnel (1821):

$$I(I_0, \lambda, \alpha, n_\gamma, n_\alpha, d) = I_0 \cdot \sin^2(2\alpha) \cdot \sin^2 \left[\pi \frac{d}{\lambda} (n'_\gamma - n'_\alpha) \right]$$

Két dőstörő kristály keresztteztelt polarizátorok között



$$E_e = E \cos \varphi e^{i(\omega t + \alpha)}$$

$$E_o = E \sin \varphi e^{i(\omega t + \alpha)}$$

$$\lambda_e = \frac{\lambda}{n_e} \quad \lambda_o = \frac{\lambda}{n_o}$$

fénycsökkenés:

$$\delta_e = 2\pi \frac{d}{\lambda_e} \quad \delta_o = 2\pi \frac{d}{\lambda_o}$$

$$E_e' = E \cos \varphi e^{i(\omega t + \alpha - \delta_e)}$$

$$E_o' = E \sin \varphi e^{i(\omega t + \alpha - \delta_o)}$$

$$\alpha = \delta_e$$

$$E_e'' = E \cos \varphi \cos(\varphi - \psi) e^{i\omega t}, \quad E_o'' = E \sin \varphi \sin(\varphi - \psi) e^{i(\omega t + \delta_e - \delta_o)}$$

$$E'' = E_e'' + E_o'' = E e^{i\omega t} \cdot (\cos \varphi \cdot \cos(\varphi - \psi) + \sin \varphi \cdot \sin(\varphi - \psi) e^{i2\pi \frac{d}{\lambda} (n_e - n_o)})$$

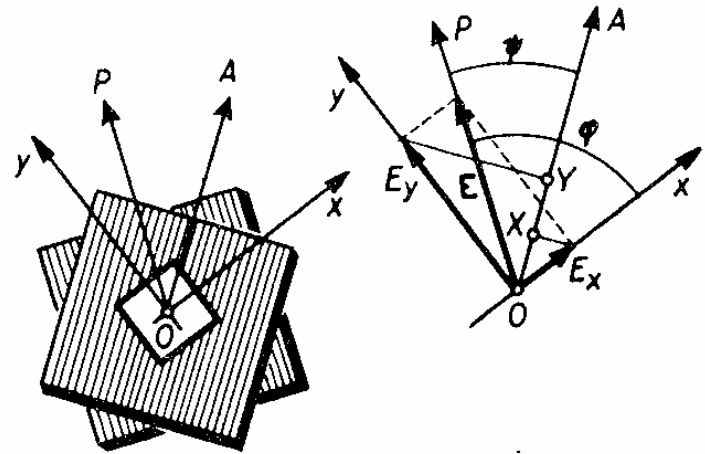
$$I = E'' \cdot E''^* = I_0 \cdot (\cos \varphi \cdot \cos(\varphi - \psi) + \sin \varphi \cdot \sin(\varphi - \psi) e^{i2\beta}) (\cos \varphi \cdot \cos(\varphi - \psi) + \sin \varphi \cdot \sin(\varphi - \psi) e^{-i2\beta})$$

$$= I_0 [\cos^2 \varphi \cos^2(\varphi - \psi) + \sin^2 \varphi \sin^2(\varphi - \psi) + (\cos \varphi \cdot \cos(\varphi - \psi) \sin \varphi \sin(\varphi - \psi)) \cdot (e^{i2\beta} + e^{-i2\beta})]$$

$$= I_0 [\cos^2 \varphi - \frac{1}{2} \sin 2\varphi \sin 2(\varphi - \psi) + \frac{1}{4} \sin 2\varphi \sin 2(\varphi - \psi) \cdot 2(\cos^2 \beta - \sin^2 \beta)]$$

$$= I_0 [\cos^2 \varphi - \frac{1}{2} \sin 2\varphi \sin 2(\varphi - \psi) \cdot (1 - \frac{\cos^2 \beta - \sin^2 \beta}{\sin^2 \beta + \cos^2 \beta})]$$

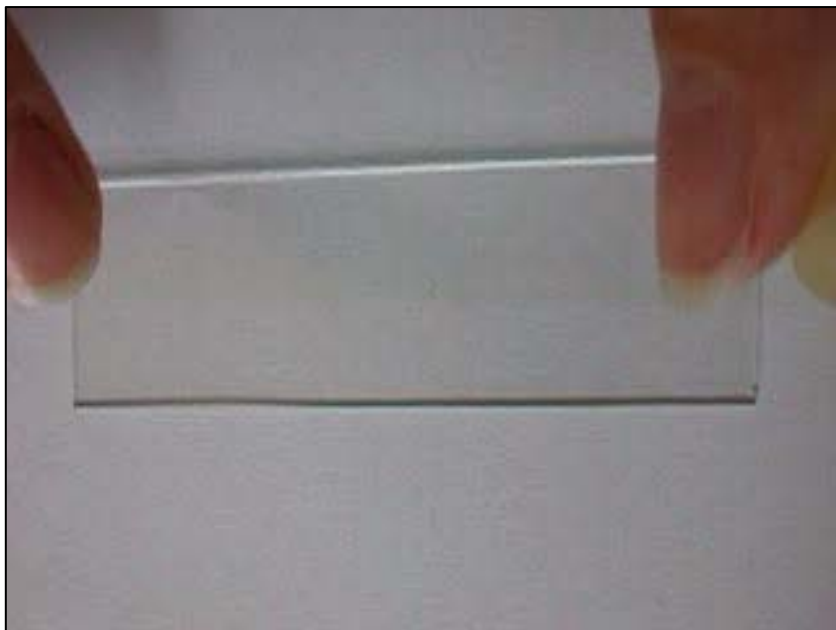
$$= I_0 [\cos^2 \varphi - \sin 2\varphi \sin 2(\varphi - \psi) \sin^2(\pi \frac{d}{\lambda} \cdot n_e - n_o)]$$



Budó III. 292 §

$$\psi = 0, \quad I_{\parallel} = I_0 \cdot [1 - \sin^2 2\varphi \cdot \sin^2(\pi \frac{d}{\lambda} \cdot (n_e - n_o))]$$

