

# Лекция 1

**Основы геометрической оптики; формула тонкой линзы**

**Лупа (микроскоп Левенгука) – увеличение, ход лучей**

**Формирование изображения в микроскопе – геометрическая оптика**

# Допущения геометрической ОПТИКИ

Длина волны света бесконечно мала.

Скорость света конечна, она максимальна в вакууме и зависит от среды распространения.

Пучок света представляет собой полубесконечный конус, который имеет вершину и характеризуется только углом расхождения.

Поведение световых лучей полностью обратимо – изображение тождественно объекту.

Линзы являются тонкими – их толщина пренебрежимо мала по сравнению с фокусным расстоянием.

# Оптическая среда

Оптическая среда – твердая, жидкая или газообразная прозрачная среда, в которой свет распространяется со скоростью, отличной от скорости в вакууме. Показатель преломления среды – коэффициент, характеризующий снижение скорости распространения света в среде по сравнению с вакуумом. Он всегда больше единицы.

# Основные формулы геометрической оптики

Закон отражения света:

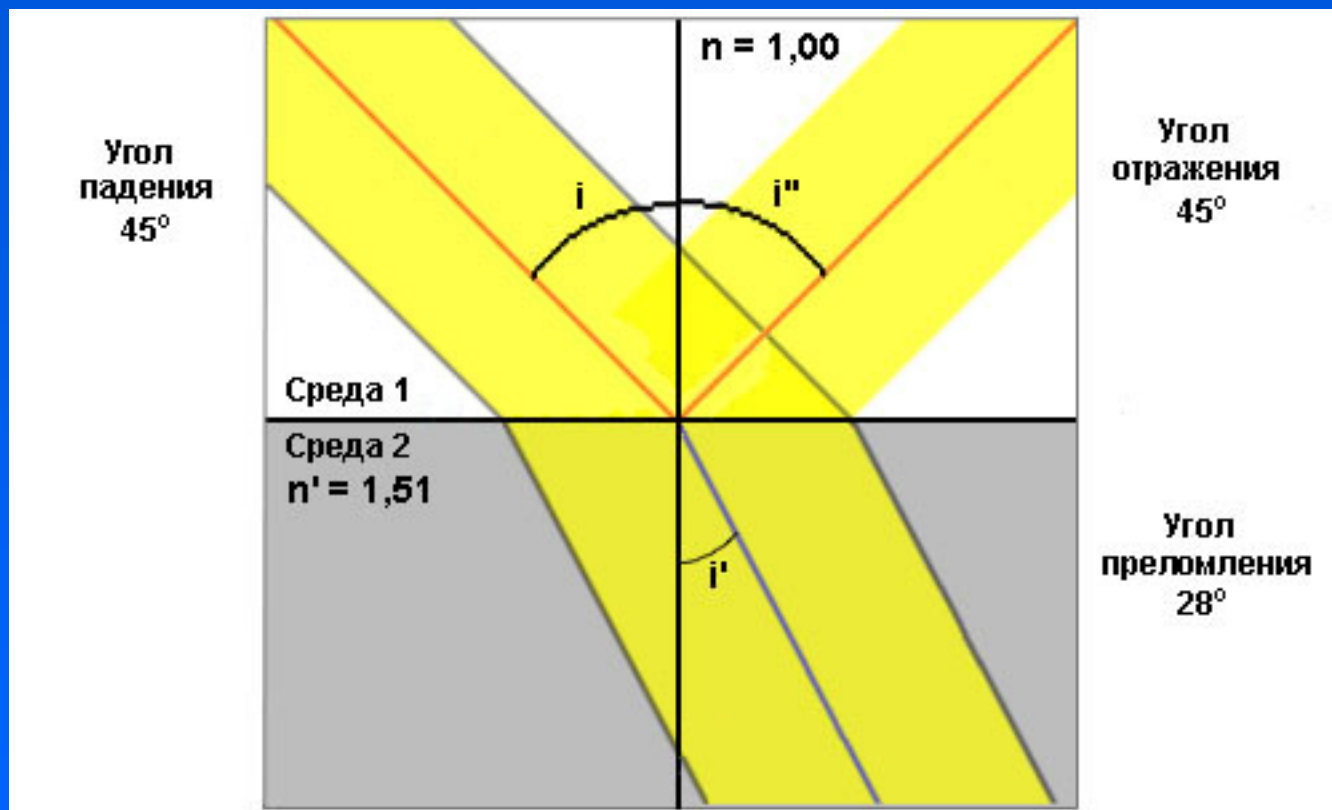
$$i = i'$$

Закон преломления света:

$$\sin i' / \sin i = n' / n$$

При переходе из менее плотной среды в более плотную и обратно часть света отражается.

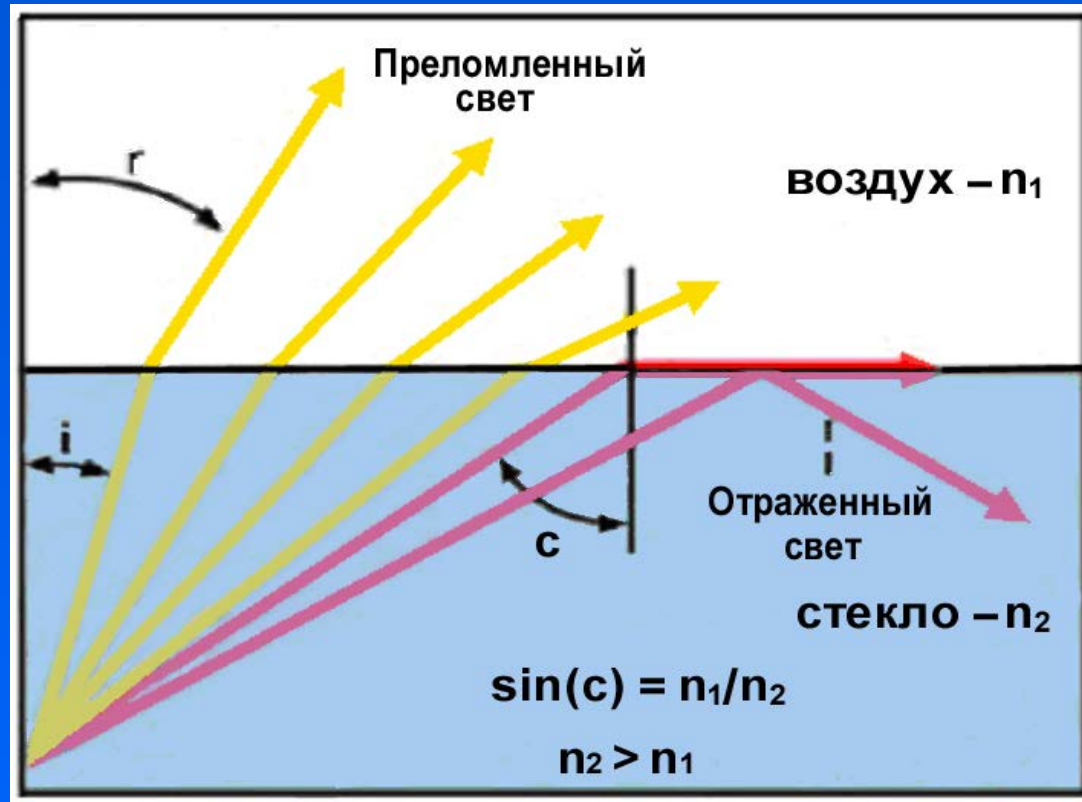
# Отражение и преломление света на границе раздела фаз



Закон преломления:  $\sin i / \sin i' = n'/n$ .

Закон отражения:  $\sin i'' = \sin i$

# Угол полного внутреннего отражения



Поскольку  $\sin c \leq 1$ , то существует угол, когда свет не может пересечь границу раздела фаз – угол полного внутреннего отражения. На границе раздела оптических сред угол определяется формулой:  $c = \arcsin n'/n$ , или при  $n'=1$  (воздух),  $c = \arcsin 1/n$

# Простые сферические линзы

«Формула тонкой линзы»:

$$1/a + 1/a' = 1/f,$$

где  $a$  и  $a'$  расстояния от линзы до предмета и его изображения;  $f$  – фокусное расстояние линзы.

Следствие: линза дает увеличенное перевернутое изображение объекта только тогда, когда он расположен между фокусом и двойным фокусом линзы.

Собирающая линза (толщина в центре больше, чем по краю) –  $f > 0$ ;  
фокус действительный

Рассеивающая линза (толщина в центре меньше, чем по краю) –  
 $f < 0$ ; фокус мнимый

# Примеры сферических линз

## Собирающие линзы:

1. Двояковыпуклая
2. Плосковыпуклая
3. Выпукловогнутая

## Рассеивающие линзы:

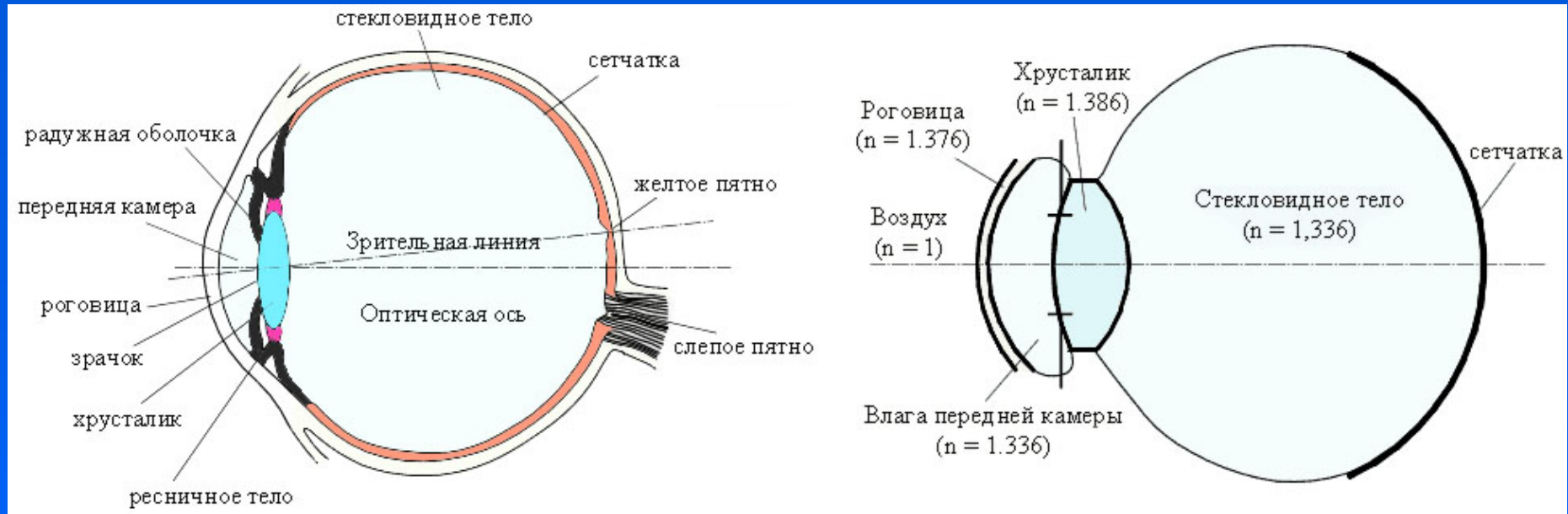
1. Плосковогнутая
2. Двояковогнутая



# Применение рассеивающих линз

1. Очки для близоруких
2. Для компенсации аберраций в сложных оптических системах – в комбинации с собирающими линзами.
3. Коллиматоры – трансформация лазерного пучка.

# Человеческий глаз – схема



**В первом приближении глаз может быть рассмотрен как сложная линза, основными компонентами которой являются: роговица, передняя камера, хрусталик и стекловидное тело.**

**Хрусталик за счет мышц ресничного тела имеет переменную кривизну, а весь глаз – способность к аккомодации.**

# Очки и очковые линзы

Оптическая сила линз измеряется через их фокусное расстояние ( $f$ ) или в диоптриях ( $D$ ).

$$1D = 1\text{м}^{-1}$$

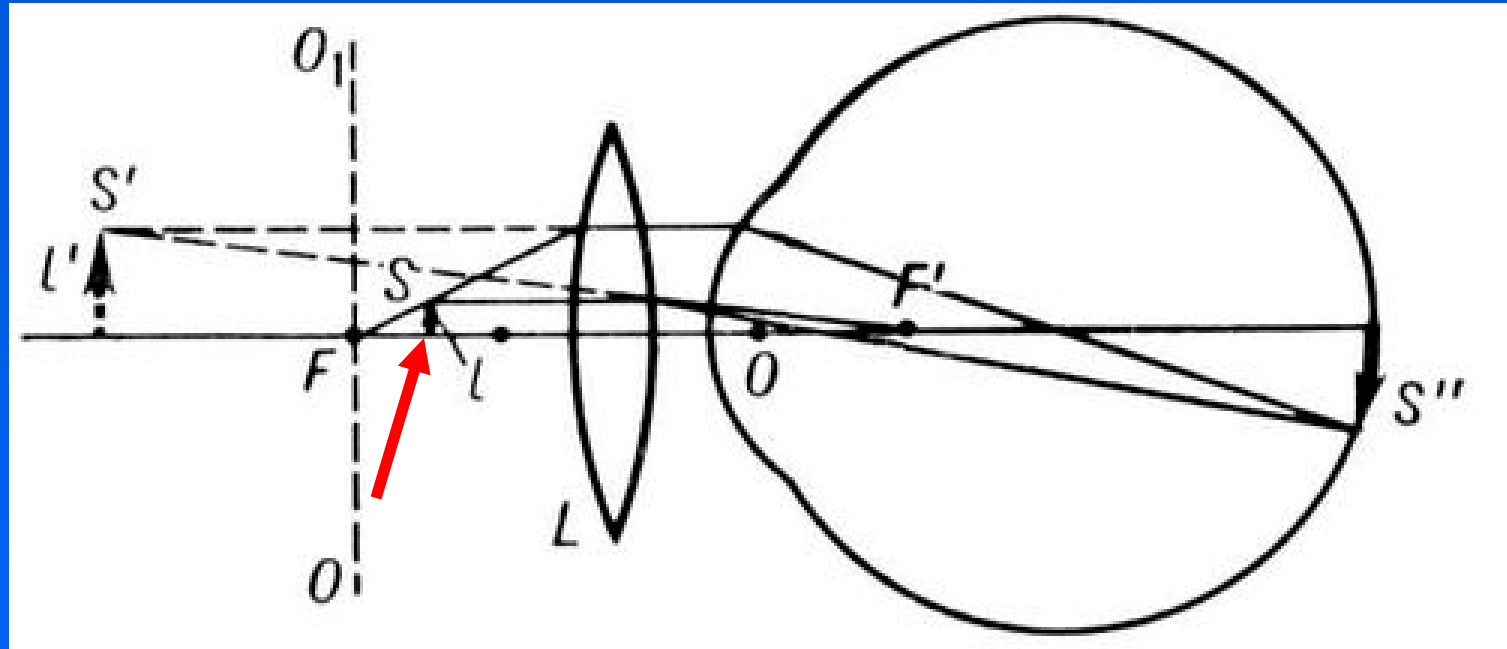
Оптическая сила «стандартного» глаза – 58-70 D, что соответствует фокусному расстоянию 14-17 мм.

При отклонении физических параметров глаза от этих пределов необходимы очки.

Для близоруких – рассеивающие линзы ( $f < 0$ )

Для дальнозорких – собирающие линзы ( $f > 0$ )

# Линза как лупа – ход лучей



Ход лучей при рассматривании небольшого предмета  $l$  в лупу  $L$ . Предмет помещают в непосредственной близости от фокальной плоскости лупы  $OO_1$ . Лучи, исходящие из точки  $S$  предмета, собираются в точке  $S''$  на сетчатке глаза. В этой же точке собирались бы лучи от точки  $S'$ , если бы лупы не было ( $S'$  — мнимое изображение точки  $S$ ).

# Увеличение лупы

Степень увеличения определяется сравнением увеличенного угла зрения с углом, под которым объект виден, когда он находится на условном «расстоянии ясного зрения» — 250 мм от глаза. Отсюда угловое увеличение оптических приборов выражается формулой:

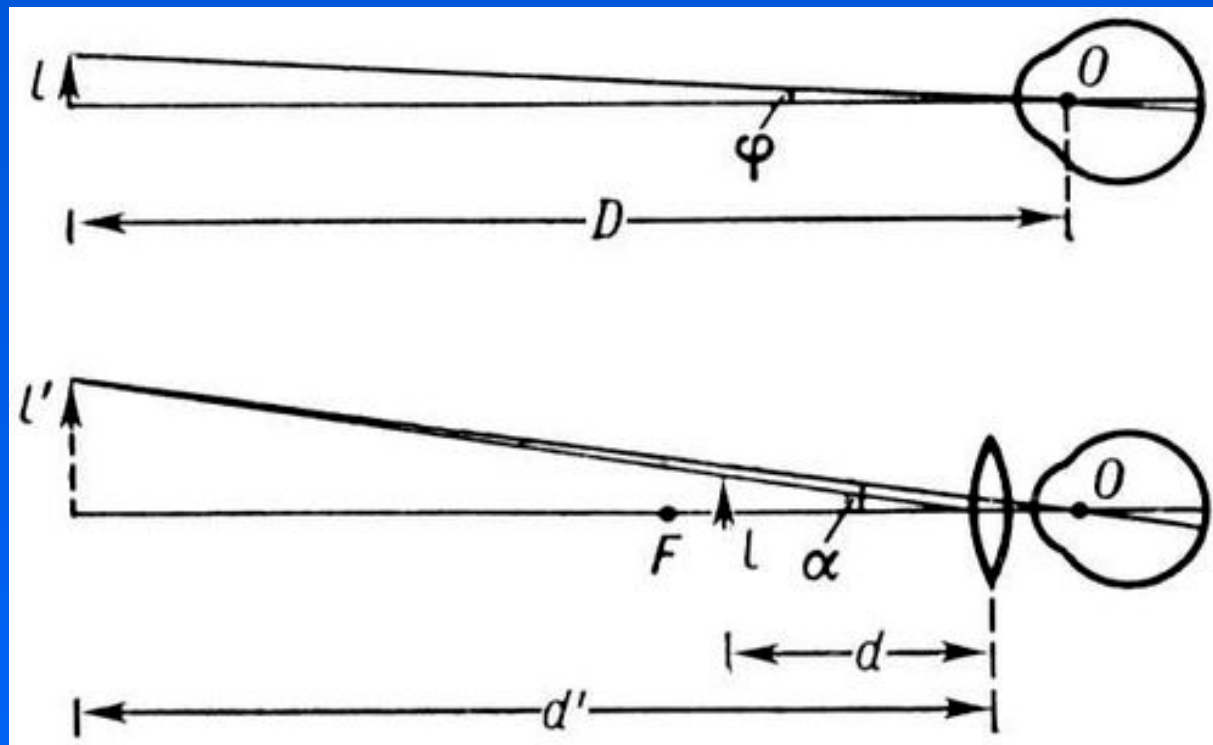
$$Г = d/F = 250/F \text{ или } \Phi/4,$$

где  $F$  — фокусное расстояние линзы в мм, а  $\Phi$  — оптическая сила лупы в диоптриях

Линейное увеличение оптического прибора:

$$M=1+250/f$$

# Увеличение лупы



Наблюдение малого предмета  $l$ . Наверху — невооружённым глазом на расстоянии наилучшего видения;  $\varphi$  — угол раствора лучей от предмета, попадающих в глаз. Внизу — через лупу; лучи от предмета входят в глаз под углом  $\alpha > \varphi$ ;  $d$  — расстояние от лупы до предмета,  $d'$  — расстояние от лупы до формируемого ею мнимого изображения предмета, которое видит наблюдатель

# Сложные оптические системы

1. Телескоп (линзовый, зрительная труба)
2. Микроскоп

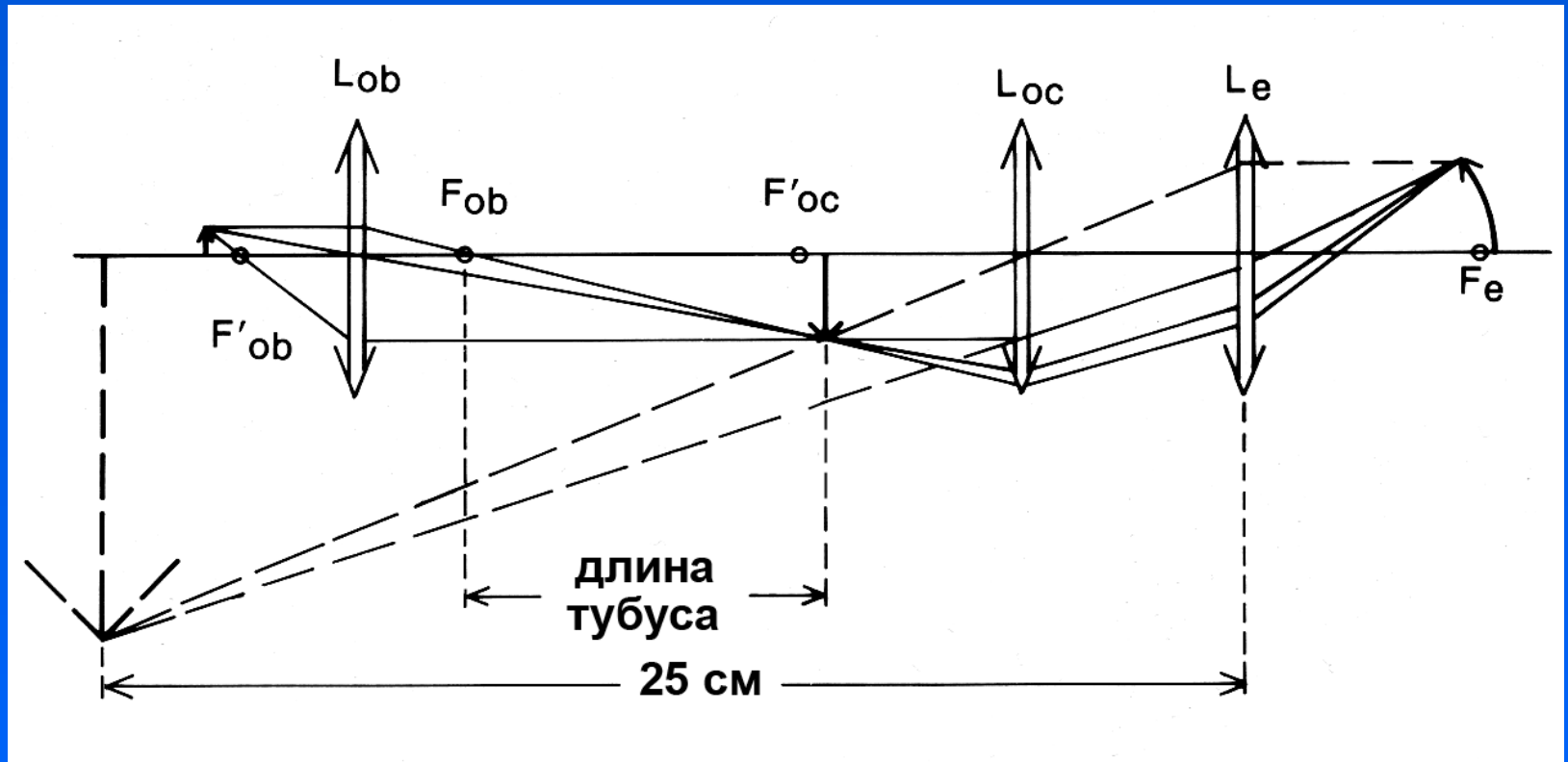
В обоих случаях основой является пара собирающих линз, где вторая линза служит лупой для разглядывания изображения, создаваемого первой линзой.

Для пары тонких положительных линз, разделенных промежутком  $\Delta$  таким, что  $\Delta > f_1 + f_2$ , фокусное расстояние системы  $f$  составляет:

$$f = f_1 * f_2 / \Delta$$

Таким образом, увеличение, достигаемое парой линз, может быть весьма велико.

# Увеличение в микроскопе



промежуток  $\Delta$  (длина тубуса) – 160 мм;

$f_1$  (объектив) – 2-20 мм (в зависимости от увеличения);

$f_2$  (окуляр) – фокусное расстояние отрицательное



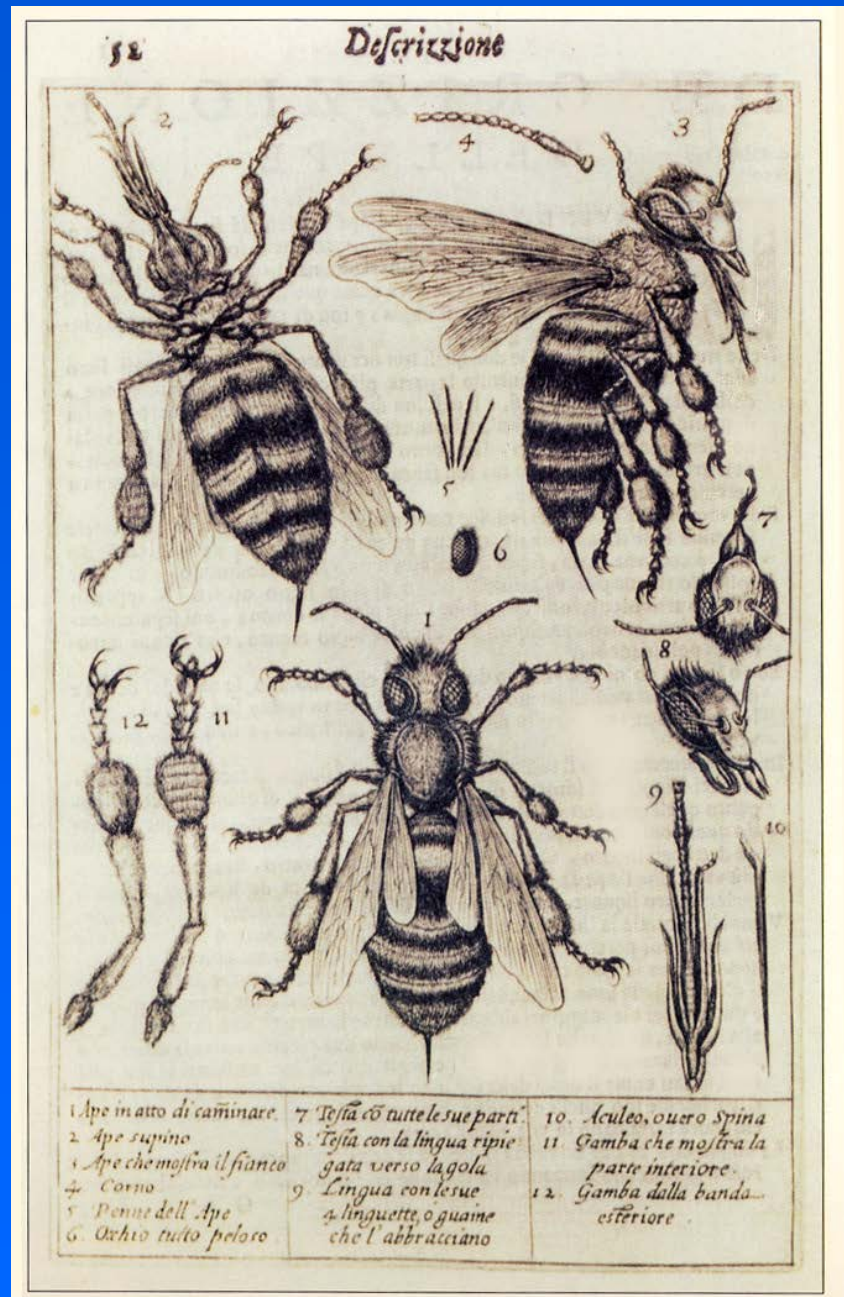
# Микроскоп, геометрическое приближение

Для получения изображения препарат располагается вблизи переднего фокуса объектива.

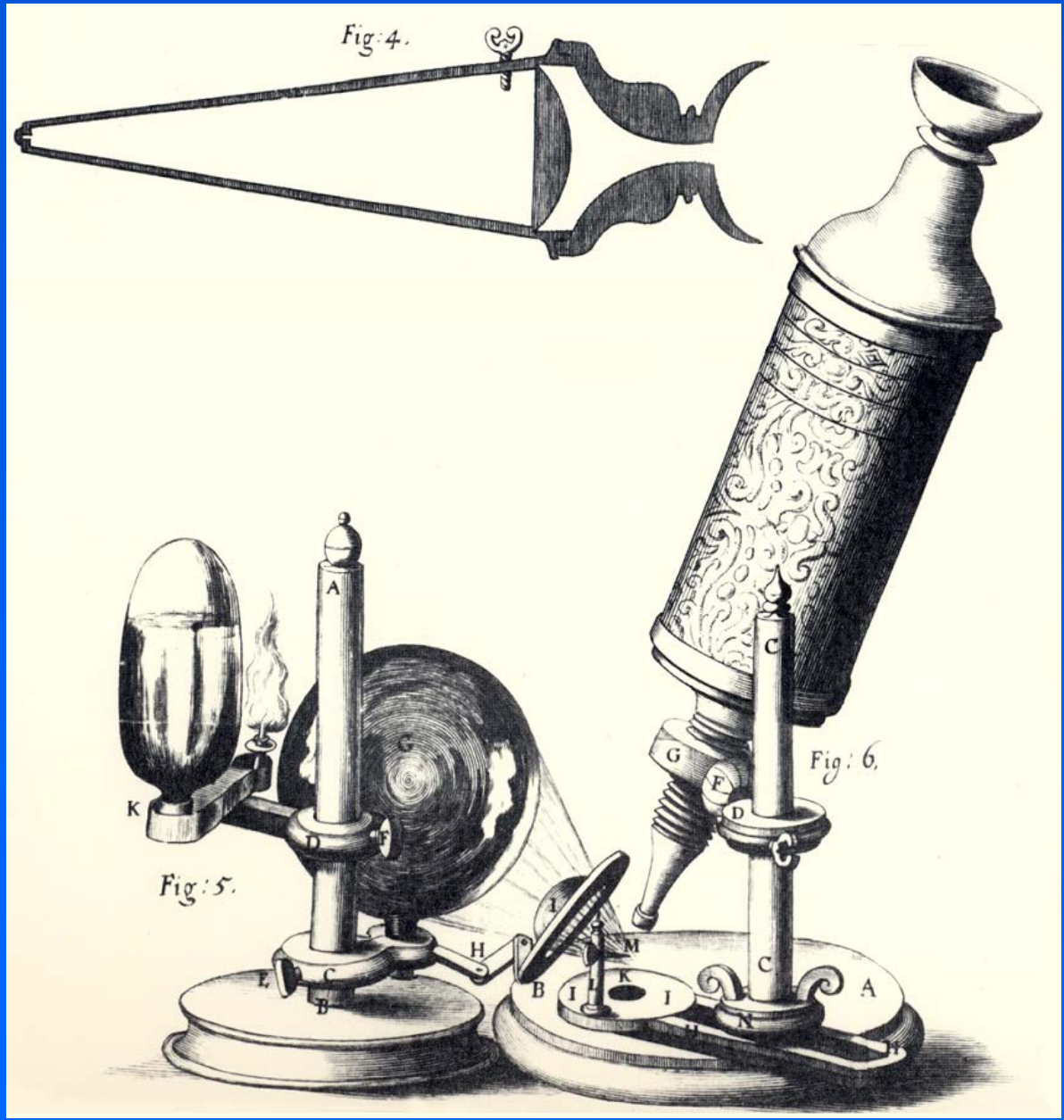
Объектив создает сильно увеличенное изображение препарата внутри тубуса, которое располагается на большом расстоянии от заднего фокуса объектива.

Окуляр, работая как лупа, позволяет наблюдать изображение, создаваемое объективом, как бы в бесконечности.

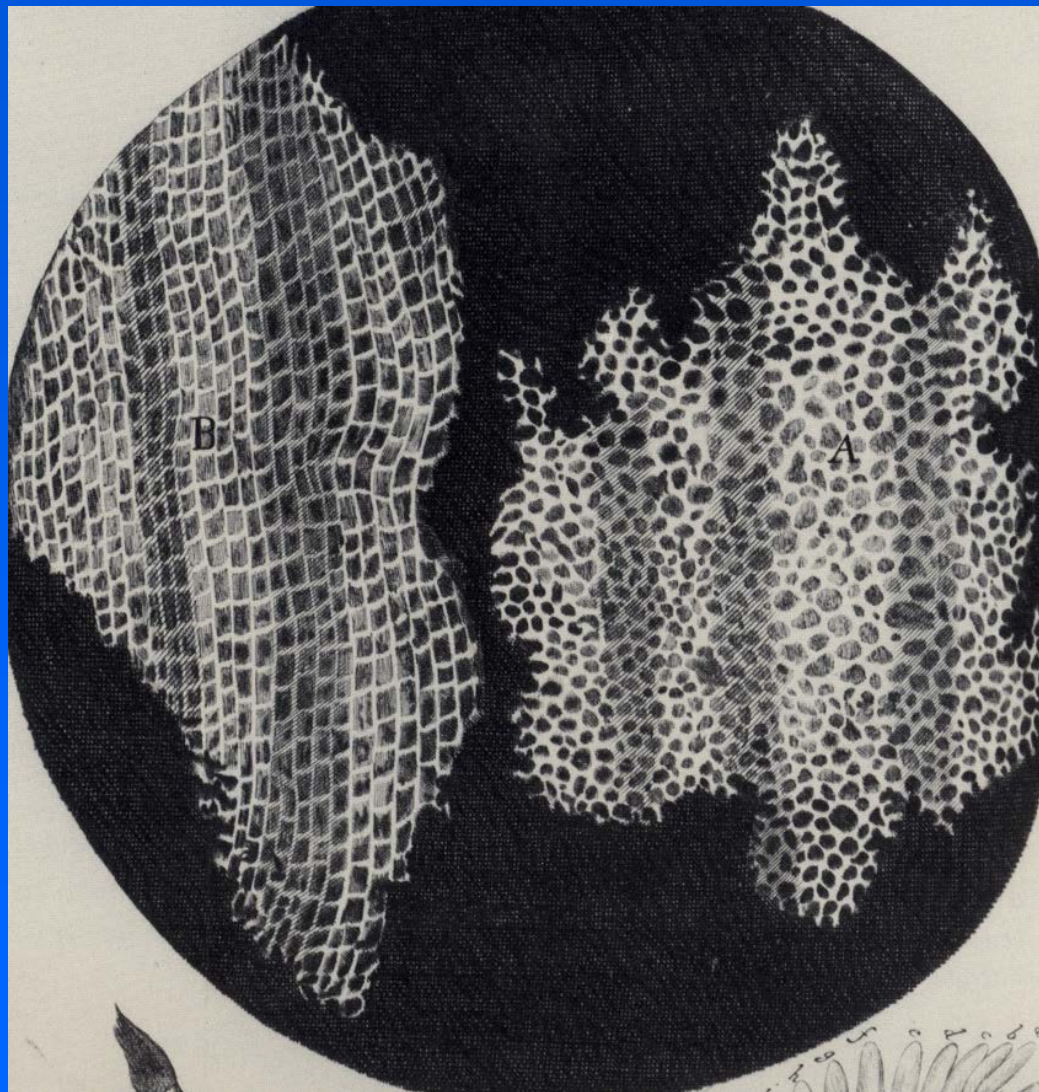
Первый  
рисунок,  
сделанный под  
микроскопом  
Стеллутти, 1630



**Первый  
сложный  
микроскоп  
(Р. Гук,  
около 1660 г.)**



# Первый рисунок клеток



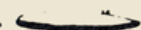
Роберт Гук,  
срез пробки,  
1665 г.


# Микроскоп Левенгука (копия)




# Бактерии из полости рта


uerer, viderim crescentem inter dentes quo

*fig: A* 

*fig: B* 

*fig: E* 

*fig: F* 

*fig: G.* 



quandam all  
fitem farina  
lem. Hanc  
censui, (lic  
dignoscere r  
men ei viva  
esse. Sæpius  
pluviatili pu  
animalcula in  
salivæ immi  
ore meo peti  
aeris bullulas

# Из истории оптики

Первый телескоп (зрительная труба) – Галилей, 1609 г.

Первый сложный микроскоп с увеличением более  $\times 10$  – Роберт Гук (около 1660 г.)

Простой микроскоп (лупа) с увеличением более  $\times 100$  – Антони ван Левенгук (70-е годы XVII века)

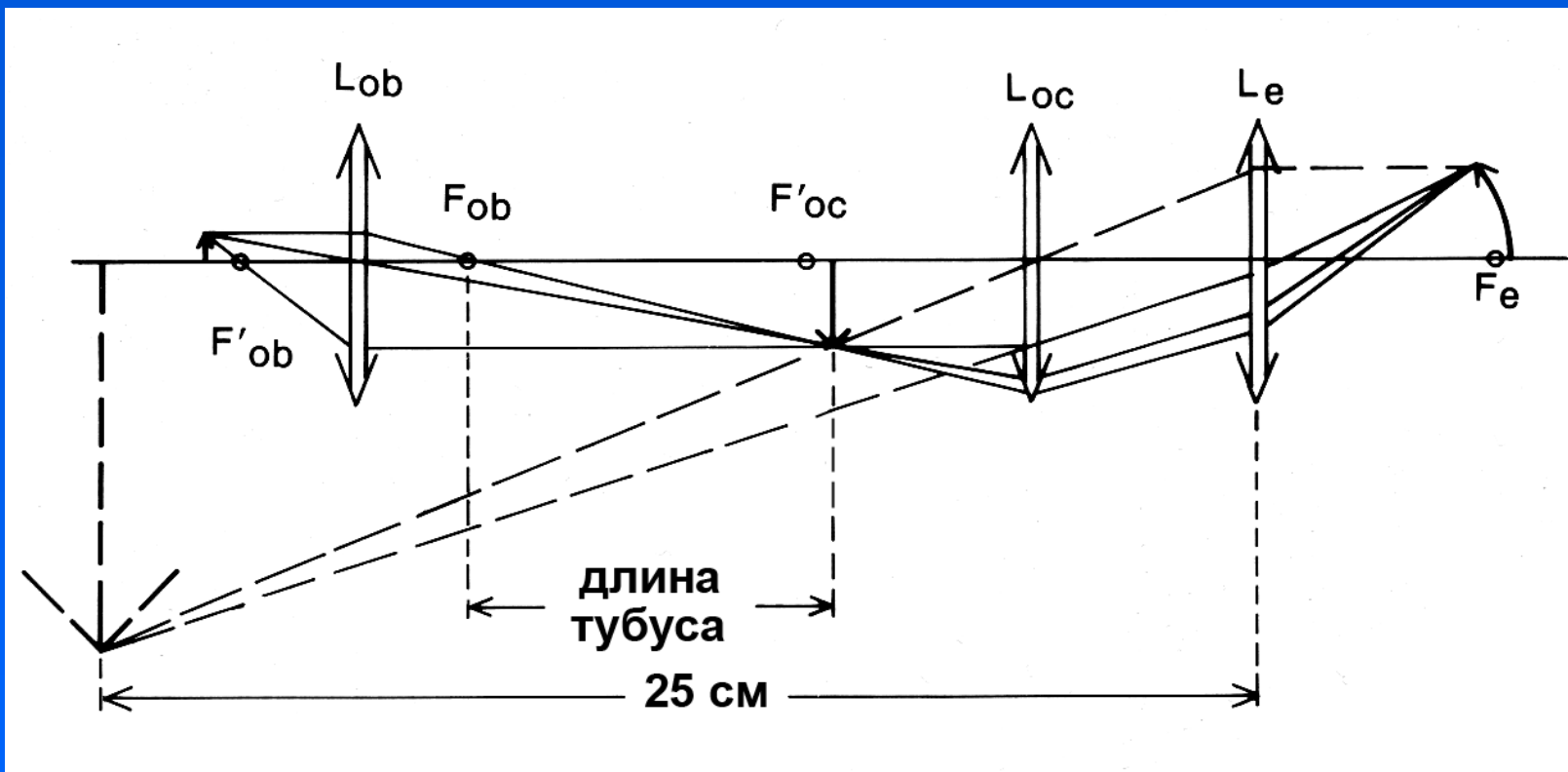
Развитие теории аберраций – конец XVIII – середина XIX века.

Апланатические системы – начало XIX века.

Создание комбинированных линз для уменьшения аберраций – первая половина 19 века (фотообъективы, объективы большого увеличения и с применением иммерсии).

Создание сортов оптического стекла с различной дисперсией; математические расчеты объективов микроскопа применение гомогенной иммерсии для достижения дифракционного предела разрешения – Эрнст Аббе (60-е – 70-е годы XIX века).

# Формирование изображения препарата в микроскопе

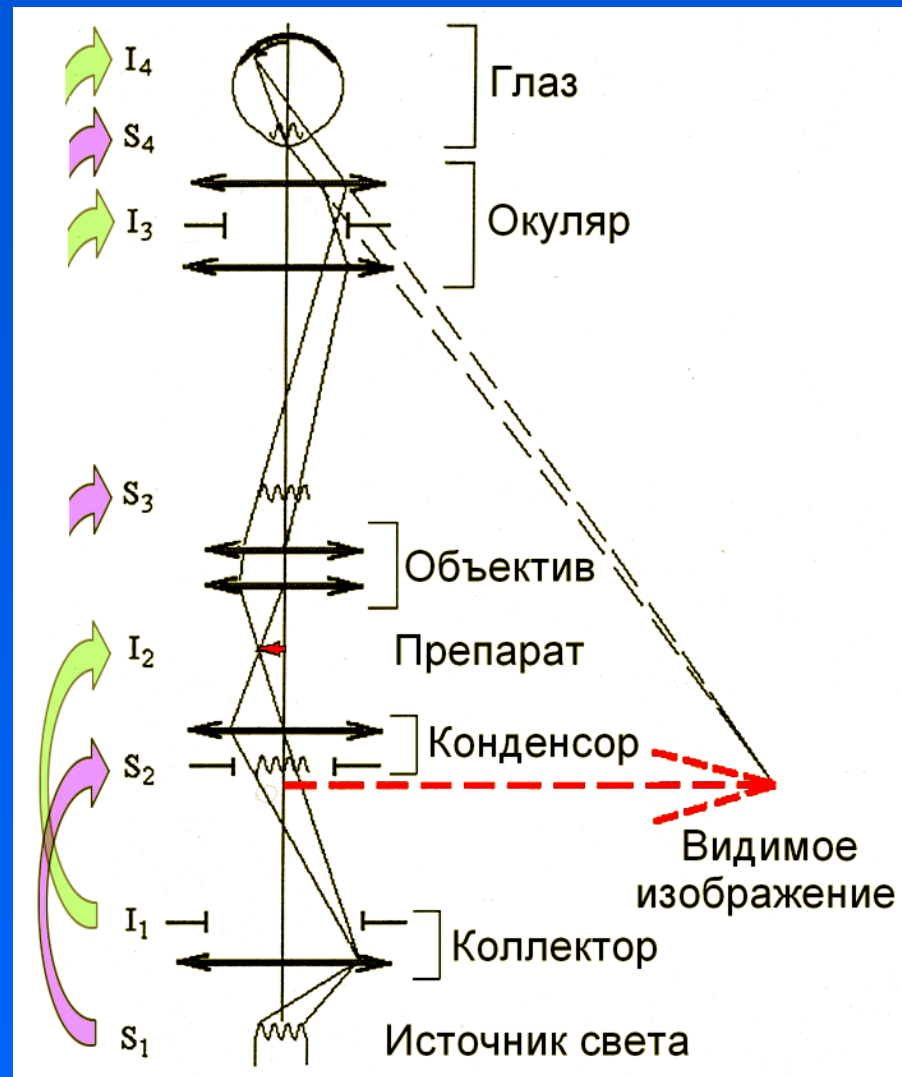


Оптическая длина тубуса – 160 мм; 25 см (250 мм) – расстояние «ясного зрения».

Расстояние ясного зрения - расчетная величина, используемая для определения увеличения микроскопа.



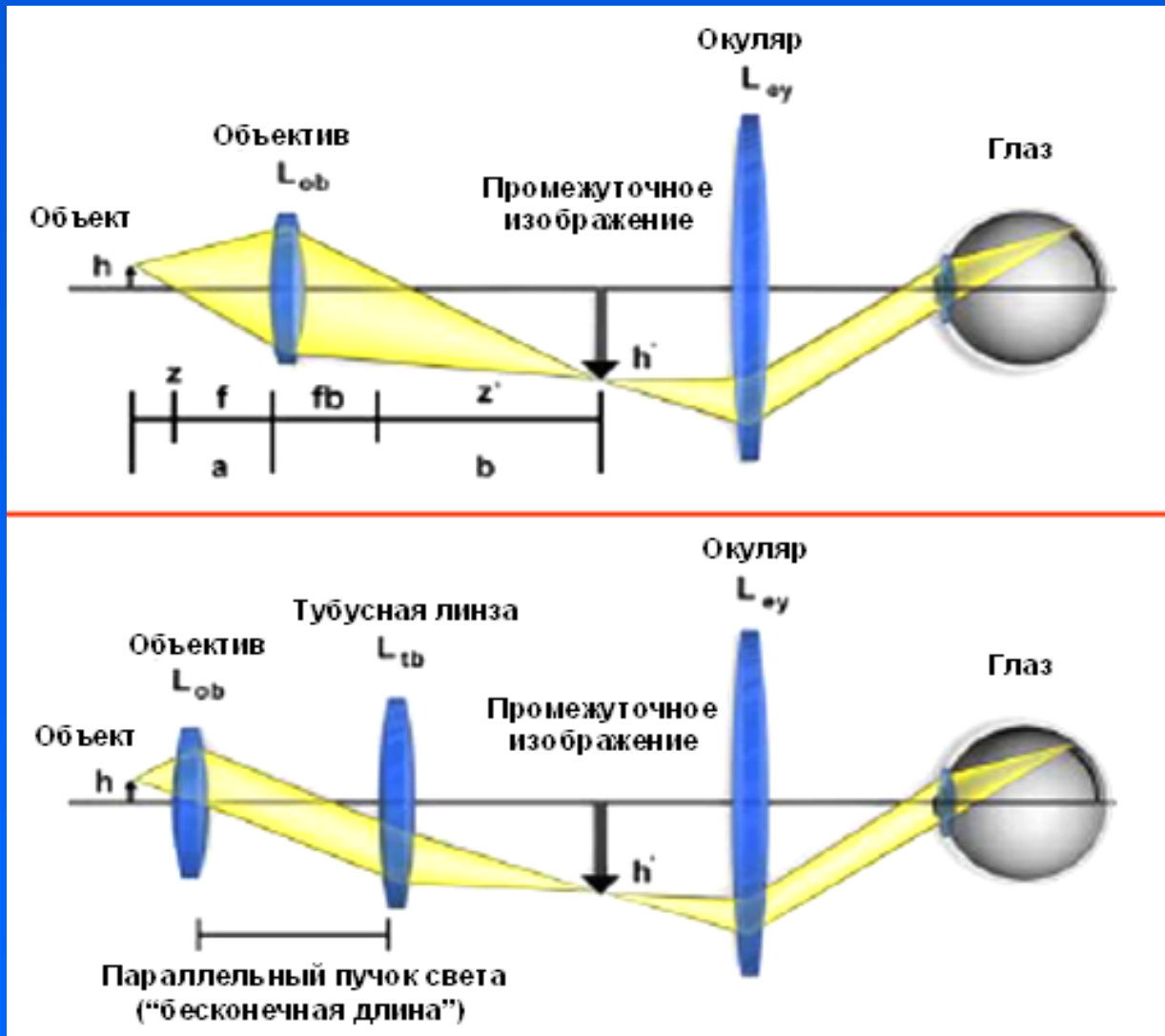
# Оптические плоскости в микроскопе



1 группа ( $S_1 - S_4$ ): лампа осветителя – диафрагма конденсора – з.ф.п. объектива – входной зрачок глаза

2 группа ( $I_1 - I_4$ ): полевая диафрагма – препарат – диафрагма окуляра – сетчатка глаза

# Ход лучей в микроскопах с конечной и бесконечной оптической длиной тубуса



# Лекция 2

**Физическая оптика: интерференция и дифракция**

**Дифракционная решетка**

**Формирование изображения объективом микроскопа – теория Аббе и критерий Рэлея**

# Пространство предметов и пространство изображений

В оптике часто рассматривается изображение предметов, создаваемое линзами и/или зеркалами.

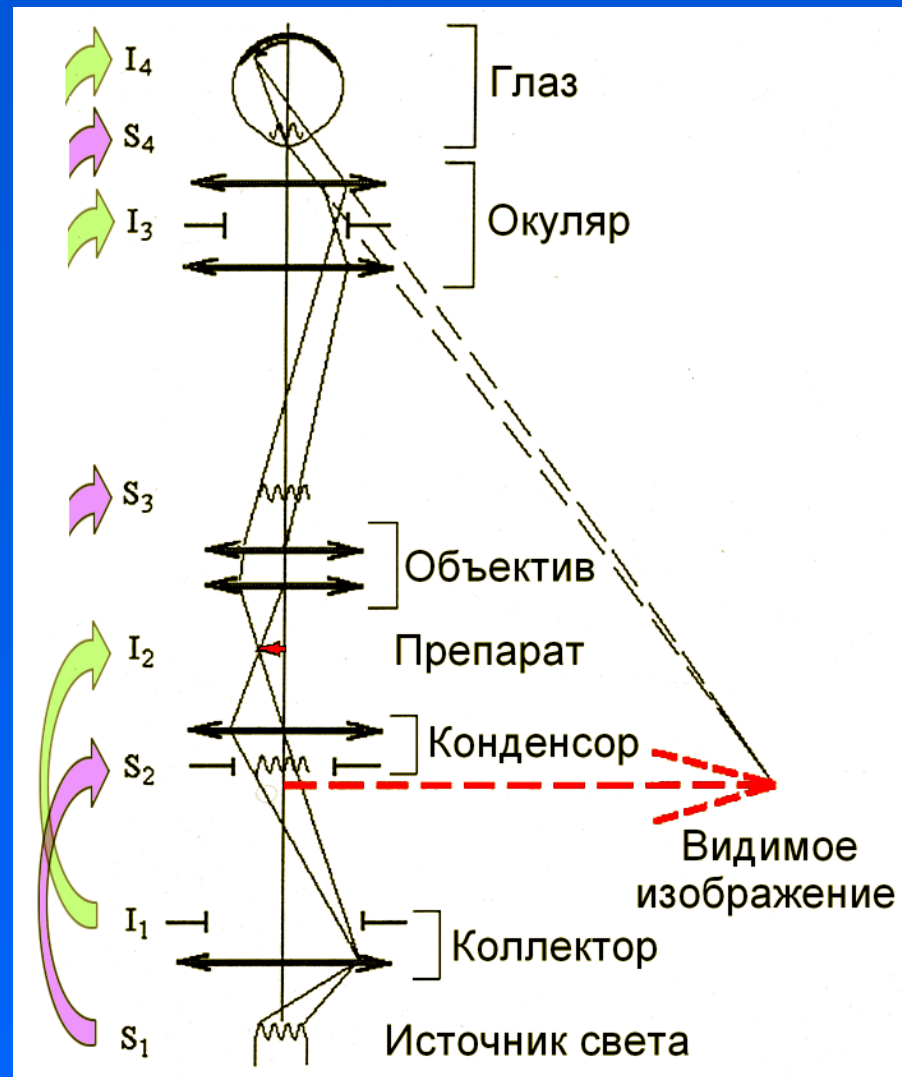
В геометрической оптике изображение предмета тождественно ему (ход лучей обратим). В физической оптике изображение не тождественно предмету, так как ход волнового фронта необратим.

Для описания соотношения предметов и их изображений, создаваемых оптическим прибором, удобно ввести понятия «пространство предметов» и «пространство изображений».

В случае микроскопа пространство предметов ограничивается препаратом, а пространство изображений возникает позади задней фокальной плоскости объектива и рассматривается через окуляр или проецируется на матрицу камеры.

Соответственно глаз рассматривает вторичное изображение, создаваемое окуляром, которое проецируется линзами глаза на сетчатку.

# Оптические плоскости в микроскопе



1 группа ( $S_1 - S_4$ ): лампа осветителя – диафрагма конденсора – з.ф.п. объектива – входной зрачок глаза

2 группа ( $I_1 - I_4$ ): полевая диафрагма – препарат – диафрагма окуляра – сетчатка глаза

# Увеличение и разрешение

В геометрической оптике увеличение прибора (простой линзы) может быть бесконечно большим. На практике различают полезное и избыточное увеличения.

Полезным называется увеличение, которое делает различимым для глаза новые детали изображения.

Избыточным называется увеличение, которое не приносит в изображение новых деталей, а только делает его более размытым.

Разрешение (разрешающая способность прибора) – это комплексная характеристика, которая имеет несколько определений. Наиболее часто под разрешением подразумевают возможность увидеть раздельно два близко расположенных объекта, то есть фактически обсуждается не минимальная величина объектов, а расстояние между ними (угловое или линейное). В некоторых случаях под разрешением подразумевают минимальный по размеру объект, который можно увидеть в оптическом приборе.

# Физическая оптика

Для описания разрешающей способности прибора геометрической оптики недостаточно. В качестве следующей аппроксимации используется физическая оптика.

Физическая оптика учитывает волновые свойства света (фотонов) и за счет этого позволяет точнее описать соотношение между объектом и его увеличенным изображением.

Кроме того, физическая оптика позволяет математически рассчитать системы линз, создающих наилучшее изображение (объективы, свободные от аберраций).

# Допущения физической оптики

Длина волны света конечна.

Распространение света есть распространение электромагнитных колебаний в виде волновых фронтов.

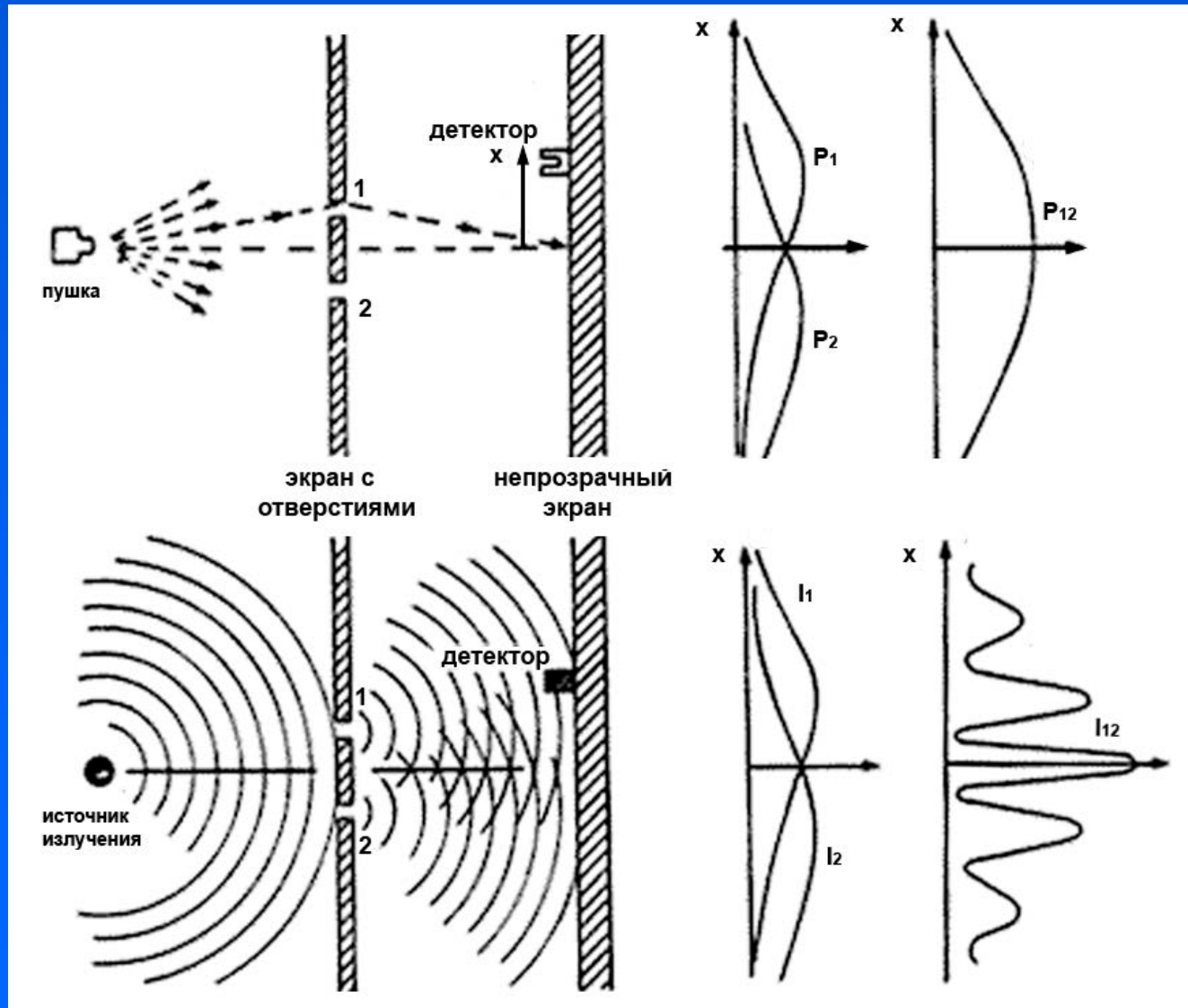
Квантовые эффекты отсутствуют.

**Следствия:**

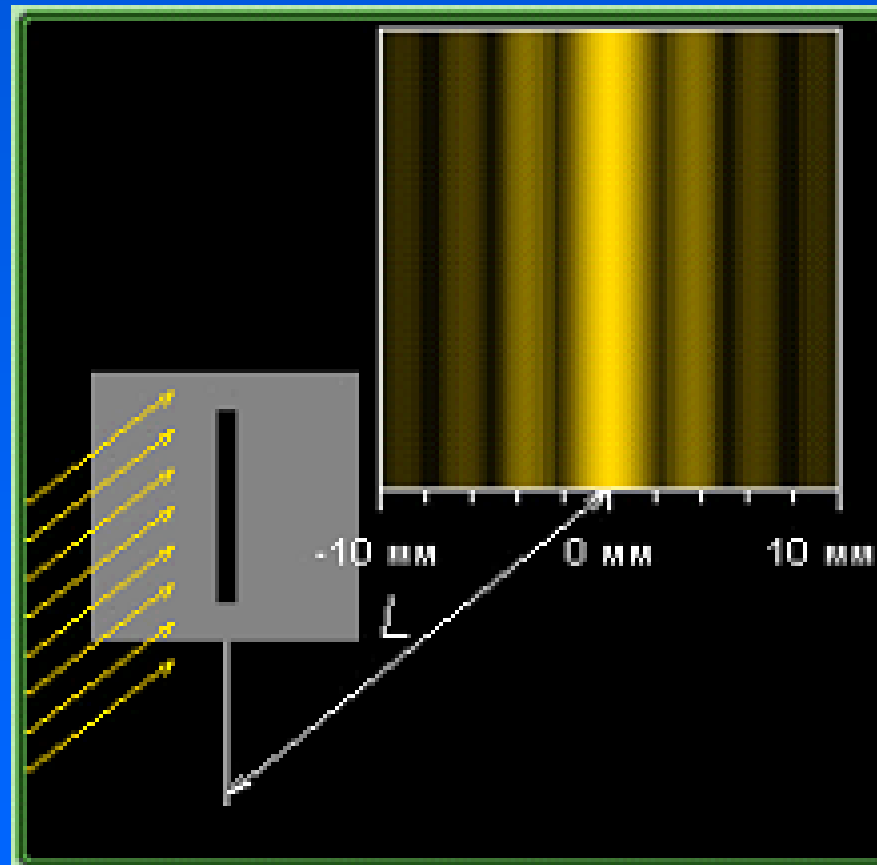
1. Распространение света в однородной среде не прямолинейно (дифракция).
2. Волновые фронты взаимодействуют друг с другом (интерференция).



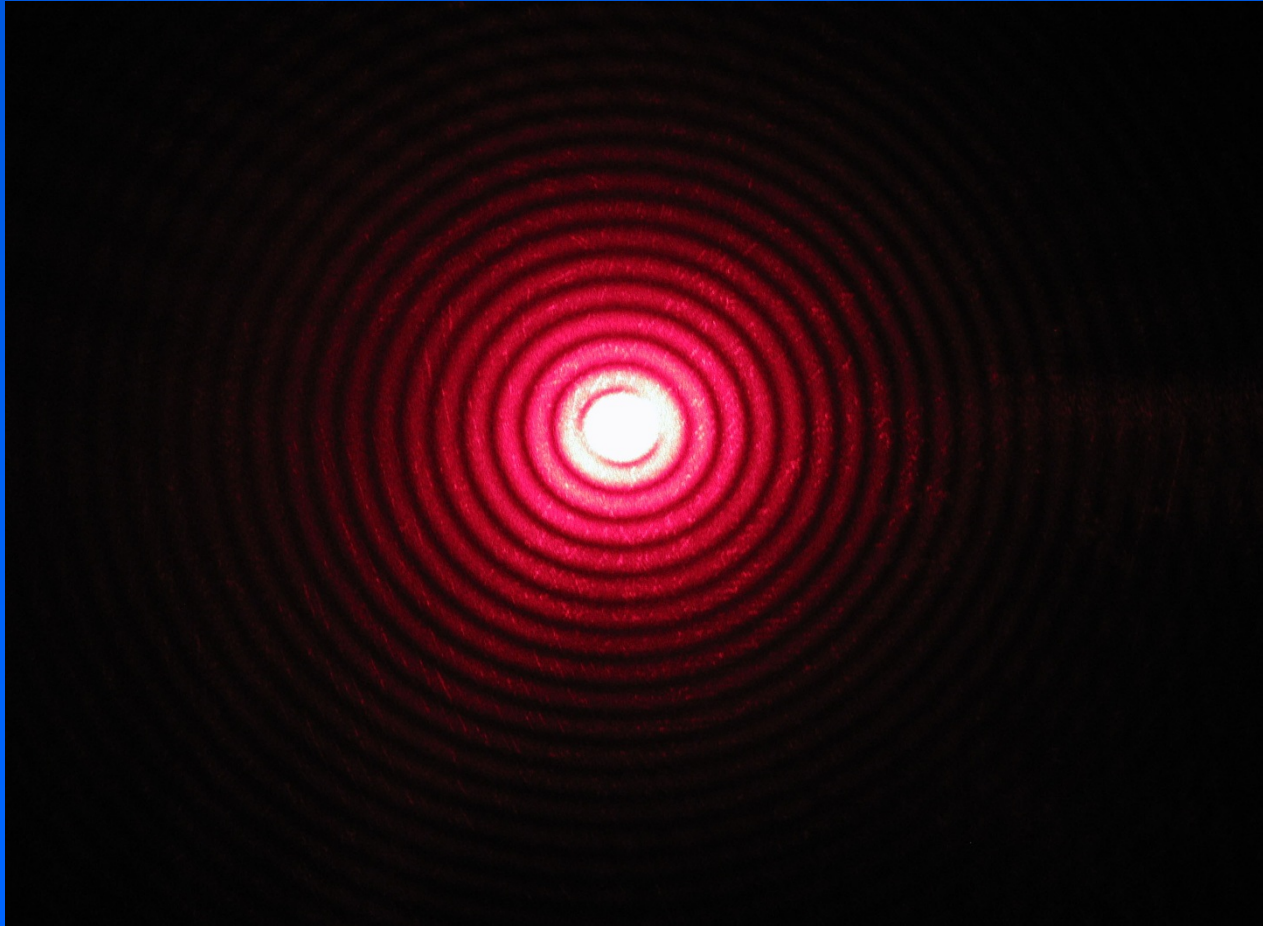
# Сравнение распространения волн и частиц



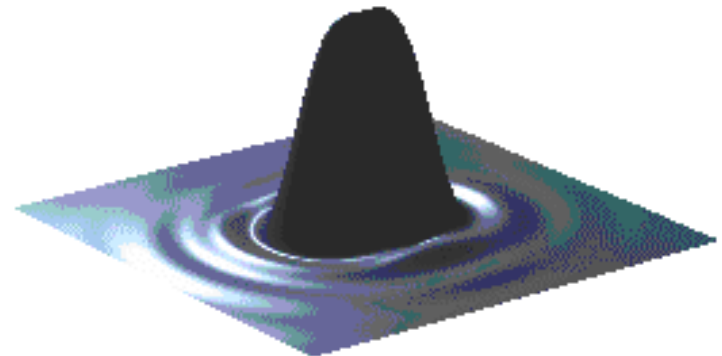
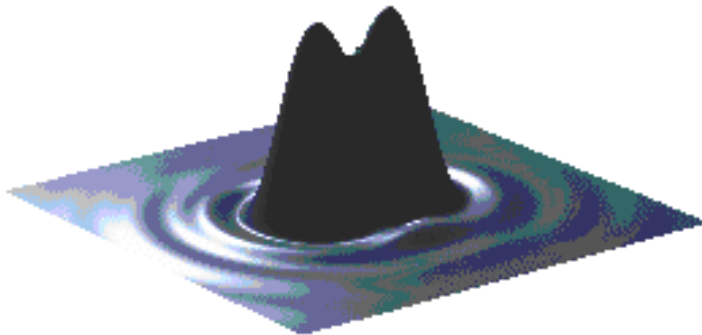
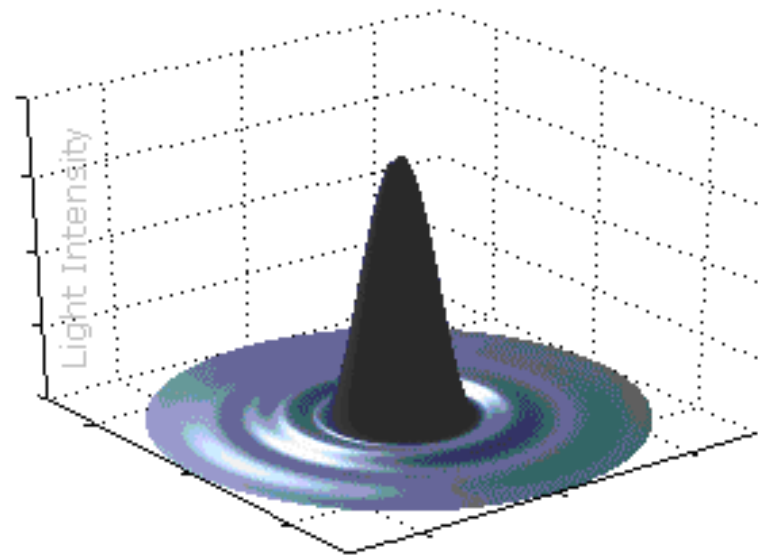
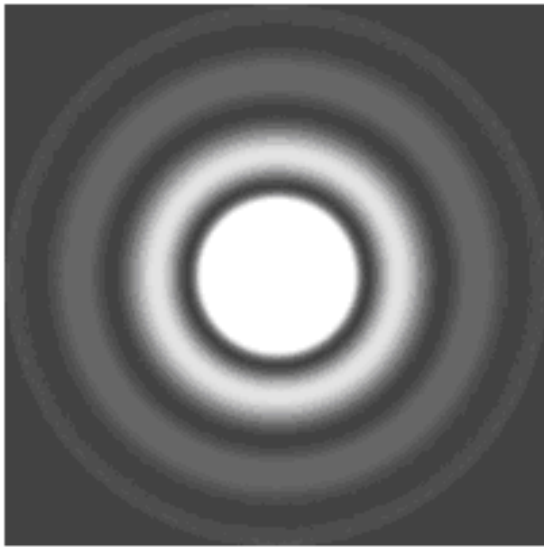
# Дифракция Фраунгофера на щели



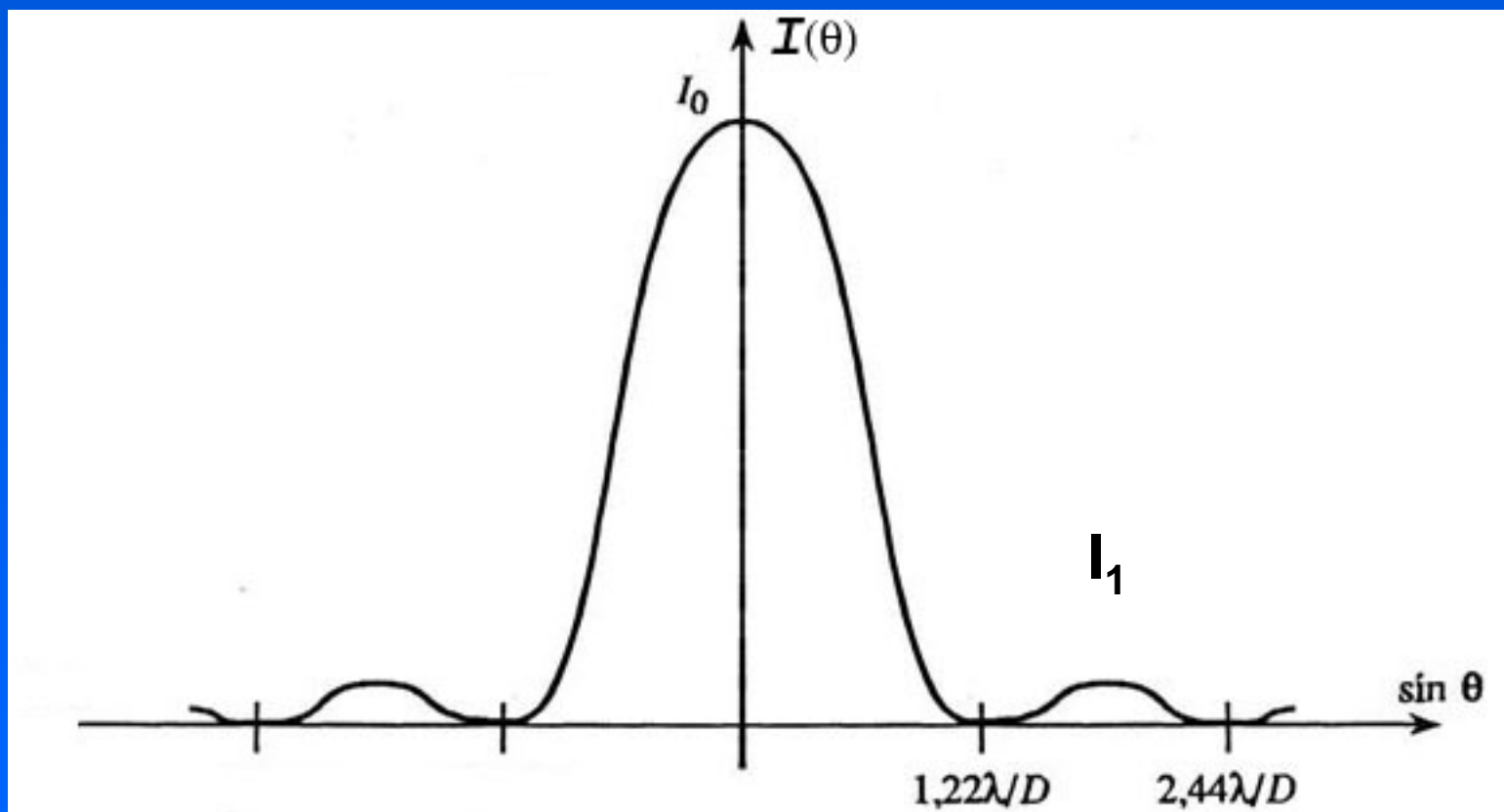
# Дифракция Фраунгофера на малом круглом отверстии



# Диск Эри – изображение точечного объекта идеальной линзой



# Дифракция света – распределение интенсивности



В диске Эри есть центральный (нулевой) максимум и локальные максимумы больших порядков, которые имеют значительно меньшую интенсивность ( $I_1 \sim 2\%$  от  $I_0$ )

Полное распределение интенсивности в диске Эри описывается формулой:

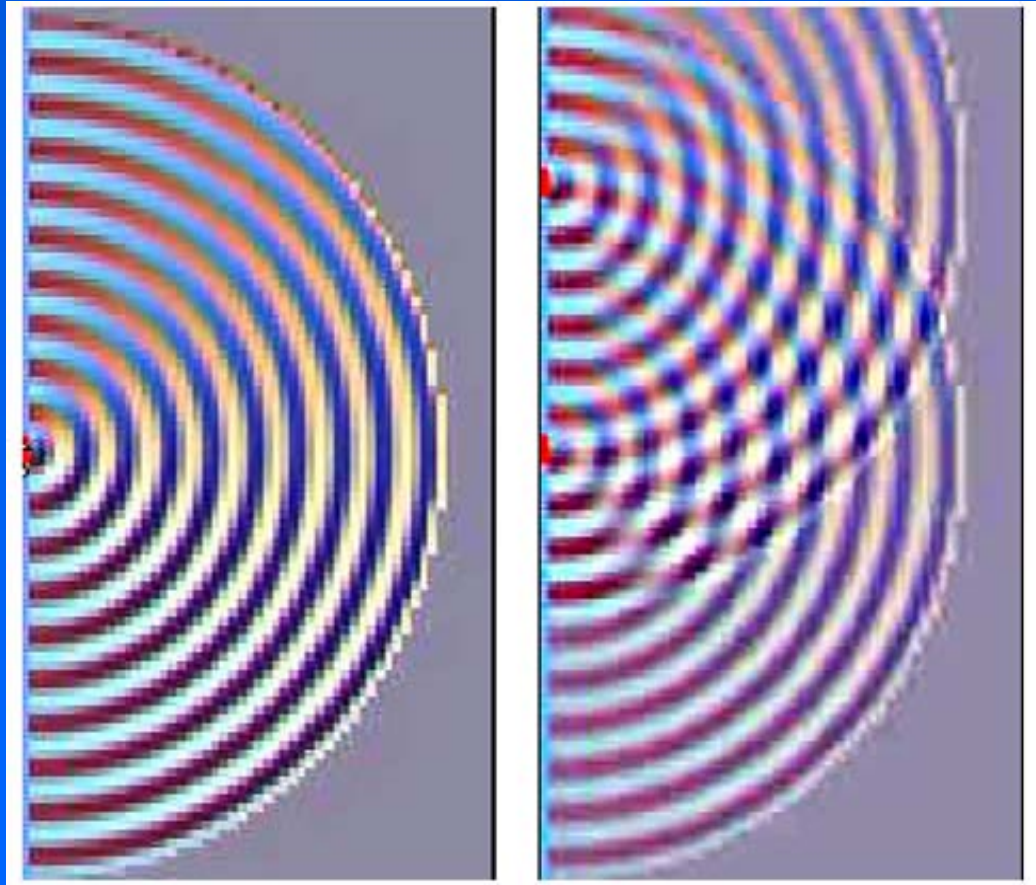
$$I = \left[ \frac{J_1(v)}{v} \right]^2$$

где  $I$  – интенсивность,

$v$  – нормализованное расстояние от центра,

$J_1$  – Бесселева функция первого рода

# Интерференция волн



Интерференция волновых фронтов приводит к образованию псевдо-структур - пучностей и впадин («стоячие волны»).

Расположение пучностей и впадин определяется источниками волн.

# Источники света и интерференция

Лазер – когерентен, и интерференционная картина видна при любом рассеивании пучка лазерного света.

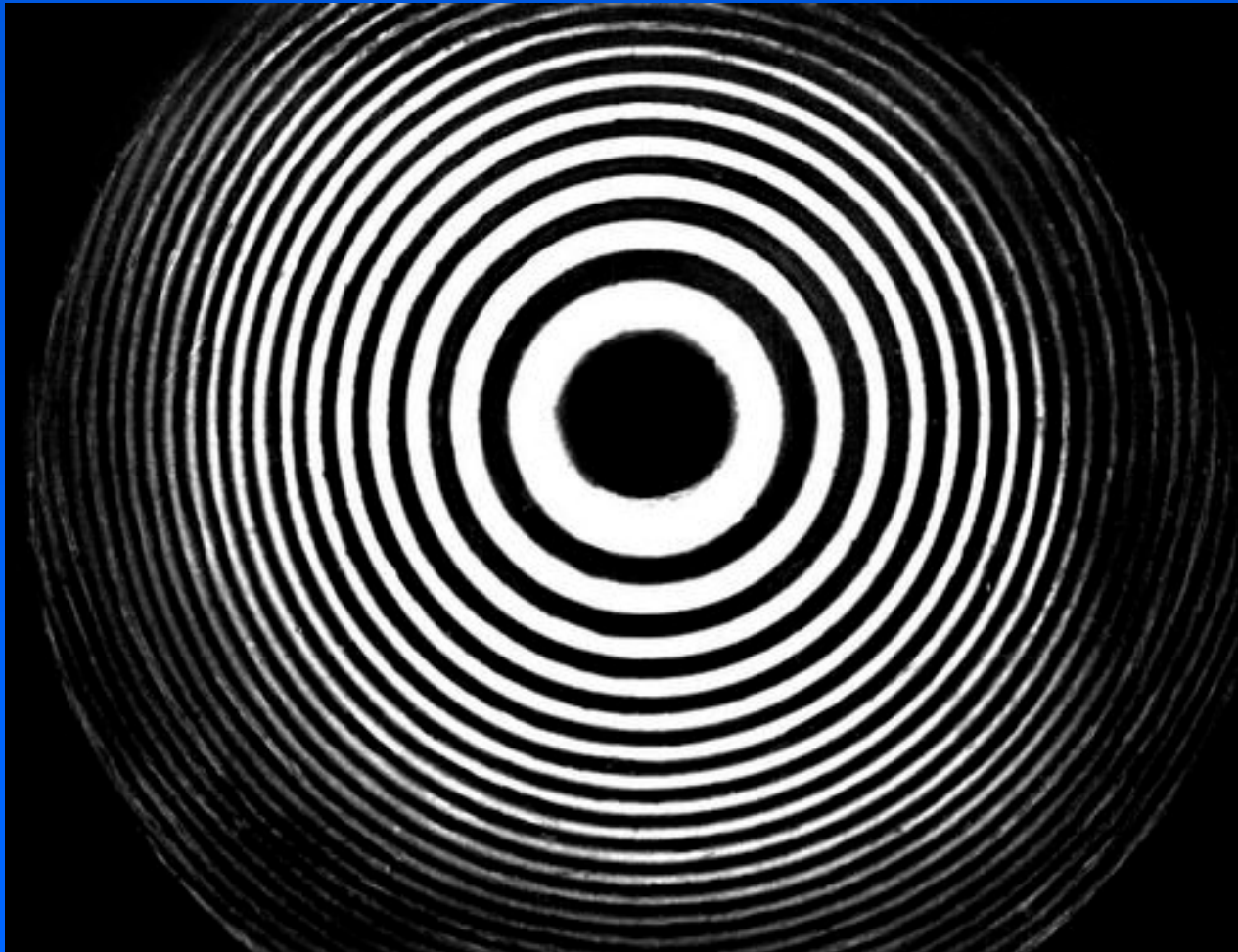
Нагретое тело – квазикогерентный источник, цуги когерентных волн имеют продолжительность  $\tau \cong 10^{-8}$  секунды (газоразрядные лампы). Для солнечного света  $\tau \cong 10^{-15}$  секунды.

Таким образом, интерференция при освещении объекта лампой накаливания не видна. Она может быть видна только в том случае, если разность оптического хода лучей много меньше  $10^{-8}$  с (например, кольца Ньютона, интерференция в тонких пленках).

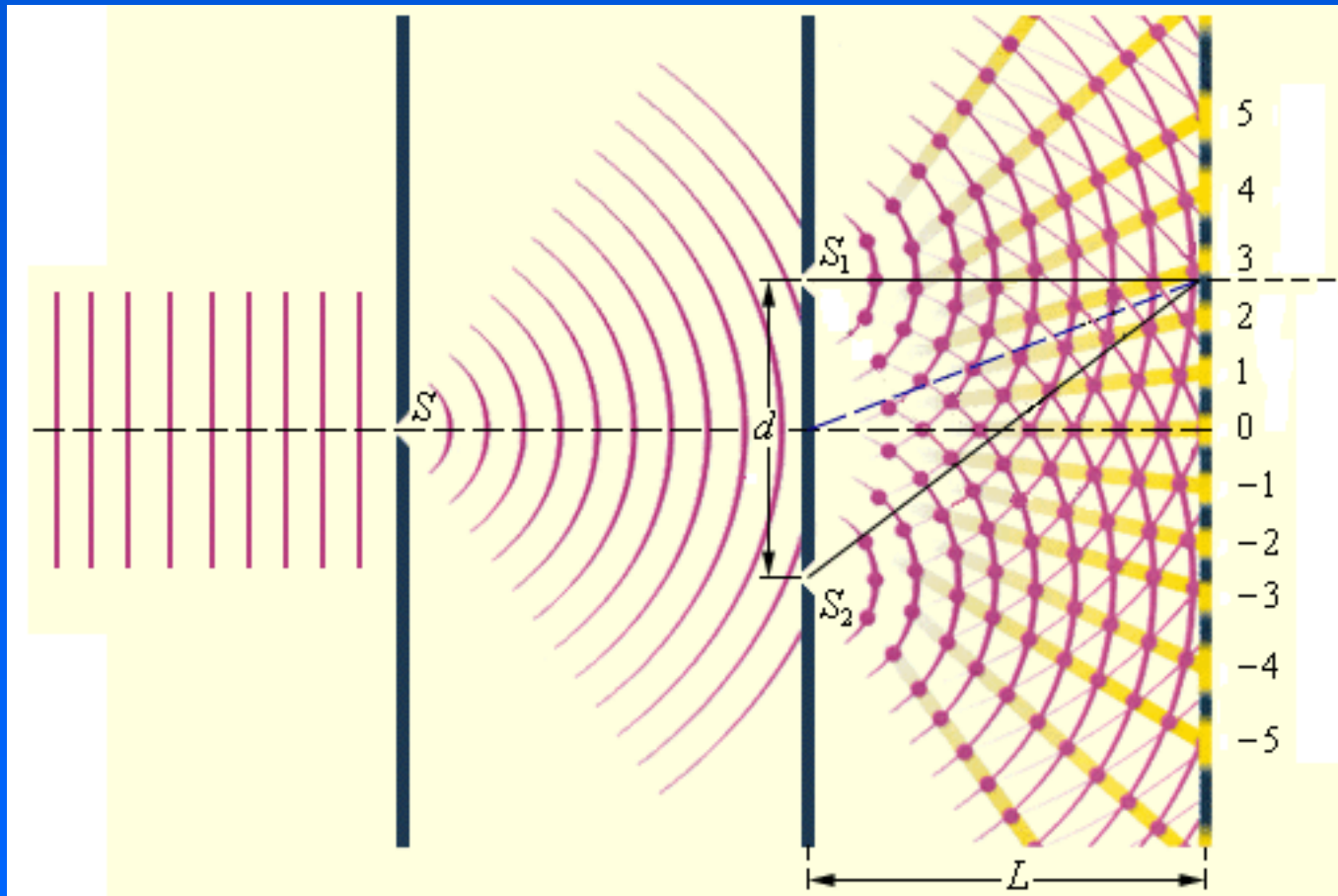
Поэтому для наблюдения интерференции волновых фронтов от обычного источника света используют расщепление светового пучка и последующее схождение двух фронтов с небольшой разностью оптического хода.



# Кольца Ньютона – интерференция в тонком слое

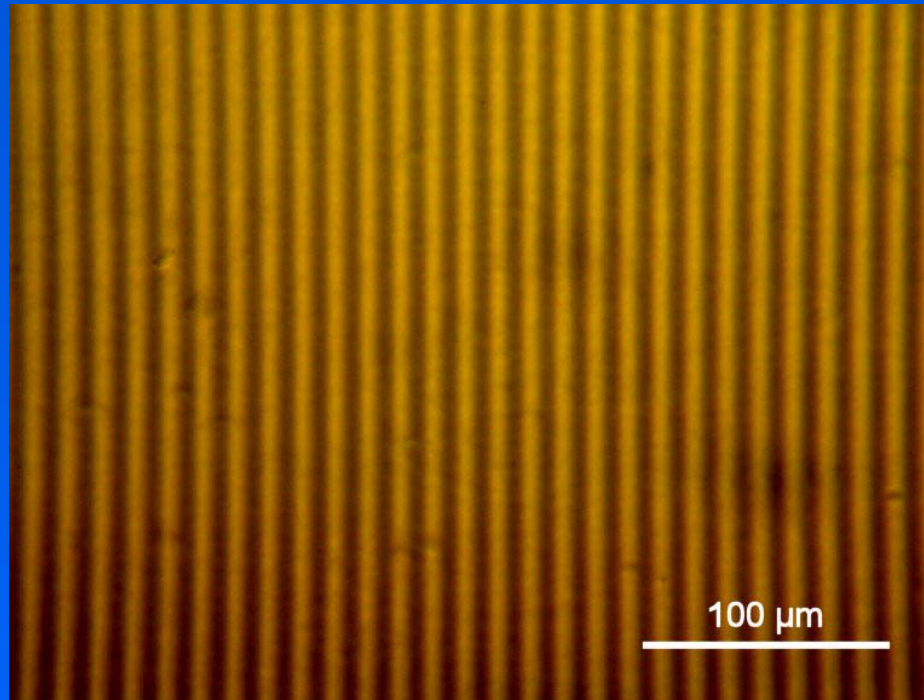


# Опыт Юнга – создание интерференционной картины



Свет, последовательно проходящий через одну, а затем две щели ( $S$ ;  $S_1$  и  $S_2$ ) создает на экране сложную картину чередующихся полос различной яркости.

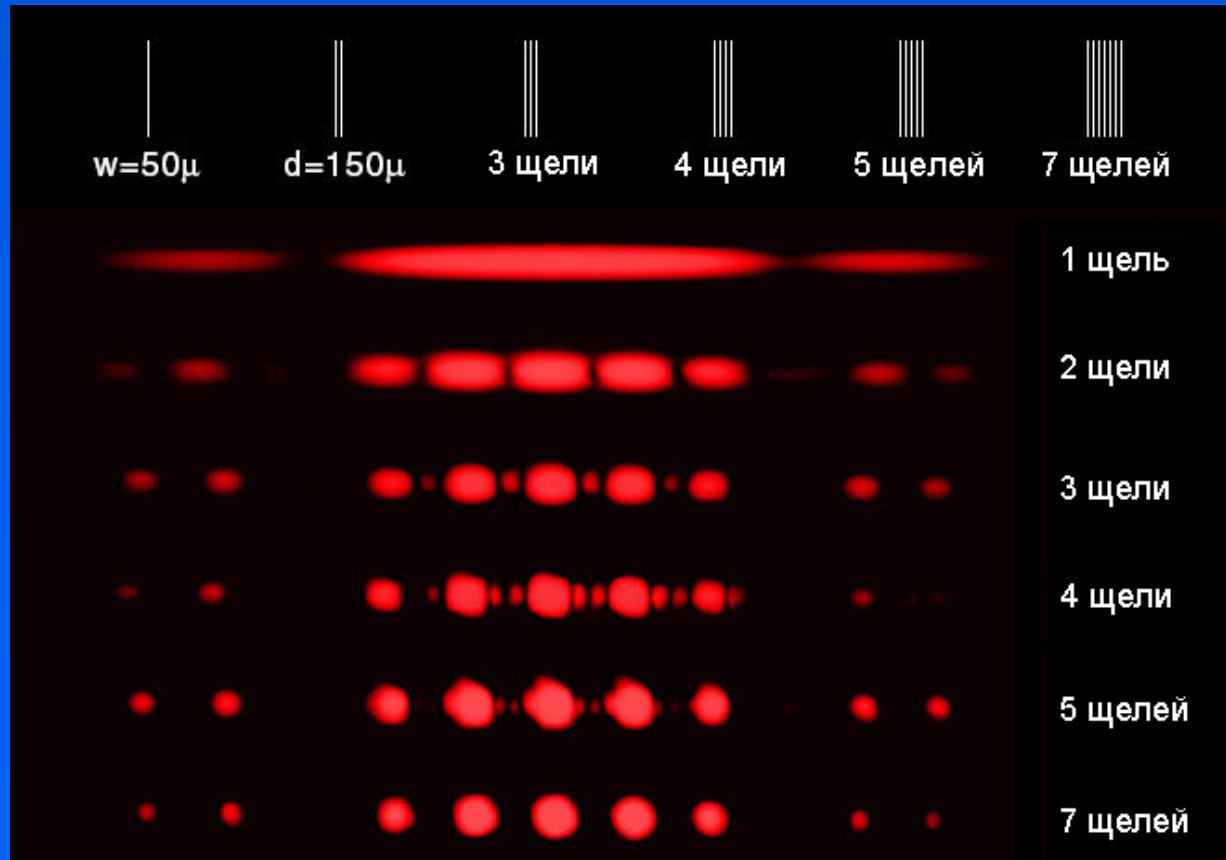
# Дифракционная решетка



Дифракционная решетка – система параллельных (прозрачных) щелей, разделенных непрозрачным промежутком, ширина которого примерно равна ширине щелей.

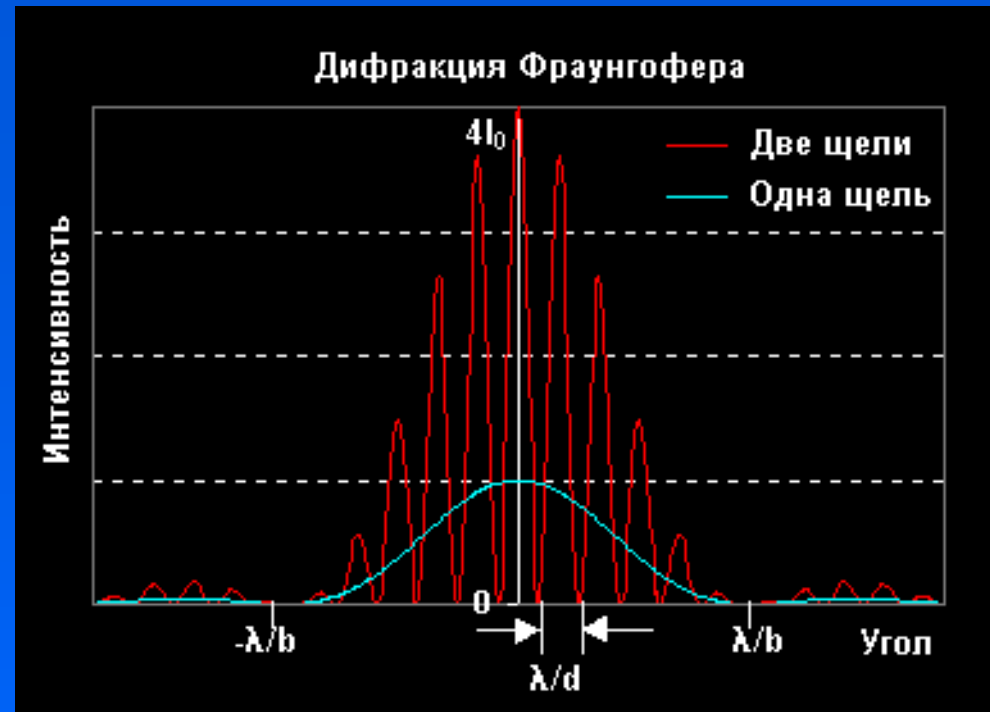
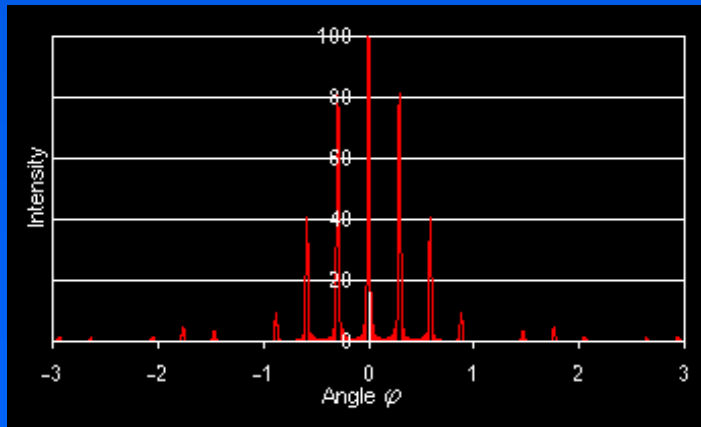
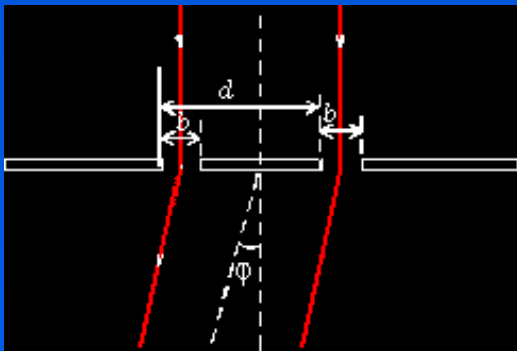
При использовании монохроматического света дифракционная решетка позволяет многократно усилить дифракционную картину (Фраунгофера), возникающую от одной щели.

# Изображение, создаваемое дифракционной решеткой



Картина, создаваемая дифракционной решеткой с разным числом элементов: с ростом числа щелей дифракционная картина Фраунгофера превращается в регулярное изображение.

