

Голубым выделено то что не очень нужно, желтым — недопереведенное.

Impressum: Author: Dr. H. G. Kapitza Editor: Dipl.Bibl. Susanne Lichtenberg Photos:
Furtwängler Translation: Sprachendienst CZO All rights of publication and translation reserved.
◆ Carl Zeiss, Oberkochen, 1994 Carl Zeiss Jena GmbH, 1997 2nd revised edition

Микроскопия — это не сложно. Вот Вы, и перед Вами микроскоп. Вы пытаетесь сделать первые шаги в мир микроскопии. Поначалу все эти винтики, выключатели, таинственные числа и цветные кольца на объективе приводят в замешательство. И хуже того, Вам никак не удастся глядя в микроскоп увидеть приличного качества изображение.

Тем не менее, микроскопия легче, чем Вы можете думать. Использование микроскопа – это навык, которым Вы вполне можете овладеть. Всё основано на принципах, которые всегда остаются неизменными. Как только Вы поймете эти принципы и примените их на практике, сразу придёт успех. Много лет практики и совершенствования, собственная переработка стандартных методов – это также поможет стать настоящим мастером в этой области. Данное руководство поможет Вам сделать успешное начало.

Микроскопия – это означает увидеть большое изображение чего-то маленького. Несмотря на весь технический прогресс, к настоящему моменту лучшая система анализа изображений – это глаз как орган зрения, в сочетании с мозгом. Никакие технологические достижения не сравнимы с глазом по скорости и разрешающей способности. Строение глаза можно соотнести с фотоаппаратом. Искривленная поверхность роговицы (1), вместе с хрусталиком, настраиваемым мышцами (1a), проецирует оптическое изображение на сетчатку (2). Количество падающего света контролируется изменением диаметра радужной оболочки (3). Четкое изображение создается гибким хрусталиком, линзой, длина фокуса которой изменяется мускулатурой таким образом, что фокусирование возможно на объект на расстоянии от приблизительно 20 см до бесконечности. Само изображение захватывается сетчаткой приблизительно 130 миллионами рецепторов-палочек (уровень серого) и 7 миллионами колбочек (определение цвета) и передается в мозг по кратчайшему пути через глазной нерв. Лучи света, показанные на следующей иллюстрации, образуют угол в 30 градусов. Примерно под таким углом видны, например, следующие объекты:

- Главный корпус МГУ высотой 240 м с расстояния 450м.
- Фотография высотой 13 см с расстояния 25 см.

Что означает «маленький»?

Когда мы захотим поближе взглянуть на тонкие капилляры стебля растения, мыотрежем тонкий срез стебля, положим на предметное стекло и защитим нежный объект покровным стеклом. Когда мы подносим готовый препарат к свету, мы немного можем разобрать. Мы только видим, что присутствуют какие-то тонкие структуры.

Причину этой проблемы легко объяснить. Детали строения, которые мы хотим увидеть, имеют диаметр всего 1/100 или даже 1/1000 миллиметра. Но приблизиться к нему ближе чем примерно на 20см мы не можем. Следовательно, угол зрения становится экстремально низким – вот почему мы не можем разобрать никаких деталей. В такой же ситуации мы оказываемся, глядя на вышеупомянутую высотку с расстояния 300м. Многие сложные детали, созданные каменщиками, не распознаются с такого большого расстояния, так как угол обзора слишком мал.

Первая помощь: лупа.

Решение проблемы для некоторых случаев было известно веками: использование увеличительного стекла, которое, помещенное между глазом и объектом, показывает всё более крупным. Однако, у такого метода есть ограничение: увеличение более чем в 8-10 раз

невозможно. Всякий кто хочет увидеть больше должен использовать «сложный» микроскоп.

Микроскопы увеличивают поэтапно

Когда одной линзы недостаточно, можно установить несколько, одну за другой.

Увеличивающее действие их перемножается, давая увеличение вплоть до 2000х.

Классический микроскоп увеличивает в два этапа: объектив создает увеличенное изображение объекта в так называемой плоскости промежуточного изображения, и окуляр (латынь: *oculus* = глаз) увеличивает промежуточное изображение так же, как это делает лупа. На рисунке показан путь луча от объекта наблюдения (стрелка), проходящий через три линзы. Мы рассмотрим только лучи, начинающиеся от двух концов объекта. Этого будет достаточно, чтобы пояснить, как происходит увеличение. На иллюстрации показан принцип ICS (ICS=Infinity Colorcorrected System – системы без хроматической разности увеличений, скорректированные на «бесконечность»), применяющийся и в микроскопах Axiolab. Этот современный микроскоп обладает следующей характерной чертой, отличающей "infinity optics": для поддержки объектива добавлена тубусная линза. Объектив проецирует изображение «на бесконечность», тубусная линза с длиной фокуса $f = 164.5\text{мм}$ формирует из этих параллельных лучей промежуточное изображение. Сначала допустим, что в пространстве между объективом и тубусной линзой не происходит ничего существенного для формирования изображения. В любом случае, лучи, идущие от объекта, находящегося в фокусе, здесь параллельны. Окуляр, в свою очередь, служит увеличительным стеклом, делая это маленькое промежуточное изображение ещё более увеличенным для глаза.

Увеличение микроскопа = увеличение объектива \times увеличение окуляра

Результат: на срезе стебля теперь представлены детали, которые мы хотели увидеть. Здесь общее увеличение микроскопа 100х. (10х объектив и 10х окуляр).

На иллюстрации — фотография также с увеличением 100х, с учётом увеличения фотоаппарата и при печати.

(А) Путь луча в микроскопе. Объект (1, показан стрелкой) отображается объективом (2) и сначала проецируется на бесконечность. Это означает, что световые лучи, исходящие от одной точки объекта, позади объектива идут параллельно друг другу. Затем тубусная линза (3), подобно фотоаппарату, создаёт увеличенное промежуточное изображение (4), которое захватывается окуляром (5) и показывается глазу (6). Результирующий угол обзора δ_1 намного больше, чем δ_2 в случае В, где объект наблюдается непосредственно с расстояния около 25см.

Одного увеличения недостаточно: что мы видим, определяется разрешающей способностью. Белый свет состоит из электромагнитных волн, длина которых составляет 400-700 нм. Важно помнить, что

1 мм = 1000 мкм

1 мкм = 1000 нм

Зеленый свет имеет длину волны 550нм, что соответствует 0,55мкм.