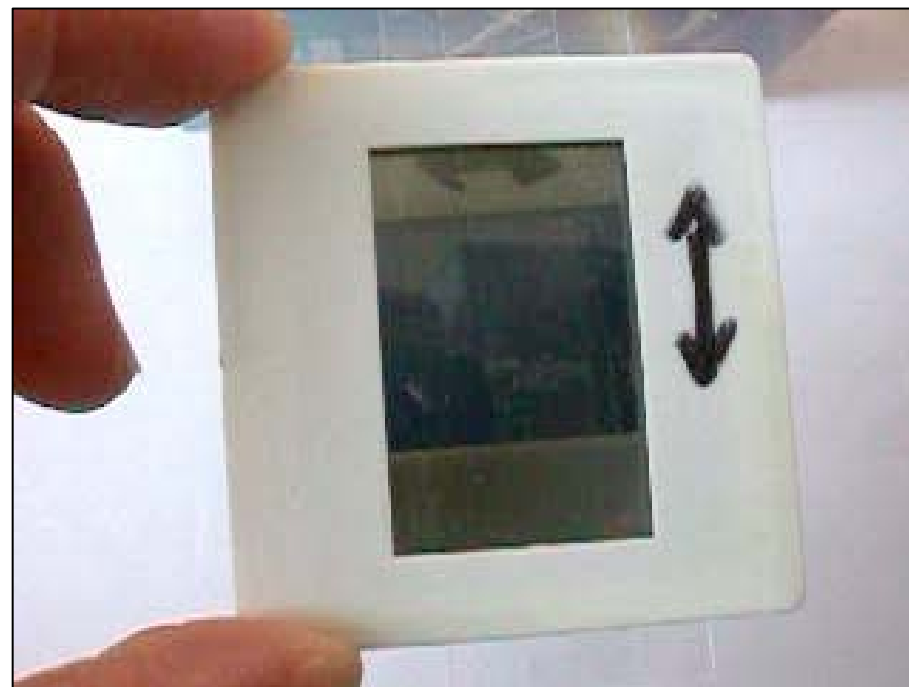
$$\psi = 90^\circ, \quad I_{\perp} = I_0 \cdot \sin^2 2\varphi \cdot \sin^2(\pi \frac{d}{\lambda} \cdot (n_e - n_o))$$



← Ragasszunk cellulz-csíkot az üveglapra

$$\frac{I}{I_0} = \sin^2(2\alpha) \cdot \sin^2 \left[\pi \frac{d}{\lambda} (n'_\gamma - n'_\alpha) \right]$$

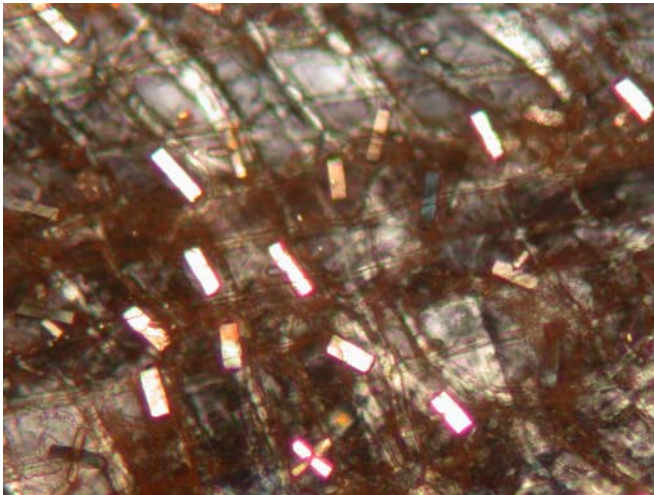
**Anizotrop anyag
keresztpolarizátor lemezek
között →**



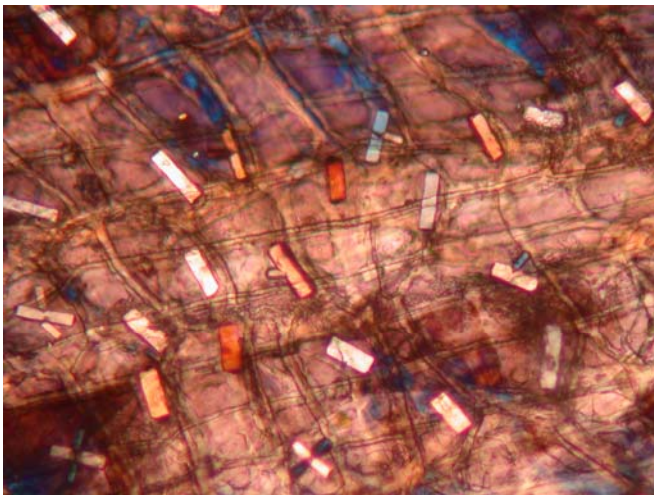


Polarizációs mikroszkóp felvételek keresztpolarizációban:

Transzmisszióban

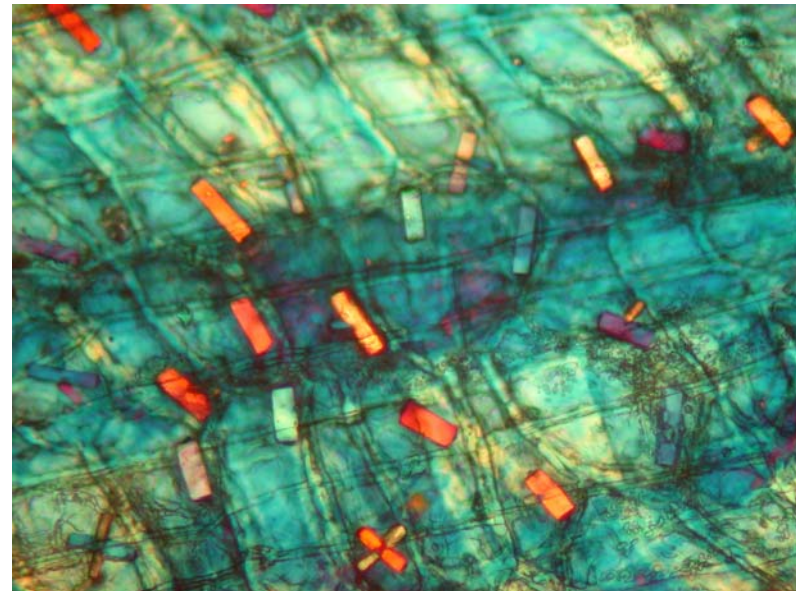


Nincs vörös kompenzátor



Vörös kompenzátorral

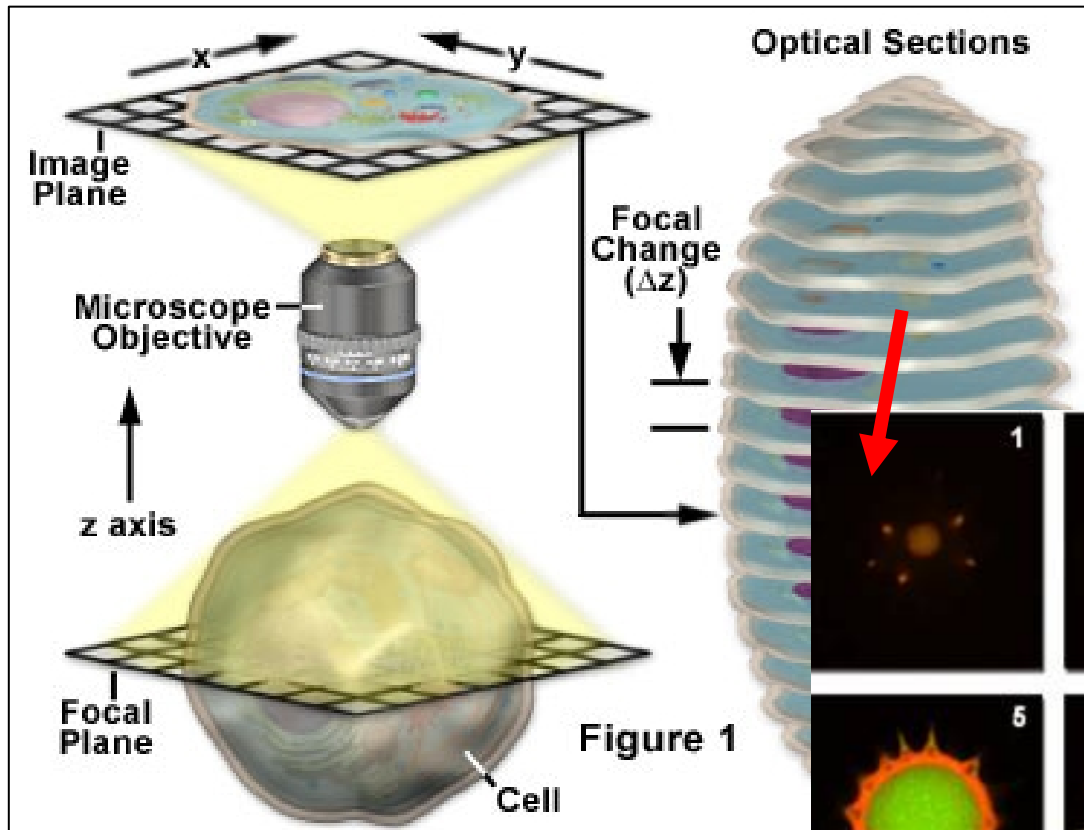
Reflexióban



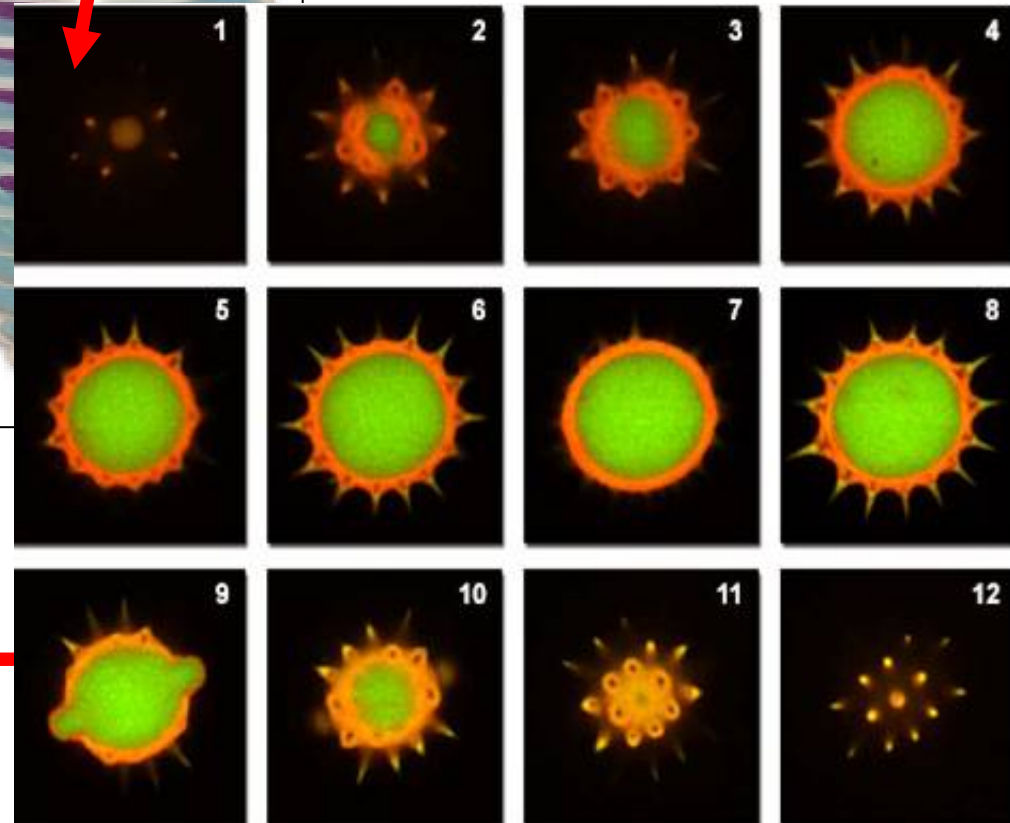
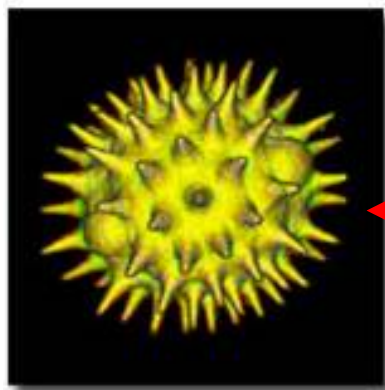
Vörös kompenzátorral

HAMIS SZÍNEK!