# Дифракция света на решетке

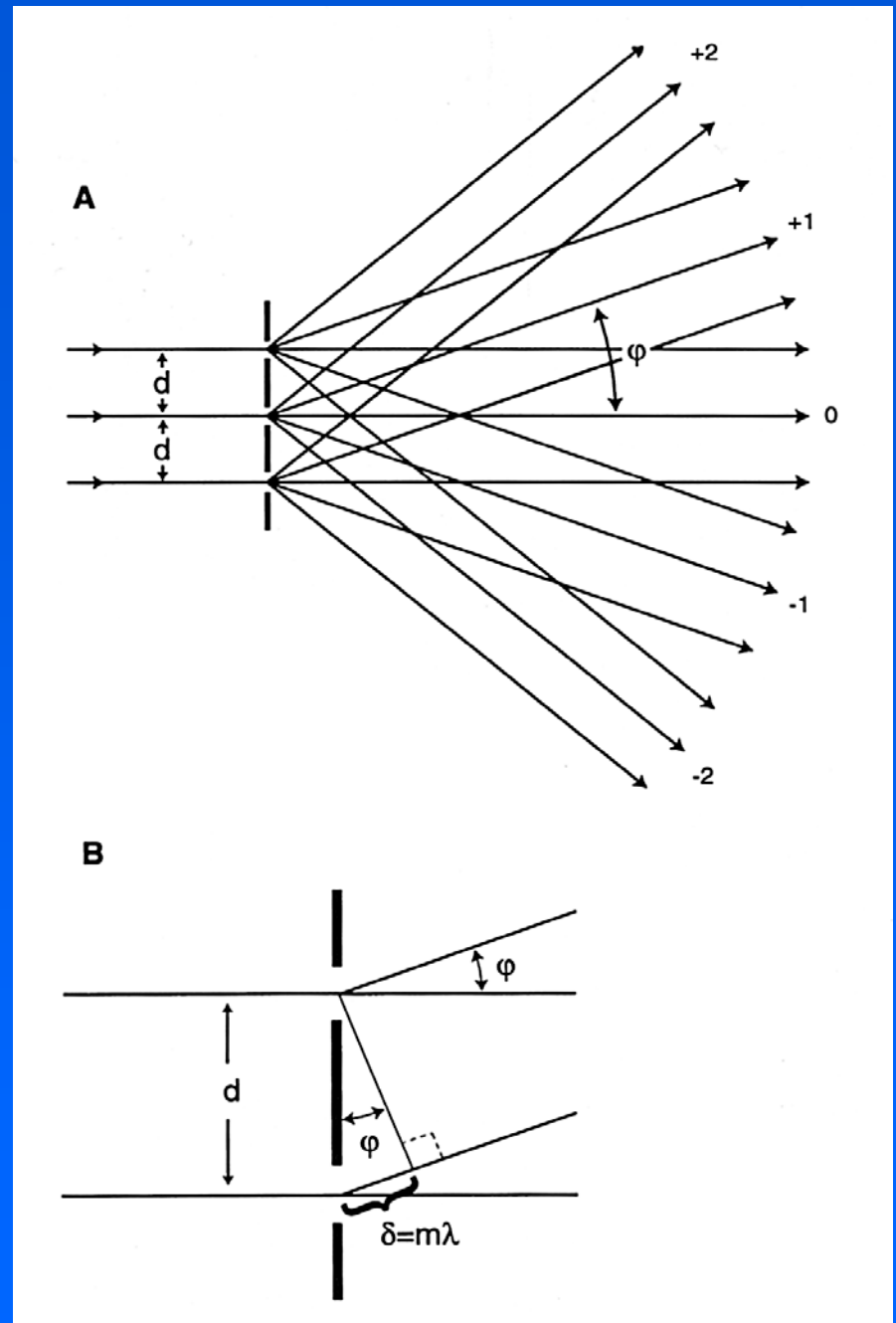


Дифракция на решетке:  $d = \lambda / (\sin \phi)$ , где  $d$  есть интервал между элементами решетки,  $\lambda$  – длина волны падающего света,  $\phi$  – угол отклонения лучей

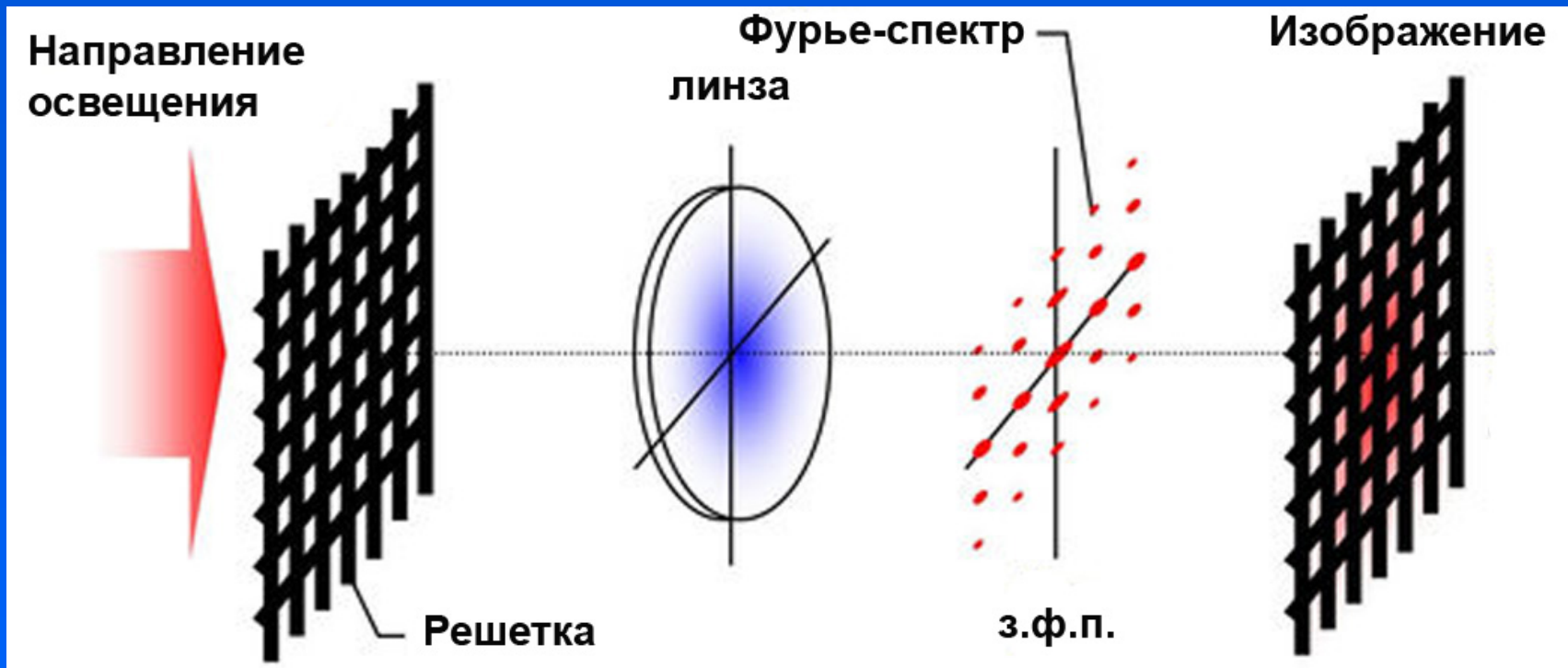
**Дифракция света на  
решетке с тонкими  
щелями: чем меньше  
расстояние, тем  
больше угол первого  
максимума:**

$$\sin\varphi = \lambda/d.$$

**Для  $d=1$  мкм и  
 $\lambda=550$  нм  $\varphi=33,6^\circ$**

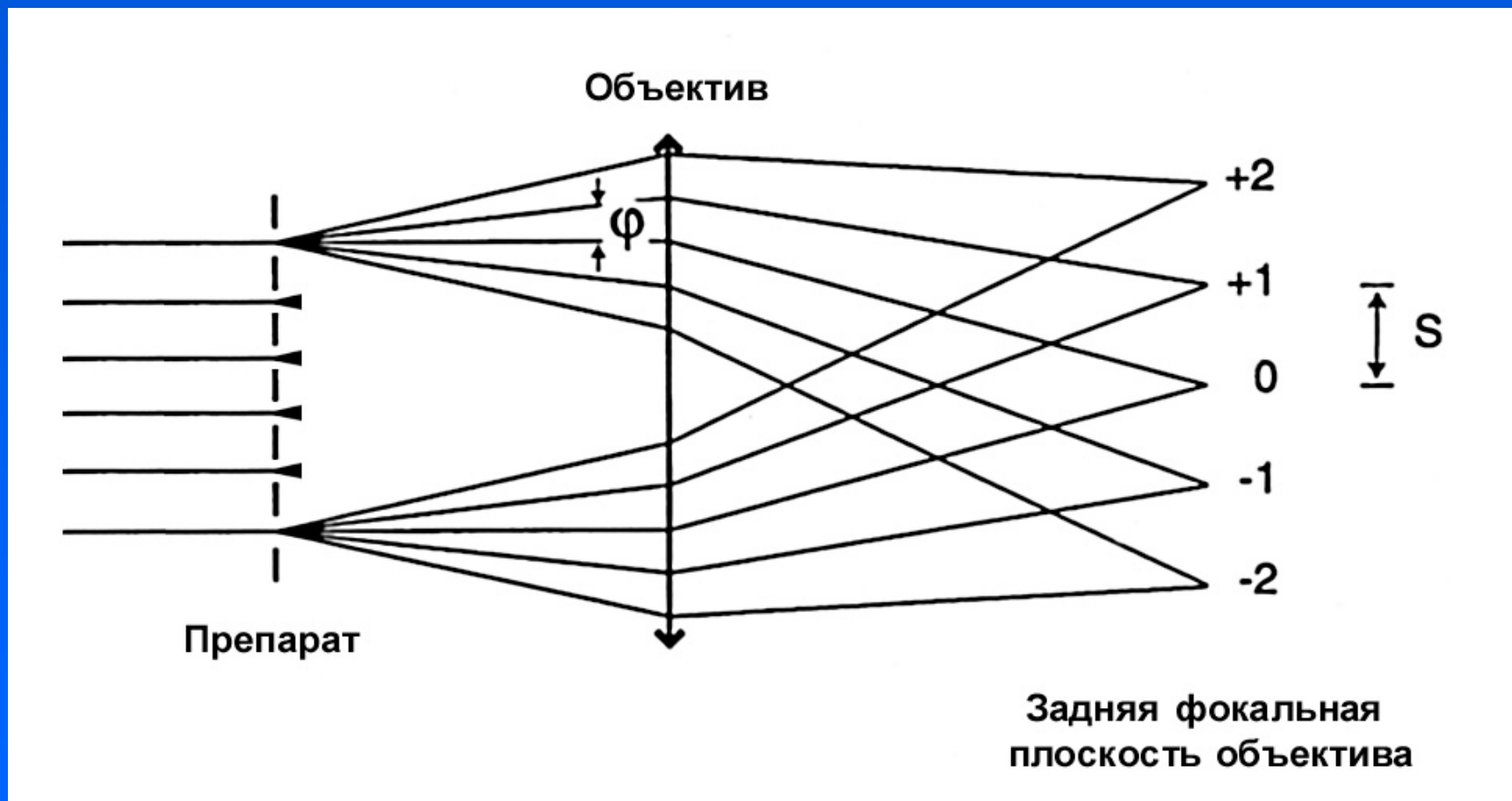


# Эксперимент Аббе-Портера



Если объект с регулярной структурой расположен перед передним фокусом идеальной линзы (объектива), то в з.ф.п. появляется его дифракционная картина (двумерный Фурье-спектр). Закрывая в этом спектре часть элементов можно регулировать конечное изображение, формируемое линзой.

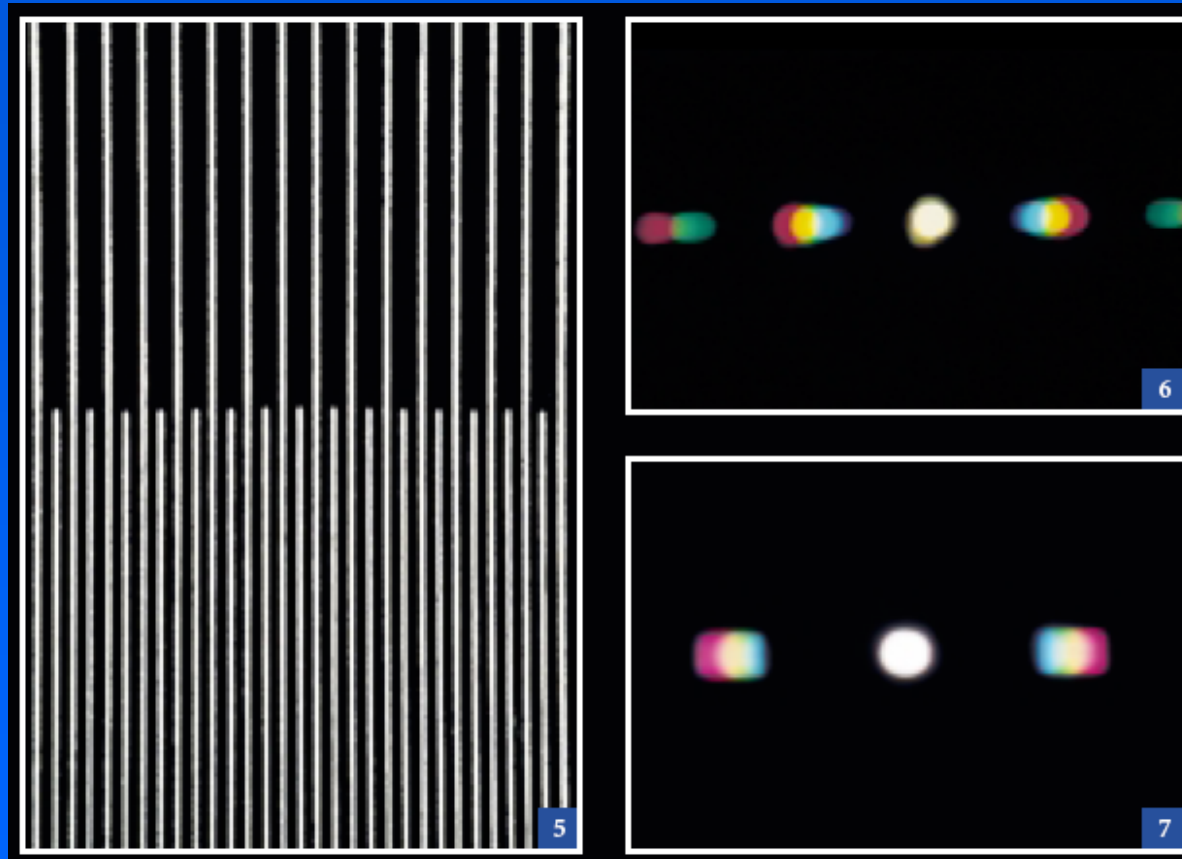
# Построение изображения решетки объективом микроскопа



$$\sin\varphi = \lambda/d; \quad \sin\varphi_{\max.} = NA_{\text{об.}}$$

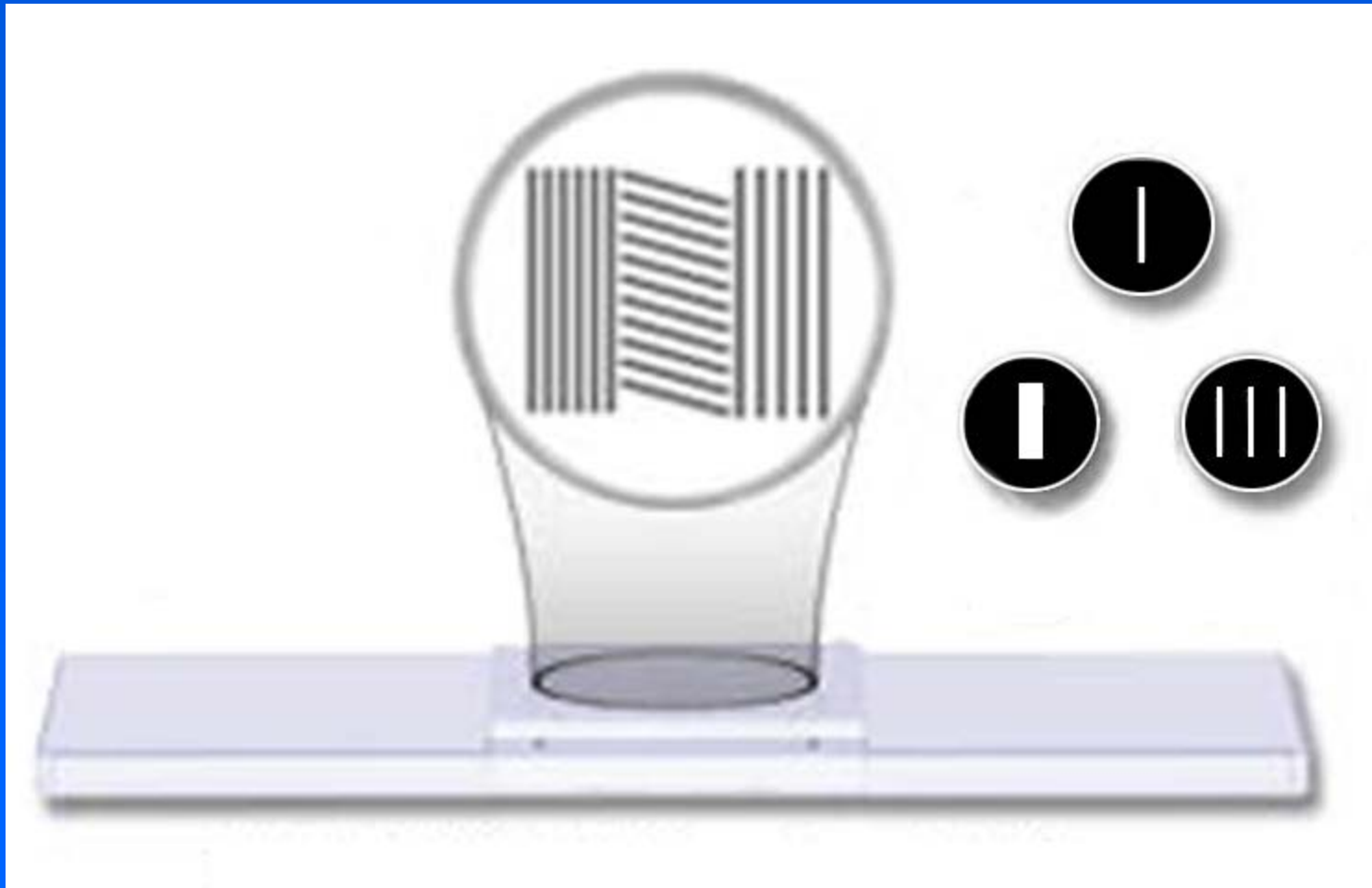


# Дифракционная картина в з.ф.п. – решетка с разными периодами

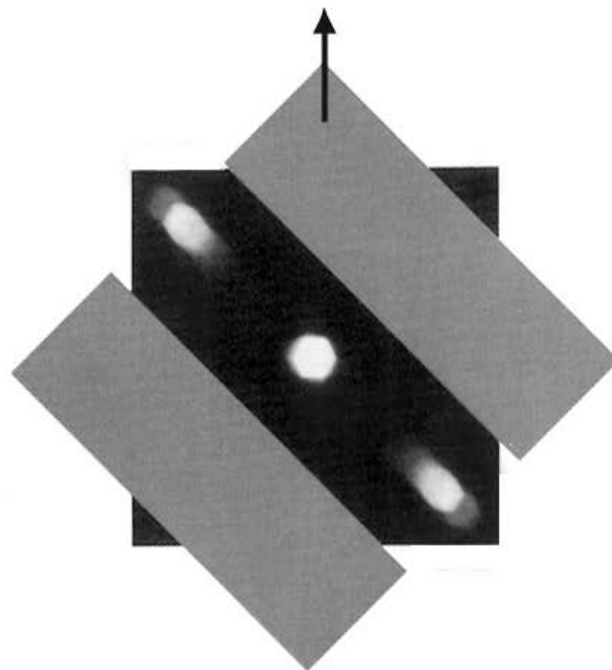
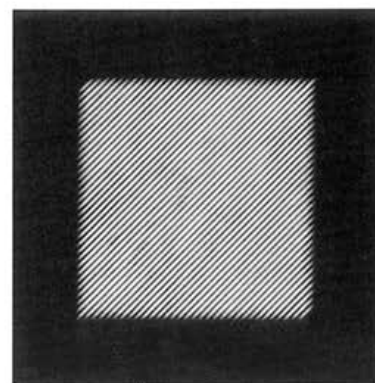
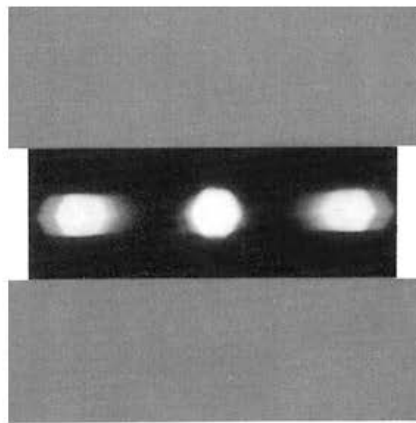
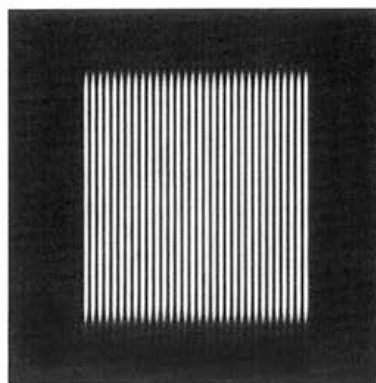
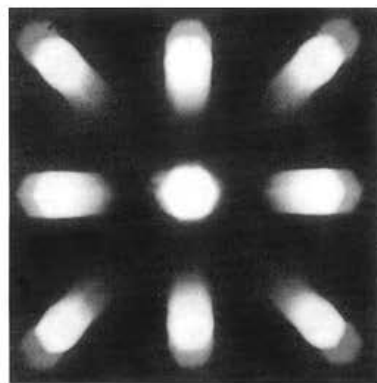
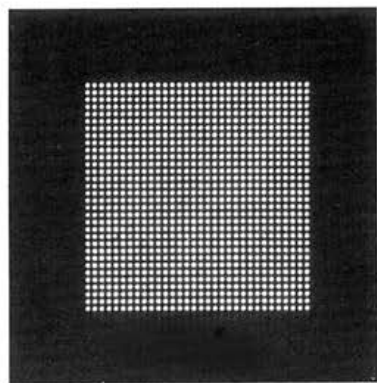


Расстояние между максимумами в з.ф.п. объектива растет с уменьшением расстояния между штрихами

# Решетка и маски для наблюдения эффектов Аббе



# Влияние закрытия дифракционных максимумов на вид решетки

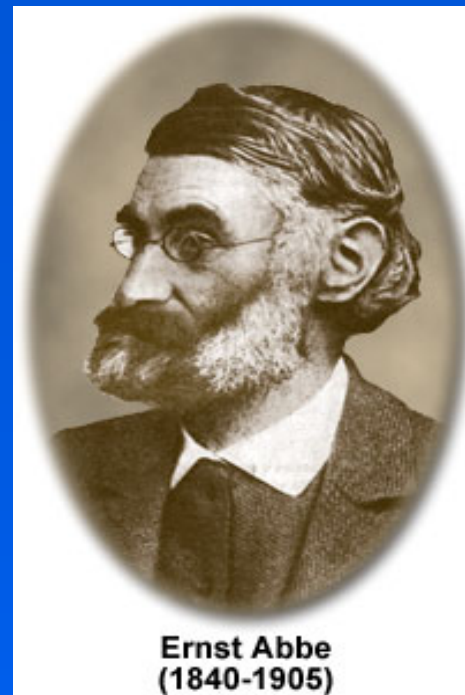


# Эксперименты Аббе

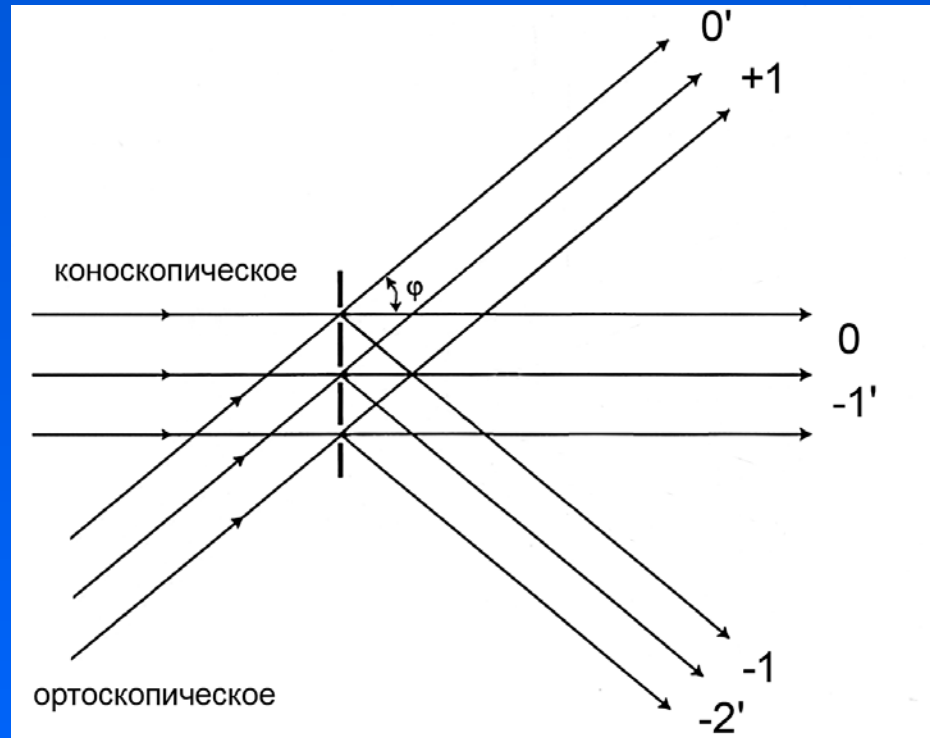
1. Изображение решетки не меняется, если закрыть большую часть задней фокальной плоскости объектива, но оставить щели, соответствующие дифракционным максимумам.
2. Изображение решетки пропадает, если закрыть только области объектива, соответствующие дифракционным максимумам.
3. Если в объектив попадает свет первого и второго дифракционных максимумов, то, закрывая первый максимум, мы получим изображение решетки с вдвое более частыми щелями, чем они есть на самом деле.

# Теория Аббе

Изображение в микроскопе формируется в результате интерференции прямого и дифрагированного света в задней фокальной плоскости объектива. Оно возникает тогда, когда объективом собирается свет прямой и, как минимум, от первого дифракционного максимума. Промежуточным этапом в формировании изображения является формирование Фурье-образа в задней фокальной плоскости объектива. Степень подобия изображения и объекта зависит от числа дифракционных максимумов в задней фокальной плоскости объектива.



# Максимальный угол дифракции при различном освещении



Дифракция на решетке:  $d = \lambda / (\sin i + \sin (f - i))$ , где  $d$  есть интервал между элементами решетки,  $\lambda$  – длина волны падающего света,  $f$  – угол отклонения лучей,  $i$  – угол освещения, создаваемый конденсором

# Разрешающая способность микроскопа по Аббе

Для дифракционной решетки угол первого дифракционного максимума  $\alpha$  рассчитывается по формуле:

$$\sin \alpha = \lambda/d,$$

где  $\lambda$  – длина волны,  $d$  – период решетки.

Согласно условию Аббе, разрешающая способность микроскопа определяется максимальным углом отклонения дифрагированного света, попадающего в объектив. То есть,

$$\sin \alpha \leq NA_{об.},$$

откуда получаем разрешающую способность объектива при освещении параллельным пучком света:

$$\lambda/NA_{об.},$$

где  $\lambda$  – длина волны света,  $NA$  – числовая апертура объектива.

При использовании косого освещения по критерию Аббе разрешающая способность возрастает вдвое и составит для поглощающих объектов  $0.5 \lambda/NA$ .

# Критерий Рэля

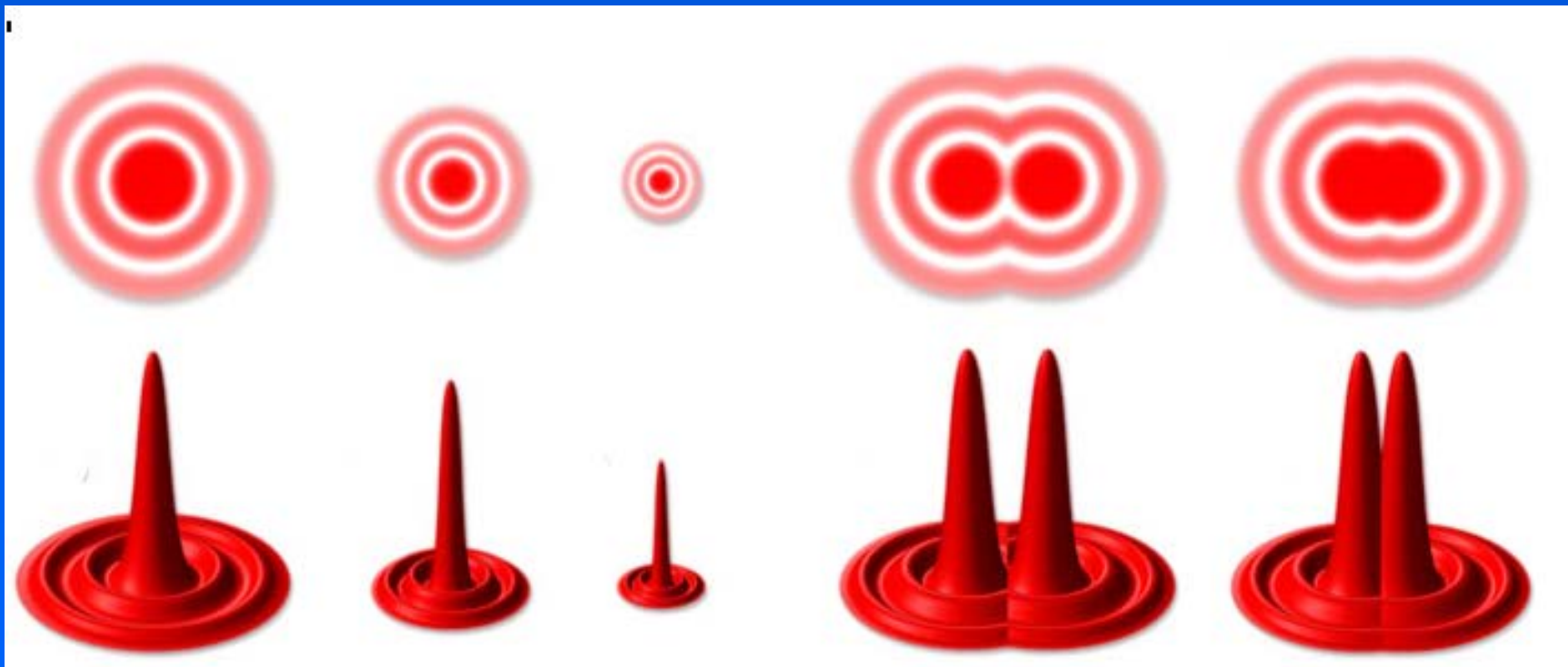
Поскольку изображение точки является диском, то разрешение определяется расстоянием между соседними дисками Эри.

Размер диска Эри определяется конструкцией оптического прибора и длиной волны испускаемого света.

Критерий Рэля в наилучшей степени приложим к светящимся объектам (астрономия, флуоресцентная микроскопия)

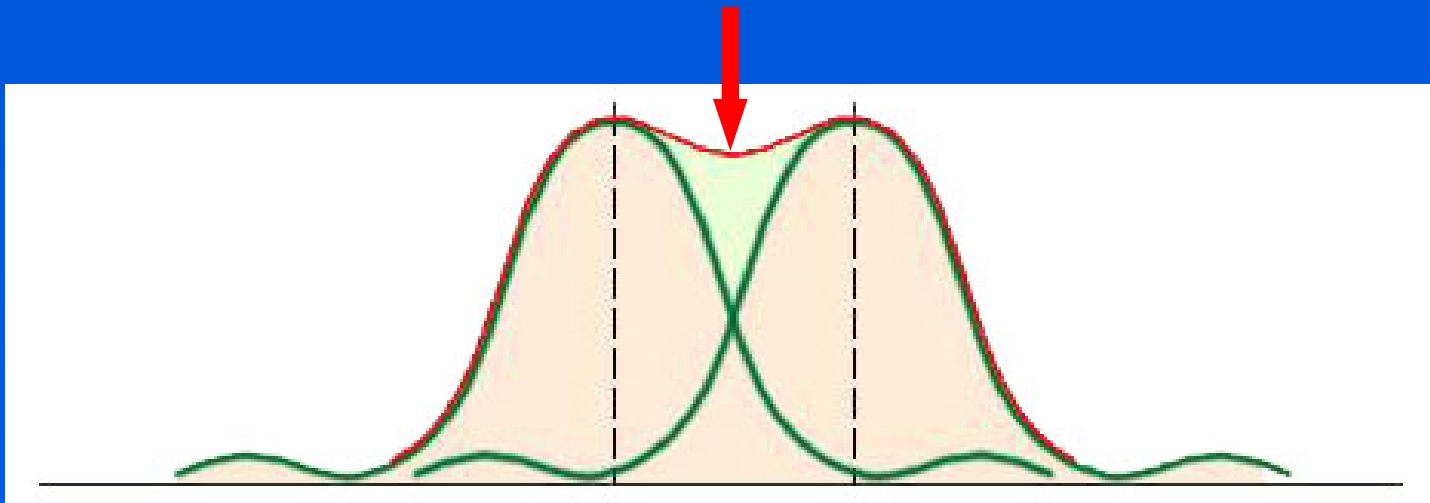


# Изображения точек линзой



Слева – размер диска Эри определяется апертурой объектива (возрастает слева направо). Справа – когда диски Эри сближаются, их изображения начинают сливаться.

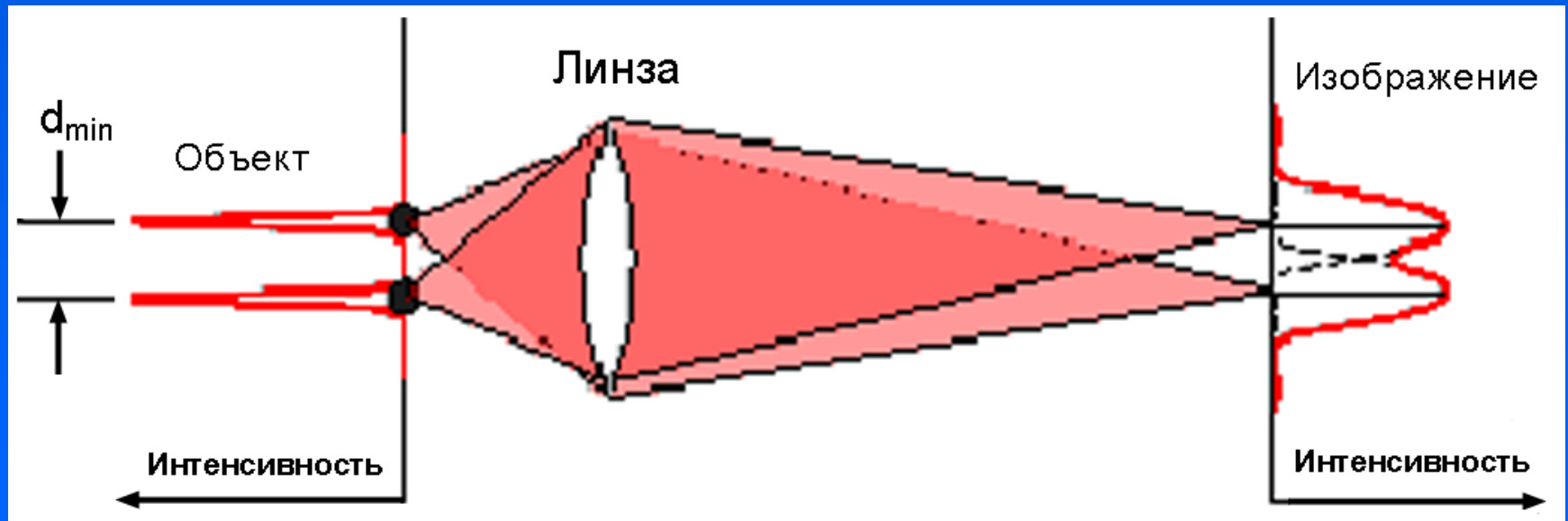
# Критерий Рэля



Когда диски Эри частично перекрываются, то суммарная интенсивность в минимуме (указан стрелкой) растет по мере сближения объектов, и затем минимум исчезает вовсе.

Критерий Рэля – интенсивность центрального минимума должна быть не более 73,7% от максимумов. Это соответствует расстоянию между максимумами равном радиусу диска Эри.

# Построение изображения объективом вблизи дифракционного предела



# Разрешающая способность объектива микроскопа

Согласно критерию Рэля, разрешение свободного от аберраций оптического прибора может быть вычислено по формуле:

$$R = 0,61 \lambda / \sin \alpha,$$

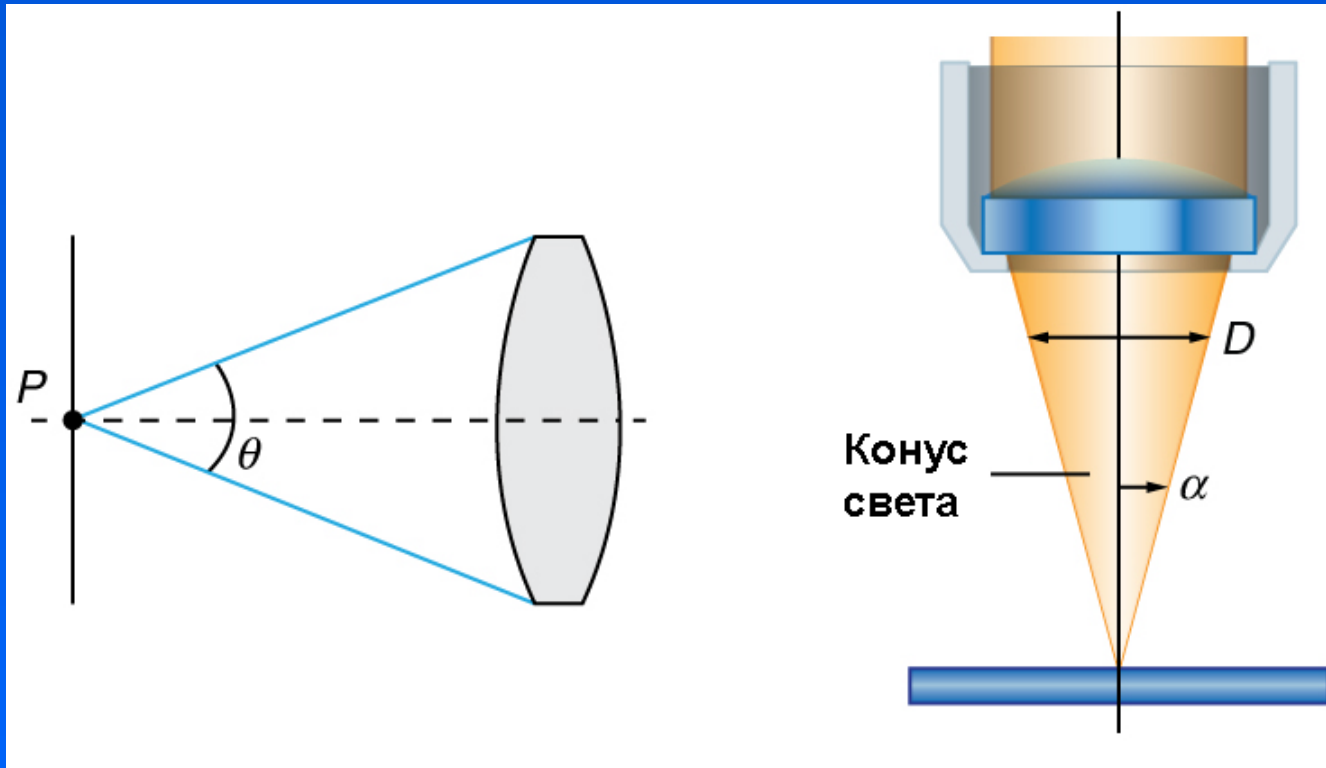
где  $R$  – минимальное разрешаемое расстояние,  $\alpha$  – максимальный угол, под которым отклоняющийся от оси свет попадает в линзу.

Для объектива микроскопа, где диаметр диска Эри определяется апертурой объектива, получаем

$$0.61 \lambda / NA,$$

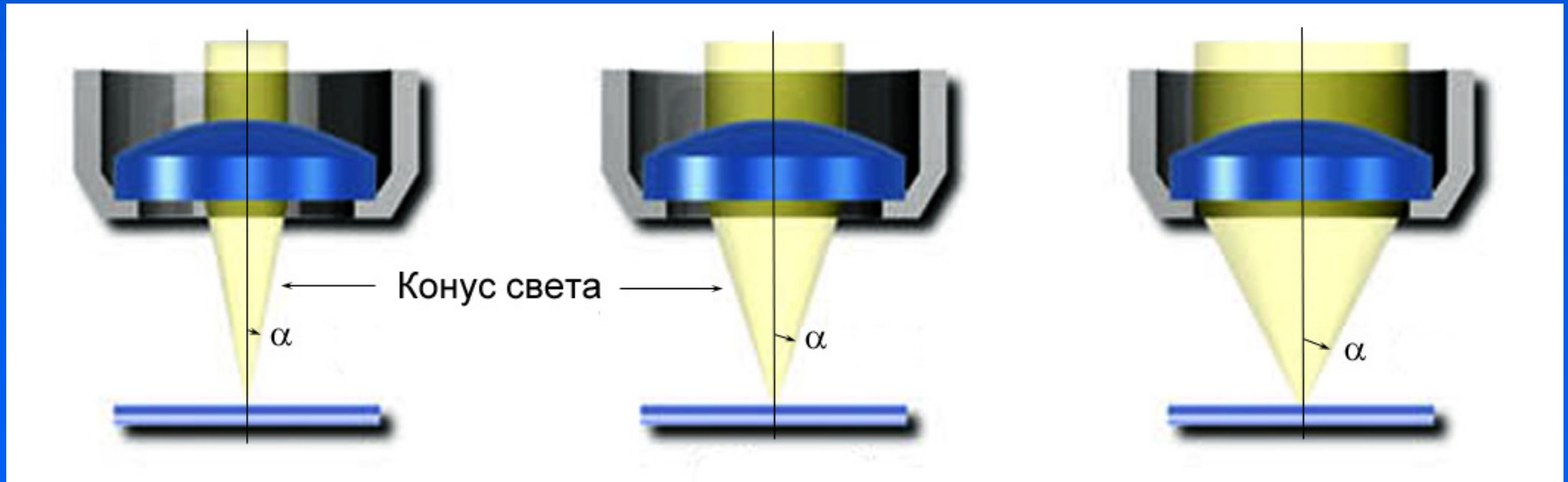
где  $\lambda$  – длина волны света,  $NA$  – числовая апертура объектива.

# Апертура объектива



Апертура объектива (линзы) – угол ( $\theta$ ) конуса света, собираемого объективом от предмета, расположенного вблизи фокуса. Апертура определяется соотношением между фокусным расстоянием объектива и диаметром его входного зрачка ( $D$ ).

# Числовая апертура объектива



Числовая апертура (NA) – синус половинного угла ( $\alpha$ ) конуса света, собираемого объективом.

Для иммерсионного объектива величина апертуры умножается на коэффициент преломления иммерсионной жидкости (масла, воды):

$$NA = n \cdot \sin \alpha$$

# Разрешающая способность объектива микроскопа

Два подхода:

Аббе (1871) – изображение есть сумма дифракционных решеток с разными периодами.

Критерий Аббе (Фуко) – должен быть различим минимальный период решетки.

Рэлей (1896) – изображение есть сумма точек, каждая из которых дает диск Эри.

Критерий Рэля – каждый диск Эри должен быть различим, то есть окружен заметным минимумом.

# Лекция 3

**Ограничение разрешающей способности  
лупы и микроскопа – aberrации**

**Компенсация aberrаций – условие  
апланатизма, теорема синусов**

**Объектив микроскопа – конструкция и  
основные характеристики**



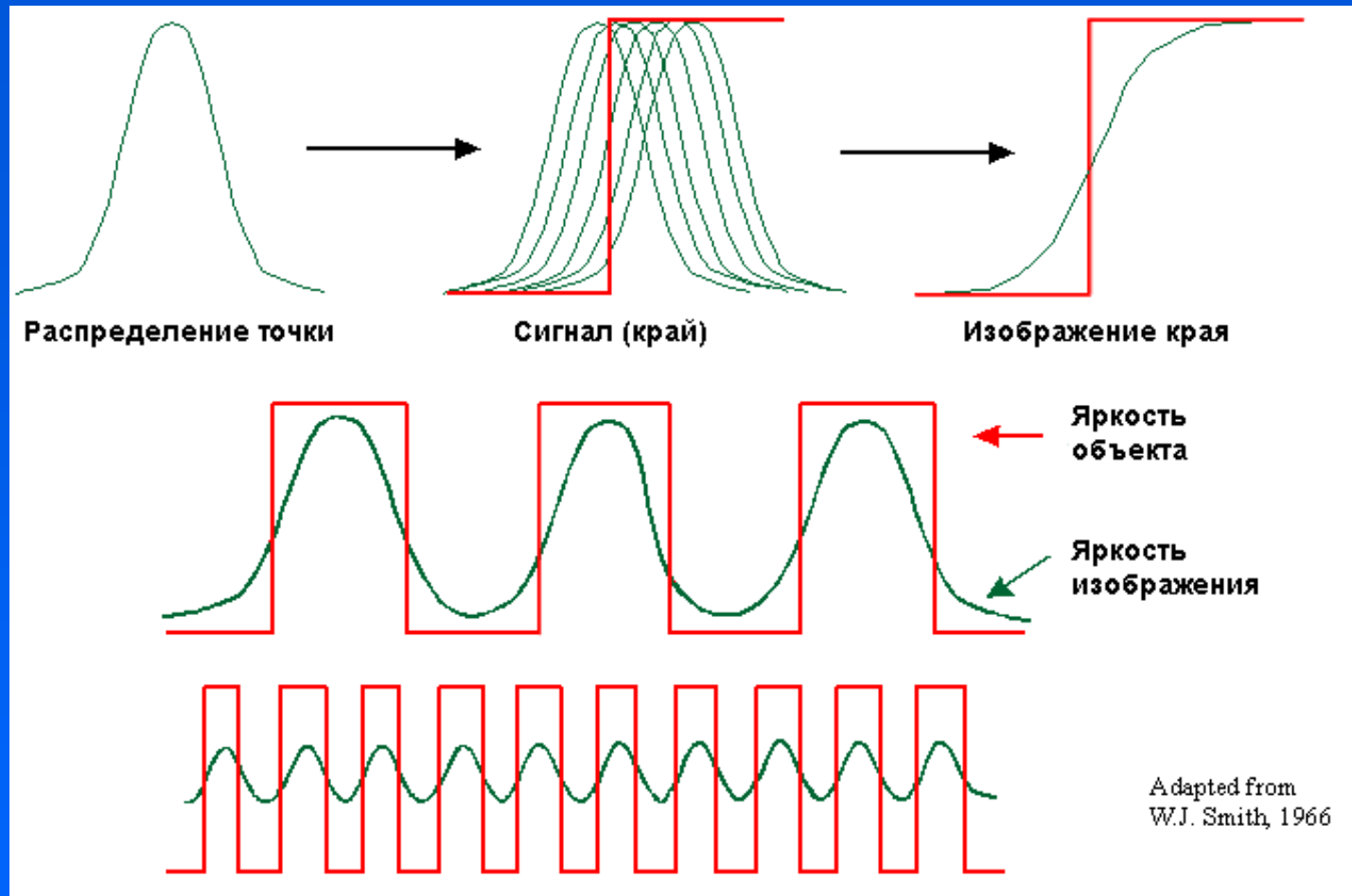
# К критерию Рэля

Разрешающая способность объектива точно определяется для заданной величины контраста. Для визуальных наблюдений минимальный уровень контраста предполагается равным 20% (в расчетном критерии Рэля – 26,3%).

При использовании цифровой камеры уровень контраста может быть снижен до порога камеры (менее 1% для научных камер). Соответственно критерий Рэля заменяется критерием Спарроу -  $0.47 \lambda/NA$ . Однако оцифрованное изображение ухудшается по сравнению с теоретическим пределом за счет так называемой пикселизации.

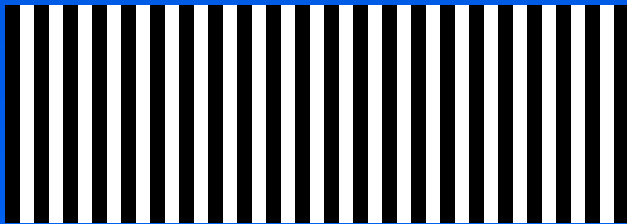
При цифровой записи изображения, состоящего из малых объектов, разделенных относительно большими расстояниями, возможно вычисление положения центра каждого одиночного диска Эри с погрешностью менее 1% его диаметра. Этот прием используется для получения так называемого суперразрешения.

# Функция передачи контраста

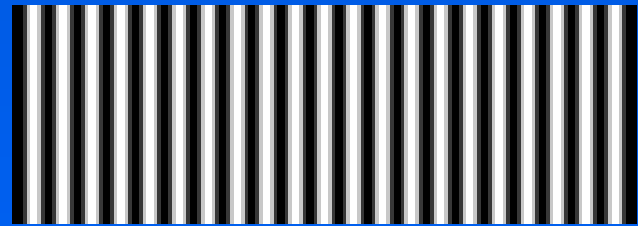


Из-за волновой природы света (точка преобразуется в диск Эри) степень передачи контраста в изображении уменьшается с ростом пространственной частоты объекта.

# Изображение при разных увеличениях



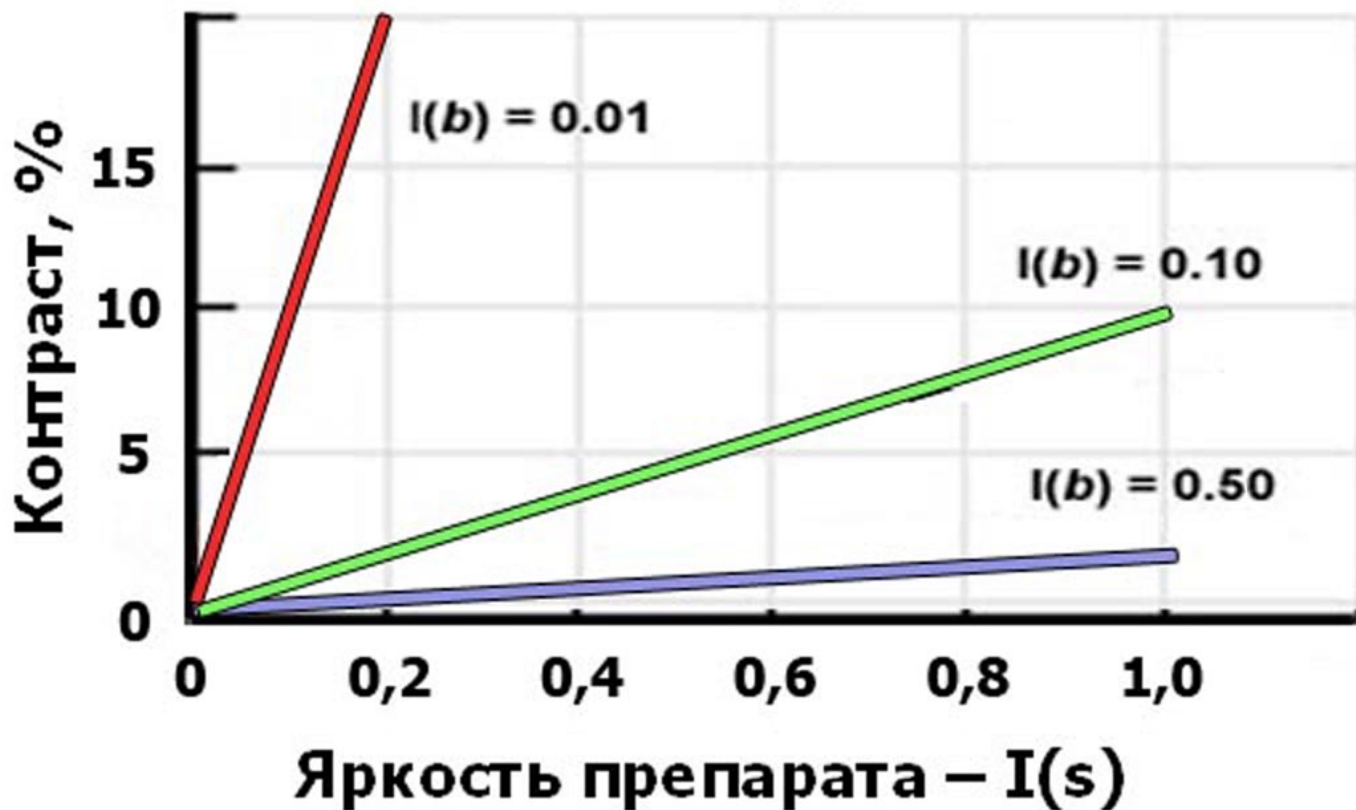
Диски Эри не  
перекрываются



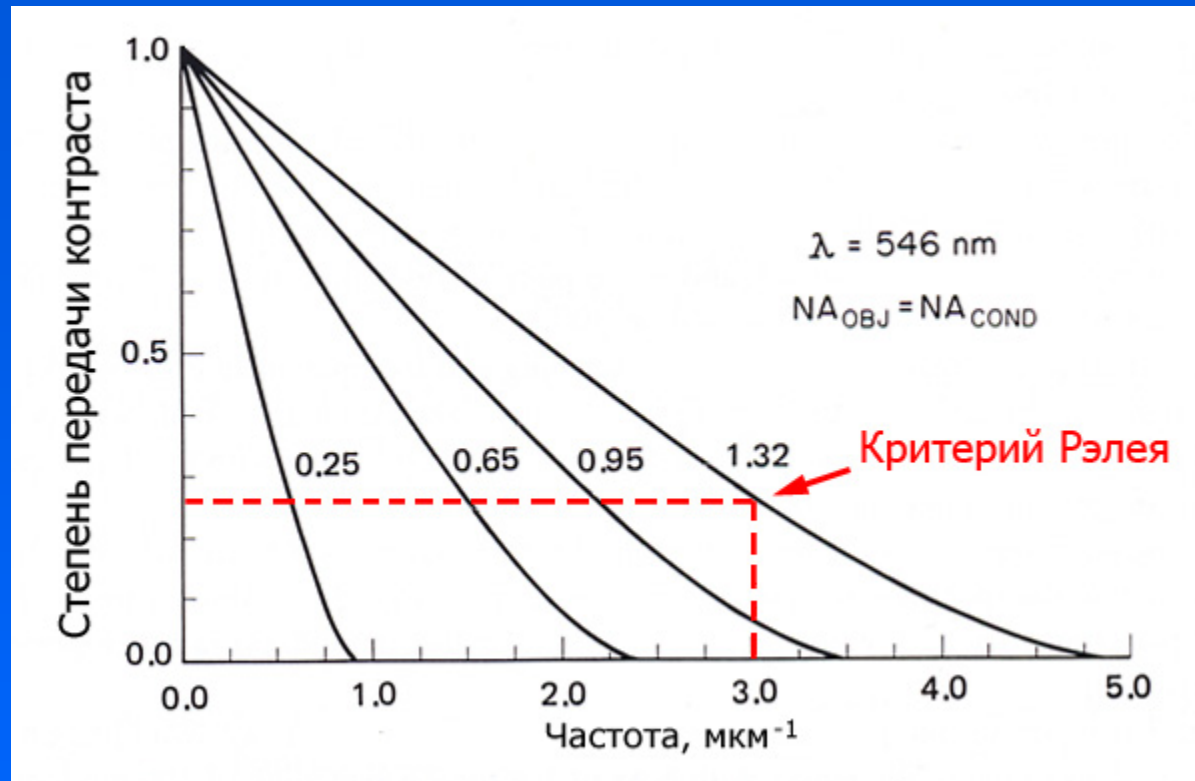
Диски Эри частично  
перекрываются

# Контраст изображения

$$C = \frac{I(s) - I(b)}{I(b)}$$

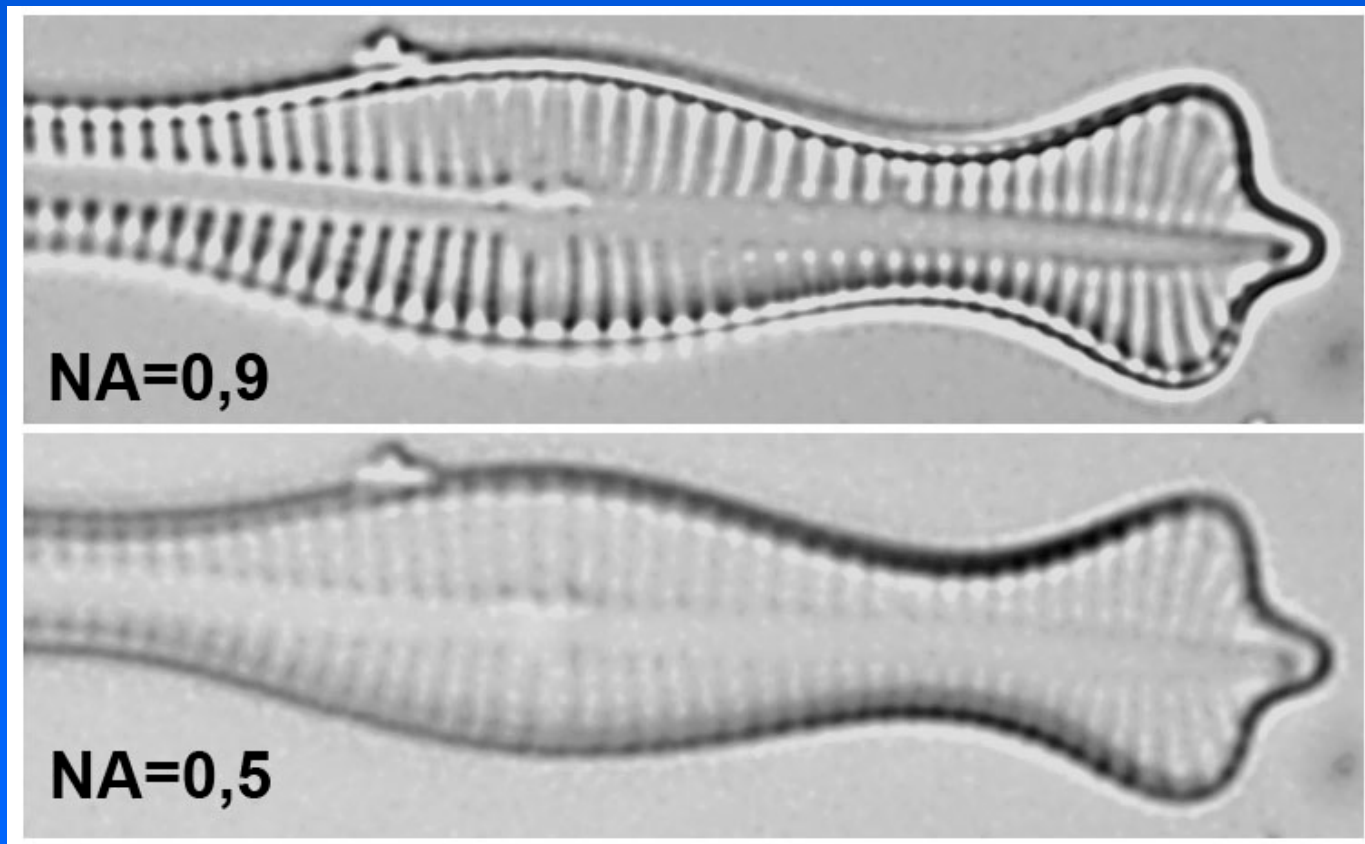


# Функция передачи контраста в микроскопе



Степень контрастности изображения (отношение контраста предмета в контрасту его изображения) быстро убывает с ростом пространственной частоты и зависит от апертуры объектива.

# Контраст зависит от апертуры объектива



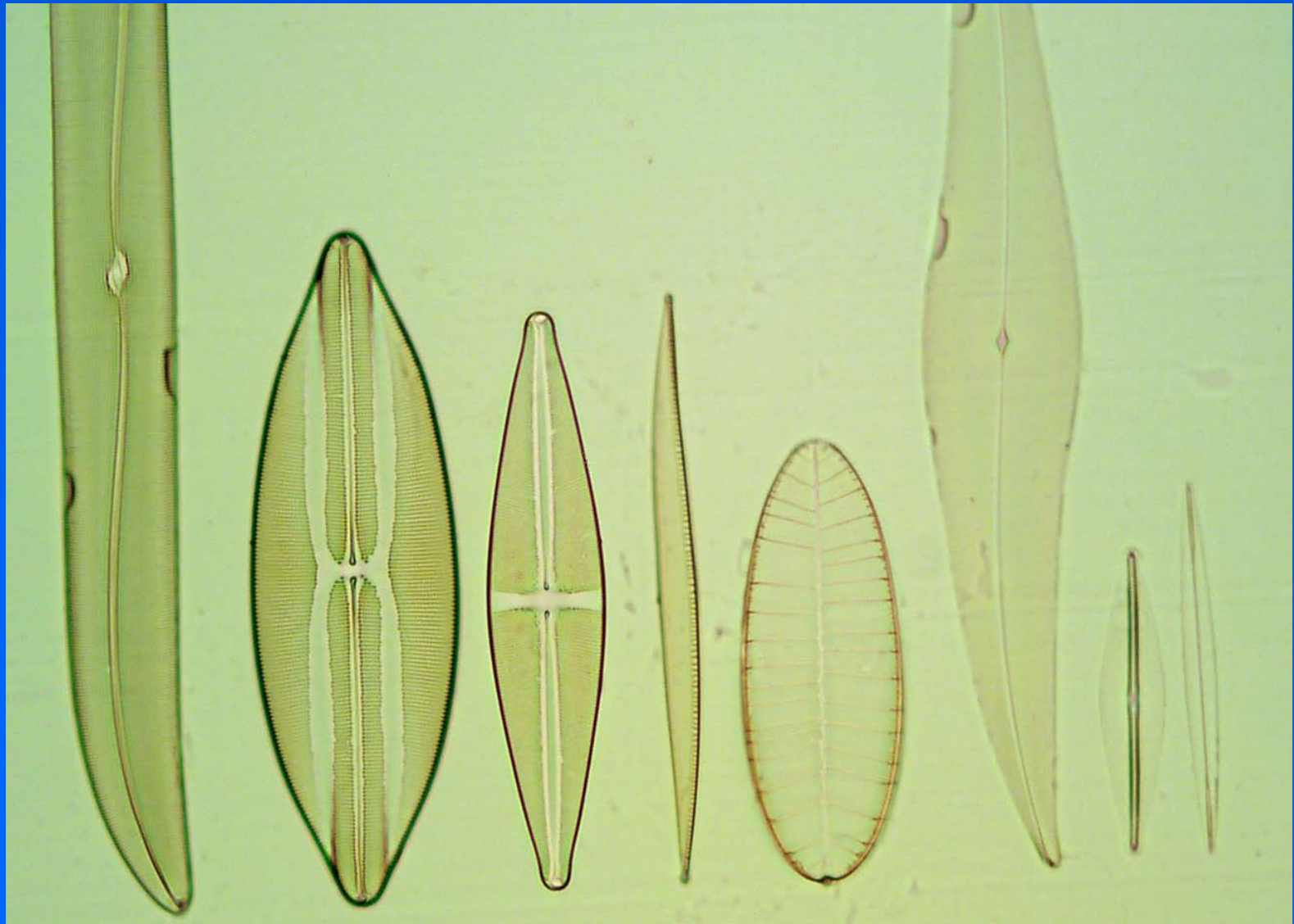
Фотографии диатомовой водоросли *Gomphonema* sp. при разных апертурах объектива (x50)

# Разрешение и функция передачи контраста

Функция передачи контраста (оптическая передаточная функция – ОПФ или optical transfer function – OTF) характеризует изображение предмета как функцию пространственных частот и показывает, как передается гармоническая решетка в плоскость изображения. По мере уменьшения шага решетки контраст ее изображения снижается.

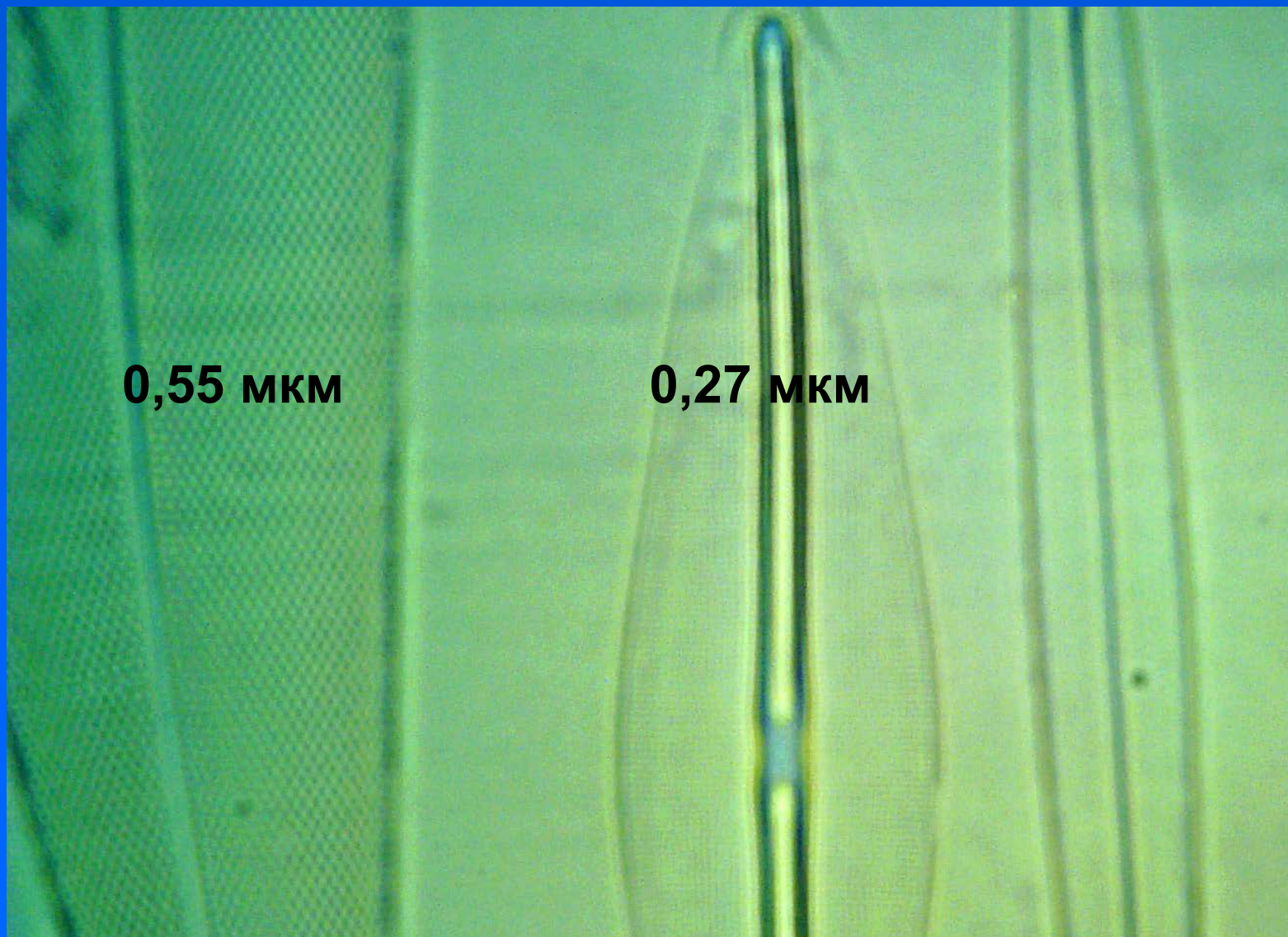
Предел разрешения может быть описан как шаг решетки, когда контраст ее изображения обращается в ноль.

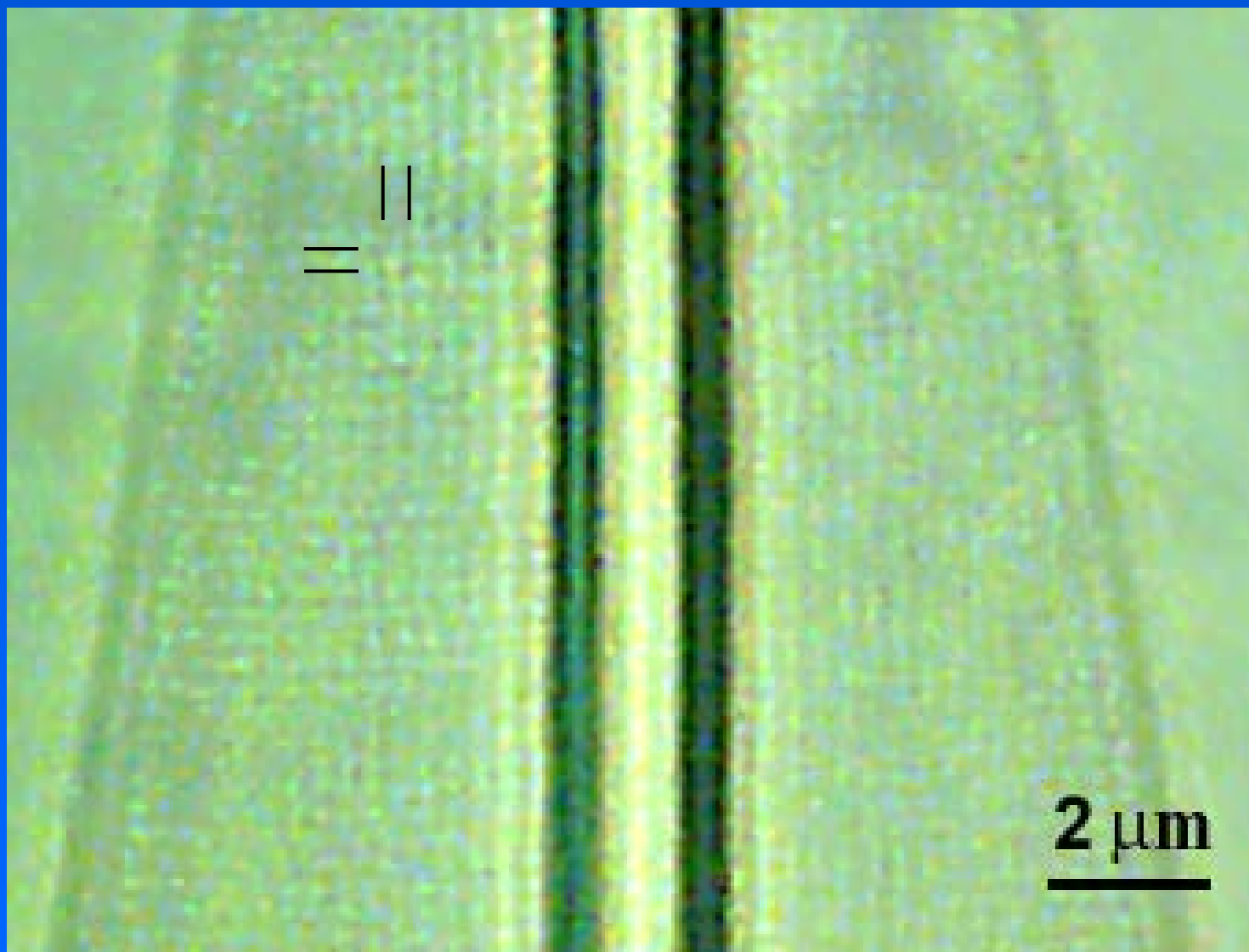
# Диатомовые водоросли, объектив x20





# Диатомовые водоросли





Разрешающая способность системы  $\leq 0.27$  мкм

# Ограничение разрешающей способности объектива (лупы)

Полезное увеличение лупы ограничено кружком нерезкости, который обусловлен ее аберрациями.

Величина кружка нерезкости зависит от размеров входного и выходного зрачков оптической системы.

В сложной оптической системе размеры кружка нерезкости могут быть уменьшены по сравнению с простой лупой путем комбинирования линз из различных сортов стекла.

Два подхода к борьбе с аберрациями: устранение их в широком пространстве изображений (фотообъектив) или в одной плоскости (объектив микроскопа).

Для объектива микроскопа существует одна плоскость в пространстве предметов, перпендикулярная главной оптической оси, когда аберрации в пространстве изображений данной плоскости минимальны (апланатическая точка).

# Аберрации

Аберрации – отклонения хода лучей от идеального, обусловленные несовершенством сферической линзы. Зеркала (например, параболическое зеркало) могут быть свободны от аберраций, и поэтому получили распространение в астрономии, но их трудно использовать в микроскопии. Сферические зеркала также имеют аберрации, обусловленные их формой.

## Причины аберраций:

Отклонение лучей, участвующих в построении изображения, от главной оптической оси линзы на значительный угол (сферические аберрации).

Зависимость оптических свойств стекла от длины световых волн (хроматические аберрации).

# Типы аберраций

Для устранения аберраций в сложных оптических системах был создан специальный математический аппарат. В нем аберрации классифицируются, и для минимизации их проводятся расчеты по сложной системе уравнений. Эта система уравнений не дает возможности свести аберрации к нулю, но позволяет в определенных пределах уменьшить суммарную аберрацию сложной оптической системы для определенной области пространства изображений, используя набор линз с различными свойствами.

Расчеты величин аберраций производятся приближенно (численными методами) для выбранных лучей и длин волн.

Аберрации монохроматического света:

поперечная – лучевая

продольная – волновая.

Для смешанного света дополнительно появляются хроматические аберрации (также поперечные и продольные).

# Классификация аберраций (Зайделя)

Сферическая

Кома (косого света)

Дисторсия

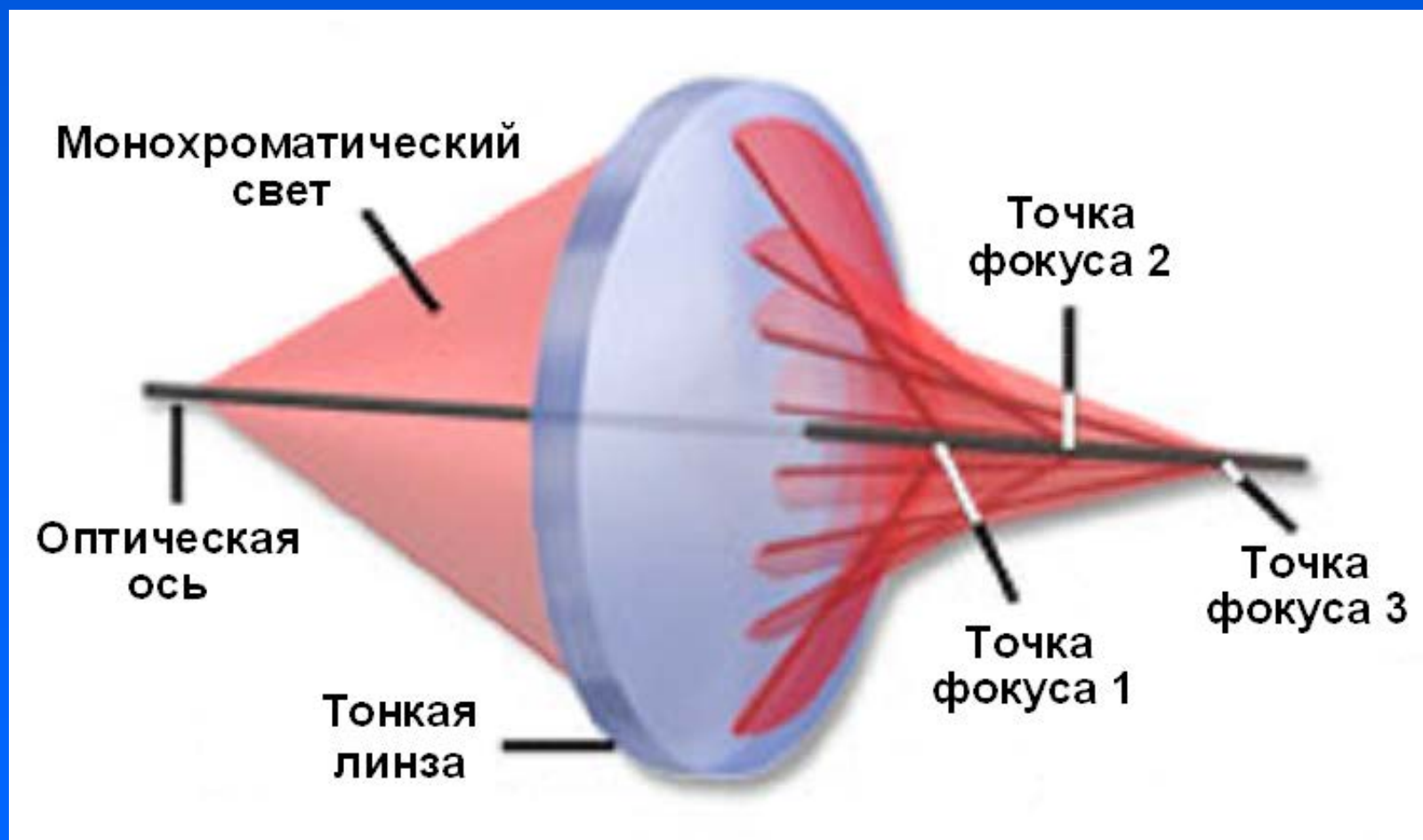
Астигматизм

Сферичность поля зрения

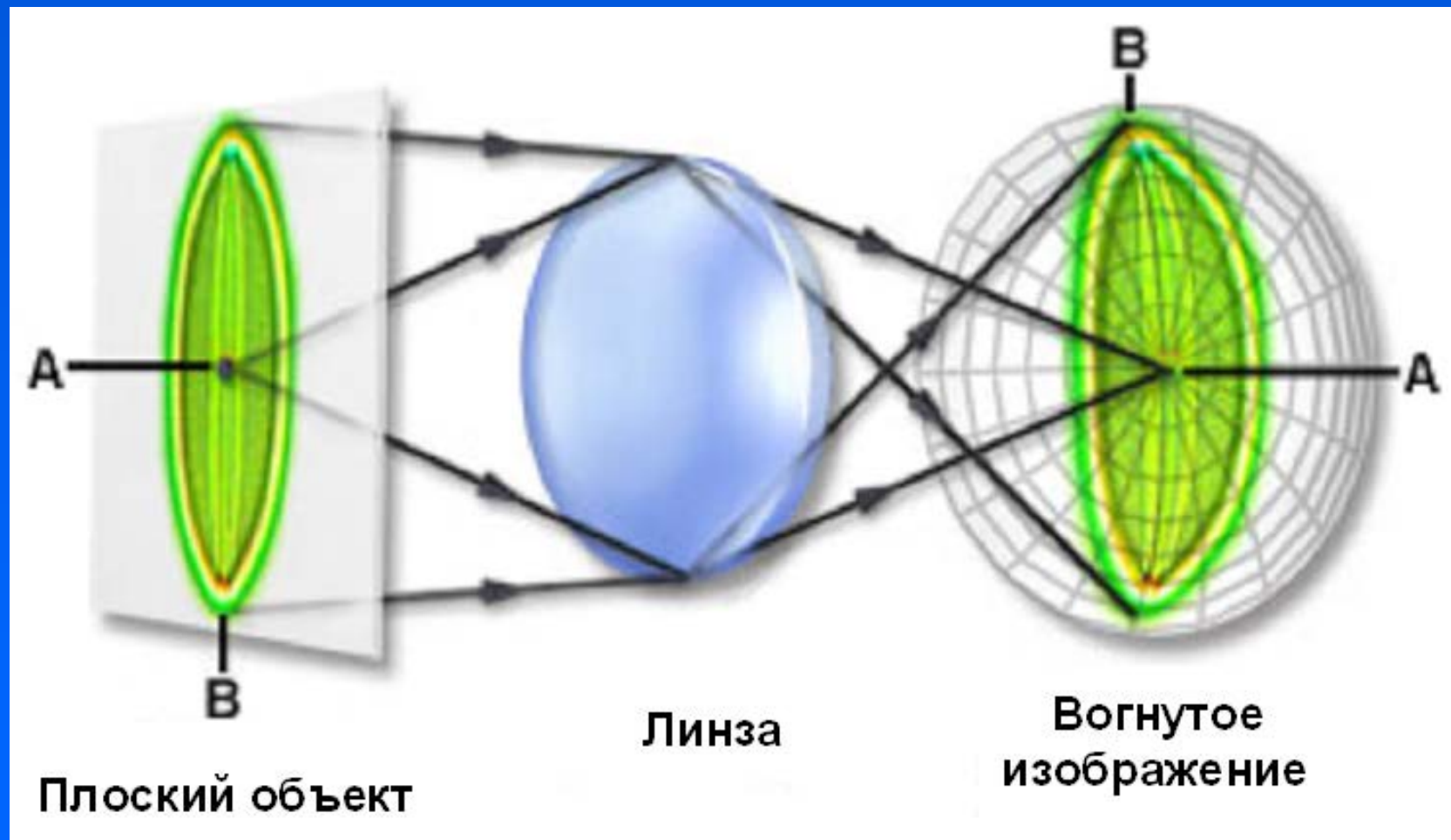
Хроматическая (продольная)

Хроматическая разность увеличений  
(поперечная)

# Сферическая абберрация

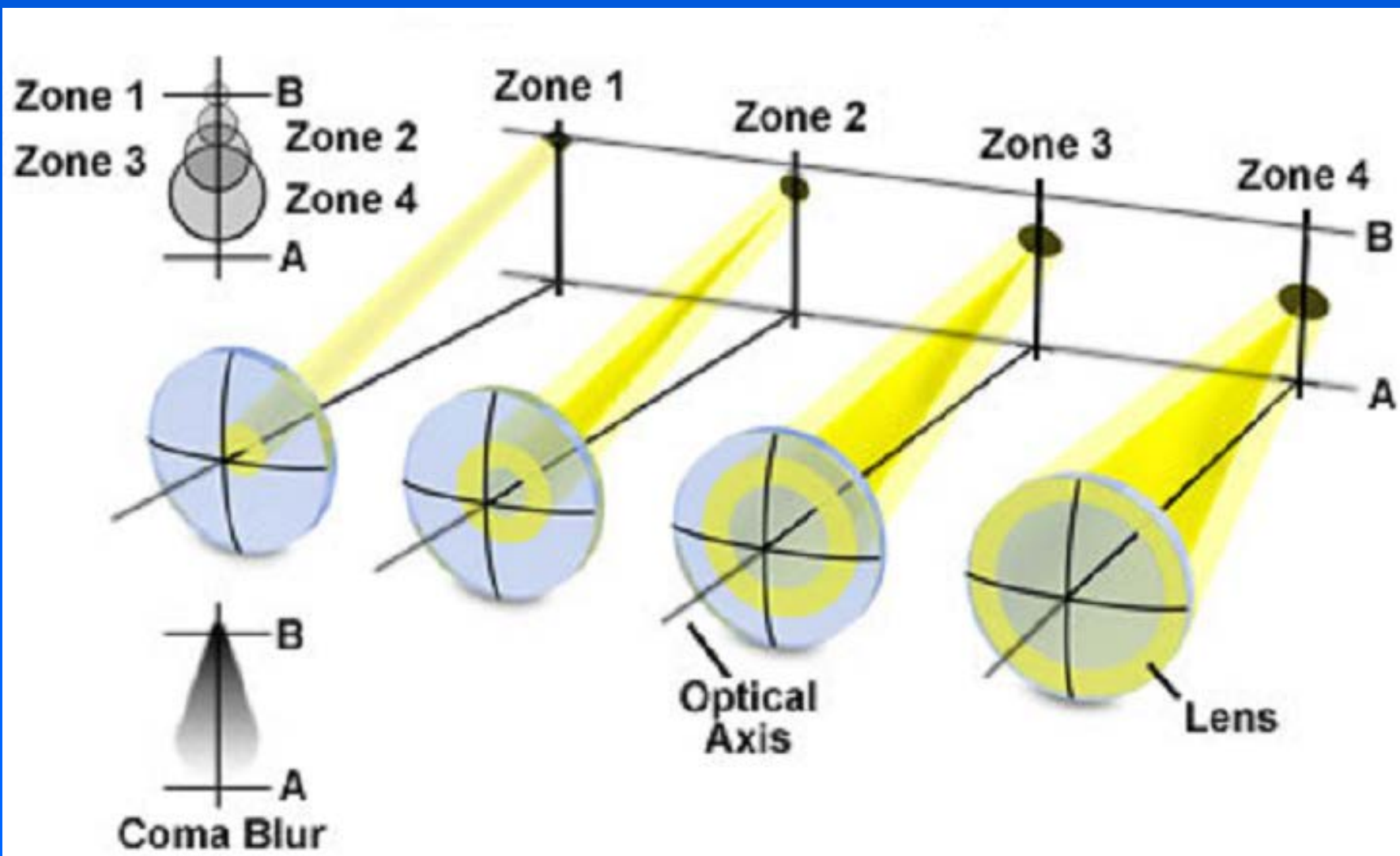


# Сферичность поля зрения

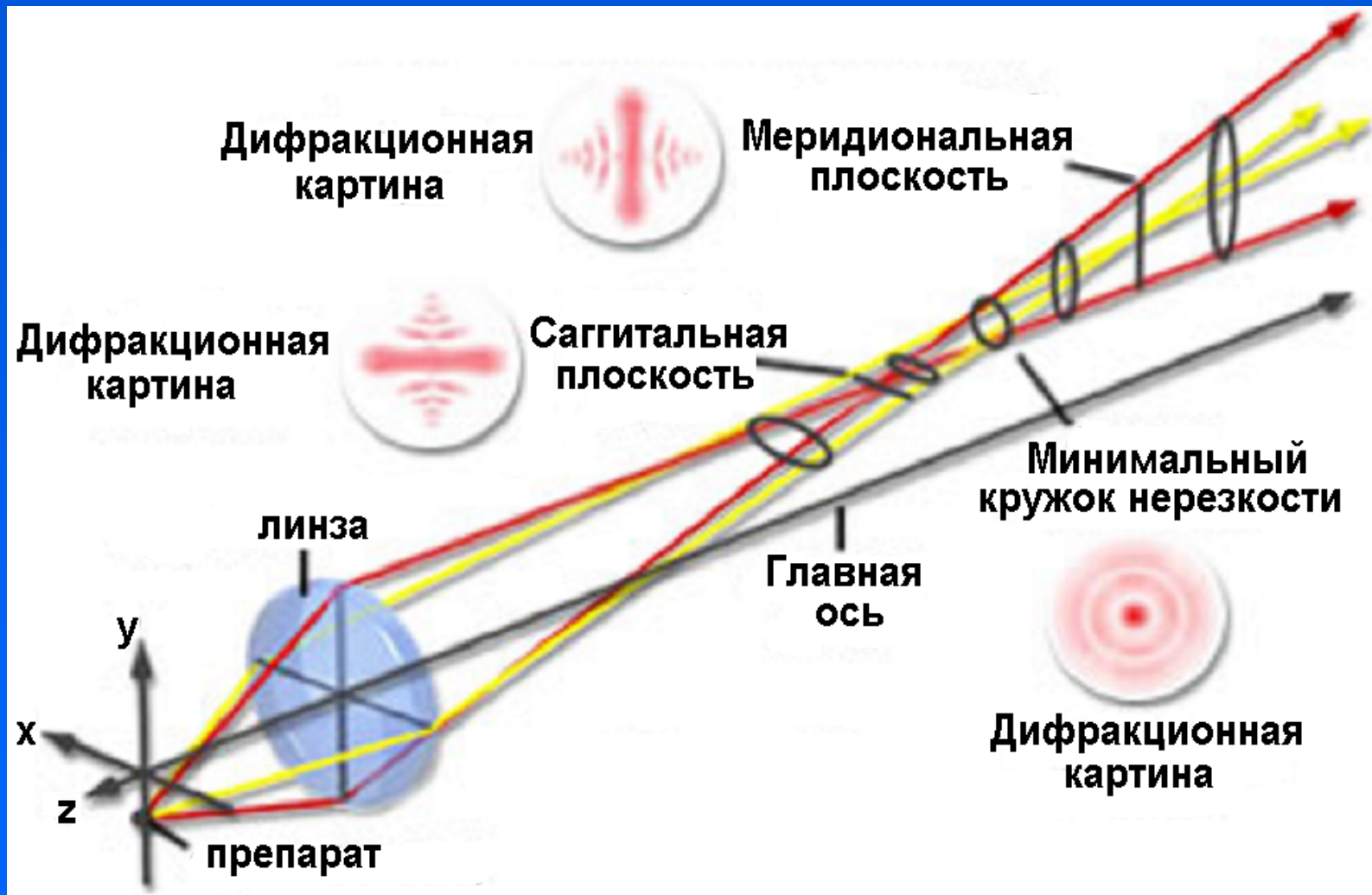




# Кома косо́го света

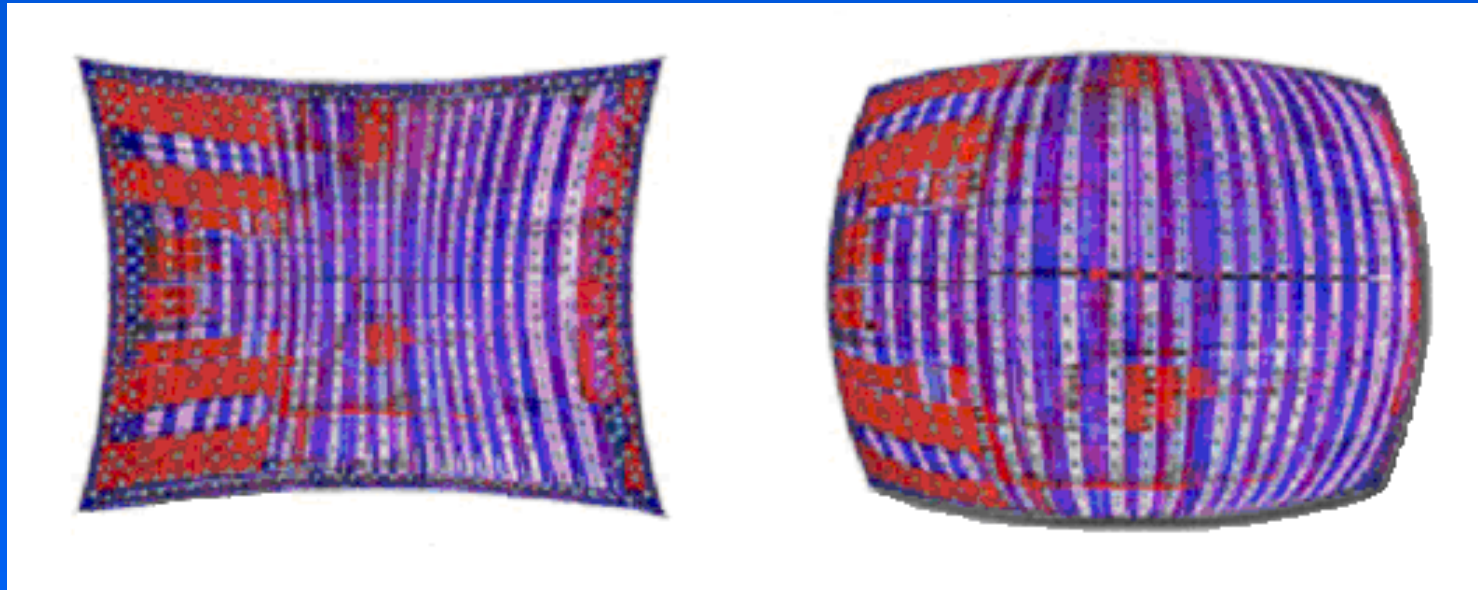


# Астигматизм



**Разность увеличений по двум осям – отклонение от сферической формы**

# Дисторсия



**положительная**

**отрицательная**

**Дисторсия означает переменное увеличение в пределах поля зрения. Положительная – увеличение растёт по мере удаления от главной оптической оси.**

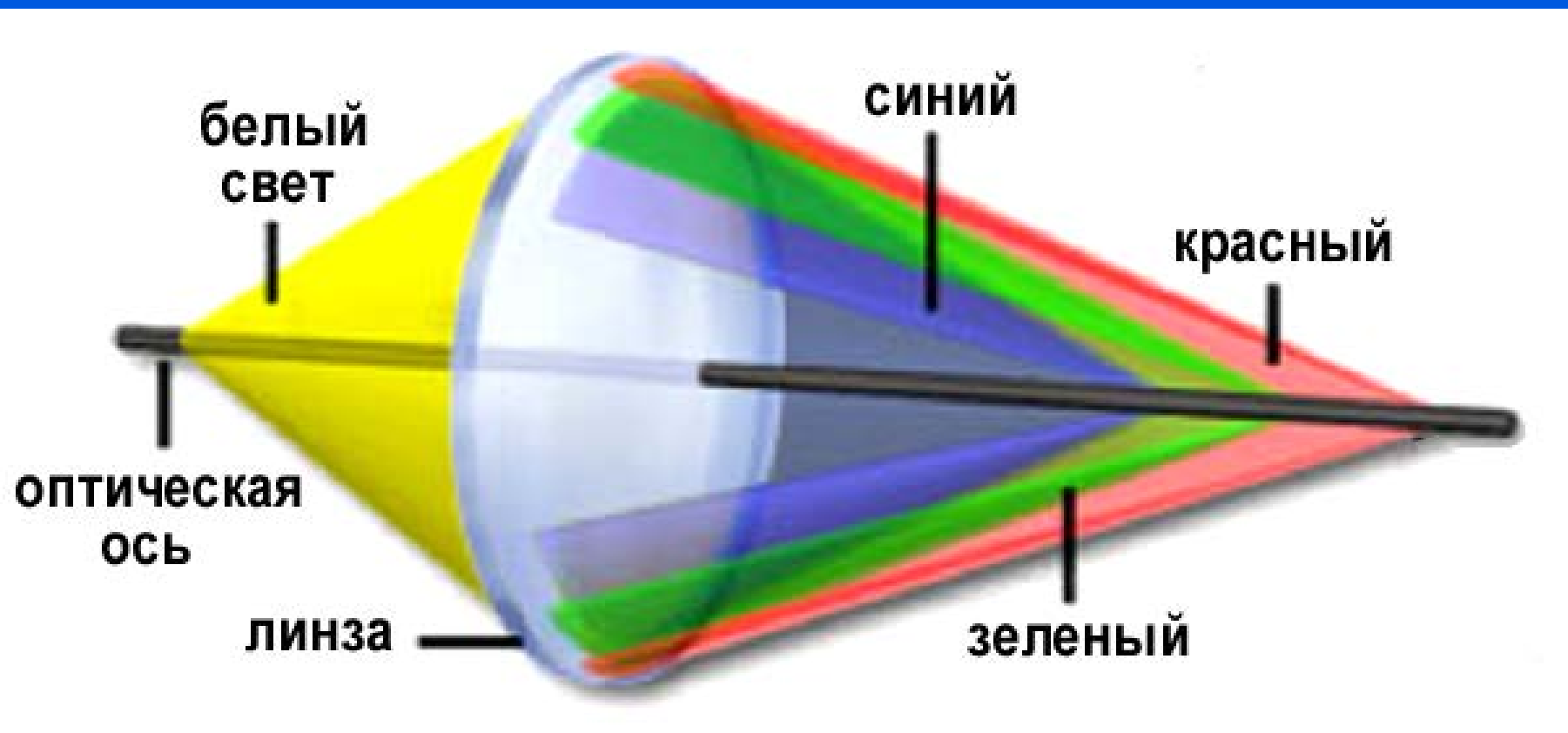
# Устранение (компенсация) аберраций

Устранение аберраций может производиться для определенной длины волны (сферические аберрации), а также одновременно для нескольких длин волн (хроматические аберрации).

Минимизация всех аберраций в объективе микроскопа достигается для небольшой окрестности так называемой апланатической точки, располагающейся вблизи фокуса на главной оптической оси системы.

Если объект располагается на удалении от апланатической точки, то аберрации оптической системы быстро возрастают.

# Хроматическая aberrация (продольная)



# Дисперсия стекла

Зависимость показателя преломления  
стекла от длины волны – дисперсия.

Число Аббе:

$$v = (n_d - 1) / (n_f - n_c),$$

где d, f и c – линии в спектре натрия с  
длиной волны 587.6, 486.1, и 656.3 нм,

соответственно.

# Сорта оптического стекла

С различными показателями преломления и дисперсии:

крон (легкое,  $n < 1,7$ ; число Аббе более 50),

флинт (тяжелое,  $n > 1,8$ , содержит  $PbO$ ; число Аббе менее 50),

флюорит ( $CaF_2$ ;  $n \sim 1,5$ ; число Аббе менее 50)

Применение флюоритового стекла позволяет значительно уменьшить остаточные хроматические aberrации, используя небольшое число линз.

# Конструирование объектива из пар сферических линз

Для пары склеенных тонких линз фокусное расстояние системы  $f$  определяется по формуле:

$$1/f = 1/f_1 + 1/f_2$$

Для пары положительных линз оно составляет:

$$f = f_1 * f_2 / (f_1 + f_2)$$

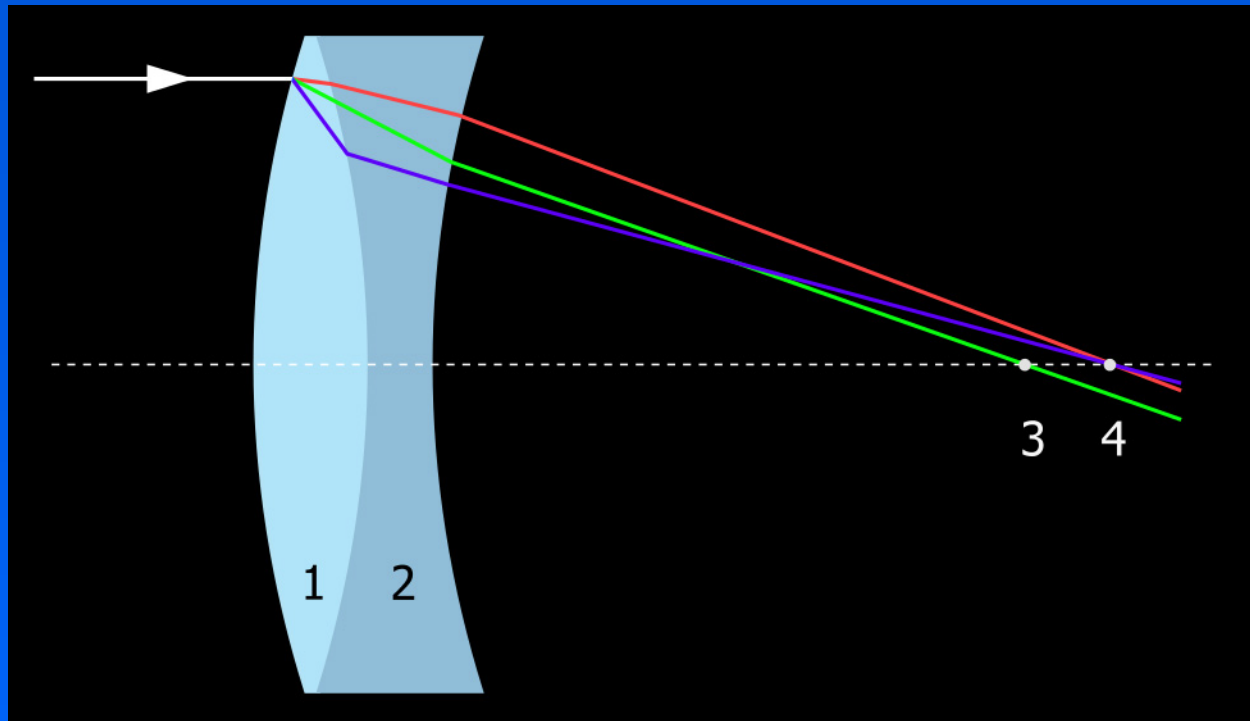
Для пары из положительной и отрицательной линз оно составляет:

$$f = f_1 * f_2 / (f_1 - f_2).$$

Таким образом, суммарное увеличение пары меньше, чем исходной линзы, но не равно нулю, если их фокусные расстояния различаются.



# Ахроматическая система



Ахроматическая пара состоит из склеенных линз с различными показателями дисперсии (крон/флинт – 1 и 2).

Ахроматическая пара линз позволяет значительно уменьшить хроматическую aberrацию, за счет сведения точек пересечения для синего и красного лучей (4).

# Ахроматическая система

Условие ахроматизма для пары сферических линз:

$$v_1 f_1 + v_2 f_2 = 0 \quad (1)$$

При различной дисперсии ( $v_2 > v_1$ ) из уравнения (1) следует, что,

$$|f_2| < |f_1|$$

То есть для пары линз (собирающая,  $f_1 > 0$  и рассеивающая,  $f_2 < 0$ )

$1/f = 1/f_1 + 1/f_2 > 0$ , и они дают в сумме положительное увеличение

# Ахроматический объектив

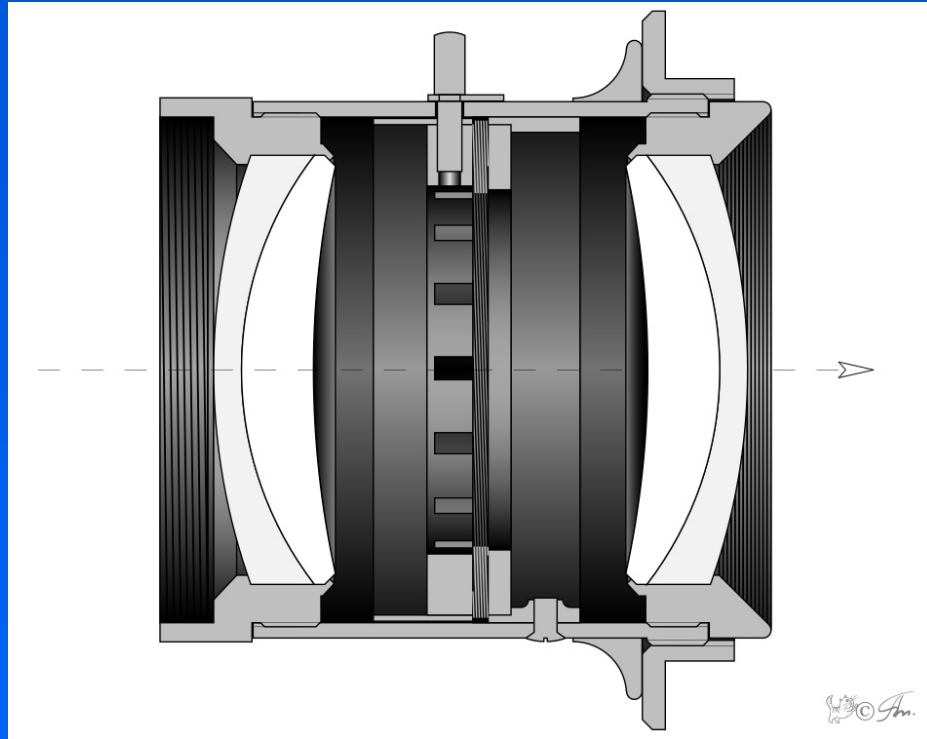
Простейший ахромат (малое увеличение) – две ахроматических пары линз (x8, x10).