Когда мы смотрим через микроскоп на маленькие объекты (1), свет (2), проходящий через такие объекты, отклоняется от изначального направления (преломляется). Чем меньше объект, тем более выраженным будет это отклонение. Чтобы получить четкое изображение мелких структур, объектив (3) микроскопа должен собирать как можно больше преломленных лучей. Это особенно хорошо получается, когда объектив покрывает большой телесный угол. Это свойство описывается термином апертура («отверстие»). Чтобы можно было сравнивать между собой объективы, было введено понятие «числовая апертура»: это

мера телесного угла, покрываемого объективом. По определению,

Числовая апертура = Numerical Aperture = N.A. = $n \times \sin a$

где a – апертурный угол объектива.¹

n — коэффициент преломления иммерсионной среды, заполняющей пространство между объектом и объективом.

($n = 1$ для воздуха; $n = 1.51$ для стекла или масла)

Единственный способ повысить разрешающую способность – увеличить угол светового конуса также со стороны осветителя. Это дает объективу возможность получить даже очень сильно преломленные лучи. Такие отклоненные лучи берут начало от очень тонких структур. Сейчас для освещения используют конденсор (4) с той же числовой апертурой, что и объектив.

Другой способ — использовать иммерсионные среды (6) между фронтальной линзой объектива (3) и покровным стеклом (5). Прекрасные результаты были получены с маслом, коэффициент преломления которого ($n = 1,51$) точно соответствует стеклу. В этом случае на пути от объекта до объектива полностью исключается преломление лучей. Когда такой приём не используется, отражение всегда приведет к потере света на покровном стекле или, в случае больших углов, на фронтальной линзе объектива (на рис. 4.3 – слева). Из-за этого отражения полезная апертура объектива и разрешающая способность уменьшаются.

Что такое на самом деле «разрешающая способность»?

Положение, вплоть до которого два маленьких объекта всё ещё видны отдельно, используется как мера разрешающей способности микроскопа. На некотором расстоянии d_0 достигается предел, и эти объекты становятся видны как один. Это можно рассчитать теоретически. Для этого рассмотрим рис. 5.1 справа. В первую очередь важно знать, что объектив и тубусная линза (2) не дают изображения точечного объекта (например, крошечного отверстия в металлической пластинке (1)) в виде яркого диска с четко очерченным краем – на самом деле это будет слегка сглаженное пятно, окруженное дифракционными кольцами (3), или дисками Эри, названными так по имени открывателя. Появление дифракционных колец вызвано ограничивающей функцией апертуры объектива: объектив действует как отверстие, за которым и обнаруживаются дифракционные кольца. Чем выше апертура объектива (N.A. Obj.) и конденсора (N.A. Cond.), тем меньше будет d_0 . Короткие длины волн света также улучшают разрешающую способность:

$$d_0 = 1.22 \lambda / (N.A.obj. + N.A.Cond), \text{ или проще } d_0 = 1,22 \lambda / 2N.A$$

где λ – длина световой волны, около 550 нм для зеленого света

Коэффициент взят из вычислений для случая, показанного на рис. 5.2. Кривые интенсивностей для двух дифракционных колец были наложены друг на друга. Когда две точки изображения далеки, их легко распознать как отдельные объекты. По мере того как расстояние между ними уменьшается, достигается предельное положение, при котором главный principal максимум объекта 2 (пунктир) накладывается coincides на главный principal максимум объекта 1 (сплошная линия). Наложённые кривые показывают два максимума интенсивности, разделённых некоторым спадом. Интенсивность здесь уменьшена примерно на 20% по сравнению с двумя пиками. Этого как раз достаточно, чтобы глаз мог различить две точки (критерий Рэля).

Легче это понять, сделав такое сравнение: едва ли по телефону можно передать нежные звуки скрипки, так как полоса пропускания здесь очень ограничена («низкая апертура»). Намного лучший результат можно получить, используя высококачественные микрофоны и усилители,

¹ Апертурный угол — угол между крайним лучом конического светового пучка на входе (выходе из) оптической системы и ее оптической осью.

Угловая апертура — угол между крайними лучами конического светового пучка на входе (выходе из) оптической системы. Из [http://ru.wikipedia.org/wiki/Апертура_\(оптика\)](http://ru.wikipedia.org/wiki/Апертура_(оптика)) (прим.перев.).

частотный диапазон которых соответствует человеческому слуху («высокая апертура»). В музыке информация содержится в средних звуковых частотах, однако тонкие нюансы звука несут высокие обертоны. В микроскопе тонкие структуры «закодированы» в сильно преломленных лучах. Если мы хотим видеть их и после объектива, мы прежде всего должны убедиться, что они попали в объектив. Это тем проще, чем больше апертурный угол и соответственно числовая апертура.

Числовая апертура объективов тем больше, чем выше увеличение, вплоть до 40х объективов. Например, объективы PlanNeofluar с увеличением 5, 10 и 20х имеют числовые апертуры 0,15, 0,30 и 0,50 соответственно. Теоретическим пределом в воздухе является $NA=1$, что соответствует полному апертурному углу объектива $2\alpha=180^\circ$. На практике удается достичь апертуры 0,95, что соответствует углу более чем 140° . Очень сложно выполнить объектив с большой апертурой для малых увеличений из-за обширного поля зрения и большого диаметра линз.

В следующей таблице приведены значения разрешающей способности, рассчитанные для нескольких объективов. Расстояние до образца – d_0 , и, умножив его на увеличение, получаем расстояние между различными точками D_0 point distance в промежуточном изображении (для зеленого света – 550нм). Наконец, число n отражает количество различных точек, как если бы они были выставлены по диаметру окружности в 20мм (т. е. 20мм/ D_0).

(апертура конденсора равна апертуре объектива)

Изображение ниже показывает разницу в разрешающей способности между объективами 40х/0,75 (слева) и 40х/1,3МИ (справа). Едва ли какую-то разницу можно увидеть на распечатанной картинке с малым увеличением (наверху), в то время как фрагменты изображения с дополнительным 8х увеличением (внизу) показывают заметные отличия.

Что означает «полезное увеличение»?

«Чем больше, тем лучше» – однако, это неприменимо к выбору «полезного» увеличения. Имеется в виду, что не следует пытаться повысить общее увеличение микроскопа, используя окуляры, обеспечивающие большое дополнительное увеличение (например 16х) или другие оптические «улучшатели», если объектив при небольшой числовой апертуре не предоставляет достаточного количества пикселей. С другой стороны, вы потеряете тонкие нюансы, если объектив (например, Планапохромат 10х) проецирует очень тонкие детали в промежуточное изображение, а вы пользуетесь окулярами с малым увеличением.