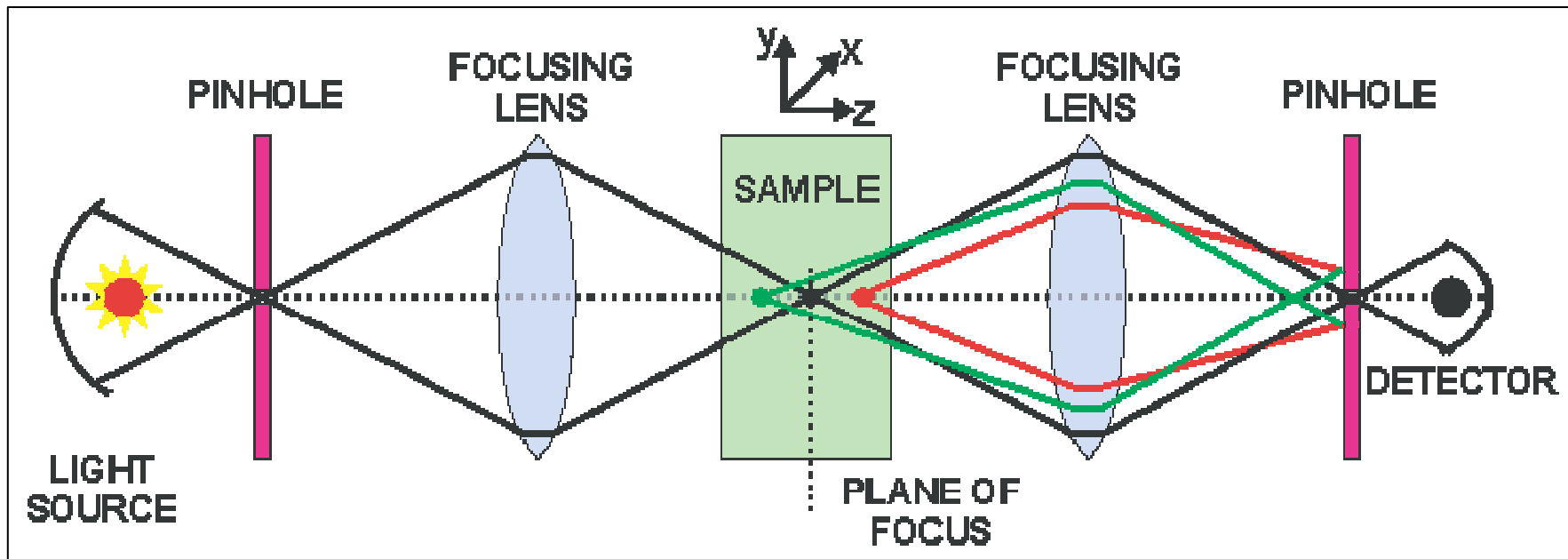
Konfokális mikroszkópia



Napraforgó
pollenszemcséje



Konfokális mikroszkópia, *transzmissziós üzemmód*



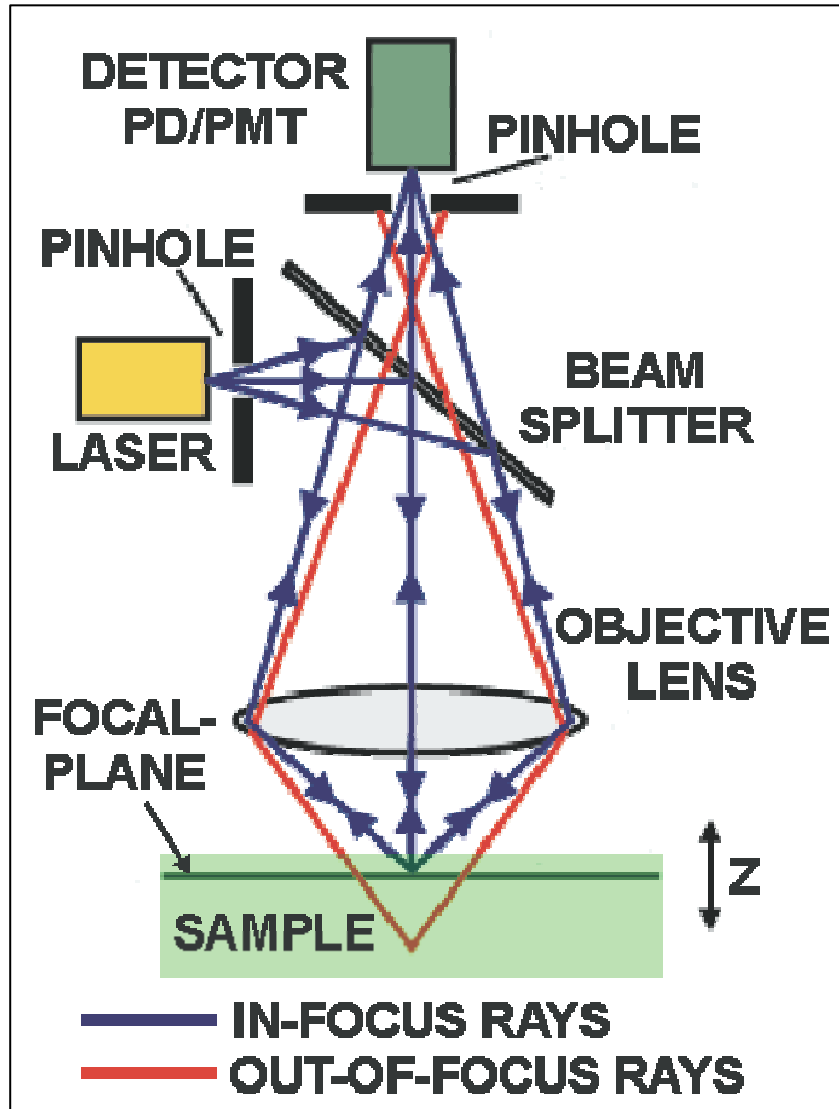
- Pontszerű fényforrás
- Fókuszáló lencse
- Lokális kh. /pásztázás/
- Detektorlencse
- Tűlyuk mögötti detektálás

A detektoroldali tűlyuk hatékonyan blokkolja azokat a fénysugarakat, amelyek nem a fókuszsíkból érkeznek.



Éles kép a fókuszsíkról!

Konfokális mikroszkópia, *refleksiós üzemmód, lat. feloldás*



LATERÁLIS FELOLDÁS

Nagyszögű mintakivilágítás

(konvencionális optikai mikroszkóp)

$$R = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$

$$\times \frac{1}{\sqrt{2}}$$

Pontszerű mintakivilágítás

(konfokális mikroszkóp)

$$R = 0.43 \frac{\lambda}{NA}$$

A digitális képfeldolgozás

Az előfeldolgozás eszközei

- Hisztogram
- Szűrés
- Vágás

A képosztályozás eszközei

- Statisztikus alakfelismerés
- Szintaktikus alakfelismerés

A képfelismerés

digitális képfeldolgozás

A digitális képfeldolgozás meglévő képekből való információk kinyerését szolgálja, vagyis a képben foglalt információ megértésére irányul.

- **Előfeldolgozás** a digitális kép létrehozását, leképezési hibáinak kijavítását, és a további feldolgozáshoz kedvező átalakítását (jellemző tulajdonságok kiemelése, zaj csökkentése) jelenti.
- **Képosztályozás** a kép jellemző sajátosságainak meghatározását, az előforduló alakzatoknak a megkeresését, valamint az ezek alapján való leképezést (osztályozást) jelenti.
- **Képfelismerés** a képen rögzített valóság értelmezését jelenti, mégpedig a megtalált alakzatoknak és egyéb információknak egy tudásbázisból vett adatokkal történő összevetésével.

Az **előfeldolgozás**, **képosztályozás**, **képfelismerés** szakaszai az **emberi látás** folyamán is értelmezhetőek. A különbség annyi, hogy - szemben a digitális képfeldolgozással - ez esetben analóg módon mennek végbe a különböző folyamatok.

A digitális kép képpontokból áll (pixelek) , melyek a digitális *kvantálás* során kapnak értéket.