Для получения большого увеличения (свыше x16), этой системы недостаточно.

Для исправления aberrаций при создании объектива большого увеличения рассчитывается более сложная система, состоящая из полусферической фронтальной линзы и нескольких менисковых линз, последовательно исправляющих ее aberrации.

В задней части объектива для достижения большого увеличения (то есть малого фокусного расстояния всей системы) и устранения хроматических aberrаций дополнительно располагается одна или две ахроматических пары линз.

# Апланатическая система



**Апланатический объектив, состоящий из двух пар ахроматических линз, позволяет значительно уменьшить хроматическую aberrацию, сферическую aberrацию и кому.**

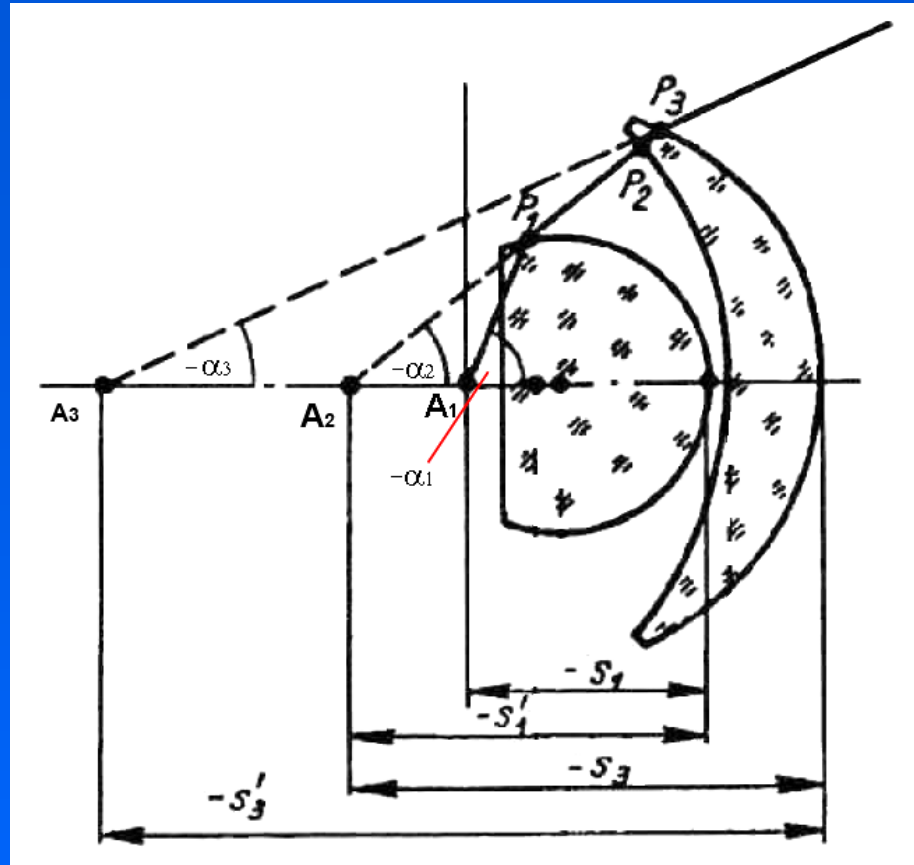
# Апланатическая система

Важным элементом в практической оптике являются так называемые апланатические системы, в которых законы геометрической оптики удаётся совместить с выполнением условия синусов для элемента поверхности в окрестности одной точки на оси системы (телескоп) или для пары сопряжённых поверхностей (микроскоп).

Апланатические системы изображают без аберраций широким пучком лучей окрестность такой точки. Примером апланатической системы является сфера с коэффициентом преломления  $n$  и радиусом  $R$ . Точки, лежащие на сферах радиусов  $nR$  и  $R/n$ , изображаются друг в друга без аберраций. Точки поверхности с радиусом  $nR$  мнимые, т.е. в них пересекаются не лучи, а их продолжения.

Апланатические свойства сферы используются при конструировании объективов микроскопов (фронтальная линза объективов с большим увеличением представляет собой полусферу), где существенна большая апертура пучков, а положение предмета может быть фиксировано.

# Апланатический объектив Амичи

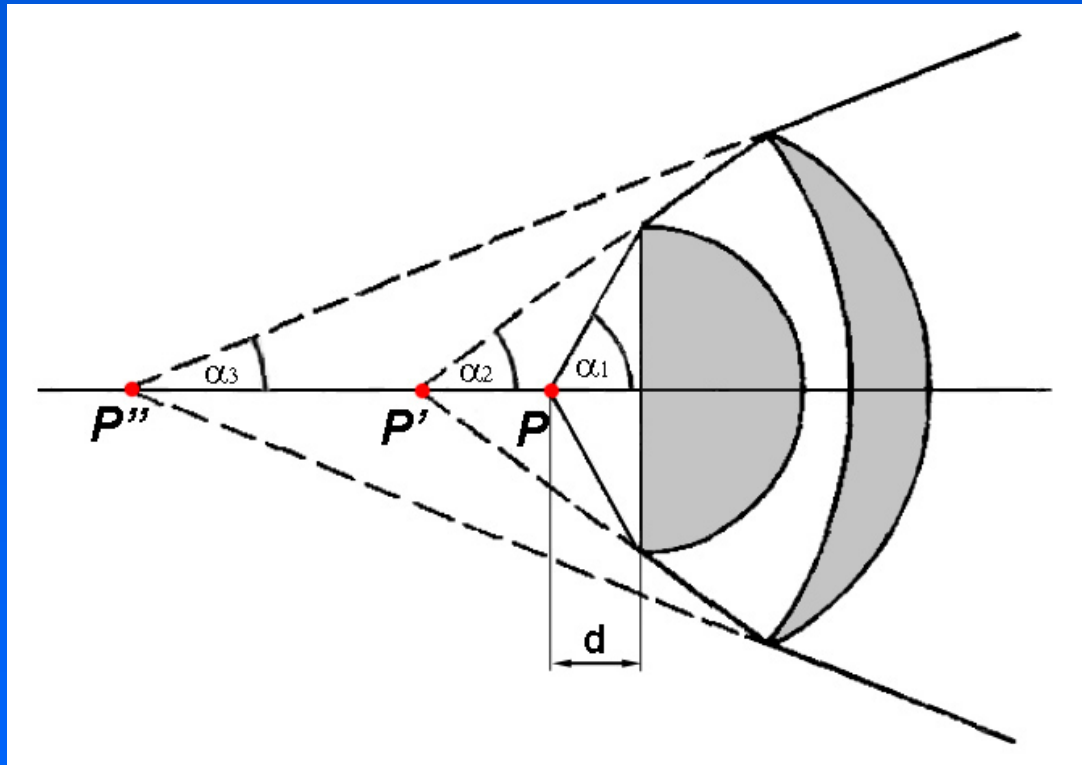


Препарат располагается в передней апланатической точке (A1) полусферической фронтальной линзы на расстоянии  $d=R/n$  от ее плоской поверхности. Между препаратом и линзой находится иммерсионная жидкость. Первая поверхность преломления (P1) – задняя поверхность сферической линзы.

Вторая и третья поверхности преломления – на менисковой линзе.

В результате кажущееся положение предмета (A2 – A3) удаляется, и мы уменьшаем угол наблюдения предмета, что позволяет приблизиться к выполнению условия синусов.

# Апланатический объектив большого увеличения



Препарат располагается в передней апланатической точке ( $P$ ) полусферической фронтальной линзы на расстоянии  $d=R/n$  от ее плоской поверхности.

$R$  – радиус линзы,  $n$  – показатель преломления стекла.

Расходящийся пучок света от фронтальной линзы дополнительно собирается менисковой линзой.

$P'$  – кажущееся положение объекта для сферической линзы;  $P''$  – кажущееся положение объекта для пары сферической и менисковой линз.

# Исправление аберраций объектива

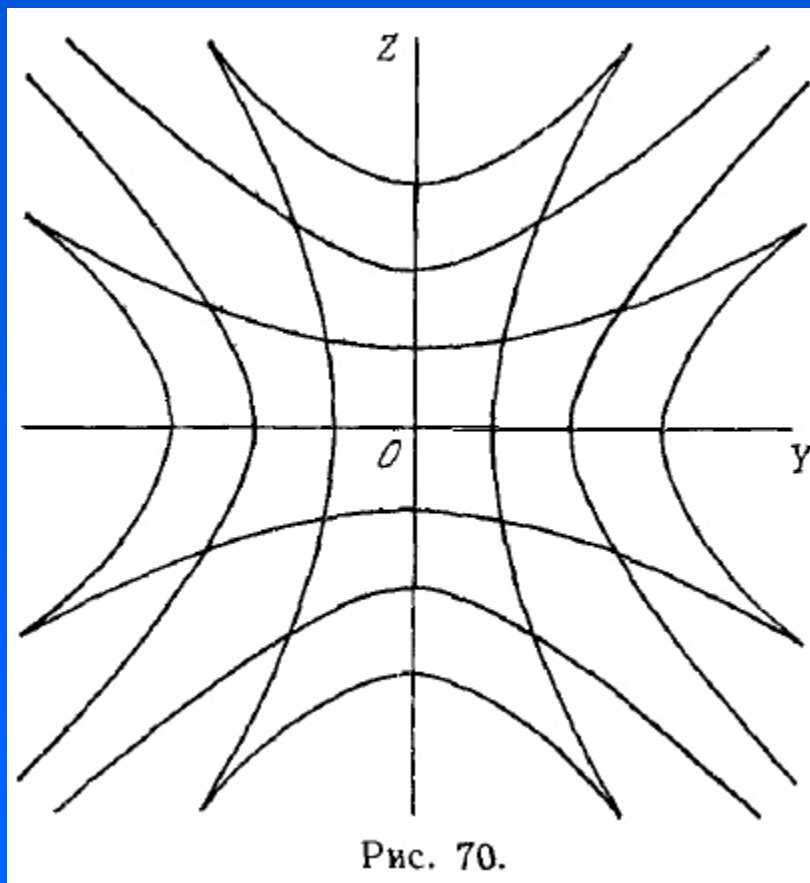
Полное исправление сферических аберраций объектива – расчетный размер кружка нерезкости меньше дифракционного предела (половины диска Эри).

Полным исправление хроматических аберраций считается тогда, когда величина продольной и поперечной хроматических аберраций для выбранных длин волн (ахромат – две: зеленая и желтая; апохромат – три: синяя, зеленая и красная; суперапохромат – 5: фиолетовая, синяя, зеленая, желтая и дальняя красная) меньше половины минимальной длины волны.

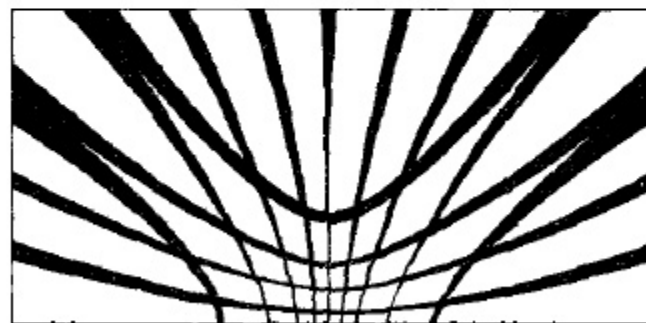
Максимальное исправление аберраций возможно только для одной плоскости, когда объект находится в передней апланатической точке объектива, и оптические среды между препаратом и фронтальной линзой объектива по своим показателям преломления соответствуют расчетным параметрам.



# Тестовые решетки Аббе

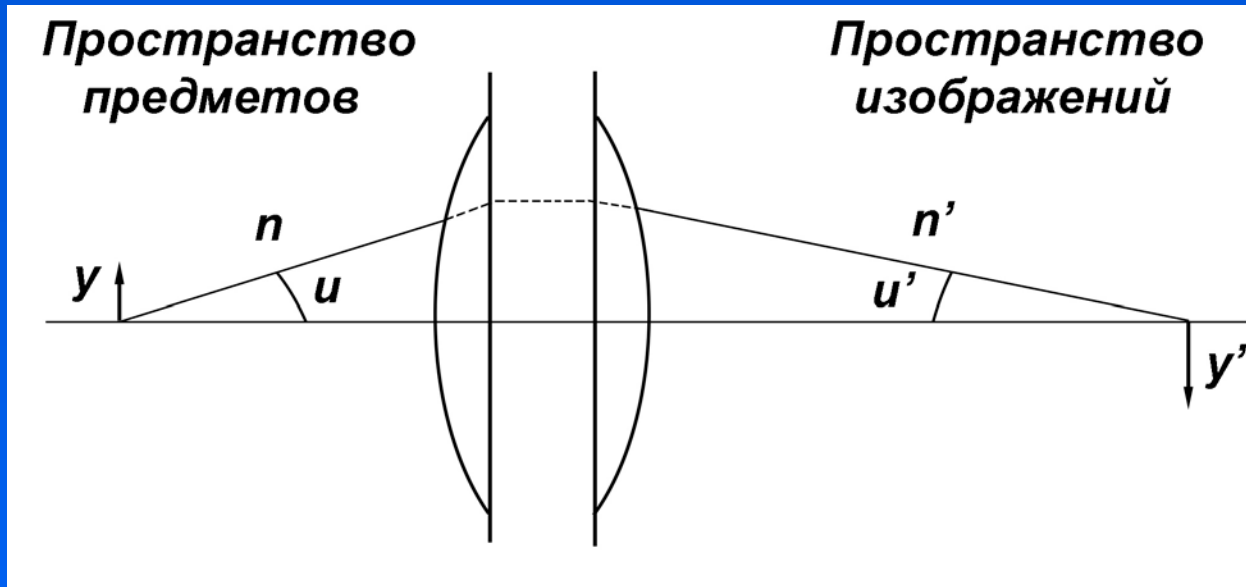


лучать одинаковые приращения. Тогда и приращения параметра  $S$ , как это видно из (18.4), также будут одинаковыми. Следовательно, если рис. 70 поместить на расстоянии  $q$  перед передней апланатической точкой  $P$ , то гиперболы изобразятся в виде квадратной сетки прямых. При  $\omega^2 = 1/2(1 - A^2)$  уравнение (18.2) переходит в



**Решетка располагается вдали от объектива. При выполнении условия синусов, глаз видит ее изображение через диафрагму в виде прямоугольной сетки.**

# Условие синусов Аббе

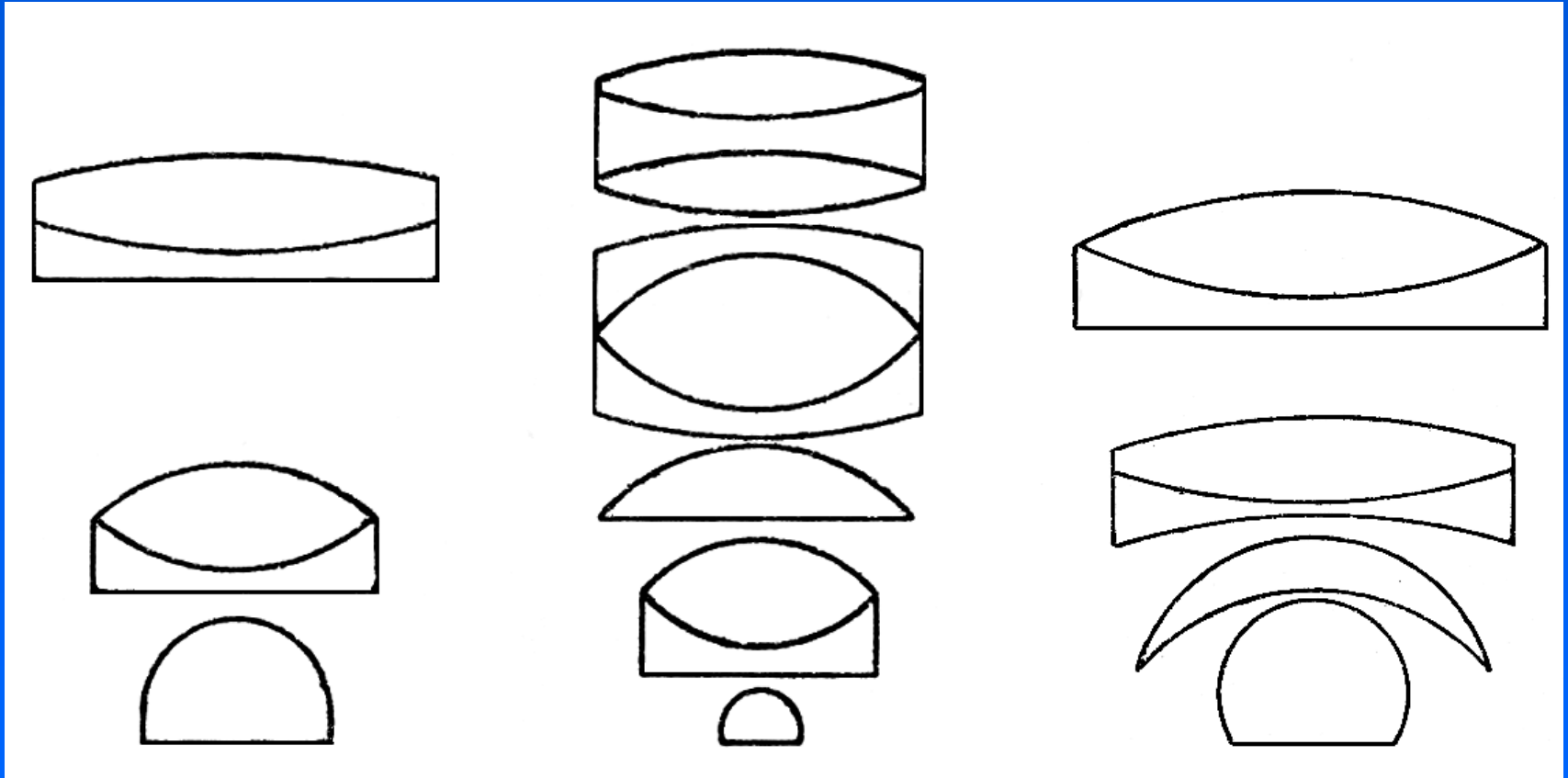


Для получения свободного от аберраций изображения для всех лучей, выходящих из передней апланатической точки на главной оптической оси и направляющихся после преломления в объективе к задней апланатической точке, отношение между синусами углов сопряженных лучей должно быть постоянно:

$$(n * \sin u) : (n' * \sin u') = v$$

где  $n, n'$  – показатели преломления;  $v = \text{const.}$  – увеличение объектива.

# Объективы большого увеличения (разрез)



**Ахромат  
сухой**

**Апохромат  
сухой**

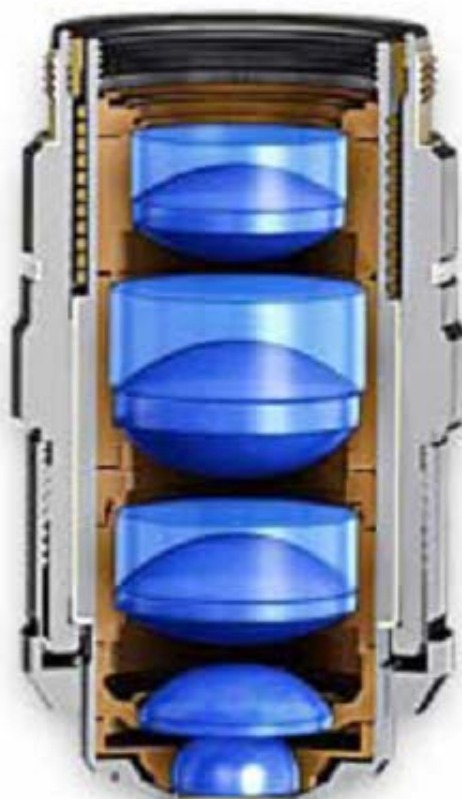
**Иммерсионный  
ахромат**

# Типы объективов

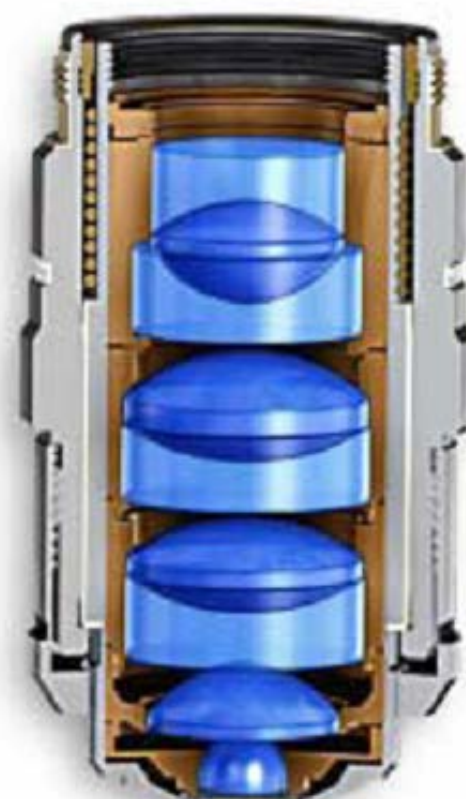
Achromatic Objective



Fluorite Objective



Apochromatic Objective



# Маркировка объектива



# Типы объективов для микроскопа

Ахромат (510-580 нм)

Апохромат (450-660 нм) -- Apo

Флюоритовый объектив -- Fl

Планахромат -- Plan

Планапохромат -- PlanApo

Супер планапохромат – компенсация для 5 точек спектра (от 405 до 700 нм)

Планфлюорит -- PlanFluor

УФ (кварцевый, 280 нм) -- UV

# Микроскопические объективы

Компенсация хроматических aberrаций для апохроматического объектива требует значительного количества промежуточных линз.

Поэтому часто применяются системы так называемых полуапохроматов – объективов, в которых используется флюоритовое стекло.

Флюоритовые объективы имеют большее светопропускание и увеличенный, по сравнению с апохроматами, рабочий отрезок.

# Лекция 4

Характеристики объектива

Типы объективов

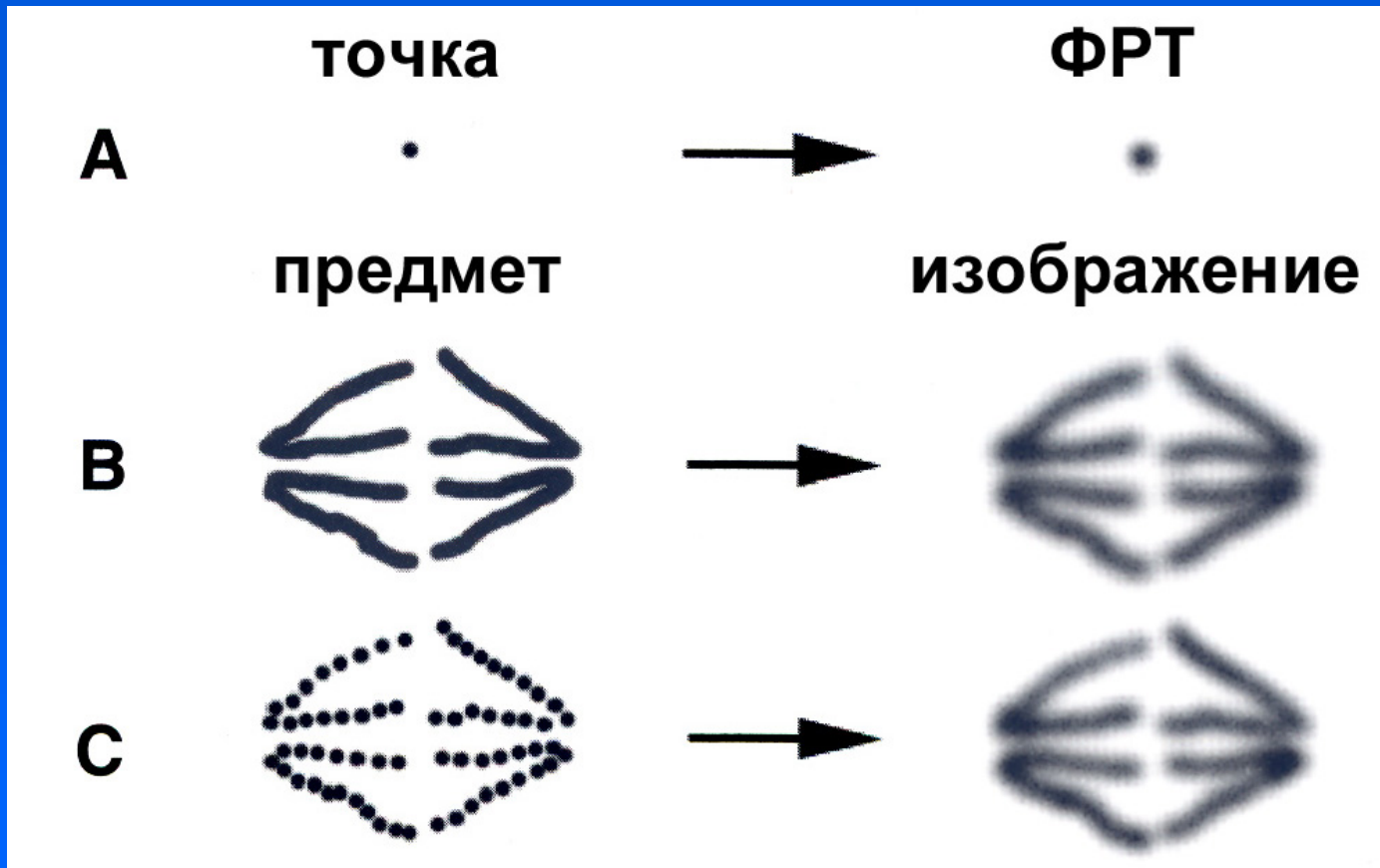
Функция передачи контраста

Глубина поля зрения и понятие резкого изображения

Трехмерное изображение точки

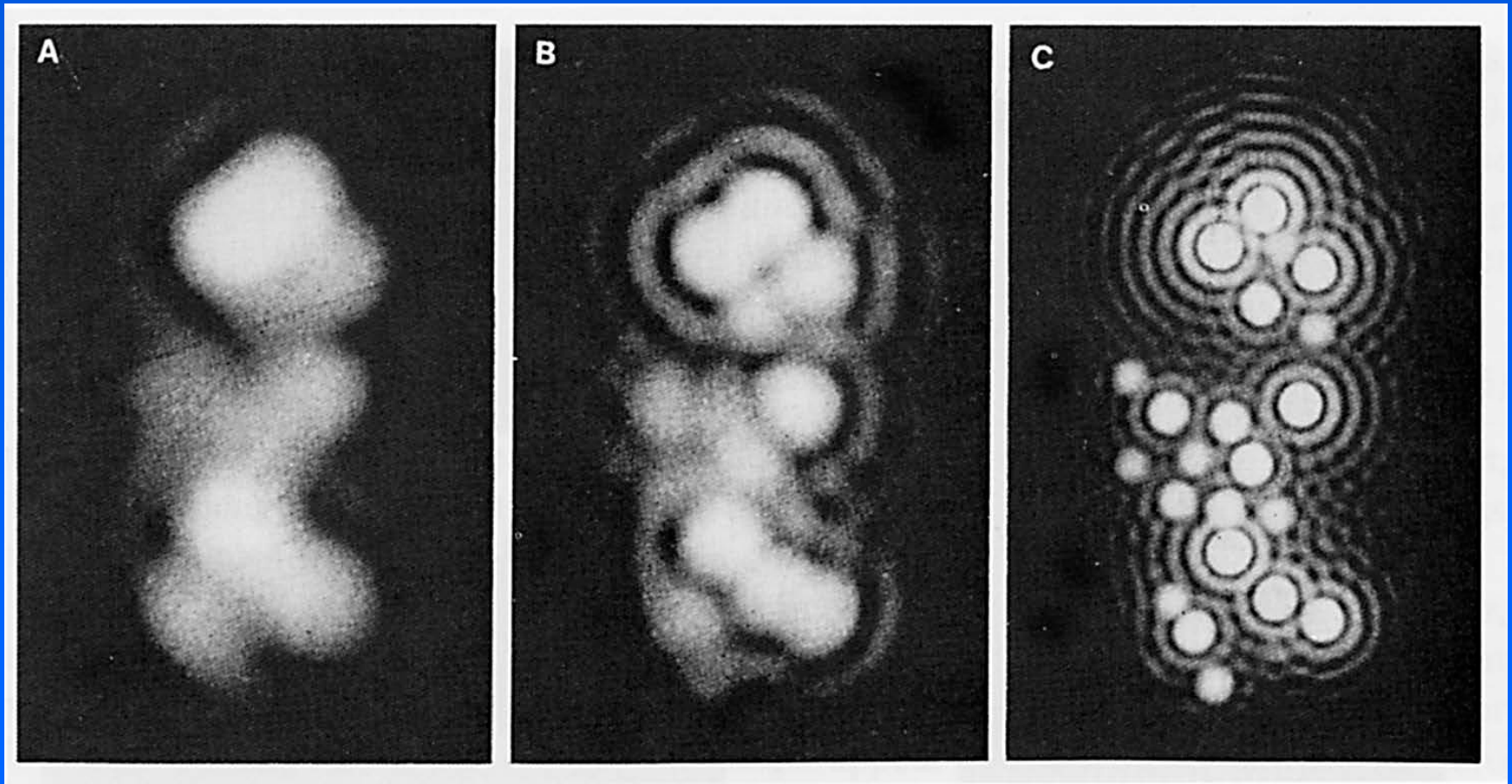


# Влияние ФРТ на изображение в микроскопе

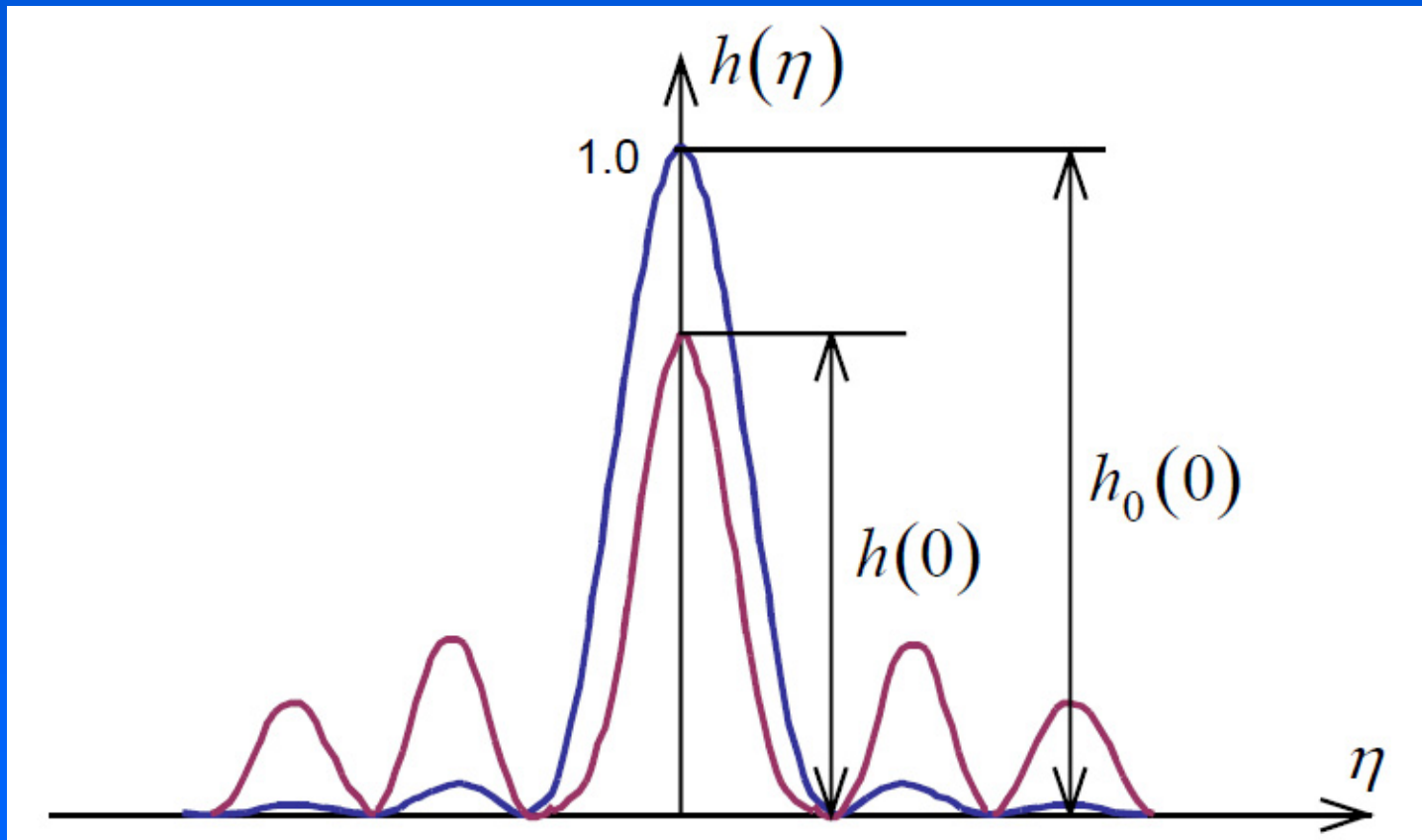


Размытие изображения может создавать псевдоструктуры (изображение объектов В и С не различаются, хотя сами объекты различны).

# Влияние апертуры объектива на изображение малых объектов



# Качество оптической системы

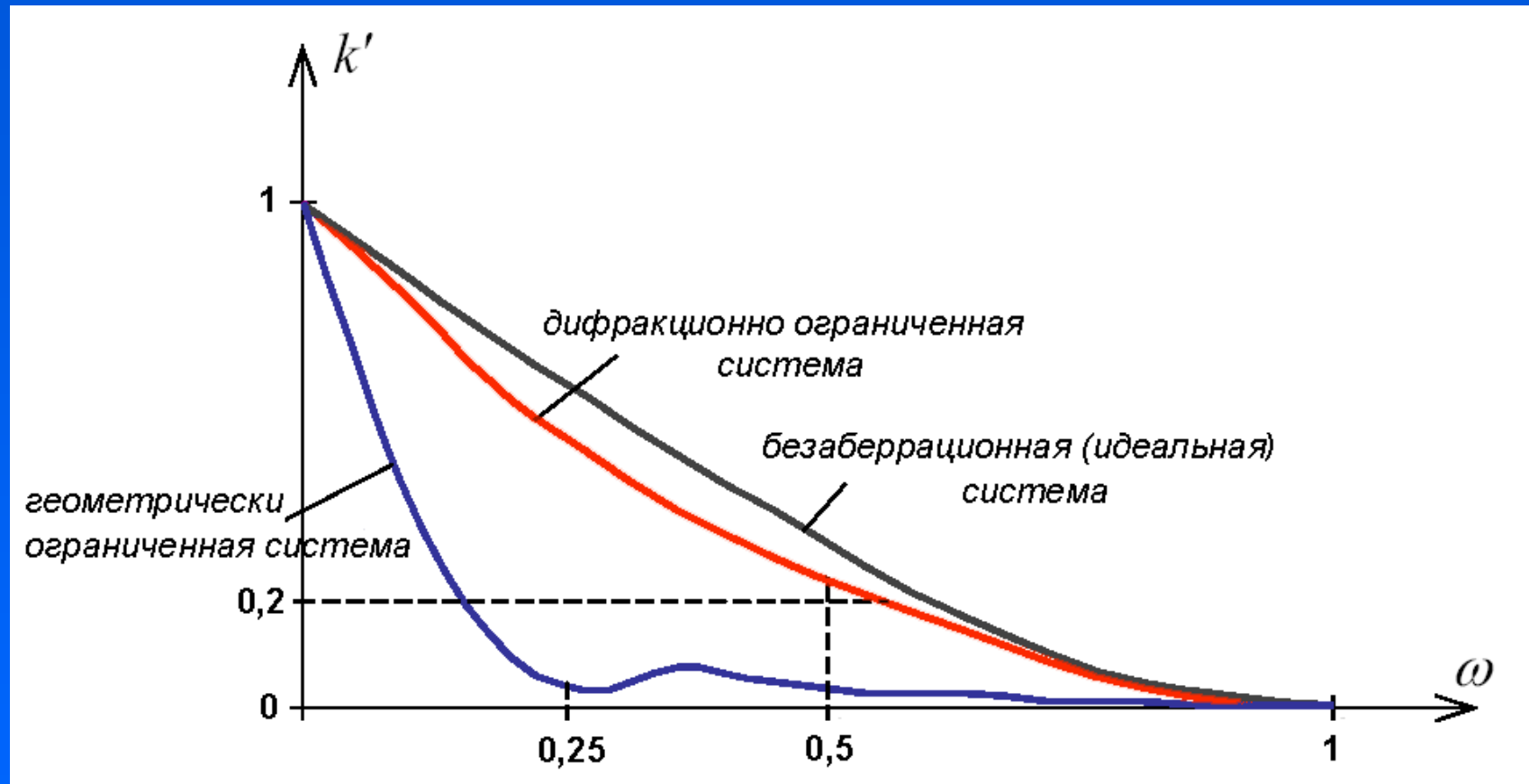


Качество системы характеризуется числом Штреля:

$$St = h(0)/h_0(0).$$

Для объектива микроскопа  $St > 0.8$

# Функция передачи контраста в оптической системе



**Степень контрастности изображения (отношение контраста предмета в контрасту его изображения) быстро убывает с ростом пространственной частоты**

# Разрешающая способность объектива микроскопа

Критерий Рэля :  $R = 0,61 \lambda / \sin \alpha$

Критерий Аббе :  $R = 0,5 \lambda / \sin \alpha$

Критерий Sparrow :  $R = 0,47 \lambda / \sin \alpha$

где  $R$  – минимальное разрешаемое расстояние,  $\alpha$  – максимальный угол, под которым отклоняющийся от оси свет попадает в линзу.

Различия критериев – в степени контраста изображения, которая считается достаточной. Критерий Рэля – примерно 27,3%, критерий Sparrow – больше 0% (неприменим для визуальных наблюдений).

# Дополнительные характеристики объективов

Высота (современные стандарты – 33 или 45 мм)

Поле зрения ( нормальное – до 18 мм; широкопольные – до 22,5 мм и сверхширокопольные – до 26,5 мм).

Рабочий отрезок – расстояние от наружной оправы до передней апланатической точки (у иммерсионных объективов может быть меньше 0,2 мм).

Наличие ирисовой диафрагмой для уменьшения апертуры.

Наличие оправы для коррекции на толщину покровного стекла (0,11-0,22 мм или 0,8-1,6 мм) – обязательно для водно-иммерсионных объективов.

Наличие коррекционной оправы на различные виды иммерсии (вода-глицерин-иммерсионное масло).

Светопропускание – многие планапохроматы практически не пропускают свет с длиной волны меньше 360 нм.

# Группы объективов для микроскопа

Особо малого увеличения  $\times 0,5$ - $\times 2$

Малого увеличения --  $\times 2,5$ - $\times 10$

Среднего увеличения --  $\times 16$ - $\times 32$

Большого увеличения (сухие) --  $\geq \times 40$

Иммерсионные –  $\times 40$ - $\times 100$

Специальные --  $> \times 100$ .

# Недостатки сухих объективов

Основной недостаток – преломление света, исходящего из препарата на границах раздела фаз (стекло-воздух).

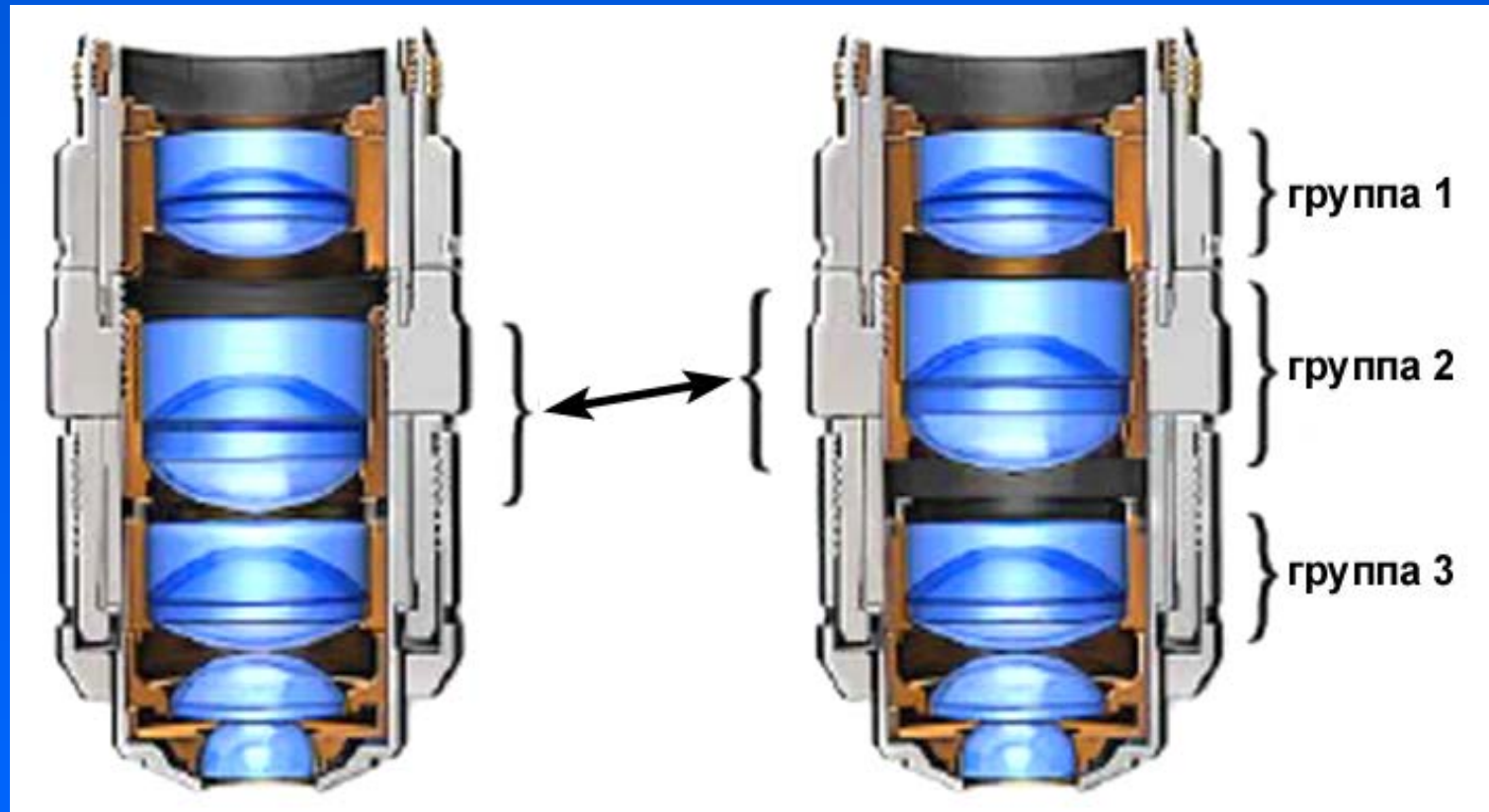
Значительная часть света, падающего на объектив под большим углом, не участвует в построении изображения.

Объективы с большой апертурой ( $>0,6$ ) очень «чувствительны» к толщине покровного стекла. Сухие объективы с апертурой более 0,8 всегда имеют коррекционную оправу.

Маленький рабочий отрезок создает опасность загрязнения фронтальной линзы.

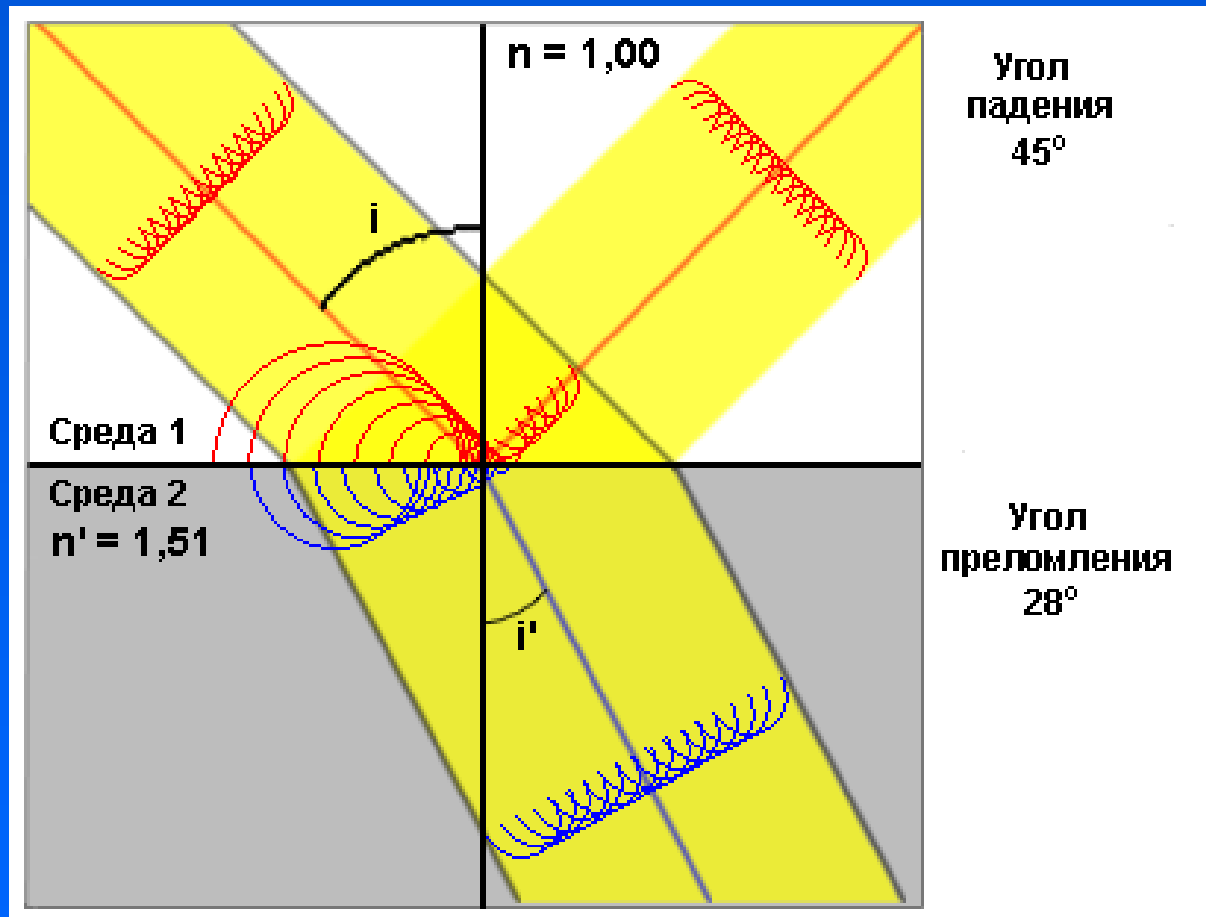


# Корректировка объектива на толщину покровного стекла



Корректировка достигается перемещением центральной группы линз, что позволяет изменить положение передней апланатической точки.

# Преломление света



На границе раздела фаз часть энергии светового пучка отражается. Максимальная апертура сухого объектива ограничивается углом полного внутреннего отражения.

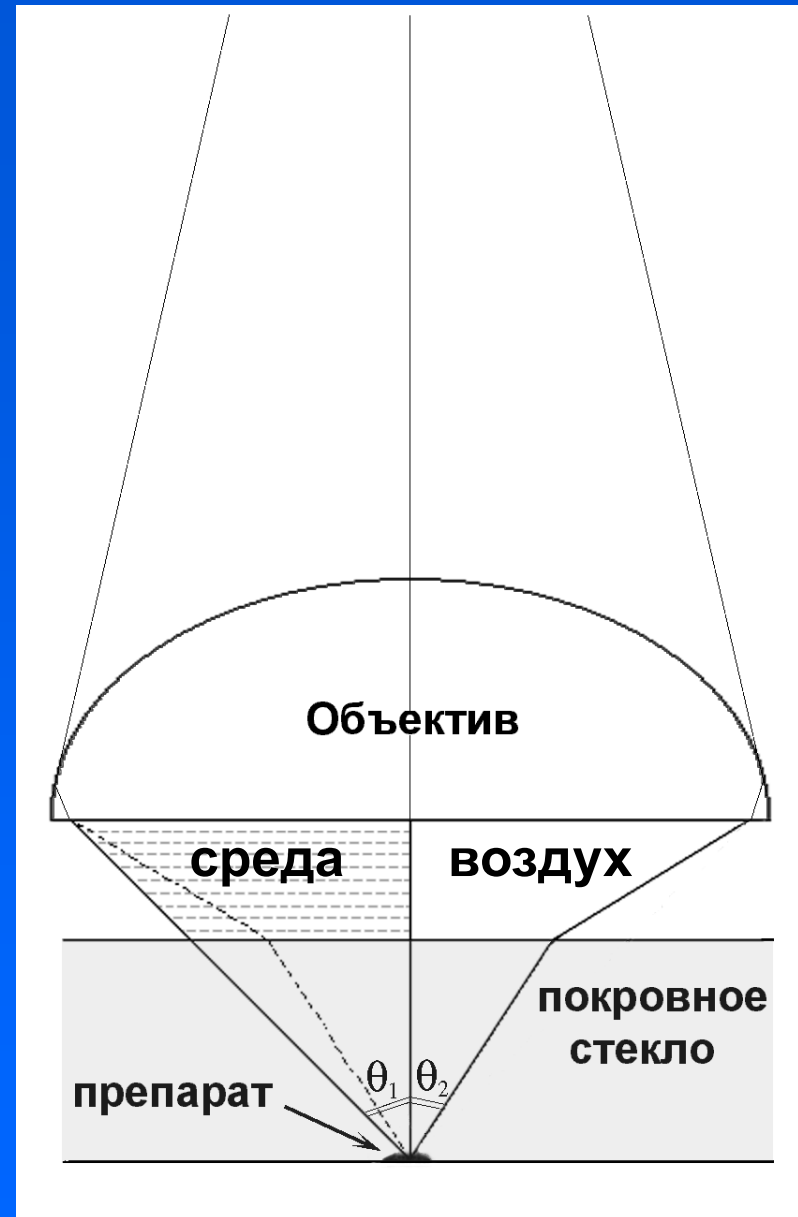
# Применение иммерсии

Иммерсия позволяет уменьшить эффект отражения света на границе раздела фаз.

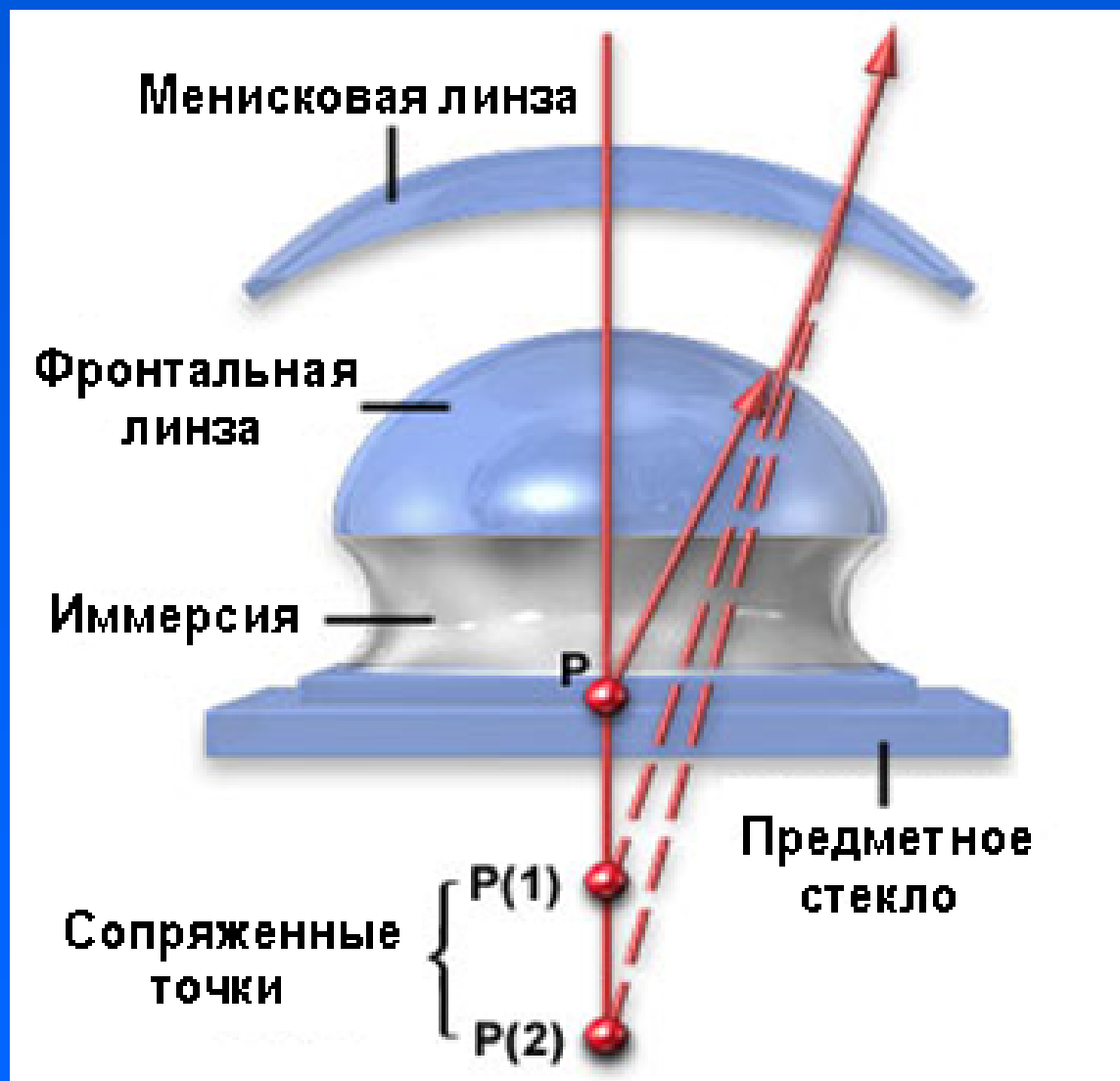
Гомогенная иммерсия позволяет свести этот эффект к нулю.

За счет иммерсии растет эффективная апертура объектива и разрешающая способность микроскопа возрастает в полтора раза.

Иммерсия также увеличивает светособирающую силу объектива.



# Ход лучей в иммерсионном объективе



# Типы иммерсии

Водная –  $n=1,333$  ( $NA \leq 1,25$ )

Глицериновая –  $n=1,470$  ( $NA \leq 1,25$ )

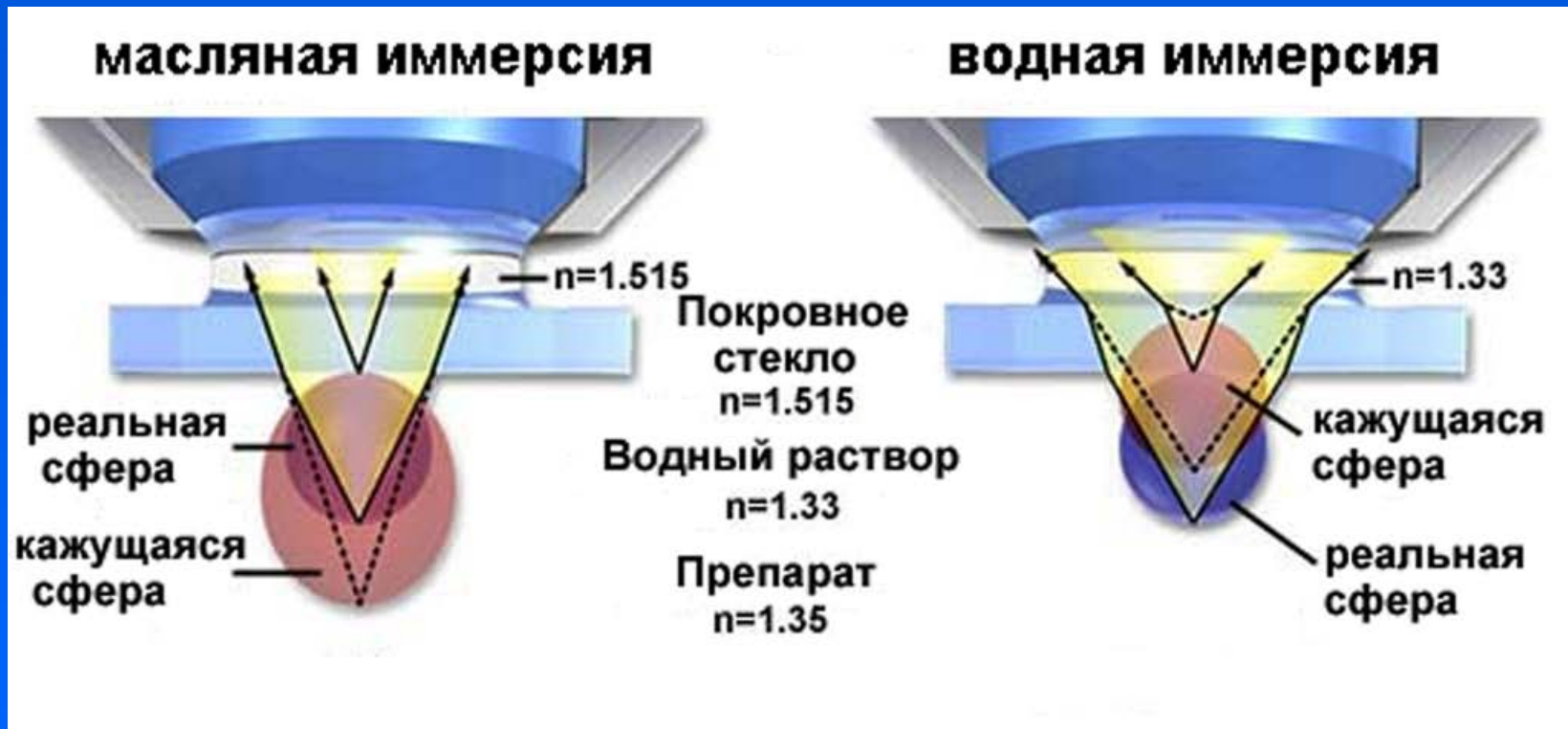
Гомогенная масляная –  $n=1,515 \pm 0,003$  ( $NA \leq 1,49$ ).

Образцы масляной иммерсии могут существенно отличаться по своей вязкости.

Современные объективы разных изготовителей рассчитаны на немного различные показатели преломления масляной иммерсии.

Специальная иммерсия –  $n > 1,6$  ( $NA = 1,45 \sim 1,65$ )

# Сравнение масляной и водной иммерсий



Искажения, вносимые масляной иммерсией, становятся значительными при толщине водного слоя (наблюдаемого объекта) 10 мкм и более. Объектив для водной иммерсии очень чувствителен к толщине покровного стекла и к его расположению.

# Окуляр микроскопа

Типы окуляров:

Гюйгенса –  $\times 5$ - $\times 25$

Рамсдена –  $\times 4$ - $\times 15$

Компенсационный – имеет хроматическую разность увеличений (только в сочетании с объективом)

Ортоскопические –  $\times 10$ - $\times 16$

- Широкопольный (окулярное число свыше 180)

- Сверхширокопольный (окулярное число свыше 225)

Окуляры с вынесенным зрачком

Окуляры с внутренней фокусировкой

# Характеристики окуляра

Конструкция (положение переднего фокуса)  
– Гюйгенса, Рамсдена и др.

Увеличение – х4-х25

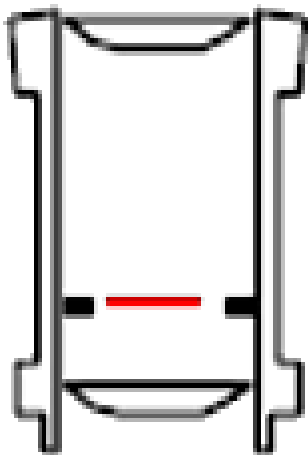
Размер поля зрения в мм – 8-26,5

Расстояние до выходного зрачка

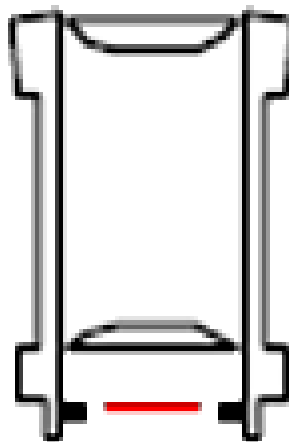
Наличие диоптрийной настройки ( $\pm 5D$ )



# Конструкция окуляров



Гюйгенса



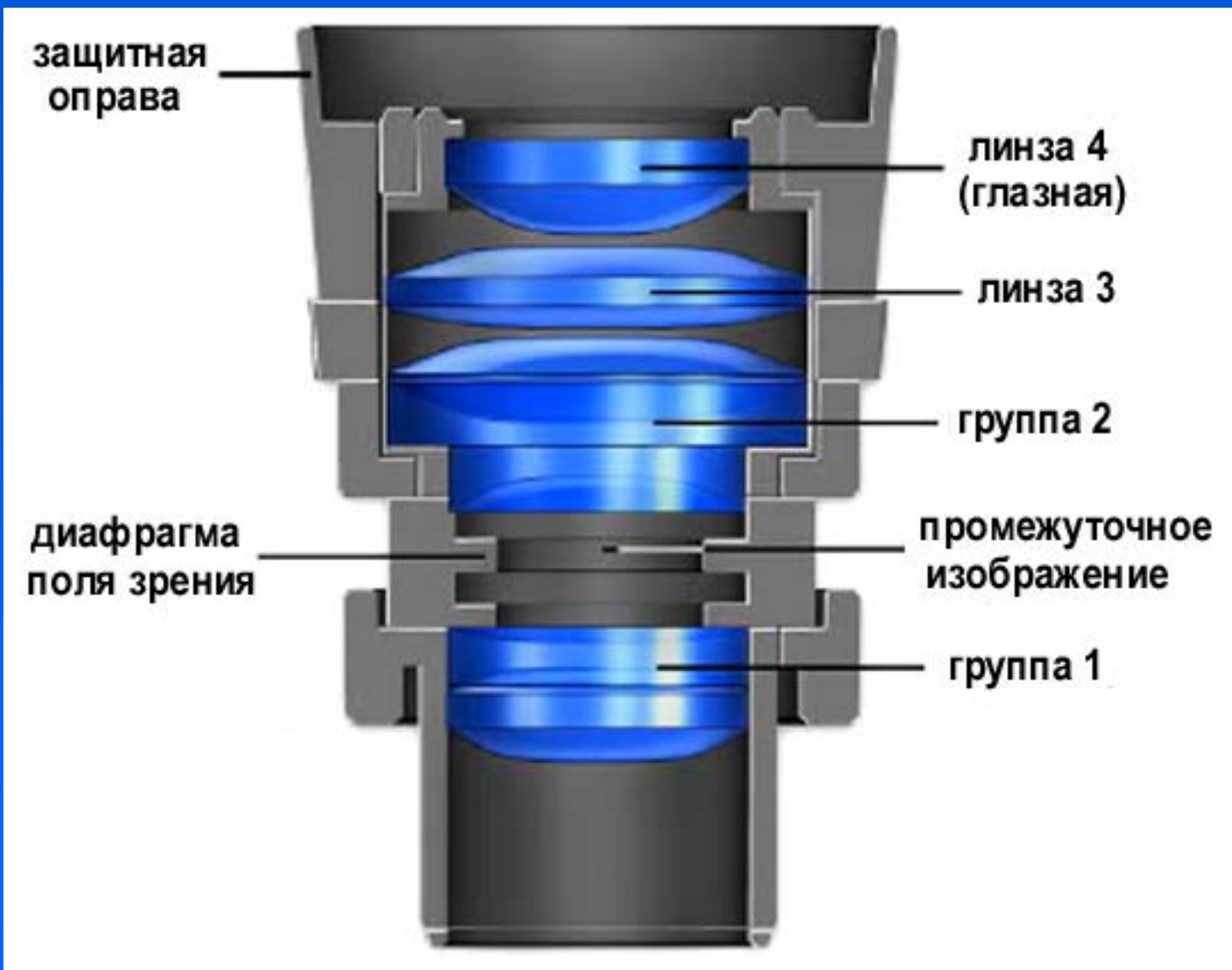
Рамсдена



компенсационный

Красная полоса указывает положение переднего фокуса (плоскость первичного изображения)

# Ортокоспический окуляр



# Поле зрения окуляра

Гюйгенса (x5-x25) – 8-10 мм

Ортокоспические:

Стандартные (x10-x16) – 18-20 мм

Wide (x10-x12,5) – 20 или 22 мм

Super Wide (x10) – 26,5 мм

# Увеличение и поле зрения микроскопа

Увеличение микроскопа равно произведению увеличения объектива на увеличение промежуточной линзы (бинокулярной насадки) и на увеличение окуляра.

Максимальное поле зрения обусловлено конструкцией объектива и тубусом микроскопа.

Величина поля зрения микроскопа равна полю зрения окуляра (в мм), деленному на увеличение объектива и промежуточной линзы (бинокулярной насадки).

# Поле зрения и конструкция микроскопа

Стандартный диаметр тубуса микроскопа – 23,2 мм. Для сверхширокопольных окуляров необходим увеличенный диаметр всего тубуса. Конструктивно он возрастает до 28 мм.

Сверхширокопольные окуляры могут эффективно использоваться только в сочетании с объективами увеличенного поля зрения.

# Размер поля зрения с окуляром 10x/22 (WF) без насадки.

Объектив	Диаметр (мм)
1x	22
2.5x	8.8
4x	5.5
10x	2.2
20x	1.1
40x	0.55
60x	0.37
100x	0.22

# Сочетание окуляра и объектива

Коррекция на аберрации объектива – CF, CFI

Величина поля зрения (FN для окуляра) – WF, SWF, UWF. Для реализации широкого поля зрения (25-26,5 мм) необходим соответствующий микроскоп (с широким тубусом) и объектив.

Для достижения максимальной глубины резкости при заданном разрешении применяется высокоапертурный объектив с малым увеличением + сильный окуляр

Полезное общее увеличение микроскопа:

$$500 NA_{ob.} < V_{ob.} \times V_{oc.} \times V_t. < 2000 NA_{ob.}$$

# Диапазон полезных увеличений

## Объектив

## Окуляр

Увел. (NA)

10x

12.5x

15x

20x

25x

2.5x (0.08)

—

—

—

x

x

4x (0.12)

—

—

x

x

x

10x (0.35)

—

x

x

x

x

25x (0.50)

x

x

x

x

—

40x (0.75)

x

x

x

—

—

40x (1.00)

—

x

x

x

—

60x (0.95)

x

x

x

—

—

60x (1.40)

—

x

x

x

—

100x (1.30)

x

x

—

—

—



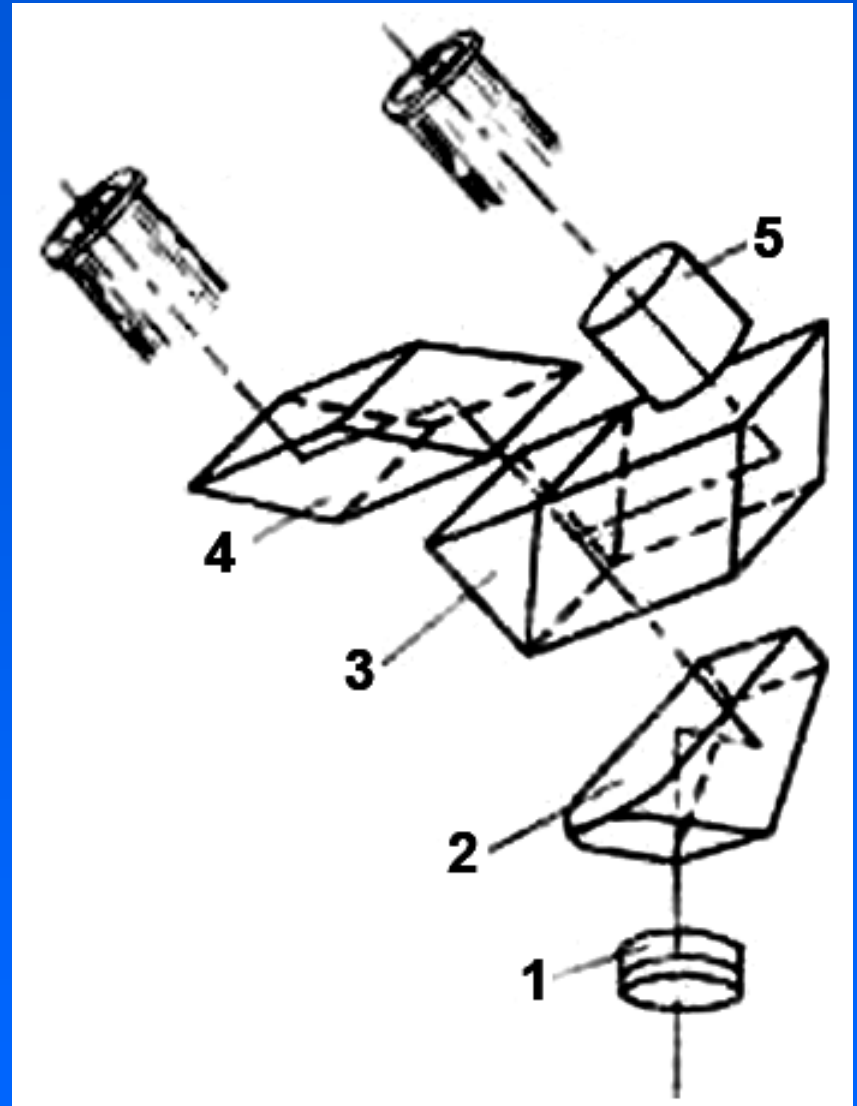
# Биноклярная насадка, конструкция

1-5 – оптические элементы  
насадки.

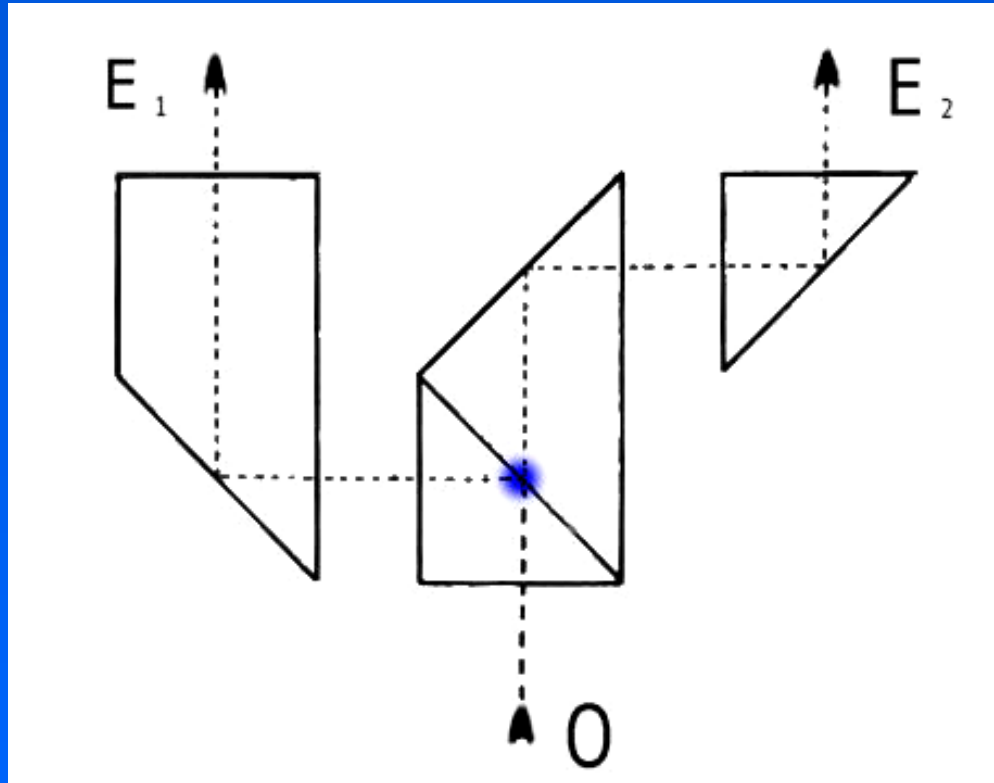
1 – линза

2 – призма для наклона  
лучей

3 – светоделительная  
призма (пентапризма)



# Разделение лучей в бинокулярной насадке



Расстояние между  $E_1$  и  $E_2$  должно соответствовать межзрачковому расстоянию (у большинства людей – 55-75 мм)



# Формирование изображения оптической системой

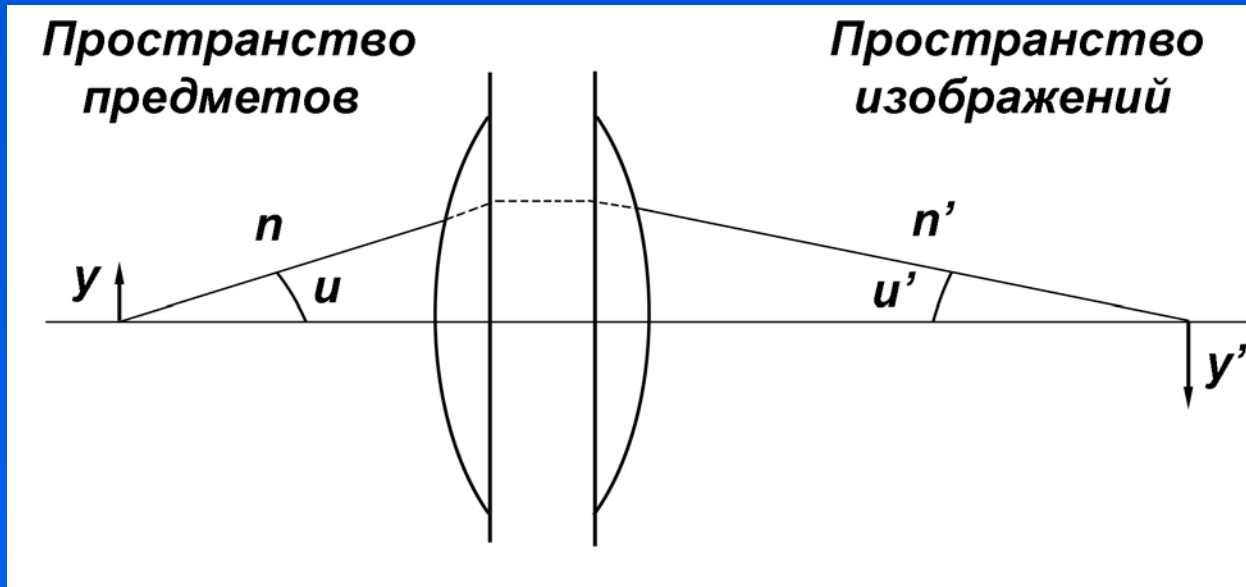
Оптические системы не могут давать идеального поточечного изображения пространства, так как обладают аберрациями. Исключение могут составлять точечные объекты на главной оптической оси и случаи, когда оба условия (условие синусов и условие тангенсов) выполняются хотя бы в некоторых точках одновременно.

Наиболее важным является случай параксиальной оптики, когда углы, составляемые лучами с осью, малы и оба условия выполняются одновременно из-за практического совпадения тангенсов и синусов. К этому случаю относятся большинство оптических приборов, но не микроскоп!

Вторым важным случаем являются так называемые апланатические системы, в которых законы геометрической оптики удаётся совместить с выполнением условия синусов для элемента поверхности в окрестности одной точки на оси системы или для пары сопряжённых поверхностей. Апланатические системы изображают без аберраций широким пучком лучей окрестность такой точки. Известным примером апланатической системы является сфера с коэффициентом преломления больше единицы.

Апланатические свойства сферы используются при конструировании объективов микроскопов, где существенна большая апертура пучков, а положение предмета вдоль главной оптической оси может быть фиксировано.

# Условие синусов Аббе



Для получения свободного от аберраций изображения для всех лучей, выходящих из передней апланатической точки на главной оптической оси и направляющихся после преломления в объективе к задней апланатической точке, отношение между синусами углов сопряженных лучей должно быть постоянно:

$$(n * \sin u) : (n' * \sin u') = v$$

где  $n, n'$  – показатели преломления;  $v = \text{const.}$  – увеличение объектива.

# Устранение aberrаций в микроскопе

Строгая центровка всех линз в оптической системе – все объективы собираются и тестируются вручную.

Продольная юстировка оптической системы – условие апланатизма выполняется одновременно для всей системы линз.

Ограничение оптических пучков – диафрагмы.

Комбинации линз с различной дисперсией – ахроматы

Введение асферических линз и специальных сортов стекла (бездисперсионных)

# Типы объективов для микроскопа

Ахромат (510-580 нм)

Апохромат (450-660 нм) -- Apo

Флюоритовый объектив -- Fl

Планахромат -- Plan

Планапохромат -- PlanApo

Супер планапохромат – компенсация для 5 точек спектра (от 405 до 700 нм)

Планфлюорит -- PlanFluor

УФ (кварцевый, 280 нм) -- UV

# Остаточные аберрации объективов для микроскопа

**Ахромат** – хроматическая аберрация для синего и красного света; сферичность поля зрения.

**Апохромат** – хроматическая разность увеличений; сферичность поля зрения, остаточная хроматическая аберрация для сине-фиолетового и дальнего красного света.

**Флюоритовый объектив** – небольшая хроматическая аберрация для синего и красного света; сферичность поля зрения.

**Планапохромат** – остаточные аберрации в апланатической точке практически отсутствуют, но объектив очень «чувствителен» к толщине покровного стекла и показателю преломления иммерсионного масла.

**УФ (кварцевый)** – значительные аберрации в видимой области спектра.



# Лекция 5

**Биноккулярная насадка**

**Конденсоры светлого поля**

**Установка света по Келеру**

# Настройка бинокулярной насадки микроскопа

1. Установить межзрачковое расстояние таким образом, чтобы два изображения полностью совместились (объектив  $\times 20$ - $\times 40$ )
2. Сфокусировать микроскоп, используя объектив  $\times 40$ .
3. Ввести объектив с увеличением не более  $\times 4$ - $\times 5$  и, установив диоптрийную подстройку на 0, сфокусировать изображение для правого глаза.
4. Сфокусировать изображение для левого окуляра с помощью диоптрийной подстройки.
5. Убедиться, что фокусировка для объектива  $\times 40$  не изменилась.

# Освещение препарата в микроскопе

При увеличении  $\times 1000$  яркость освещения препарата должна примерно в 1 млн. раз превышать освещенность помещения. Поэтому необходима специальная система освещения препарата.

Осветитель – удаленный источник света с оптической системой, создающей параллельный пучок света.

Конденсор – короткофокусная система, создающая конус света, фокусирующийся на препарате.

# Осветитель микроскопа (светлое поле)

Осветители: встроенные и навесные.

Основной тип ламп – лампы накаливания (галогеновые) – 20, 30 и 100 Вт.

Напряжение – 6 В или 12 В.

Спираль лампы – плотная, в плоскости изображения, как правило, прямоугольная.

Юстировка лампы – винты на домике (вверх-вниз, вправо-влево).

Коллектор – 3-х линзовый.

Полевая диафрагма – встроенная (внутри коллектора) или вынесенная (внутри станины микроскопа).

# Применение светофильтров

Основные цели – увеличение контраста изображения и/или подбор правильной цветовой гаммы.

Нейтральные светофильтры (ND) – позволяют увеличить накал лампы и скорректировать цветовую температуру.

Цветные светофильтры: коррекция цветовой температуры лампы (конверсионные); увеличение контраста при использовании ахроматов (зеленый, оранжевый); избирательное увеличение контраста в окрашенных препаратах.

# Типы конденсоров для микроскопа

Ахроматический Аббе





Апланатический

Ахроматический-апланатический

Конденсоры сухие и иммерсионные

Конденсоры с переменной апертурой – панкратические и с откидной линзой

# Основные светлостолбные конденсоры

		Numerical aperture (N.A.)	Object distance (mm)	Remarks
	Abbe condenser	0.90	1.9	For 4X-100X
	Swing-out Achromat condenser	0.90/0.22	1.8	For 2X-100X
	Achromat condenser	0.80	4.2	For 4X-100X
	Achromat/Aplanat condenser	1.4	1.6	For 10X-100X

# Рабочий отрезок и апертура конденсоров

Стандартный (около 2 мм) ( $NA=1,4-0,8$ )

Удлиненный (свыше 4 мм) -- LWD ( $NA=0,55$ )

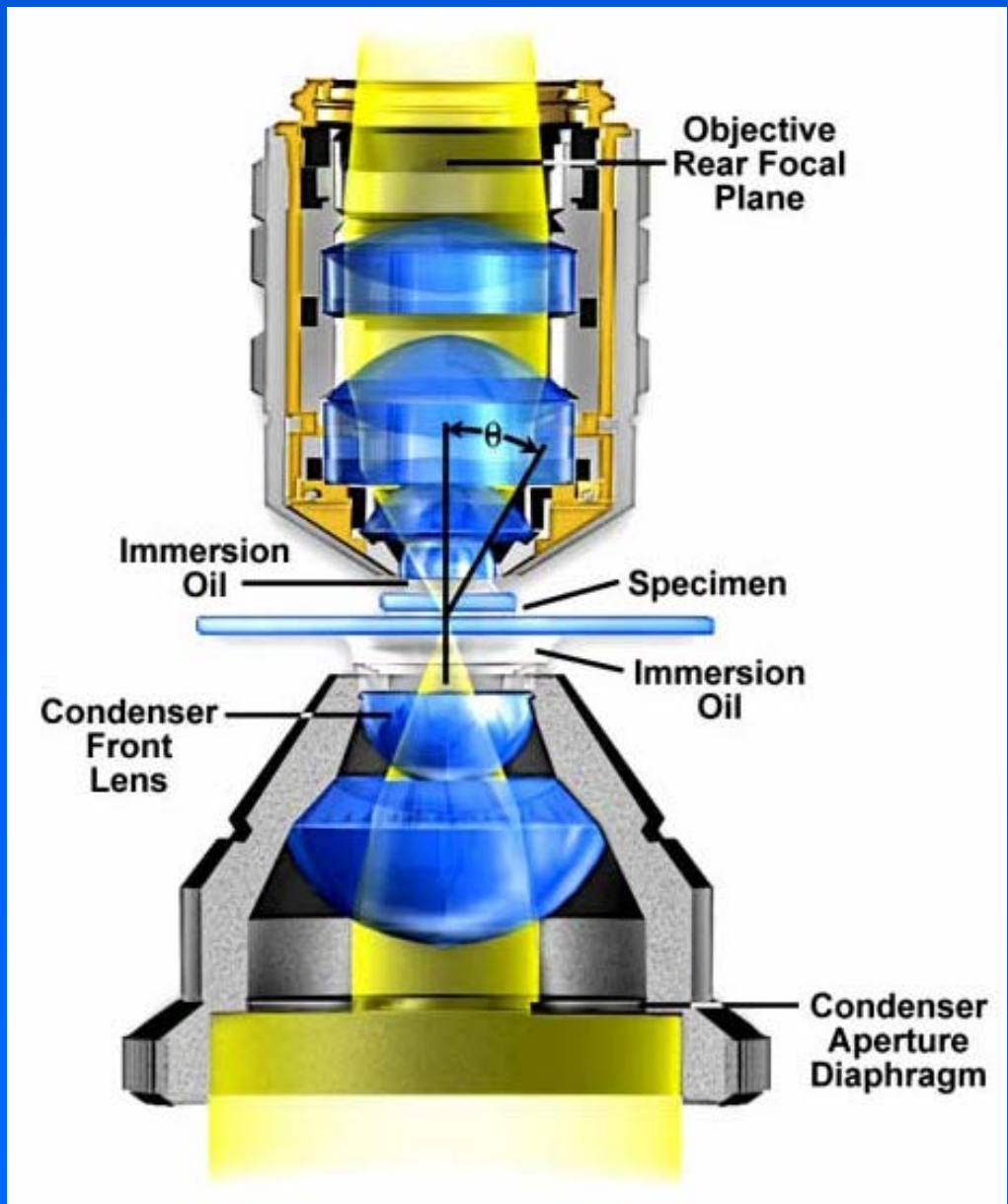
Особо длинный (свыше 2 см) -- ELWD  
( $NA=0,2-0,3$ )

Конденсор с откидной линзой ( $NA: 0,9/0,2$ )

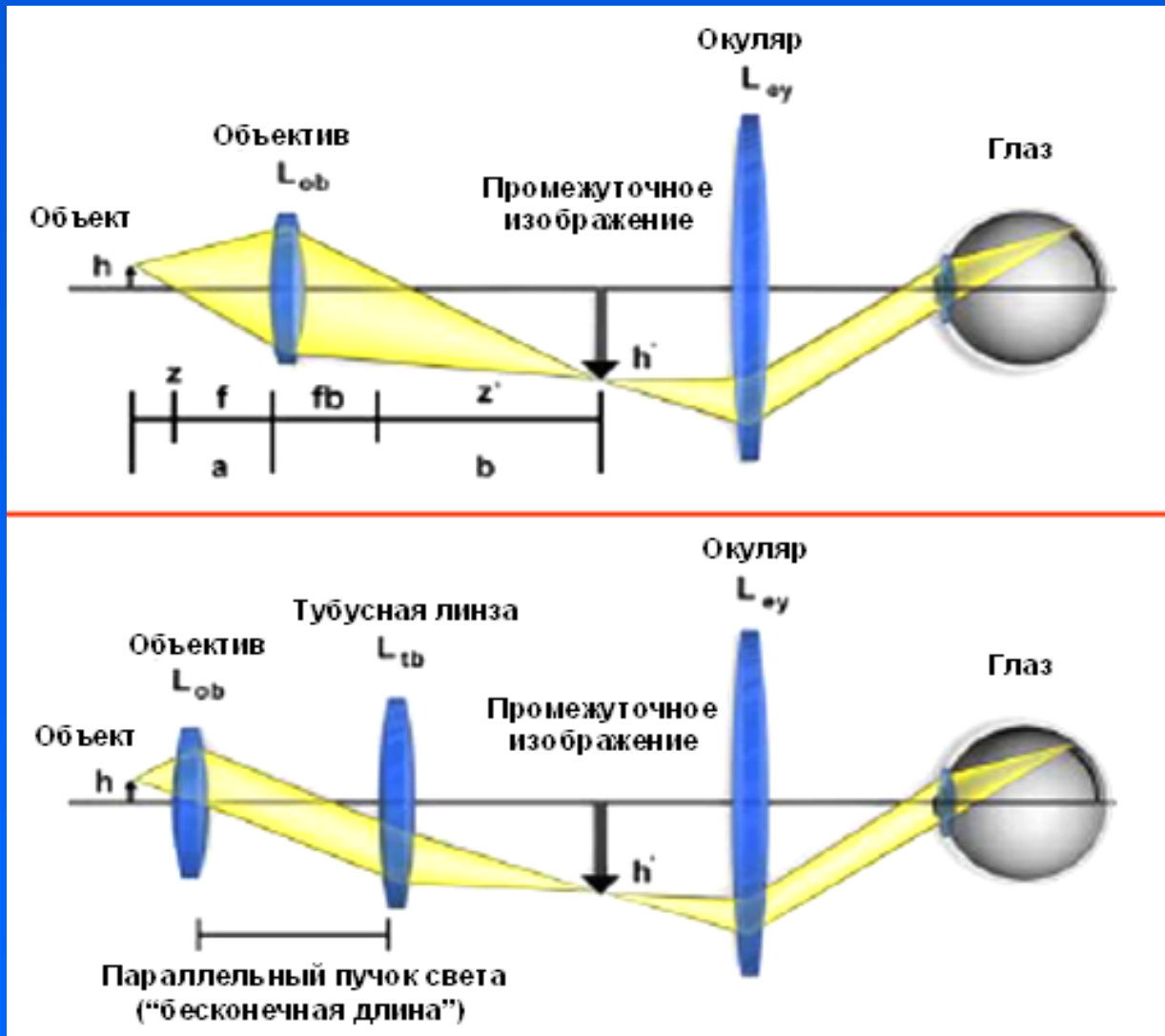
Панкратический ( $NA$  меняется от 1,2 до 0,3)



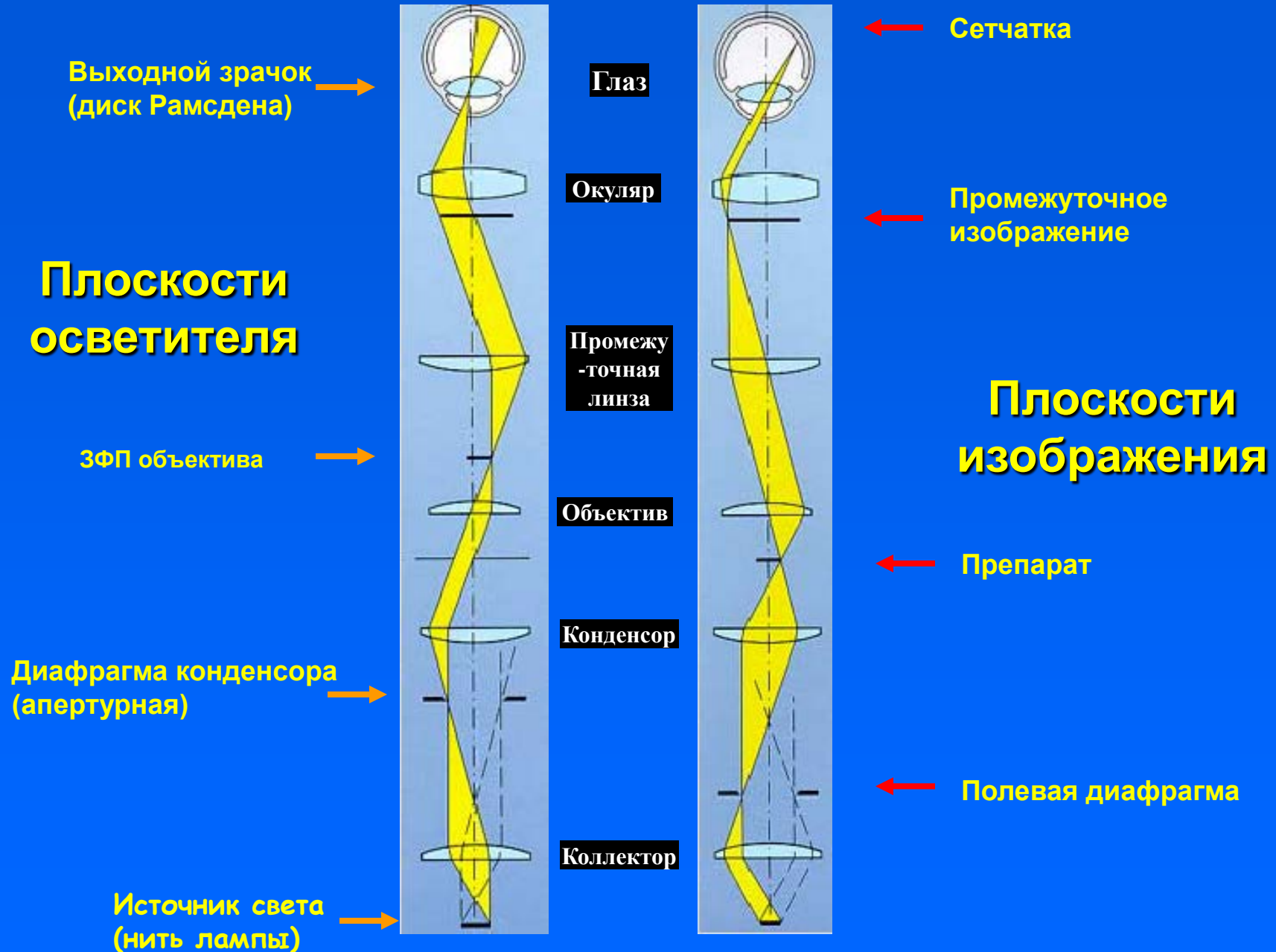
# Оптическое согласование объектива и конденсора



# Ход лучей в микроскопах с конечной и бесконечной оптической длиной тубуса



# Сопряженные плоскости



# Сопряженные оптические плоскости в микроскопе

## 1 группа:

- спираль лампы
- апертурная диафрагма (конденсора)
- задняя фокальная плоскость объектива
- входной зрачок глаза (диск Рамсдена)

## 2 группа:

- полевая диафрагма (осветителя)
- препарат
- диафрагма поля зрения (передний фокус) окуляра
- сетчатка глаза

# Установка света по Келеру

1. Фокусировка лампы и центрировка осветителя.
2. Фокусировка полевой диафрагмы.
3. Центрировка диафрагмы конденсора с помощью вспомогательного микроскопа.
4. Окончательная настройка осветителя.
5. Согласование полевой и апертурной диафрагм с используемым объективом.
6. Максимальное разделение по оси  $z$  двух групп сопряженных плоскостей.