Применяют следующее простое правило:

- Общее увеличение микроскопа должно быть более чем в 500 раз, но менее чем в 1000 раз больше апертуры объектива. В этом диапазоне и находится полезное увеличение.

Resolving power: Practical hints Modern microscope objectives from Carl Zeiss permit the theoretical resolving power to be also achieved in practice ♦ provided that good specimens are used. However, it is often the small things that prevent success:
q Are the objective and the specimen clean?

A fingerprint on the front lens of an air objective alone may be sufficient to affect the high-contrast reproduction of a specimen since scattered light is produced. The same applies to immersion objectives soiled with residues of resin or emulsions (e.g. oil and water). Such cases require careful cleaning using a soft cloth and pure alcohol.

q Do the cover slips have the correct thickness?

It is very important that cover slips for objectives of a high aperture used without immersion oil

have the standard thickness of 0.17 mm, since here the cover slips are already taken into consideration in the complicated computation of objectives. Therefore, if a different thickness than the standard one is used, the quality of the optical image suffers visibly in the case of high apertures. Experience has shown that the following deviations are just acceptable and no more: \diamond 0.01 mm with N.A. > 0.7 \diamond 0.03 mm with $0.3 < \text{N.A.} < 0.7$

q Do you use the correct immersion oil?

Most high-performance objectives from Carl Zeiss are used with immersion oil. The right oil with the refractive index $n = 1.51$ and a suitable oiler are supplied with the objective. The oil is PCB-free and exhibits scarcely any autofluorescence. The image will be markedly impaired if air bubbles are contained in the immersion layer. To avoid these bubbles, it is vital to apply the oil in the right way. The operating instructions include the relevant hints.

Всё видно?

Сейчас считается само собой разумеющимся, что рутинная микрокопия представляет всегда качественные изображения. Однако это не всегда было так. На протяжении нескольких веков создание микроскопов и соответствующей оптики было полностью делом мастерства. Совершенство этих ранних приборов зависело от опыта полировщиков линз, и достигнутые результаты часто являлись полностью делом случая. С большой заботой и напряжением создавали и внешний вид тех инструментов. Во многих случаях использовались они лишь, чтобы повысить престиж своего владельца. Расхождение между внешним лоском и качеством предоставляемых изображений было – по сегодняшним меркам – потрясающим. Несмотря на это, микроскопия стала любимым развлечением богатых эстетов в 18 веке. Например, Елизавета Шарлотта Пфальцская, ставшая знаменитой как жена младшего брата короля Людовика IV, владела ценным микроскопом и регулярно его использовала; она точно предсказала, что этот инструмент в будущем станет неосцимемо важным в применении к медицине. В то время такое предсказание казалось неосуществимой фантазией.

Первые шаги.

В 19 веке произошел прорыв в области естественных наук. Уже в 20-30х годах наука о свете и теория оптических изображений получили прочную основу. Одним из наиболее успешных исследователей в этой области – и не только теории – был Иосиф Фраунгофер (1787-1826). Именно его следует благодарить за создание ныне наиболее широко распространенной системы линз – с коррекцией цветовых аберраций (ахроматические линзы, или ахроматы) – и за фундаментальные представления о дифракции света. Однако, главным полем деятельности Фраунгофера была астрономия, и в то время никто еще не задумывался о возможности прямого использования этих знаний для производства микроскопов. В этот период бесчисленных технических достижений механик Карл Цейсс основал собственное дело в университетском городе Йена (земля Тюрингия в Германии). Этот молодой человек поставил себе целью обеспечение исследователей высококачественными приборами. Сегодня мы бы сказали, что он увидел на рынке нишу и захотел этим воспользоваться. Между 1846 и 1866 в его мастерской изготавливались микроскопы одинаково высокого качества, и делались они по всем правилам ремесла. Сначала это были очень простые приборы, применявшиеся как операционные микроскопы (**dissection microscopes**), но в 1857 из мастерской Цейсса вышел первый «настоящий» микроскоп – "Stativ 1", снабженный окуляром и объективом. Этот инструмент сочетал в себе практическую функциональность с искусным мастерством исполнения.

Почти 20 лет спустя, Карл Цейсс уже нанимал около 20 человек квалифицированных сотрудников и наслаждался процветанием своего бизнеса. У него были все основания быть удовлетворенным. Но, как истинный бизнесмен, он чувствовал, что можно достичь большего и что он не может просто почитать на лаврах. Он знал, что его приборы хороши, но он

отказывался принять тот путь проб и ошибок, которым в то время пользовались при производстве оптики. И он не забывал о конкуренции.

Его целью было наладить серийное производство в своей мастерской. Для этого было необходимо построить процесс производства на точных принципах. Его желание: «Рабочие руки не должны иметь иных функций, кроме точного выполнения деталей тех форм и размеров, которые вычислены заранее».

Передача технологий.

Но кто должен придумать эти принципы? Для того чтобы попытаться осуществить задуманное, Карл Цейсс разыскал 26-летнего талантливого физика и математика, Эрнста Аббе. Потребовались инвестиции: пять-шесть лет теоретических работ над проблемами формирования изображения в микроскопе были профинансированы – и в те времена инновации стоили дорого. Но мечта обоих партнеров о создании лучшей продукции заставляла их упорно идти к цели. И в конце концов Аббе выполнил свою задачу настолько, что в 1872 году для Карла Цейсса стало возможным представить линейку из 17 объективов, включая три иммерсионные системы, все с невиданным до тех пор качеством изображения. Конструирование микроскопов на прочной теоретической основе в конце концов стало возможным. Так это и остается сегодня. Эта теория включает в себя и новую формулу для вычисления теоретически возможного разрешения микроскопа:

Ключевые технологии.

Предприятие продолжало разрастаться. Эрнст Аббе стал равным партнером Цейсса: информация стала неотъемлемым капиталом молодой компании. В последующие годы Аббе стал столь же знаменит и как предприниматель исторического масштаба, социальный реформатор, ученый. Всё – на основе процветания, которое он, как учёный, сделал возможным.