hely szerinti kvantálás

Creation of a Digital Image

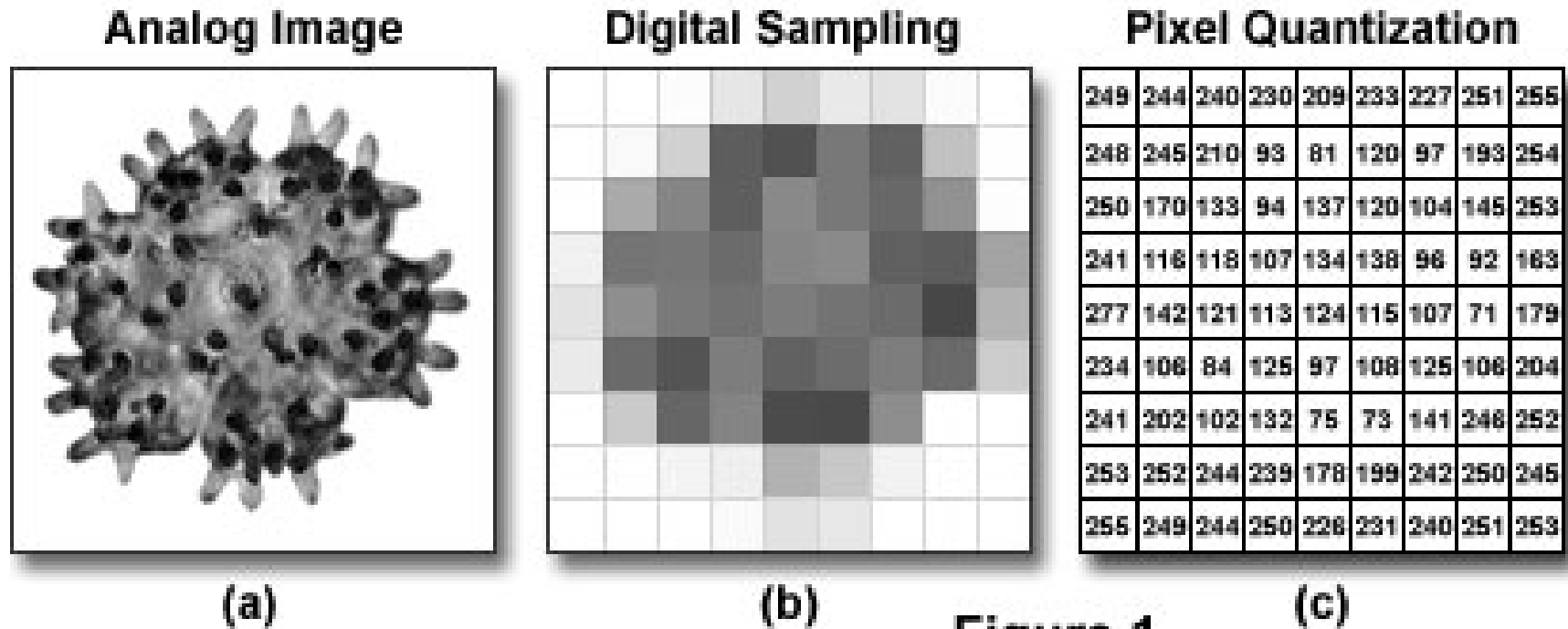
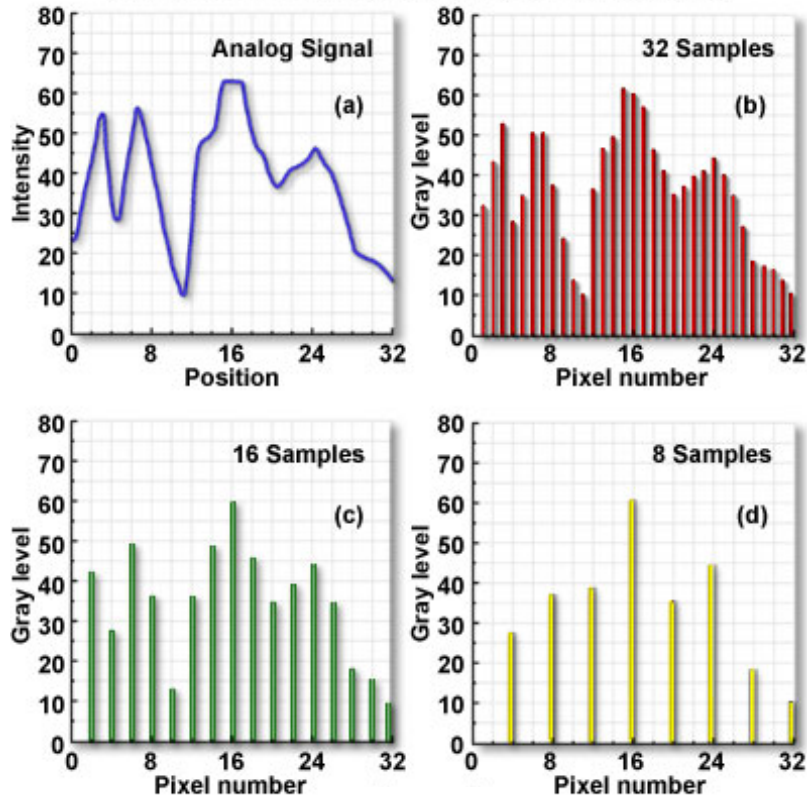