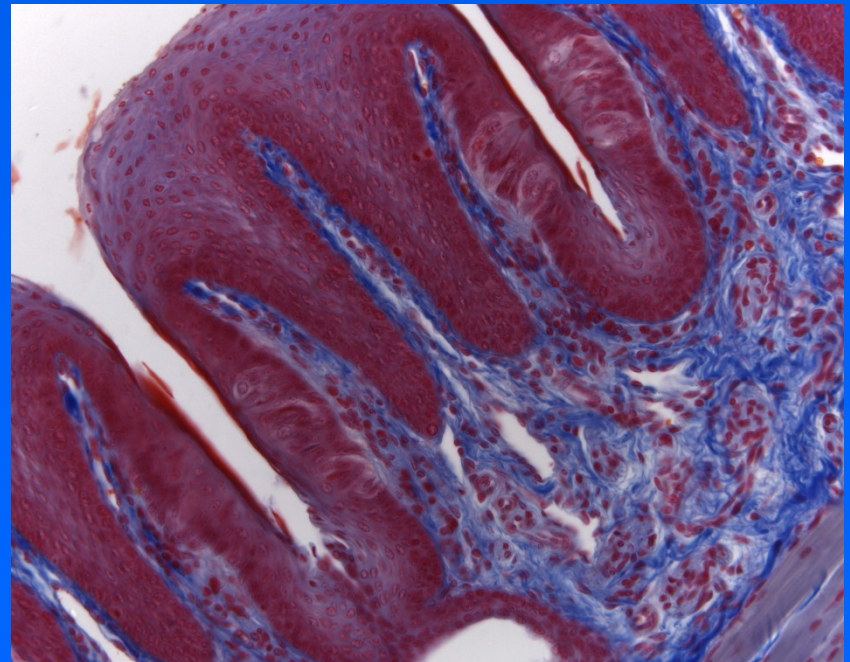
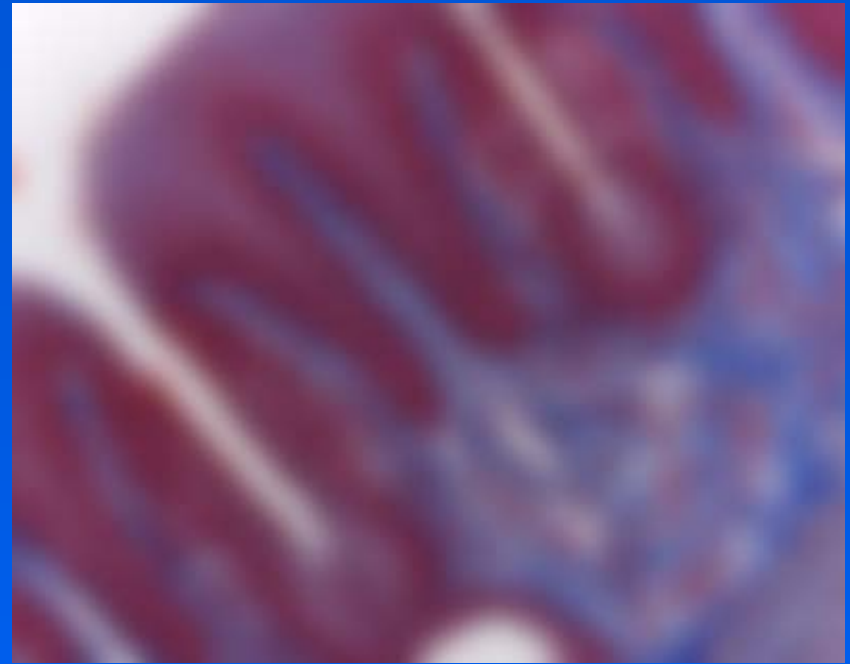
# Необходимые элементы для установки света по Келеру

В микроскопе должны быть:

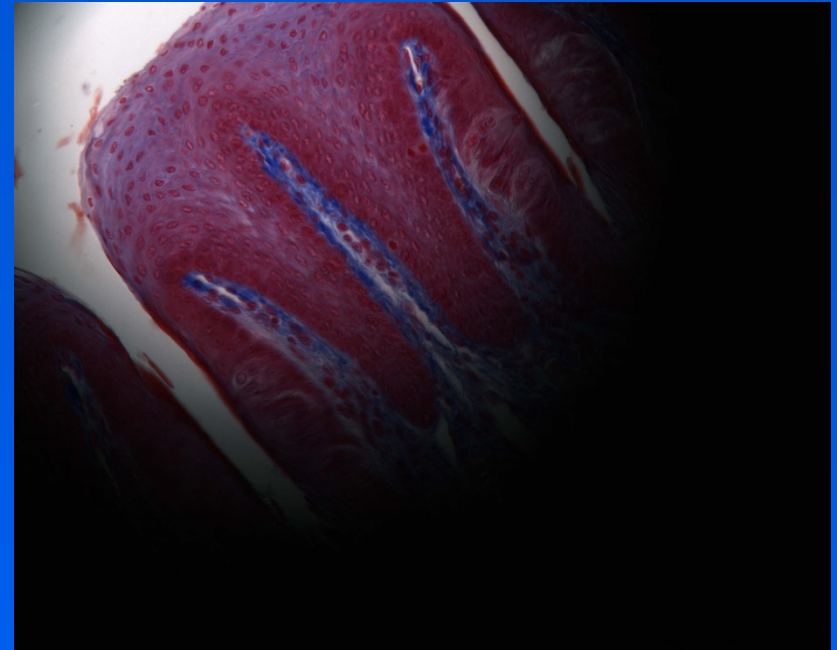
- Регулируемая полевая диафрагма (осветителя)
- Регулируемая и центрируемая апертурная диафрагма (конденсора)
- Перемещающийся в трех плоскостях конденсор

# Последовательные шаги:

- 1) Полностью открыть полевую и апертурную диафрагмы, увидеть препарат
- 2) Сфокусироваться на препарат
  - Закрывать полевую диафрагму
  - Сфокусировать изображение диафрагмы перемещая конденсор вверх-вниз
  - Центрировать полевую диафрагму, затем открыть ее до освещения поля зрения
  - Вставить вспомогательный микроскоп
  - Закрывать апертурную диафрагму до  $4/5$  апертуры объектива

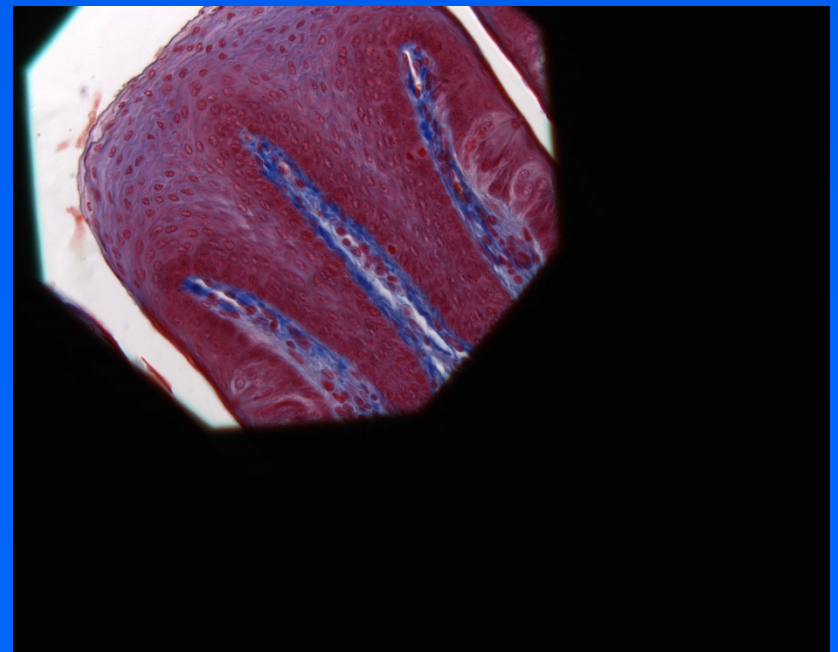
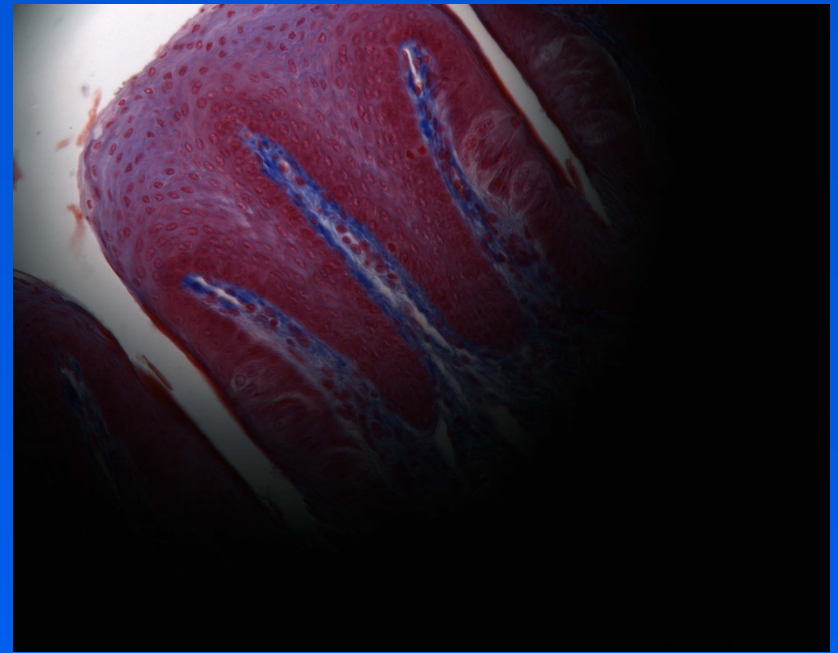


- 1) Открыть полевую и апертурную диафрагмы
- 2) Сфокусировать препарат
- 3) Закрывать полевую диафрагму
  - Сфокусировать изображение диафрагмы перемещая конденсор вверх-вниз
  - Центрировать полевую диафрагму, затем открыть ее до освещения поля зрения
  - Вставить вспомогательный микроскоп
  - Закрывать апертурную диафрагму до  $4/5$  апертуры объектива

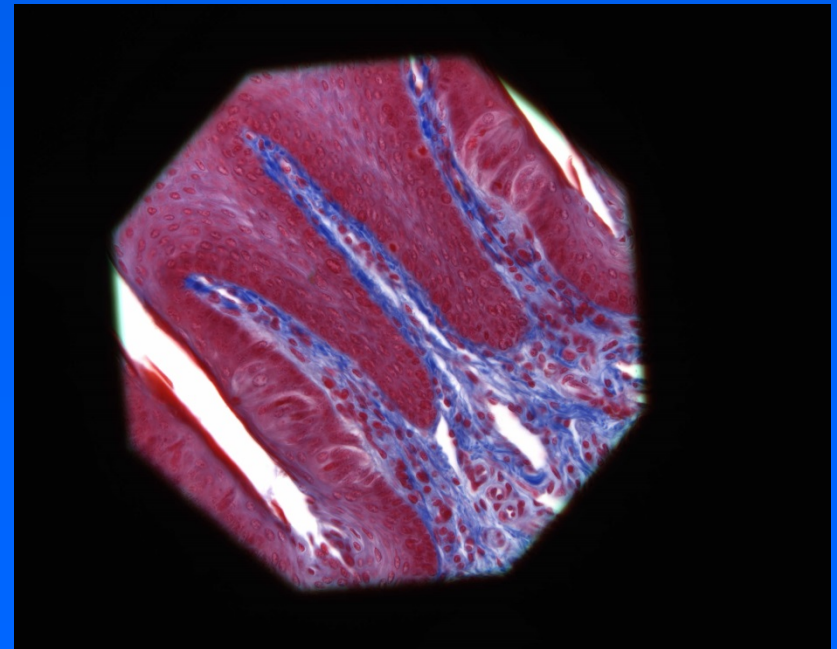
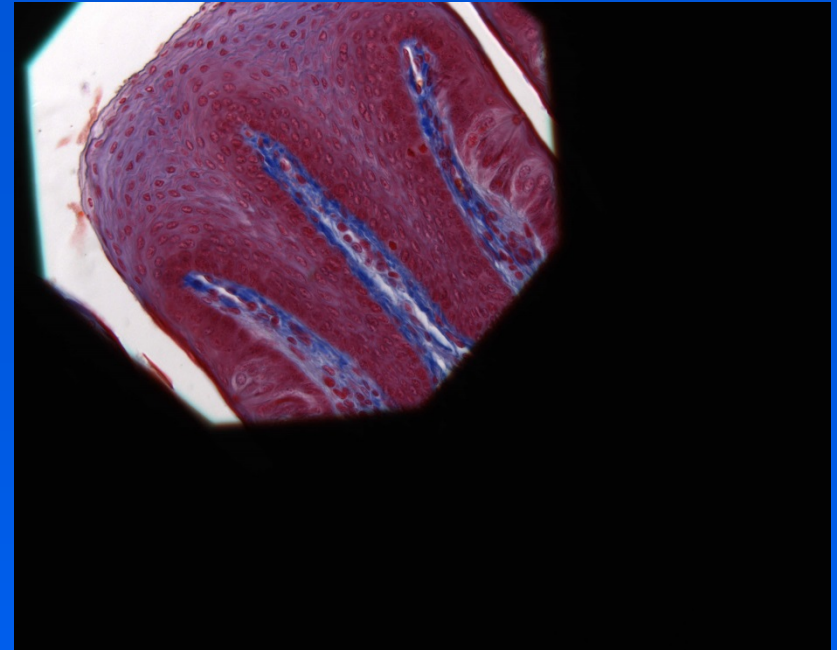




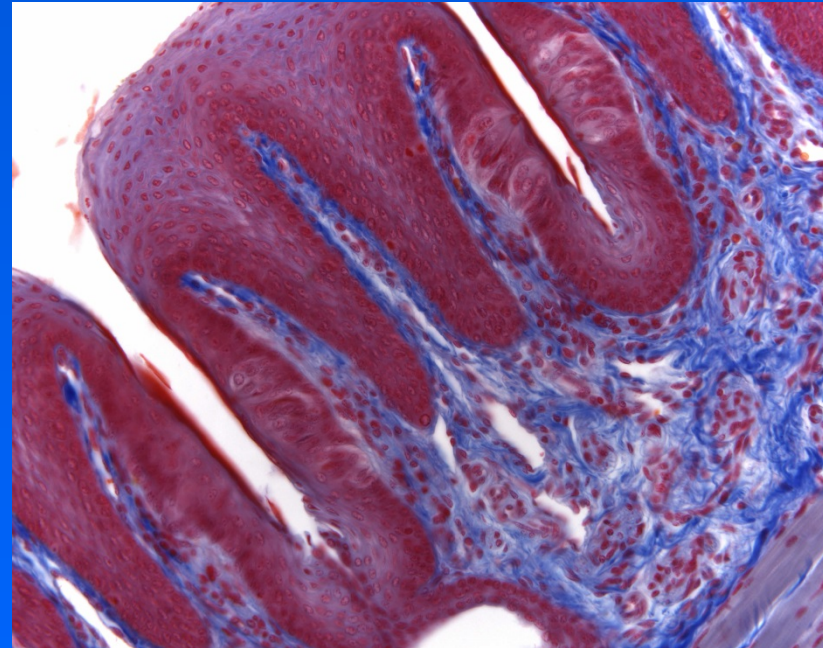
- 1) Открыть полевую и апертурную диафрагмы
  - 2) Сфокусировать препарат
  - 3) Закрывать полевую диафрагму
  - 4) Сфокусировать изображение диафрагмы, перемещая конденсор вверх-вниз
- Центрировать полевую диафрагму, затем открыть ее до освещения поля зрения
  - Вставить вспомогательный микроскоп
  - Закрывать апертурную диафрагму до  $4/5$  апертуры объектива



- 1) Открыть полевую и апертурную диафрагмы
  - 2) Сфокусировать препарат
  - 3) Закрывать полевую диафрагму
  - 4) Сфокусировать изображение диафрагмы перемещая конденсор вверх-вниз
  - 5) Центрировать полевую диафрагму
- затем открыть ее до освещения поля зрения
  - Вставить вспомогательный микроскоп
  - Закрывать апертурную диафрагму до  $4/5$  апертуры объектива



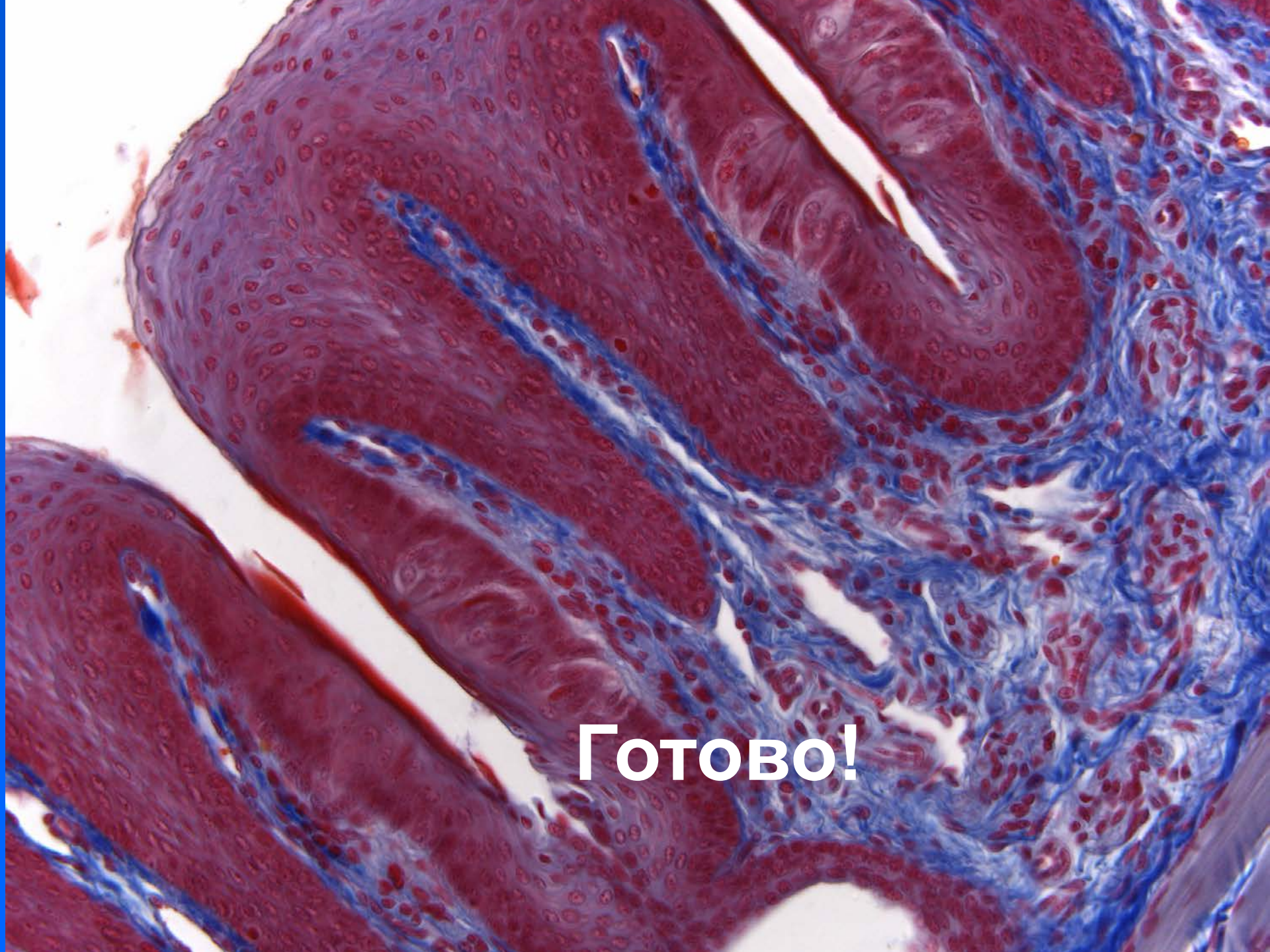
- 1) Открыть полевую и апертурную диафрагмы
- 2) Сфокусировать препарат
- 3) Закрывать полевую диафрагму
- 4) Сфокусировать изображение диафрагмы перемещая конденсор вверх-вниз
- 5) Центрировать полевую диафрагму
- 6) Открыть ее до освещения поля зрения
  - Вставить вспомогательный микроскоп
  - Закрывать апертурную диафрагму до  $4/5$  апертуры объектива



- 1) Открыть полевую и апертурную диафрагмы
- 2) Сфокусировать препарат
- 3) Закрывать полевую диафрагму
- 4) Сфокусировать изображение диафрагмы перемещая конденсор вверх-вниз
- 5) Центрировать полевую диафрагму
- 6) Открыть ее до освещения поля зрения
- 7) Вставить вспомогательный микроскоп
- 8) Закрывать апертурную диафрагму до  $4/5$  апертуры объектива

Примечание: для малоконтрастного препарата закройте диафрагму конденсора до  $\sim 30\%$   $NA_{\text{объектива}}$





**ГОТОВО!**

# Преимущества установки света по Келеру

1. Гомогенное освещение поля зрения.
2. Численная апертура конденсора и величина освещенного поля на столике микроскопа могут регулироваться независимо друг от друга.
3. Плоскость переднего фокуса конденсора передается в заднюю фокальную плоскость объектива. Это создает минимум рассеянного света в оптическом пути микроскопа и оптимальные условия для усиления контраста изображения.
4. Достигается максимальное латеральное (x-y) и осевое (z) разрешение микроскопа.

# Основные ошибки при установке света

1. После установки света конденсор опускался.
2. При смене объектива не перестраивались полевая и апертурная диафрагмы.
3. В ход лучей вместо нейтральных светофильтров ввели матовое стекло.
4. Изображение диафрагмы конденсора имеет неравномерную кайму.

Все отклонения в настройке света приводят к снижению контраста изображения!

# Объемное изображение точки в идеальной оптической системе

Изображение точки есть искажение волнового фронта в плоскости изображения.

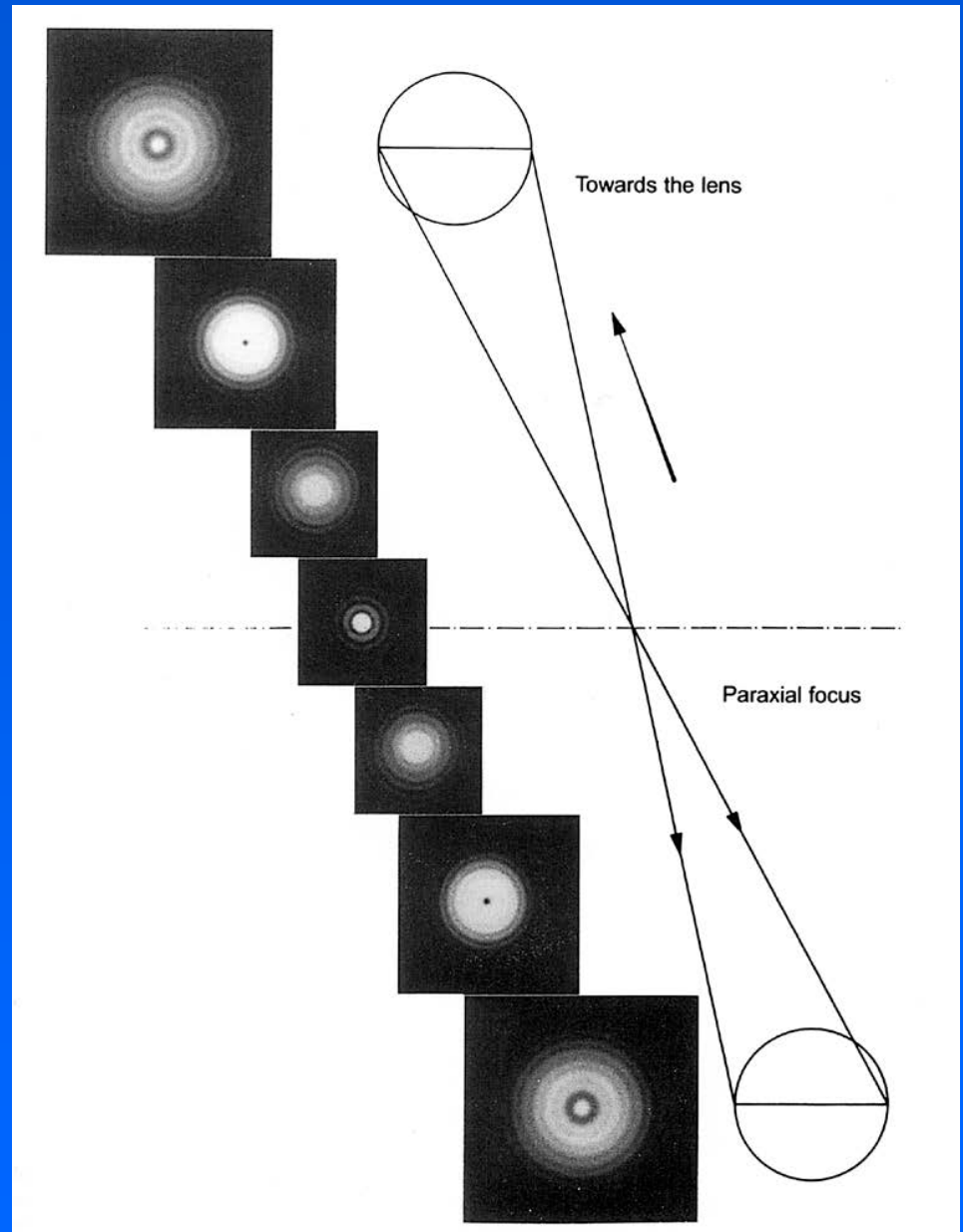
PSF (point spread function) – функция рассеяния точки (ФРТ).

Изображение точки в плоскости передается диском Эри, параметры которого определяются свойствами линзы (объектива). Для свободной от аберраций оптической системы размер диска Эри определяется только ее апертурой.

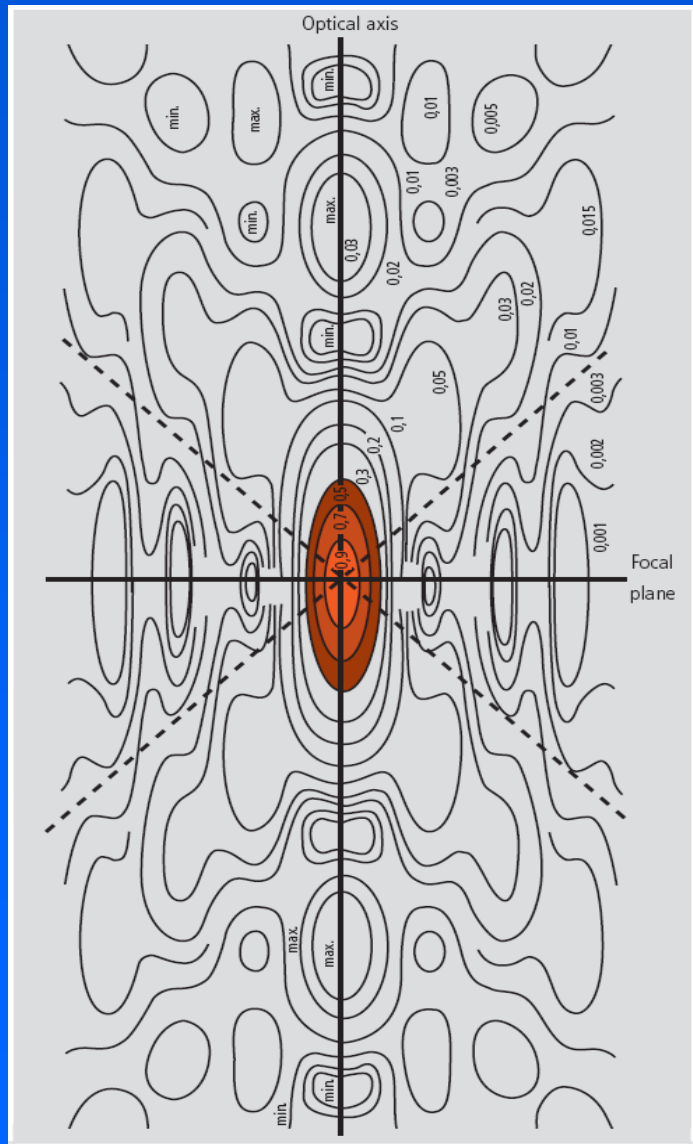
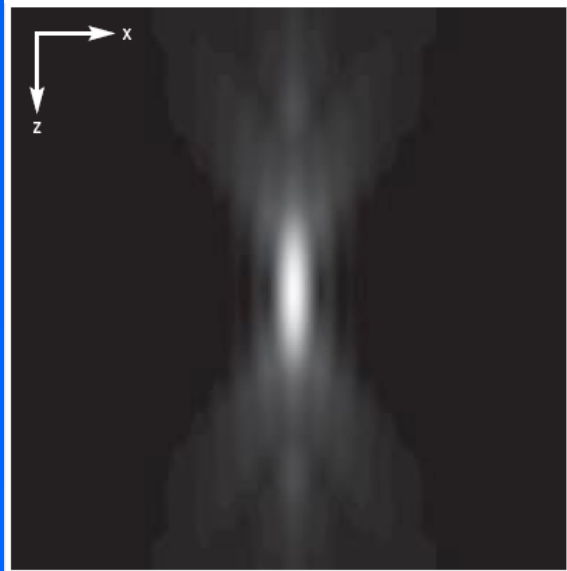
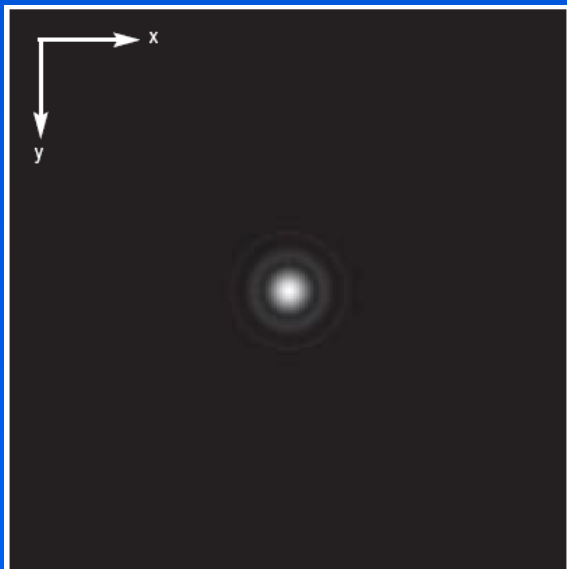
Изображение точки вдоль оси микроскопа описывается эллиптической перетяжкой.



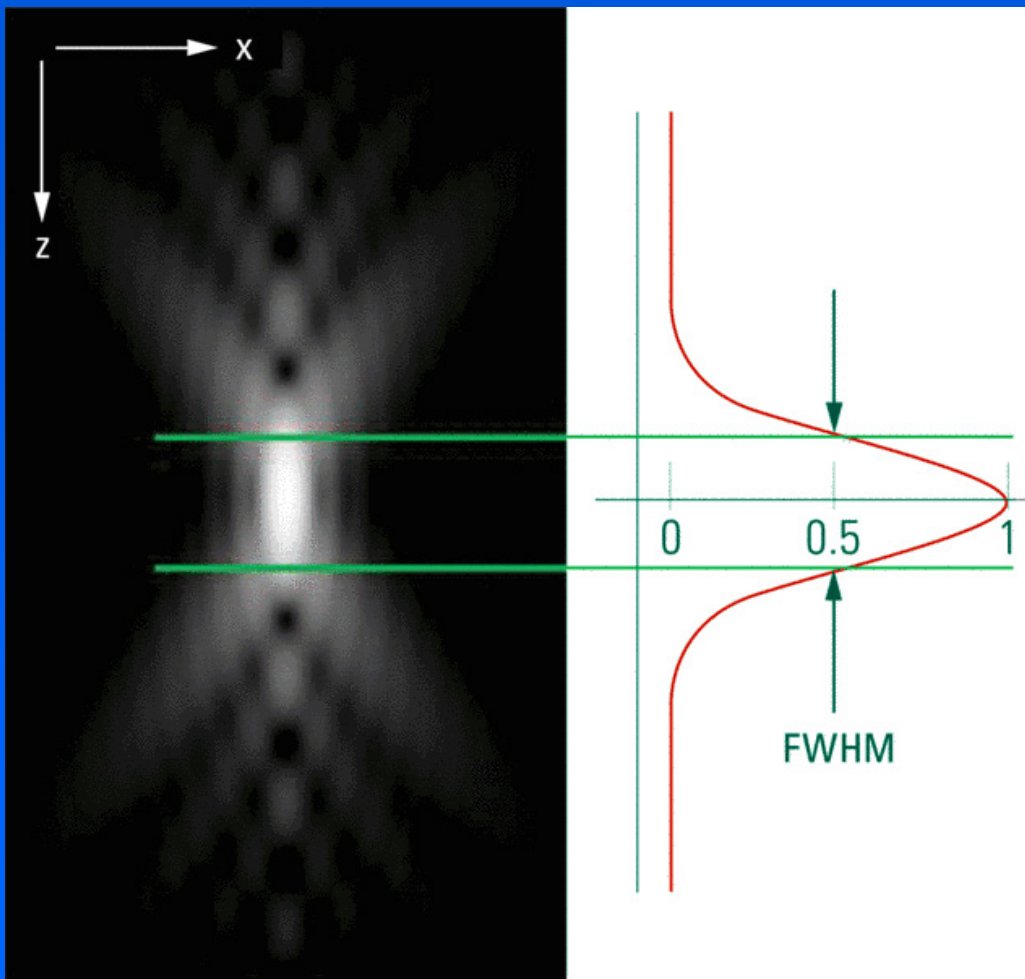
**Объемное  
изображение точки  
(функция рассеяния  
точки – PSF)  
в идеальной  
оптической системе**



# Проекции объемного изображения точки (ФРТ) в поперечной и меридиональной плоскостях



# Характеристика перетяжки



**FWHM – full width at half maximum (ширина на полувысоте).**

**FWHM является количественной мерой для описания различных оптических картин.**

**Данная характеристика является исчерпывающей, только если известна функция на графике.**

# Понятие оптического среза

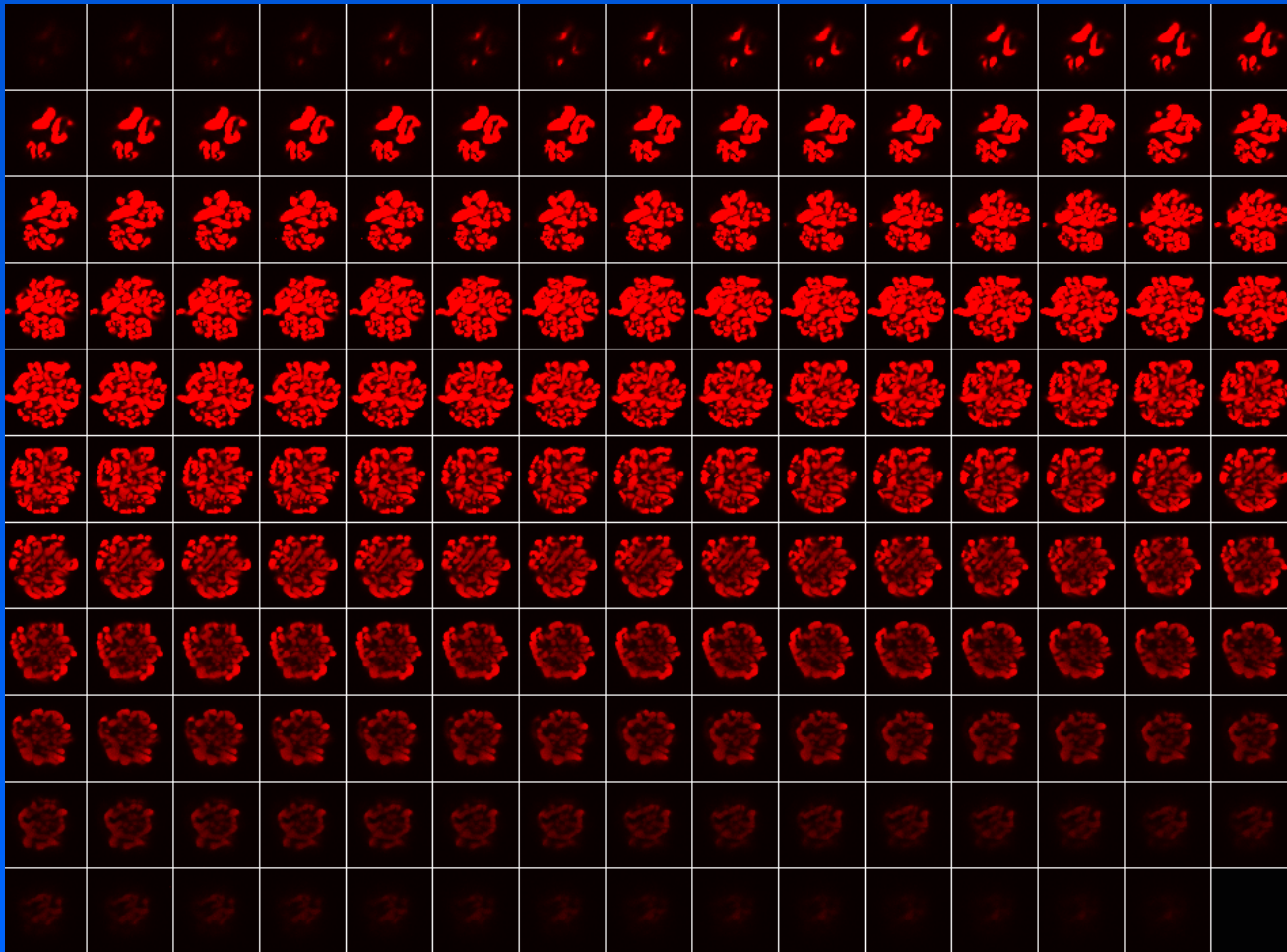
Оптический срез – плоскость в пространстве предметов, изображение которой создает микроскоп в зависимости от своей настройки в пространстве изображений.

Наилучшее изображение оптического среза получается при попадании препарата в переднюю апланатическую точку объектива.

При визуальном наблюдении отдельный оптический срез трудно различим из-за аккомодации глаза.

Окрестности оптического среза (выше- и нижележащие плоскости) размываются микроскопом, и степень этого размытия определяет толщину (глубину) так называемого «резко изображаемого пространства».

# Оптические срезы



**Оптический срез – часть препарата, изображение деталей в которой размыто в пределах половины диска Эри. Его толщина для иммерсионных объективов составляет менее 1 мкм.**

# Разрешающая способность по оси Z

Расстояние от центра до первого дифракционного минимума по оси Z рассчитывается по формуле:

$$z = 2\lambda n / (NA)^2,$$

где  $\lambda$  - длина волны света,  $n$  – коэффициент преломления среды, и  $NA$  – числовая апертура объектива.

Соотношение аксиального и радиального разрешения (по критерию Рэля) составляет:

$$z/r = 3.28 * n / NA$$

# Глубина поля зрения

Глубина резкого поля зрения – область пространства, расположенная выше и ниже плоскости фокусировки объектива, где расфокусировка изображения точки не превышает половины радиуса диска Эри (или кружка нерезкости).

Максимально допустимая величина расфокусировки при микрофотографии приблизительно определяется как одна четверть расстояния до дифракционного минимума по оси  $z$ .

За счет аккомодации глаза глубина поля зрения при визуальном наблюдении увеличивается.

# Толщина резко изображаемой области предмета

Максимально допустимая величина расфокусировки  $d$  приближенно определяется как:

$$d = \frac{\lambda \sqrt{n^2 - (NA)^2}}{(NA)^2}$$

или

$$d = \frac{\lambda n}{2(NA)^2}$$

где  $\lambda$  - длина волны света,  $n$  – коэффициент преломления среды, и  $NA$  – числовая апертура объектива.

«Оптический срез» – слой резко изображаемого пространства. Под «толщиной оптического среза» подразумевается слой, центр которого находится в фокусе (реальный оптический срез), а толщина равна удвоенной величине допустимой расфокусировки.





# Глубина изображения

Глубина изображения – область пространства, расположенная выше и ниже плоскости фокусировки, где расфокусировка изображения не превышает допустимого кружка нерезкости.

Допустимый размер кружка нерезкости определяется детектором (глаз, камера).

Глубина поля зрения и глубина изображения связаны обратной нелинейной зависимостью.

Максимальная глубина изображения достигается при использовании иммерсионного объектива, минимальная – с объективом малого увеличения.

# Глубина поля зрения и резкого изображения

Увеличение	Апертура (NA)	Глубина поля зрения (мкм)	Глубина изображения (мм)
4x	0.1	27.2	0.13
10x	0.20	6.8	0.8
20x	0.4	1.7	3.8
40x	0.65	0.65	12.8
60x	0.95	0.30	29.8
100x	1.4 (имм.)	0.21	80

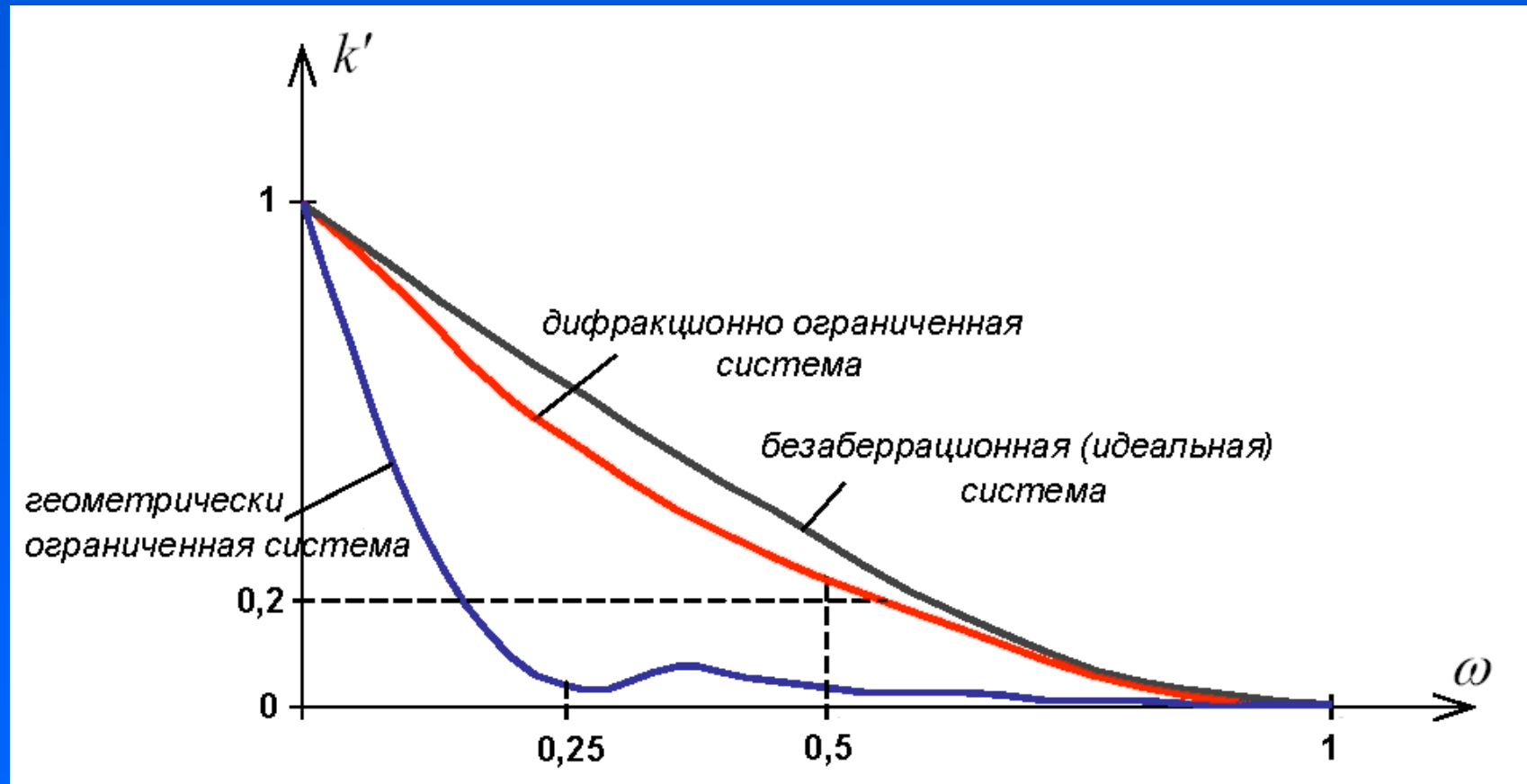
# Типы оптических систем

Если aberrации в пределах поля зрения малы (существенно меньше  $\lambda/4$ ), то система называется дифракционно-ограниченной (объектив микроскопа, зеркало телескопа). Но малые aberrации существуют только для апланатических точек, вне их изображения размываются.

Если aberrации велики, система называется геометрически-ограниченной (объективы фотоаппаратов и проч.). Для геометрически ограниченной системы формирование изображения хорошо описывается с помощью геометрической оптики. Изображения объемных предметов имеют практически одинаковое качество по всему полю.

В геометрически-ограниченной системе уменьшение апертуры (закрытие диафрагмы) в определенных пределах улучшает качество изображения (уменьшается кружок нерезкости), а в дифракционно-ограниченной системе – ухудшает всегда (размывается диск Эри).

# Функция передачи контраста в оптической системе



Степень контрастности изображения (отношение контраста предмета в контрасту его изображения) быстро убывает с ростом пространственной частоты

# Лекция 6.

**Методы усиления контраста в  
микроскопии: темное поле,  
фазовый контраст,  
интерференционный контраст**

**Методы усиления  
контраста в проходящем  
свете – визуализация  
неокрашенных препаратов**

# Метод темного поля

Принцип метода – в объектив попадает только свет, преломленный или рассеянный объектом (Зидентопф, 1907, 1909).

Для получения яркого и контрастного изображения используется объектив с регулируемой апертурой и специальный высокоапертурный конденсор.

Ограничение метода: часто видны только наружные границы объекта, а внутренняя структура может не разрешаться.



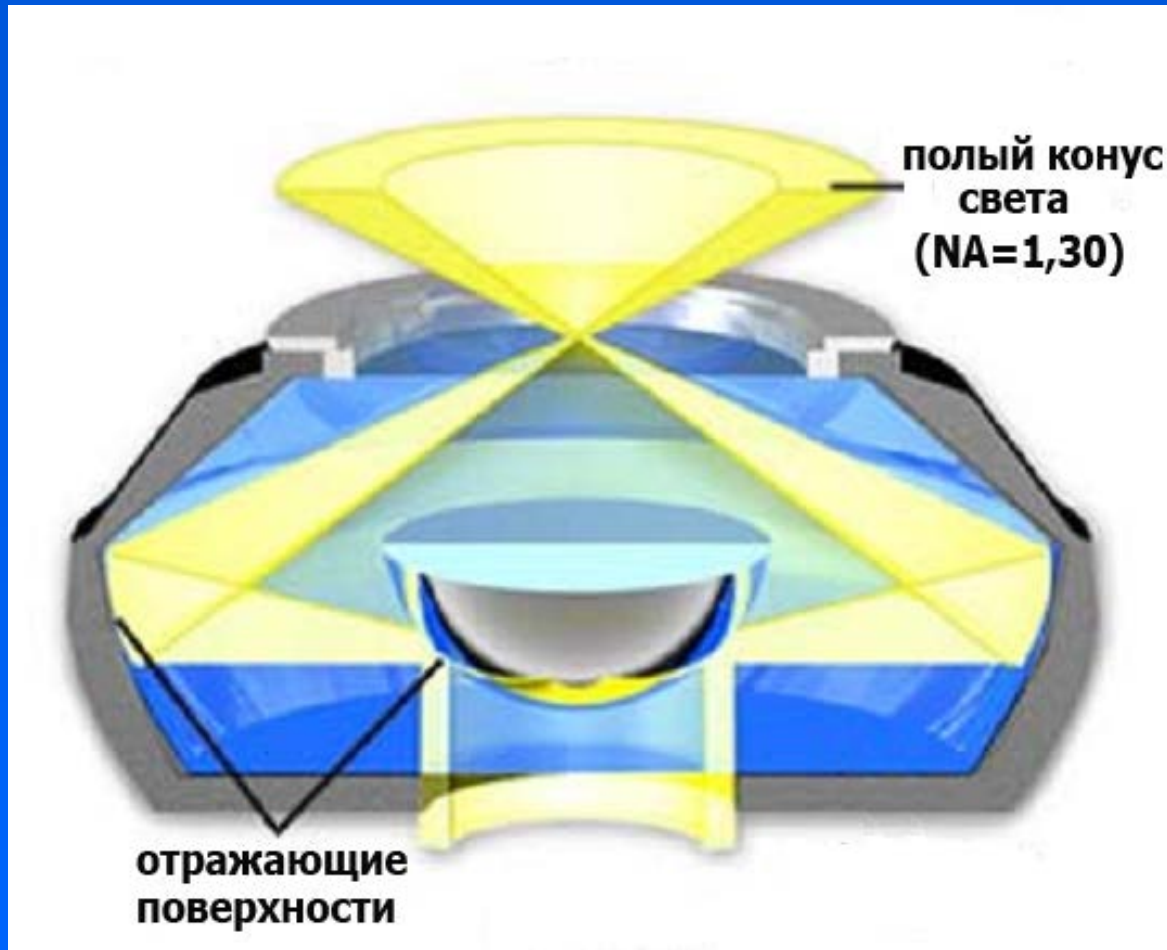
# Освещение в темном поле

Малое увеличение – сухой конденсор с центральным экраном и диафрагмой

Большое увеличение (иммерсия) – иммерсионный кардиоидный конденсор с постоянной апертурой, иммерсионный объектив с апертурной диафрагмой

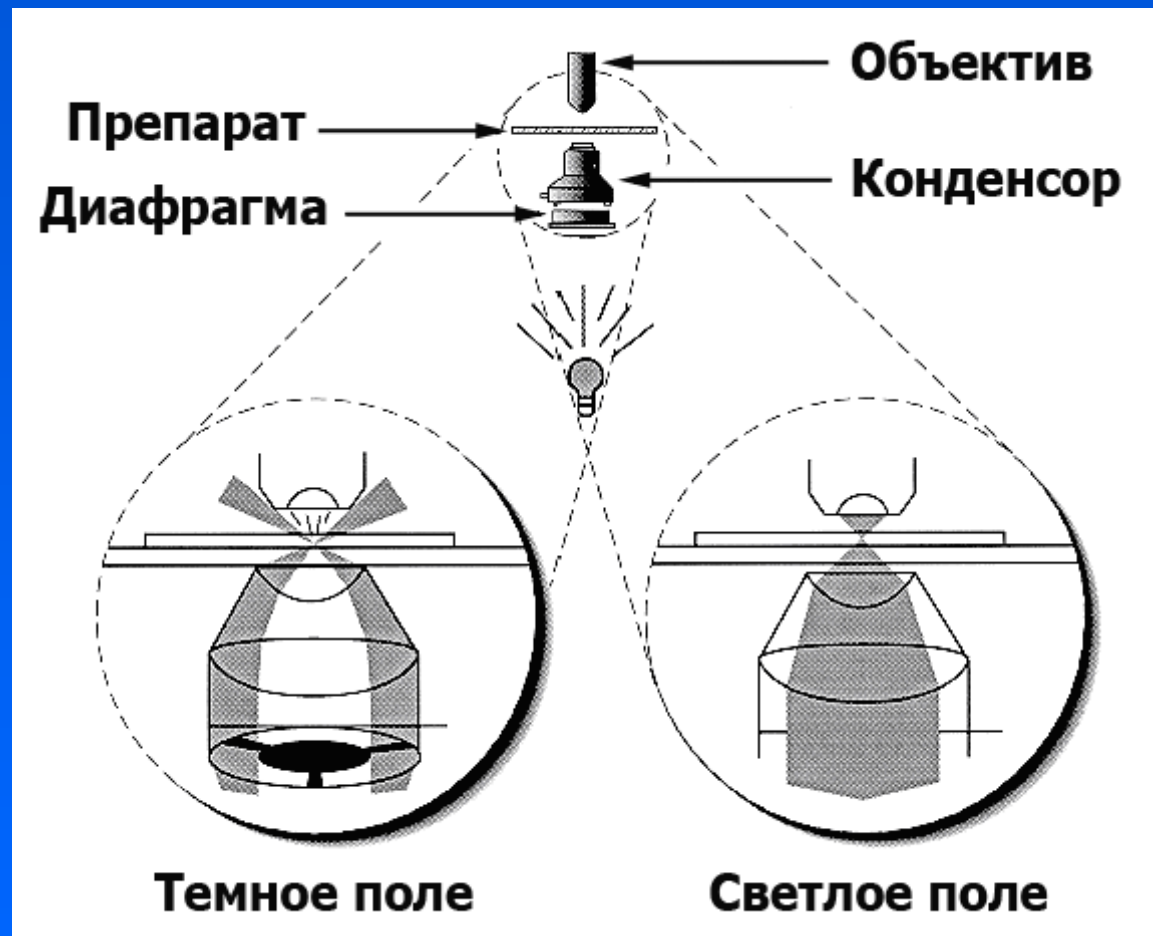
Для живых объектов максимальная апертура конденсора – 1, 336.

# Кардиоидный конденсор

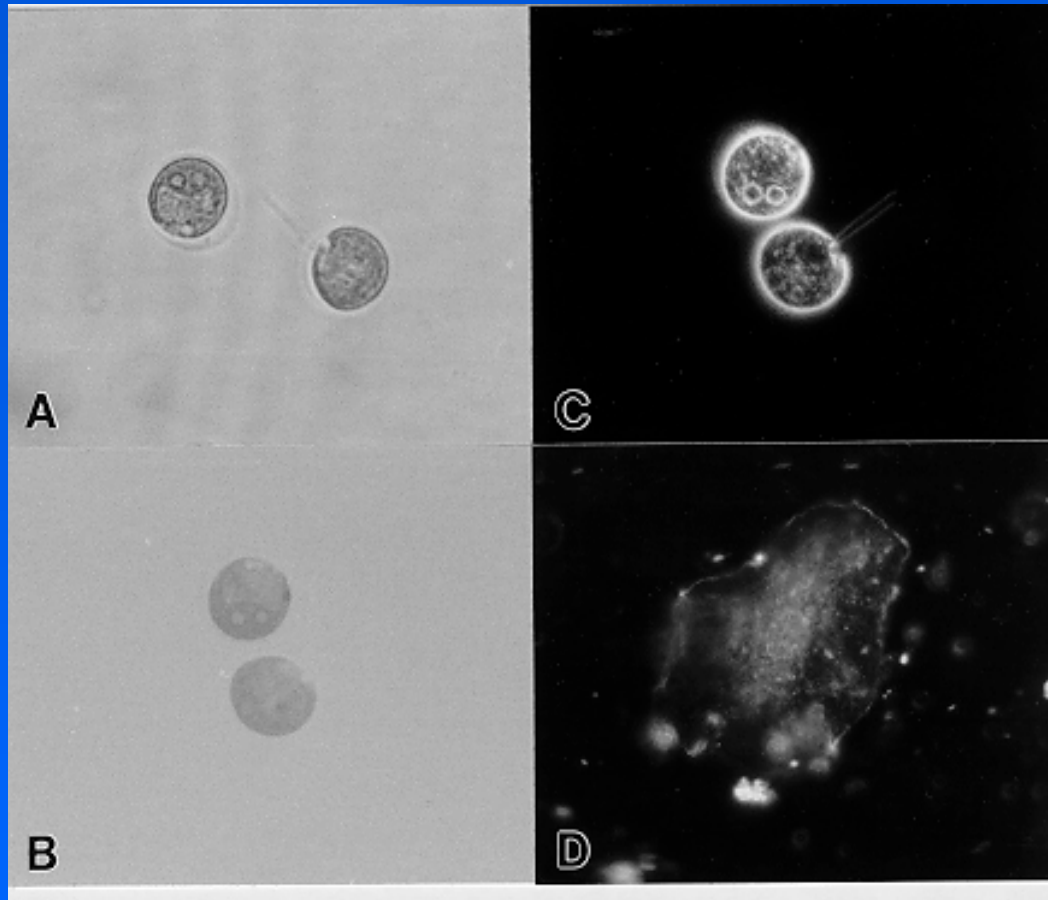


Кардиоидный конденсор создает полый конус света, внутренний угол которого немного превышает апертуру объектива.

# Ход лучей в темном поле



# Темнопольные изображения



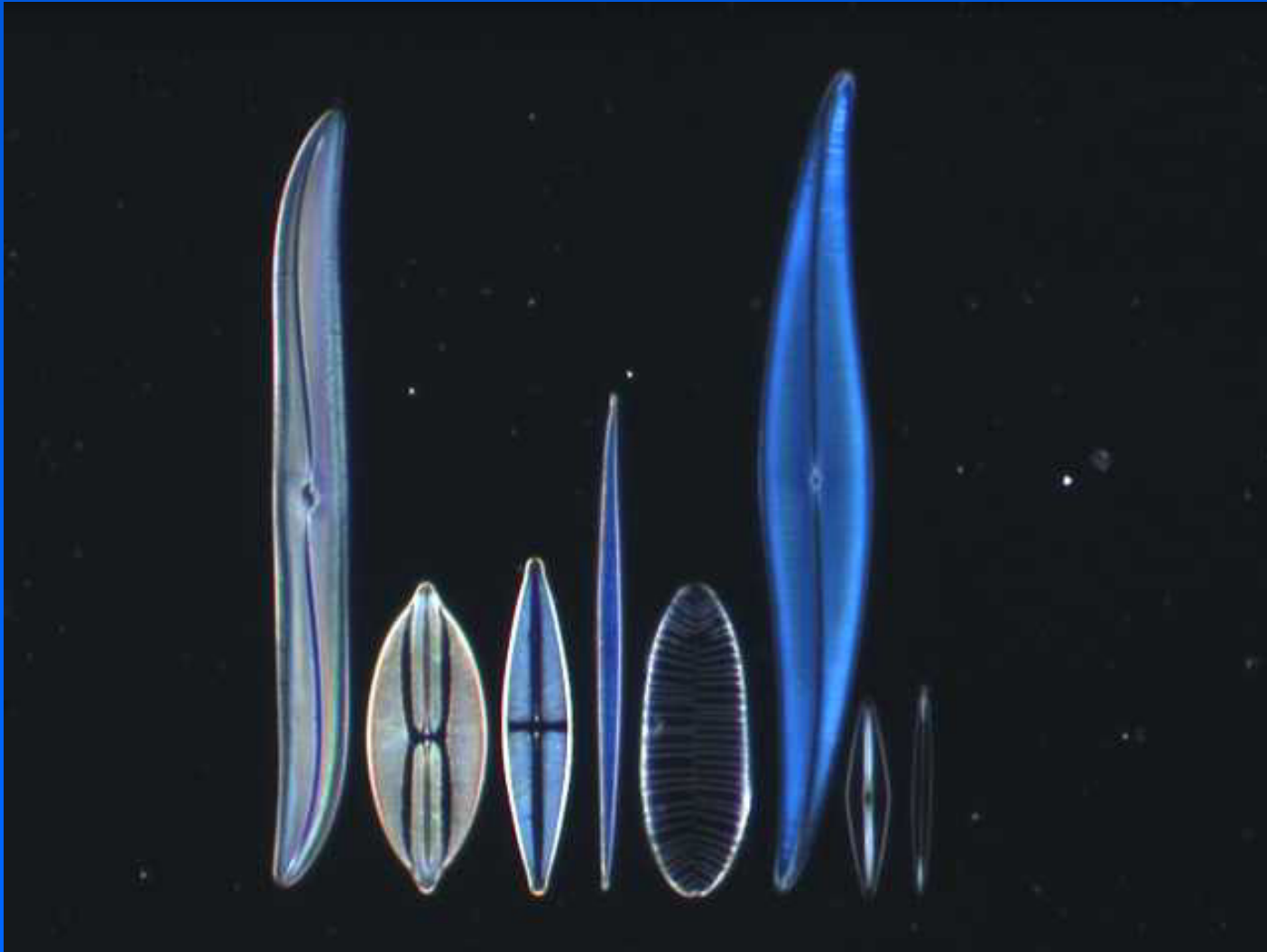
**А-С – хламидомонады; D – буккальный эпителий**  
**А – светлое поле, конденсор опущен; В – светлое поле, освещение по Келеру; С, D – темное поле**

# Бактерия в темном поле



Бактерия среди эритроцитов. Видны только границы клеток.

# Диатомовые водоросли в темном поле



# Разрешающая способность микроскопа в темном поле

Определяется яркостью источника света и точностью настройки хода лучей.

Минимальный диаметр частиц – 40 нм;  
толщина нитчатых структур – 15-20 нм  
(бактериальные жгутики, отдельные микротрубочки).

# Фазовый контраст

## Принцип метода:

Падающий свет проходит через кольцевую диафрагму конденсора и его интенсивность ослабляется кольцевой пластинкой, напыленной в объективе.

Изображение формируется как результат интерференция двух волновых фронтов: прямого света и света, преломленного объектом.

Для эффективной интерференции преломленный свет дополнительно замедляется на  $\frac{1}{4}$  длины волны.



# Опыты Цернике

**Опыт 1.** Мелкие частицы угля дают при освещении по Келеру темное изображение – диск Эри.

**Опыт 2.** Если при коноскопическом освещении закрыть диафрагму конденсора и в з.ф.п. объектива расположить маленький экран, закрывающий диск Эри, то изображение частицы окажется светлым диском Эри на темном фоне.

**Опыт 3.** Если в тех же условиях заменить маленькую маску в з.ф.п. объектива на большую, но с отверстием, соответствующим диску Эри в центре, то изображение частицы полностью исчезает.

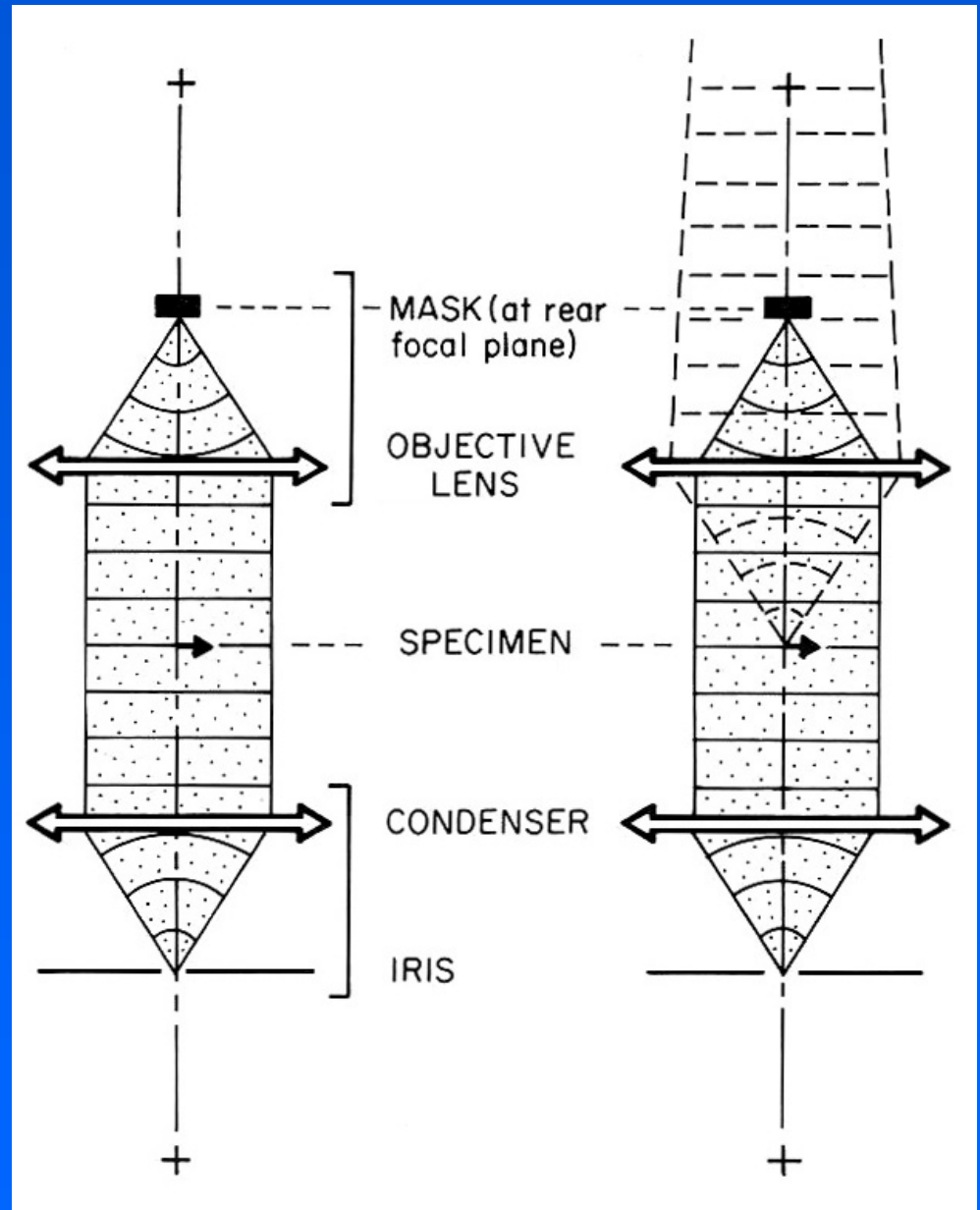
**Опыт 4.** Берется прозрачный образец, который не дает изображения при настройке света по Келеру и точной фокусировке. Однако он дает видимое, но малоконтрастное изображение при дефокусировке.

**Опыт 5.** Аналогично опыту 2 в з.ф.п. объектива располагается маленький непрозрачный экран. Тогда объект становится виден как светлый диск Эри.

Таким образом, прозрачный и непрозрачный объекты преломляют и рассеивают свет.

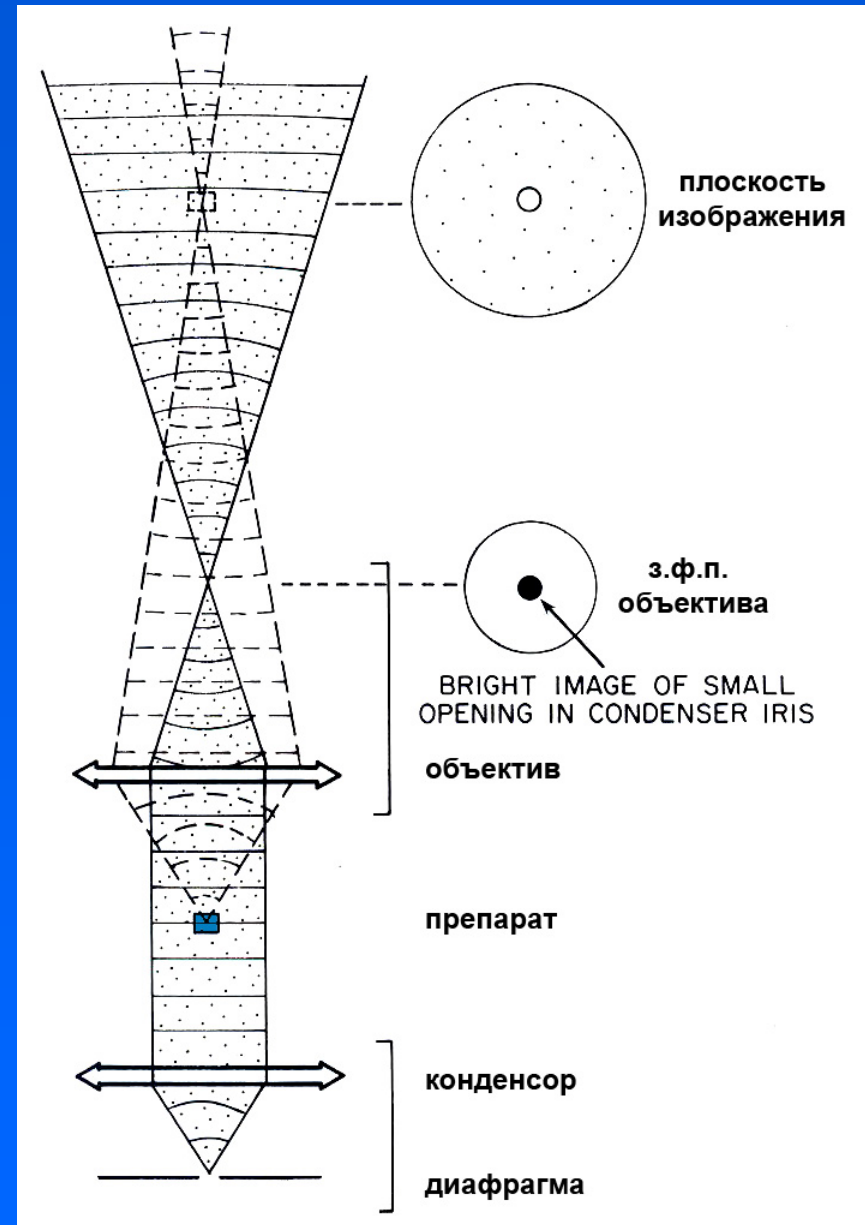
**Опыт 2.** Если закрыть диафрагму конденсора и в з.ф.п. объектива расположить маленький экран, закрывающий диск Эри, то изображение частицы окажется светлым диском на темном фоне.

**Опыт 3.** Если заменить маленькую маску в з.ф.п. объектива на большую, но с отверстием, которое соответствует диску Эри в центре, то изображение частицы полностью исчезает



**Опыт 4.** Берется прозрачный образец, который не дает изображения при настройке света по Келеру и точной фокусировке. Однако он дает слабое изображение при дефокусировке.

**Опыт 5.** В з.ф.п. объектива ставится маленький непрозрачный экран. Тогда объект становится виден в плоскости изображения как светлый диск Эри.



# Поглощающие и фазовые объекты

**Поглощающий объект – виден в проходящем свете за счет поглощения прямого света.**

**Изменения волнового фронта, создаваемые объектом, несущественны для наблюдения.**

**Фазовый объект – плохо виден в проходящем свете (малое поглощение), однако модифицирует волновой фронт за счет преломления и отражения части света.**

**Метод темного поля – выделение света, преломленного и рассеянного объектом (модифицированного волнового фронта).**

**Метод фазового контраста – суперпозиция методов светлого и темного поля.**

# Выводы Цернике

Свет, преломленный поглощающим объектом, отстает на половину длины волны, и поэтому эффективно интерферирует в з.ф.п. объектива с непреломленным светом.

Свет, преломленный непоглощающим (фазовым) объектом, отстает на четверть длины волны, и их интерференция неэффективна.

Для того, чтобы интерференция прошедшего и преломленного света давала различия в яркости, их сдвиг должен составлять около половины длины волны, а интенсивность быть примерно одинаковой.

Для достижения этих целей используется специальная «фазовая» пластинка для объектива и кольцевая диафрагма конденсора.

В микроскопе наиболее эффективной оказывается пластинка с вытравленной в ней кольцевой канавкой для прямого света.

# Устройство фазового контраста

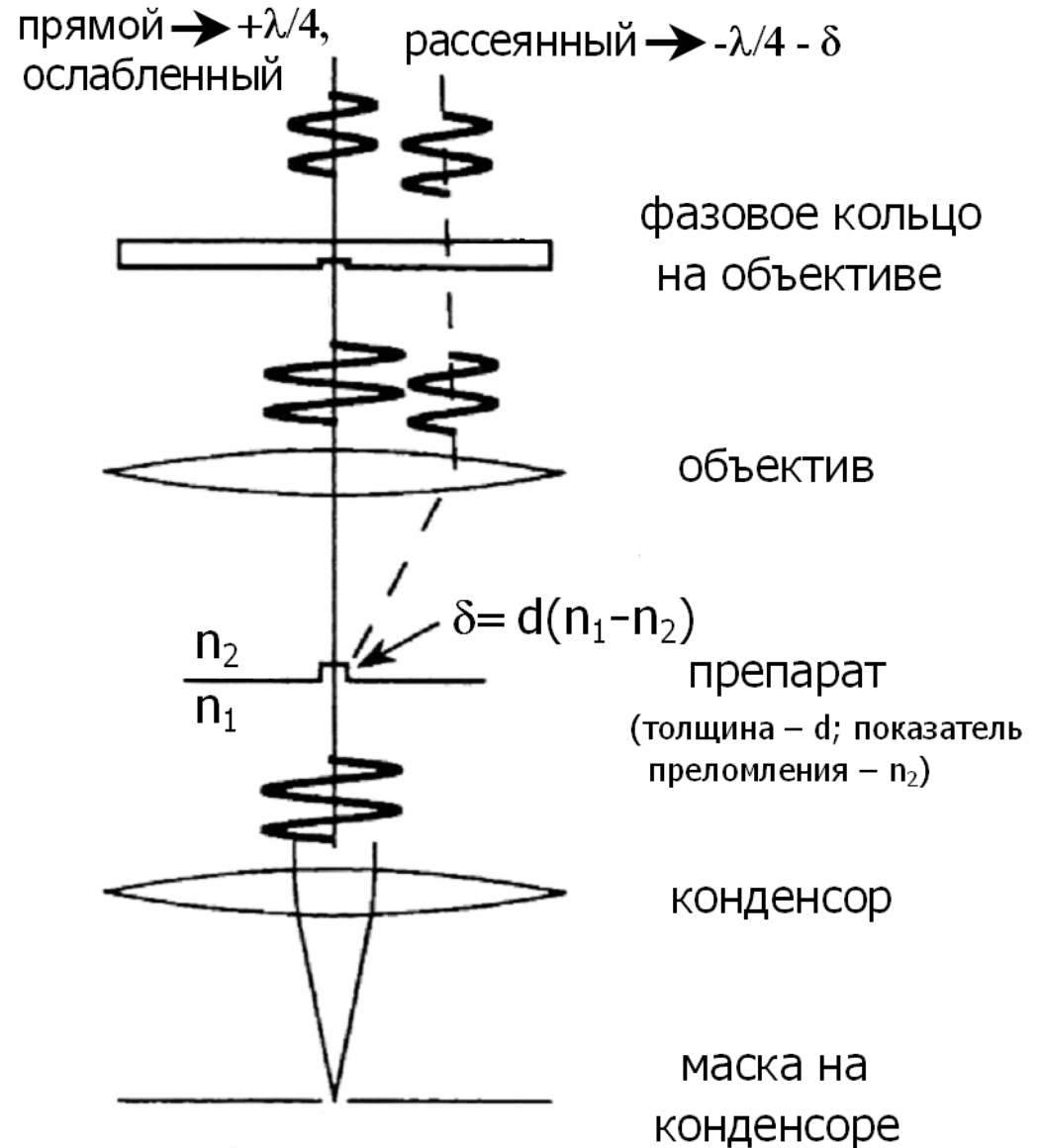
Световой фронт, преломленный объектом, дополнительно сдвигается (отстает) от проходящего фронта на четверть длины волны.

Свет, прошедший через объект без преломления, ослабляется в такой степени, чтобы его интенсивность примерно соответствовала интенсивности преломленного света (в 4 раза и более).

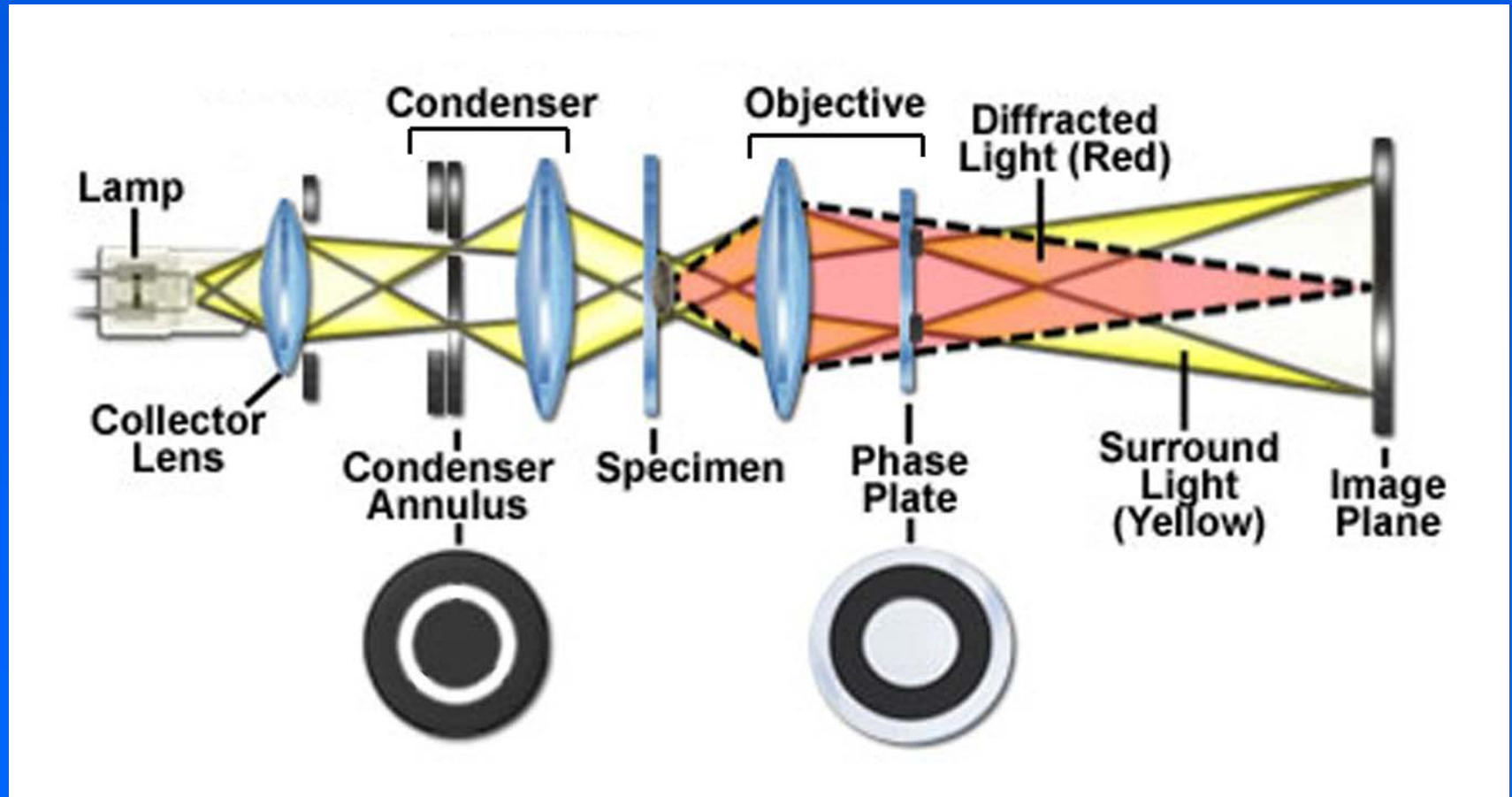
Освещение препарата производится через кольцевую диафрагму конденсора, которая имеет апертуру, соответствующую кольцевой пластинке в объективе.

Максимальная эффективность наблюдения (максимальный контраст) рассчитывается на использование зеленого света (546 нм).

# Ход лучей в ПОЗИТИВНОМ фазовом контрасте

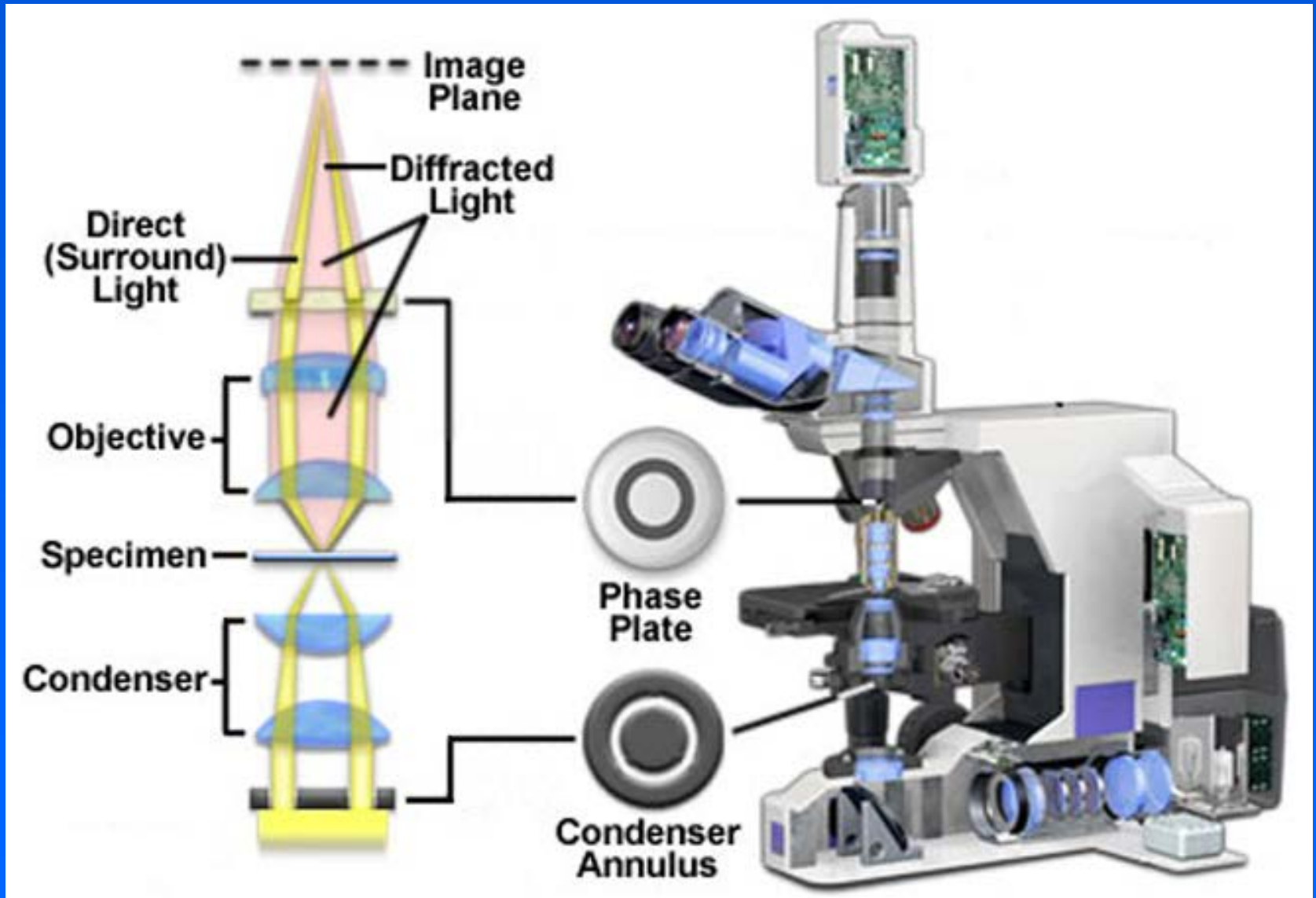


# Формирование изображения в фазовом контрасте

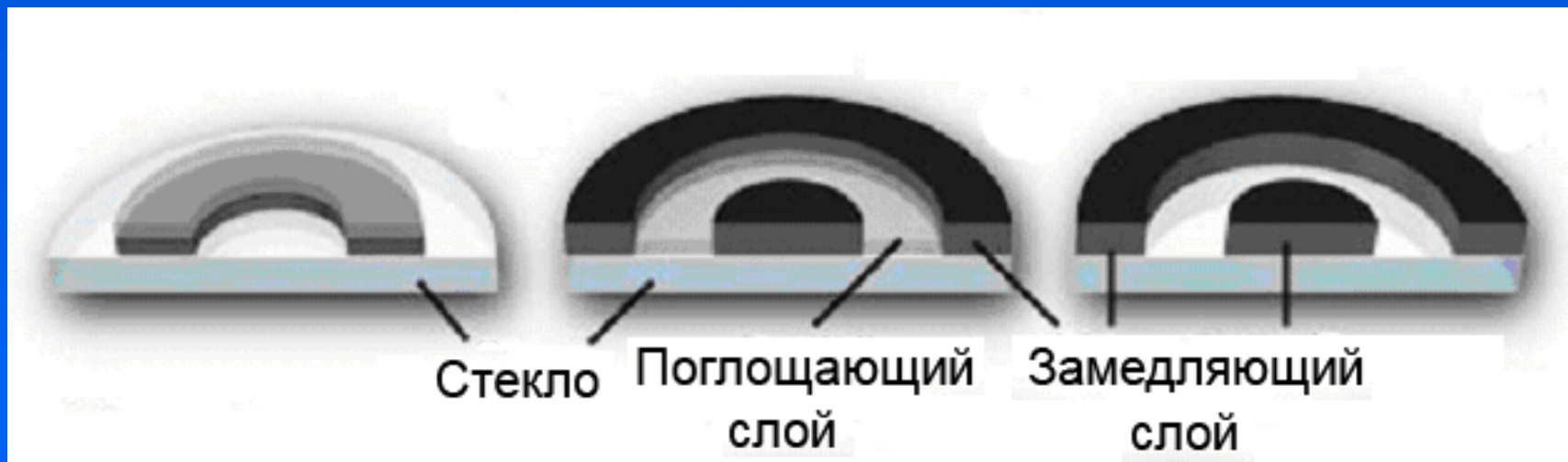




# Фазовоконтрастный микроскоп



# Строение фазового кольца объектива

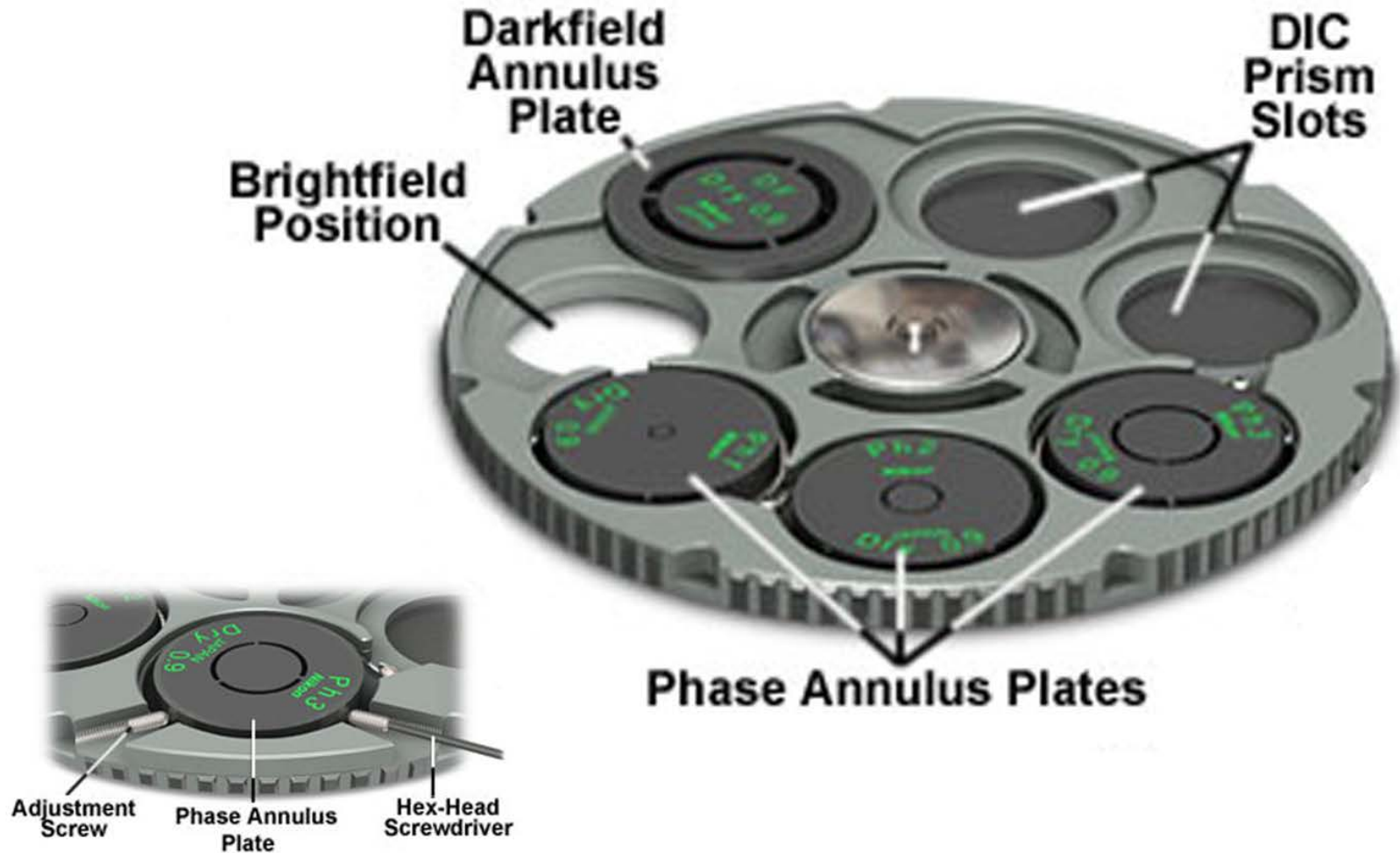


Поглощающий слой (серебро) напыляется на поверхность вытравленной канавки. Глубина канавки рассчитывается исходя из коэффициента преломления стекла (линзы объектива) и длины волны света – 546 нм.

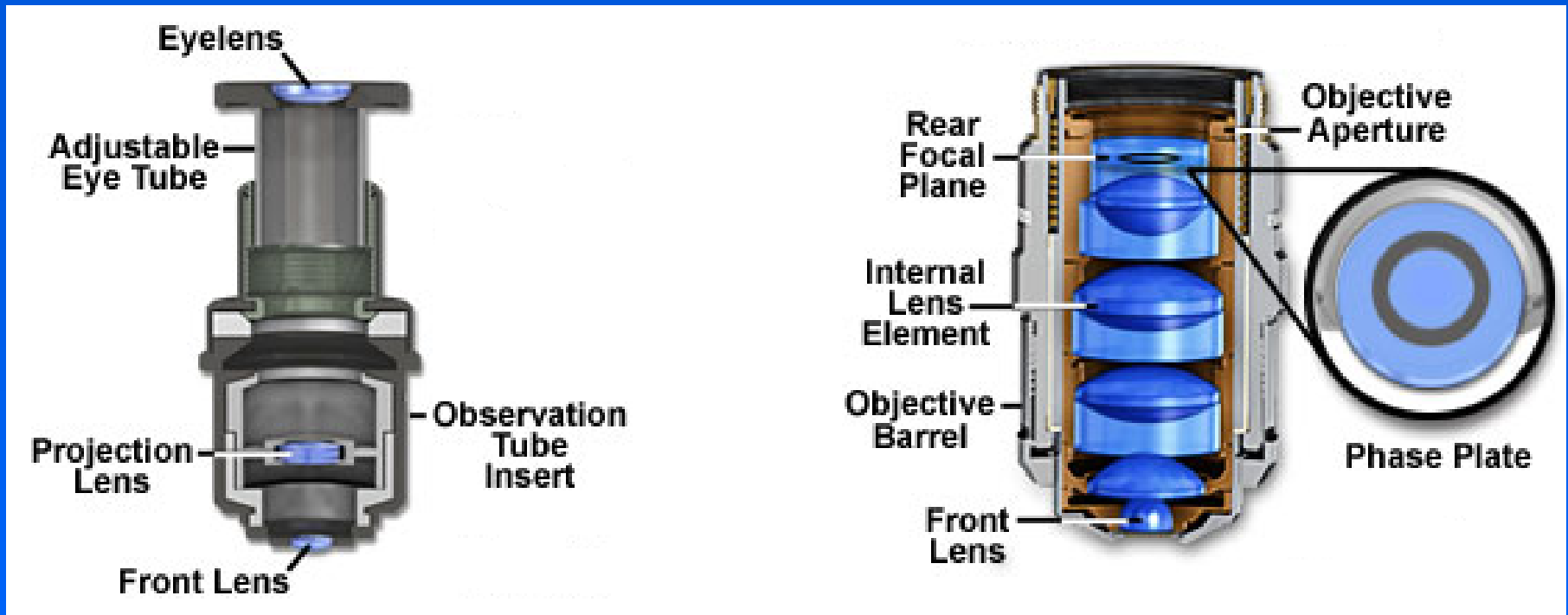
# Комплект для фазового контраста



# Револьвер конденсора



# Фазовый телескоп и объектив

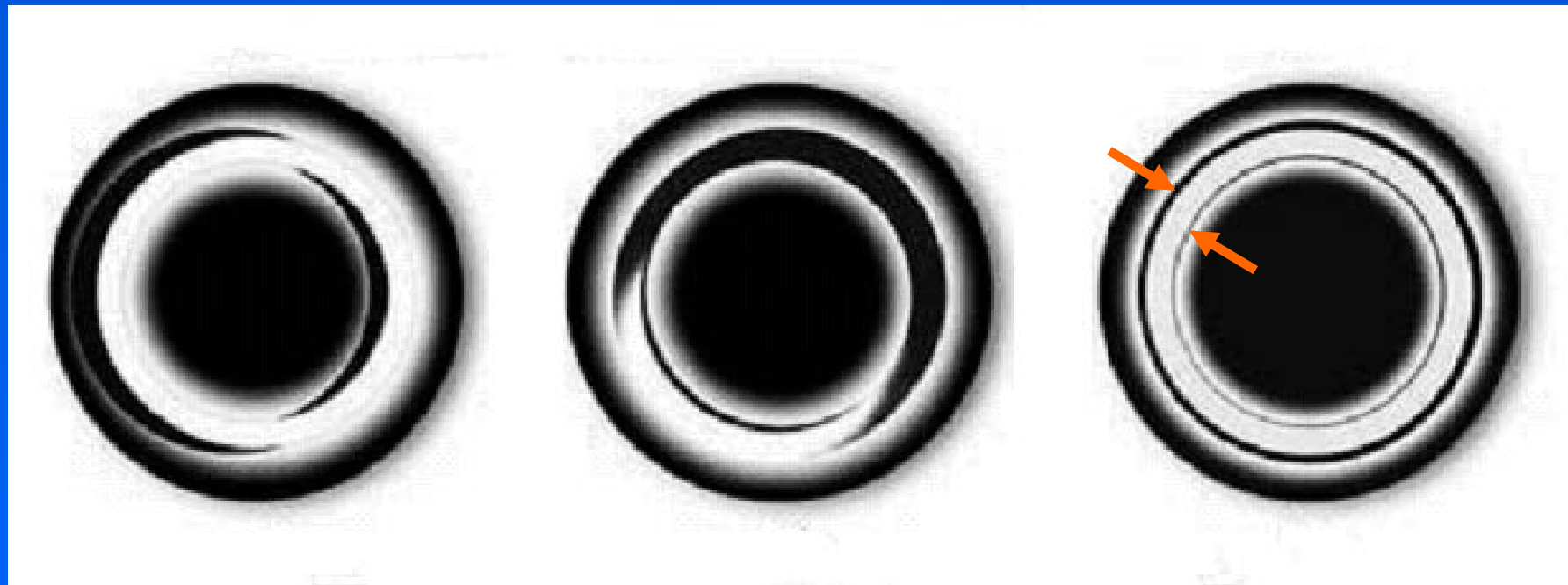


**Фазовый «телескоп» - специальный микроскоп, который вставляется в тубус вместо окуляра и фокусируется на з.ф.п.**

# Установка света в фазовом контрасте

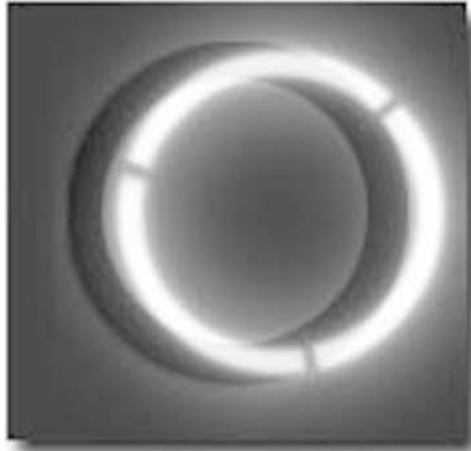
1. Установите полупрозрачный и достаточно тонкий препарат на столик микроскопа и конденсор в режим светлого поля. Для наведения на фокус вам может понадобиться закрыть апертурную диафрагму конденсора.
2. Установите в микроскопе свет по Келеру. Изображение станет практически невидимым.
3. Выньте окуляр, и установите вместо него вспомогательный микроскоп. Сфокусируйте вспомогательный микроскоп на заднюю фокальную плоскость объектива. На светлом поле будет резко видна серая кольцевая пластинка – фазовое кольцо объектива.
4. Полностью откройте апертурную диафрагму конденсора. Установите в ход лучей в конденсоре кольцевую (фазовую) диафрагму, соответствующую выбранному объективу. Диафрагма конденсора будет иметь вид яркого светлого кольца.
5. Юстировочными винтами фазового кольца конденсора совместите два изображения. Светлое кольцо (конденсора) должно расположиться полностью внутри темного кольца (объектива). Если видимая ширина светлого кольца равна или больше, чем ширина темного, то первую можно несколько уменьшить, перемещая конденсор вверх или вниз.

# Центрировка фазового кольца

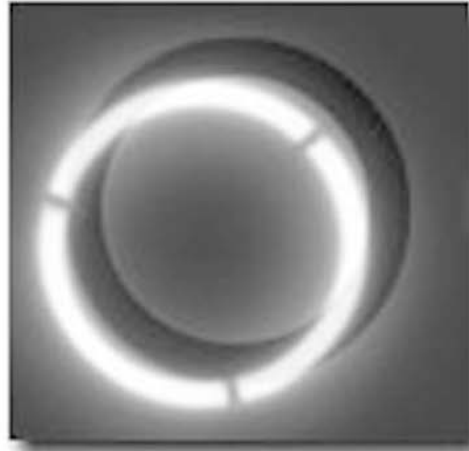


При правильной установке фазового контраста в з.ф.п. светлое кольцо должно полностью находиться внутри темного кольца. Чем больше ширина темных ободков, тем выше контраст.

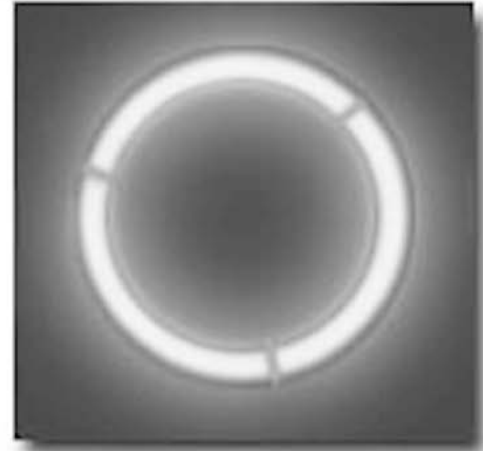
# Центрировка фазового кольца



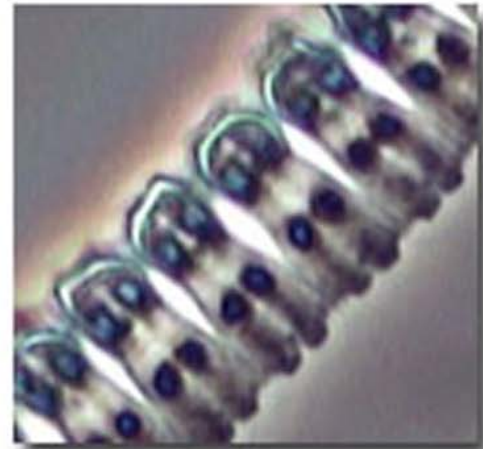
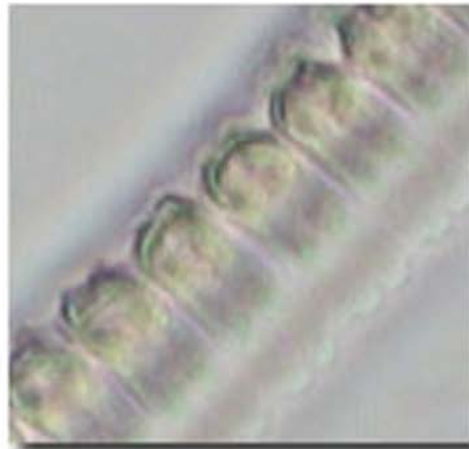
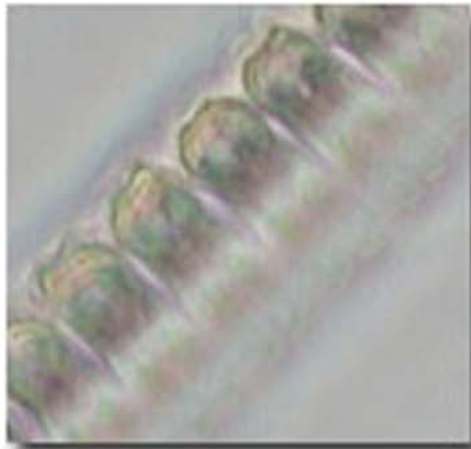
a



b



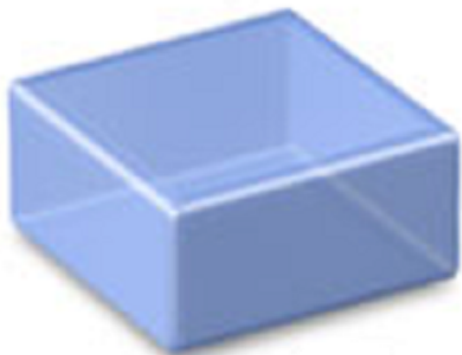
c



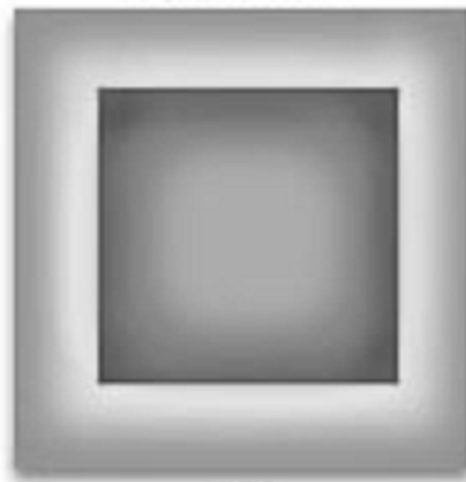


# Кайма вокруг краев

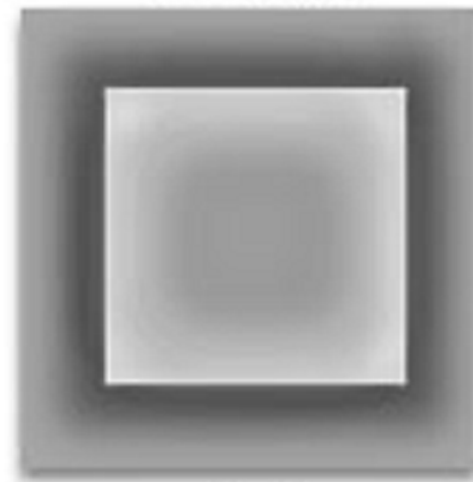
ФАЗОВЫЙ ОБЪЕКТ



ПОЗИТИВНЫЙ КОНТРАСТ



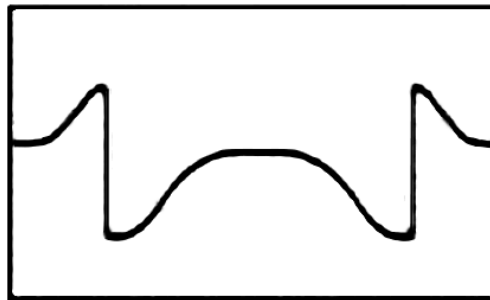
НЕГАТИВНЫЙ КОНТРАСТ



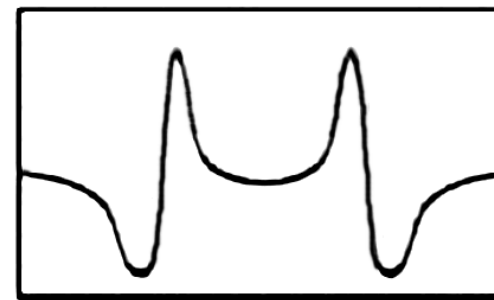
ОПТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ (ИНТЕНСИВНОСТЬ)



ФОРМАЛЬНЫЙ



ФАКТИЧЕСКИ НАБЛЮДАЕМЫЙ



# Реализация метода фазового контраста

Сдвиг волновых фронтов преобразуется в результате их интерференции в з.ф.п. объектива в разность амплитуд.