Попытка введения инноваций продолжалась с неослабевающей решимостью. Теория, созданная Аббе, предсказывала, что ещё больших успехов можно достигнуть, если ученые смогли бы принять в рассмотрение свойства используемых типов стекла. Иными словами, он хотел не только использовать то что было доступно, но и фактически создать то что было необходимо. В конце концов Аббе сумел найти третьего участника команды: Отто Скотта, специалиста по химии стекла. И вновь кто-то отступает от проторенных дорог – и оказывается в состоянии это сделать. Его последующие масштабные серии экспериментов в поиске новых типов стекла и определении их свойств приносят удачу. В конце концов удаётся добиться успеха, выходящего далеко за рамки микроскопии: в результате основывается Йенский стекольный завод «Schott & Genossen». В области микроскопии, теоретические прогнозы Аббе воплотились в жизнь в 1886г. Создание апохроматических объективов, в том числе иммерсионных, на том этапе завершило стадию опытно-конструкторских работ.

Что такое «освещение по Кёлеру»?

Совершившийся в области разработки объективов прогресс привел к увеличению поля зрения микроскопа до невиданных раньше размеров. Со временем стало ясно, что большее внимание следует уделить и освещению. Для микроскопии настала эра проработки деталей. Профессор Август Кёлер (1866-1948) became an early member of staff at Carl Zeiss in Jena, и в 1893г. он опубликовал пособие по корректному освещению микроскопического препарата. Он разработал хорошо продуманную систему освещения для микроскопа, которая наконец сделала полностью доступной разрешающую способность объективов Аббе, особенно для получившей впоследствии такое распространение микрофотографии.

Система освещения по Кёллеру предоставляет изображения с равномерным освещением всего поля, и в то же время позволяет повысить разрешающую способность за счет применения конденсора. Особенно важное преимущество: апертурная диафрагма конденсора

позволила поддерживать баланс между контрастом изображения и разрешающей способностью, без малейшей потери равномерности яркости изображения. Знание и соблюдение разработанных Кёллером рекомендаций и соответствующая настройка микроскопа, автоматическая – моторизованного микроскопа через компьютер – или ручная, по-прежнему необходимы и сегодня. Такое небольшое дополнительное усилие всегда вознаграждается результатами не только полезными, но и убедительными. А теперь вновь вернемся к настоящему.

Всё под контролем: ход световых лучей – от осветителя до глаза

Конструкция микроскопа должна обеспечить очень точное прохождение световых лучей через микроскоп. Только так можно достичь получения яркого изображения даже при слабом осветителе. Недостаточная яркость – не большая проблема в обычной светлостольной микроскопии. Однако при использовании методов контрастирования, таких как фазовый или поляризационный контраст, в оптический путь вводятся дополнительные оптические элементы, отнимающие большую часть светового потока. В результате остаётся слишком мало света для наблюдения, и изображение становится тёмным. Следующая важная причина использовать диафрагму и фильтры в микроскопе, говоря коротко, состоит в том, что по двум причинам освещение следует перенастраивать после каждой смены объектива. Первая: размер наблюдаемой области объекта для каждого объектива свой. Объектив с малым увеличением, например 4x, предоставляет большое поле зрения (в данном случае – с таким большим диаметром как 5мм, при условии что окуляр допускает промежуточное изображение диаметром 20мм). Если переключить 40x объектив, диаметр видимого поля образца сжимается в 10 раз, до всего 0,5мм. Видимое поле становится тем самым меньше в 100 раз. Вторая причина: числовая апертура повышается с 0,12 до 0,65, а если описывать через угловую апертуру – с 15 до 80 градусов. Оба случая проиллюстрированы на рис. 10.1 выше. Однако для настройки света по Кёллеру требуется, чтобы ничего кроме видимого поля не освещалось, так как «лишний» свет вне видимого поля – это мешающий, рассеянный свет. Однако в то же время конус света, освещающий образец, всегда должен соответствовать угловой апертуре объектива, чтобы можно было в полной мере использовать числовую апертуру оптики – это единственный способ добиться максимальной разрешающей способности.

Это становится возможным благодаря таким приспособлениям, как конденсор, содержащий апертурную диафрагму (2), и полевая (А) диафрагма, обычно вмонтированная в основание микроскопа. При ближайшем рассмотрении можно обнаружить, что полевая диафрагма отображается в плоскости объекта посредством конденсора. Именно полевая диафрагма определяет, какая часть объекта освещается. Однако апертурная диафрагма отображается на «зрачке» объектива (3) и регулирует освещенность этого зрачка. Вся оптика рассчитана таким образом, что апертурные углы конусов света собираются воедино апертурной диафрагмой. Следовательно, в микроскопе есть две различные группы оптических плоскостей, связанных друг с другом. Первая группа состоит из нити лампы накаливания, апертурной диафрагмы, «зрачка» объектива и зрачка глаза наблюдателя (1,2,3,4). Эта группа определяет путь лучей **This group defines the beam path of the pupils** и разрешающую способность микроскопа. В состав второй группы входят полевая диафрагма, объектная плоскость, промежуточное изображение и сетчатка глаза наблюдателя (А, В, С, D). Это важнейшие оптические плоскости пути луча, формирующего изображение.

При прохождении плоскостей А-Д изображение становится видимым. Эти же плоскости диктуют и ограничения получаемого изображения. В одной группе каждая такая плоскость отображает предыдущую плоскость. Мы говорим о "сопряженных" плоскостях, это означает, что они взаимосвязаны.

Не будет преувеличением сказать, что почти все искусство микроскопии - если не учитывать сам препарат – состоит в правильном использовании полевой и апертурной диафрагм. К счастью, для этого есть простые правила. На следующих страницах подробно описано, как

правильно установить свет по Кёллеру. Вам будет намного проще понять принцип Кёллера, если вы ознакомитесь со смыслом специальных оптических планов (плоскостей), упомянутых раньше. Их отношения друг с другом очень упрощенно можно представить следующим образом:

Плоскости "1" – "4" Pupils

For resolving power, contrasting techniques, brightfield. Компоненты: светофильтры и контрастирование. Настройка осуществляется через апертурную диафрагму.

Плоскости «А» – «D» Fields

For fields of view, illumination, intermediate images. Components: reticles and scales. Настройка осуществляется через полевую диафрагму.

Тот факт, что лучи накладываются, может иметь и негативные последствия. Наиболее ярким примером этого являются частицы пыли на окуляре: эти частицы будут резко отображаться вместе с изображением в микроскопе и не украсят микрофотографии.

Из сказанного выше становится ясно, что конденсор, который собирает освещающий световой пучок на объекте, играет в микроскопии столь же важную роль, как объективы и окуляры. Конденсор показывает препарат в правильном свете. The condenser makes the specimen appear in the right light.