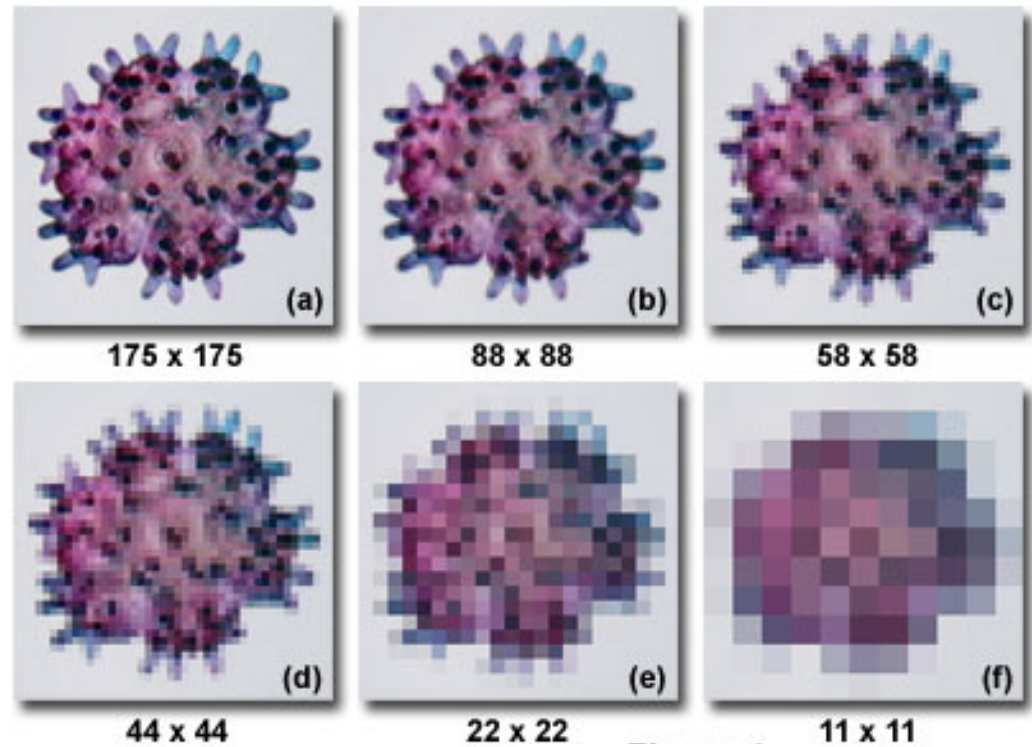
Figure 1

Térbeli feloldás

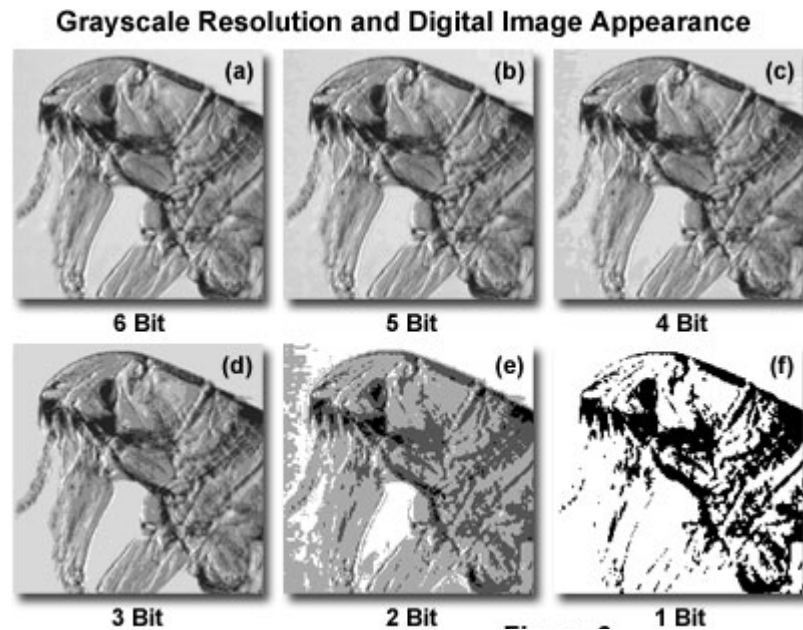
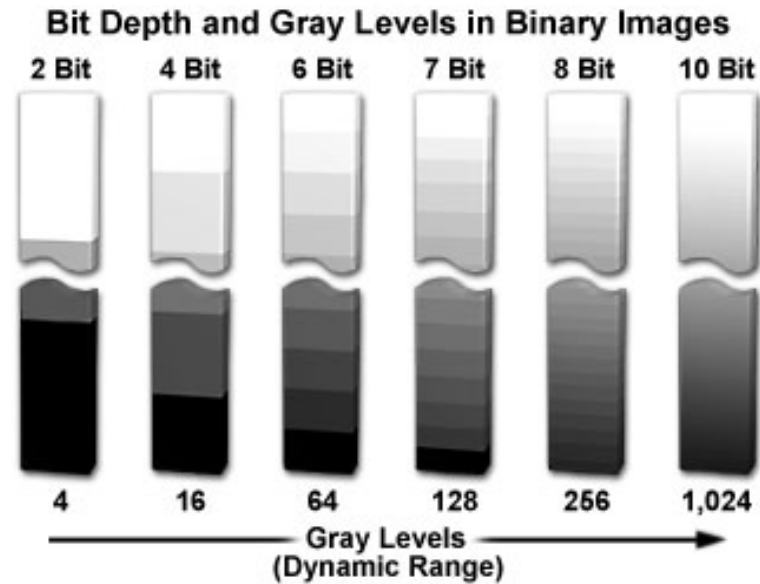
Sampling Frequency Effects on Image Fidelity



Spatial Resolution Effect on Pixelation in Digital Images



A képpontok intenzitásának kvantálása



Bit Depth	Grayscale Levels	Dynamic Range (Decibels)
1	2	6 dB
2	4	12 dB
3	8	18 dB
4	16	24 dB
5	32	30 dB
6	64	36 dB
7	128	42 dB
8	256	48 dB
9	512	54 dB
10	1,024	60 dB
11	2,048	66 dB
12	4,096	72 dB
13	8,192	78 dB
14	16,384	84 dB
16	65,536	96 dB
18	262,144	108 dB
20	1,048,576	120 dB

Digitális file formátumok memória igénye

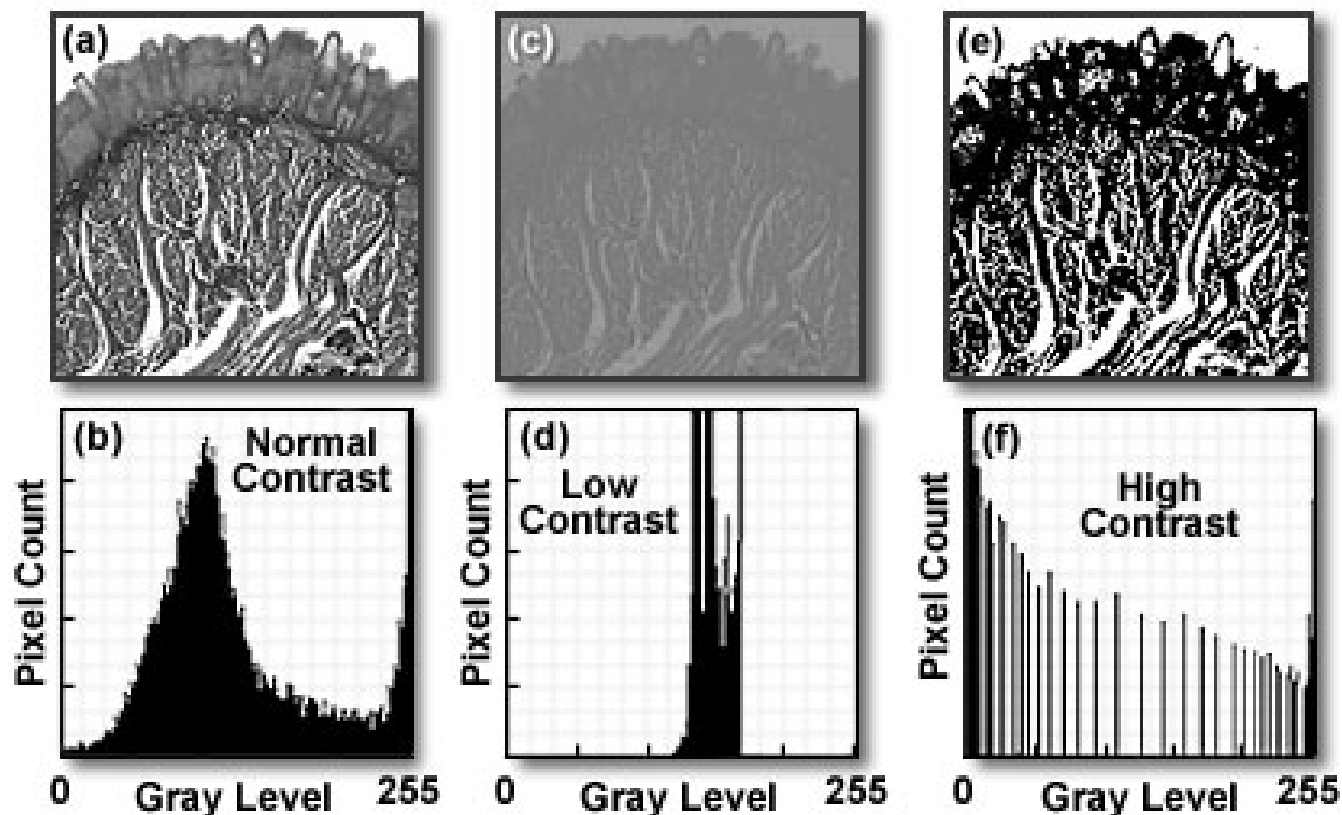
Pixel Dimensions	Grayscale (8-Bit)	Bitmap (24-Bit)	JPEG (24-Bit)	TIFF (24-Bit)
16 x 16	2k	2k	2k	2k
64 x 64	6k	13k	5k	13k
128 x 128	18k	49k	12k	49k
256 x 256	66k	193k	22k	193k
320 x 240	77k	226k	24k	226k
512 x 512	258k	769k	52k	770k
640 x 480	302k	901k	56k	902k
800 x 600	470k	1,407k	75k	1,408k
1024 x 768	770k	2,305k	104k	2,306k
1280 x 1024	1,282k	3,841k	147k	3,842k
1600 x 1200	1,877k	5,626k	161k	5,627k
2250 x 1800	3,960k	11,869k	276k	11,867k
3200 x 2560	8,002k	24,001k	458k	24,002k
3840 x 3072	11,522k	34,561k	611k	34,562k