## Ограничения:

1. Эффективный контраст возникает только тогда, когда величина сдвига одного фронта относительно другого незначительно отличается от половины длины волны.
2. Темные и светлые объекты окружены каймой с противоположной яркостью. Ширина каймы зависит от разности оптического хода двух фронтов.

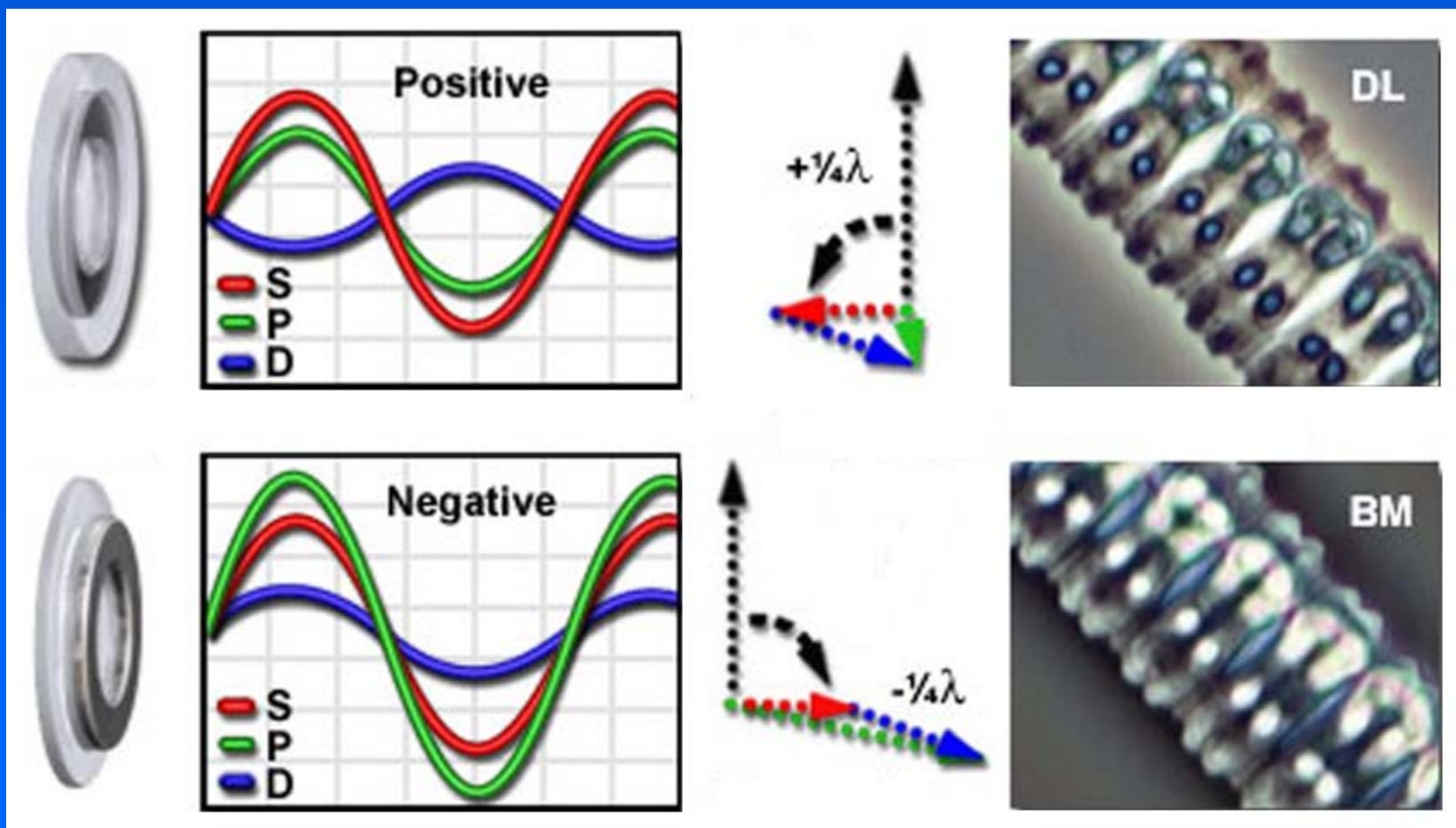
# Типы фазового контраста

**Позитивный фазовый контраст +  $\frac{1}{4}$  длины волны (травление). Объекты, замедляющие свет, выглядят темнее фона.**

**Негативный фазовый контраст -  $\frac{1}{4}$  длины волны (напыление). Объекты, замедляющие свет, выглядят светлее фона.**

**Аноптральный или фазово-темнопольный контраст – большой диаметр запирающего кольца, малое светопропускание.**

# Позитивный и негативный фазовый контраст



# Объективы для фазового контраста

Маркировка – Ph + цифра (номер кольца).

Типы: планахроматы, флюоритовые, планапохроматы.

Недостаток – немного сниженное светопропускание (~на 5-10%).

Максимальный контраст достигается при использовании зеленого светофильтра.

# Интерференционный контраст

## Принцип метода:

Падающий свет делится на два волновых фронта. Изображение формируется как результат интерференция двух волновых фронтов, прошедших через разные области поля зрения.

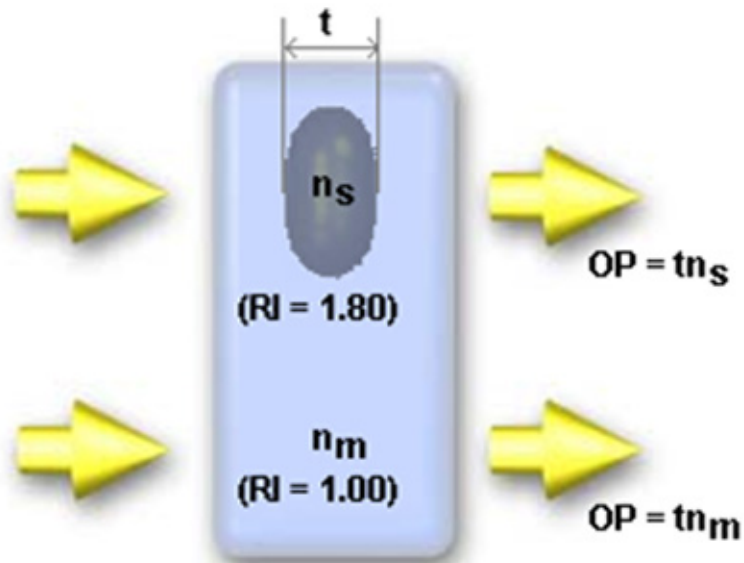
Существует две основных системы – микроскоп Жамина-Лебедева и система Номарского.

В первом случае происходит интерференция двух фронтов, разделенных большим расстоянием (десятки микрон), то есть сравнивается свет прошедший через объект и мимо объекта.

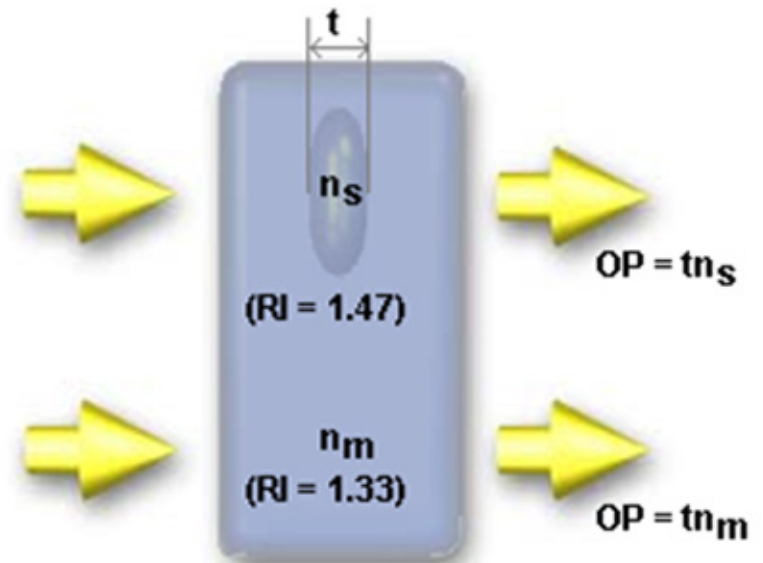
В системе Нормаского сдвиг фронтов минимален, и фактически выявляется градиент изменения показателя преломления внутри объекта.

# Разность оптического хода

$$OPD = (tn(s) - tn(m)) = t(n(s) - n(m)); \text{ сдвиг фазы } \delta = (2\pi/\lambda)(OPD)$$

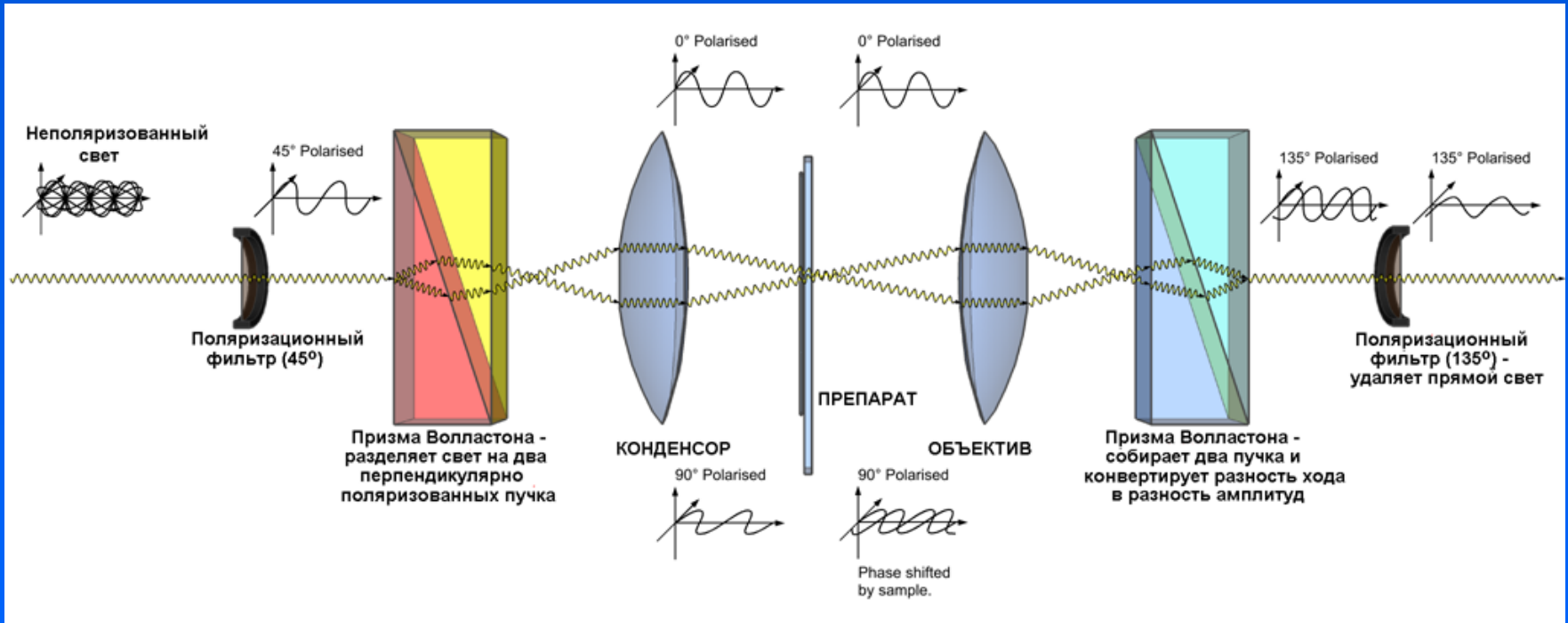


$$OPD = t(n_s - n_m) = 64 \cdot (1.80 - 1.00) = 51.2$$



$$OPD = t(n_s - n_m) = 40 \cdot (1.47 - 1.33) = 5.5$$

# Ход лучей при дифференциальном интерференционном контрасте



Поляризатор и анализатор повернуты под углом  $45^\circ$  к плоскости разделения лучей призмами Волластона и под углом  $90^\circ$  друг к другу. Это обеспечивает равную интенсивность двух волновых фронтов и позволяет свести к минимуму прямой свет.



# Дифференциальный интерференционный контраст

Сдвиг волнового фронта преобразуется в разность амплитуд в результате интерференции двух почти совпадающих фронтов, создаваемых за счет двулучепреломляющей системы.

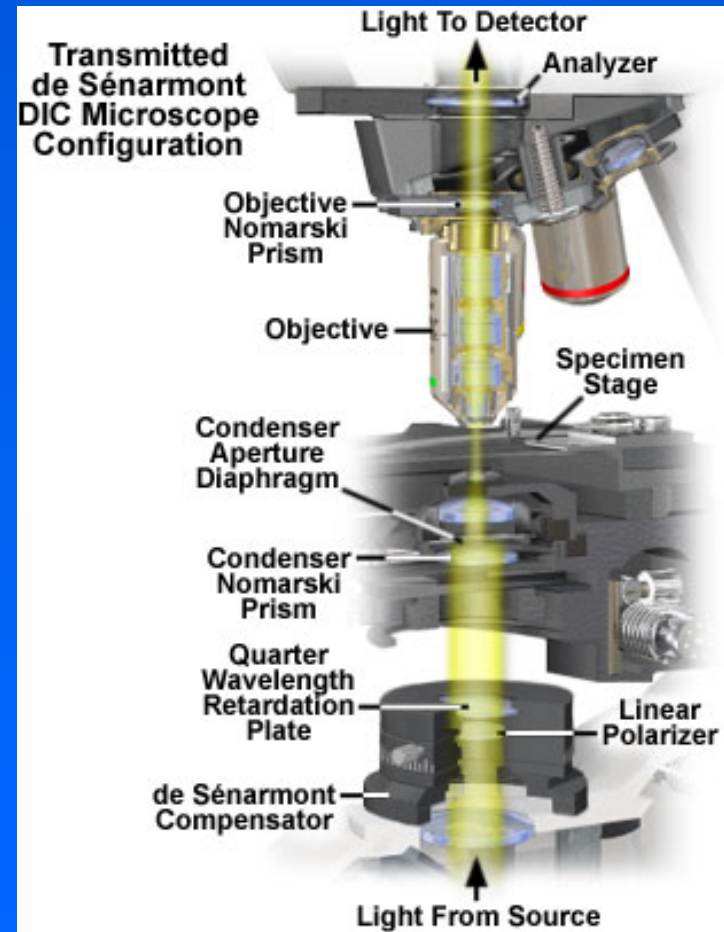
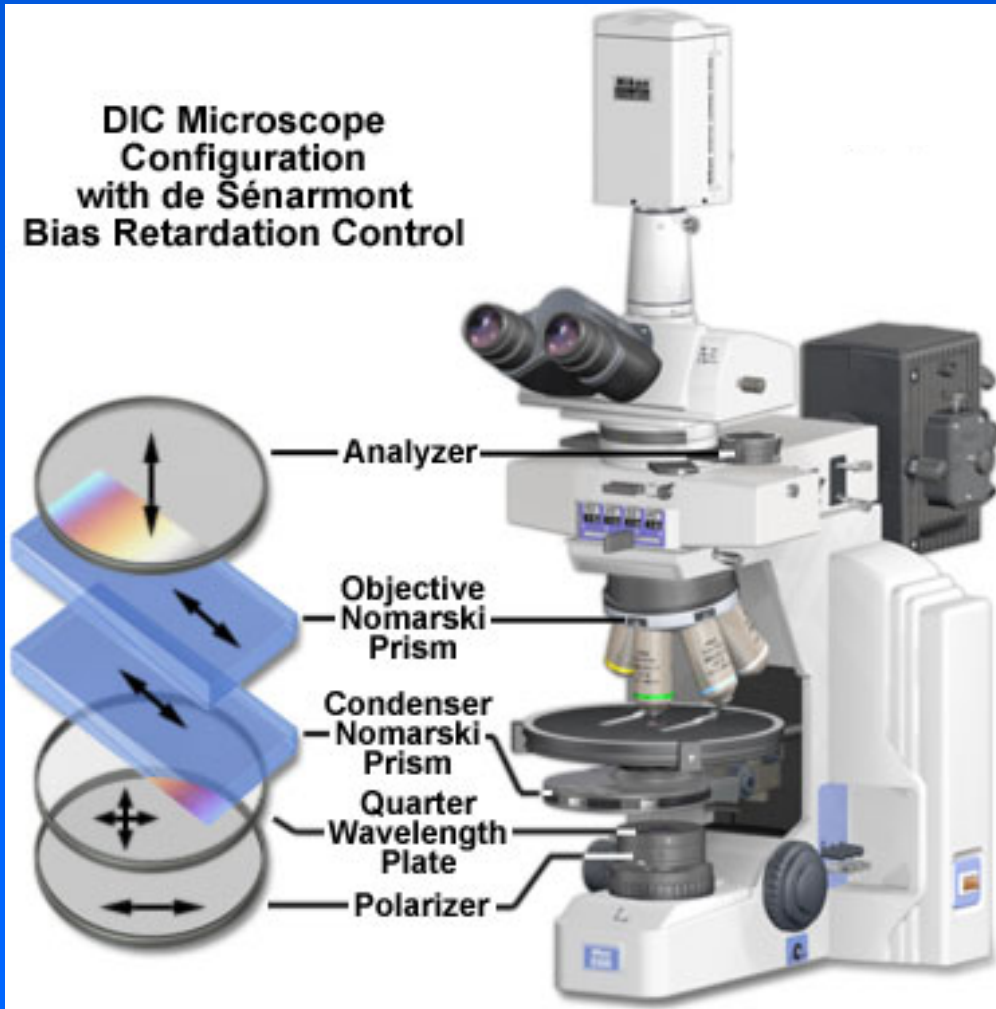
Прямой проходящий свет подавляется с помощью скрещенных поляризатора и анализатора.

Направление и величина сдвига одного фронта относительно другого регулируются настройками микроскопа.

Фактически DIC контраст отражает градиент изменения оптической плотности внутри препарата.

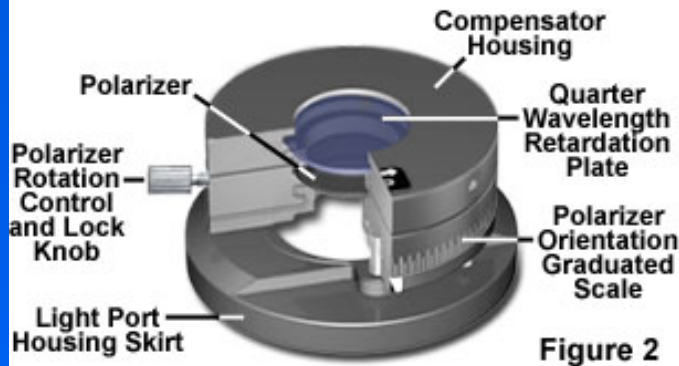
# Интерференционный контраст

DIC Microscope Configuration with de Sénarmont Bias Retardation Control



# Комплектующие к DIC

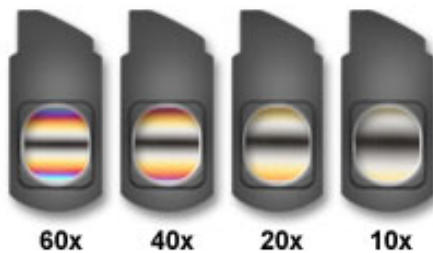
Base Mounted de Sénarmont Compensator



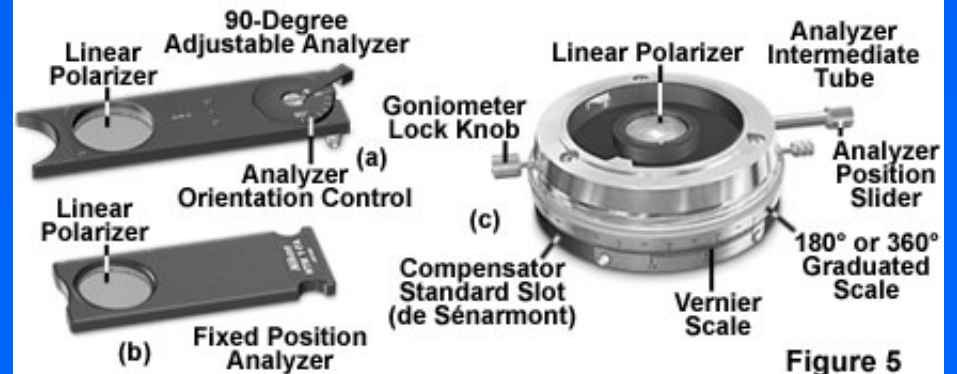
Universal Condenser Turret DIC Configuration



Fixed Nomarski Objective Prisms



de Sénarmont DIC Microscope Analyzer Configurations



# Кадры с различным сдвигом

Bias Retardation with de Sénarmont Compensation

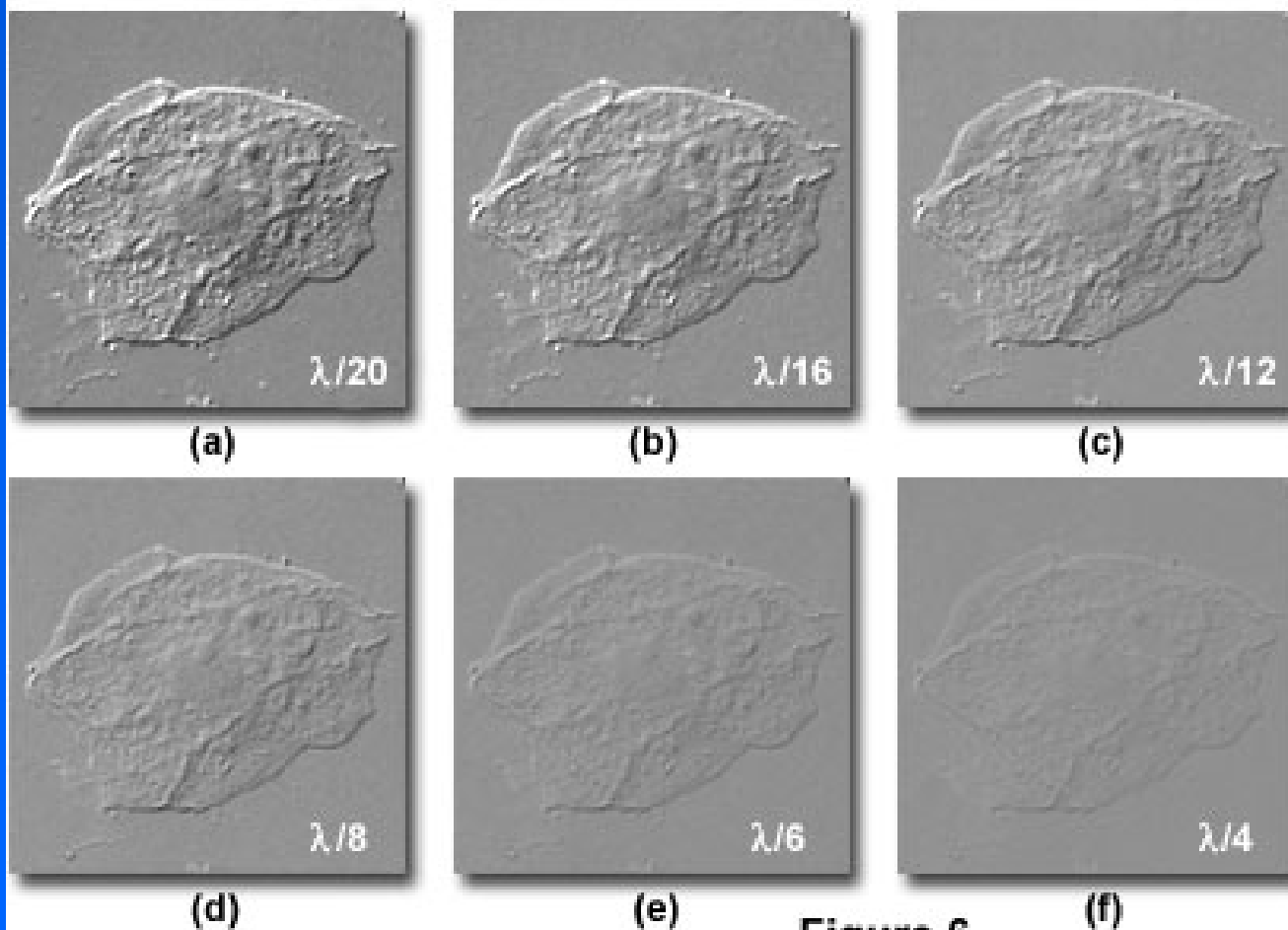
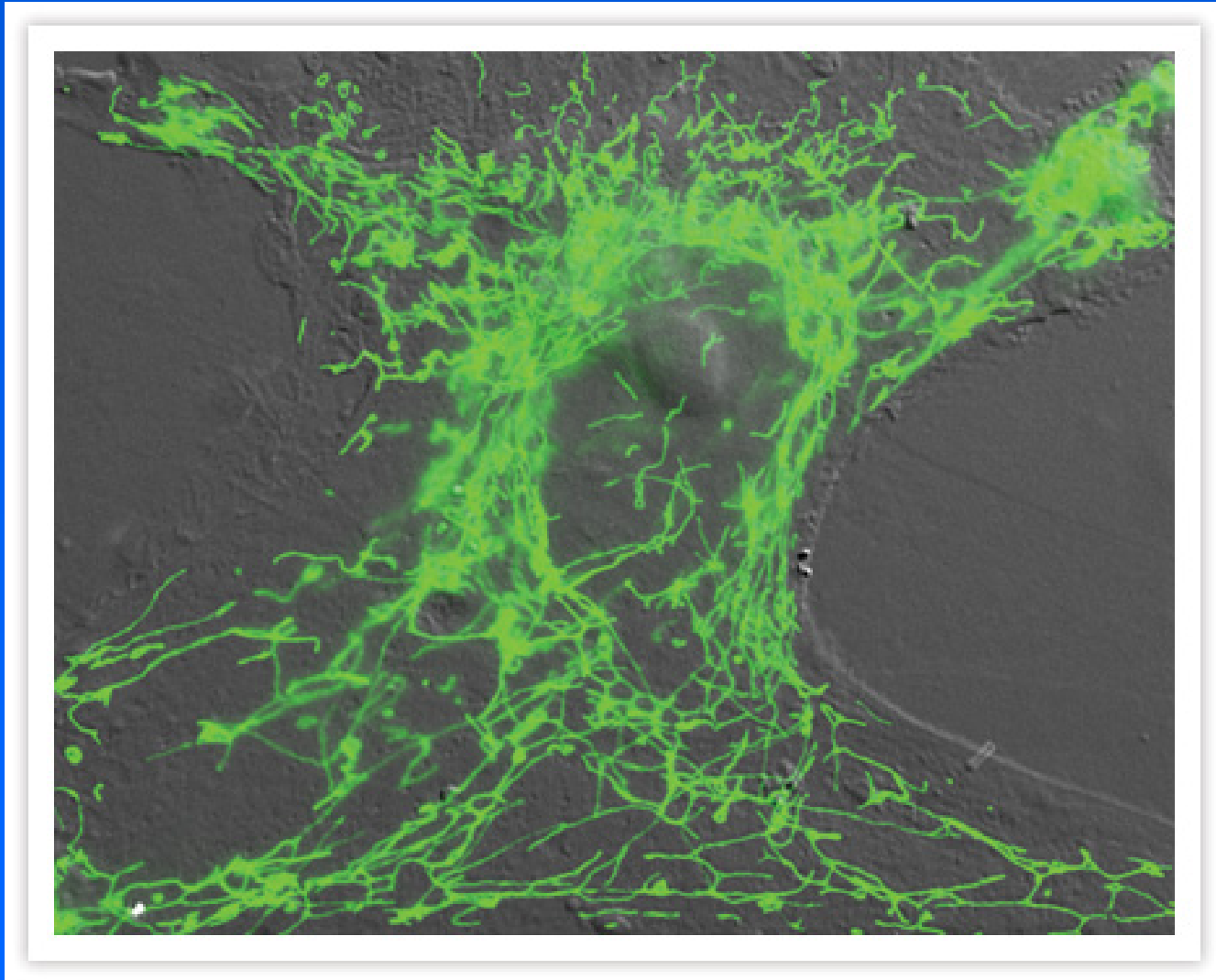
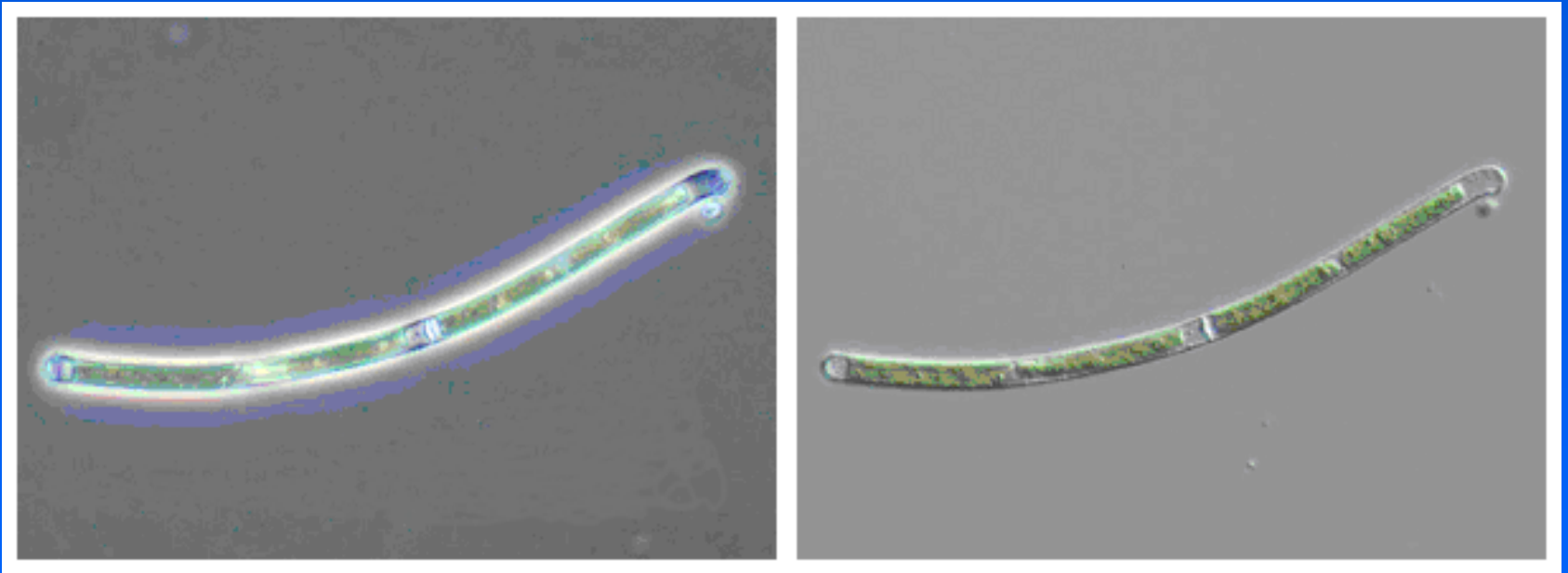


Figure 6

# Комбинированное изображение – флюоресценция и DIC



# Фазовый контраст и DIC (Nomarski)



**Сине-зеленая водоросль (цианобактерия)**

# Разные виды контраста



**bright**

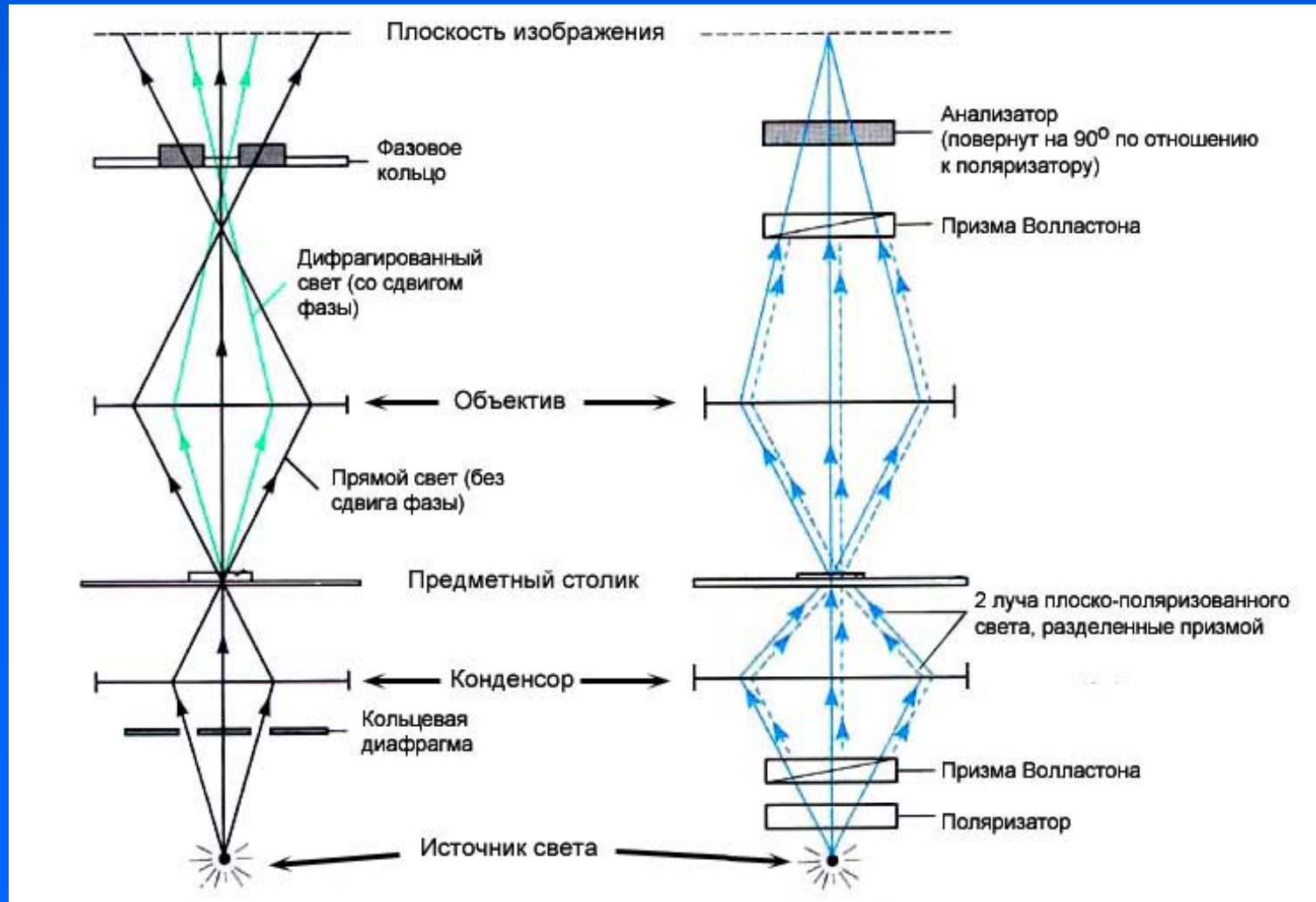


**phase**



**DIC**

# Сравнение методов фазового и интерференционного контраста





# Сравнение фазового контраста и DIC

Установка света – проще в ФК.

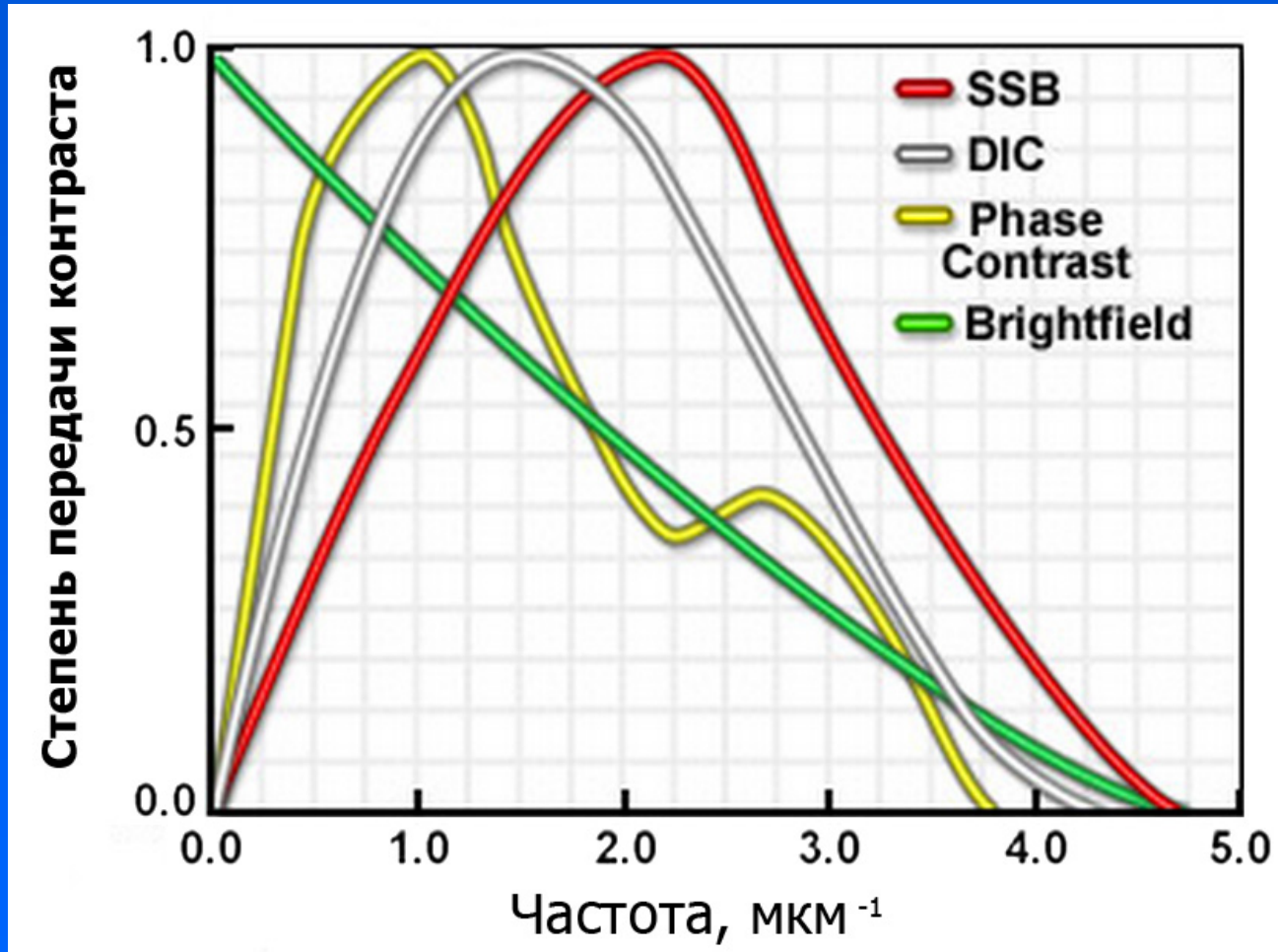
Возможности усиления контраста – больше в DIC.

Светопропускание объективов – больше в DIC.

Величина ореола (сдвига) – настраиваемая (или постоянная) в DIC и зависит от объекта в ФК.

Непрерывный контур – есть в ФК и нет в DIC.

# Сравнение различных методов



**Зависимость STF от размеров в системах с усилением контраста нелинейная, в отличие от светлого поля.**

# Лекция 7

Явление флуоресценции.

Устройство флуоресцентного микроскопа.

Источники света для флуоресцентной микроскопии

# Правило Стокса

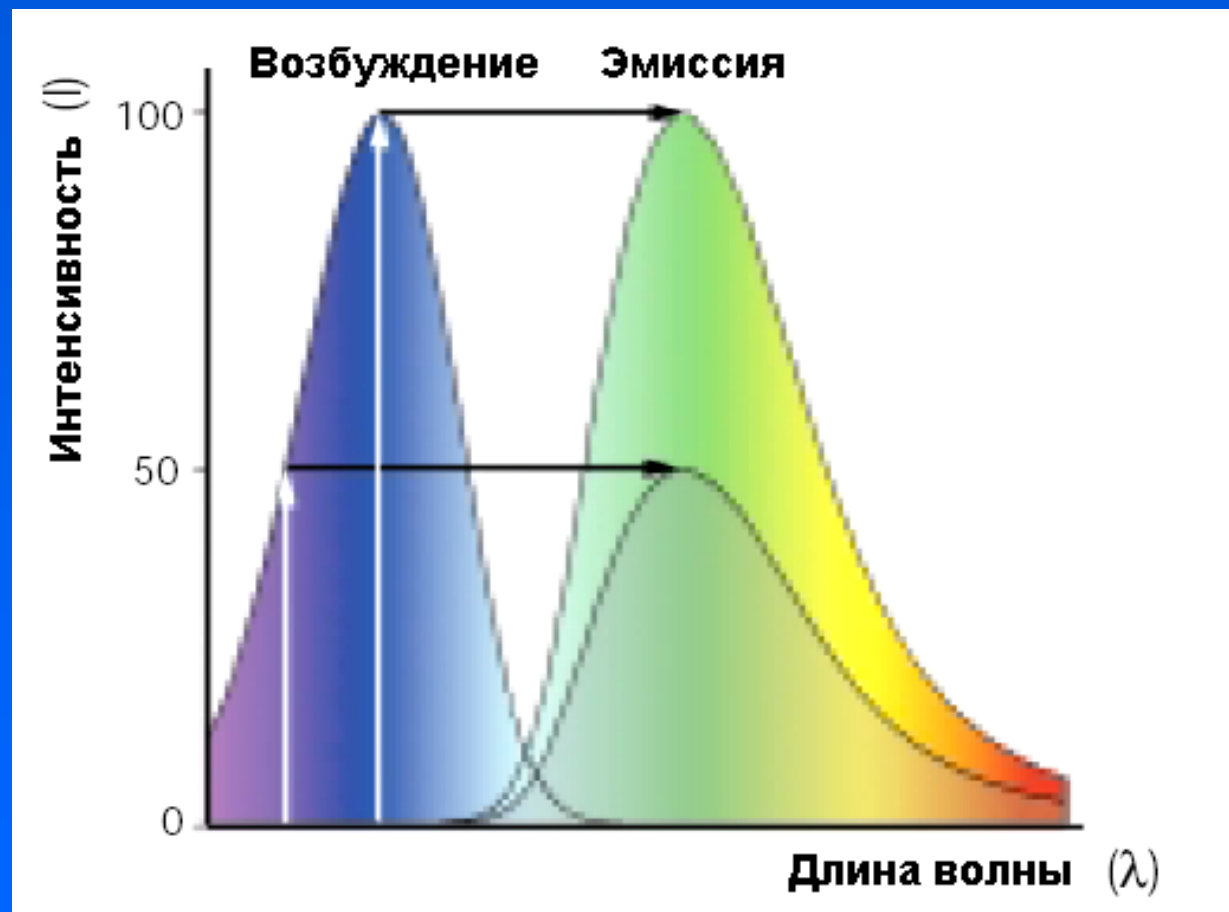
Сэр Дж. Стокс, 1-й баронет. Описал правило Стокса в 1852 г.

Спектр испускания и спектр поглощения не совпадают, причем, как правило, максимум поглощения приходится на меньшую длину волны, чем максимум испускания.

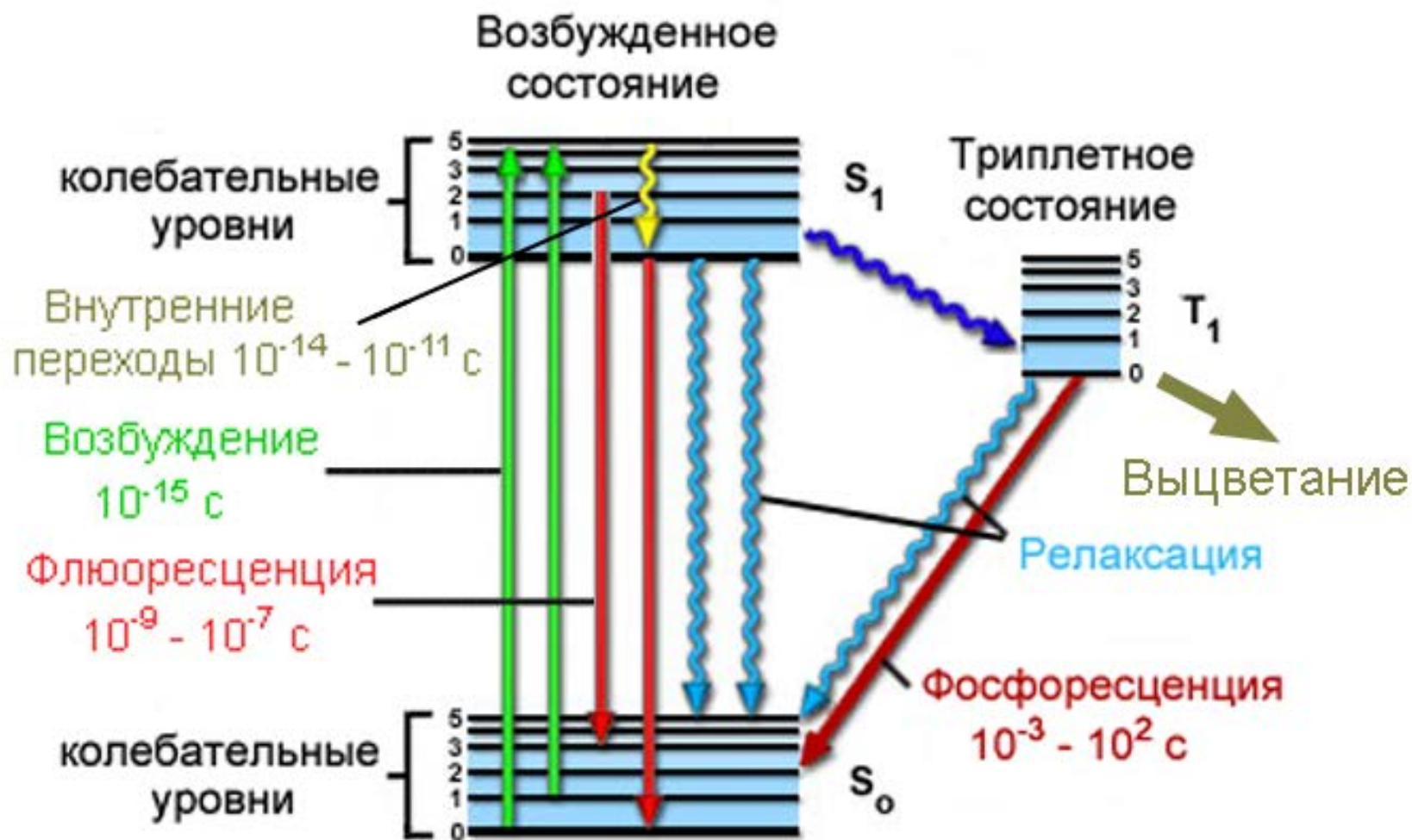
Сдвиг между максимумами поглощения и эмиссии – сдвиг Стокса.

Спектры поглощения и испускания флюорохрома независимы. Эмиссия ненаправлена.

# Правило Стокса



# Диаграмма Яблонского



# Явление флуоресценции

Время поглощения кванта света молекулой составляет около  $10^{-15}$  секунды. Диапазон энергий поглощаемых квантов определяется структурой электронных оболочек в молекуле.

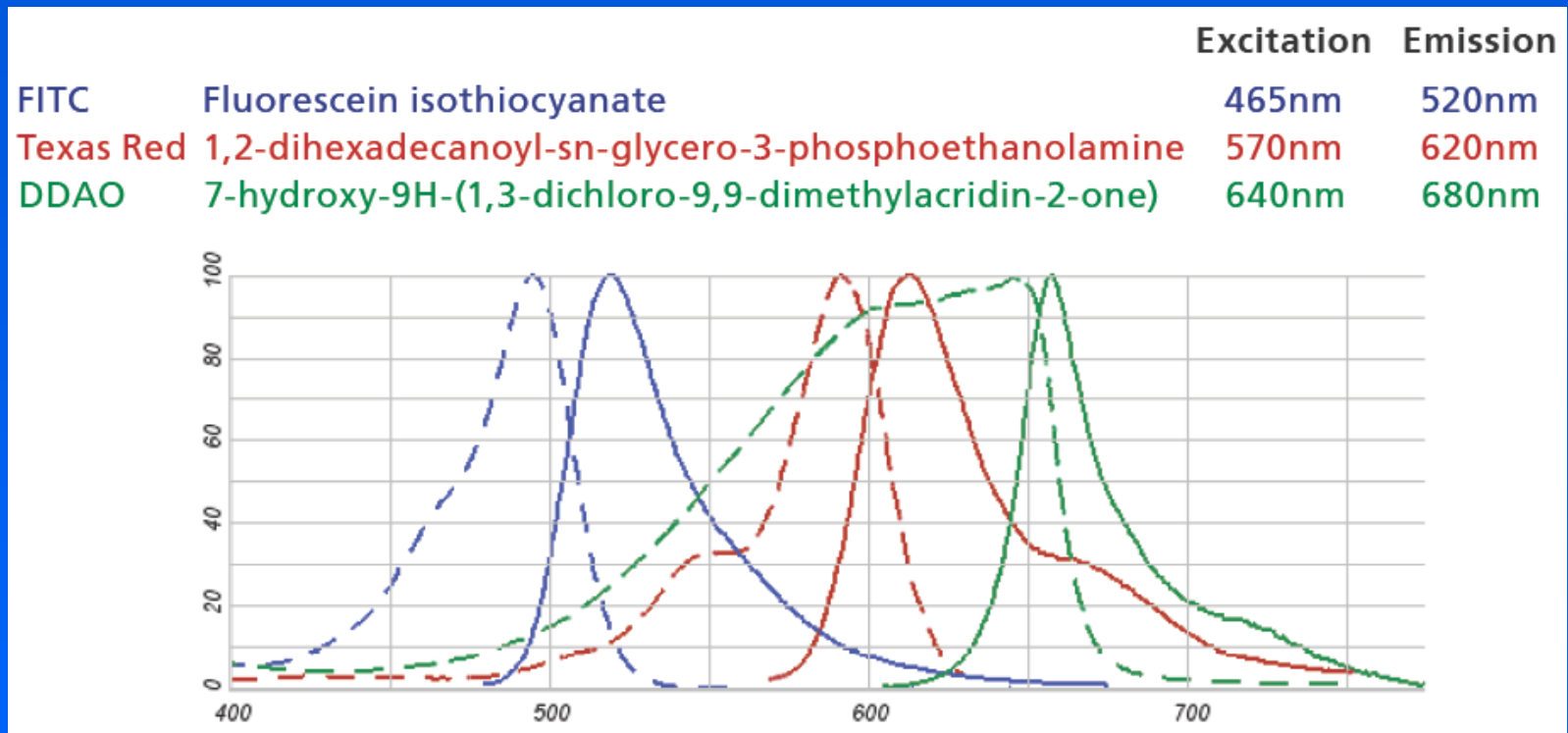
Энергия поглощенного кванта света распределяется в молекуле (возбуждение), а затем новый квант света высвечивается (флуоресценция) или молекула возвращается на исходный энергетический уровень иным путем (релаксация). В альтернативе возбужденная молекула может претерпеть химическую модификацию (переход в триплетное состояние).

Запаздывание высвечивания составляет порядка  $10^{-9}$  секунды. Эмиссия происходит равновероятно по всем направлениям.

Сдвиг средней энергии высвечиваемого кванта обусловлен потерей энергии за счет внутренних колебаний на разрешенных электронных уровнях поглощающей молекулы.

Наиболее яркие органические флуорохромы – вещества с чередующимися двойными связями.

# Примеры спектров некоторых красителей



**Сдвиг Стокса, как правило, невелик (10-30 нм).**

**Спектры асимметричны, их «хвосты» заходят более, чем на 100 нм. Спектры испускания имеют «красный» хвост, спектры возбуждения – «синий» хвост.**



# Принцип флюоресцентной микроскопии

Сдвиг Стокса используется для эффективного выделения полос возбуждающего света и света эмиссии из общего спектра.

Интенсивность эмиссии составляет не более  $10^{-4}$  от интенсивности возбуждающего света, а часто значительно меньше.

Для эффективного наблюдения флюоресценции необходимо подавить возбуждающий свет, попадающий в окуляр, с коэффициентом не менее, чем  $10^8$ , желательно -  $10^{10}$

Для разделения возбуждающего света и света флуоресценции используется система интерференционных светофильтров.

# Разделение возбуждающего света и света флуоресценции

Эпиосвещение – объектив одновременно служит конденсором. Это позволяет свести к минимуму эффект проходящего света.

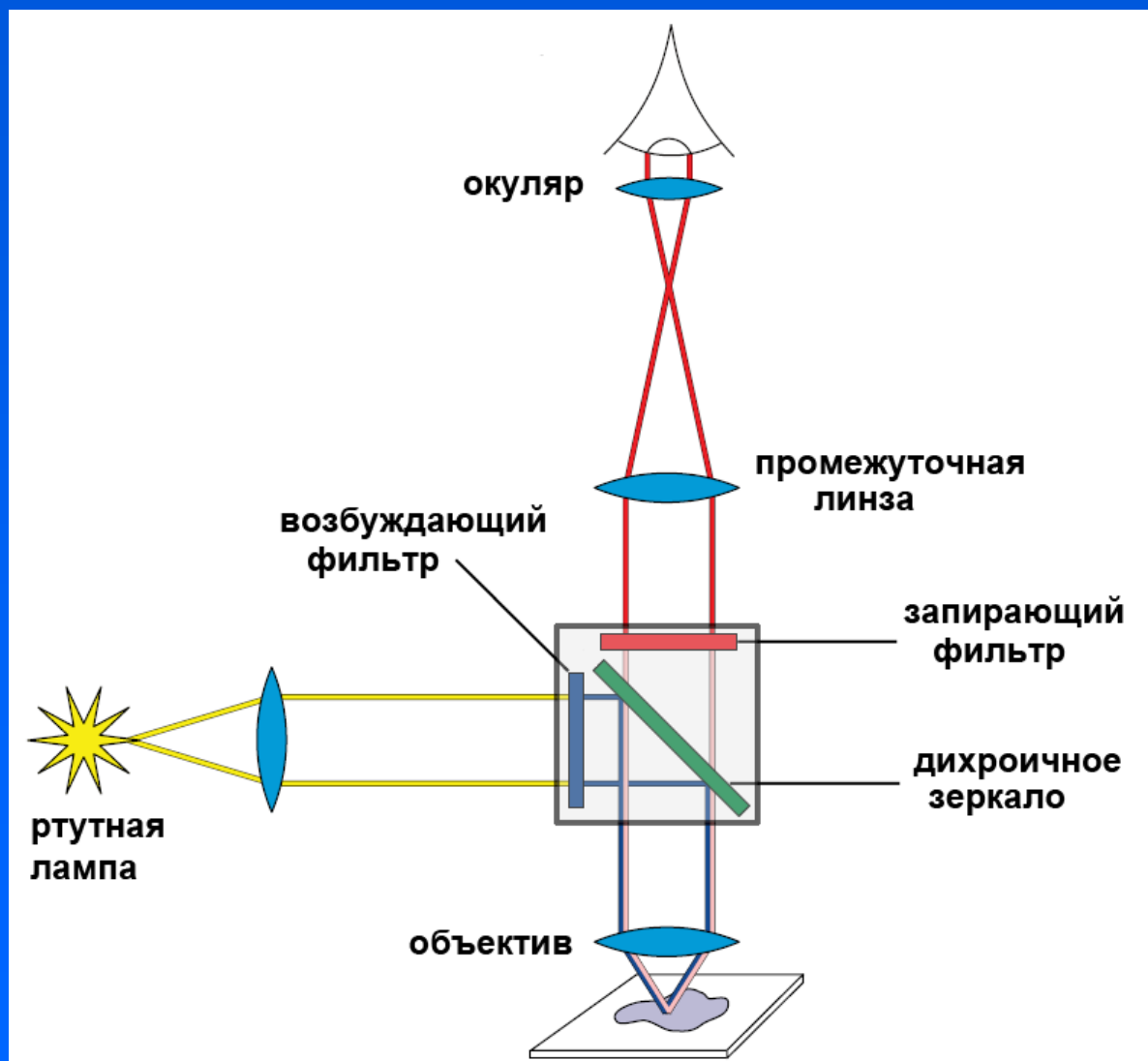
Куб светофильтров позволяет подавить нежелательный свет (отраженный препаратом и рассеянный) с эффективностью более, чем  $10^7$  за счет последовательного применения двух фильтров – светоделительного зеркала и запирающего светофильтра.

Коэффициент запираения светоделительного зеркала – не более, чем  $10^2$ , у запирающего светофильтра – не менее  $10^5$  (хорошие фильтры имеют коэффициент  $10^6$  и более)

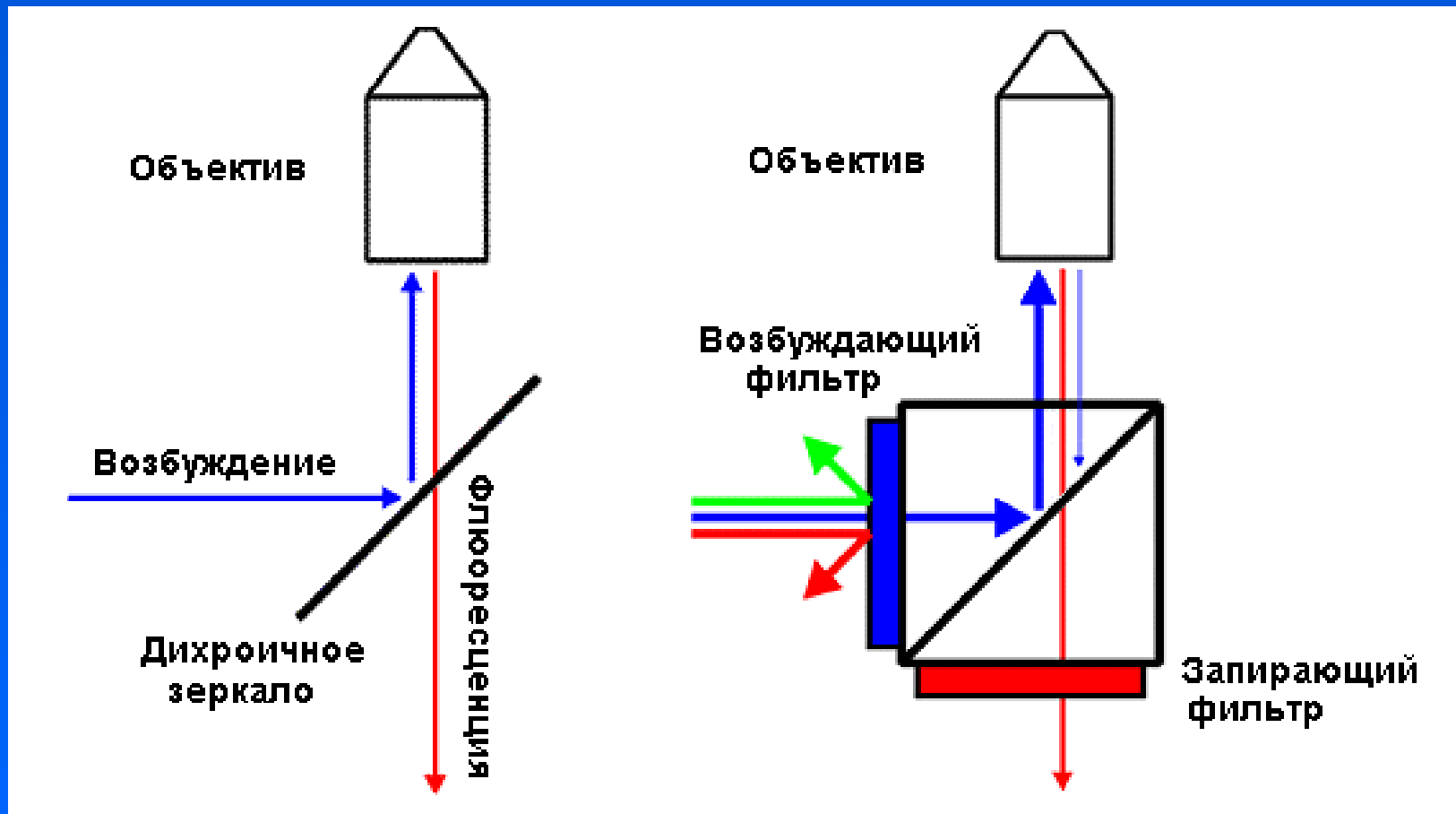
# Общий вид флуоресцентного микроскопа



# Эпифлуоресцентный микроскоп, схема



# Куб светофильтров - схема



**Примечание** Куб светофильтров изображен в своем положении на инвертированном микроскопе. Лампа и окуляр находятся за пределами схемы.

# Типы светофильтров

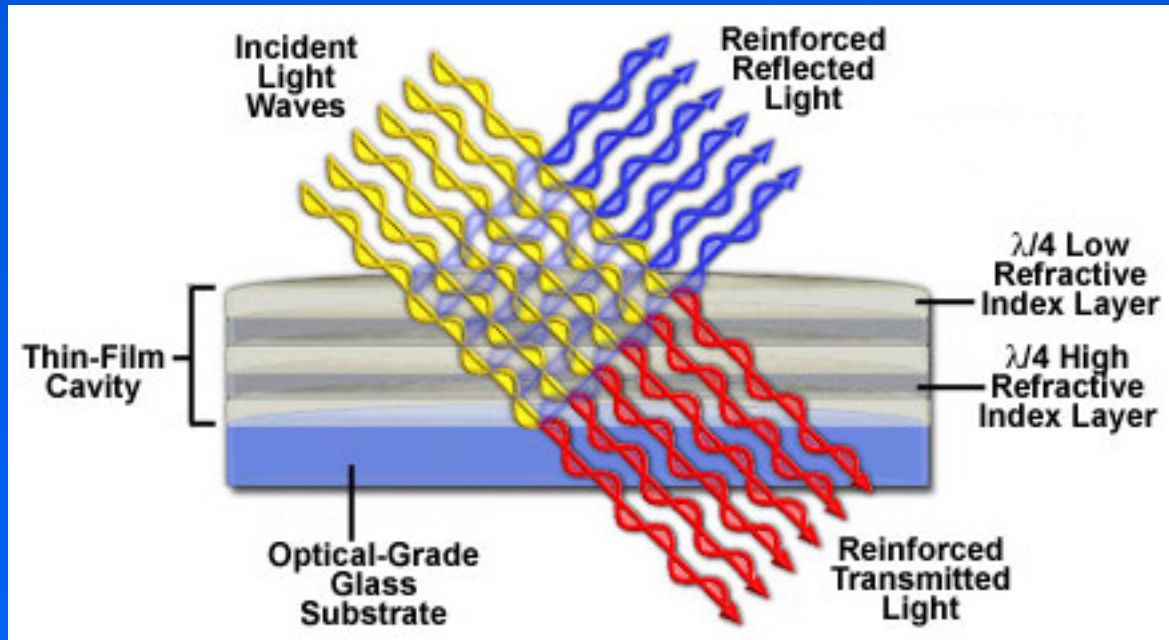
По характеру пропускания – LP (long pass), BP (band pass), SP (short pass).

По расположению – под углом  $90^\circ$  и под углом  $45^\circ$  (дихроичное зеркало).

По конструкции – окрашенное стекло, интерференционные фильтры (изготовленные методом тонкослойного напыления).

По применению: возбуждающие светофильтры, светоделительные зеркала, запирающие светофильтры.

# Дихроичный светофильтр



Многослойное (10-200 слоев) тонкопленочное напыление диэлектриками с чередующимися высокими и низкими показателями преломления обеспечивает эффективную интерференцию большей части светового потока, и создает в результате высокую избирательность пропускания – от 0,01 % до 0,00001% за пределами выбранного диапазона.

# Интерференционный (дихроичный) светофильтр

Многослойное (10-200 слоев) тонкопленочное напыление диэлектриками с чередующимися высокими и низкими показателями преломления обеспечивает высокую избирательность пропускания – до 0,00001 % в диапазоне шириной до 500 нм.

Примеры наносимых соединений (мягкое покрытие):  
показатель преломления 2.2-2.3:  $\text{PbCl}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnS}$   
показатель преломления 1.3-1.4:  $\text{MgF}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_3\text{AlF}_6$ .

Толщина каждого слоя тщательно выдерживается, слои наносятся методом вакуумного напыления. Точные значения толщин слоёв определяют положение кривую пропускания.

От числа слоёв зависит ширина зоны пропускания фильтра, степень подавления и ширина ненужной части спектра.



# **Интерференционный светофильтр с твердым покрытием**

**Т.н. твердое покрытие - напыление слоев на стеклянную подложку осуществляется с помощью ионной пушки.**

**Твердость покрытия соответствует твердости стекла. Оно не выгорает и не «стареет» во влажных условиях.**

**«Твердые» интерференционные светофильтры в настоящее время выпускают Semrock, Chroma, OmegaFilters.**

# Особенности дихроичных светофильтров

Характеристики светофильтра сильно зависят от его угла по отношению к пучку света.

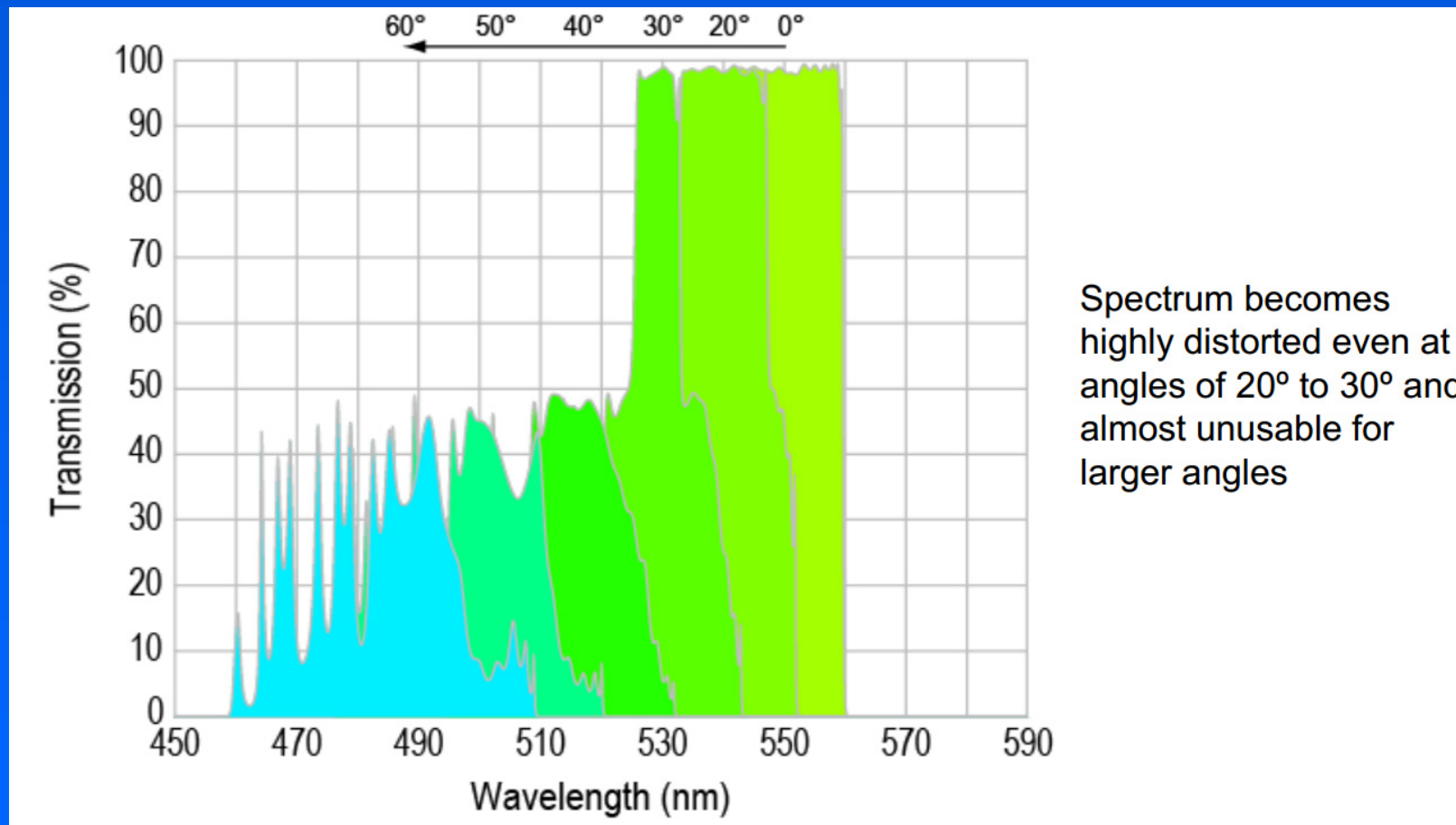
Стандартная характеристика ВР светофильтра – середина полосы пропускания и ширина на полувысоте пропускания (FWHM).

Например, обозначение ВР530/30 означает, что середина полосы пропускания приходится на 530 нм, а 50% пропускание начинается с  $530 - 30/2 = 515$  нм и заканчивается на  $530 + 30/2 = 545$  нм.

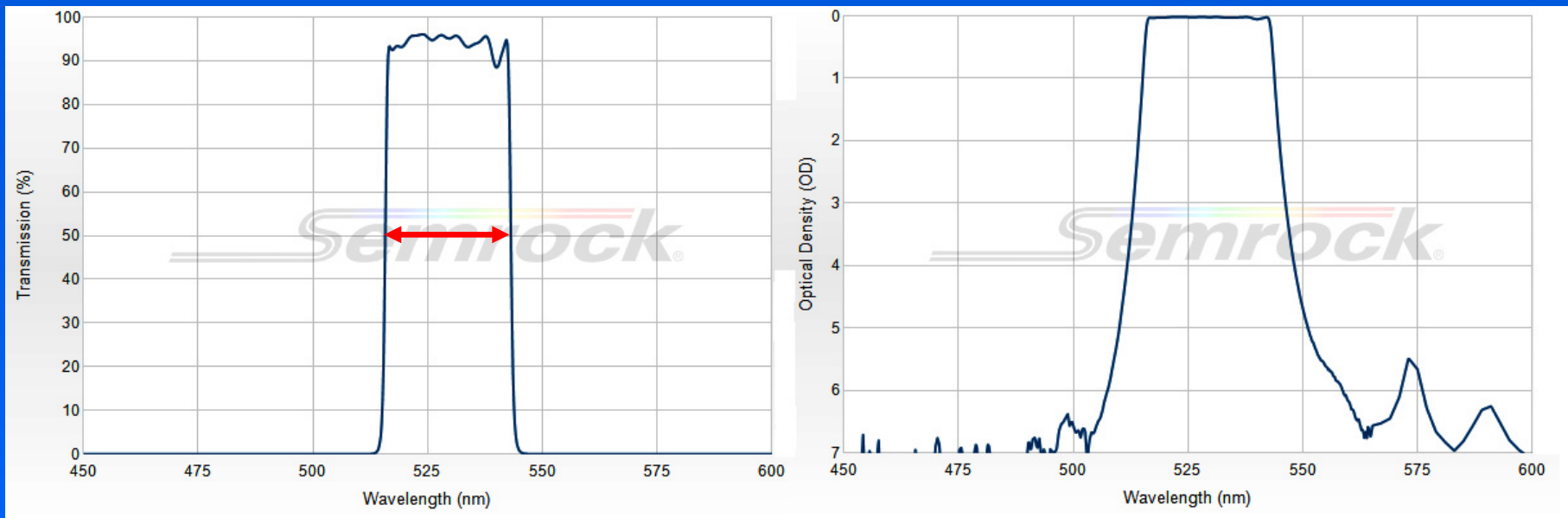
Полный спектр пропускания, как правило, приводится в паспорте светофильтра.

Светопропускание измеряется в % либо в единицах оптической плотности (OD) – логарифмическая шкала. Например, OD=5 означает подавление света в  $10^5$  раз.

# Зависимость спектра от угла наклона фильтра



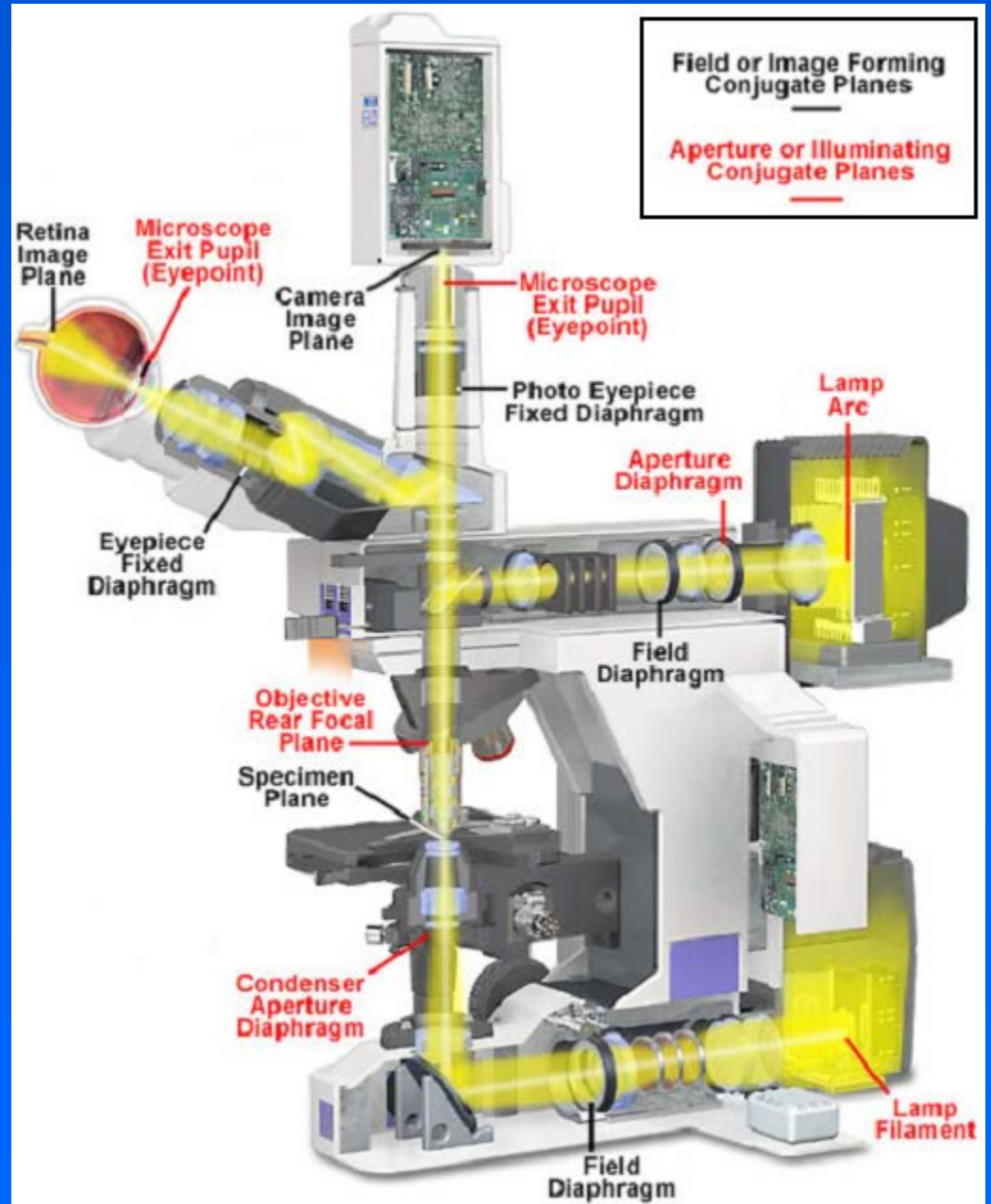
# Спектр пропускания светофильтра



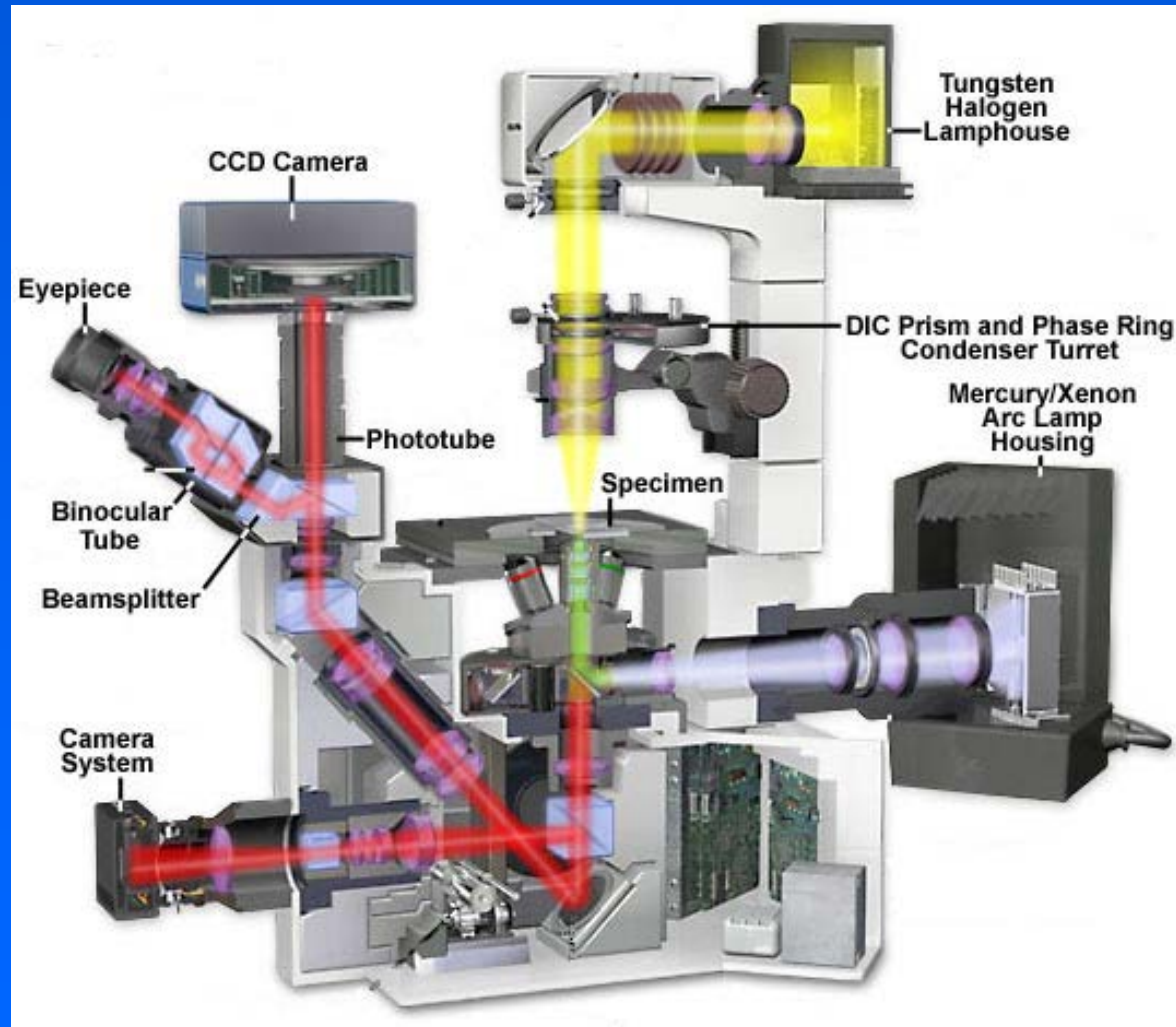
Спектр пропускания светофильтра анализируется в двух шкалах: линейной (0-100%, слева) и логарифмической (1-10<sup>-7</sup>, справа).

Линейная шкала дает общую оценку пригодности светофильтра (по ширине на высоте полупропускания), логарифмическая шкала позволяет оценить степень подавления нежелательного возбуждающего света.

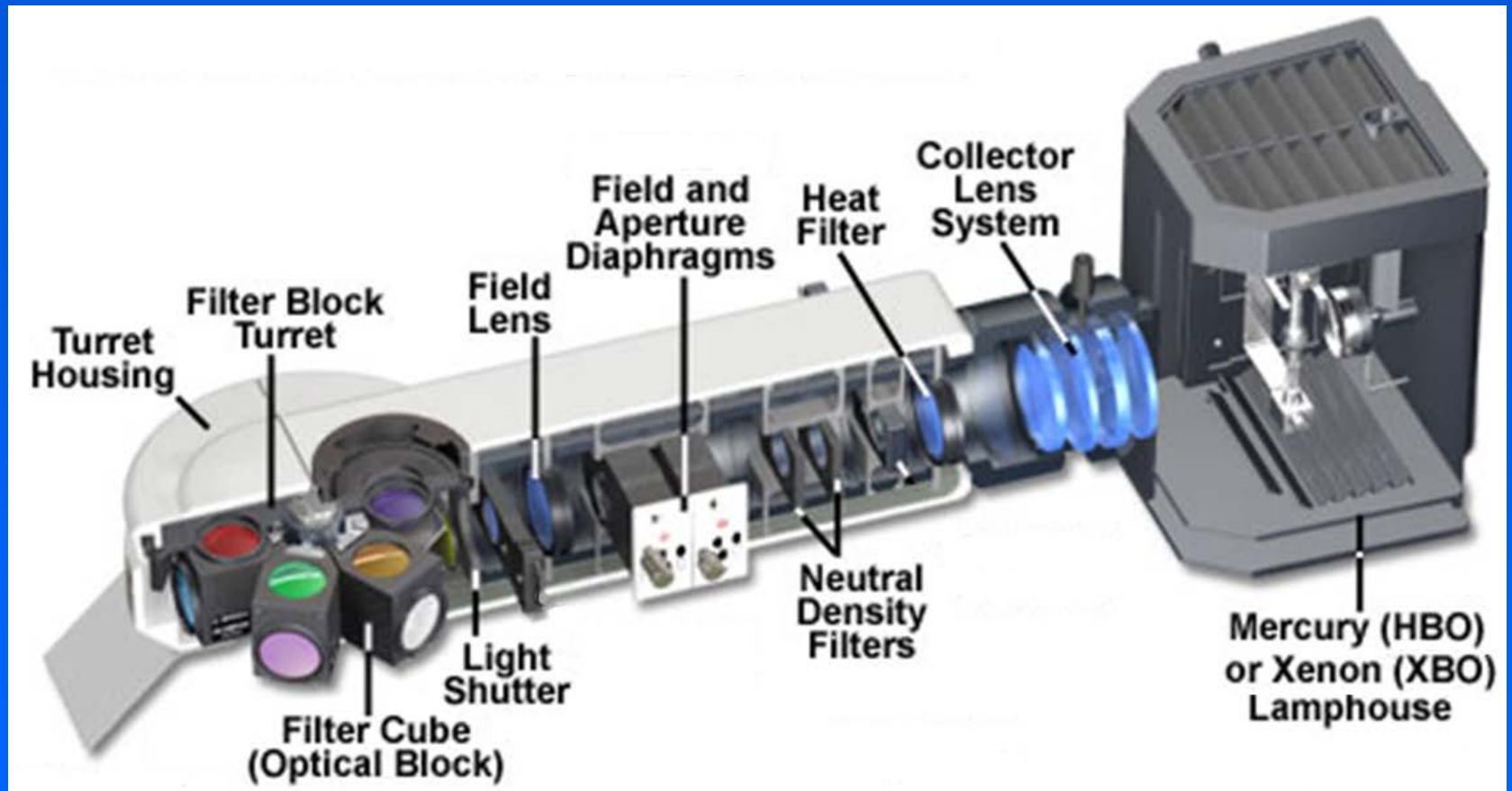
# Полный ход лучей и сопряженные плоскости в флуоресцентном микроскопе



# Инвертированный флуоресцентный микроскоп



# Эпиосветитель



# Куб светофильтров - примеры

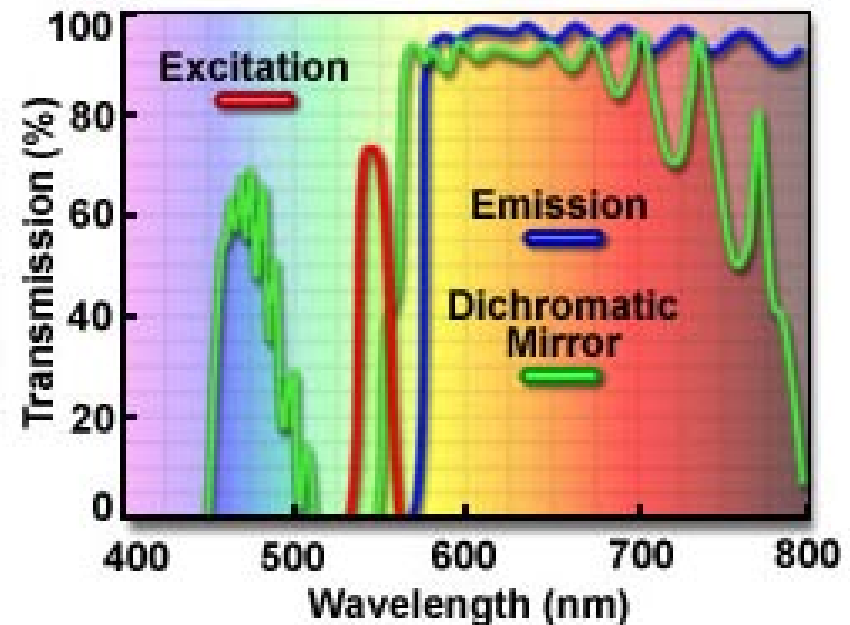
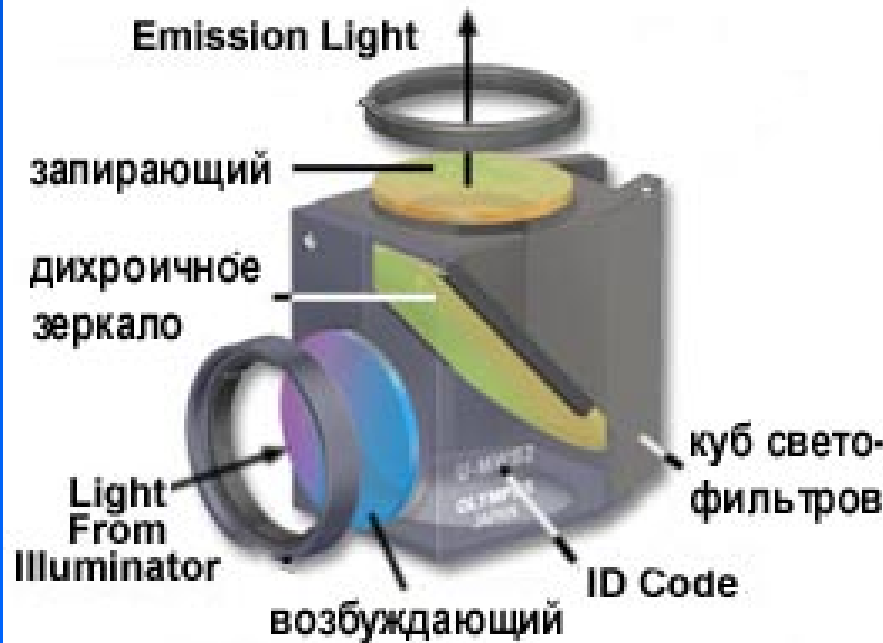


**Возбуждающие светофильтр расположены слева, запирающий светофильтр – сверху.**

**В правом кубе светофильтры вынуты. Дихроичное зеркало устанавливается по диагонали куба.**



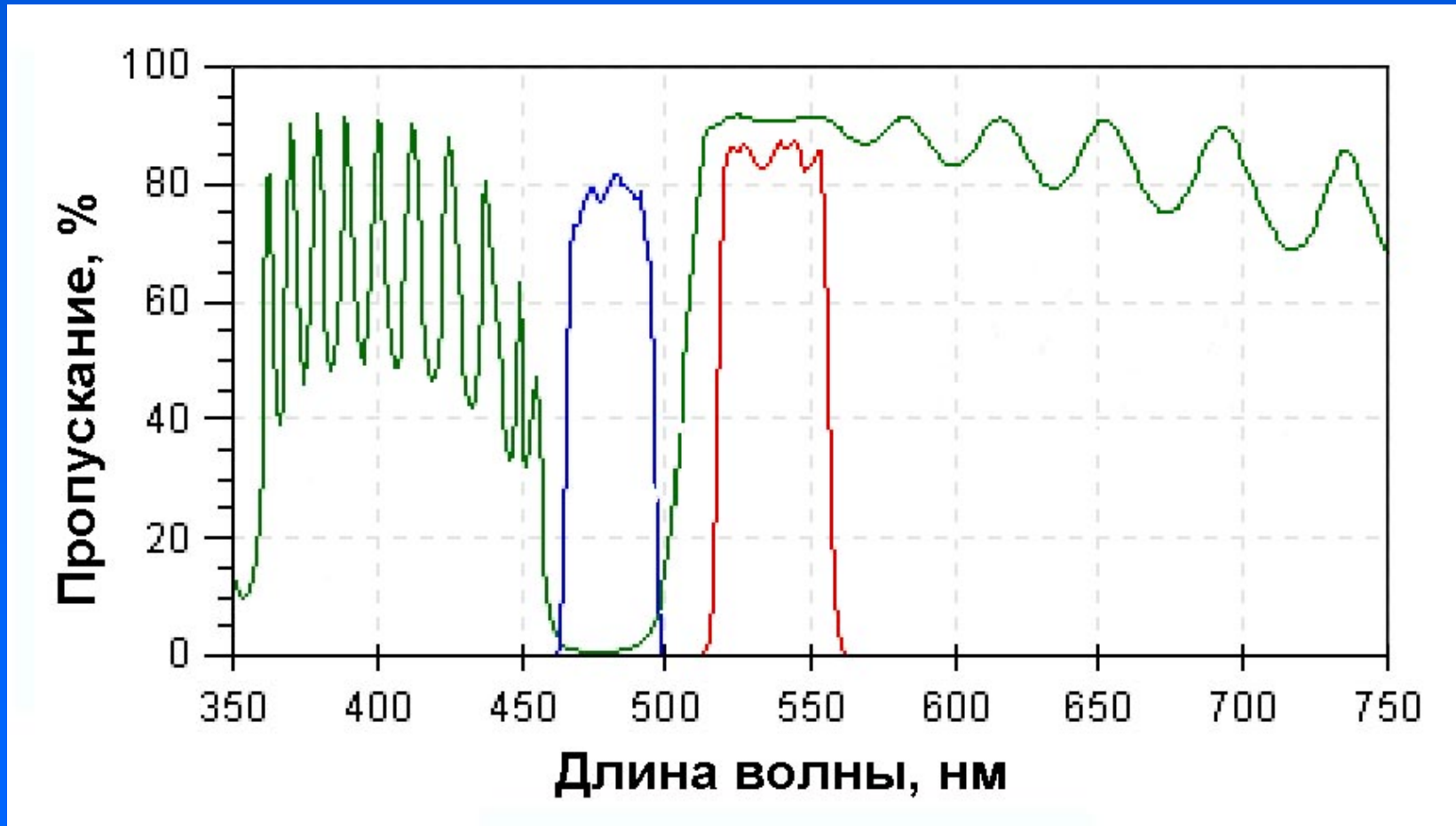
# Куб светофильтров - светопропускание



# Спектры пропускания светофильтров в кубе – long-pass



# Спектр пропускания светофильтров в кубе – band-pass



# Подбор светофильтров

Стандартные кубики светофильтров – DAPI, FITC, TRITC/Cy-3; TexasRed, Cy-5.

Подбор светофильтров определяется спектром возбуждения и спектром эмиссии красителя.

Основное условие – максимальная регистрация эмиссии.

При одновременном использовании нескольких красителей возникает проблема «затекания» сигналов.

# Основные источники света для флюоресцентной микроскопии

Ртутная лампа сверхвысокого давления (мощность 100 Вт) – срок службы 300 часов.

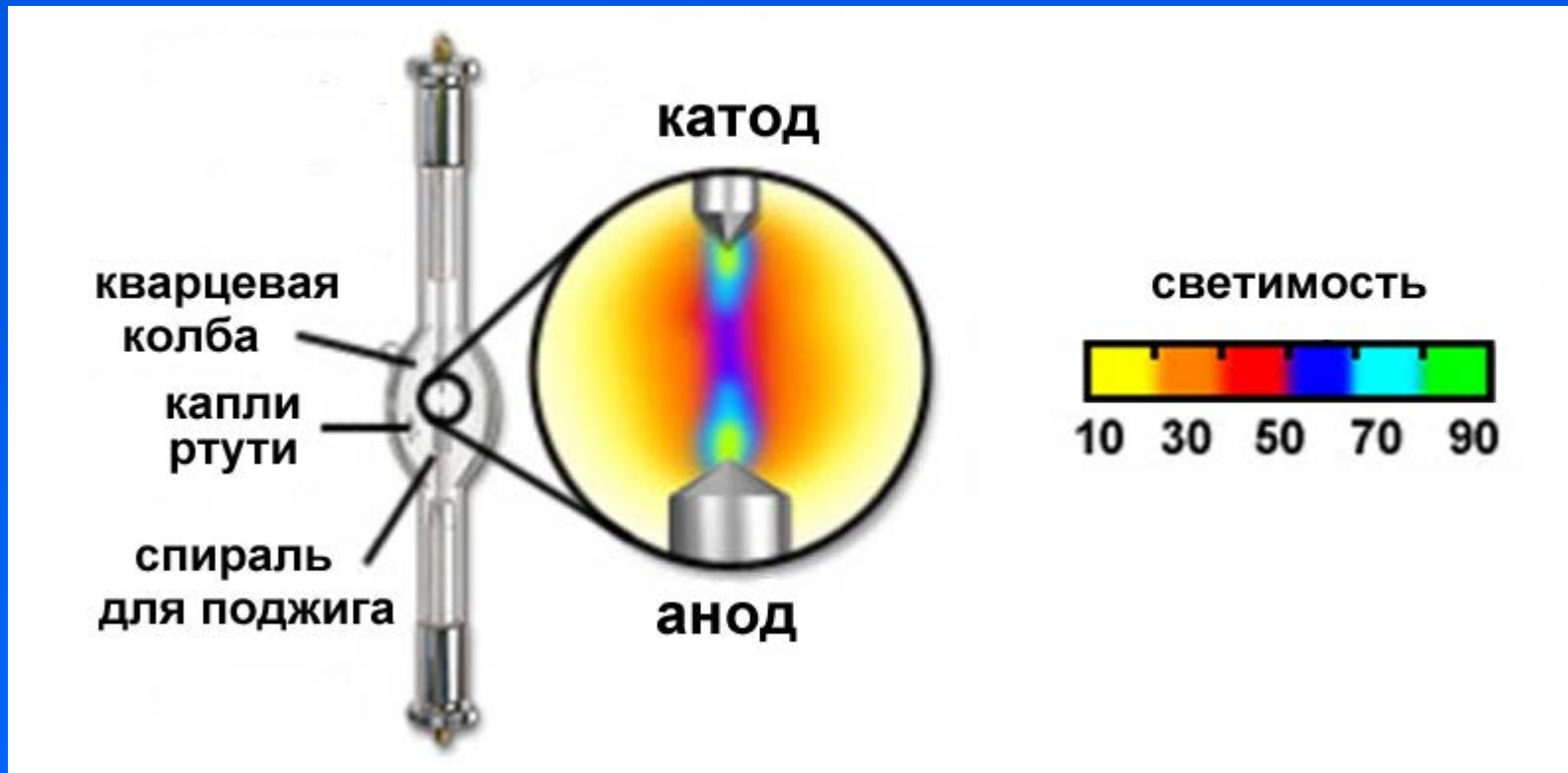
Ксеноновая лампа и смешанная (ртутно-ксеноновая) лампа (мощность 75-200 Вт) – срок службы 100-300 часов.

Металл-галидные лампы (мощность около 100 Вт) – срок службы 1000-2000 часов.