Если вы хотите только получить оптимальную интенсивность освещения, выберите the critical illumination system систему освещения, где источник света отображается на объекте, а не on the pupils. Однако освещение тогда не будет однородным. Такое освещение получают, перенастраивая lamp collector (fluorescence).

Легче в управлении Easier to handle: путь луча в отраженном свете

Тот, кто работает с металлом, керамикой или другими техническими образцами, в большинстве случаев будет использовать отраженный свет will use a reflected-light microscope, поскольку такие образцы являются непрозрачными и как правило рассматривать можно только их поверхность.

Together with lenses which are integrated into the stand, the objective of the reflected-light microscope acts as a condenser. This means that the optical axis and the position of the remaining "condenser lenses" cannot be changed. The luminousfield diaphragm also only has to be set once for one objective and is then suitable for all the other objectives.

Путь лучей при микроскопии в отраженном свете.

Свет от источника (1) проходит через апертурную диафрагму (2) и полевую диафрагму (A) к светоделителю. Здесь примерно половина света отражается обратно в просвет объектива (3) и объективом проводится в плоскость объекта. Поверхность образца отражает или рассеивает свет обратно в объектив. На обратном пути, светоделитель, в свою очередь, около половины света перенаправляет к промежуточной линзе, которая производит промежуточное изображение (C), которое дополнительно увеличивается и наблюдается с помощью окуляра.

Увидеть разницу: методы контраста в микроскопии

При работе с микроскопом ваши препараты не всегда будут хорошо окрашены, чтобы их можно было рассмотреть обычным способом (на светлом поле). Неокрашенные образцы, такие как бактерии или живые клеточные культуры, практически не поглощают света даже при идеальной настройке освещения. Низкое светопоглощение приводит к тому, что очень мала разница в распределении интенсивности на изображении. Глаз человека распознает объект на ярком фоне, если локальные отклонения интенсивности не меньше, чем 10-20%.

This "modulation" of light intensity is far from reached by many microscope objects in brightfield. The contrasting techniques described in the following are tricks which allow optical effects in the sample \blacklozenge not visible to the eye \blacklozenge to be translated into intensity changes which can be recognized by the eye.

Darkfield in transmitted light

Fine structures can often not be seen in front of a bright background. This situation changes if the structures are illuminated from the side and viewed in front of as dark a background as possible. The structures then really seem to light up.

An artificial dark background is created in the microscope using an annular stop (1) in the condenser. Although the condenser optics (2) then illuminates the sample (3), it does so with a hollow cone of light. The light does not hit the objective (4), but passes it by on the outside. If there is no sample, the image seen in the eyepieces remains completely dark. However, if objects, e.g. small particles of bacteria, are in the object plane, light is laterally diffracted away from the straight path. Provided that this light hits the aperture cone of the objective, it is gathered by the objective and fused to form an image. The object becomes brightly visible in front of a dark background. For this, it is necessary for the objective aperture to be smaller than the inner aperture of the illuminating light cone (case A). However, objectives with an integrated variable iris diaphragm (5) are also available to shutter out the indirect light even if it falls into the aperture cone of the objective (case B). This permits the use of very high apertures for darkfield.

18.1

Fine structures become visible: The spider webs (above) are barely recognizable in front of the bright background \blacklozenge a light green field in this case. The picture completely changes when a dark background \blacklozenge a dark forest \blacklozenge is chosen. The structure seems to light up (below). In both cases, the object is illuminated at an angle from above by the bright afternoon sun. However, the sunlight did not directly hit the camera; this direct illumination would have swamped everything else.

18.3

The diatoms are barely visible in brightfield (left). This is quite different in darkfield (right) where they seem to light up.

Фазовый контраст в проходящем свете.

Этот метод, описанный голландцем Фрицем Цернике в 1934 году, не только принёс своему открывателю Нобелевскую премию по физике в 1953, но и радикально изменил фундаментальные биологические и медицинские исследования живых, то есть неокрашенных, клеток. Фазовый контраст идеально подходит для тонких неокрашенных объектов, например монослойных клеточных культур, толщина которых над ядром составляет 5-10 мкм, но менее 1 мкм на периферии, и которые почти не поглощают свет в видимой части спектра. Глаз едва различает их и в светлом, и в тёмном поле. Однако, существуют очень незначительные различия в коэффициентах преломления между клетками и омывающим водным раствором (A) и внутри клетки – между цитоплазмой (B) и клеточным ядром (C).

Фазовый контраст делает эти тонкие отличия видимыми за счет использования оптических

систем, т. е. он превращает их в различие в интенсивности.

The optical effect used consists of a shift of phase in the light ray. During their journey through cell nuclei, cytoplasm or water, the light waves are shifted by small degrees, since these media have slightly different refractive indices. The higher the refractive index of a medium, the smaller the speed or velocity of light in the medium. As a result, a light wave which has passed through a cell nucleus, lags behind the light waves which only had to pass through water. The amount of "lag" is called phase shift. Before their entry into the sample, the waves are still "in phase", but this is no longer the case when they have passed through the various materials. The amount of the phase shift behind the sample depends on what media (refractive indices) the waves had to pass through on their paths and how long the paths were in these media. The human eye cannot see these phase shifts in the microscope image. It can only distinguish between different intensities and colors. Therefore, the phase contrast technique uses optical tricks to translate phase shifts into "grey values". Much like darkfield, the aperture diaphragm is replaced by a phase stop (1) which illuminates the sample (3) via the condenser optics (2). However, here the entire light bundle enters the objective (4) and an image of the phase stop (1) is created in the objective pupil (5). A "phase ring" is attached to the objective pupil (5) which does two things: firstly, it attenuates like a grey filter the pronounced bright light coming from the phase stop of the condenser, and secondly, it adds a constant phase shift to this light. If the specimen contains objects such as cells and their nuclei, they guide the light from the direct ray to new paths (7). This light will not pass through the phase ring in the objective, i.e. it will neither be attenuated nor will it be "retarded". All the partial rays are fused to form the intermediate image (9) by the tube lens (8). The partial rays which have all been "retarded" to varying degrees are superimposed in the intermediate image, where they amplify or attenuate each other, depending on the phase position. Since the direct ray was strongly attenuated by the phase ring in the objective, the much weaker, diffracted light can become effective. The result of these interference processes in the intermediate image are bright and dark spots without which the cell to be examined would not be visible to the eye. Optimum contrast is created by selecting the right retardation and attenuation for the light waves in the phase ring of the objective.