Hisztogram

A képeken hisztogramjának átalakításával különböző változtatásokat úgynevezett **skálázást** végezhetünk:

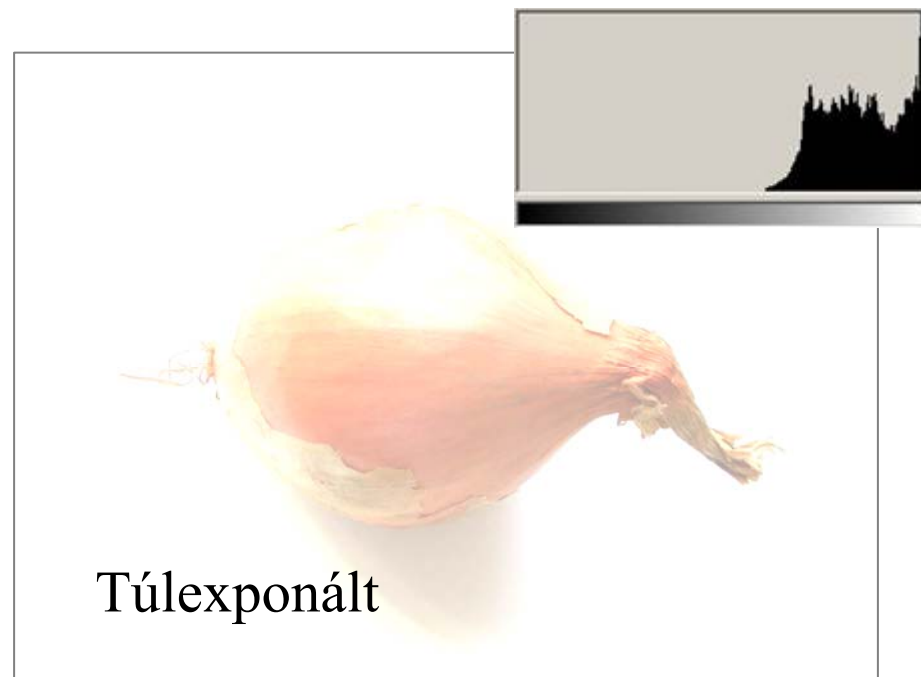
- a szakaszonként lineáris transzformáció,
- a sávzsugorítás (kontrasztkiemelés),
- az invertálás, és
- kvadratikusan illetve logaritmikusan transzformációk.

Grayscale Histograms and Contrast Levels in Digital Images

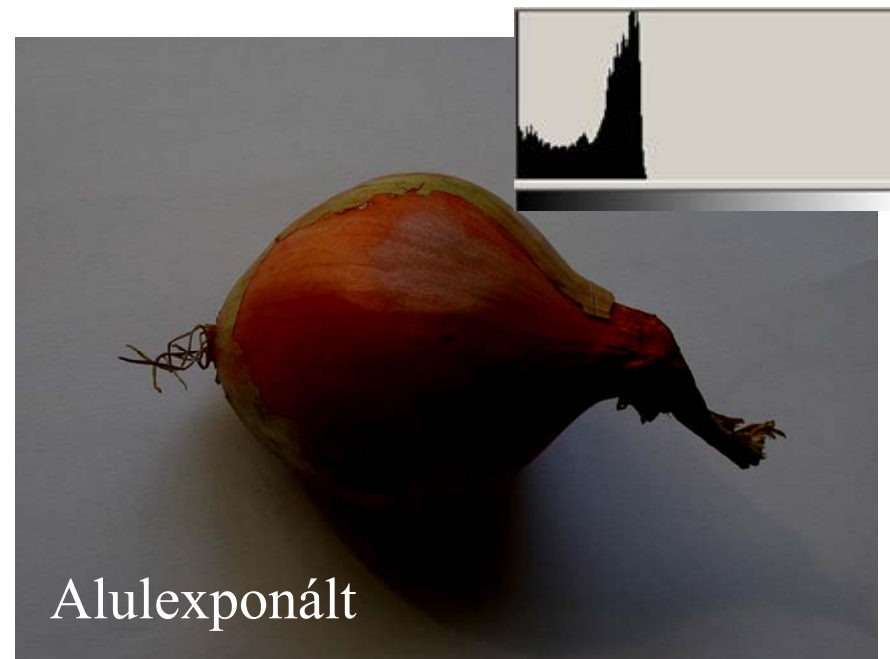


Mikroszkópos kép jellemzői

Világosság



Túlexponált



Alulexponált

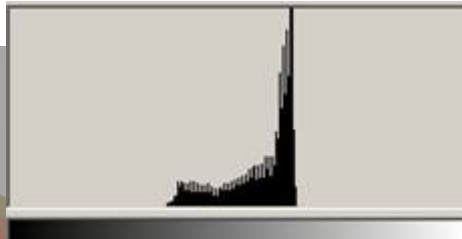
Kontrasztosság:



Túl kontrasztos



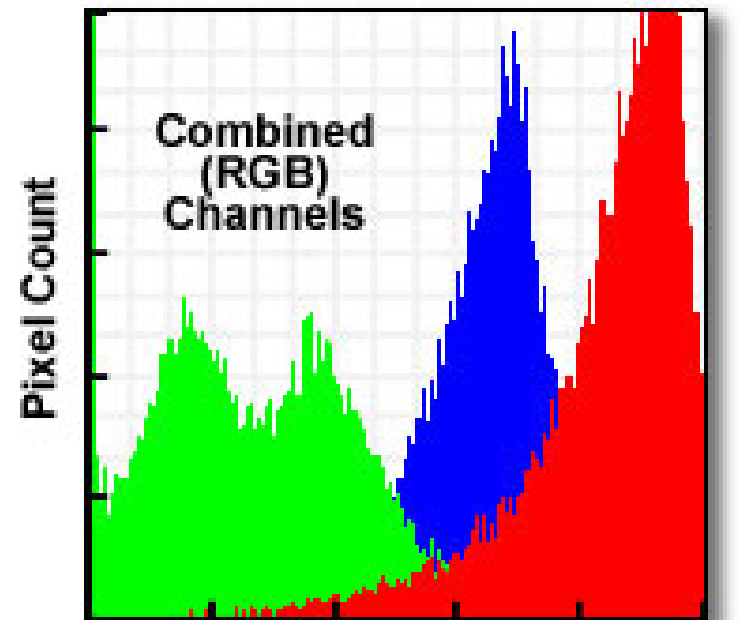
Nem elég kontrasztos



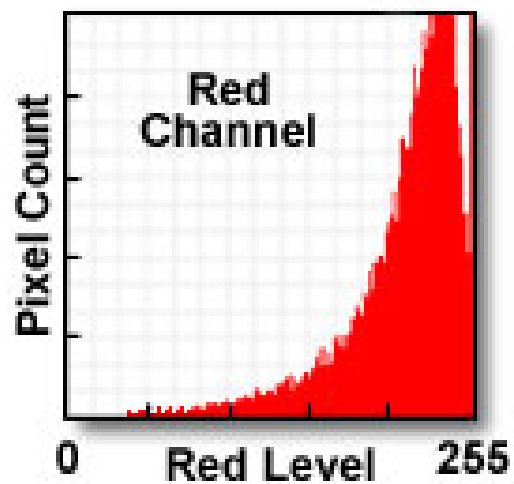
Color Digital Images and RGB Histograms



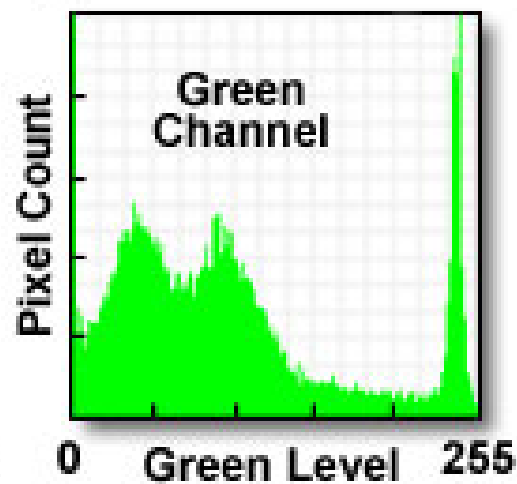
Color Digital Image



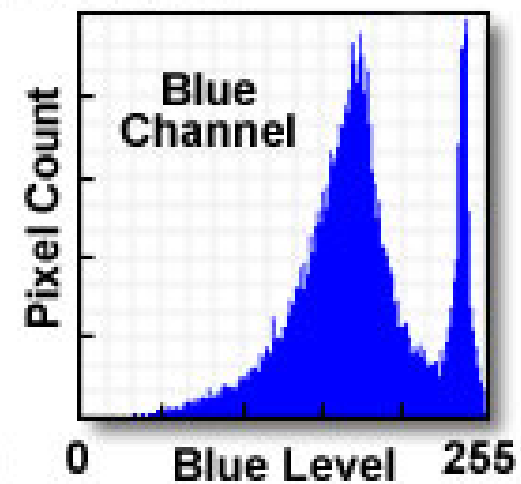
0 RGB Levels 255



0 Red Level 255



0 Green Level 255



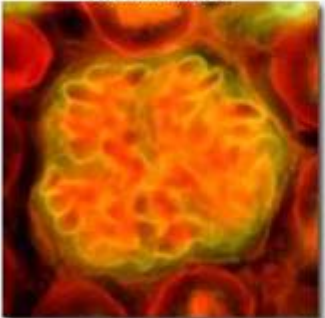
0 Blue Level 255

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

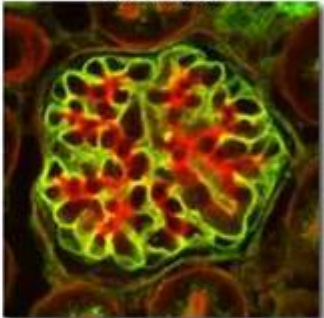
Laser Scanning Confocal Microscopy

Laser scanning confocal microscopes employ a pair of pinhole apertures to limit the specimen focal plane to a confined volume approximately a micron in size. Relatively thick specimens can be imaged in successive volumes by acquiring a series of sections along the optical (z) axis of the microscope.

Widefield Image



Confocal Image



Focus Lock Choose A Specimen: Mouse Kidney Magnification: 100X

Focus

Brightness

Z-Axis Position

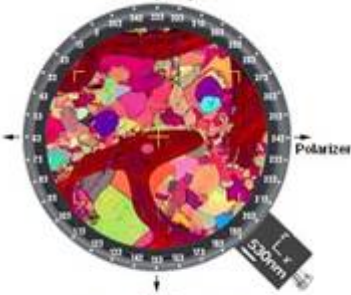
PMT Red Gain

Pinhole Aperture Size: Small Medium Large

Scan Line Speed

PMT Green Gain

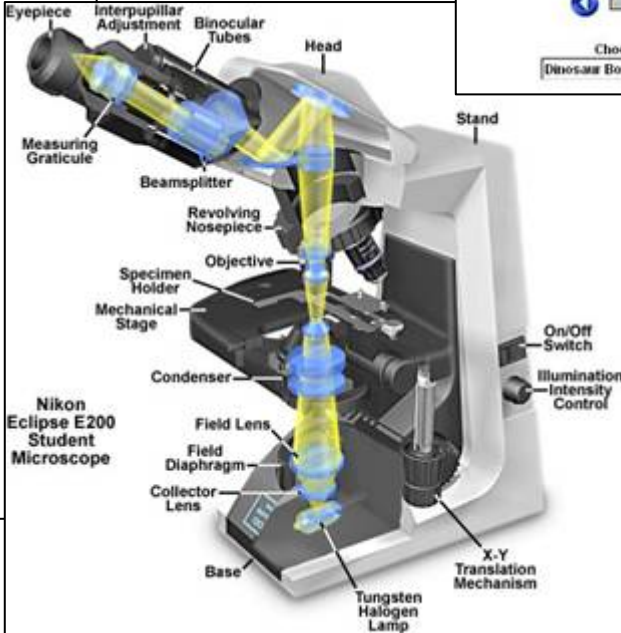
Analyzer



Polarizer

-10° 153° +10°
Angle

Choose A Sample:
Dinosaur Bone



Nikon Eclipse E200 Student Microscope

Labels: Eyepiece, Interpupillar Adjustment, Binocular Tubes, Head, Measuring Graticule, Beamsplitter, Revolving Nosepiece, Specimen, Objective, Mechanical Stage, Condenser, Field Lens, Field Diaphragm, Collector Lens, Base, Stand, Tungsten Halogen Lamp, X-Y Translation Mechanism, On/Off Switch, Illumination Intensity Control.

Előadásanyag letölthető: <http://www.staff.u-szeged.hu/~bereznai>