Светодиоды («монохроматический» свет) – срок службы не менее 20000 часов

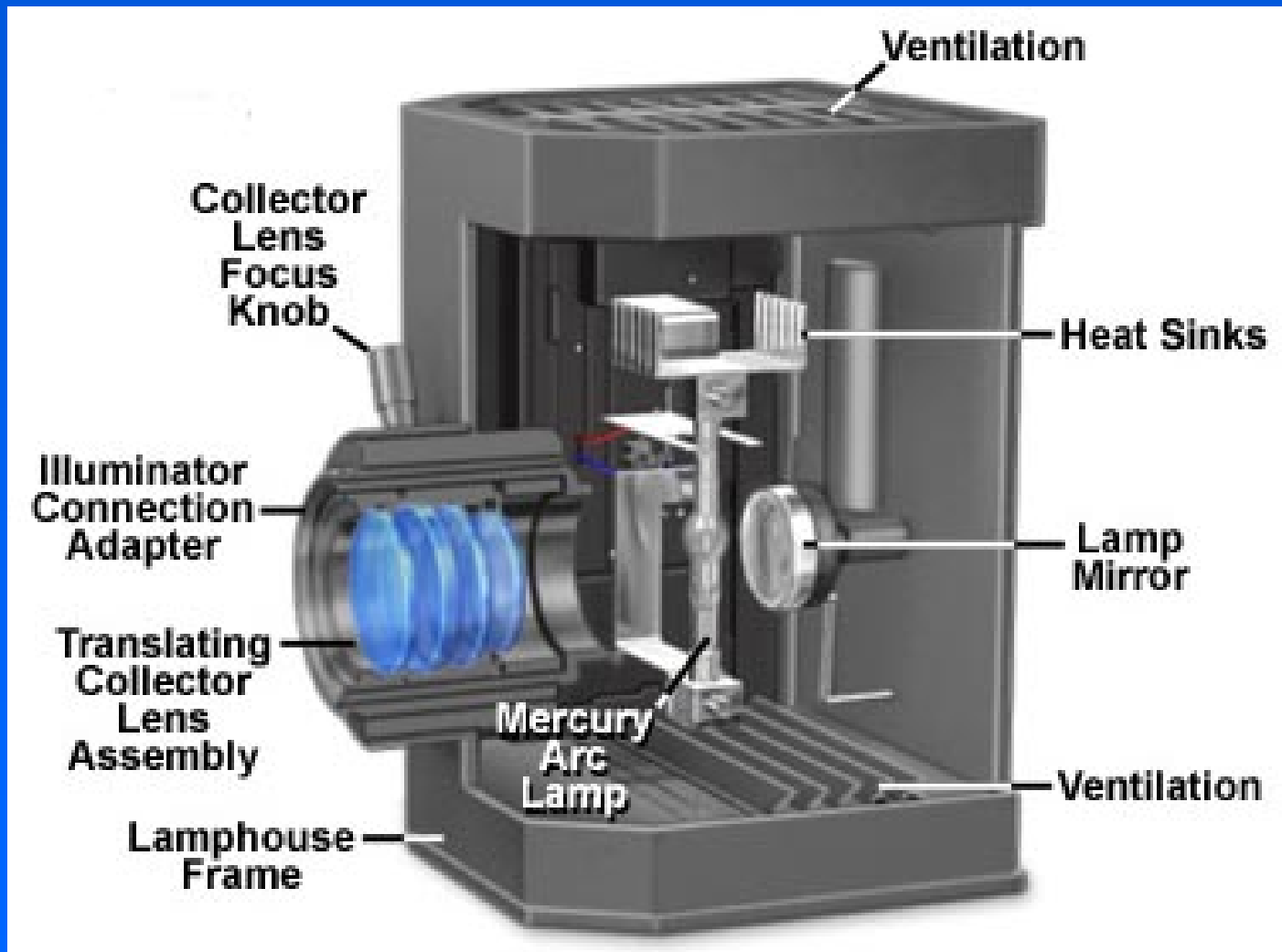
Лазеры: газовые (мощность в линии – 1-1000 мВт); твердотельные с диодной накачкой (мощность 10-300 мВт) – срок службы 5000-10000 часов.

# Дуговая ртутная лампа сверхвысокого давления

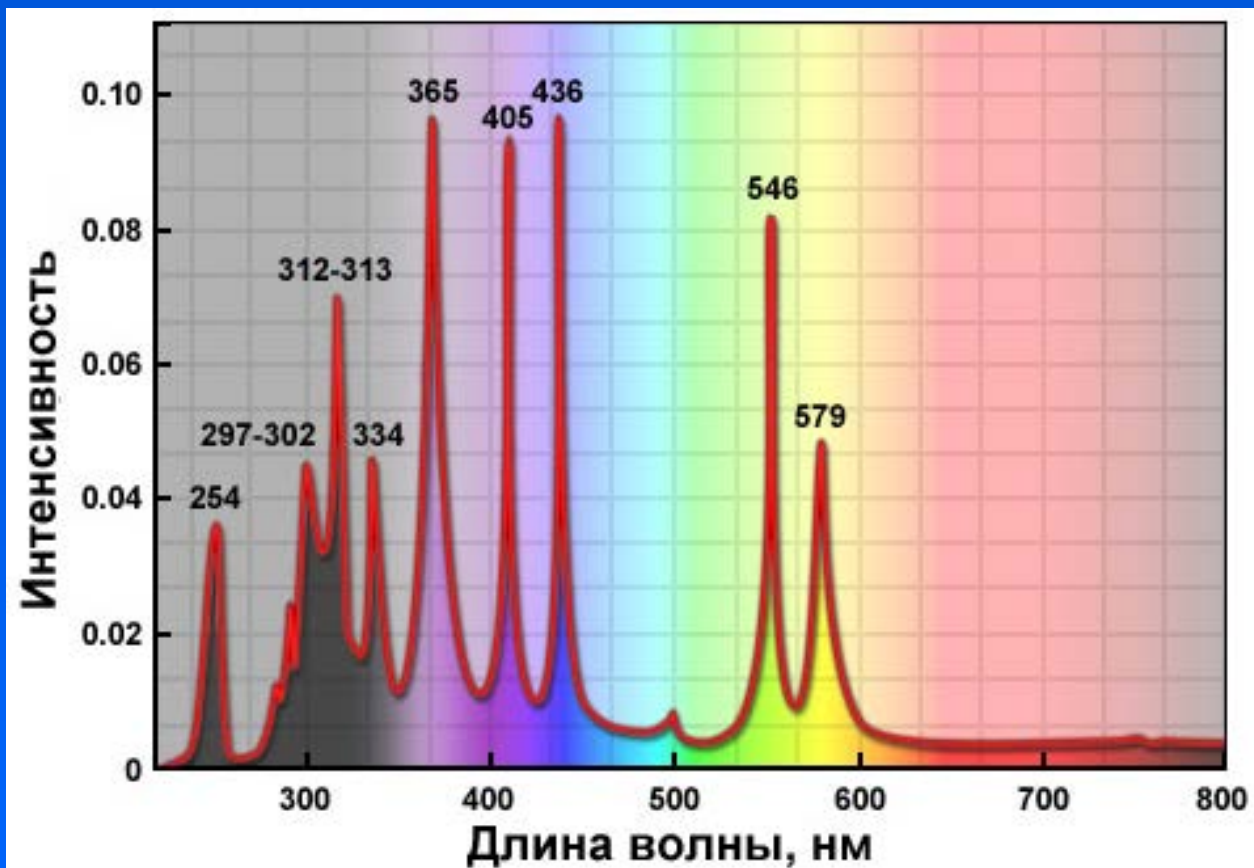


Источник света – пары ртути в дуговом разряде.  
Колба – плавленый кварц. Электроды – вольфрам.  
Рабочее давление – около 30 атм. Мощность – 100 Вт.

# Домик ртутной лампы



# Спектр свечения ртутной лампы



Спектр свечения — квазилинейный, он расширен за счет высокого давления паров ртути.

Максимумы — 365 (10,7%), 405 (4%), 436 (12,6%), 546 (7,1%) и 579 (7,9%) нм.



# Яркость ртутной лампы в разных областях спектра

Краситель	Возбуждающий фильтр	Дихроичное зеркало	Мощность, мВт/см <sup>2</sup>
DAPI	365/10	395 LP	23,0
CFP	436/25	455 LP	79,8
GFP/FITC	470/40	495 LP	32,8
YFP	500/24	520 LP	20,0
TRITC/Cy3	546/12	560 LP	43,1
Texas Red	562/40	595 LP	153,7
mCherry	587/25	605 LP	80,9
Cy5	640/30	660 LP	9,1

# Эксплуатация ртутной лампы

Ртутная лампа сверхвысокого давления работает от источника постоянного тока и поджигается большим током.

Лампа должна располагаться вертикально, радиатором вверх. Дно домика лампы не может быть ближе, чем несколько см к поверхности стола.

После поджига лампа выходит на стационарный режим в течение нескольких минут. Полная стабилизация дуги занимает не менее 20 минут. Юстировка лампы производится только после ее стабилизации.

После выключения лампа может быть повторно включена не ранее, чем через 30 минут.

Время эксплуатации (НВО103W/2) – около 300 часов. Окончание эксплуатации определяется по увеличению времени поджига и/или падению яркости более, чем на 10%.

# Лекция 8

**Флуоресцентная микроскопия:  
источники света, объективы,  
красители и их использование**

# Эксплуатация ртутной лампы

Ртутная лампа сверхвысокого давления работает от источника постоянного тока и поджигается большим током.

Лампа должна располагаться вертикально, радиатором вверх. Дно домика лампы не может быть ближе, чем несколько см к поверхности стола.

После поджига лампа выходит на стационарный режим в течение нескольких минут. Полная стабилизация дуги занимает не менее 20 минут. Юстировка лампы производится только после ее стабилизации.

После выключения лампа может быть повторно включена не ранее, чем через 30 минут.

Время эксплуатации (НВО103W/2) – около 300 часов. Окончание эксплуатации определяется по увеличению времени поджига и/или падению яркости более, чем на 10%.

# Сравнение ксеноновой, металл-галидной и ртутной ламп

Ртутная лампа сверхвысокого давления имеет квазилинейный спектр. Значительная часть энергии выделяется в ультрафиолете. Срок службы – около 300 часов.

Металл-галидная лампа имеет сходный спектр, но с меньшими провалами между линиями. Срок службы – порядка 1000 часов. Стоимость в несколько раз больше.

Ксеноновая лампа имеет практически равномерный спектр в видимой области, но большая часть энергии выделяется в инфракрасном свете. Срок службы – около 300 часов. Стоимость больше, чем у ртутной лампы.

Относительная яркость НВО-100 и ХВО-75:

в сине-зеленой области ХВО немного ярче; в желтой – НВО ярче в несколько раз.

# Лазерные источники света

Газовые лазеры (аргоновый, гелий-неоновые, криптоновый) – полностью устарели, но продолжают использоваться в приборах, выпущенных 4-5 и более лет назад. Основной недостаток – сравнительно небольшая продолжительность жизни и необходимость периодической юстировки.

Твердотельные лазеры – имеют большую продолжительность жизни, более компактны. Как правило, работают в импульсном режиме. Также требуют юстировки.

Диодные лазеры – значительно дешевле, имеют очень малые размеры, продолжительность жизни не менее 10000 часов, не требуют юстировки. Волновой фронт не вполне когерентен. Работают в непрерывном режиме.

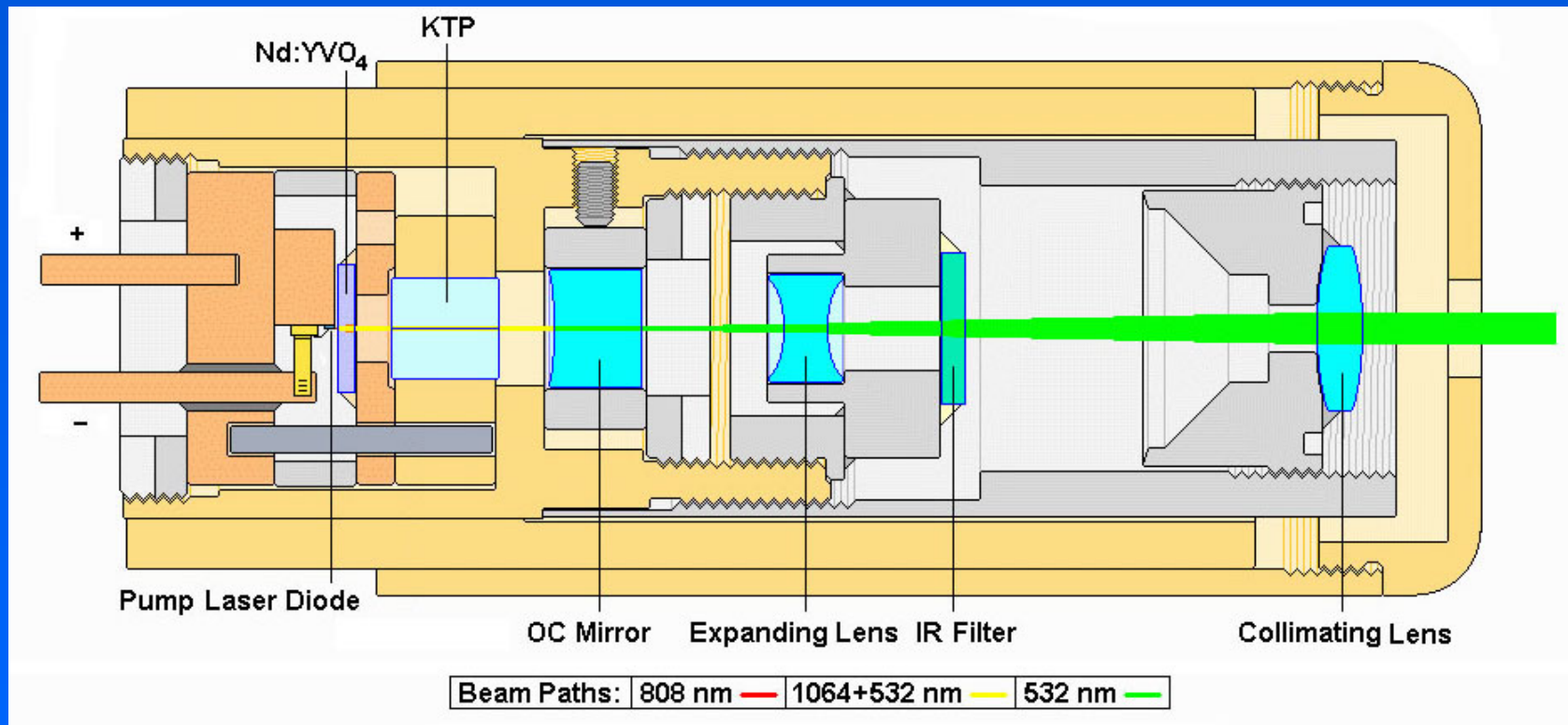
Твердотельные лазеры с диодной накачкой.

Для присоединения лазера к обычному микроскопу требуются специальные устройства (scrambler), полностью разрушающие когерентность волнового фронта.

# Примеры твердотельных лазеров



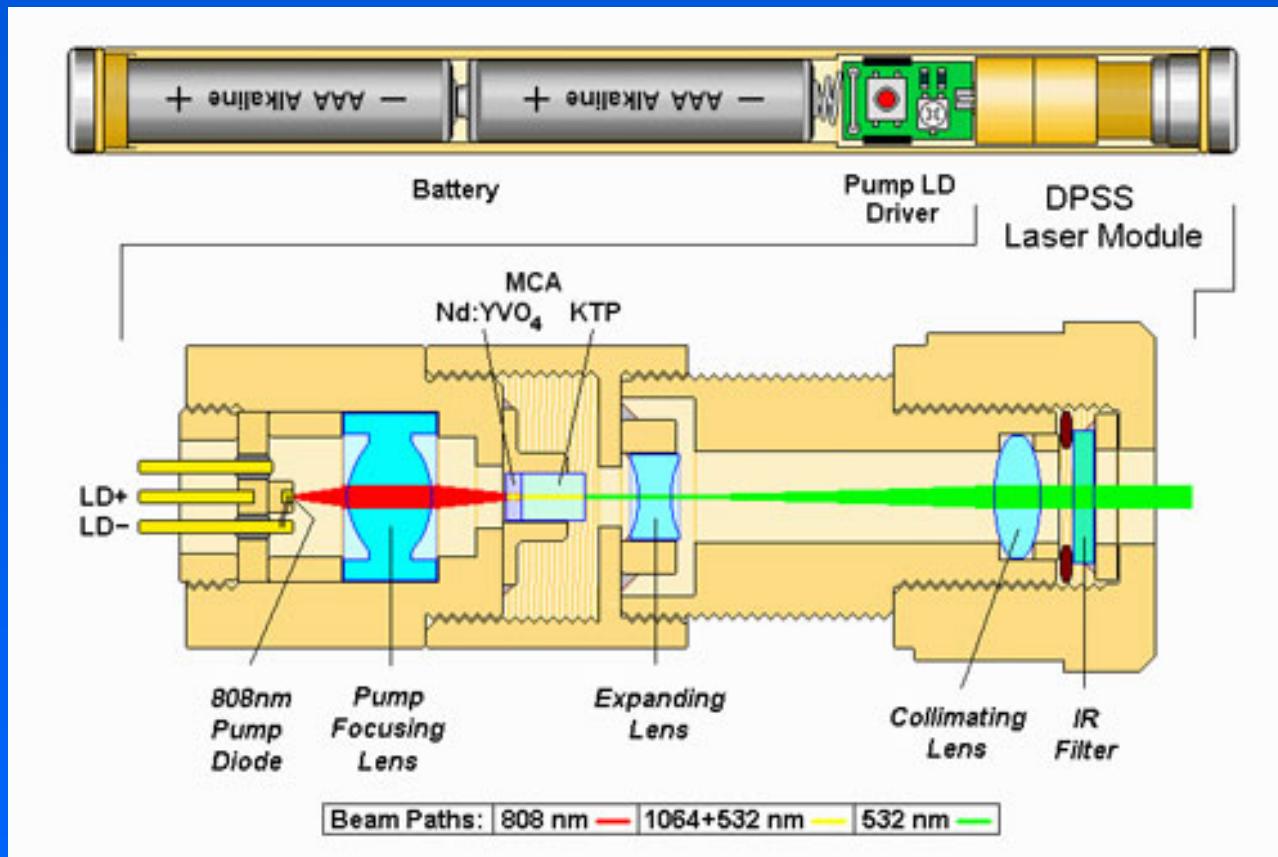
# Твердотельный лазер с диодной накачкой (DPSS)



Конструкция лазера зависит от длины волны. Общий принцип – накачка твердотельного резонатора с помощью светодиода. На выходе из резонатора – коллиматор пучка и ИК фильтр.



# Лазерная указка



Диапазон мощностей – 1-1000 мВт. Для микроскопии – 50-200 мВт.

Основные длины волн: 365 нм; 405 нм; (445 нм; 473 нм); 488 нм; 532 нм; 561 нм; 594 нм; 635-640 нм.

# Светодиоды

Сравнительно новые источники освещения (в микроскопии применяются с 2006 года).

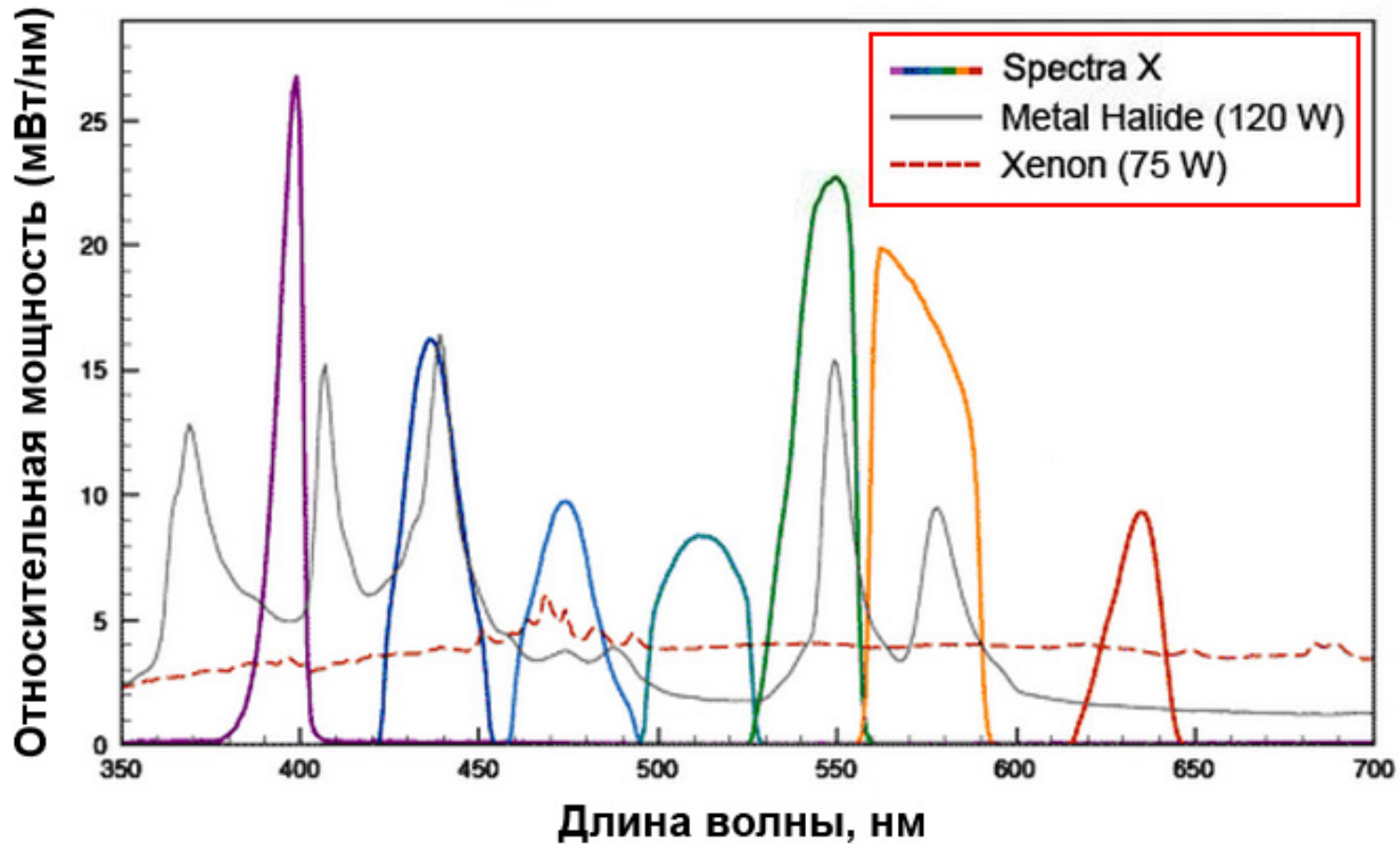
Светодиод излучает в ширине около 30-40 нм, мощность – порядка 10-200 мВт.

Осветители в виде комплектов светодиодов выпускаются несколькими фирмами.

Яркость освещения – несколько ниже, чем у ртутной лампы, но больше, чем у галогеновой лампы.

Преимущества: регулируемая мощность, высокая стабильность, быстрое переключение длин волн; длительный срок службы (не менее 20000 часов).

# Сравнительная характеристика ИСТОЧНИКОВ СВЕТА



# Объективы для флюоресцентного микроскопа

Типы объективов: Plan; PlanFluor; SuperFluor; Planapo; TIRF objectives (NA>1,45)

## Требования:

1. Большая светособирающая сила объектива (ССО).

ССО измеряется как отношение числовой апертуры (NA) к увеличению.

Яркость изображения при флуоресцентной микроскопии пропорциональна четвертой степени числовой апертуры. Таким образом, использование при одинаковом увеличении объектива с NA= 0,75 по сравнению с NA=0,65 увеличивает яркость изображения почти в два (в 1,77) раза; увеличение апертуры с 0,85 до 1,2 дает выигрыш в 4 раза.

Максимальная ССО – у объективов x20/0,75, x40/1,3.

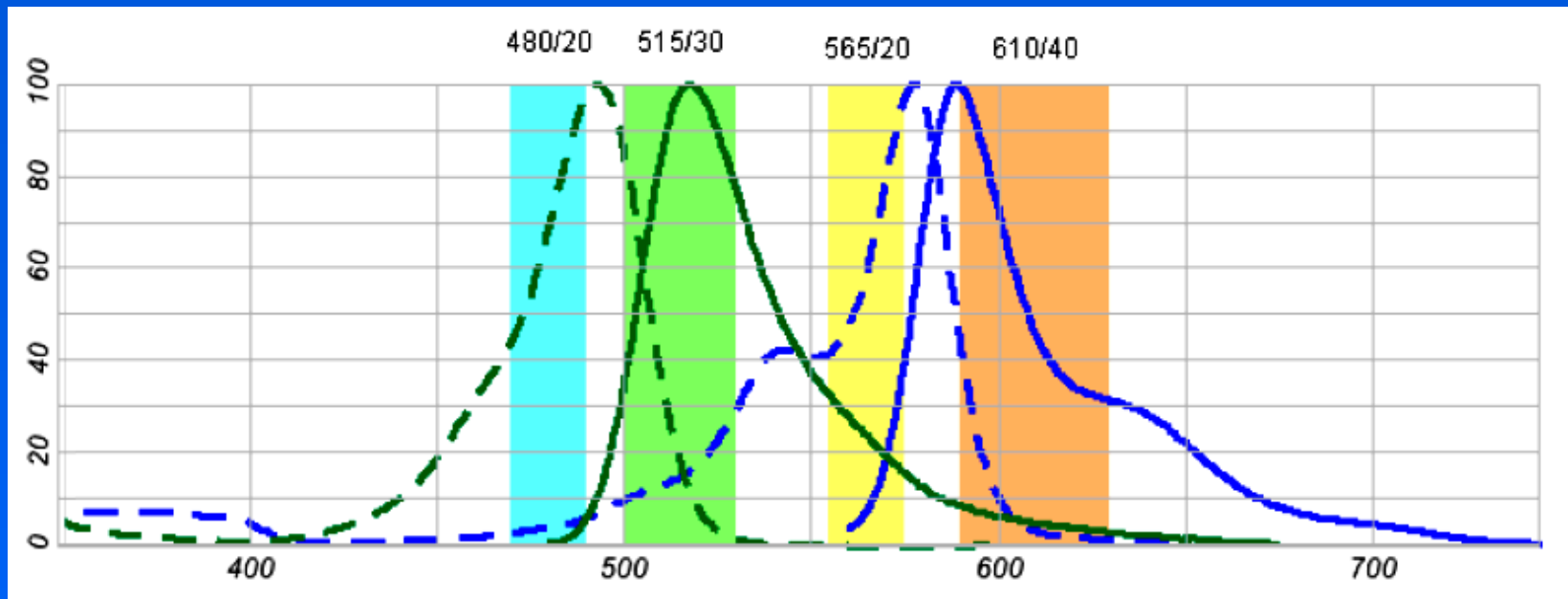
# Объективы для флюоресцентного микроскопа

Высокое светопропускание объектива в коротковолновой части спектра ( $\lambda < 430$  нм) необходимо для работы с красителями, возбуждающимися в ближнем УФ свете (например, DAPI, красители для определения кальция – Fura2, Indo и др.).

Этому условию плохо удовлетворяют планапохроматы, поэтому наибольшее распространение получили планфлуоритовые объективы.

При использовании нескольких красителей с далеко отстоящими друг от друга спектрами необходимость свести к минимуму абберации привела к разработке специальных «суперапохроматов» - объективов, для которых абберации исправлены во всем диапазоне видимого спектра (400-750 нм) и ближнем ИК спектре.

# Сочетание красителей и фильтров



Светофильтры выделяют для наблюдения небольшую часть спектров возбуждения и эмиссии.  
Правильный подбор селективных светофильтров может уменьшить эффект «затекания» сигнала.

# Флуоресцентные красители

Красители для нуклеиновых кислот (РНК, ДНК).

Мембранные красители органелл (митохондрий, АГ, лизосом и др.).

Для конъюгирования с антителами, нуклеотидами и др.

Сенсоры (рН, окислительно-восстановительный потенциал, ионы кальция, ионы натрия)

Флуоресцентные белки животного происхождения.

Тандемные красители для исследования фёрстеровского переноса энергии (FRET).

# Основные характеристики флуоресцентных красителей

Коэффициент экстинкции –  $\varepsilon$  (20000-200000 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>)

Квантовый выход –  $Q_e$  (20-90%). Флуоресцеин – 92%.

Среднее время высвечивания флуоресценции –  $\tau$  (0,5-20 нс).  
Флуоресцеин – 4,5 нс.

Стабильность – величина, обратная вероятности фотодеструкции (отношение  $Q_e/Q_d$ ). Флуоресцеин:  $Q_e/Q_d = 3 \times 10^4$ .

Спектры поглощения и испускания – максимумы, ширина на полувысоте (FWHM), сдвиг Стокса (флуоресцеин и ФИТЦ – 24 нм; GFP – около 20 нм).

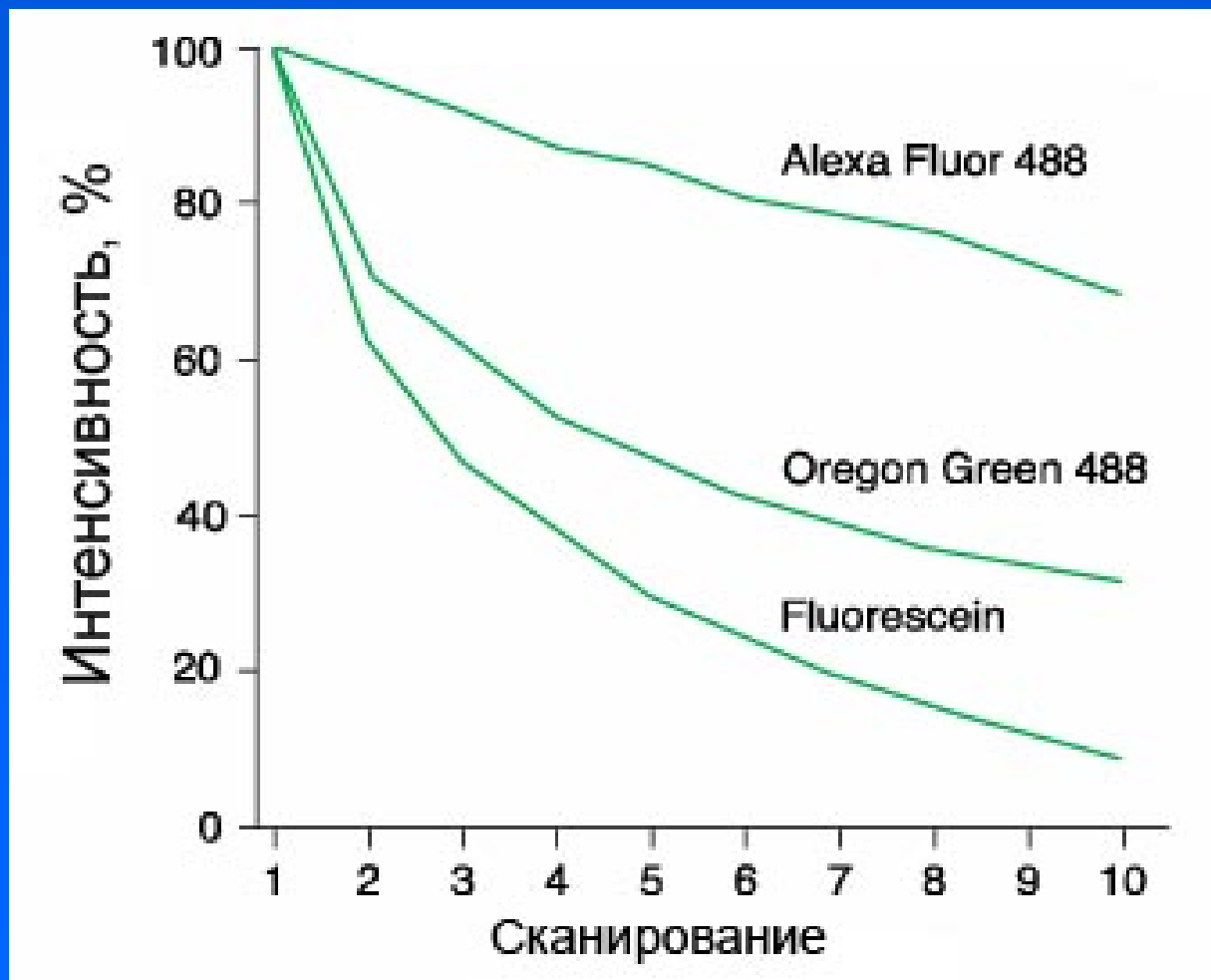
Все спектры эмиссии органических красителей широкие. Поэтому при совместном использовании нескольких красителей возникает эффект перекрывания сигналов. Сигнал от красителя с меньшим максимумом эмиссии «затекает» в канал более длинноволнового красителя.



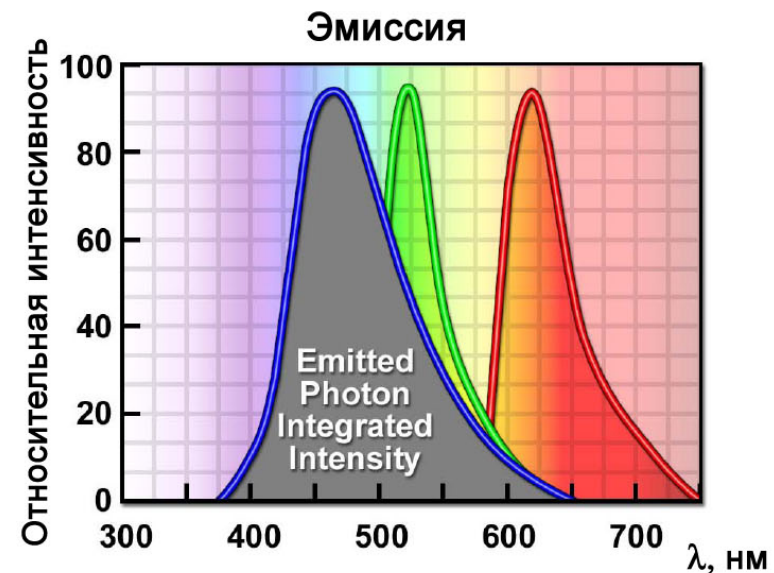
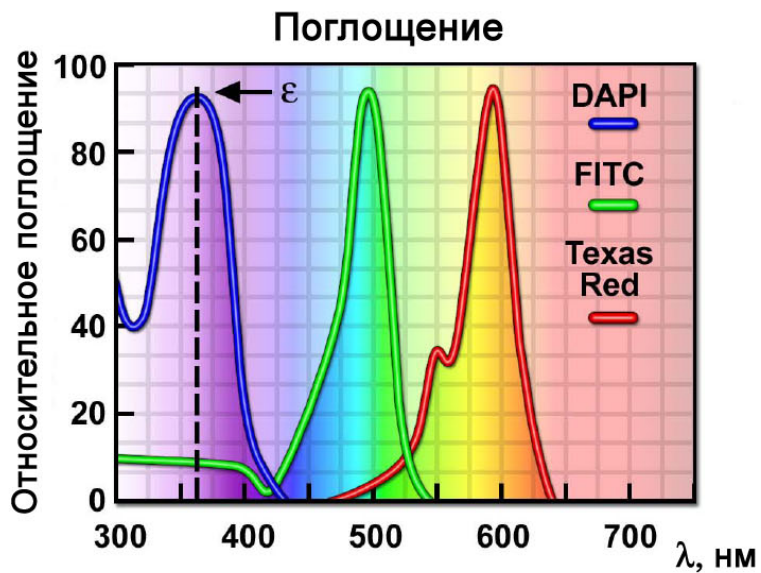
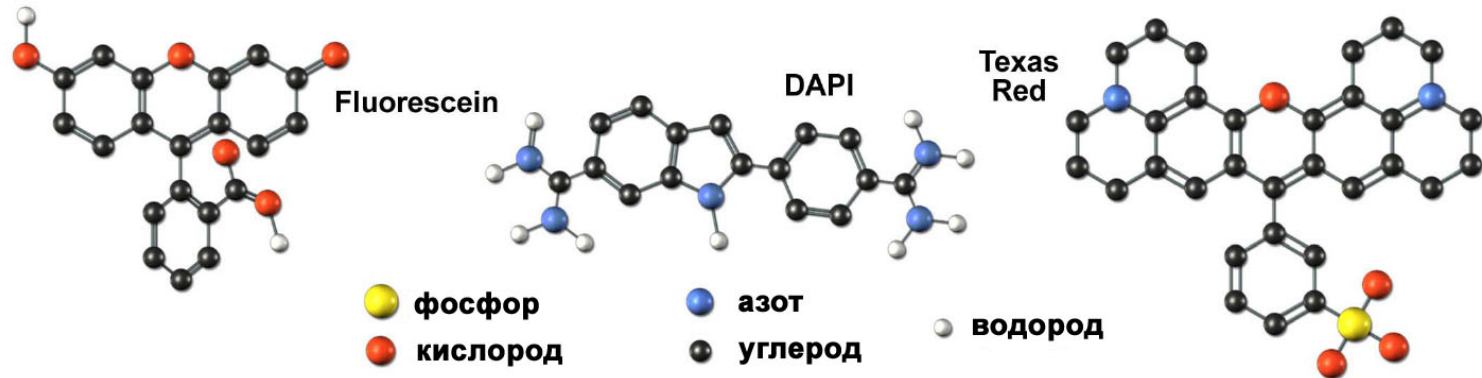
# Характеристики некоторых флюорохромов

Краситель	$\lambda_{ex}$	$\lambda_{em}$	$\epsilon$	$Q_e$	Яркость
DAPI	350	470	27000	0.58	15.7
Fluorescein	490	520	67000	0.71	47.6
Alexa 488	494	517	73000	0.6	43.8
Rhodamine	554	573	85000	0.28	23.8
Cy3	554	568	130000	0.14	18.2
Cy5	652	672	200000	0.18	36
GFP	488	507	56000	0.6	33.6
mCherry	587	610	72000	0.22	15.8
CFP	433	475	32500	0.4	13
YFP	516	529	77000	0.76	58.5

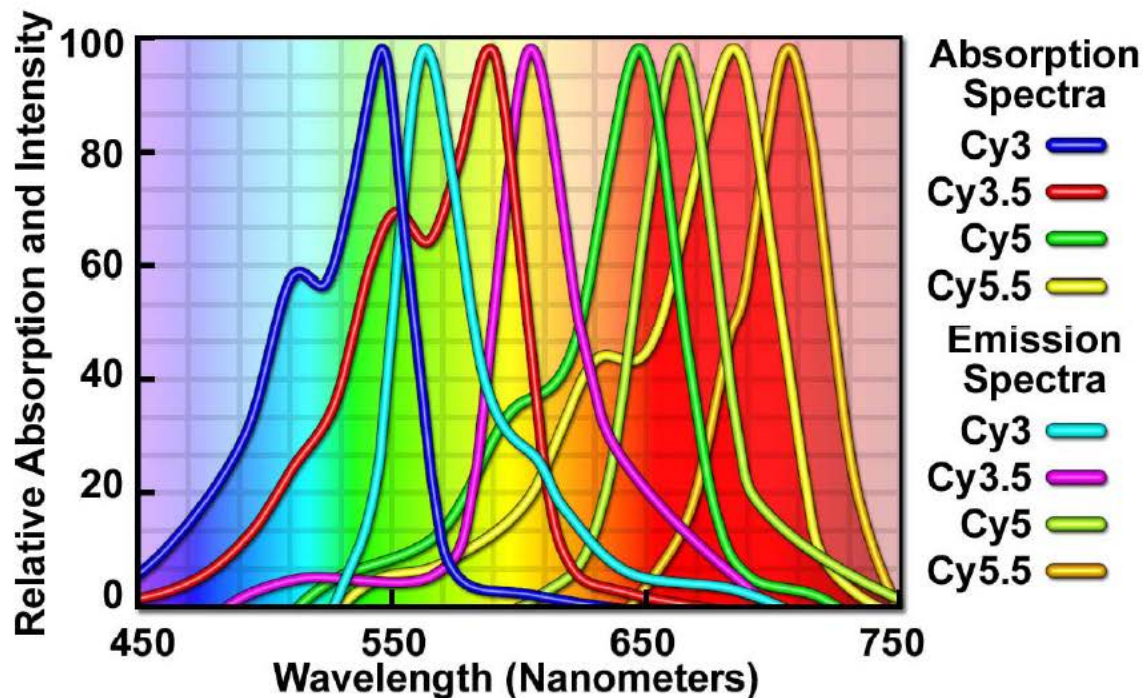
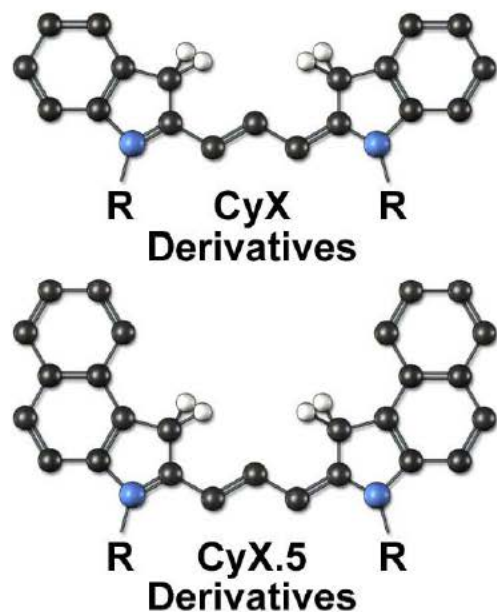
# Стабильность флуоресцентных красителей



# Примеры часто употребляемых флюоресцентных красителей

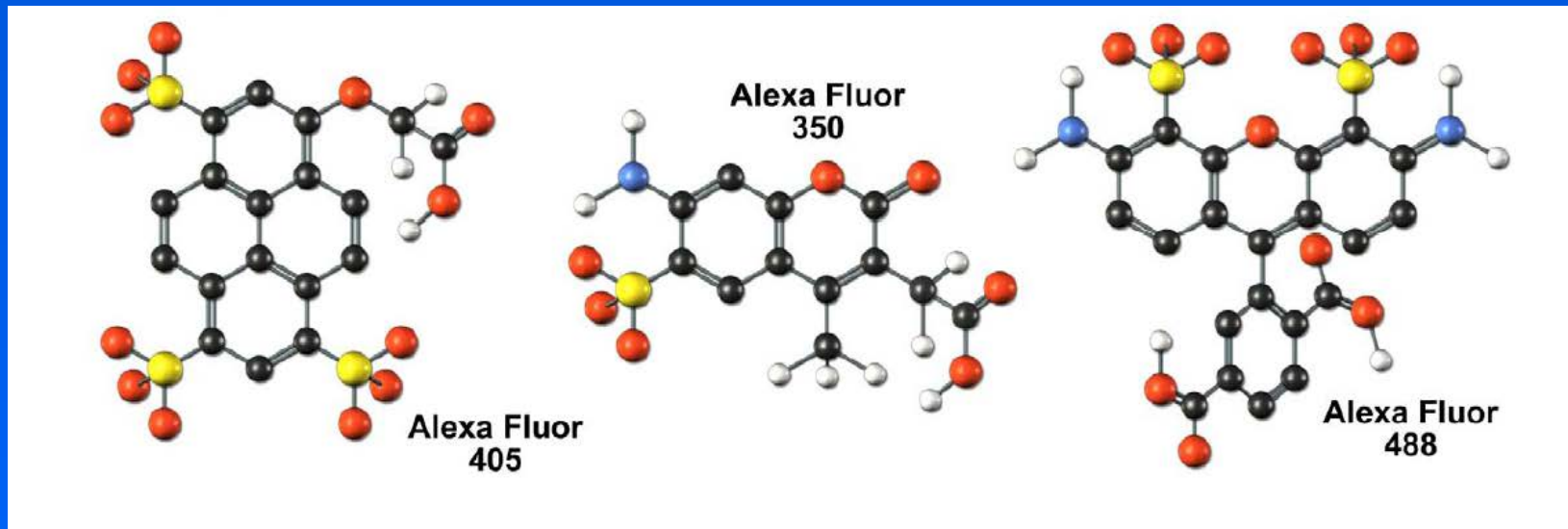


# Цианиновые красители



Красители достаточно стабильны, но имеют небольшой сдвиг Стокса.

# Красители семейства AlexaFluor



Наиболее стабильные из органических красителей (Alexa488, Alexa 555, Alexa 568, Alexa 647). Имеют небольшой сдвиг Стокса и различный коэффициент экстинкции.

# Флуоресцентные белки

## Необходимые характеристики:

- спектры возбуждения и эмиссии
- время и эффективность созревания (folding)
- коэффициент экстинкции и квантовый выход
- фотостабильность (для пролонгированных экспериментов)
- изоэлектрическая точка

## GFP и его мутанты:

Yellow FP, EYFP (514/527 nm)

Green FP, EGFP (488/509 nm)

Cyan FP, ECFP (475 nm)

Blue FP, EBFP (448 nm)

Красные флуоресцентные белки (возбуждение – 550-590 нм, флуоресценция 580-640 нм) – очень много, но они менее стабильны, чем производные GFP.

# Зеленый флуоресцентный белок

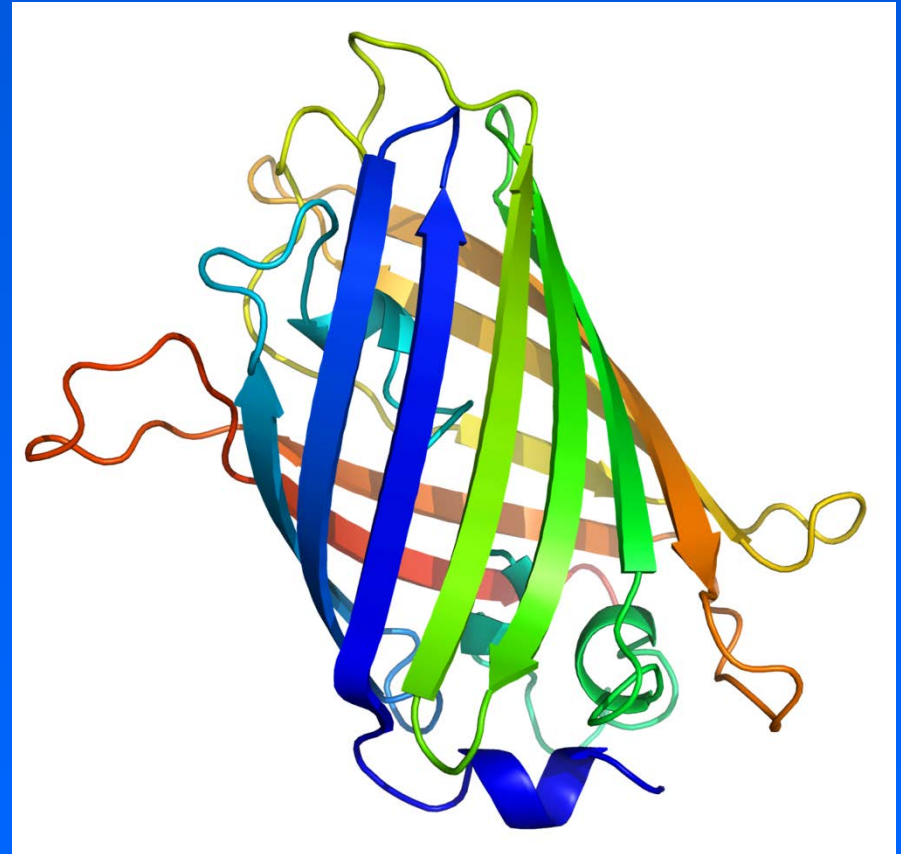
Нобелевская премия,  
2008

Осама Симомура, Мартин Чалфи и Роджер Тсьен.

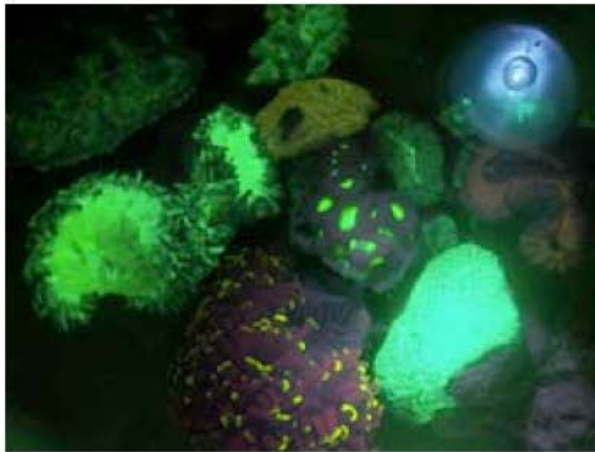
Выделен из медузы *Aequorea victoria*, экспрессирован в про- и эукариотах. Получено множество мутантов.

Исходный белок – 238 а-к,  
мол. вес 26,9 кД.

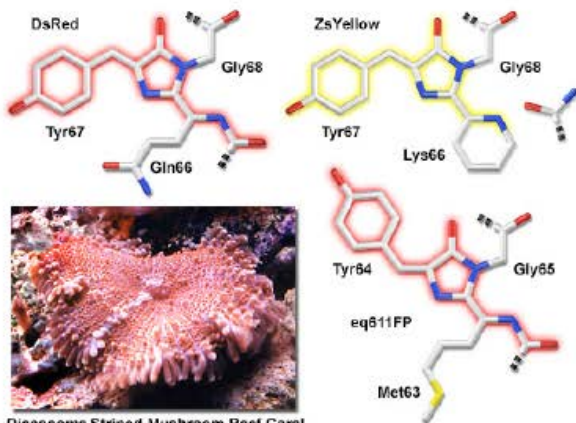
Флуорофор находится в центре складчатой структуры.



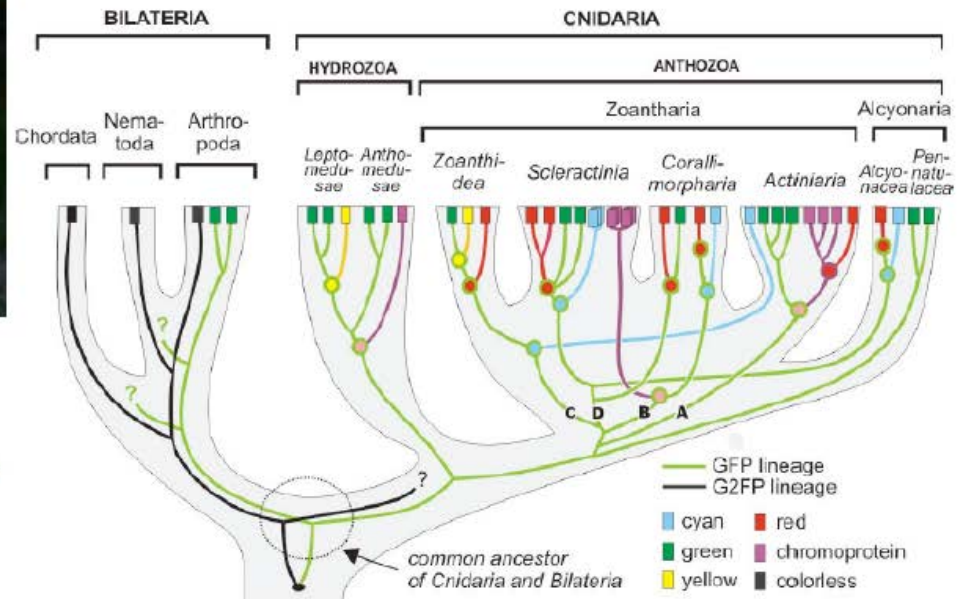
# Флуоресцентные белки кораллов



Chromophore Structure of Anthozoa Fluorescent Proteins



Discosoma Striped Mushroom Reef Coral

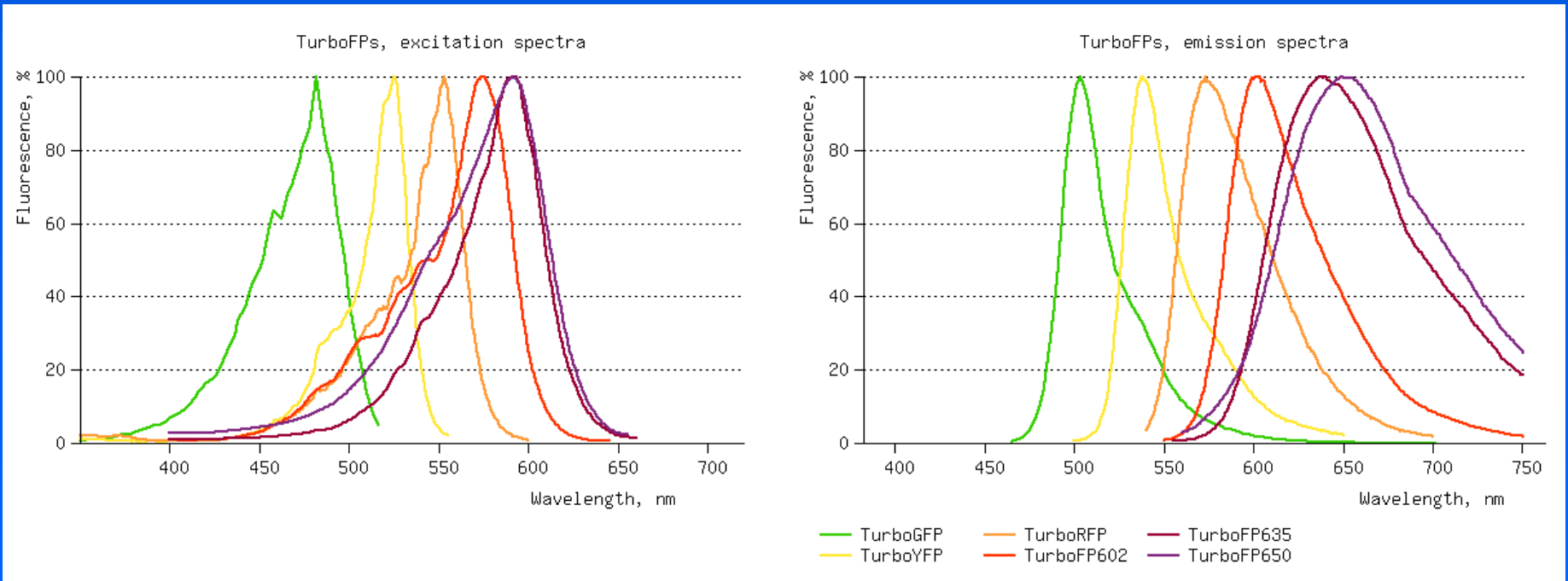




# Характеристики некоторых флуоресцентных белков

Белок	$\lambda_{ex}$	$\lambda_{em}$	$\epsilon$	$Q_e$	Яркость
CFP	433	475	32500	0.4	13.0
GFP	488	507	56000	0.6	33.6
Citrine	516	529	77000	0.76	58.5
PhiYFP	525	537	130000	0.4	52.0
MkOrange	548	559	51600	0.6	31.0
tdimer2	552	579	120000	0.68	81.6
tdtomato	554	581	138000	0.69	95.2
DsRed-monomer	556	586			
mRFP1	584	607	44000	0.25	11.0
mCherry	587	610	72000	0.22	15.8
tHcRed	590	637	160000	0.04	6.4

# Спектры некоторых флуоресцентных белков (Evrogen)

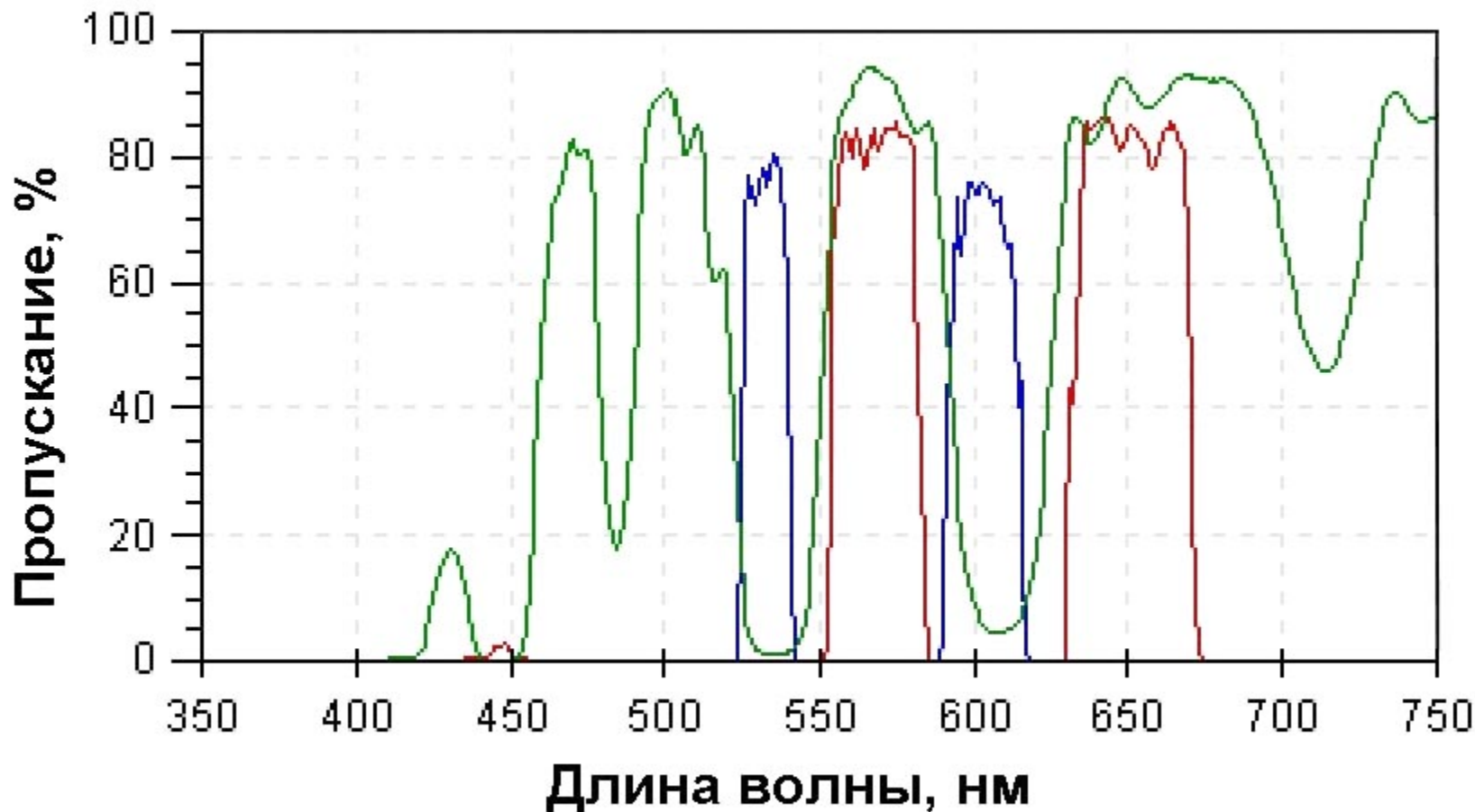


# Специальные флуоресцентные красители

**Мерцающие красители:** спонтанно переходят из флуоресцентного в нефлуоресцентное состояние и обратно.

**Фотоактивируемые красители (caged dyes)** – под воздействием коротковолнового света переходят во флуоресцентное состояние. Некоторые фотоактивируемые красители могут возвращаться во флуоресцентное состояние многократно.

# Спектр пропускания светофильтров в кубе – двойной набор (double set)



# Перекрывание сигналов

Fluorophore Filter Set	Relative Fluorophore Contributions for Each Filter Set								
	DAPI	SpAqua	SpGreen	SpGold	SpOrange	SpRed	Cy5 / FRed	Cy5.5	Cy7
DAPI	100%	30%	0%						
SpAqua	0%	100%	1%	0%					
SpGreen	0%	0%	100%	3%	0%				
SpGold		0%	2%	100%	49%	1%			
SpOrange			0%	36%	100%	11%	0%		
SpRed				0%	15%	100%	1%	0%	
Cy5 / FRed					0%	12%	100%	53%	1%
Cy5.5						0%	53%	100%	6%
Cy7							0%	12%	100%

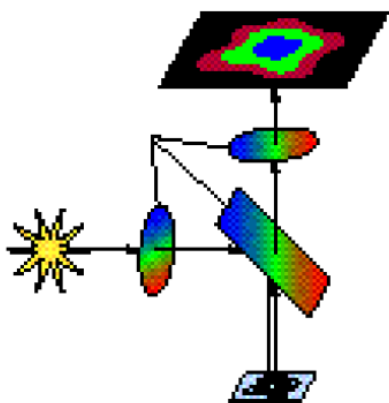
Grey combinations are not recommended

При одновременном использовании нескольких флуорофоров основная проблема состоит в перекрывании сигналов. Величина перекрывания зависит от спектров красителей и применяемых светофильтров.

# Конфигурации наборов светофильтров

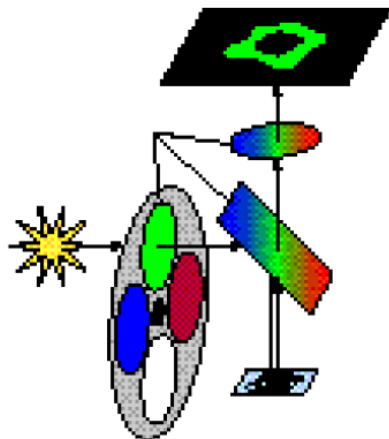
## "Full Multiband" Configuration

(Multiband exciter, multiband emitter, & multiband dichroic)



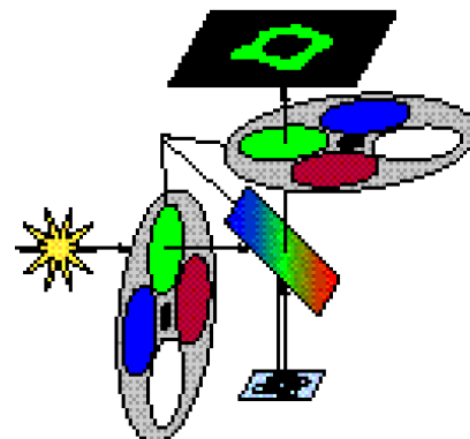
## "Pinkel" Configuration

(Multiband emitter, multiband dichroic, & single-band exciters)



## "Sedat" Configuration

(Multiband dichroic, single-band exciters, & single-band emitters)

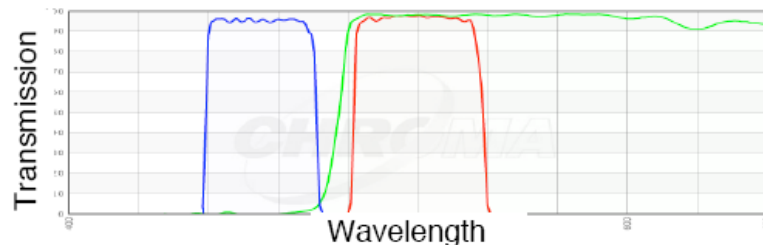


Многоцветный куб позволяет получить цветное изображение. Набор Пинкеля (Pinkel set) требует одного колеса с фильтрами и двух многополосных фильтров – светоделителя и запирающего фильтра. Набор Седата (Sedat set) требует двух колес с фильтрами. Колесо с запирающими светофильтрами устанавливается перед камерой.

# Варианты комплектации светофильтров

## Single wavelength sets

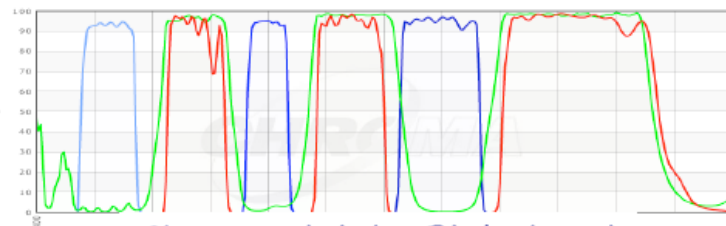
- Most efficient
- Best separation
- Very slow to change  $\lambda$



## Multi-band filters

### • Multi-band everything

- See all colors at once
- For color cameras
- Bad crosstalk

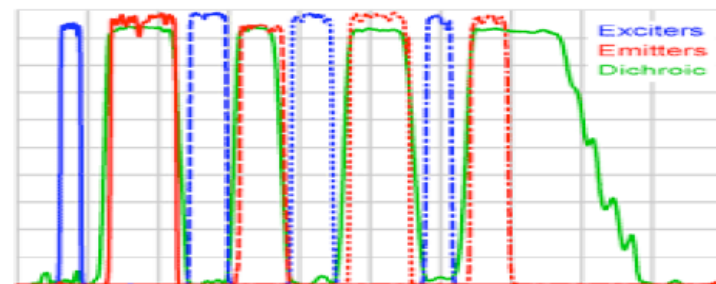
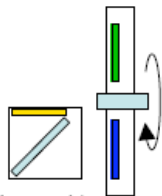


Chroma triple Pinkel set

### • "Pinkel" scheme

Multi-band dichroic  
Multi-band emitter  
Single- $\lambda$  exciters

- Excitaton filter wheel
- Separate image at each wavelength
- Better separation

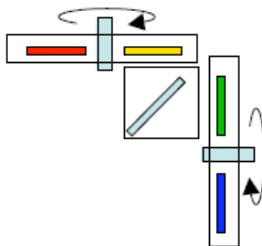


Semrock quad Sedat set

### • "Sedat" scheme

Multi-band dichroic  
single-band emitters  
Single- $\lambda$  exciters

- Two filter wheels
- Even better separation



# Подбор светофильтров для красителя

Определение спектра возбуждения и испускания красителя – максимумы, ширина, асимметрия.

Максимальная яркость – детектирование отдельных молекул и другие случаи слабых сигналов. Используется широкая полоса пропускания запирающего фильтра и LP запирающий фильтр. Такой подход неудобен для одновременного использования нескольких красителей. Также он приводит к относительному возрастанию автофлуоресценции.

Для максимальной селективности (при достаточной яркости сигнала) используется узкая полоса пропускания возбуждающего и запирающего фильтров, которые максимально соответствуют пикам поглощения и эмиссии красителя. Это позволяет уменьшить автофлуоресценцию (которая всегда имеет широкий спектр) и добиться большей селективности при работе с несколькими флуорохромами.



# Способы флуоресцентного мечения

Иммунофлуоресценция – прямая и непрямая окраска конъюгированными антителами.

Флуоресцентная гибридизация нуклеиновых кислот *in situ* (FISH) – конъюгированные зонды.

Прямое связывание с мишенью (красители для нуклеиновых кислот – акридиновый оранжевый, DAPI).

Красители, накапливающиеся в органеллах (жирные катионы в митохондриях - Rhodamin-123).

Введение флуоресцентных белков – трансфекция (eGFP, DsRed).

# **Флуоресцентные красители для визуальных наблюдений**

**Флуоресценция в диапазоне 450-630 нм.**

**Возбуждение – УФ, синий свет (450-490 нм),  
зеленый свет (500-550 нм).**

**Малое время высвечивания флуоресценции  
(большая яркость).**

# **Флюоресцентные красители для инструментальных наблюдений**

**Флюоресценция в диапазоне 400-850 нм.**

**Возбуждение – УФ (340-395 нм), фиолетовый свет (407 нм); синий свет (450-490 нм), зеленый свет (500-550 нм), желто-красный свет (570-640 нм), ближний ИК свет (730-780 нм).**

**Высокая фотостабильность, большой квантовый выход.**

# Автофлуоресценция живых клеток

Автофлуоресценция аминокислот – тирозин, триптофан, фенилаланин. Белки – коллаген, эластин.

Автофлуоресценция возбуждается в диапазоне 270-490 нм. Она практически отсутствует при возбуждении светом >500 нм.

Эмиссия – синий свет (слабая), зеленый свет (средняя-сильная), желто-оранжевый свет (сильная).

Автофлуоресценция клеток – в видимой области светят НАД-Н, рибофлавин, ретинол, липофусцин, меланин. Основные органеллы – предположительно лизосомы (не митохондрии!).

Относительно яркой автофлуоресценцией обладают макрофаги, нейроны, мышцы, сперматозоиды.

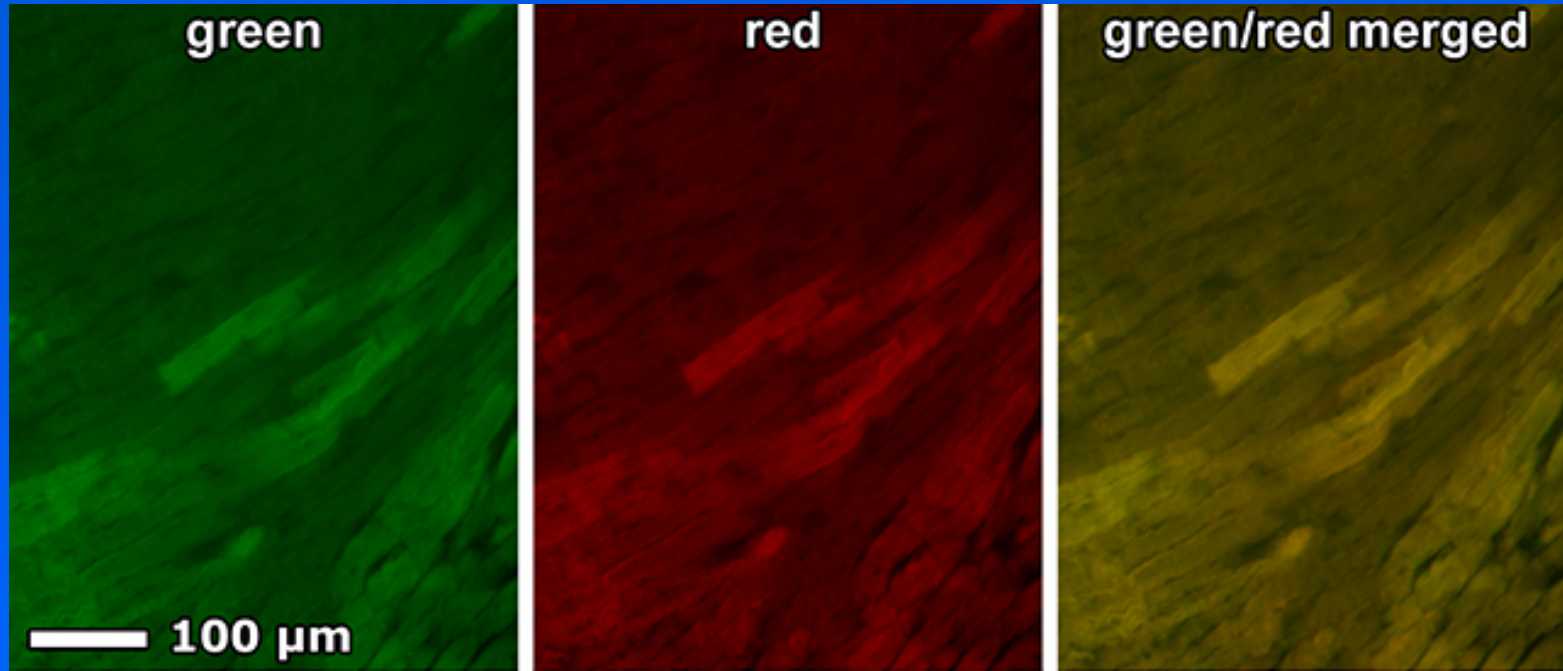
# Автофлуоресценция фиксированных клеток

Автофлуоресценция клеток может возрастать при фиксации (особенно сильно – при альдегидной).

Для ее уменьшения можно использовать борогидрид натрия (свежеприготовленный раствор в ФФБ), или избегать альдегидов в составе фиксатора (метанол, ацетон при низкой температуре и др.).

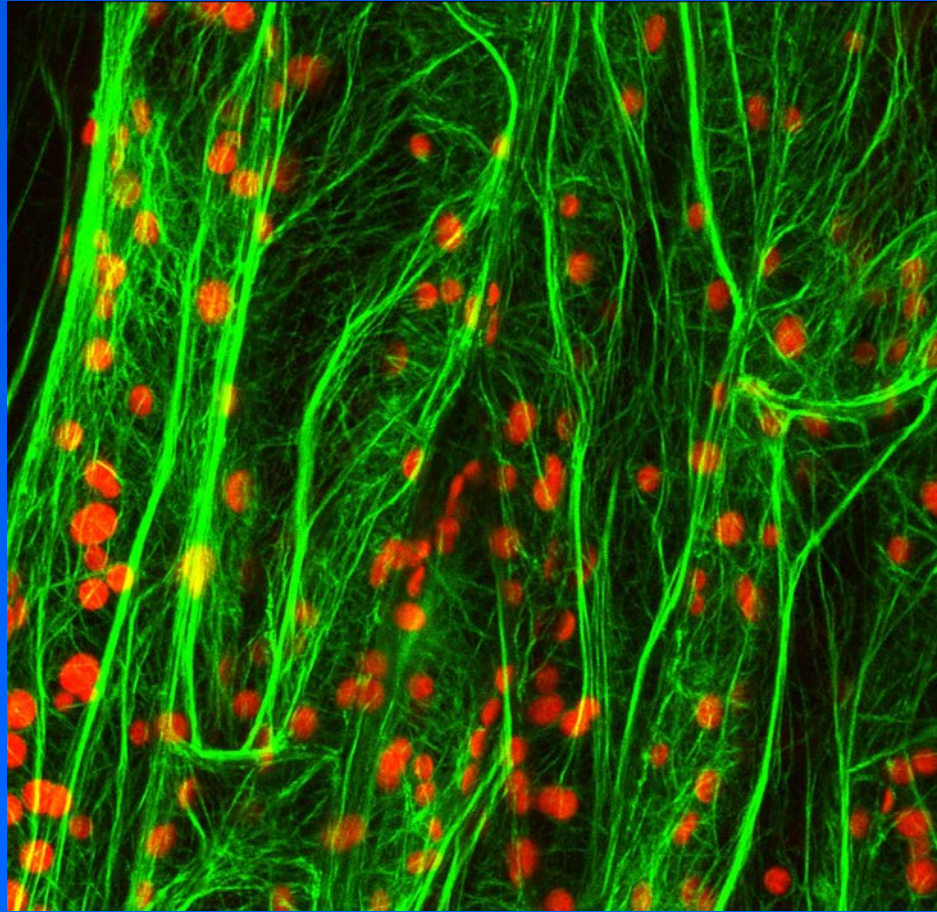
Чтобы уменьшить влияние автофлуоресценции, целесообразно пользоваться длинноволновыми красителями (эмиссия свыше 580 нм).

# Автофлюоресценция миокардиоцитов



Автофлюоресценция доказывается широким спектром свечения и отсутствием специфических окрашенных структур.

# Флуоресценция и автофлуоресценция в клетках растений



Зеленый цвет – GFP-актин (трансфекция); красный – автофлуоресценция хлоропластов

# Прижизненные наблюдения

Поддержание постоянной температуры - инкубатор.  
При использовании иммерсионного объектива обязательно его термостатирование.

Поддержание баланса pH – добавление HEPES (10-25 мМ) в среду с минимальным содержанием бикарбоната или подача CO<sub>2</sub> в специальной камере, или использование специальных культуральных сред (CO<sub>2</sub>-независимых)

Уменьшение фотодеструкции – синхронизированный с камерой затвор; снижение парциального давления кислорода (оксираза).

Уменьшение автофлуоресценции – использование специальных культуральных сред (без витаминов и др. добавок).



# Вещества, защищающие флуорохромы от выцветания

Вещество	Комментарии
p-phenylene-diamine	Наиболее эффективен для FITC. Также работает для Rhodamine. Применяется в концентрации 0.1% в глицерине/PBS. Хранить в темноте, быстро разрушается на свету. Очень токсичен для кожи.
<b>DABCO</b> (1,4-diazabicyclo-2,2,2-octane)	Высокоэффективен для FITC. Несколько уступает p-phenylenediamine, но более устойчив к свету и менее токсичен.
n-propylgallate	Наиболее эффективен для Rhodamine, Также работает для FITC. Применяется в концентрации 1% в глицерине /PBS.
2-mercaptoethylamine	Для окраски хромосом и ДНК с помощью propidium iodide, acridine orange, или Chromomysin A3. Применяется в концентрации 0.1mM 2-mercaptoethylamine в Tris-EDTA

# Совместное использование нескольких красителей

Все спектры флуоресценции органических красителей широкие. Поэтому при совместном использовании более двух красителей, как правило, возникает эффект перекрывания сигналов.

При подборе красителей необходимо, чтобы расстояние между максимумами их эмиссий было не менее 40-50 нм. Желательно – 60 и более нм. Таким образом, максимальное число цветов для визуального наблюдения составляет не более трех, для инструментального (без специальных мер) – не более четырех.

Поскольку большинство спектров флуоресценции асимметричны («красный хвост»), то флуоресцентный сигнал от красителя с меньшим максимумом эмиссии «затекает» в канал более длинноволнового красителя, но не наоборот.

Для уменьшения эффекта перекрывания помимо подбора светофильтров используется процедура «компенсации», которая проводится на цифровых изображениях.

# Квантовый выход и регистрация флуоресценции

Квантовый выход ( $Q_e$ ) рассчитывается как вероятность излучательного перехода. Он всегда меньше единицы, но может приближаться к ней. Квантовый выход флуоресцеина (в пике) – 92%.

При смещении полосы возбуждения от пика квантовый выход снижается.

Эффективность детектирования флуоресценции зависит от квантового выхода (возбуждение) и от полосы пропускания запирающего фильтра.

Для оценки эффективности регистрации флуоресценции для большинства красителей используются специальные программы – например, *Spectra viewer*.

Спектры некоторых красителей могут изменяться при их взаимодействии с клеткой (как правило – сдвиг в более длинноволновую сторону и расширение спектра эмиссии).

# Подбор красителей и фильтров – Spectra viewer

	Channel 1			Channel 2			Channel 3		
	Ex1	Em1	Σ1	Ex2	Em2	Σ2	Ex3	Em3	Σ3
<b>TagFPs</b>									
<input checked="" type="checkbox"/> TagBFP	0.34	0.43	1462	0.00	0.09	0	0.00	0.00	0
<input type="checkbox"/> TagCFP									
<input type="checkbox"/> TagGFP2									
<input checked="" type="checkbox"/> TagYFP	0.01	0.00	0	0.14	0.44	616	0.00	0.03	0
<input type="checkbox"/> TagRFP									
<input checked="" type="checkbox"/> mKate2	0.01	0.00	0	0.02	0.00	0	0.30	0.30	900
<b>TurboFPs</b>									
<input checked="" type="checkbox"/> TurboGFP	0.04	0.04	16	0.44	0.34	1496	0.00	0.01	0
<input type="checkbox"/> TurboYFP									
<input checked="" type="checkbox"/> TurboRFP	0.00	0.00	0	0.09	0.02	18	0.44	0.22	968
<input type="checkbox"/> TurboFP602									
<input type="checkbox"/> TurboFP635									
<input type="checkbox"/> TurboFP650									
<b>Special FPs</b>									
<input type="checkbox"/> NirFP									

Value  $\Sigma$  is shown in red in the occurrence of an inappropriate combination of excitation and emission wavelengths in the same channel.

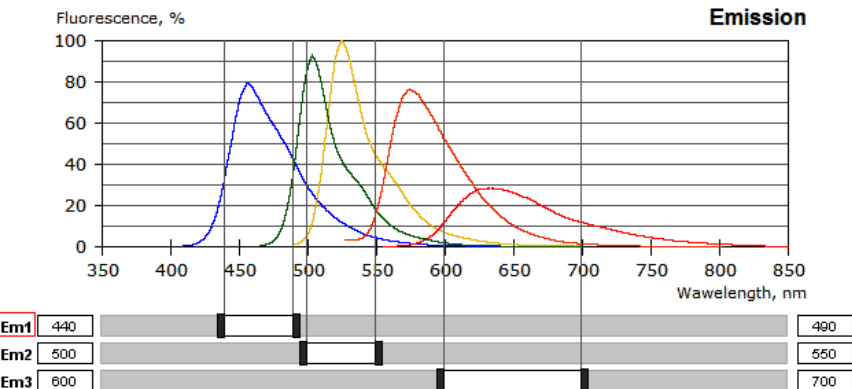
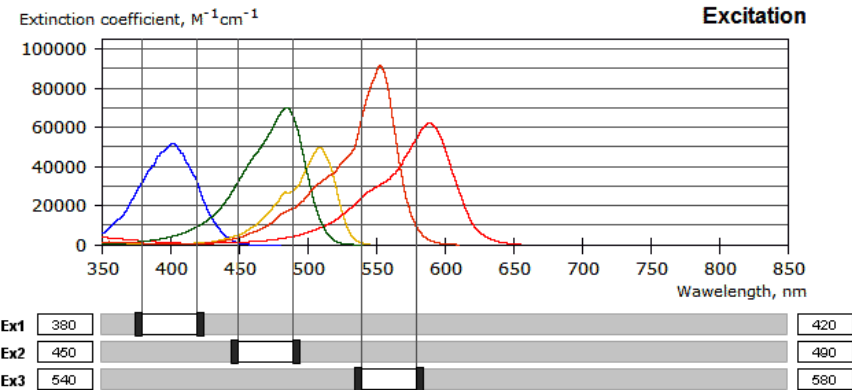
## Non-normalized spectra / wide-field excitation

Non-normalized view allows for the comparison of excitation and emission efficiencies of different FPs between each other within the selected wavelength range. Here the amplitude of each excitation peak is equal to the maximal molar extinction coefficient of the corresponding FP, and the total area of each emission spectrum is equal to the fluorescence quantum yield of the corresponding FP.

**Ex:** Relative efficiency of excitation by light of the selected wavelength range. The value is calculated as the ratio of the area under the excitation curve limited by selected wavelengths to the total area of excitation spectrum of NirFP (the reporter with the largest area of excitation spectrum among currently available Evrogen FPs).

**Em:** Quantum yield of corresponding fluorescent protein within the selected wavelength range. The value is calculated for each particular FP as a portion of the area under the emission curve, limited by selected wavelengths.

**Σ:** Product of **Ex** and **Em**, X 10000. The value reflects the total brightness of the signal, collected in the corresponding channel.



The data provided by Spectra Viewer can be used only for preliminary estimation of relative reporter's suitability for your instrumentation; the actual performance should be tested experimentally and may vary.

**Интерактивная система, позволяющая посмотреть спектры выбранных красителей и оценить их совместимость.**

# Наблюдение отдельной молекулы во флуоресцентной микроскопии

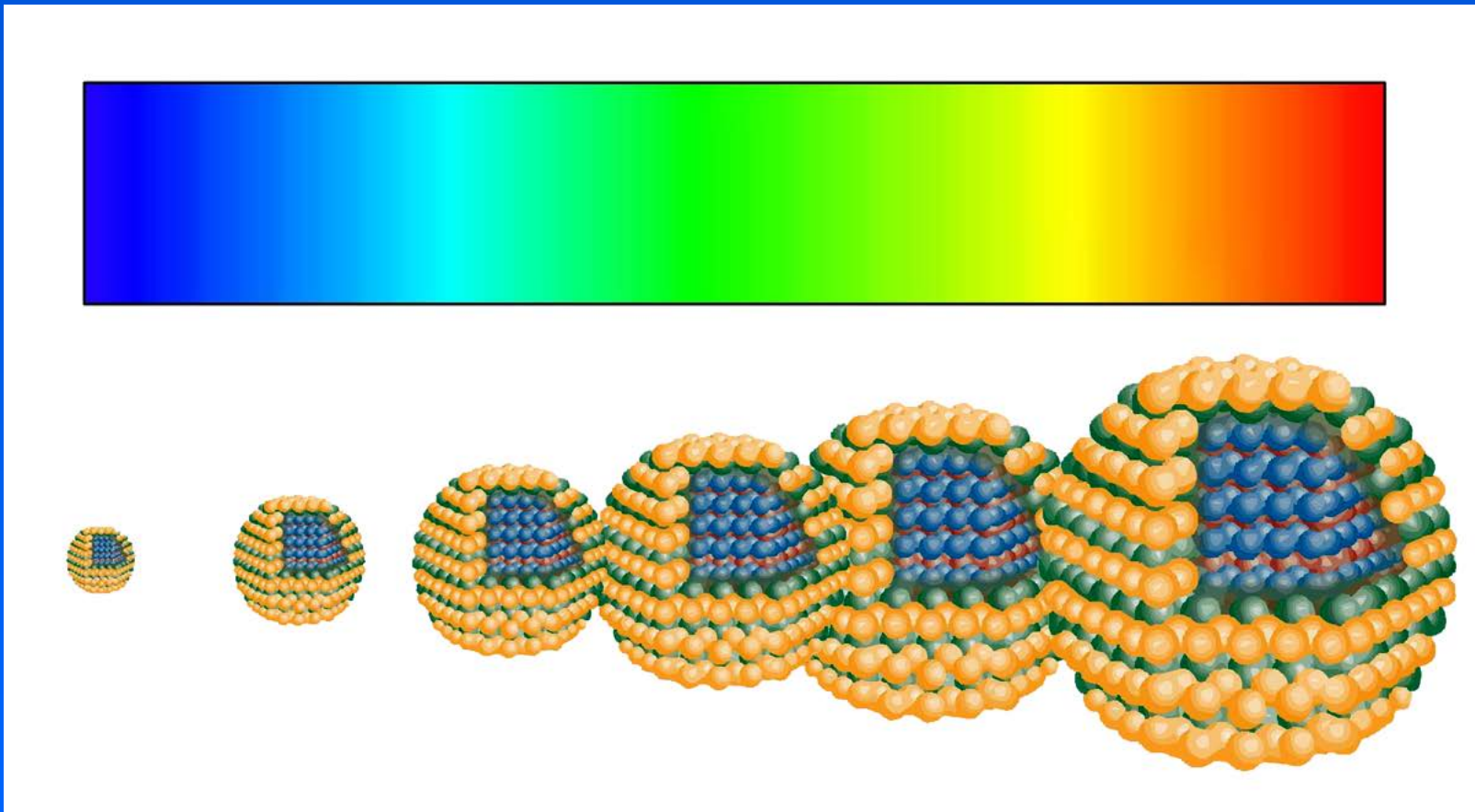
Флуорохром – максимально стабильный  
( $Q_e/Q_d > 10^5$ ).

Объектив с максимальной светособирающей  
силой (например, x60/1,45) .

Квантовый выход камеры – не менее 70%;  
эквивалентный размер пиксела 0,1-0,15 мкм.

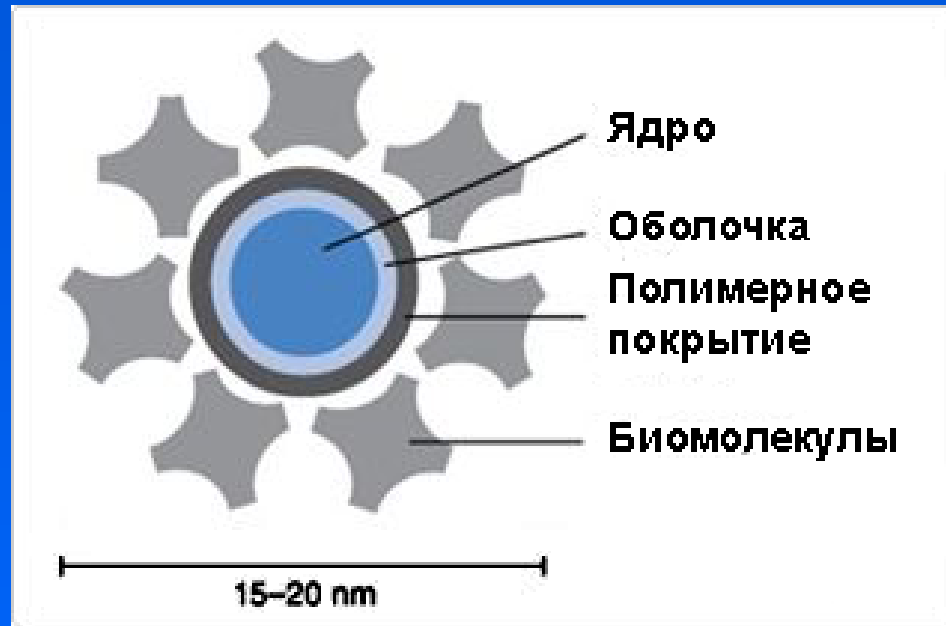
Критерий: свечение не затухает постепенно, но  
пропадает внезапно и полностью.

# Флуоресцентные наночастицы



Частицы из полупроводниковых материалов (например, CdSe) с ядром переменного диаметра (2-10 нм). Ширина спектра поглощения и длина волны эмиссии зависят от размера ядра.

# Строение флуоресцентной наночастицы

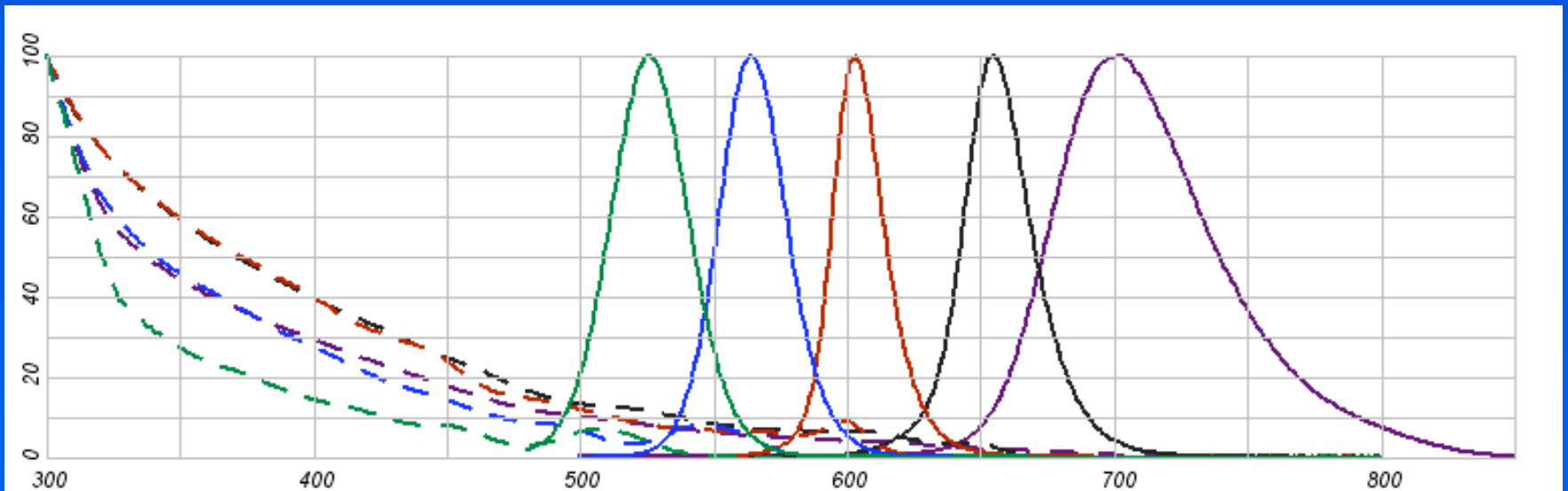


Размер ядра и свойства оболочки определяют спектр флюоресценции.

Полимерное покрытие делает частицу нетоксичной и позволяет получать конъюгаты.

Связываемые биомолекулы – например, биотин или антитела.

# Спектры возбуждения и эмиссии наночастиц



## Основные достоинства наночастиц:

Большой сдвиг Стокса

Широкий спектр возбуждения

Высокая фотостабильность

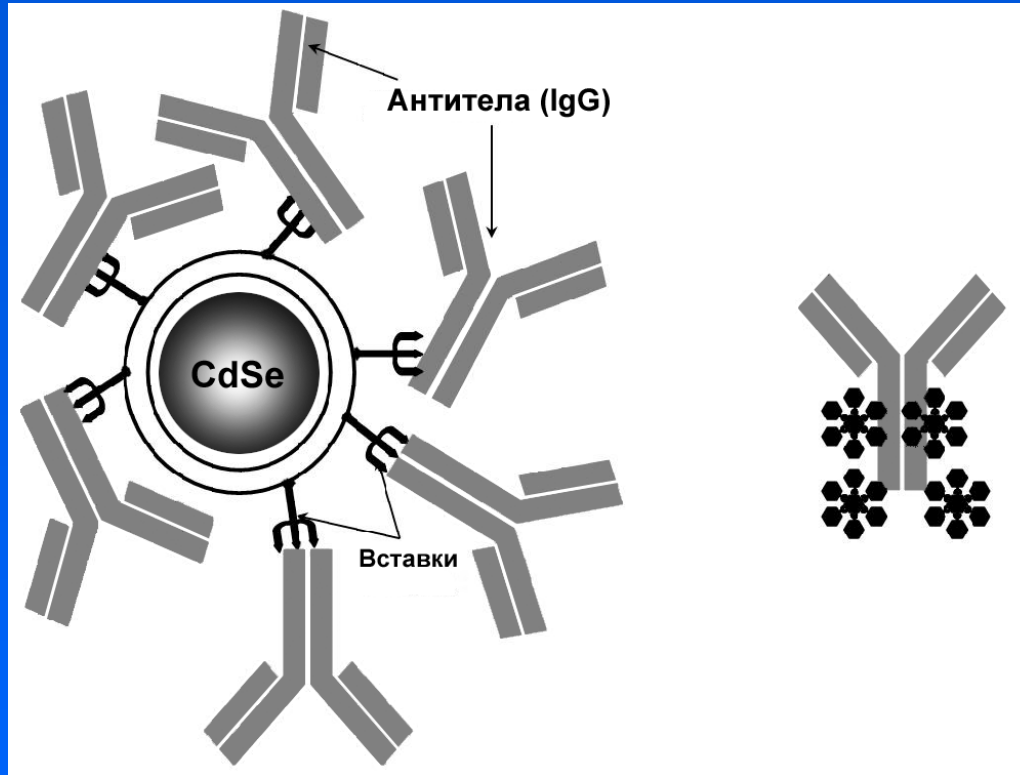
Симметричные спектры флюоресценции

## Недостатки:

относительно большие размеры, трудности конъюгации.



# Сравнение квантовых точек и органических красителей



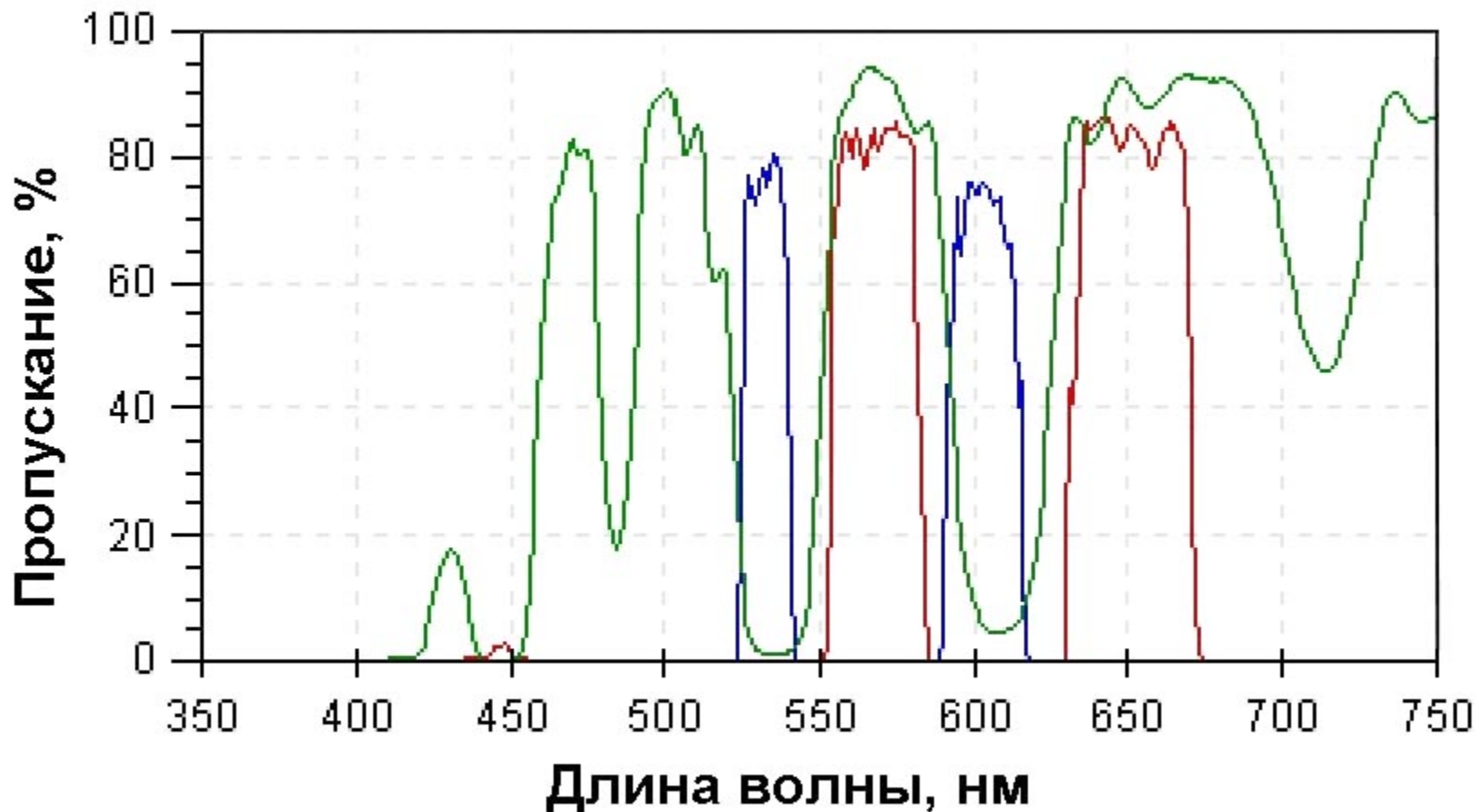
Одна квантовая точка (слева) связывается с несколькими молекулами антител, поскольку имеет большой размер.

Одна молекула антитела (справа) связывается с несколькими молекулами небольших органических красителей.

# Лекция 9

**Флуоресцентная микроскопия:  
наблюдение нескольких  
красителей; работа с живыми  
клетками**

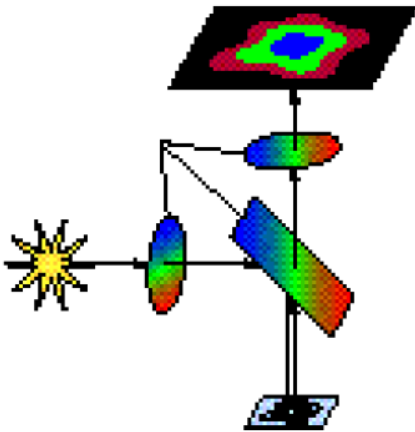
# Спектр пропускания светофильтров в кубе – двойной набор (double set)



# Конфигурации наборов светофильтров

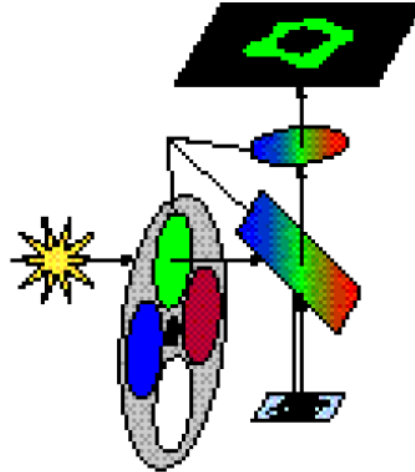
## "Full Multiband" Configuration

(Multiband exciter, multiband emitter, & multiband dichroic)



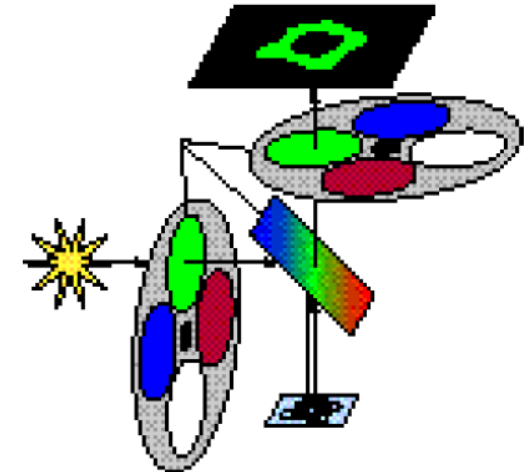
## "Pinkel" Configuration

(Multiband emitter, multiband dichroic, & single-band exciters)



## "Sedat" Configuration

(Multiband dichroic, single-band exciters, & single-band emitters)



Только многоцветный куб позволяет получить цветное изображение.