A concomitant of phase contrast is the haloes of light which appear on the structure borders. They are caused by the optical principle and may result especially in the case of thick specimens in "illegibility" of the image, since the haloes are superimposed many times over. Therefore, phase contrast is a method which is only recommended for very thin objects where several structures are not physically lying on top of each other. In a thick specimen, details may be blended into an image which, in the final analysis, is then no longer "legible".

The microscope equipment for phase contrast Phase contrast requires special objectives which are equipped with a phase ring near the pupil. They are easy to recognize by the green inscription "Ph1", "Ph2" or "Ph3". If you hold such an objective against the light and look into the pupil from the screw-on surface, you will be able to see the grey/transparent phase ring. The condenser requires one, two or three phase stops, depending on the phase contrast objectives you have chosen. The required ring diameter increases with the numerical aperture, i.e. high apertures require the maximum diameter (e.g. 0.9 in air or 1.3 with oil immersion). Three sizes are available and are sufficient for all objectives. If you very rarely use phase contrast and with only one ring size, an easily attachable and removable plug-on stop for the condenser will suffice. A turret disk with several mounts ("eyes") is more convenient, since it contains all three phase stops and allows fast changeover. Additional openings are available for the aperture iris for brightfield and, for example, for the darkfield diaphragm. The phase stops must be centered once after they have been inserted in the condenser so that the image of the phase stop in the objective pupil corresponds exactly with the position of the phase ring in the beam path. Centering is performed using two small wrenches on the turret disk of the condenser. Again, look into the objective pupil and bring the bright image of the condenser phase stop into coincidence with the phase ring of the objective. This is clearly shown in the figure below: On the left side, the phase stop of the condenser (bright) is not aligned,

while it is in perfect congruence with the phase ring of the objective on the right.

If you want to be particularly precise, use a centering telescope for the setting. This small accessory looks like an eyepiece and is also inserted into the tube instead of an eyepiece. When it is focused on the pupil of the objective, the aperture diaphragm and the phase stops can be conveniently controlled.

The image of an object in phase contrast can be influenced by appropriately selecting the retardation of the main beam through the phase ring in the objective. Depending on the retardation selected, objects with a higher refractive index than their surroundings appear either brighter or darker than their surroundings. This is also called "positive" or "negative" phase contrast. Today, "positive" phase contrast is standard, where the darkness of objects increases with their refractive index. This simulates absorption to the observer's eye in areas where a higher refractive index becomes locally effective. This impression is considered "correct" in particular with cells and tissue in aqueous media because cell nuclei and organelles, for example, appear darker than the cytoplasm of a cell.

21.1b

Клетки почти невидимы в светлом поле (наверху), но легко различимы при фазовом контрасте (внизу).

VAREL contrast A new contrasting technique, in which phase contrast and inclined unilateral illumination are mixed, has been developed for the examination of living cells in culture vessels (21.2). An additional stop shaped like a ring sector is used on the illumination side, permitting unilateral inclined illumination. Unilateral darkfield, VAREL contrast superimposed on phase contrast and inclined brightfield are set by shifting the stop in the radial direction from the outside to the inside (21.3). This is a very low-price method of imaging cells in culture vessels. The image shows pseudo-relief (21.4). Even vessels with a curved bottom allow a useful image to be produced. Phase contrast alone sometimes fails in such cases because a curved chamber base acts like a lens and impairs the superimposition of phase rings. The method is successfully used for the examination of living objects (micromanipulation). A slider contains two of the mentioned sectors to allow illumination to be performed from the left or right, as required. This makes it possible to contrast cells even in the "holes" of microtiter plates in the vicinity of the "hole" edges.

Polarization contrast in transmitted light In this method, polarized light is used; it consists of light waves which all feature the same direction of vibration, i.e. which are linearly polarized. This very "ordered" light is generated by polarizers which filter out a privileged plane from the statistical confusion of vibration directions prevailing in natural light. It is an important fact that two filters of this type do not let any light pass when they are arranged one behind the other in the beam path at an angle of 90° to each other. The first filter sorts out the vibration directions in such a way that the second filter cannot let pass this very selection. The second filter is called "analyzer", since it allows the privileged direction of the first filter called "polarizer" to be checked. The appropriate arrangement is relatively easy to implement in the microscope. The polarizer (1) on the condenser near the aperture diaphragm ensures that the specimen (3) is illuminated with linearly polarized light via the condenser. The analyzer (5), arranged at an angle of 90° to the polarizer (1), is located behind the objective. The tube lens (6) forms the intermediate image (7). If no specimen is on the microscope stage or only an empty, clean microscope slide the image will remain completely dark. When illuminated, many specimens turn the vibration direction of the polarized light out of the plane produced by the polarizer. Such specimens are mainly birefringent materials, in which the refractive index depends on the vibration direction of the incident light. This is mainly the case with crystals, such as starch or minerals, but also with polymers. If such materials

are viewed under the polarization microscope between the crossed polarizer and the analyzer, bright areas can be seen in the image because light is partially transmitted by the analyzer. The drawing of the beam path also includes a so-called auxiliary object (5a), also termed lambda plate. In polarized light, this lambda plate converts contrast to colors. As in phase contrast, path differences are used for this purpose, although this time with polarized light and birefringent material in the auxiliary object. The path differences generated lead to an extinction of certain wavelengths in the light, i.e. only certain colors remain from the white light and create beautiful, colored pictures. Mechanical stress in the glass results in so-called stress-induced birefringence, which in turn influences the polarized light. Therefore, Pol examinations in the microscope require condensers and objectives which are free of such internal stress. Such objectives can be recognized by the "Pol" marking inscribed in red.

The unstained polymer fiber is only indistinctly visible in brightfield (left) but can be seen in detail in polarized light (center). The lambda plate (right) converts contrast to colors.