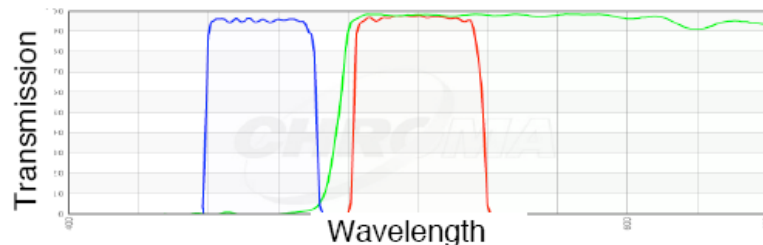
Набор Пинкеля (Pinkel set) требует одного колеса с фильтрами и двух многополосных фильтров – светоделителя и запирающего фильтра.

Набор Седата (Sedat set) требует двух колес с фильтрами и одного многополосного светоделителя. Второе колесо (с запирающими светофильтрами) устанавливается перед камерой.

# Варианты комплектации светофильтров

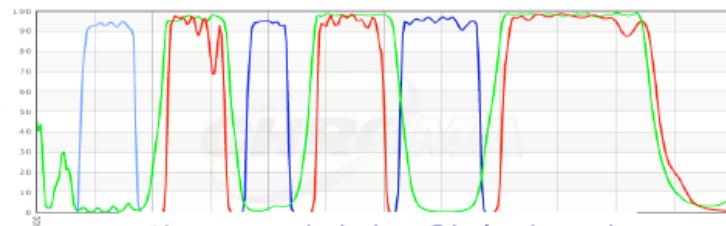
## Single wavelength sets

- Most efficient
- Best separation
- Very slow to change  $\lambda$



## Multi-band filters

- Multi-band everything
  - See all colors at once
  - For color cameras
  - Bad crosstalk

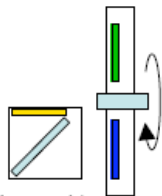


Chroma triple Pinkel set

- "Pinkel" scheme

Multi-band dichroic  
Multi-band emitter  
Single- $\lambda$  exciters

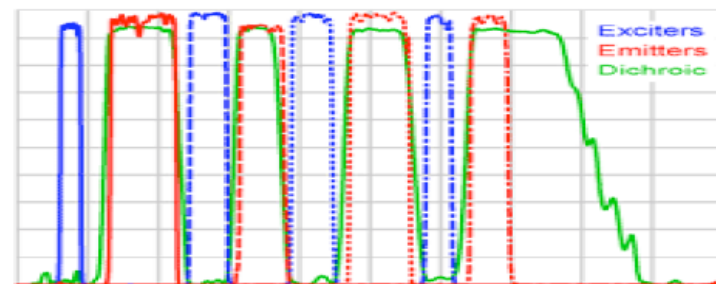
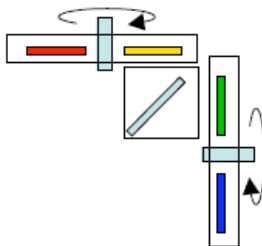
- Excitaton filter wheel
- Separate image at each wavelength
- Better separation



- "Sedat" scheme

Multi-band dichroic  
single-band emitters  
Single- $\lambda$  exciters

- Two filter wheels
- Even better separation



Semrock quad Sedat set

# Подбор светофильтров для красителя

Определение спектра возбуждения и испускания красителя – максимумы, ширина, асимметрия.

Максимальная яркость – детектирование отдельных молекул и другие случаи слабых сигналов. Используется широкая полоса пропускания запирающего фильтра и LP запирающий фильтр. Такой подход неудобен для одновременного использования нескольких красителей. Также он приводит к относительному возрастанию автофлуоресценции.

Для максимальной селективности (при достаточной яркости сигнала) используется узкая полоса пропускания возбуждающего и запирающего фильтров, которые максимально соответствуют пикам поглощения и эмиссии красителя. Это позволяет уменьшить автофлуоресценцию (которая всегда имеет широкий спектр) и добиться большей селективности при работе с несколькими флуорохромами.

# Подбор красителей и фильтров – Spectra viewer

	Channel 1			Channel 2			Channel 3		
	Ex1	Em1	Σ1	Ex2	Em2	Σ2	Ex3	Em3	Σ3
<b>TagFPs</b>									
<input checked="" type="checkbox"/> TagBFP	0.34	0.43	1462	0.00	0.09	0	0.00	0.00	0
<input type="checkbox"/> TagCFP									
<input type="checkbox"/> TagGFP2									
<input checked="" type="checkbox"/> TagYFP	0.01	0.00	0	0.14	0.44	616	0.00	0.03	0
<input type="checkbox"/> TagRFP									
<input checked="" type="checkbox"/> mKate2	0.01	0.00	0	0.02	0.00	0	0.30	0.30	900
<b>TurboFPs</b>									
<input checked="" type="checkbox"/> TurboGFP	0.04	0.04	16	0.44	0.34	1496	0.00	0.01	0
<input type="checkbox"/> TurboYFP									
<input checked="" type="checkbox"/> TurboRFP	0.00	0.00	0	0.09	0.02	18	0.44	0.22	968
<input type="checkbox"/> TurboFP602									
<input type="checkbox"/> TurboFP635									
<input type="checkbox"/> TurboFP650									
<b>Special FPs</b>									
<input type="checkbox"/> NirFP									

Value  $\Sigma$  is shown in red in the occurrence of an inappropriate combination of excitation and emission wavelengths in the same channel.

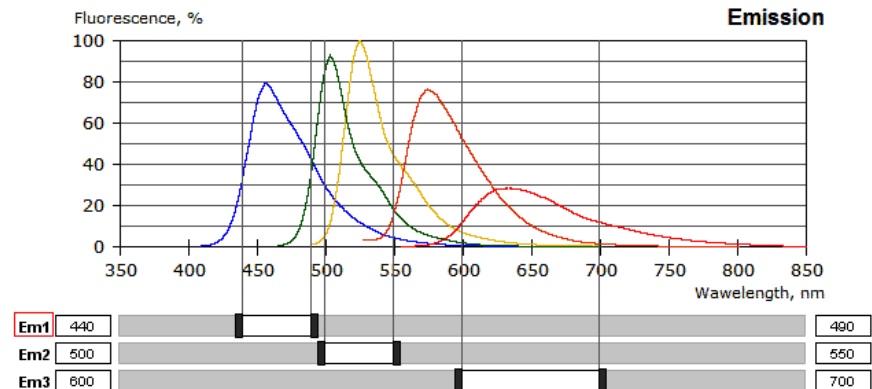
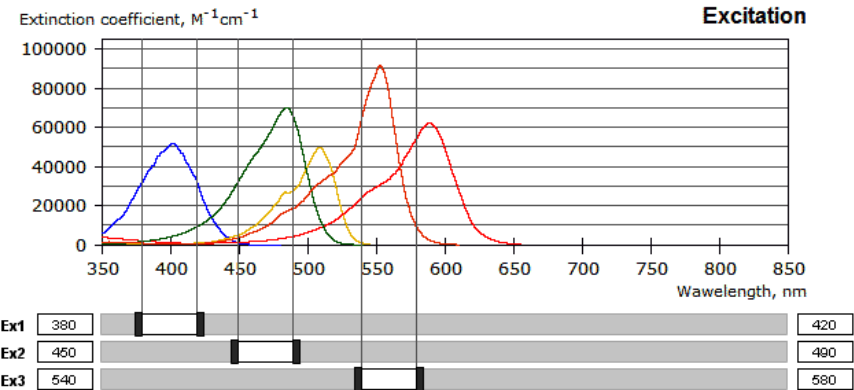
## Non-normalized spectra / wide-field excitation

Non-normalized view allows for the comparison of excitation and emission efficiencies of different FPs between each other within the selected wavelength range. Here the amplitude of each excitation peak is equal to the maximal molar extinction coefficient of the corresponding FP, and the total area of each emission spectrum is equal to the fluorescence quantum yield of the corresponding FP.

**Ex:** Relative efficiency of excitation by light of the selected wavelength range. The value is calculated as the ratio of the area under the excitation curve limited by selected wavelengths to the total area of excitation spectrum of NirFP (the reporter with the largest area of excitation spectrum among currently available Evrogen FPs).

**Em:** Quantum yield of corresponding fluorescent protein within the selected wavelength range. The value is calculated for each particular FP as a portion of the area under the emission curve, limited by selected wavelengths.

**Σ:** Product of **Ex** and **Em**, X 10000. The value reflects the total brightness of the signal, collected in the corresponding channel.



The data provided by Spectra Viewer can be used only for preliminary estimation of relative reporter's suitability for your instrumentation; the actual performance should be tested experimentally and may vary.

Интерактивная система, позволяющая просмотреть спектры выбранных красителей и оценить их совместимость.

# Квантовый выход и регистрация флуоресценции

Квантовый выход ( $Q_e$ ) рассчитывается как вероятность излучательного перехода. Он всегда меньше единицы, но может приближаться к ней. Квантовый выход флуоресцеина (в пике) – 92%.

При смещении полосы возбуждения от пика квантовый выход снижается.

Эффективность детектирования флуоресценции зависит от квантового выхода (возбуждение) и от полосы пропускания запирающего фильтра.

Для оценки эффективности регистрации флуоресценции для большинства красителей используются специальные программы – например, *Spectra viewer*.

Спектры некоторых красителей могут изменяться при их взаимодействии с клеткой (как правило – сдвиг в более длинноволновую сторону и расширение спектра эмиссии).



# Перекрывание сигналов

Fluorophore Filter Set	Relative Fluorophore Contributions for Each Filter Set								
	DAPI	SpAqua	SpGreen	SpGold	SpOrange	SpRed	Cy5 / FRed	Cy5.5	Cy7
DAPI	100%	30%	0%						
SpAqua	0%	100%	1%	0%					
SpGreen	0%	0%	100%	3%	0%				
SpGold		0%	2%	100%	49%	1%			
SpOrange			0%	36%	100%	11%	0%		
SpRed				0%	15%	100%	1%	0%	
Cy5 / FRed					0%	12%	100%	53%	1%
Cy5.5						0%	53%	100%	6%
Cy7							0%	12%	100%

Grey combinations are not recommended

При одновременном использовании нескольких флуорофоров основная проблема состоит в перекрывании сигналов. Величина перекрывания зависит от спектров красителей и применяемых запирающих светофильтров.

# Наблюдение отдельной молекулы во флуоресцентной микроскопии

Флуорохром – максимально стабильный  
( $Q_e/Q_d > 10^5$ ).

Объектив с максимальной светособирающей  
силой (например, x60/1,45) .

Квантовый выход камеры – не менее 70%;  
эквивалентный размер пиксела 0,1-0,15 мкм.

Критерий: свечение не затухает постепенно, но  
пропадает внезапно и полностью.

# **Флуоресцентные красители для визуальных наблюдений**

**Флуоресценция в диапазоне 450-630 нм.**

**Возбуждение – УФ, синий свет (450-490 нм),  
зеленый свет (500-550 нм).**

**Требования: малое время высвечивания  
флуоресценции (большая яркость).**

# **Флюоресцентные красители для инструментальных наблюдений**

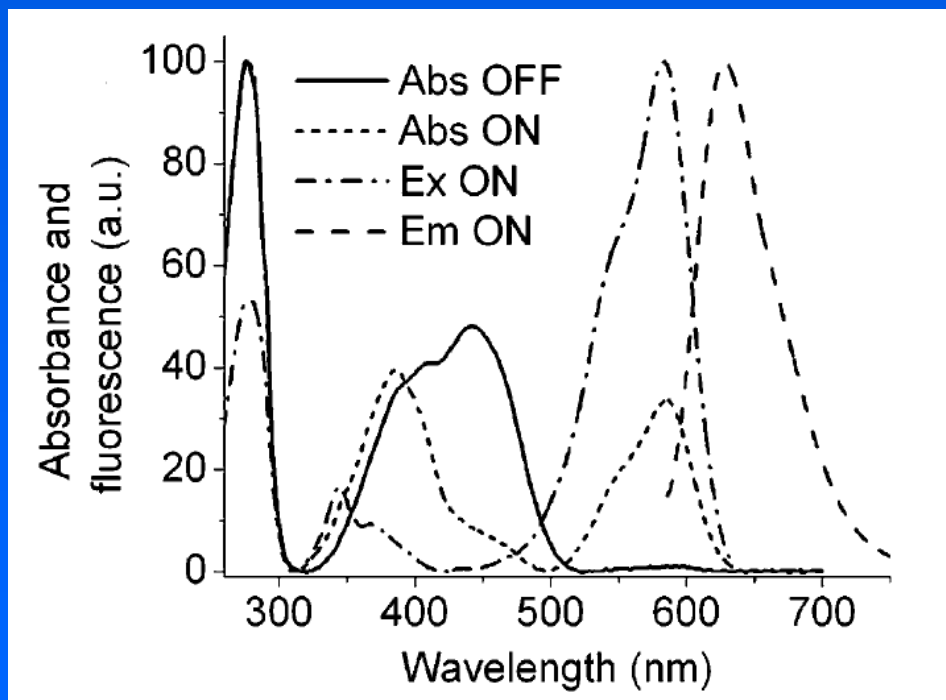
**Флюоресценция в диапазоне 400-850 нм.**

**Возбуждение – УФ (340-395 нм), фиолетовый свет (407 нм); синий свет (450-490 нм), зеленый свет (500-550 нм), желто-красный свет (570-640 нм), ближний ИК свет (730-780 нм).**

**Требования: высокая фотостабильность, большой квантовый выход.**

# Мерцающие красители

**RALM – фотоактивируемые флуоресцентные белки. Активация – как правило, фиолетовым светом (405 нм); возбуждение активированного белка – зеленым светом, флуоресценция – в красной области (>580 нм).**

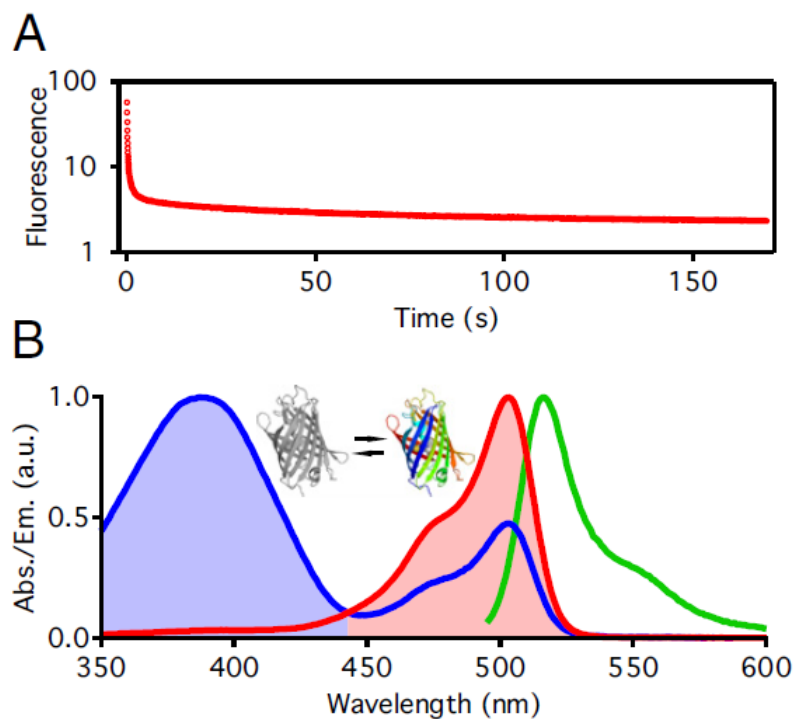


**Спектры возбуждения и флуоресценции белка RAmKate.**

**Поглощение до активации – сплошная линия, поглощение после активации (405 нм) – короткий пунктир.**

**(Gunewardene et al., 2011)**

# Мерцающие красители



Средняя флуоресценция (A) и спектры поглощения, возбуждения и флуоресценции (B) белка Dronpa.

(Dedecker et al., 2012)

# Вещества, защищающие флуорохромы от выцветания

Вещество	Комментарии
p-phenylene-diamine	Наиболее эффективен для FITC. Также работает для Rhodamine. Применяется в концентрации 0.1% в глицерине/PBS. Хранить в темноте, быстро разрушается на свету. Очень токсичен для кожи.
<b>DABCO</b> (1,4-diazabicyclo-2,2,2-octane)	Высокоэффективен для FITC. Несколько уступает p-phenylenediamine, но более устойчив к свету и менее токсичен.
n-propylgallate	Наиболее эффективен для Rhodamine, Также работает для FITC. Применяется в концентрации 1% в глицерине /PBS.
2-mercaptoethylamine	Для окраски хромосом и ДНК с помощью propidium iodide, acridine orange, или Chromomysin A3. Применяется в концентрации 0.1mM 2-mercaptoethylamine в Tris-EDTA

# Автофлуоресценция живых клеток (животных)

Автофлуоресценция аминокислот – тирозин, триптофан, фенилаланин. Основные автофлуоресцирующие белки – коллаген, эластин.

Возбуждение автофлуоресценции происходит в диапазоне 270-490 нм. Она практически отсутствует при возбуждении светом >500 нм.

Эмиссия – синий свет (слабая), зеленый свет (средняя-сильная), желто-оранжевый свет (сильная).

Автофлуоресценция клеток – в видимой области светят НАД-Н, рибофлавин, ретинол, липофусцин, меланин. Основные органеллы – предположительно лизосомы (не митохондрии!).

Относительно яркой автофлуоресценцией обладают макрофаги, нейроны, мышцы, сперматозоиды.



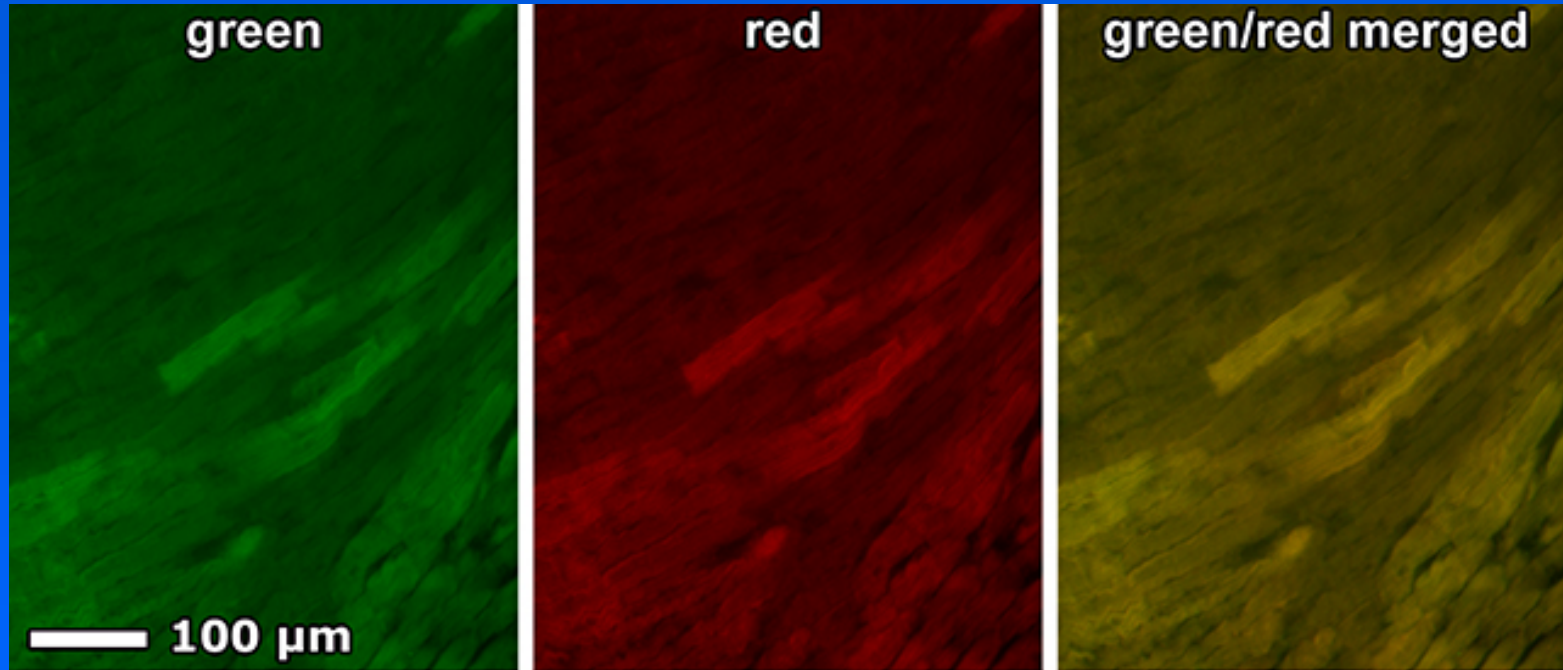
# Автофлуоресценция фиксированных клеток

Автофлуоресценция клеток может возрастать при фиксации (особенно сильно – при альдегидной).

Для ее уменьшения можно использовать борогидрид натрия (свежеприготовленный раствор в ФФБ), или избегать альдегидов в составе фиксатора (фиксация метанолом или ацетоном при низкой температуре и др.).

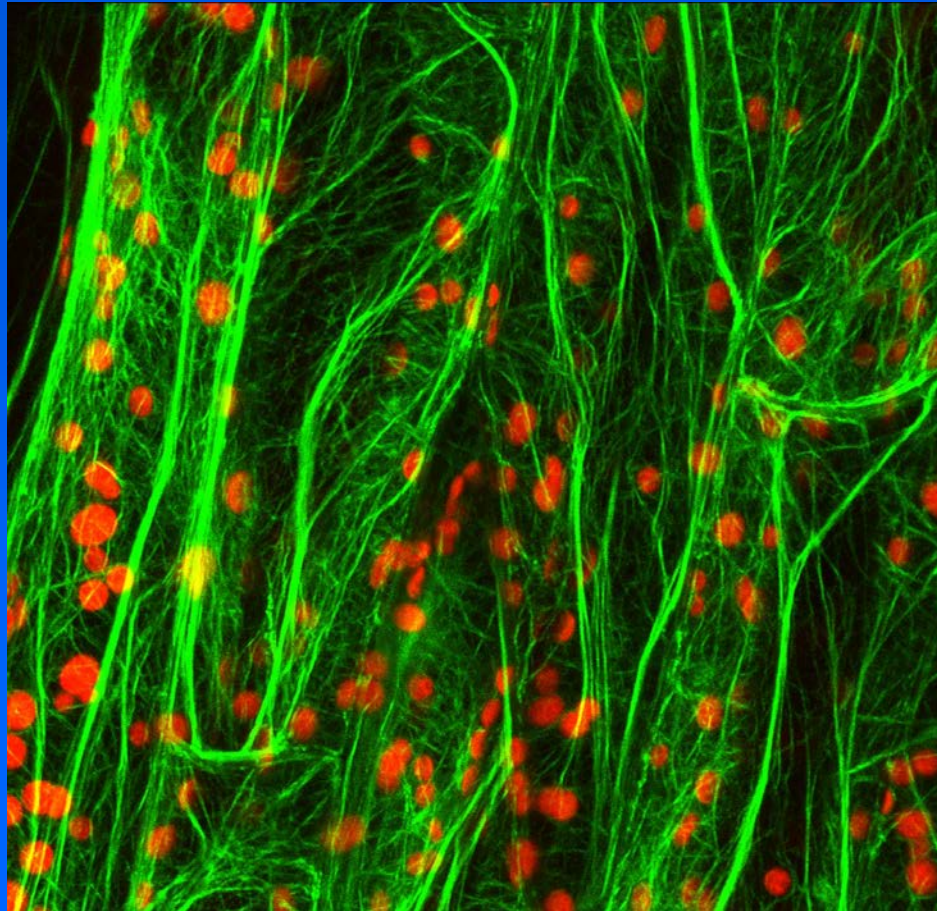
Чтобы уменьшить влияние автофлуоресценции, целесообразно пользоваться длинноволновыми красителями (эмиссия выше 580 нм) или запирающими светофильтрами с относительно узкой полосой пропускания.

# Автофлюоресценция миокардиоцитов



Автофлюоресценция доказывается широким спектром свечения и отсутствием специфических окрашенных структур.

# Флуоресценция и автофлуоресценция в клетках растений



Зеленый цвет – GFP-актин (трансфекция); красный – автофлуоресценция хлоропластов

# Прижизненные наблюдения

Поддержание постоянной температуры - инкубатор.  
При использовании иммерсионного объектива обязательно его термостатирование.

Поддержание баланса pH – добавление HEPES (10-25 мМ) в среду с минимальным содержанием бикарбоната или подача CO<sub>2</sub> в специальной камере, или использование специальных культуральных сред (так называемых, CO<sub>2</sub>-независимых)

Уменьшение фотодеструкции – синхронизированный с камерой затвор; снижение парциального давления кислорода (оксираза).

Уменьшение автофлуоресценции – использование специальных культуральных сред (без витаминов и др. добавок).

# Совместное использование нескольких красителей

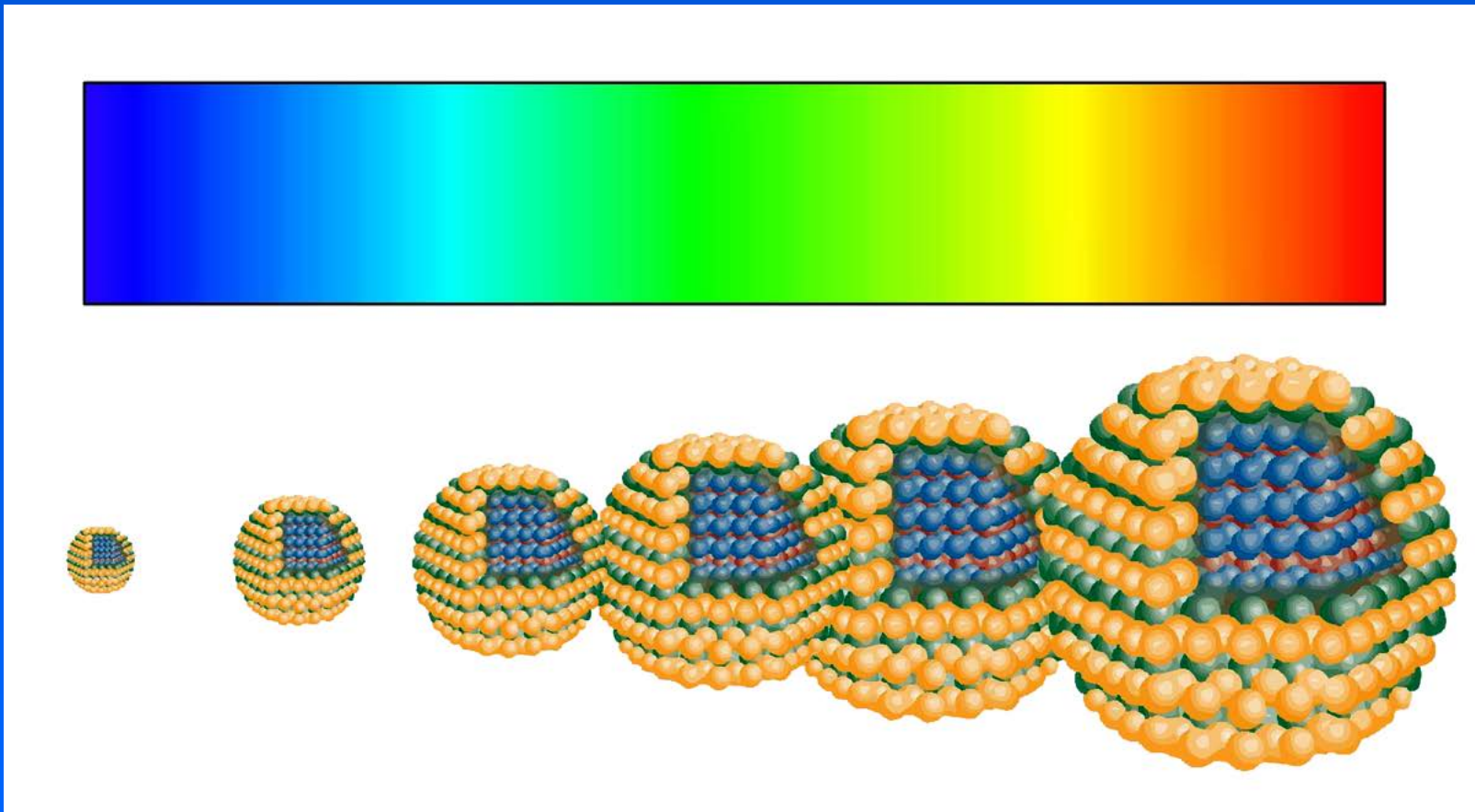
Все спектры флуоресценции органических красителей широкие. Поэтому при совместном использовании более двух красителей, как правило, возникает эффект перекрывания сигналов.

При подборе красителей необходимо, чтобы расстояние между максимумами их эмиссий было не менее 40-50 нм. Желательно – 60 и более нм. Таким образом, максимальное число цветов для визуального наблюдения составляет не более трех, для инструментального (без специальных мер) – не более четырех.

Поскольку большинство спектров флуоресценции асимметричны («красный хвост»), то флуоресцентный сигнал от красителя с меньшим максимумом эмиссии «затекает» в канал более длинноволнового красителя, но не наоборот.

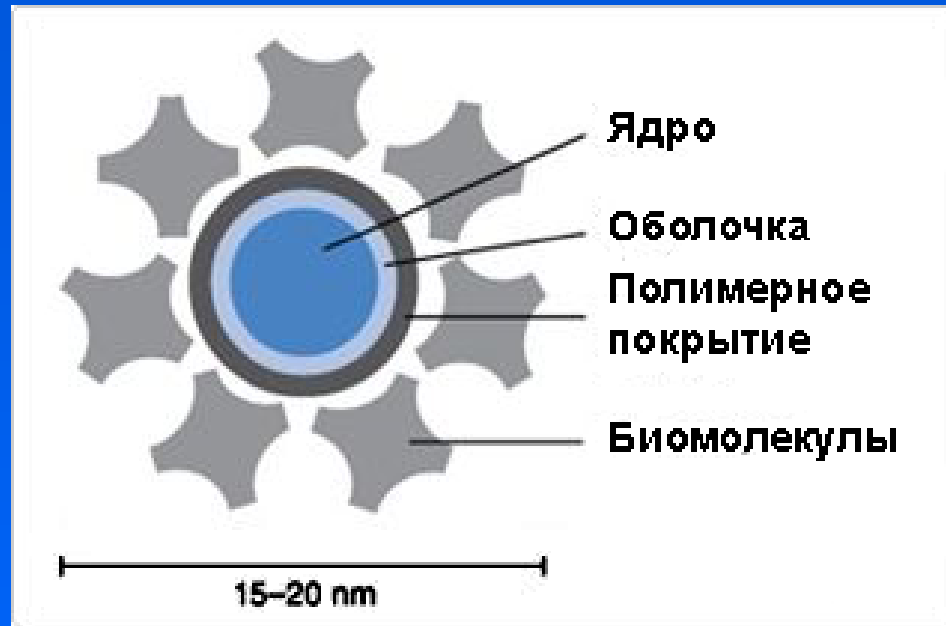
Для уменьшения эффекта перекрывания помимо подбора светофильтров используется процедура «компенсации», которая проводится на цифровых изображениях.

# Флуоресцентные наночастицы



Частицы из полупроводниковых материалов (например, CdSe) с ядром переменного диаметра (2-10 нм). Ширина спектра поглощения и длина волны эмиссии зависят от размера ядра.

# Строение флуоресцентной наночастицы

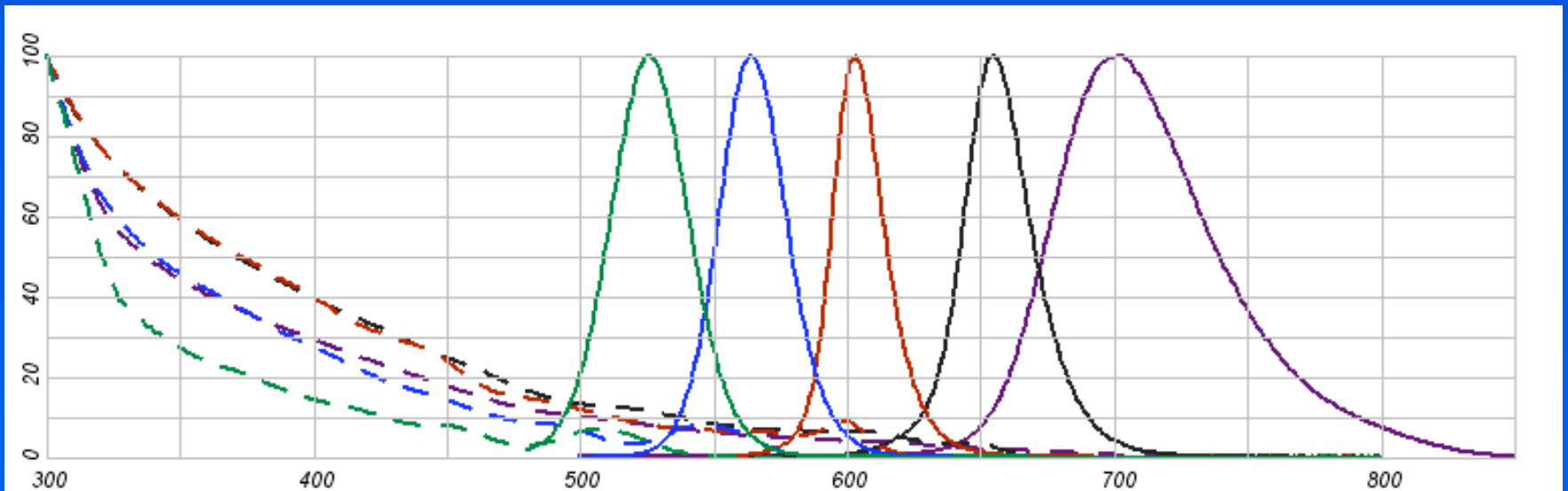


Размер ядра и свойства оболочки определяют спектр флюоресценции.

Полимерное покрытие делает частицу нетоксичной и позволяет получать конъюгаты.

Связываемые биомолекулы – например, биотин или антитела.

# Спектры возбуждения и эмиссии наночастиц



## Основные достоинства наночастиц:

Большой сдвиг Стокса

Широкий спектр возбуждения

Высокая фотостабильность

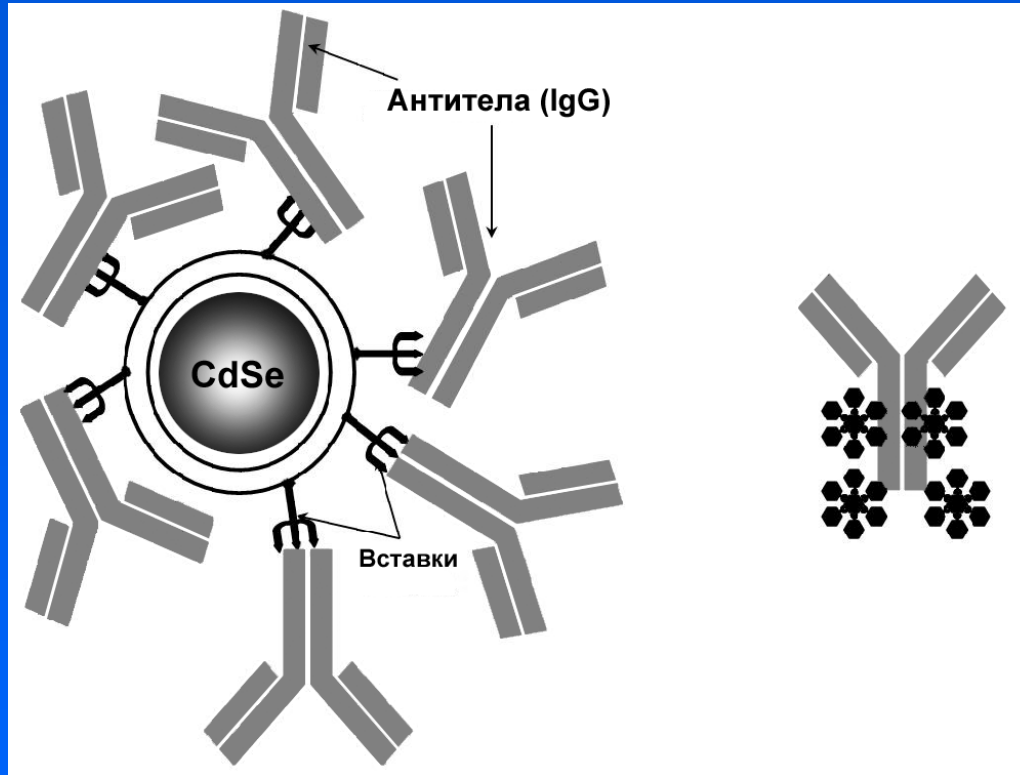
Симметричные спектры флюоресценции

## Недостатки:

относительно большие размеры, трудности конъюгации.



# Сравнение квантовых точек и органических красителей



Одна квантовая точка (слева) связывается с несколькими молекулами антител, поскольку имеет большой размер.

Одна молекула антитела (справа) связывается с несколькими молекулами небольших органических красителей.

# Способы флуоресцентного мечения

Иммунофлуоресценция – прямая и непрямая окраска конъюгированными антителами.

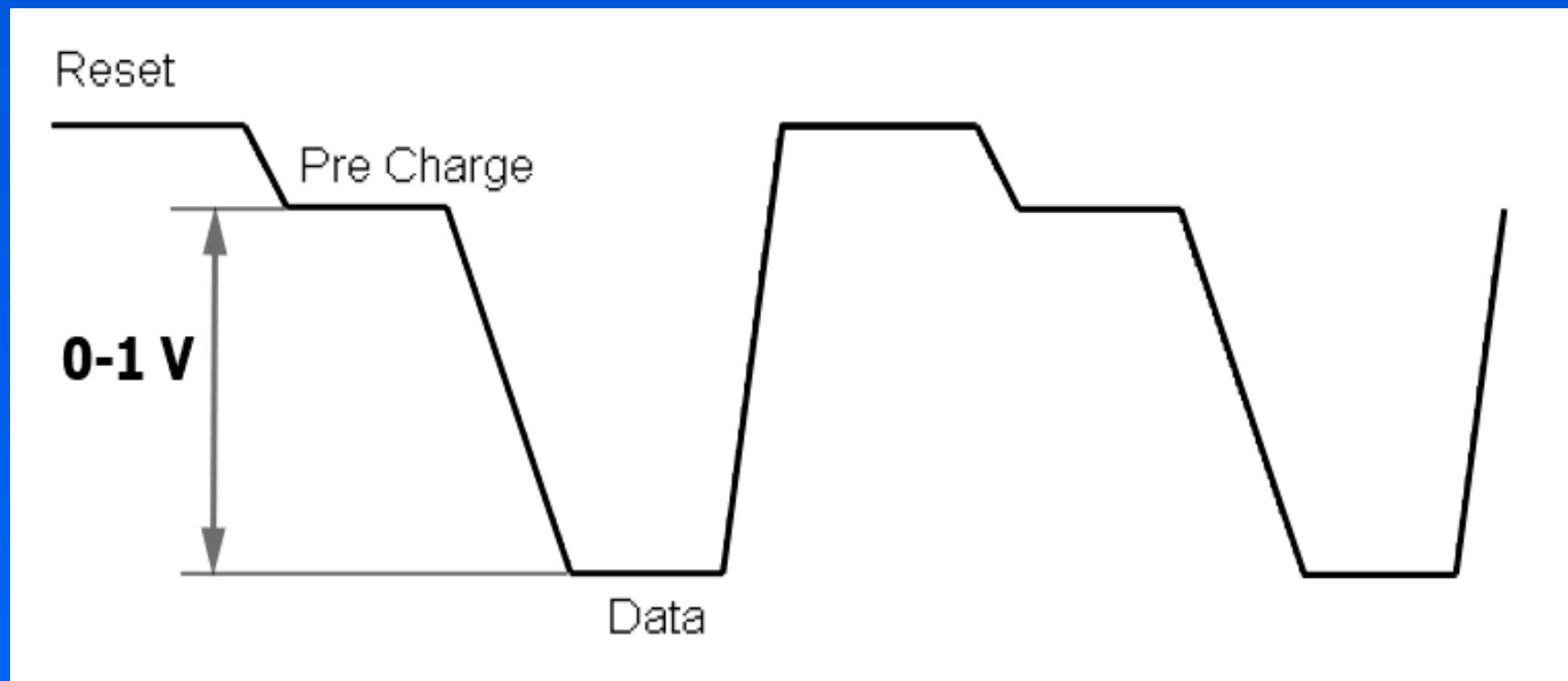
Флуоресцентная гибридизация нуклеиновых кислот *in situ* (FISH) – конъюгированные зонды.

Прямое связывание с мишенью (красители для нуклеиновых кислот – акридиновый оранжевый, DAPI).

Красители, накапливающиеся в органеллах (жирные катионы в митохондриях - Rhodamin-123).

Введение флуоресцентных белков – трансфекция (eGFP, DsRed).

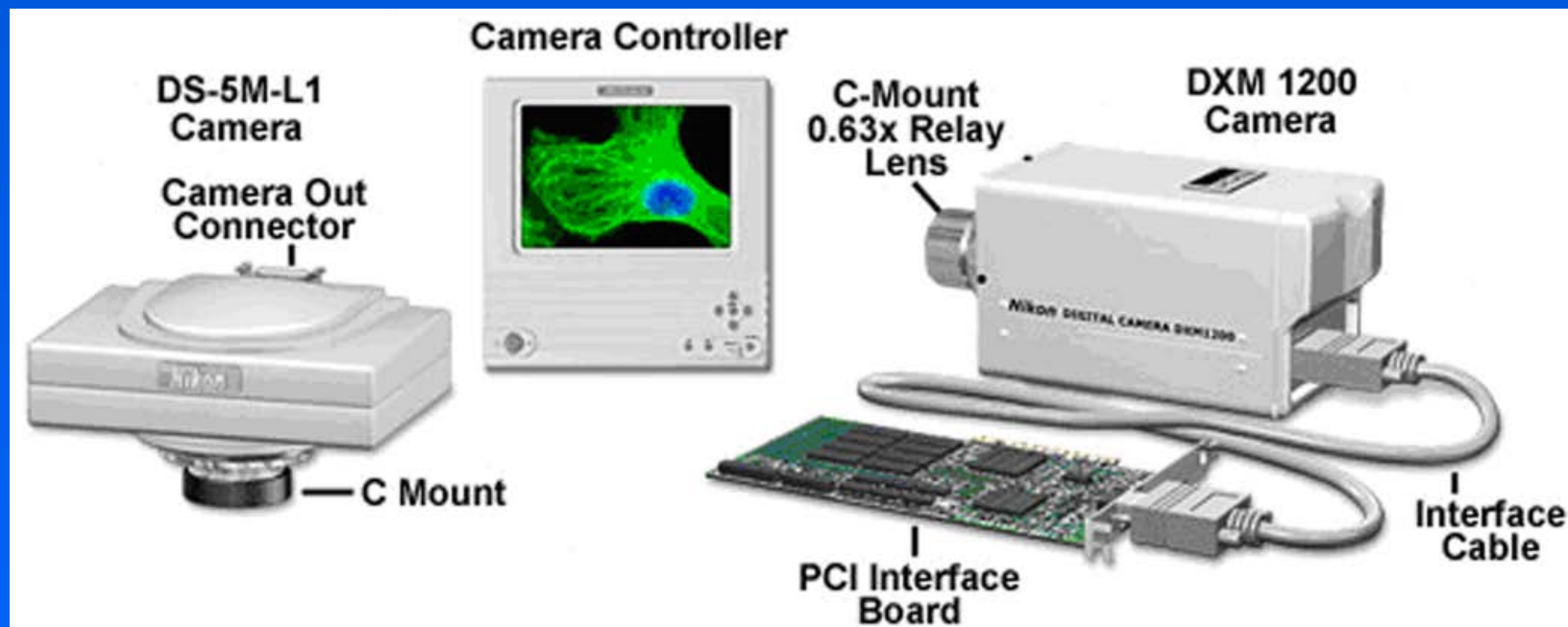
# Работа фотодиода



**Обнуление – заряд – накопление – считывание – обнуление**

**Максимальный заряд фотодиода – емкость ячейки**

# ПЗС камеры



**ПЗС – прибор с зарядовой связью  
(CCD – charged coupled device)**

# Устройство ПЗС камеры

Фотодиодная матрица

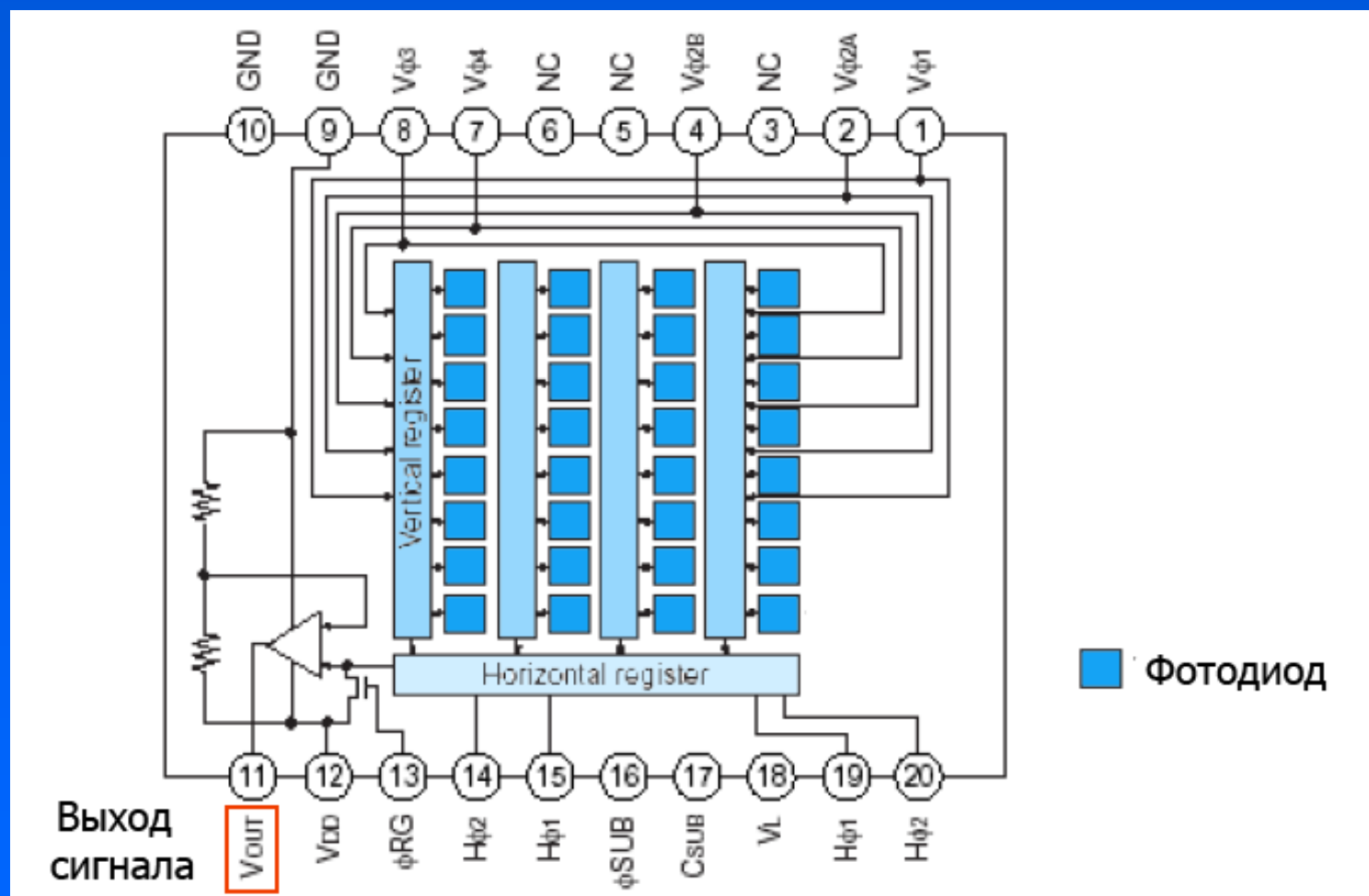
Устройство для экспозиции, считывания и обнуления

Усилитель выходного сигнала

Аналого-цифровой преобразователь сигнала (АЦП)

Охлаждаемая ПЗС камера: вакуумированный корпус;  
система охлаждения матрицы и считывающего  
устройства (ячейка Пельтье + воздушное или водяное  
охлаждение)

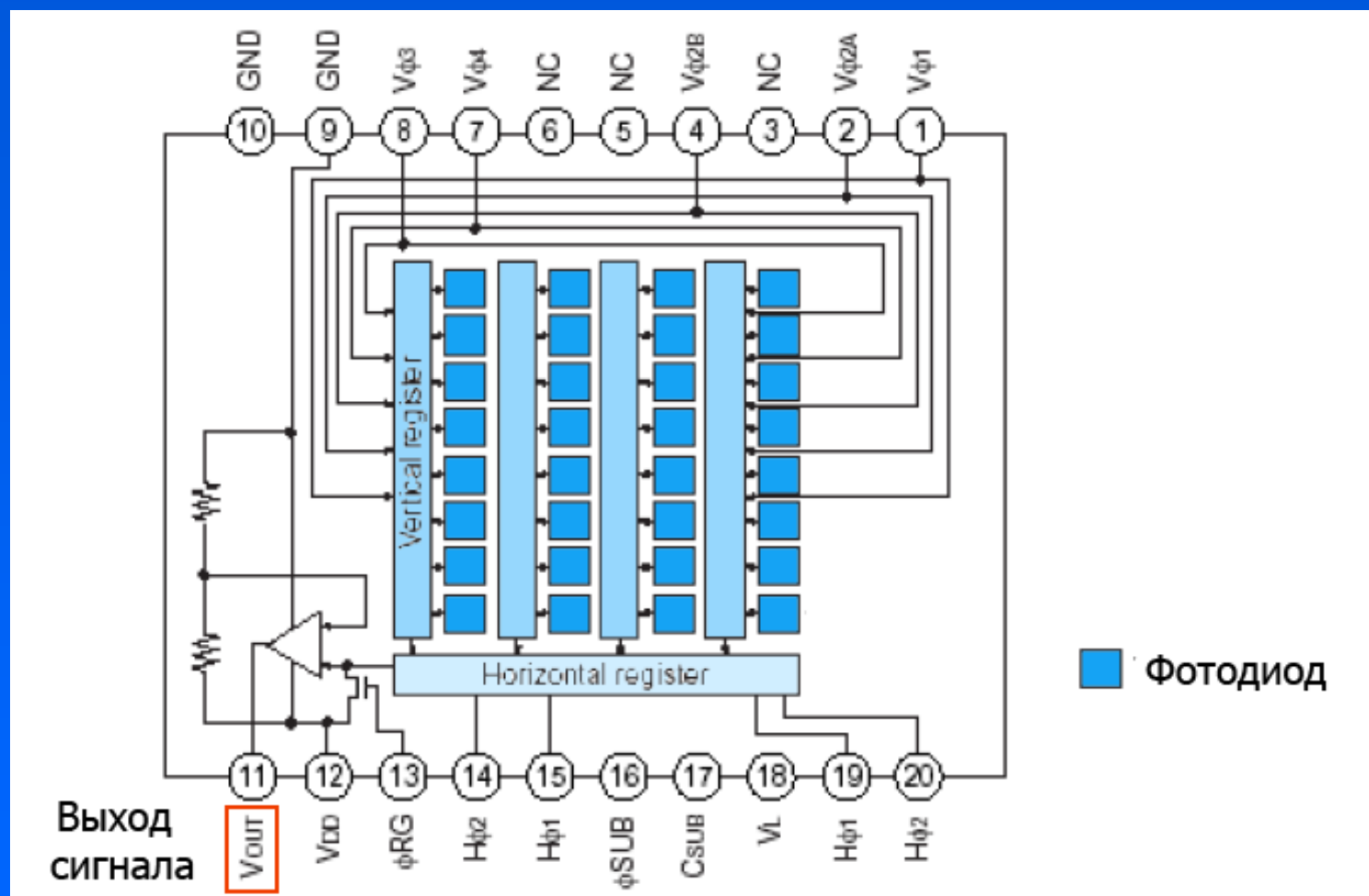
# Матрица ПЗС камеры



# Лекция 10

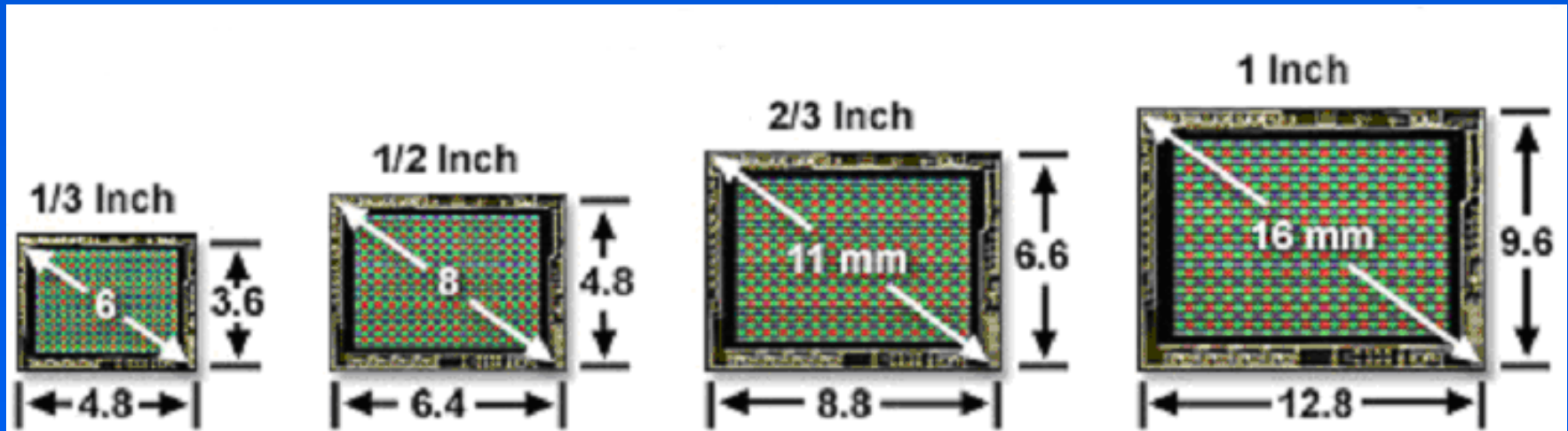
**Цифровая микроскопия:  
характеристики камер;  
установка камеры на  
микроскоп; эквивалентный  
размер пиксела**

# Матрица ПЗС камеры





# Количество и размер ячеек определяют размер матрицы



Фотодиод имеет, как правило, квадратную форму и размер в несколько микрон (3-30 мкм). Считывающее устройство располагается обычно под или над диодом.

Размер матрицы определяется как произведение размера ячейки (фотодиода) на число строк и столбцов. Он может указываться точно (мм\*мм) или приблизительно (в долях дюйма).

# Основные характеристики ПЗС (КМОП)-камеры

Тип камеры (cooled CCD, EMCCD, sCMOS); наличие микролинз;  
global shutter/rolling shutter

Охлаждение – нет, воздушное, водяное. Температура матрицы –  
ниже комнатной на 10-15°; отрицательная (-25°C и ниже)

Количество (строка x столбец) и размер ячеек (в мкм) – размер  
кадра (в долях дюйма или мм).

Квантовый выход (в процентах) и спектр чувствительности.

Максимальная емкость (заряд) ячейки – в тысячах электронов.

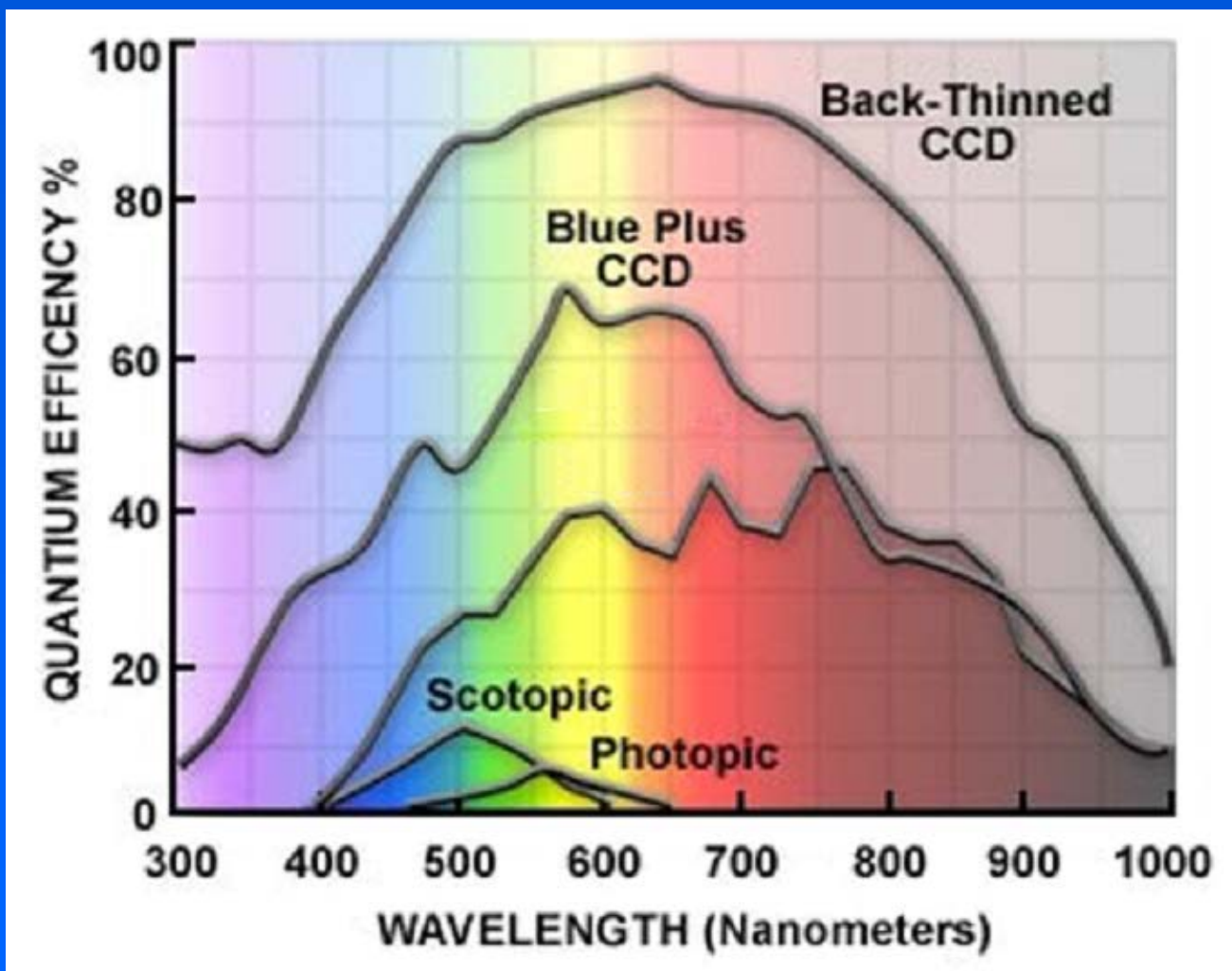
Разрядность АЦП (системы считывания) – 8, 12, 14 или 16 бит.

Темновой ток (электронов на ячейку в секунду).

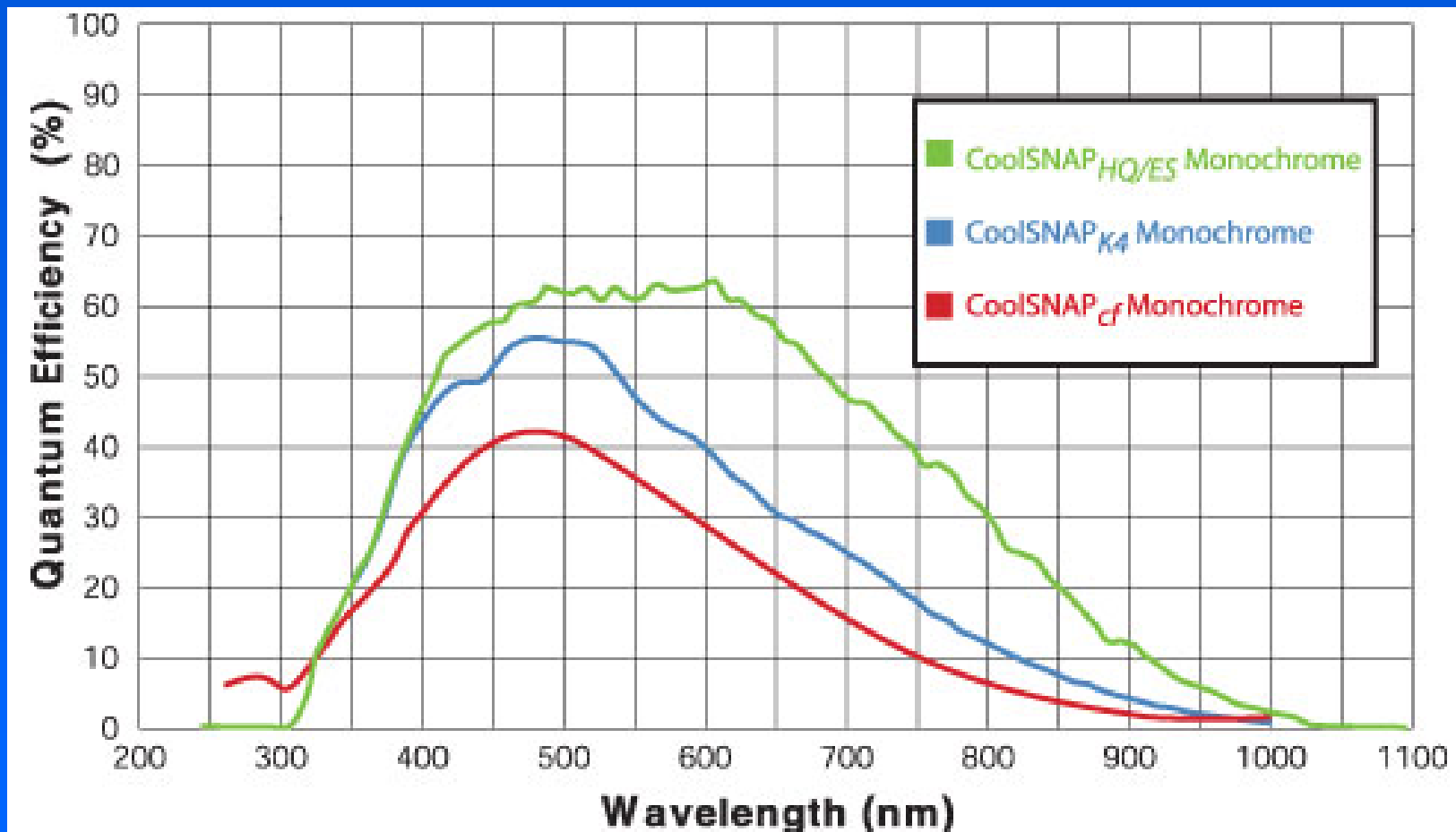
Частота считывания – МГц (0.5-500). Может быть переменной.

Шум считывания (электронов на ячейку).

# Спектр светочувствительности



# Спектры CoolSnap (3 разных чипа)



# Темновой ток и шум считывания

Темновой ток измеряется в количестве электронов на ячейку в секунду. Его природа – тепловое движение электронов. Величина темнового тока экспоненциально растет с температурой и зависит от размера фотодиода. Для уменьшения темнового тока матрицу камеры охлаждают.

Шум считывания (электронов на ячейку) есть результат относительно быстрого «пересчета» электронов. Он зависит от конструкции матрицы и возрастает со скоростью считывания (частотой).

Частота считывания камер измеряется в МГц и составляет от 0.5 до 200 и более МГц. Может быть регулируемой. В этом случае шум считывания указывается отдельно для каждой частоты.

# Камеры с охлаждением

Охлаждение матрицы осуществляется с помощью ячеек Пелтье. Каждая ступень Пелтье снижает температуру на 10-15 град. Цельсия. Степень охлаждения определяется количеством последовательных ступеней.

Минимальное охлаждение – одна ступень (темновой ток ~1-5 электронов на пиксел в секунду). Стандартное охлаждение – 2-3 ступени (темновой ток менее 1 электрона на пиксел в секунду, для экспозиций в несколько секунд).

Матрицы глубокого охлаждения имеют много ступеней.

Матрица охлаждаемой камеры всегда вакуумирована.

Специальные камеры – с дополнительным жидкостным охлаждением (до  $-100^{\circ}\text{C}$ ) или с охлаждением жидким азотом (для часовых экспозиций).

КМОП камеры потребляют значительно меньше энергии, чем ПЗС камеры (почти в 100 раз), соответственно их охлаждение достигается при меньшей мощности.

# Емкость ячейки и разрядность АЦП

Максимальная емкость (заряд) ячейки измеряется в тысячах электронов. Она пропорциональна площади фотодиода и составляет на практике от 20000 (размер 4,5 мкм) до 350000 (размер 16 мкм).

Камеры «научной» градации имеют емкость фотодиодов не менее 40000 электронов (размер более 6 мкм).

Разрядность АЦП (системы считывания) составляет 8, 12, 14 или 16 бит, что соответствует числу уровней серого  $2^8 = 256$ ;  $2^{12} = 4096$ ;  $2^{14} = 16384$ ;  $2^{16} = 65536$ . Разрядность записи числа уровней серого в компьютере составляет 8 или 16 бит.

Монохромные камеры «научной» градации имеют разрядность АЦП не менее 12 бит. При этом запись изображения в компьютере производится с разрядностью 16 бит, однако «верхние» уровни яркости оказываются незаполненными.

# Основные производители профессиональных камер для микроскопии

Andor – iXON series (12-16 bit, QE 50-90%), EMCCD; CMOS – Zyla 4.2, Neo (16 bit, QE 60-72%).

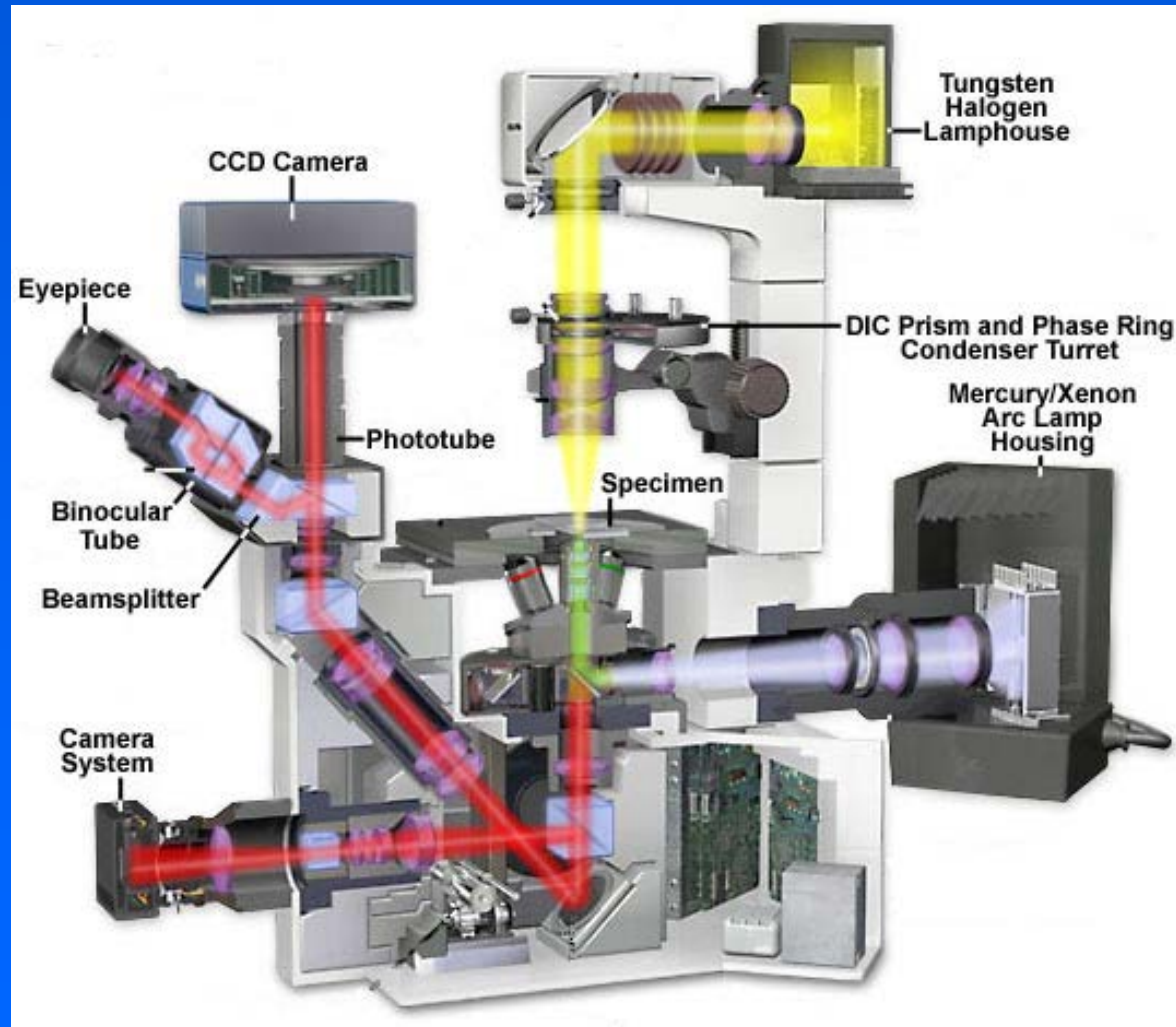
Hamamatsu Photonics – ORCA-II (1024x1024, 13  $\mu\text{m}$ , 14-16 bit, QE~80%); CMOS ORCA Flash 4.0 (16 bit, QE~60%).

Photometrics – Cascade-II (512x512, 16  $\mu\text{m}$ , 16 bit, QE>90%), EMCCD; Coolsnap HQ-2 (1392x1040, 6,45  $\mu\text{m}$ , 14 bit, QE>60%)

Производители микроскопов (Карл Цейсс, Лейка, Никон, Олимпус) также выпускают ПЗС камеры для микроскопов, но они значительно уступают лидерам по своим характеристикам.



# Инвертированный флуоресцентный микроскоп



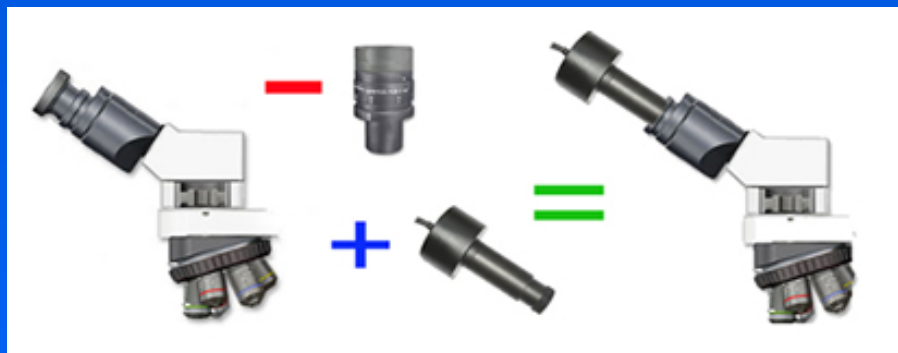
# Установка камеры на микроскоп

Прямой микроскоп – тринокулярный тубус со светоделителем (фотоокуляр). Для установки камеры используется специальная оптика (фотоокуляр).

Инвертированный микроскоп – боковой порт со светоделителем или зеркалом (линза); нижний порт. Для установки камеры в микроскопе изготовителем устанавливается линза. Дополнительная оптика нужна, только если необходимо изменять масштаб изображения, проецируемого на матрицу камеры (растягивать или сжимать).

Стандартное присоединение камеры – C-mount (резьба диаметром 25 мм или 1 дюйм).

# Установка камеры на микроскоп



**Простейшее решение – вместо окуляра или с использованием существующего окуляра.**

**Оно не является наилучшим – теряется много света и качество изображения не оптимально.**

# Адапторы для камеры



Простейший адаптор для камеры – c-mount, регулируемая длина. Дает увеличение  $\times 1$  (на специальном выходе инвертированного микроскопа).

Внутри адаптора может располагаться окуляр (на прямом микроскопе).

Более сложный адаптор имеет встроенную линзу для масштабирования – от 0,3 до 2,5

# Условие парфокальности

Правильная установка камеры предполагает, что изображение фокусируется на матрице при том же положении столика, когда оно резко изображается в окулярах (условие парфокальности).

Независимая подстройка окуляров по внутренней маске – возможна только в некоторых микроскопах.

В основном – парфокальность камеры проверяется в процессе установки света по Келеру. Она достигается перемещением камеры относительно тубуса микроскопа.

Поскольку глубина резкости в пространстве изображений минимальная при малых увеличениях, настройка парфокальности проверяется в объективе  $\times 10$  или меньше (желательно –  $\times 2,5$ - $\times 4$ ).

# Установка промежуточной ЛИНЗЫ

Все линзы для установки перед камерами являются сложными. Они монтируются в адаптер и обеспечивают «перенос зрачка», то есть скорректированы на создание безабберационного изображения на матрице камеры.

Для камер с ячейкой более 8 мкм применяются растягивающие линзы Рэлея с коэффициентами  $\times 1,5$ ;  $\times 2,0$   $\times 2,5$ .

Для камер с ячейкой менее 5 мкм допустимо использование сжимающих линз с увеличением  $\times 0,63$  -  $\times 0,5$ , однако это приводит к потере разрешения при использовании высокоапертурных объективов с небольшим увеличением (например,  $\times 40/1,3$ ;  $\times 20/0,75$ ).

# Непрерывное и дискретное изображение

Дифракционное ограничение разрешения оптического прибора предполагает визуальное наблюдение, то есть сканирование поля зрения с исчезающе малым шагом.

При записи на матрицу изображение подвергается пикселизации – разделению на участки (как правило, квадраты) внутри которых информация утрачивается (яркость интегрируется).

Пикселизация создает дополнительное ограничение разрешения прибора.

При достаточно малых размерах пиксела записанное изображение является хорошим приближением оригинала, то есть контраст его мало отличается от исходного, а за счет более широкого динамического диапазона камеры может быть даже увеличен по сравнению с визуальным.

# Увеличение и разрешение видеомикроскопической системы

Увеличение – масштаб изображения на экране.

Объектив  $\times 100$  дает увеличение на мониторе с диагональю 20' около  $\times 3000$ - $\times 6000$ .

Разрешение записанного изображения всегда хуже, чем при визуальном наблюдении.

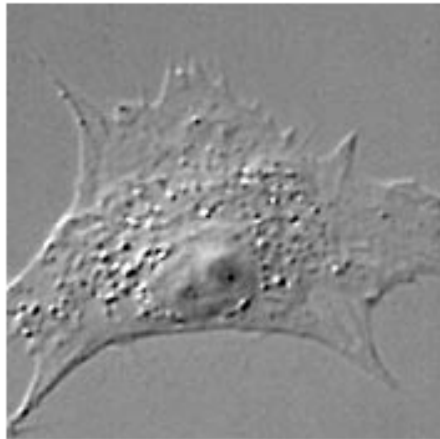
Разрешение системы примерно равно удвоенному эквивалентному размеру пиксела, если этот размер составляет не менее  $1/2$  диска Эри.

При эквивалентном размере пиксела менее  $1/3$  диска Эри (расчетного разрешения объектива микроскопа) суммарное разрешение определяется в основном апертурой объектива.

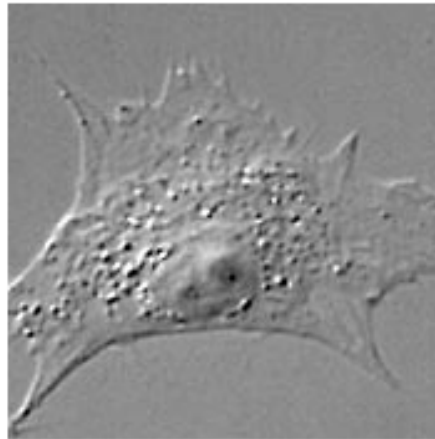


# Пространственное разрешение В ВИДЕОМИКРОСКОПИИ

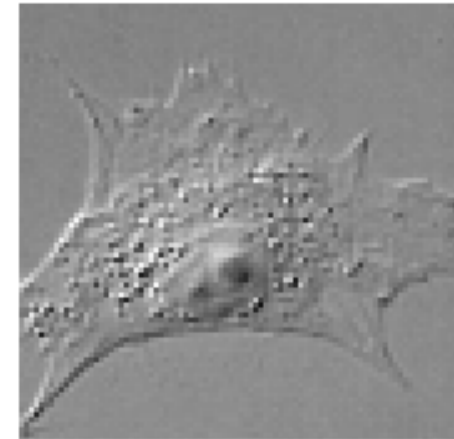
Original image



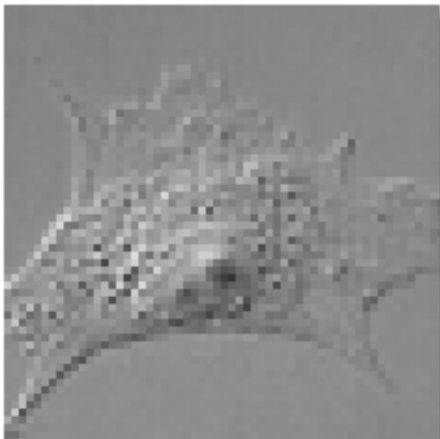
175x175 pixels



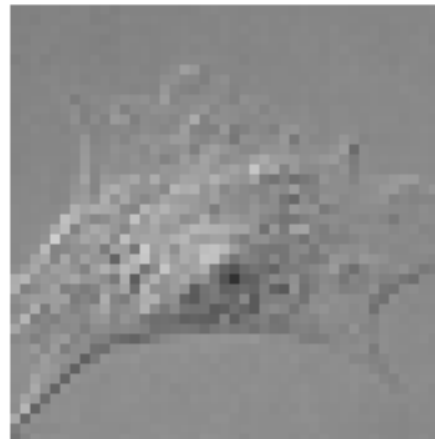
88x88 pixels



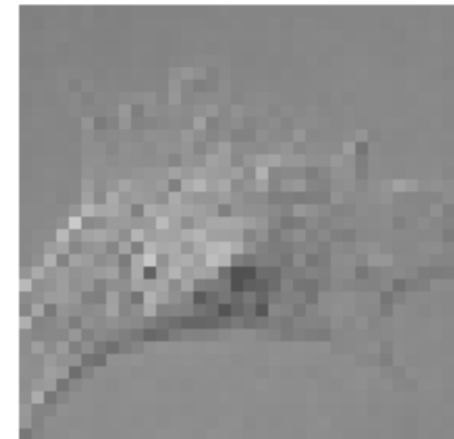
58x58 pixels



44x44 pixels



35x35 pixels



# Эквивалентный размер пиксела

Эквивалентный размер пиксела – размер пиксела камеры при проекции его в пространство предметов.

Эквивалентный размер пиксела равен физическому размеру пиксела, деленному на общее увеличение на матрице камеры.

Для микроскопов, скорректированных на бесконечность и имеющих специальный порт для камеры, общее увеличение определяется объективом, системой переноса зрачка и проекционной линзой, устанавливаемой перед камерой. Как правило, проекционная линза имеет коэффициент  $x_1$ , а система переноса зрачка – больше единицы (например,  $x_{1,5}$ ).

# Лекция 11

## Цифровая микроскопия: получение цифрового изображения

# Теорема дискретизации (Sampling theorem)

Для однозначного восстановления (передачи) непрерывного периодического сигнала с помощью дискретной (цифровой) записи частота измерения сигнала (частота дискретизации) должна быть по крайней мере в 2 раза больше самой высокой частоты из спектра исходного сигнала, которую надо передать.

Пример: для передачи звука в цифровых устройствах используется частота дискретизации 44 кГц, поскольку максимальная частота звука, воспринимаемого человеком, составляет 20 кГц.

# Теорема дискретизации в микроскопии

Для записи изображения без потери информации эквивалентный размер пиксела должен быть по крайней мере в 2 раза меньше разрешающей способности микроскопа (радиуса диска Эри).

Например, если разрешение микроскопа с иммерсионным объективом  $\times 60/1,4$  составляет 0,24 мкм, то размер пиксела при записи должен быть не более 0,12 мкм.

На самом деле размер пиксела должен быть существенно меньше указанного выше, так как диск Эри не описывается синусоидой, а матрица камеры является двумерной. Этот вопрос будет подробно рассмотрен далее.

# Ограничения дискретного изображения

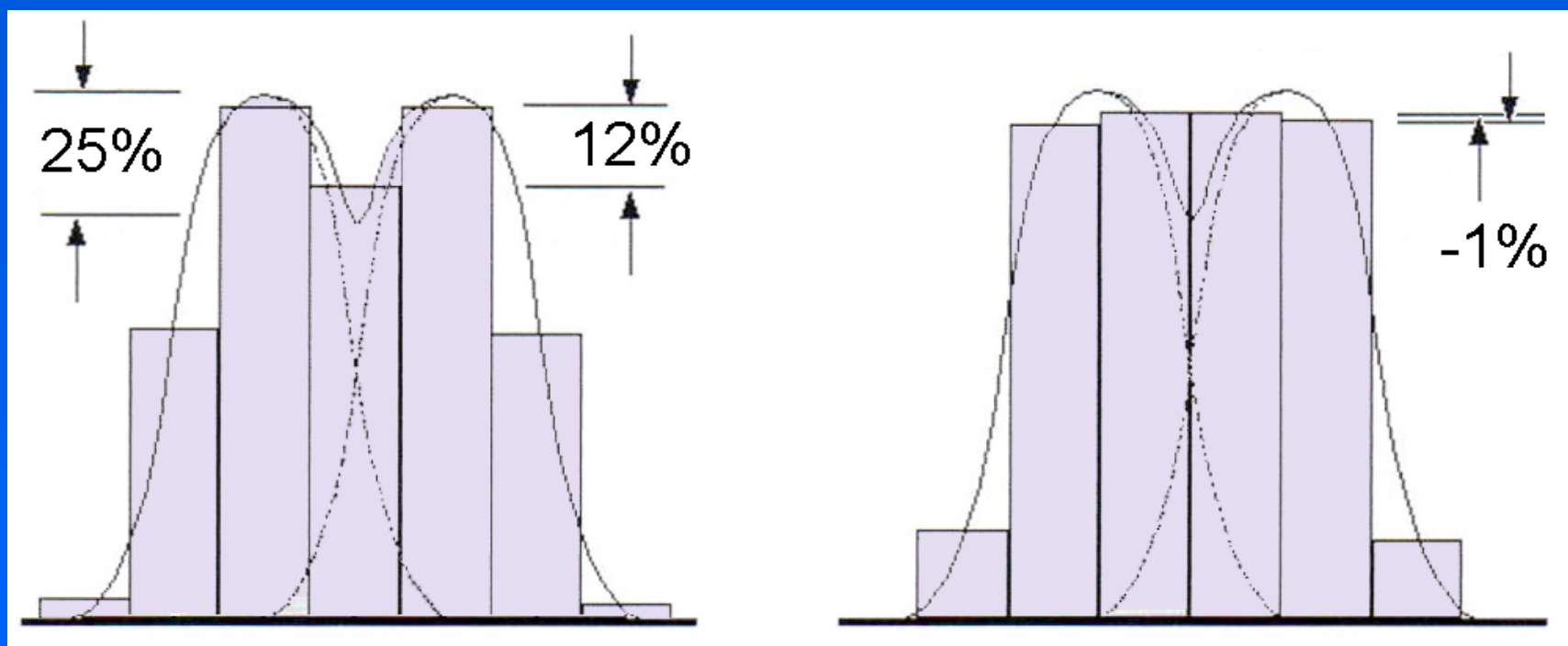
Контраст дискретного изображения всегда меньше, чем непрерывного. Основной вопрос – насколько? Так как научная камера позволяет записать больше градаций серого, чем различает глаз, то при «восстановлении» изображения контраст может быть увеличен.

При достаточно малых эквивалентных размерах пиксела (около  $1/10$  радиуса диска Эри) записанное изображение является хорошим приближением оригинала, то есть контраст его мало отличается от исходного.

При размерах пиксела свыше  $1/4$  но менее  $1/2$  радиуса диска Эри контраст изображения становится переменной величиной. Он зависит от относительного расположения элементов изображения и матрицы камеры.

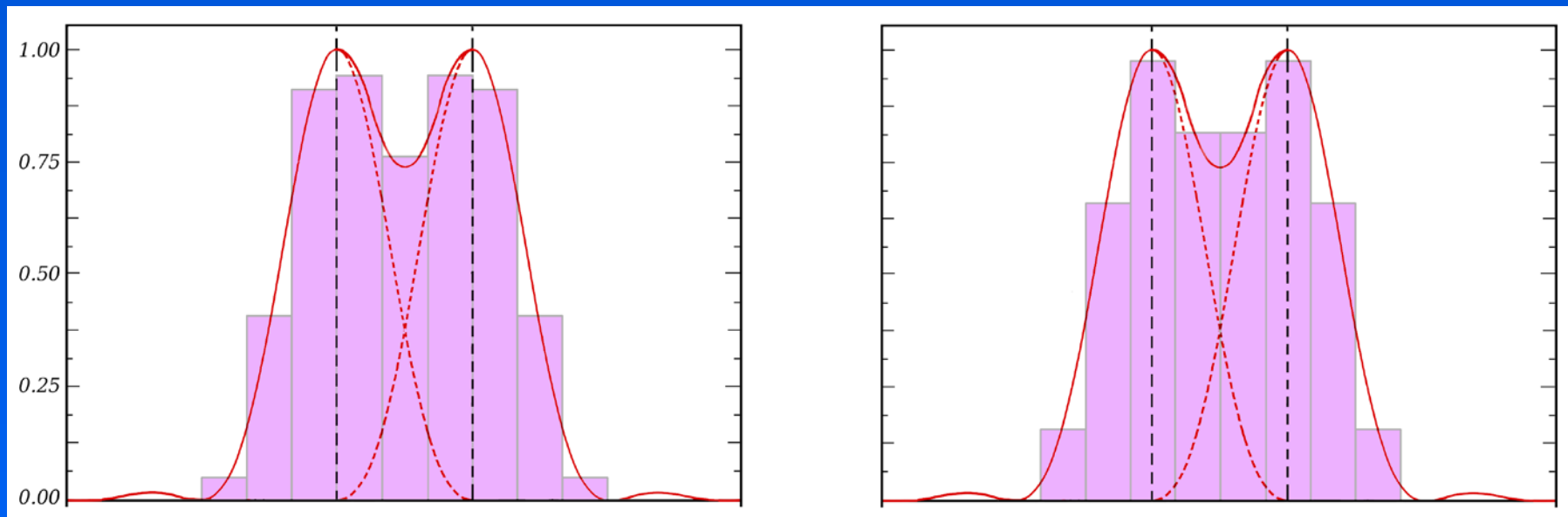
При размерах пиксела больше  $1/2$  разрешающей способности прибора, разрешающая способность системы существенно снижается и ограничивается исключительно величиной пиксела.

# Недостаточная пикселизация изображения



Максимальный эквивалентный размер пиксела, диктуемый телеграфной теоремой ( $1/2$  радиуса диска Эри), в случае, когда объекты разделены минимальным промежутком, приводит к значительному снижению контраста при «удачной» пикселизации, и полной потере контраста при «неудачной» пикселизации.

# Пикселизация изображения



**Исходя из критерия Рэля, для сохранения контраста при произвольном расположении точек в объекте, максимальный эквивалентный размер пиксела должен составлять менее  $1/3.2$  радиуса диска Эри.**

**При размере пиксела равном  $1/5$  радиуса диска Эри, контраст снижается не более, чем в 1,5 раза.**



# Максимально допустимый размер пиксела для основных объективов

**x100/1.3 (имм.) – 10 мкм**

**x60/1.4 (имм.) – 5,6 мкм**

**x40/1.0 (имм.) – 5,2 мкм**

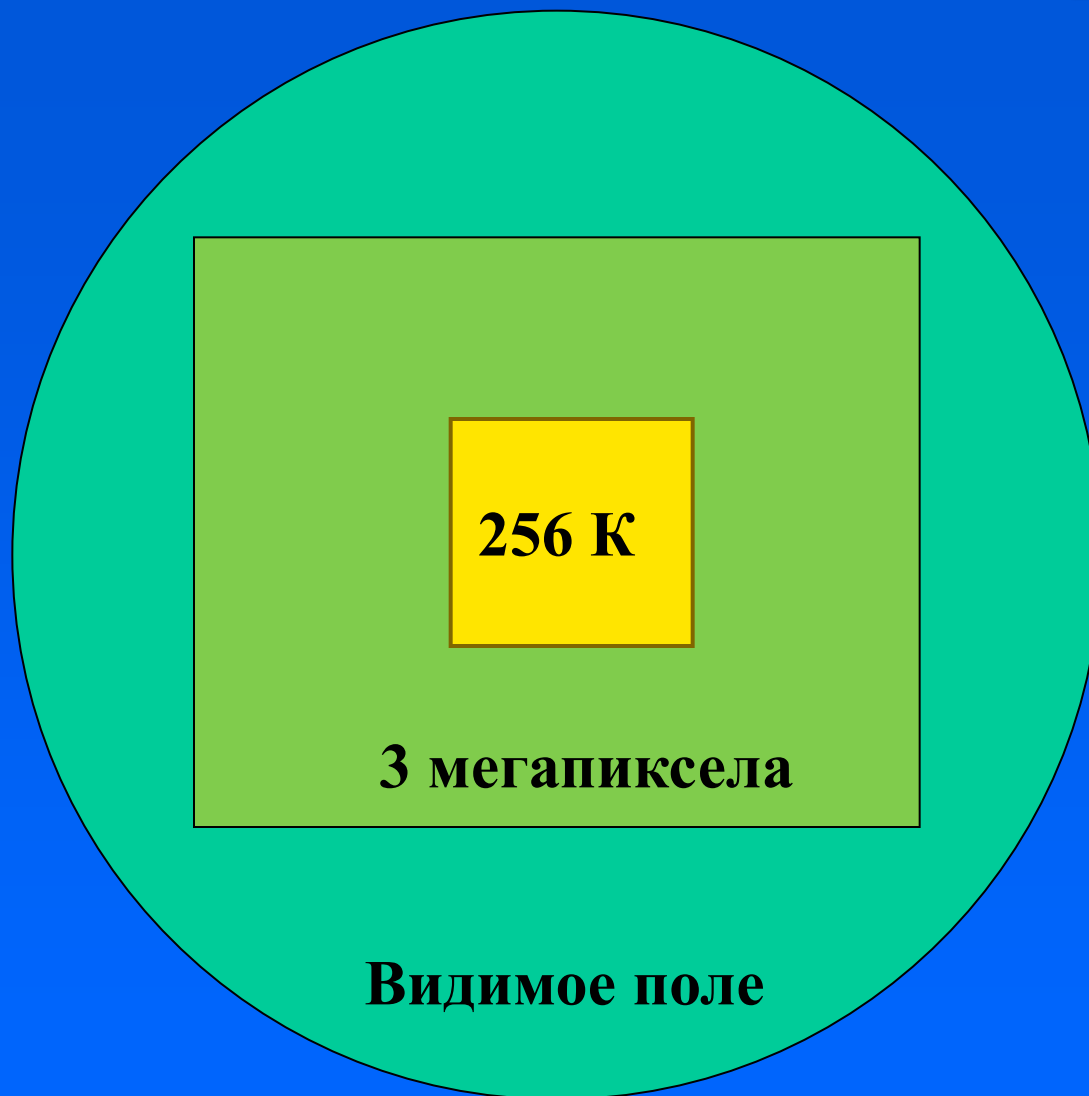
**x40/0.75 – 6,9 мкм**

**x20/0.75 – 3,5 мкм**

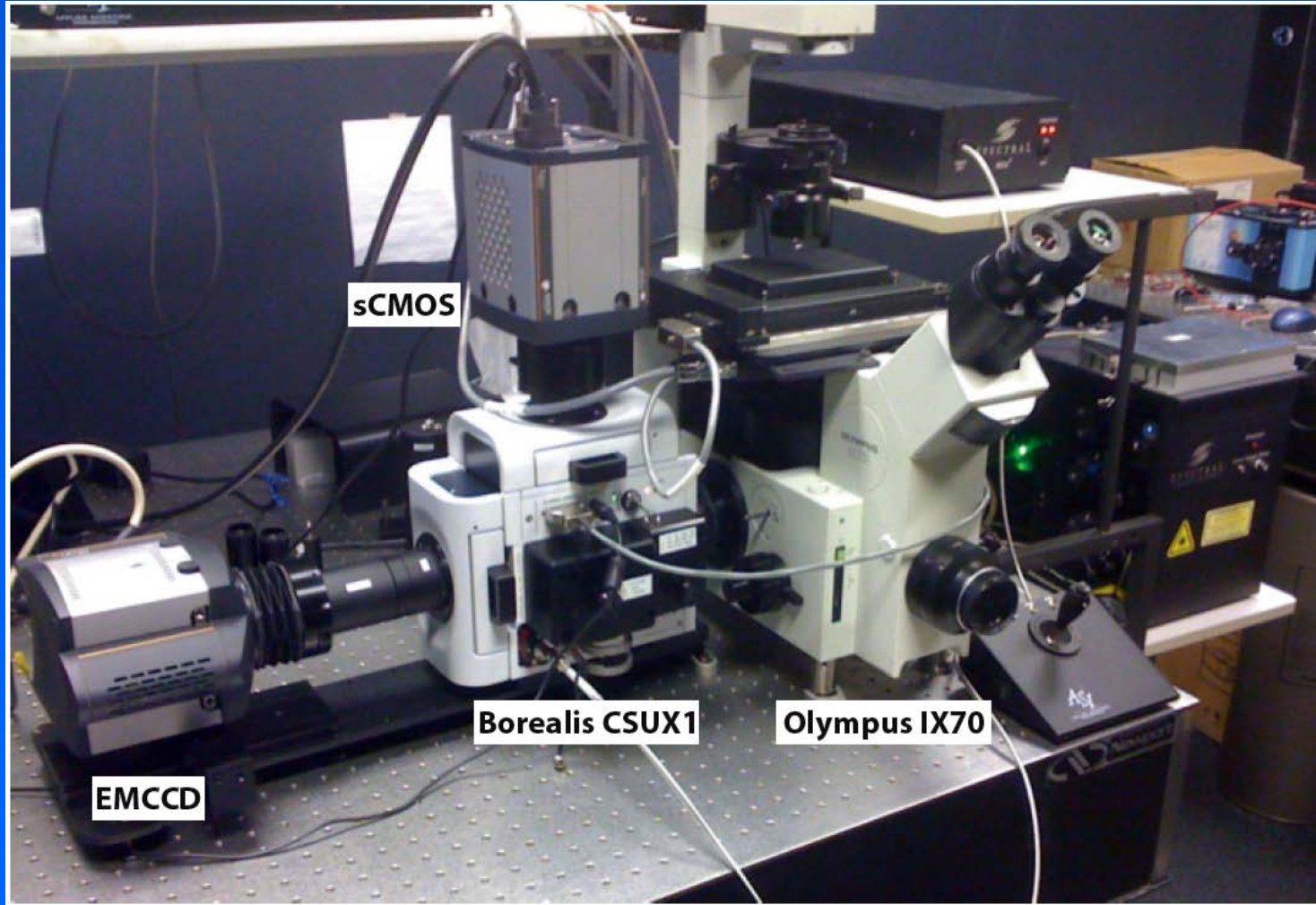
**x20/0.5 – 5,2 мкм**

**x10/0.3 – 4,3 мкм**

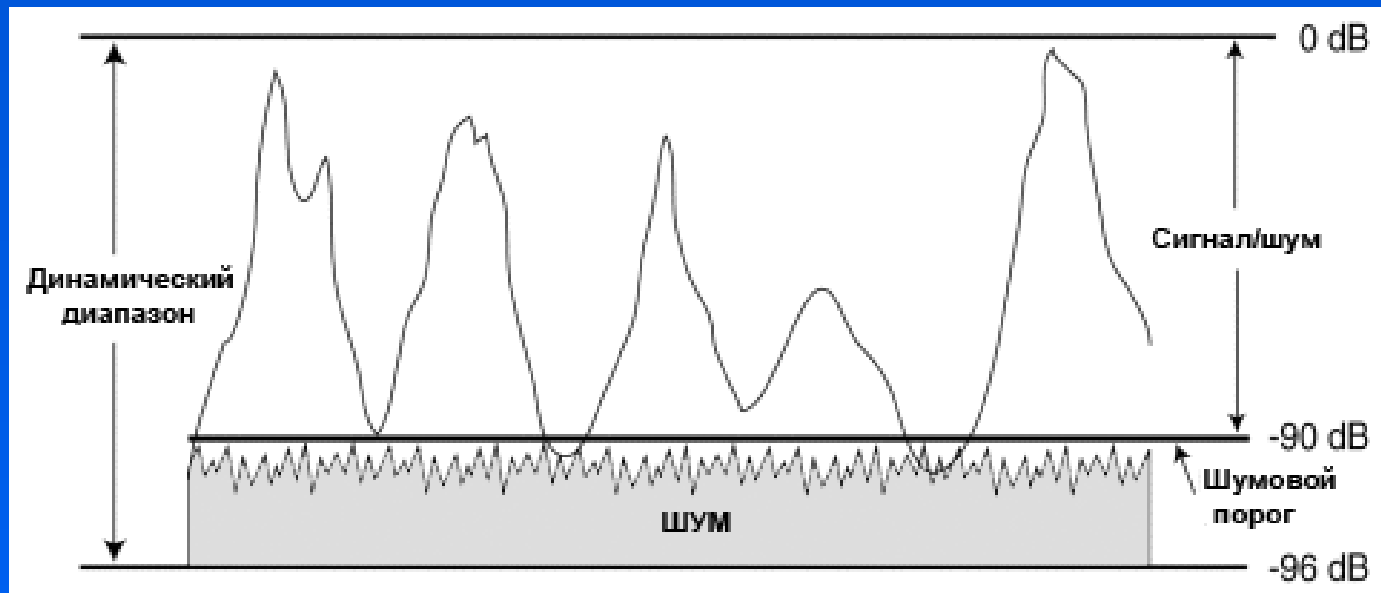
# Соотношение полей зрения



# Микроскоп – общий вид



# Отношение сигнал/шум

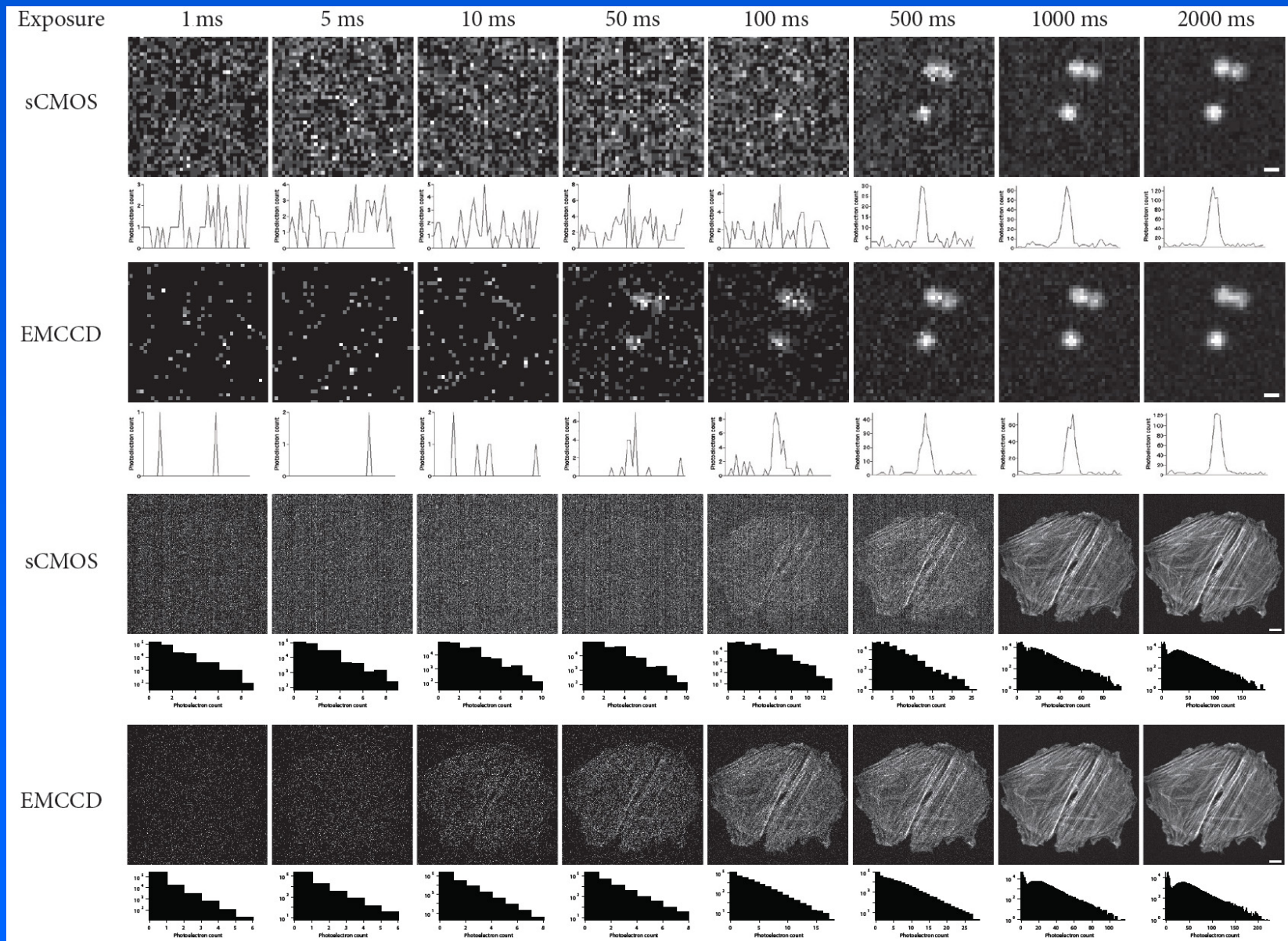


**Максимальная величина отношения сигнал/шум является характеристикой записывающей аппаратуры.**

**Она обычно выражается в децибелах (логарифмическая шкала с основанием 10 – 10 дБ соответствуют  $SNR=10$ , 20 дБ –  $SNR=100$  и т.д.). Для идеального цифрового устройства  $SNR$  соответствует разрядности АЦП (8 бит – 24 дБ; 12 бит – 36 дБ; 16 бит – 48 дБ).**

**На практике максимальное отношение может ограничиваться условиями съемки.**

# Зависимость изображения от выдержки

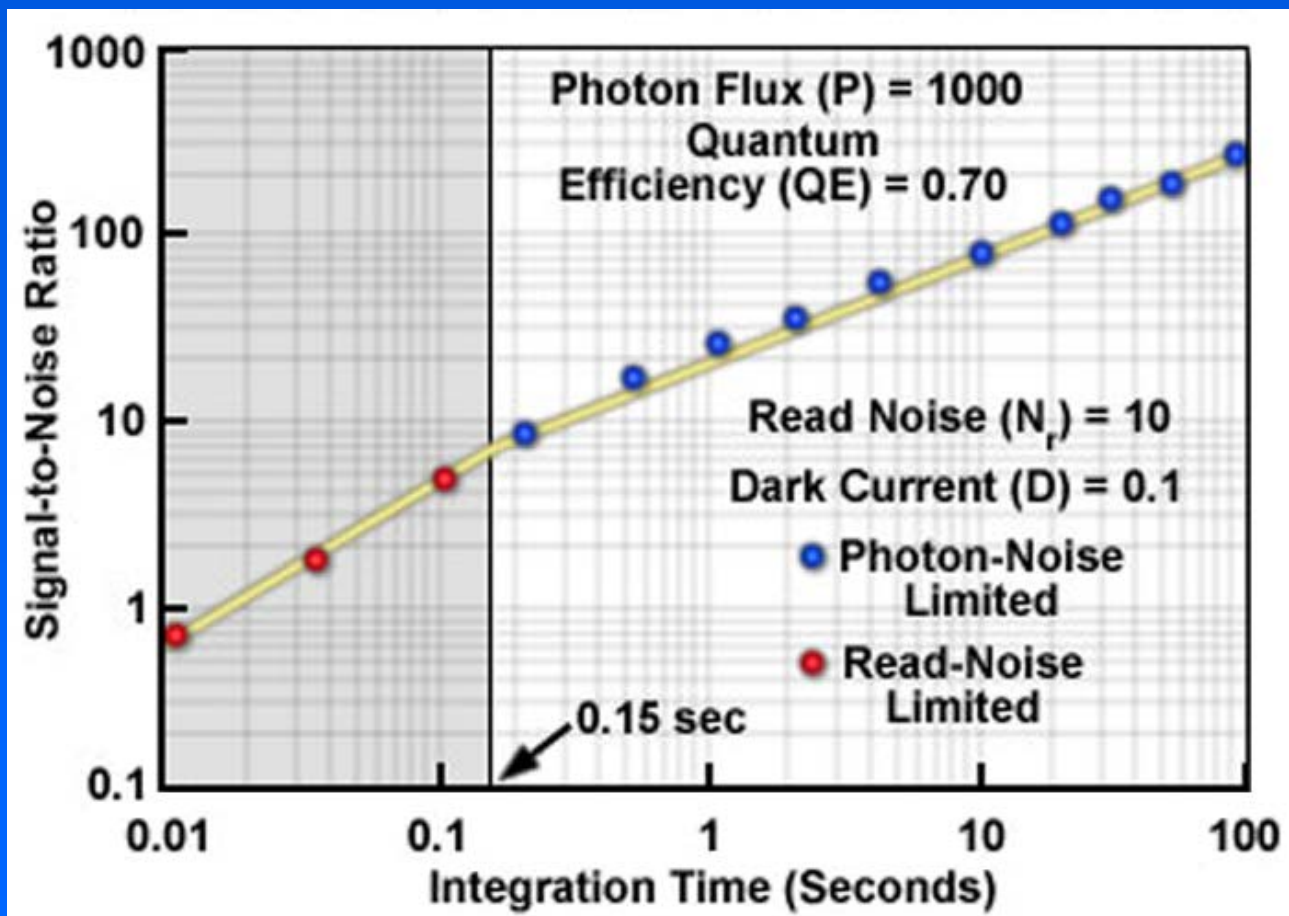


# Отношение сигнал/шум при низкой освещенности

В условиях низкой освещенности (при использовании камер с охлаждением, где темновой ток практически отсутствует) при небольших экспозициях шум считывания является основным источником неоднородностей. Отношение сигнал/шум лимитируется конструкцией камеры и растет с ростом экспозиции почти линейно.