The ultimate in sophistication: Differential Interference Contrast (DIC) in transmitted light 9 This highly efficient contrasting technique is based on the Pol contrast technique (page 22) as far as the components used are concerned. In its function, it is indeed related to DIC in reflected light (page 32). However, DIC in transmitted light is slightly more complicated than in reflected light because, firstly, two birefringent prisms are used, and, secondly, the path difference in the object is created in a different way. Fig. 23.1 shows the beam path which, initially, is identical to that of polarized transmitted light. Additionally, the two birefringent prisms (2) are inserted in the condenser and near the objective pupil (6). The condenser prism (2) performs a vectorial decomposition of the previously linearly polarized light into two vibration directions which are perpendicular to each other, and laterally shifts these partial beams in such a way that a lateral displacement of $x = k \lambda$ occurs in the specimen. λ is the wavelength of the light used and k is a number which normally is smaller than 1. 8 A 7 7a If the two partial beams now pass through exactly the same structures, no further path difference will occur in the specimen (cases A and C in Fig. 23.2). However, if the two partial beams "see" slightly different conditions, each of them will "experience" its own path difference which accompanies it on the remaining path to the intermediate image (case B in Fig. 23.2). The second prism (6) cancels the splitting process again behind the objective, and analyzer (7) selects those components from the now phase-shifted wave trains which lie in its vibration direction. It is only now with a common vibration plane that the two partial beams can interfere with each other and therefore convert path differences to intensity differences which can be seen by the eye. A λ -plate (7a,) permits additional color contrast to be produced. The resulting images look like reliefs because this method displays only "lateral" changes. DIC is therefore also ideal for the optical sectioning of unstained, thick objects.

Флуоресцентная микроскопия.

В методе флуоресцентной микроскопии, образец обрабатывается специальными веществами, молекулы которых способны поглощать свет на очень короткое время (обычно миллионные доли секунды), а затем вновь излучать его. Однако испускаемый свет характеризуется длиной волны, слегка сдвинутой «в направлении красного». Если, например, поглощается голубой свет, то мгновенно вслед за этим испускаться будет зелёный. Зелёный заменяется жёлтым, жёлтый – оранжевым, а невидимый ультрафиолетовый свет – видимым. В честь своего открывателя такое смещение получило название сдвига Стокса. Для флуоресценции, длина волны испускаемого света на 20-50нм больше чем поглощаемого возбуждающего света.

Молекулы флуорохрома могут поглощать свет только определенной длины волны. Каждый флуорохром имеет собственный специфический спектр поглощения, в зависимости от внутренней структуры флуоресцирующих молекул, а иногда и от их окружения. Кроме того, не каждый фотон поглощается, а только часть излучаемого света. Также и поглощенные

фотоны не излучаются вновь в полном объеме. Хорошие маркеры флуоресценции характеризуются высоким "квантовым выходом" (термин, описывающий отношение выбрасываемых и поглощенных фотонов). Этот эффект очень полезен для микроскопии: образец, помеченный таким образом, освещается чистым, отфильтрованным синим светом и просматривается с помощью барьерного фильтра, который совершенно прозрачен для синего света, но не пропускает длинноволновый зеленый, желтый и красный свет. Структуры, меченные молекулами флуоресценции, например части цитоскелета, затем загораются зеленым на черном фоне. Когда микрофлуоресценция только начинала применяться, образцы, как правило, окрашивались флуорохромами неспецифически. Этот вид маркировки обычно получается ярким, так как многие молекулы флуоресценции связываются повсюду. В настоящее время, однако, методы флуоресценции гораздо более специфичны. Это стало возможным в особенности благодаря ковалентному соединению флуоресцирующей молекулы с биологическими материалами, такими как антитела (в этом случае уже не краситель определяет место для связывания, а биологически активное вещество). Как правило, это приводит к слабому свечению на изображении в микроскопе, поскольку связывается значительно меньше красителя. Тем не менее, полученная информация, например при диагностике заболеваний, становится намного более точной.

Слева: образец, меченный флуоресцентным красителем, освещен в отраженном свете интенсивным синим светом. Справа: Если образец рассматривается через барьерный фильтр, синий свет возбуждения больше не виден. Теперь желтый свет флуоресценции хорошо виден на поверхности образца.

Если в клетку введены флуоресцентные метки, они откладываются на определенных структурах. При освещении возбуждающим светом флуоресцентные маркеры загораются и делают структуры ясно видимыми по испускаемому ими свету.

Путь лучей флуоресцентного микроскопа.

Иллюстрация справа показывает путь лучей в микроскопе Axiolab с флуоресцентной насадкой. Свет проходит от мощного дополнительного осветителя (1) к возбуждающему фильтру (5) через теплозащитный светофильтр (2), защитный фильтр оранжевого цвета **the red-attenuation filter/barrier slider (3)** и полевую диафрагму (4). Возбуждающий фильтр встроен в **reflector slider**, который также содержит и светоделительную пластину **beam splitter (6)**. Дихроичный светоделитель отражает коротковолновый свет возбуждения к препарату (8) через объектив (7). Свет испускания собирается объективом (7) и пропускается дихроичным светоделителем (6), т. к. длина волны у него больше, чем у волны возбуждающего света. Затем лучи проходят также через барьерный (или запирающий) фильтр (9), где отфильтровывается остаточный возбуждающий свет. Как обычно, изображение формируют тубусная линза (10) и окуляр (11), но теперь оно состоит из света флуоресценции.

The essentials for success in fluorescence microscopy:
q **Optimum quality of the fluorescence filters:**

25.1

The fluorescence light generated must be treated with care. The filters must transmit the required wavelengths, and block the unrequired ones as completely as possible. This is very difficult to do, since the intensity of the excitation light is many times higher than that of the emission light. The entire exciting light must be kept away from the microscope image, while the emission light, however, must "arrive" in its entirety.

q **High-intensity excitation:**

The light source must provide a large amount of excitation energy in very narrow ranges of the

spectrum ♦ typically 10 to 50 nm. For this purpose, so-called line emitters, usually high-pressure mercury lamps, are used.

q High light transmission of the objectives:

The objectives of the microscope ♦ particularly those offering optimum imaging quality ♦ often consist of many individual lenses. Nevertheless, objectives which are suitable for fluorescence feature high light transmission values into the UV range.

q No autofluorescence of the microscope optics:

If lenses and filters ♦ or immersion liquids ♦ of the microscope exhibit autofluorescence, this disturbing light will be mixed inseparably in the fluorescence image. The result is a brightened background which reduces the contrast available.

q High numerical aperture of the objective:

A N. A. = 0,25

As with a radio transmitter, the fluorescence excited in the specimen is radiated in all directions. The objective must gather as much of this radiation as possible (25.2). The output will be low with a small numerical aperture (A). A higher aperture angle (B) will be much more effective. If the objective aperture is doubled in size, approximately four times the fluorescence light can be gathered. Immersion, particularly with oil ♦ also eliminates the loss of light caused by light reflection on the surfaces. The image will become even brighter.
25.2

More light: fluorescence becomes visible
Filament lamps are not suitable as light sources in fluorescence microscopy. The glowing metal filaments convert most of the electrical energy utilized into red or even invisible infrared light. Fluorescence, however, requires intensive, short-wave light. The table on the right gives you a simplified overview of the colours we perceive at the various wavelengths.

Wavelength	1	2	3	4	5	6	7	340 - 400 nm	400 - 430 nm	430 - 500 nm	500 - 560 nm	560 - 620 nm	620 - 700 nm	over 700 nm
Color	near ultraviolet (UV)	♦ invisible	violet	blue	green	yellow	to orange	orange	to red	near infrared (IR)	♦ invisible			

The high-pressure mercury lamp is a time-tried light source for fluorescence. Depending on its wattage, it is either called HBO 50 or HBO 100. Unlike the filament lamp, it uses the gas discharge principle and does not feature a continuous, but a discrete light spectrum. This is how these light sources function: Two electrodes (cathode 2 and anode 3) are fused into a quartz glass bulb of a high pressure resistance (1). The burning chamber (4) contains some mercury. A light arc (5) is ignited between the electrodes by bursts of high-voltage surges and is kept "burning" via the power supply. The resultant heat vaporizes the mercury into gas and an enormous overpressure is created in the lamp. The lamp gets very hot and radiates extremely bright light with a high UV-portion. The radiated light energy is concentrated in certain wavelengths, the so-called "mercury lines" (see below: emission spectrum). The ability to change between intensive lines and weak spectral ranges is a major benefit of this line emitter and is very helpful in fluorescence. Excitation is made with a single "line" and ♦ because of Stokes shift ♦ the fluorescence is viewed at a wavelength at which the light of the illuminator causes practically no disturbance.

Some safety regulations, mentioned in the operating instructions, must be observed when using these illuminators. These are the most important:

q Operate the lamp in the housing only. q Never look into the intensive light. q Never expose the skin directly to radiation. Intensive

UV 350 400 450 500 HBO 50/100 26 550 600 650

(nm)
26.2

radiation may lead to burns and cause skin cancer in the long term. q Change lamps when cold only: danger of explosion because of the high internal pressure in warm lamps.

Light is assorted: filters and filter sets Absorption The graph on the right shows the spectral properties in (single) fluorescence. The fluorochromes absorb light (1) in a narrow spectral range and emit it into a range of a longer wavelength (2). The Stokes shift lies between the two. In fluorescence microscopy, filter combinations are arranged in the reflector area between the objective and the tube lens. These combinations determine the beam path of the excitation and emission light. The exciter filter (A) (Fig. 27.2) filters almost monochromatic light (2) out of the light source radiation (1). The properties of the dichroic beam splitter (B) are fascinating: it reflects the short-wave excitation light to the objective almost without any loss, but allows the fluorescence light (3) returning from the specimen via the objective to pass through almost completely. At the same time, most of the excitation light is reflected again and can therefore no longer affect the formation of the intermediate image. Above the beam splitter, the emission light and the remainder of the excitation light hit the barrier filter (C). Only the fluorescence light can pass the filter almost unhindered because its wavelengths are longer than those of the excitation light.

27.1

In most cases, modern fluorescence filters are combinations of color lenses and interference filters with the exception of some classical longpass filters. The interference filters have been given coatings precisely adapted to the wavelengths of the light. Such filters can be "tailor-made" and exactly meet the spectral requirements made on a fluorescence dye.

Typical spectral curves of the transmission T of filters for fluorescence microscopy: 1 Shortpass filter 2 Longpass filter 3 Bandpass filter 4 Narrowband filter

Spectral position of excitation (left) and emission (right) in fluorescence. Function of the filter combinations (see the text) Typical, individual spectral curves for the components of the filter combination: A: Exciter filter B: Beam splitter C: Emission filter.

Accessories for fluorescence microscopy The components of the fluorescence microscope described until now are available as modules and can be easily integrated into the Axiolab microscope or any other model. The main components are the HBO 50 or HBO 100 illuminators (1), the reflected-light illuminator (2) and the reflector slider (3). The reflected-light illuminator contains a barrier and filter slider (2a) and the variable iris for the setting of the illuminated field (2b).

The main difference between the epi-fluorescence illuminator and the reflected-light illuminator is the omission of the diffusion disk in fluorescence because it would unnecessarily reduce the excitation intensity. In "proper" reflected-light microscopy, however, this disk is required for homogeneous illumination. In fluorescence, the red-attenuation filter is used to eliminate the sometimes disturbing red and infrared light portions before they reach the specimen.

28.1

The reflector slider (see Fig. 28.2) permits up to three filter sets to be mounted for different fluorescence markers. This makes changeover very easy. Multifluorescence is now being increasingly used for the marking of specimens. This method makes different structures light up in

different colors which can be viewed separately ♦ each on its own. The reflector slider can be used to change between the images. However, it is easier to use special filter sets which permit the simultaneous viewing of two or three markers in one image. (Fig. 29.1).

A type of simple fluorescence: DAPI is excited in near UV with 365 nm and emitted in the violet-blue spectral range. The marking reveals cell nuclei and particularly the chromosomes (Planapo 63x/1.40 oil)

Specific marking for medical diagnosis: Fluorescein Isothiocyanate (FITC) linked with the antinuclear factor HEP 2). (Plan-Neofluar 40x/1.30 oil)

Practical hints on fluorescence microscopy:

q The work environment:

Взглянуть по-новому: Конфокальная флуоресцентная микроскопия.

Данный метод требует использования совершенно особого — конфокального — микроскопа. Здесь он будет кратко упомянут, поскольку он значительно обогатил возможности микроскопии. В конфокальном микроскопе яркий луч света (1) передается через объектив (2) на препарат (3). В оптическую систему введены сканеры (4), с помощью которых луч света передвигается по образцу (3). Излучаемый в этом месте свет флуоресценции проходит обратно через сканеры, — **i.e. the ray motion is neutralized again** -- проходит через светоделительное устройство (5) и фокусируется на отверстии в конфокальной диафрагме (6). За отверстием в конфокальной диафрагме (pinhole) свет флуоресценции отделяется от возбуждающего света барьерным фильтром (7) и непрерывно измеряется световым детектором (8). Компьютер создает цифровое изображение по измеренным значениям. Определяющим фактором является то, что лишь свет из зоны фокальной плоскости объектива (3) может пройти сквозь точечное отверстие (6) в пространственном фильтре (A). Свет от других плоскостей образца (например 3a) эффективно блокируется отверстием в конфокальной диафрагме (6). Это позволяет рассматривать отдельные плоскости образца. С помощью компьютера по ним создаются трехмерные изображения.