При увеличении экспозиции (времени накопления сигнала) наступает момент, когда дробовый шум (случайные вариации в потоке фотонов, космические частицы) превышает шум считывания и темновой ток. С этого уровня отношение сигнал/шум лимитируется дробовым шумом и растет медленнее.

# Зависимость отношения сигнал/шум от времени ЭКСПОЗИЦИИ



# Запись изображения

**Векторная запись – изображение кодируется в виде формул, изменение масштаба не приводит к ухудшению качества и позволяет увидеть новые детали (MS Word; Adobe Acrobat).**

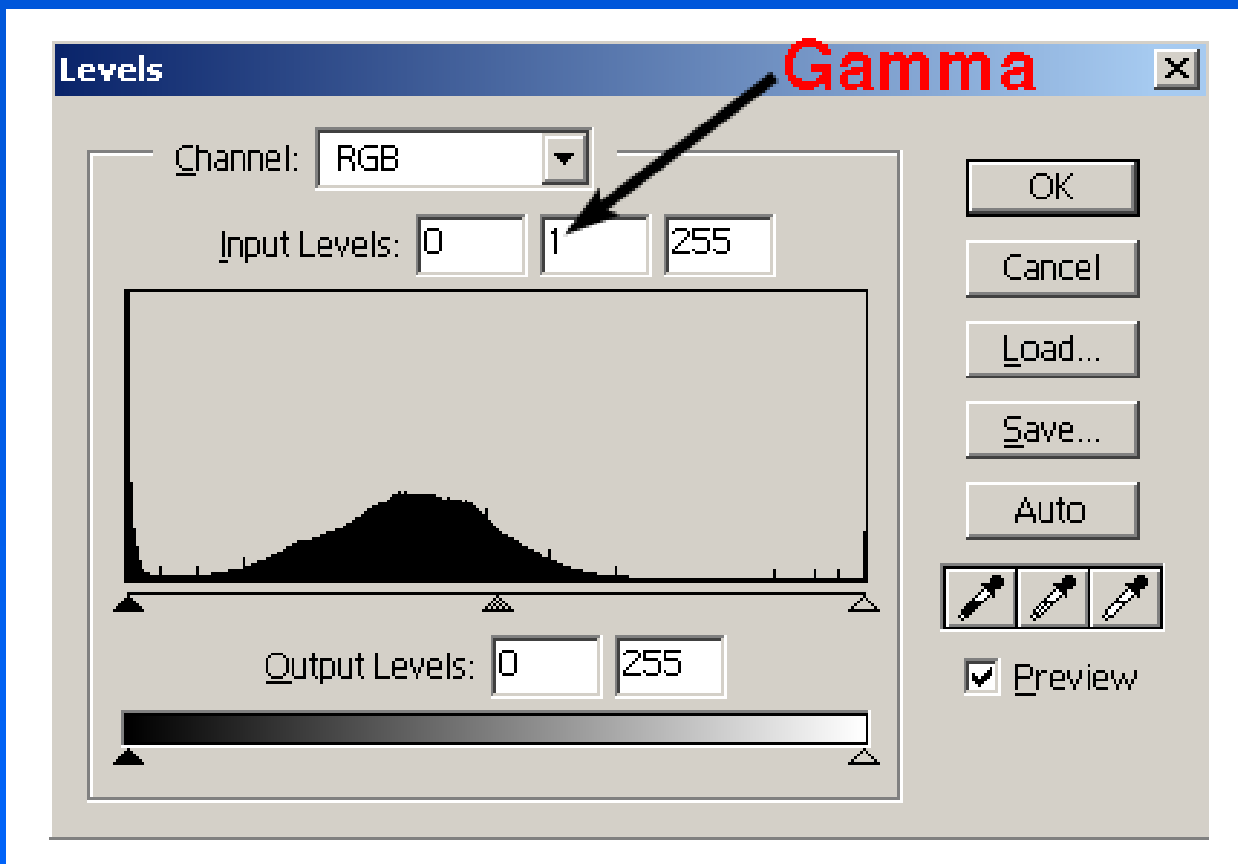
**Поточечная (растровая) запись – количество информации однозначно определяется количеством точек (пикселей) в записанном изображении. Изменение масштаба делает растр видимым.**

**Все ПЗС и КМОП камеры записывают изображение в растровом формате!**

**Каждый пиксел растрового изображения однозначно описывается своим положением в кадре и яркостью. Для цветного изображения яркость рассчитывается отдельно в трех каналах.**

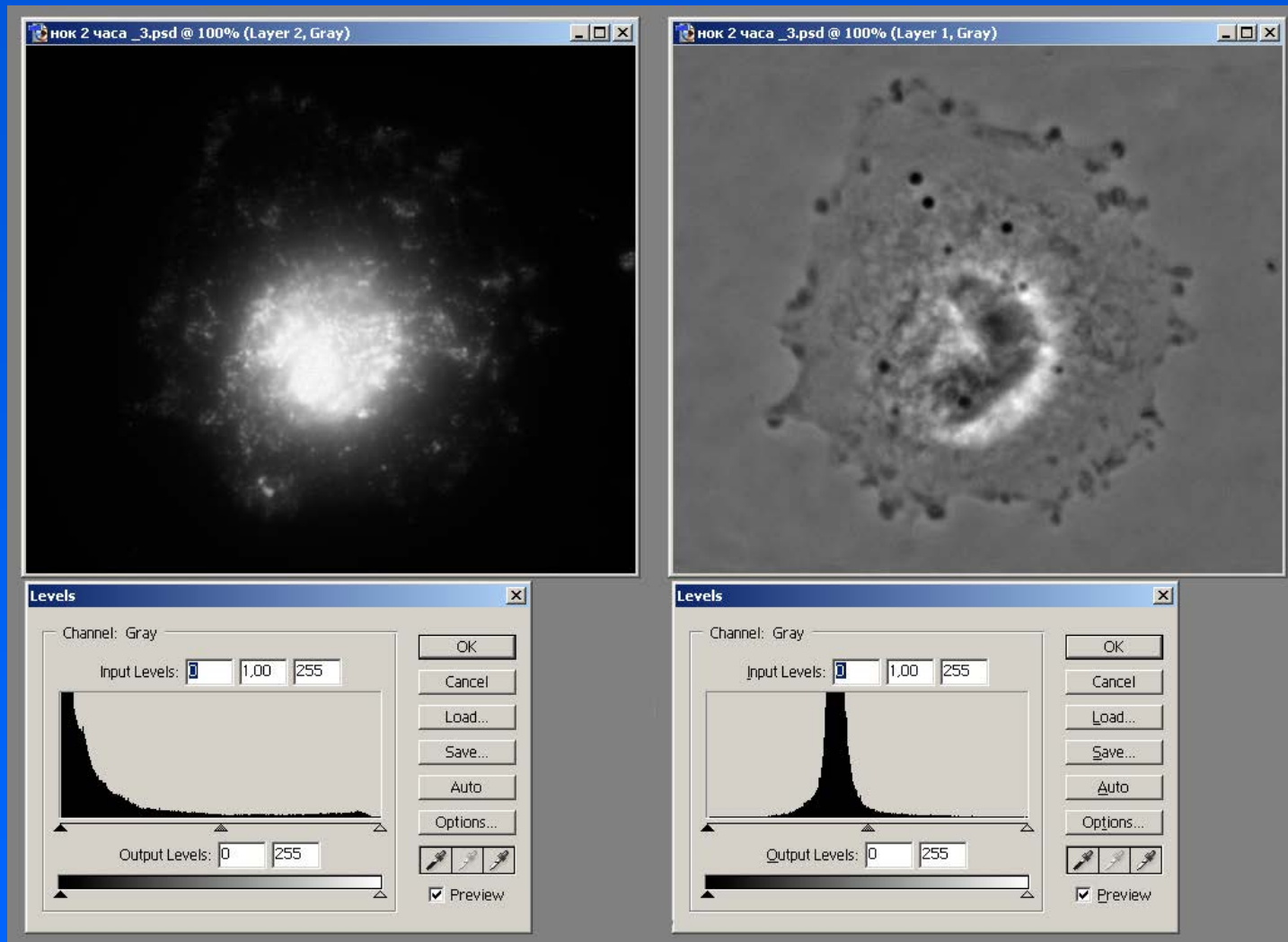


# Гистограмма яркости



График, показывающий распределение пикселей по интенсивности, называется гистограмма яркости. В зависимости от условий съемки она может иметь различный вид.

# Типичные гистограммы



**Флуоресценция**

**Фазовый контраст**

# Гистограмма яркости

График, показывающий распределение пикселей по интенсивности, называется гистограмма яркости. В зависимости от условий съемки она может иметь различный вид.

В светлом поле гистограмма имеет два или три пика, соответствующих фону и различным областям препарата.

В режиме фазового контраста и DIC – один пик, соответствующий фону.

В режиме флуоресценции – один пик, но чаще – спадающая от «0» кривая.

Правильная настройка гистограммы яркости позволяет эффективно проводить дальнейшую обработку изображения.

# **Запись изображения – режим светлого поля**

**Определение экспозиции – по гистограмме яркости (объект и фон), или по условиям съемки.**

**Настройка цветового баланса – накал лампы не менее 50% от максимального.**

**Определение достаточного увеличения объектива (эквивалентного размера пиксела).**

**Предварительная фокусировка изображения в «живом окне».**

# **Запись изображения – фазовый контраст и DIC**

**Яркость фона должна составлять около 50-70% от насыщения камеры, или время экспозиции определяется условиями эксперимента (живые клетки).**

**При съемке живых клеток для увеличения контраста целесообразно использование зеленого или оранжевого светофильтра.**

**Предварительная фокусировка изображения в «живом окне».**

# Запись изображения – режим флюоресценции

Настройка освещения – поле, освещаемое лампой, может быть уменьшено до эквивалентного размера матрицы камеры.

Определение экспозиции – как правило, экспозиция устанавливается максимально возможная по условиям эксперимента (живые клетки). Фиксированные препараты – экспозиция устанавливается близкой к насыщению камеры (стандартные препараты – экспозиция не менее 1-5 сек. для охлаждаемых камер).

Настройка камеры – обычно не требуется, но для EMCCD необходима настройка усиления.

Установка светоделителя – 100% света на камеру.

Повторная съемка того же поля зрения нежелательна!

Фокусировка в живом окне может быть затруднена – проверку парфокальности надо проводить заранее.

# Условия оптимальной записи изображения в микроскопе

Уменьшение эквивалентного размера пиксела приводит к уменьшению количества света, попадающего на него, что аналогично эффекту уменьшения чувствительности камеры. Поэтому минимальный уровень пикселизации во флуоресцентной микроскопии, составляет около  $1/3$  радиуса диска Эри, но меньший эквивалентный размер пиксела позволяет сохранить больший контраст.

В практической флуоресцентной микроскопии эквивалентный размер пиксела рассчитывается исходя из требований светочувствительности. Компромисс обычно достигается при эквивалентном размере пиксела около 40% от разрешающей способности объектива, однако для ярких препаратов его целесообразно уменьшить до 25-30%.

Для эффективной цифровой обработки светопольных изображений эквивалентный размер пиксела должен быть не более  $1/4$  разрешающей способности объектива микроскопа.

# Получение изображения

## Основные этапы:

Определение необходимого разрешения (объектива и эквивалентного размера пиксела).

Установка освещения (по Келеру).

Настройка гистограммы яркости – подбор экспозиции и настроек камеры для получения максимального отношения сигнал/шум.

Запись изображения в формате TIFF (другие нежелательны), максимальное число бит на канал (ограничивается АЦП и контроллером камеры). Если прямая запись в формате TIFF с максимальной разрядностью невозможна (режим RAW или аналогичный), то необходимо выяснить, как можно данный формат преобразовать в TIFF без потери разрядности.



# Вывод изображения на экран

Изображение, записанное с динамическим диапазоном 8 бит, теоретически может быть выведено на экран полностью, но не все его оттенки воспринимаются глазом.

Изображение, записанное камерой с динамическим диапазоном 12-16 бит, содержит большое количество скрытой информации, которая не отображается монитором.

Светлые полутона воспринимаются глазом лучше, чем темные, поэтому изображение при выводе на экран часто модифицируется нелинейным образом (гамма-коррекция).

Низкий контраст изображения может быть обусловлен препаратом, а может быть связан с неправильной настройкой микроскопа и камеры.

Для увеличения контраста записанного изображения применяют различные обработки. Некоторые из них не приводят к потере информации, а другие приводят.

# Разрядность АЦП и просмотр изображения

Изображение с разрядностью более 8 бит нельзя целиком вывести на экран, поскольку монитор отображает только 8 бит.

«Стандартное» выведение изображения предполагает, что весь динамический диапазон выводится за счет объединения соседних уровней.

Более правильное выведение – изображение «шкалируется» по минимуму и максимуму.

Для детального просмотра полутонных деталей (градаций серого) шкала должна быть настроена специальным образом (scale image), что достигается с использованием программ, работающих с 16-и битным изображением.

Суррогатная настройка изображения – регулировка яркости и контраста в 8-и битной шкале.

# Лекция 12

**Обработка изображений,  
работа с цветными  
изображениями**

# Стандартная последовательность анализа изображений

- Импорт изображений
- Коррекция
- Усиление контраста и предобработка
- Сегментация (выделение объектов)
- Измерения
- Классификация признаков

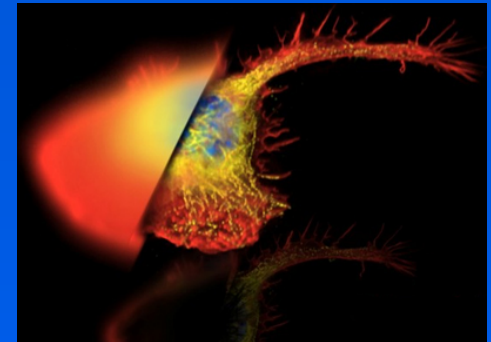
# Коррекция изображения

## Деконволюция

- Слепая (расчетная PSF)
- Итеративная (эмпирическая PSF)
- 3D деконволюция

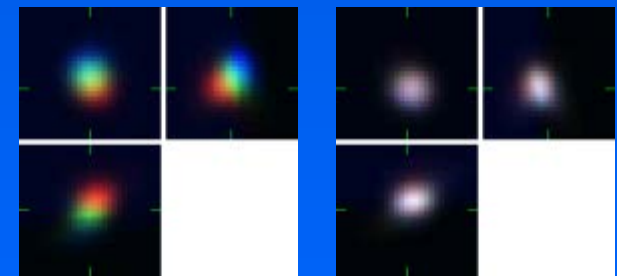
до

после



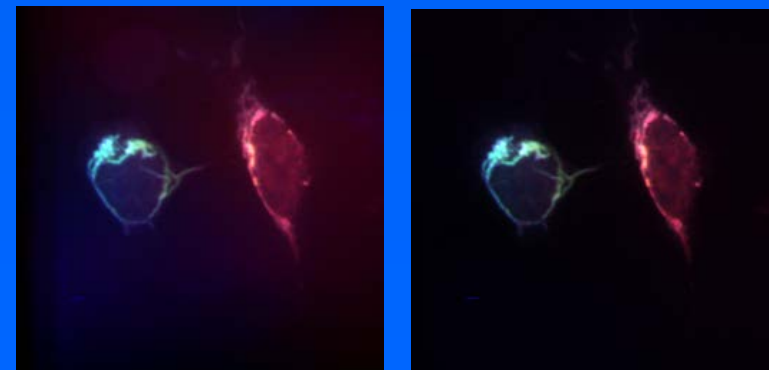
Huygens, [www.svi.nl](http://www.svi.nl)

## Коррекция хроматических аберраций



## Коррекция фона

- На плоское поле
- Неравномерное освещение



# Неоднородности поля зрения

Виньетирование.

Неравномерное освещение поля зрения (сцены).

Помехи в оптическом пути и загрязнения на входном окне камеры.

Дробовый шум (при низкой освещенности).

Неравномерный фиксированный фон (дефектные пиксели матрицы камеры).

Нелинейная светочувствительность матрицы и эффект «затекания» при насыщении.

# Виньетирование

Виньетирование – затемнение изображения по краям кадра.

Причины: зависимость освещенности от угла падения света (пропорциональна косинусу в четвертой степени); механические (косой свет затемняется из-за несовершенства оптической системы); оптические (рассеяния косого света на многочисленных поверхностях линз); зависимость чувствительности фотодиодов от угла (устраняется с помощью микролинз).

В микроскопии эффект виньетирования зависит от углового размера матрицы камеры, и возрастает с ростом ее поля зрения. Виньетированием можно практически пренебречь, когда поле зрения камеры составляет не более  $1/3$  видимого поля зрения. При больших размерах необходима коррекция. Она проводится через коррекцию на плоское поле (flat-field correction) или более сложными способами.

Коррекция на плоское поле увеличивает шум, обусловленный собственными параметрами камеры. Поэтому ее применение во флуоресцентной микроскопии нежелательно.

# Арифметические операции с изображениями

Арифметические операции означают попиксельное преобразование. Оно эффективно только в 16-и или 32-х битной шкале серого. Поскольку результирующее значение не может быть отрицательным и не может выходить за пределы заданного диапазона, то применяются корректирующие константы.

Сумма изображений – прямая:  $I_1 + I_2 = I_{рез.}$

Разность изображений:  $I_1 - I_2 + const. = I_{рез.}$

Частное изображений:  $I_1 / I_2 * const. = I_{рез.}$

Произведение изображений:  $I_1 * I_2 / const. = I_{рез.}$

Коррекция фона – вычитание или деление изображений.



# Вычитание фона

Процедура вычитания фона применяется при флуоресцентной микроскопии в случаях неравномерного освещения кадра.

Для вычитания используется изображение, записанное с той же экспозицией, что и в опыте, но полученное с участка, не содержащего флуоресцирующих структур.

Вычитание фона не может быть применено для светлопольного, фазовоконтрастного и DIC изображений.

Для исправления неравномерности фона, наблюдаемой при записи светлопольного, фазовоконтрастного и DIC изображений, применяется коррекция на плоское поле зрения (flat-field correction).

# Коррекция на «плоское поле зрения»

Коррекция на плоское поле зрения позволяет удалить из изображения значительные неоднородности изображения, вызванные:

(а) неравномерностью освещения препарата; (б) наличием загрязнений в оптическом пути микроскопа; (в) наличием загрязнений на окне камеры.

Коррекция эффективна в тех случаях, когда интенсивность освещения велика, и велика неоднородность фона (например, при фазовом контрасте, DIC).

При коррекции на плоское поле зрения уменьшается отношение сигнал/шум для участков с равномерным фоном за счет того, что собственный шум камеры учитывается два раза. Поэтому она малоэффективна для флуоресцентных изображений.

# Опорное изображение для коррекции на «плоское поле зрения»

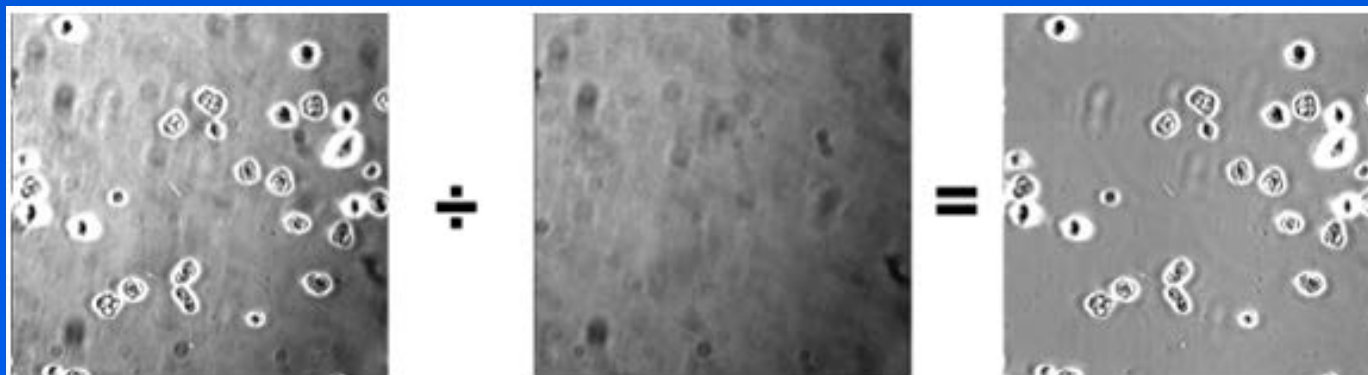
Для коррекции на плоское поле зрения в проходящем свете необходимо найти область препарата, полностью свободную от загрязнений и от каких-либо структур.

Часто это невозможно, тогда в качестве суррогата используют сильно дефокусированное изображение с максимально однородной области препарата.

В режиме флуоресценции фотографируется стандартный гомогенно флуоресцирующий препарат (например, урановое стекло, кювета с красителем) или равномерный фон на стекле.

Для уменьшения шума необходимо сделать несколько кадров с небольшим сдвигом (не менее 15 для флуоресцентного препарата и не менее 3 для светлого поля), и затем их усреднить перед преобразованием. Это помогает уменьшить дробовый шум и шум считывания.

# Коррекция на «плоское поле» (flat-field correction)



При неравномерном освещении поля зрения делается контрольный снимок – участок, где нет препарата.

Коррекция состоит в том, что полученное изображение делят на изображение фона:

$$I_{\text{из.}} / I_{\text{фон}} * \text{const.} = I_{\text{рез.}}$$

Величина множителя (const.) определяется как средняя интенсивность изображения. Операция проводится в 16-и битном пространстве.

# Яркость и контраст

Изменения яркости приводят к объединению черных (затемнение) или белых (осветление) уровней на краях гистограммы. Данное преобразование наиболее эффективно для фазового контраста и DIC, а также полезно для «осветления» флуоресцентных изображений.

Увеличение контраста (увеличение угла наклона на графике входящие-выходящие уровни) приводит к резкому расширению гистограммы яркости, и, соответственно, к появлению гомогенных областей. Поэтому увеличение контраста более эффективно в пространстве, превышающем 8 бит. Однако это возможно далеко не во всех программах по обработке изображения.

Изменение яркости и контраста осуществляется более точно в 16-и битном пространстве, в частности, путем установки верхнего и нижнего уровней воспроизведения (min./max.).

# Настройка яркости и контраста

Для настройки параметров изображения используется гистограмма яркости.

Если гистограмма яркости, соответствующая препарату, узкая, то первое, что необходимо сделать – растянуть гистограмму так, чтобы самые светлые и самые темные области изображения соответствовали уровням примерно 240 и 20 (в 8-и битной шкале).

На следующем этапе (к растянутой гистограмме) применяются изменения яркости и контраста.

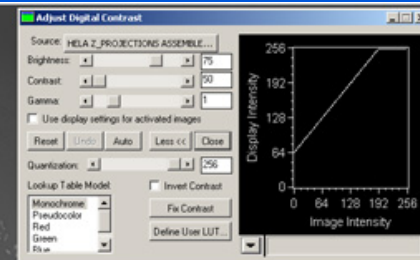
В небольших пределах они, как правило, не приводят к потере полезной информации.

# Коррекция яркости и контраста

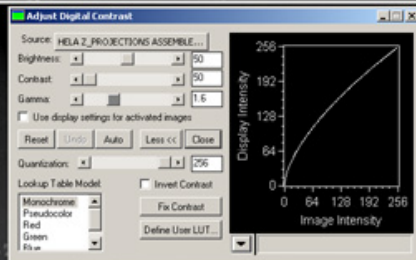
ИСХОДНОЕ



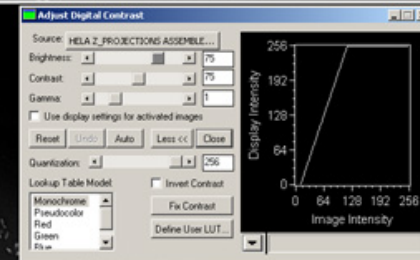
яркость +



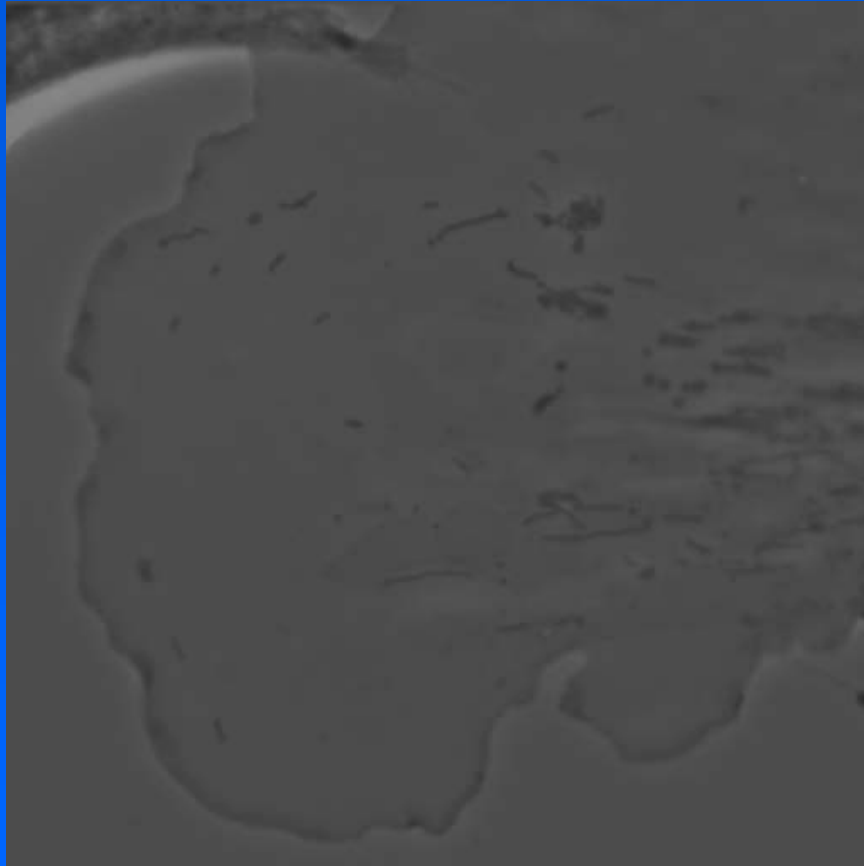
гамма +



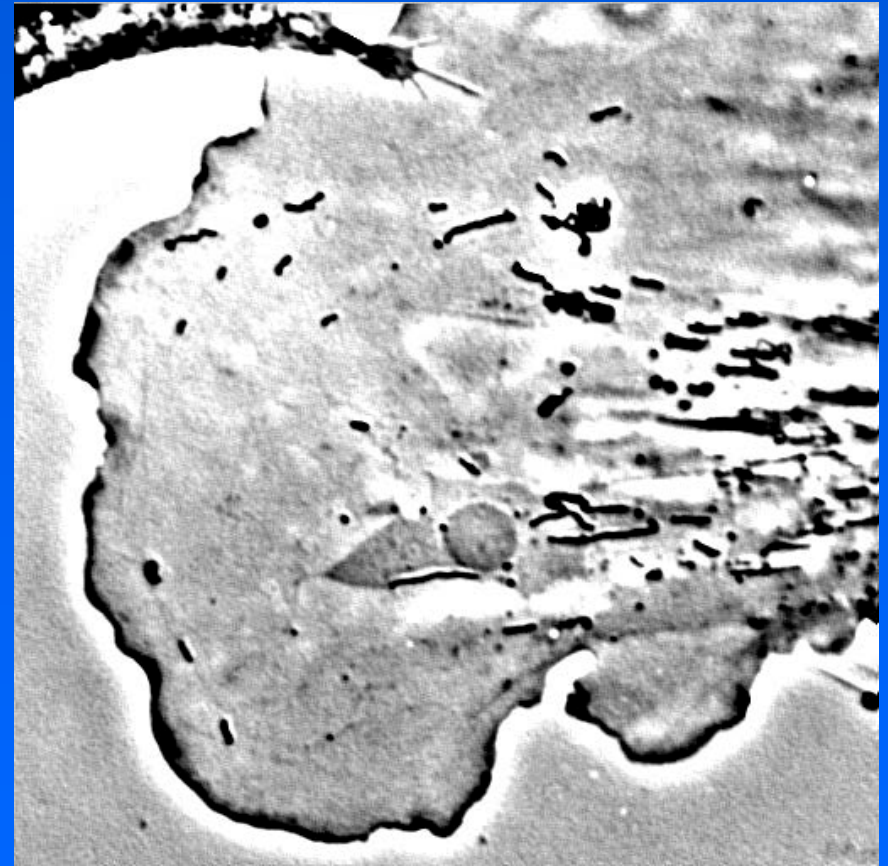
яркость +  
контраст +



# Усиление фазового контраста



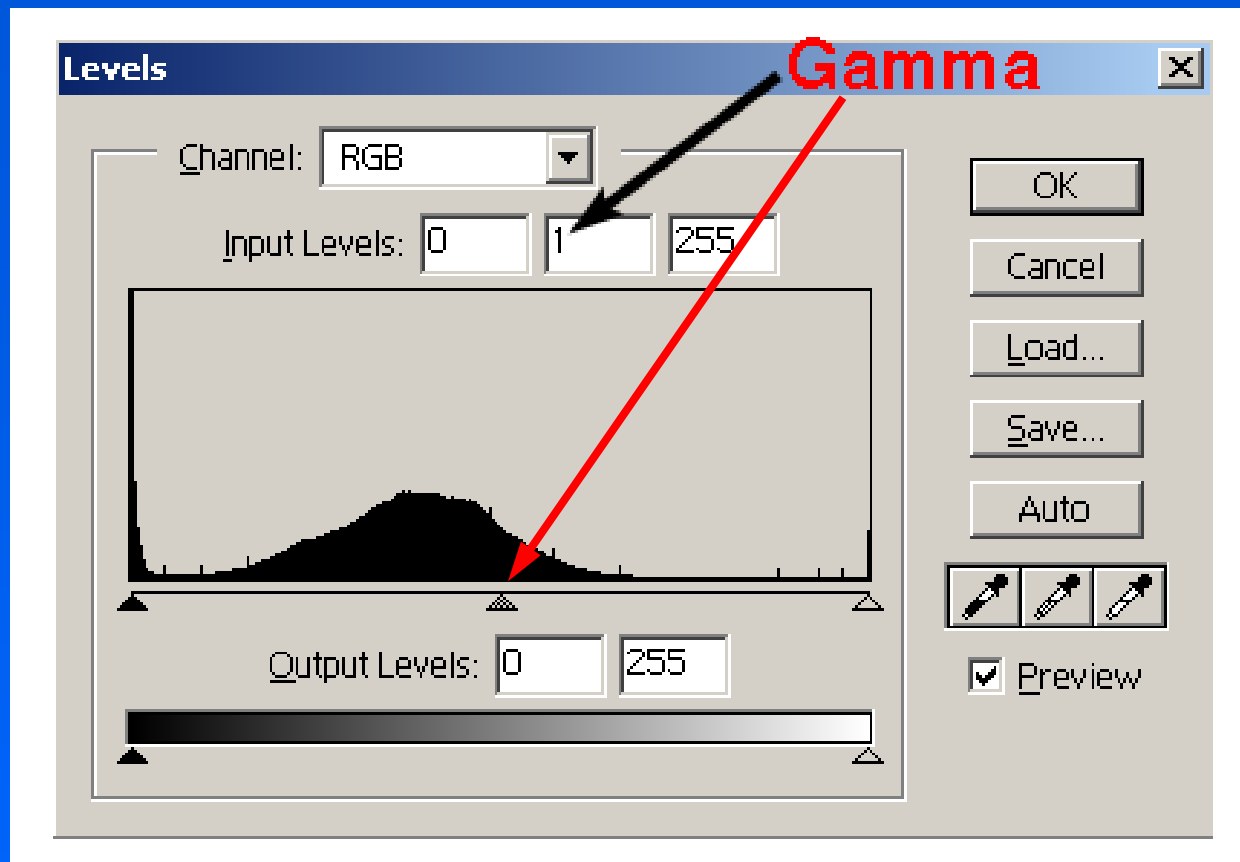
**Исходный**



**Усиление в 50 раз**

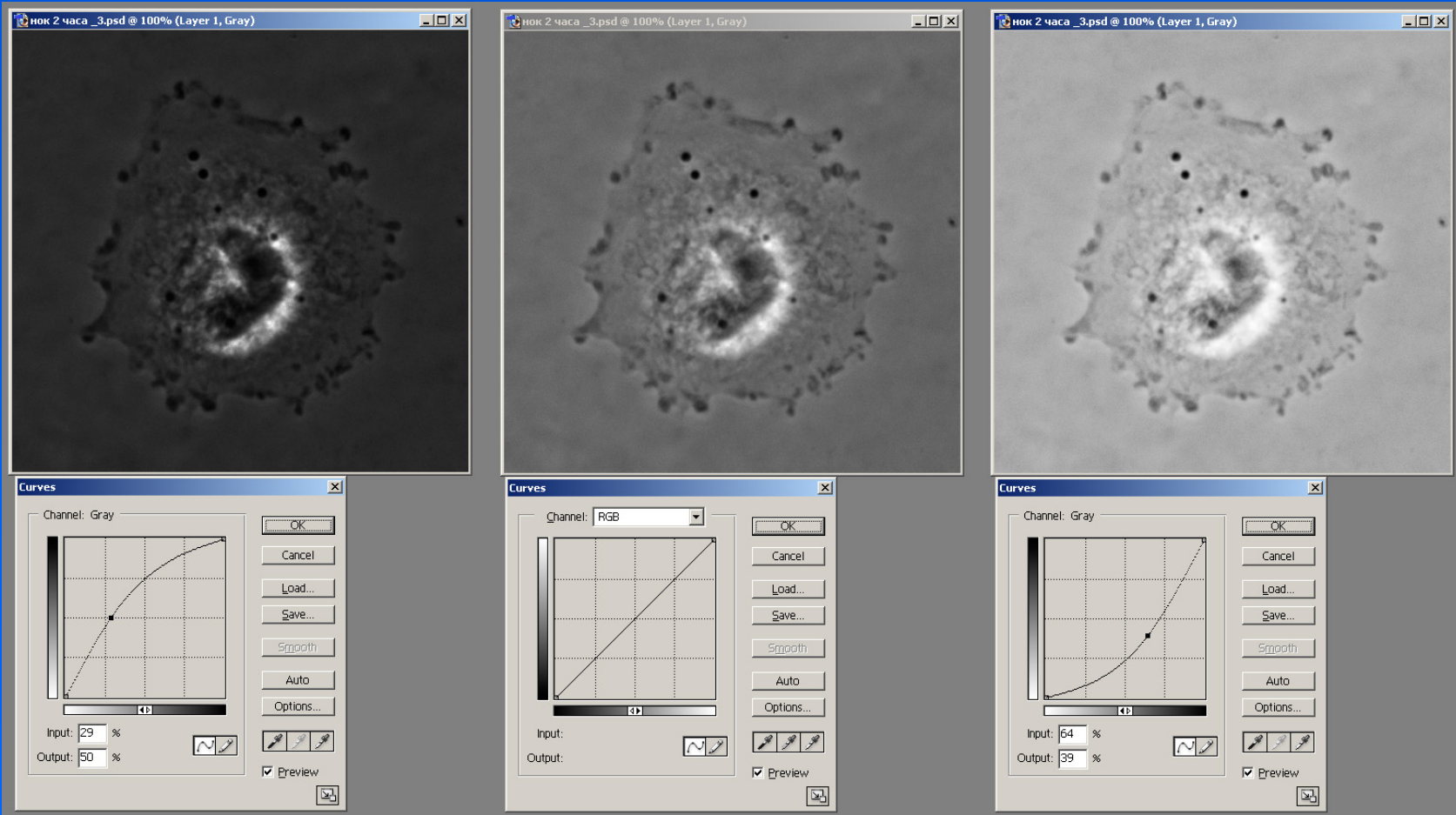


# Гамма-коррекция



Гамма коррекция – нелинейное преобразование, которое приводит к растяжению одной части гистограммы и сжатию другой части. Гамма меньше 1 – растяжение светлых полутонов; гамма больше 1 – растяжение темных полутонов.

# Гамма-коррекция



**Гамма меньше 1 – растяжение светлых полутонов;  
гамма больше 1 – растяжение темных полутонов**

# Обработка изображения в микроскопии

## Недостатки записанного изображения:

1. Неоднородное освещение поля зрения.
2. Пылинки и грязь, находящиеся в оптическом пути микроскопа.
3. Интерференционные картины (муаровый рисунок) в плоскости изображения.
4. Низкий контраст важных деталей изображения.
5. Сдвиг цветового баланса (для цветных изображений).

Для устранения всех этих недостатков применяется цифровая обработка изображения.

Отношение сигнал/шум в процессе обработки всегда снижается, и его нельзя увеличить, поэтому обработка изображений с низким отношением сигнал/шум практически затруднена.

# Задачи цифровой обработки изображения

1. Удаление отдельных дефектов изображения.
2. Избирательное контрастирование деталей (уменьшение контраста фона).
3. Растяжение гистограммы яркости и/или нелинейное преобразование гистограммы яркости.
4. Приближение записанного изображения к визуально воспринимаемому.
5. Арифметические операции с кадрами.
6. Сегментация изображения для морфометрии.

# Обработка изображения с помощью матриц – конволюция (свертка)

Элементом преобразования является ядро или маска (kernel), размер которой составляет несколько пикселей (обычно – квадраты 3x3; 5x5; 7x7 и т.п.)

Маска содержит коэффициенты, сумма которых равна единице. Центр маски последовательно накладывается на все пиксели изображения, и их значения пересчитываются в пиксели нового изображения.

Края изображения при этом деформируются, так как маска не может быть правильно применена к пикселям, отстоящим от края на расстояние меньше, чем ее радиус.

В зависимости от коэффициентов различают много видов масок – низкочастотные (low pass), высокочастотные (high pass), контрастирующие, асимметричные и проч.

# Примеры простейших масок (kernels)

1/9	1/9	1/9
1/9	1/9	1/9
1/9	1/9	1/9

**Low pass**  
(сглаживание)

-1	-1	-1
-1	9	-1
-1	-1	-1

**High pass**  
(контрастирование)

-1	0	1
-1	1	1
-1	0	1

**Edge enhancement**  
(контрастирование  
края)

# Сглаживание шумов (размытие)

0	1	3	1	0
1	6	10	6	1
3	10	15	10	3
1	6	10	6	1
0	1	3	1	0

Фильтр Гаусса, 5x5 (делитель – 99)

# Результаты фильтрации

Для сохранения информации диаметр маски (kernel) должен быть меньше разрешающей способности микроскопа. При использовании больших по площади масок, повышающих контраст, происходит избирательное контрастирование одних деталей и смазывание или удаление других элементов изображения.

Для конволюции без потери разрешения эквивалентный размер пиксела должен быть по крайней мере в 2 раза меньше, чем предел, задаваемый телеграфной теоремой.



# ImageJ для микроскопии

ImageJ, это свободно распространяемая (Public domain), написанная на языке Java программа для анализа и обработки изображений, разработанная в Национальном Институте Здоровья в США.

ImageJ была создана с открытой архитектурой, которая обеспечивает расширяемость при помощи плагинов Java, а также макросов, создаваемых пользователями.

ImageJ позволяет отображать, редактировать, анализировать, обрабатывать и сохранять 8-битные, 16-битные и 32-битные ч/б изображения, а также 24-битные цветные изображения. Программа может читать многие форматы изображений, такие как TIFF, BMP, PNG, GIF и др., а также многие RAW форматы.

Пользовательские модули получения, анализа и обработки могут быть написаны с помощью встроенного редактора ImageJ и Java компилятора.

Плагины, написанные пользователями, позволяют решать многие задачи анализа и обработки изображений, позволяют проводить трехмерную визуализацию, морфометрический анализ, а также создавать автоматизированные микроскопические системы.

# Преобразования изображения

Коррекция фона (коррекция на плоское поле зрения или вычитание).

Изменения интенсивности –линейные (растяжение гистограммы) и нелинейные (гамма-коррекция), инверсия.

Конволюция (пространственная свертка) с масками (kernels)

Деконволюция (обратная свертка).

Преобразование Фурье и фильтрация в пространстве Фурье

Наложение нерезкой маски.

Геометрические преобразования (интерполяция, поворот, устранение дисторсии и проч.).

Бинаризация (односторонняя, двухсторонняя).

Сжатие без потери информации.

Сжатие в формат JPEG (с потерей информации).

# Работа со стопками кадров

Выравнивание освещенности (equalize), возникающей вследствие выцветания препарата или мерцания лампы.

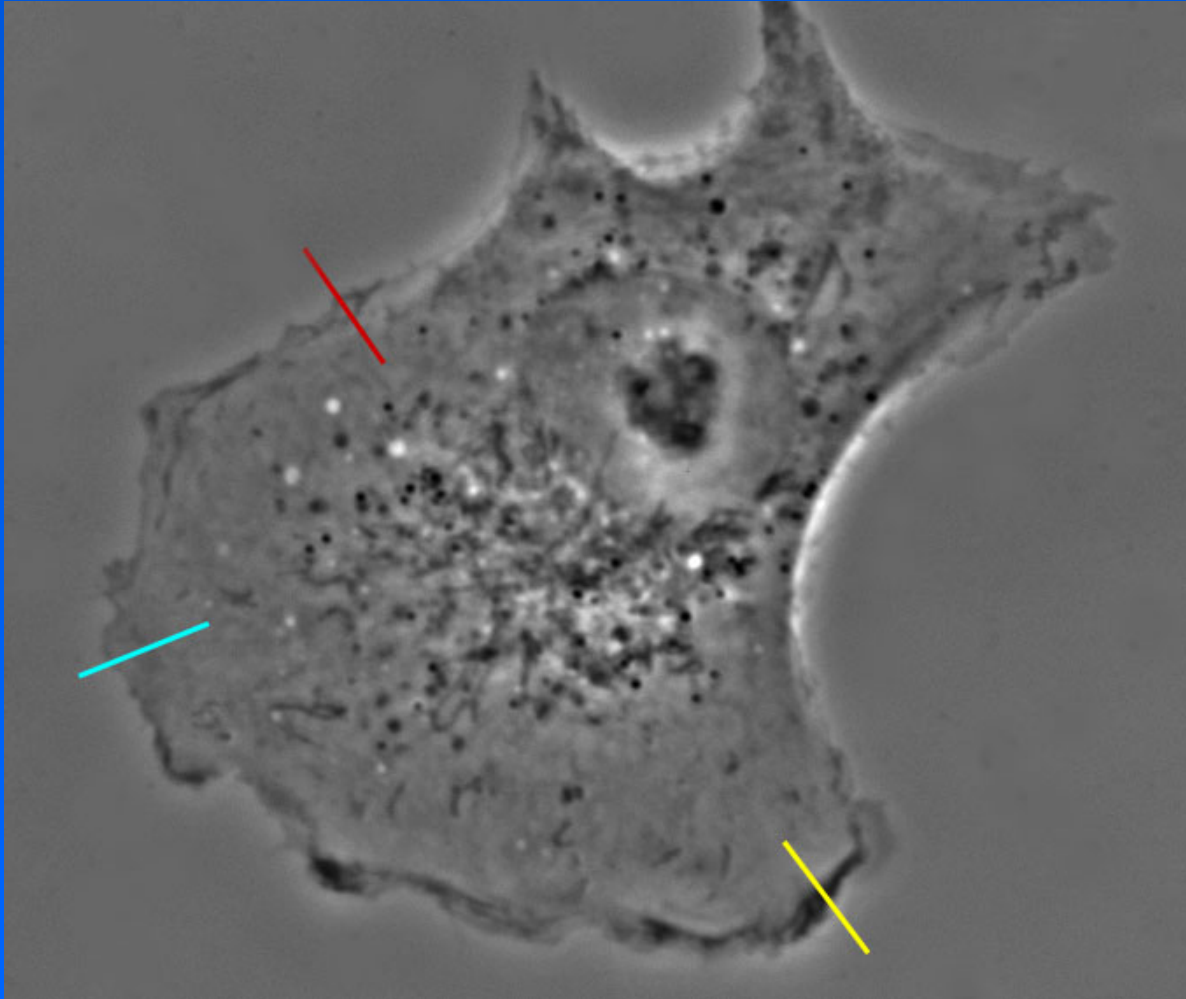
Выравнивание поля (вычитание фона).

Построение разностных изображений.

Построение кимограмм.

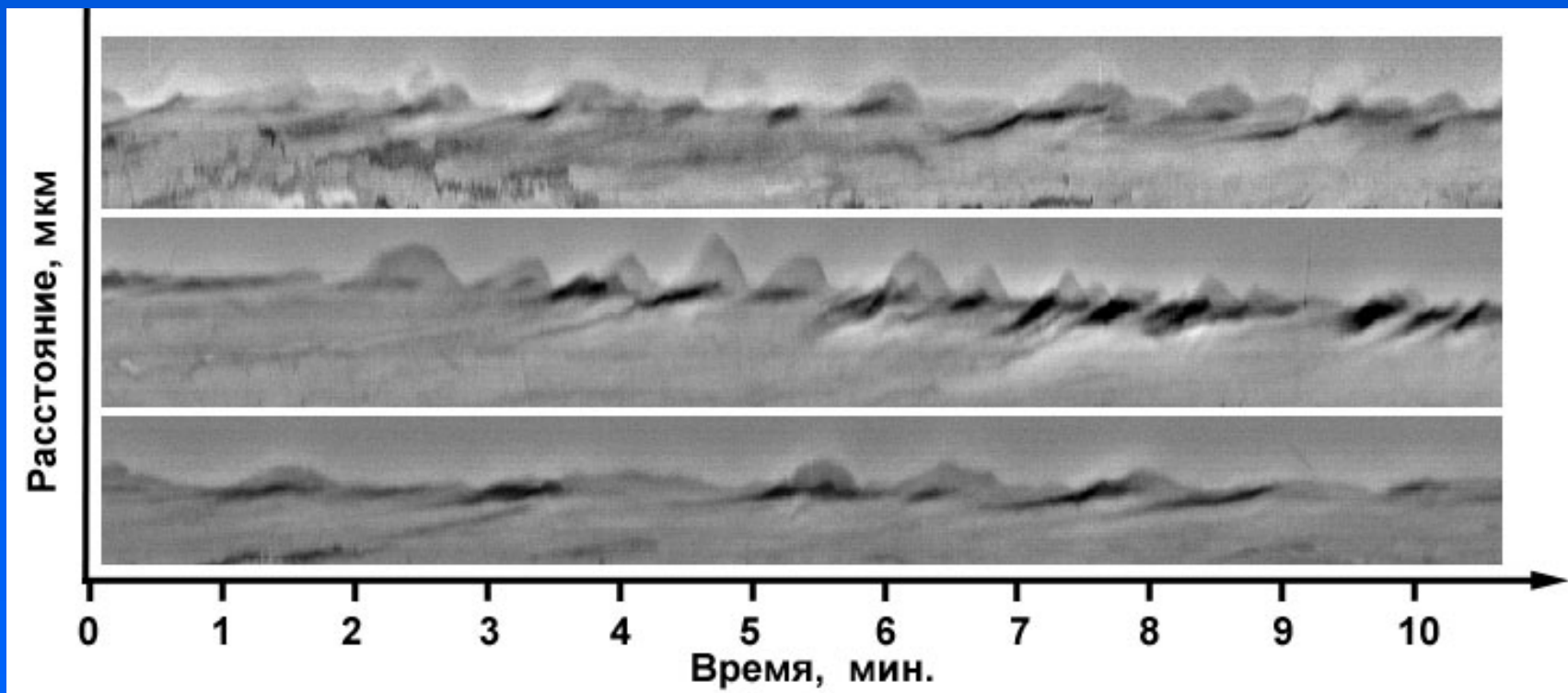
Создание видеороликов.

# Построение кимограмм



**Кимограф – прибор для записи колебаний с разверткой по времени.**

# Кимограф – анализ активного края фибробласта



Построение кимограммы – задание ширины линии и числа кадров.

Каждый столбец кимограммы соответствует одному кадру.

Измерение скорости на кимограмме – угол наклона .

# Обработка изображения – работа в Adobe Photoshop

Установка режима изображения (mode) – 8 bits/channel;  
Color mode: monochrome, RGB, Lab, CMYK.

Коррекция гистограммы яркости: яркость выходного изображения, контраст (установка пороговых уровней), гамма-коррекция.

Настройка цветового баланса: яркость, контраст, насыщенность (hue + saturation).

Фильтр Unsharp mask.

# Функция «наложение нерезкой маски» (unsharp mask)

Операция «unsharp mask» включает три последовательных преобразования изображения:

- получение нерезкой копии (размытие);
- умножение полученной копии на коэффициент и инверсия ее (получение негатива);
- сложение полученной маски с исходным изображением с использованием порога преобразования.

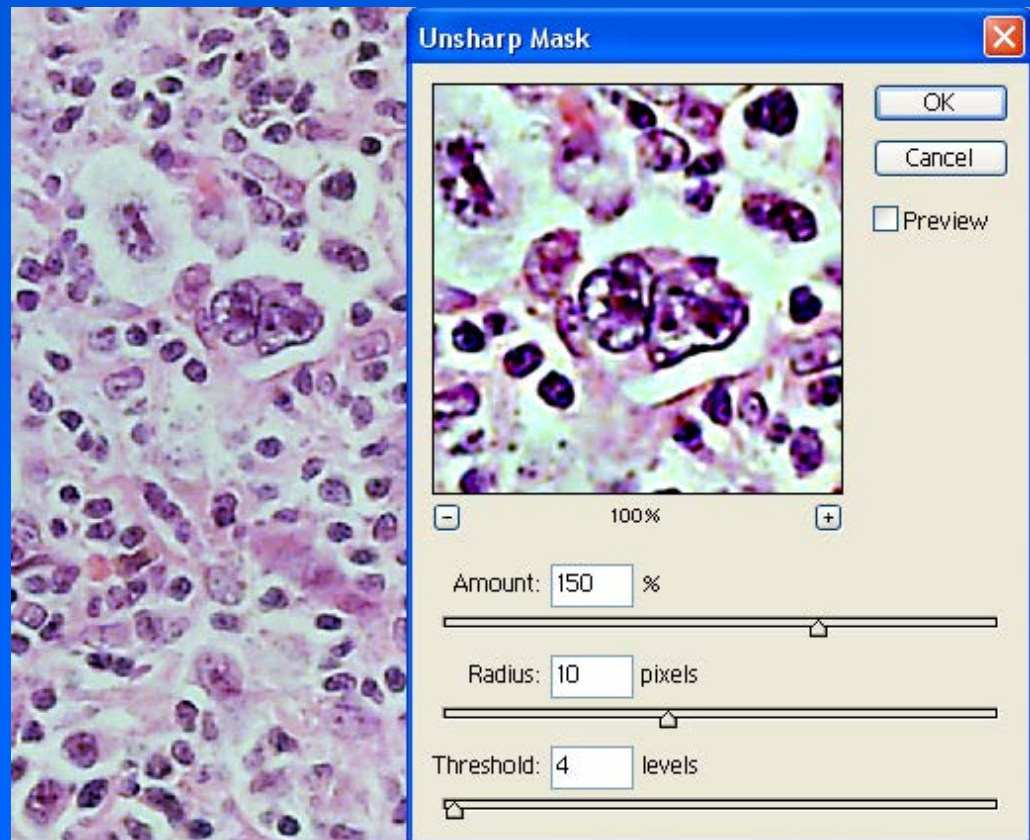
# Настройки функции «unsharp mask»

- установка радиуса размытия (от 0,1 до 2-3 пикселей);
- коэффициент умножения размытой копии (от 50 до 500%);
- порог преобразования (минимальный перепад между соседними пикселями когда преобразование проводится).



# Настройки функции «unsharp mask»

- радиуса размытия (от 0,5 до 3-5 пикселей);
- коэффициент умножения размытой копии (от 10 до 500%);
- порог преобразования (минимальный перепад между соседними пикселями).



# Лекция 12

## Цветные изображения

### Конфокальный микроскоп

#### Принципы и основные модели

# Цветные изображения

Существуют несколько способов кодировки цвета, RGB – один из них (принят в телевидении и цифровой фотографии).

Кодировка RGB означает, что каждый пиксел кодируется тремя значениями – синего, зеленого и красного каналов.

Изображение, записанное цветной камерой, обычно представляется в формате RGB с числом бит на каждый канал от 8 до 12.

Цветные изображения более высокого качества могут быть получены с помощью черно-белой камеры при съемке с использованием светофильтров.

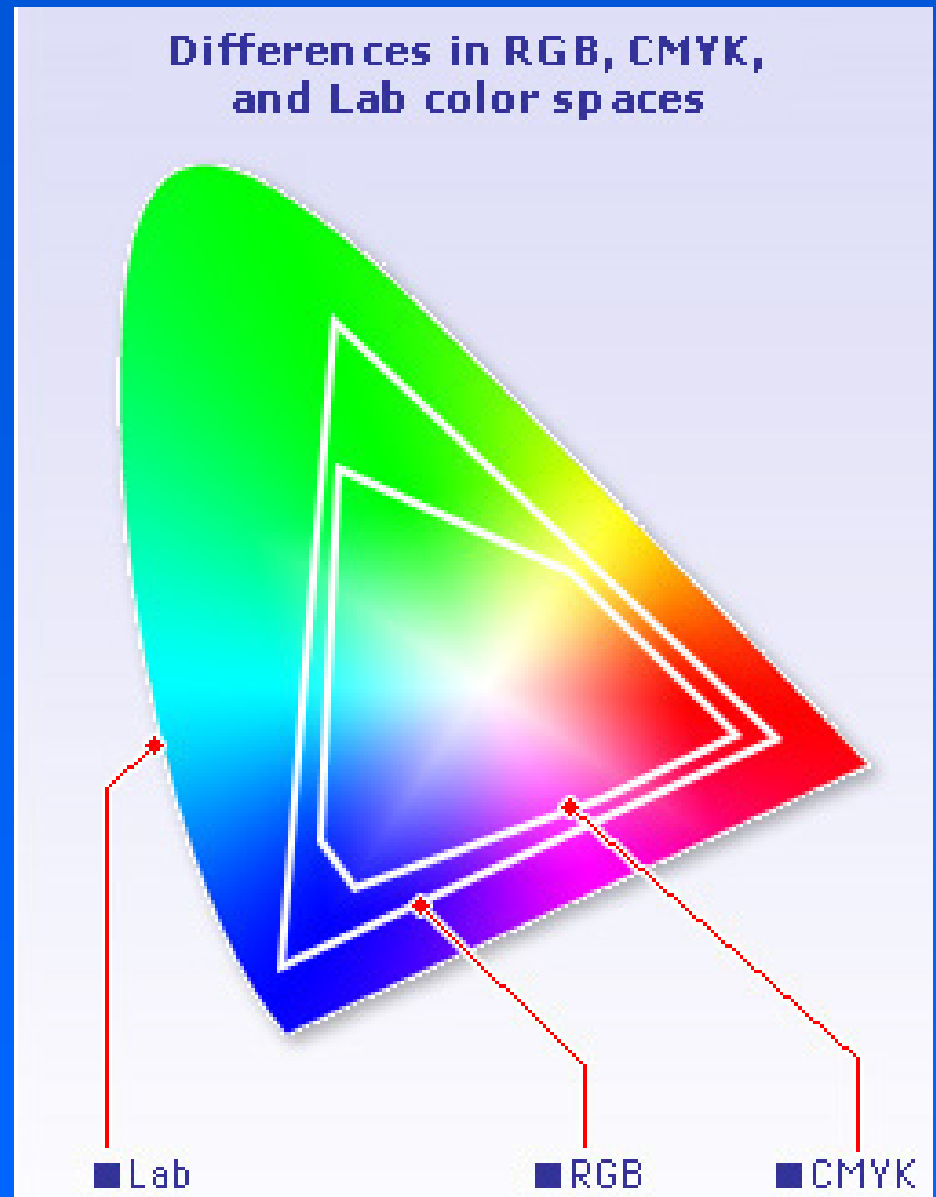
Как правило, цветная съемка применяется при съемке специально окрашенных фиксированных препаратов в гистологии и цитологии (мазки крови).

# Цветовые пространства CIE 1976

RGB – монитор

CMYK – принтер

$L^*a^*b$  – для преобразований



# Спектры зрительных пигментов

Absorption Spectra of Human Visual Pigments

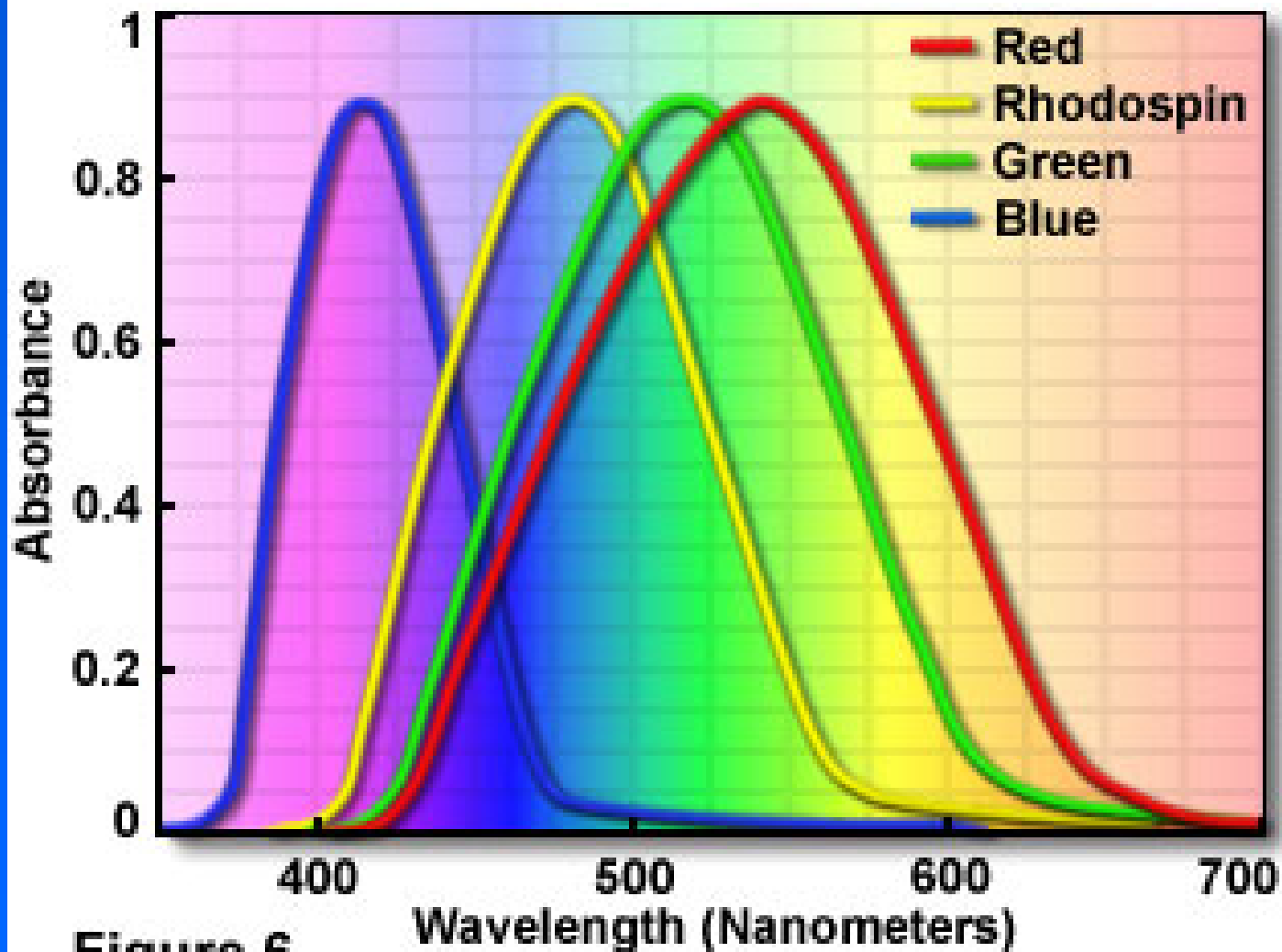


Figure 6

# Цветные ПЗС-камеры

Матрица, как правило, одна, светоделение производится по принципу «RGB». Оно осуществляется с помощью сложных систем фильтров. Конструкция системы фильтров является ноу-хау каждой фирмы.

Иногда применяются трехматричные камеры, где разделение света между матрицами происходит с помощью пентапризмы.

Некоторые камеры имеют охлаждение матрицы на 10-20 градусов по сравнению с комнатной температурой.

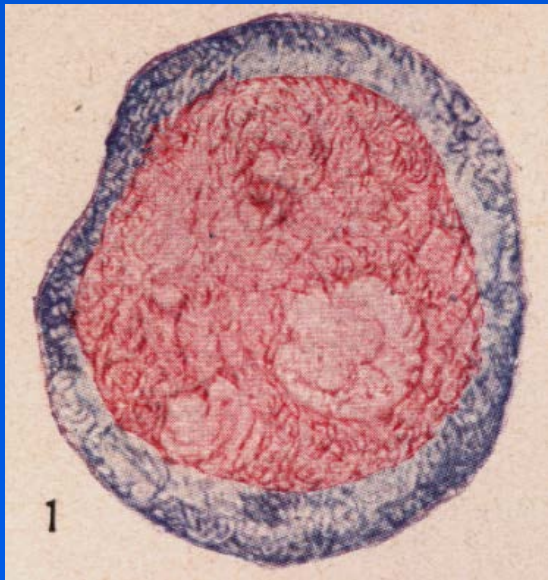
Квантовый выход не превышает 30%, обычно – не более 15%.

Размеры матрицы – большие (1,3 – 10 млн. пикселей).

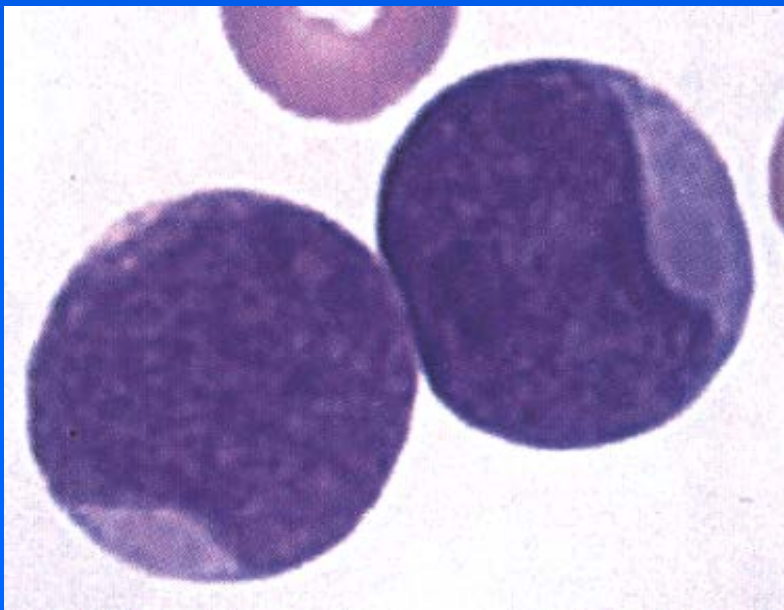
Размеры ячеек маленькие – 6,45 мкм и менее.

Оцифровка – 8 - 12 бит на цветовой канал (RGB).

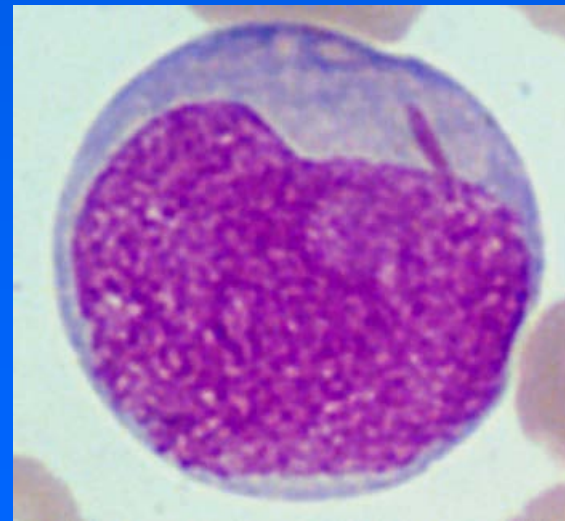
Основное предназначение – съемка при малых и средних увеличениях.



**Рисунки,  
Крюков, 1946**



**ВОЗ, 2001**



**Обработанный снимок**

# Приближение изображения к визуально воспринимаемому

## 1 алгоритм

Сглаживание шумов камеры и изображения (Gaussian blur, радиус 1-1,5 пиксела).

Наложение нерезкой маски (Unsharp mask, радиус 2-3 пиксела, коэффициент ~300%).

Растяжение гистограмм в цветовых слоях RGB и гамма-коррекция.

## 2 алгоритм

Перевод изображения в формат L\*a\*b color

Сглаживание шумов и наложение нерезкой маски (радиус 1,5-2 пиксела, коэффициент ~150%) в слое Lightness

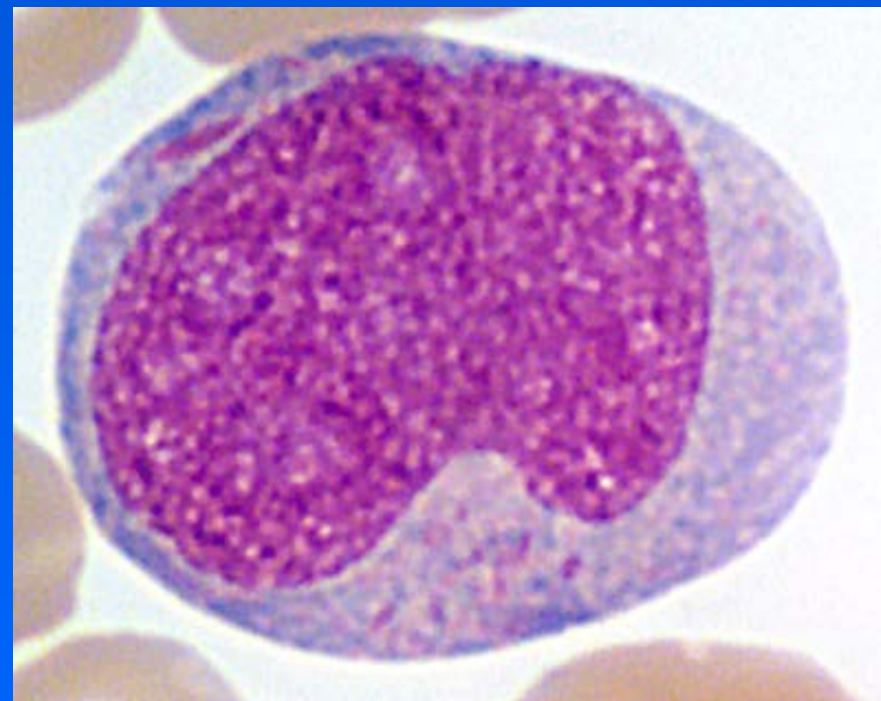
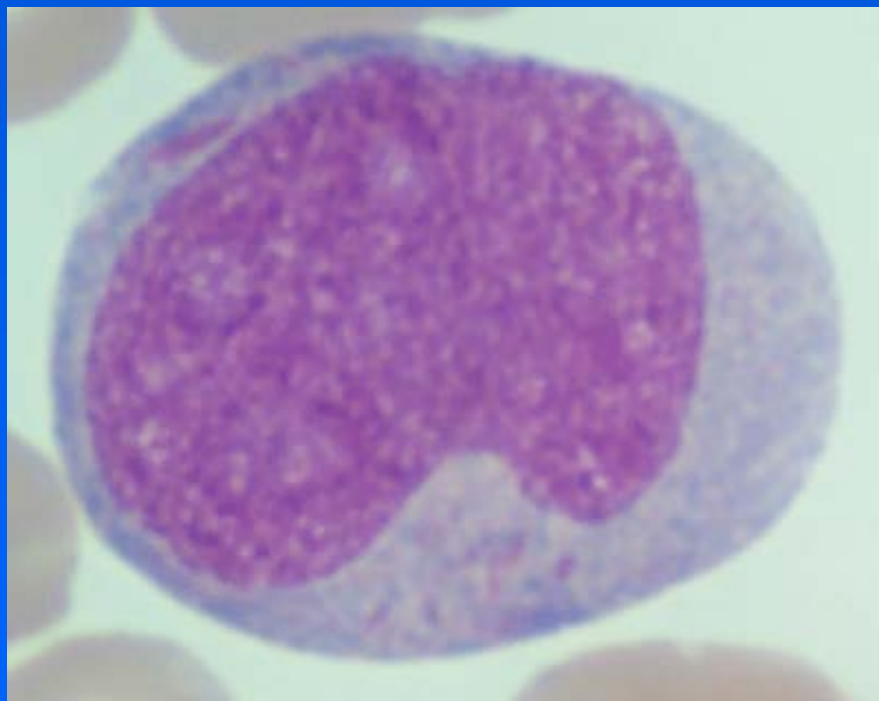
Растяжение (небольшое) гистограмм в слоях a и b.

Возвращение в формат RGB/CMYK.



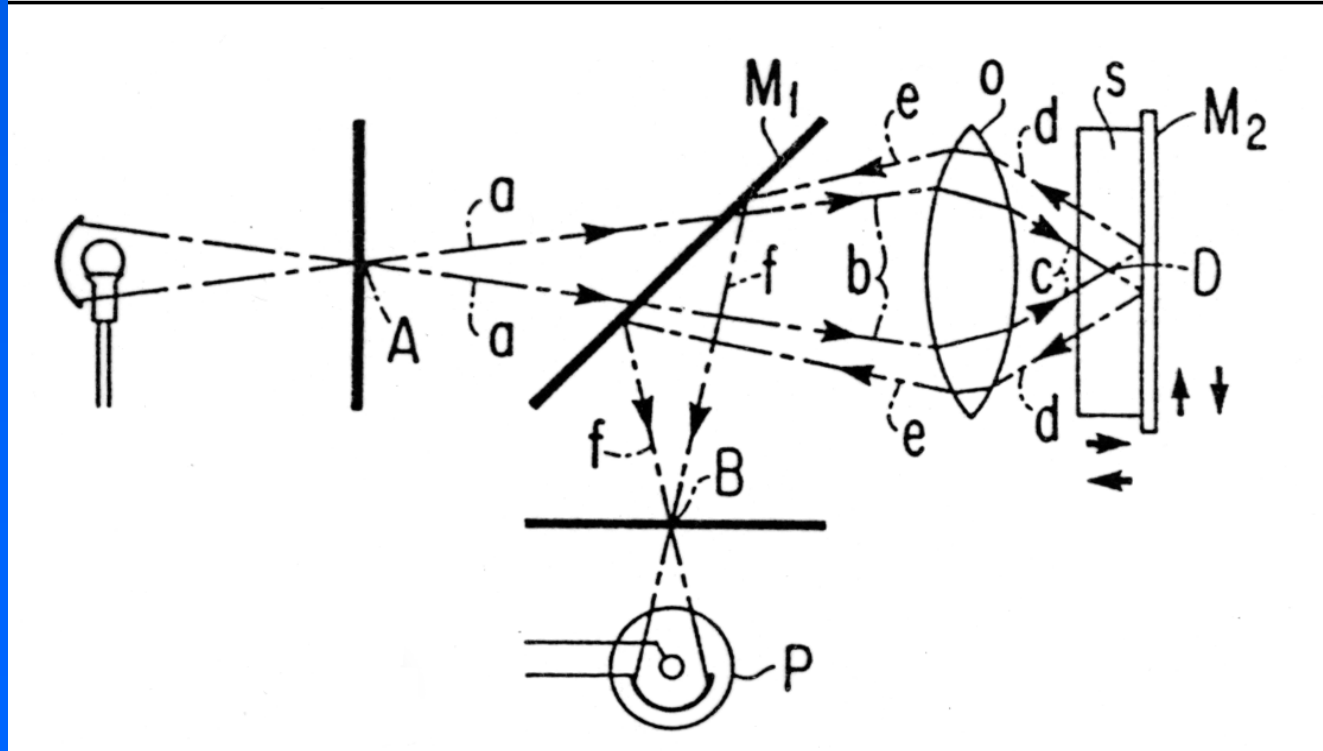
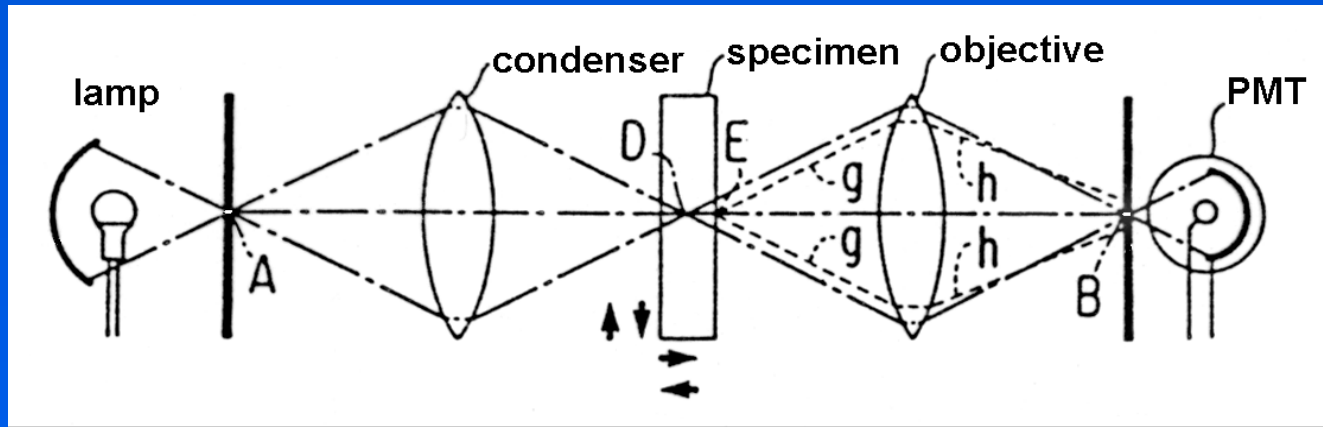
**Исходный кадр**

**После обработки**



**После фильтрации изображение делается более «объемным», но самые мелкие элементы из него исчезают.**

# Конфокальный микроскоп Минского



# Сканирующий конфокальный микроскоп

Изображение формируется поточечно за счет последовательного сканирования препарата сфокусированным лазерным пучком.

Сигнал от препарата детектируется ФЭУ, расположенным позади конфокальной диафрагмы.

Изображение записывается в компьютер с помощью АЦП и выводится на экран с помощью ЦАП.

Генерация происходит также, как в телевизоре или сканирующем электронном микроскопе.

Разрешающая способность определяется диаметром пучка и шагом сканирования.

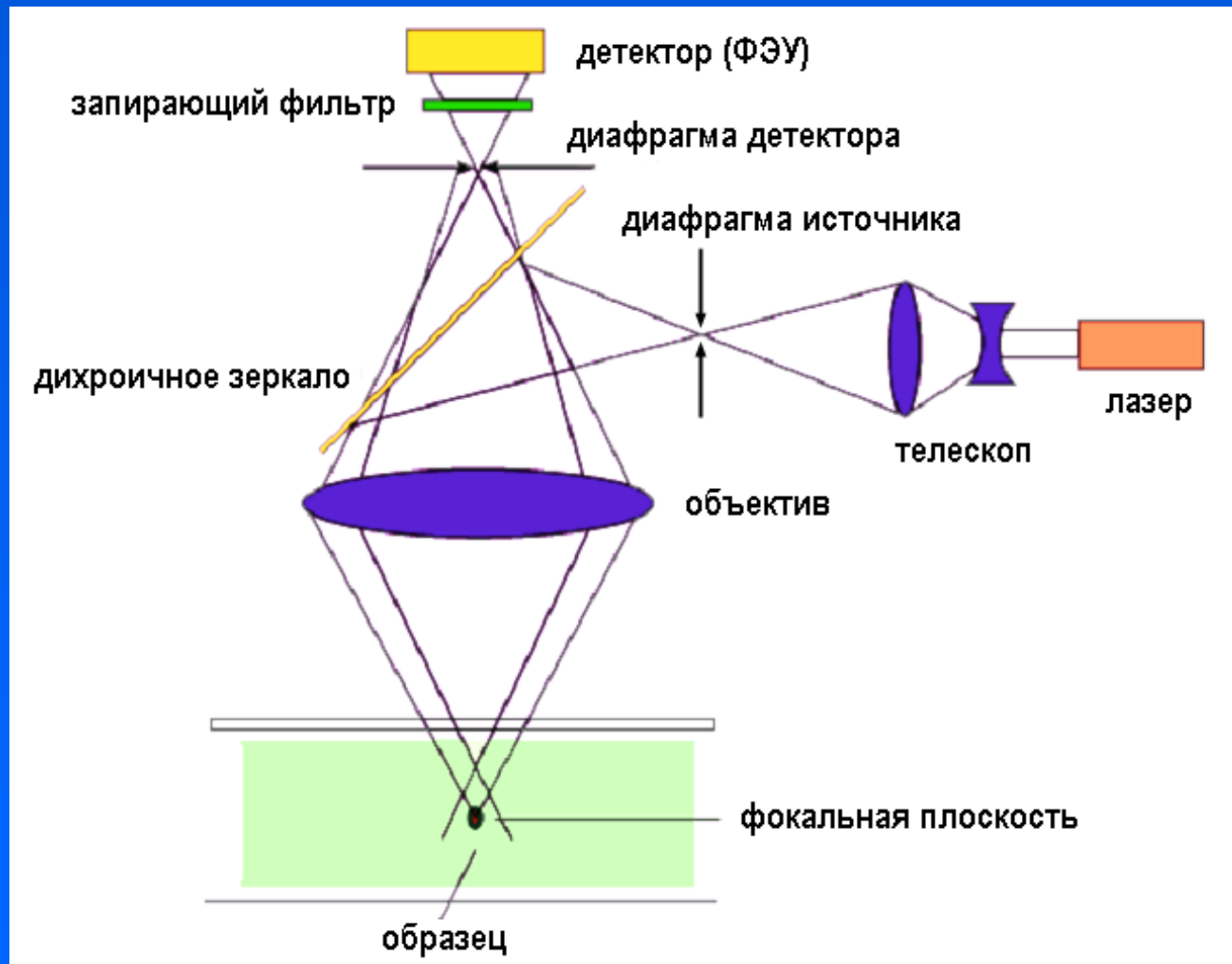
# Конфокальный эффект

Интенсивность света от расположенных вне фокуса областей препарата быстро снижается, и они дают незначительный вклад в формирование изображения – получается почти идеальный оптический срез.

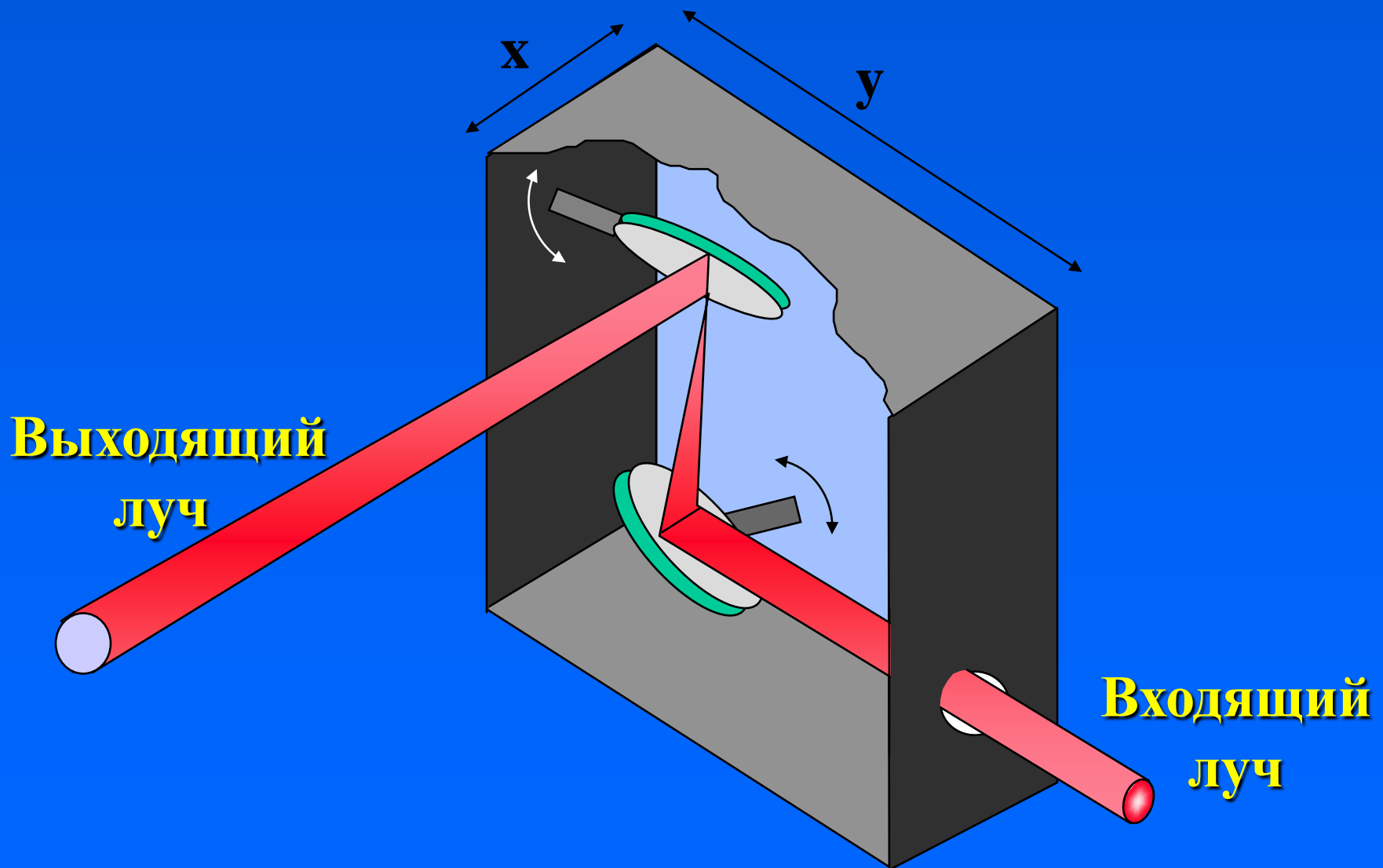
Для достижения конфокального эффекта большая часть света, падающего на детектор, отсекается диафрагмой, поэтому яркость изображения снижается.

Наилучший эффект должен достигаться при сканировании препарата относительно неподвижного пучка, но практически это крайне неудобно, и сканирование производится качающимся лучом или с помощью диска Нипкова.

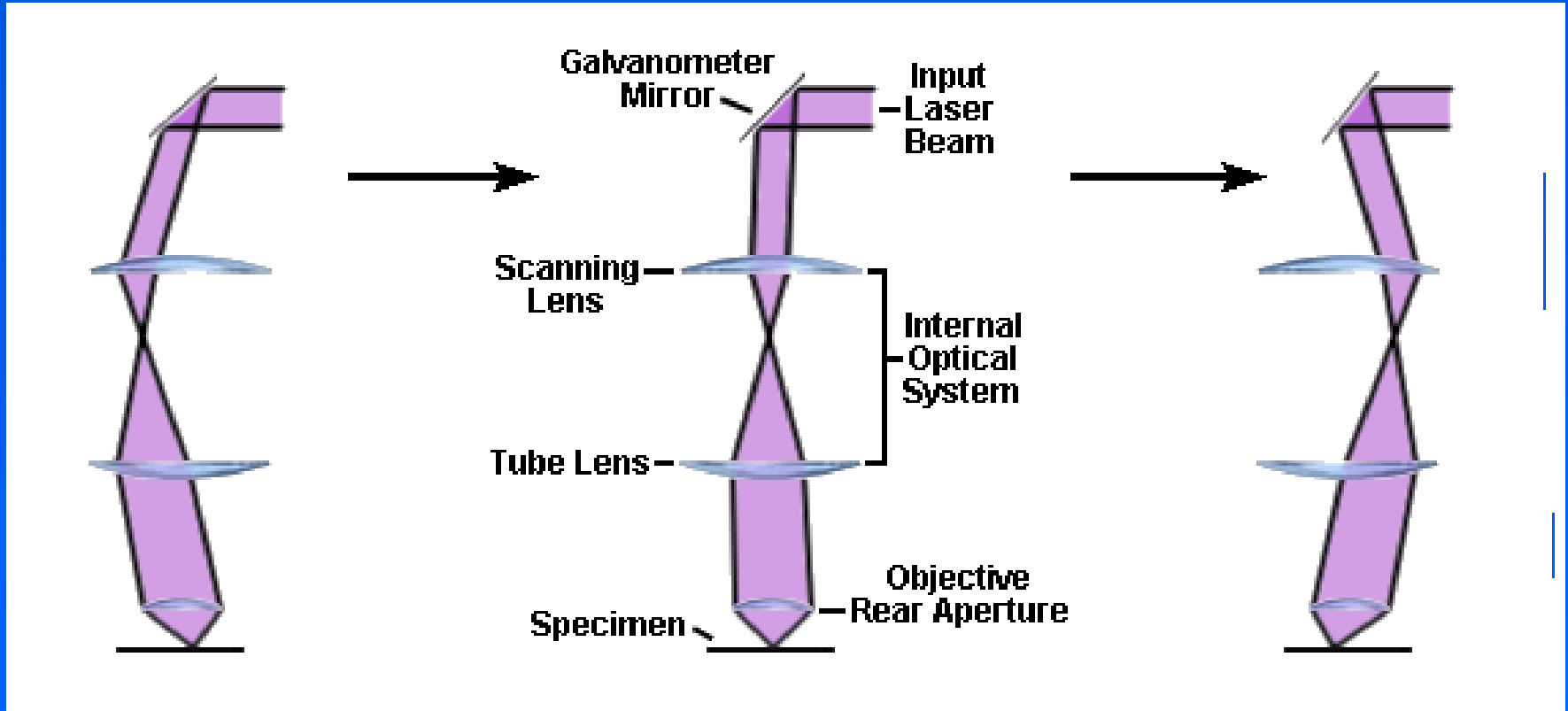
# Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп (схема)



# Блок развертки (качающиеся зеркала)



# Развертка луча (сканирование)



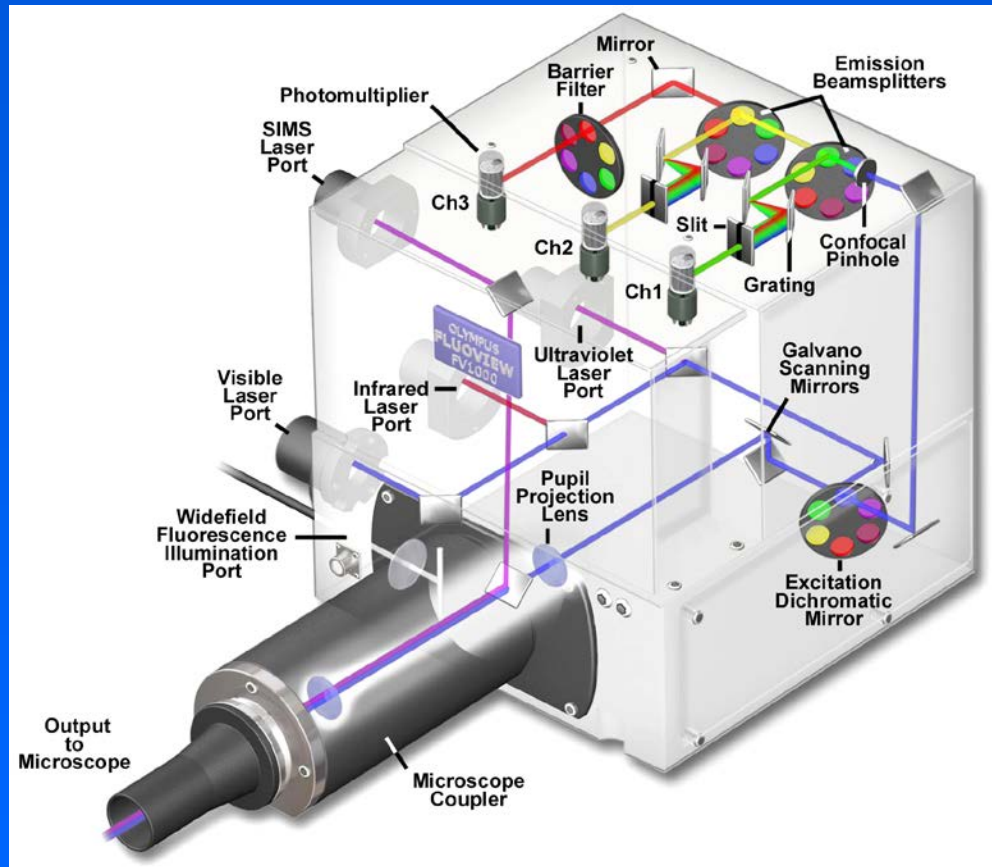
**Качающиеся зеркала обеспечивают поточечное сканирование препарата лазерным лучом, сфокусированным через объектив микроскопа.**

# MRC-1024 сканирующая голова





# Конфокальный блок устаревшего микроскопа

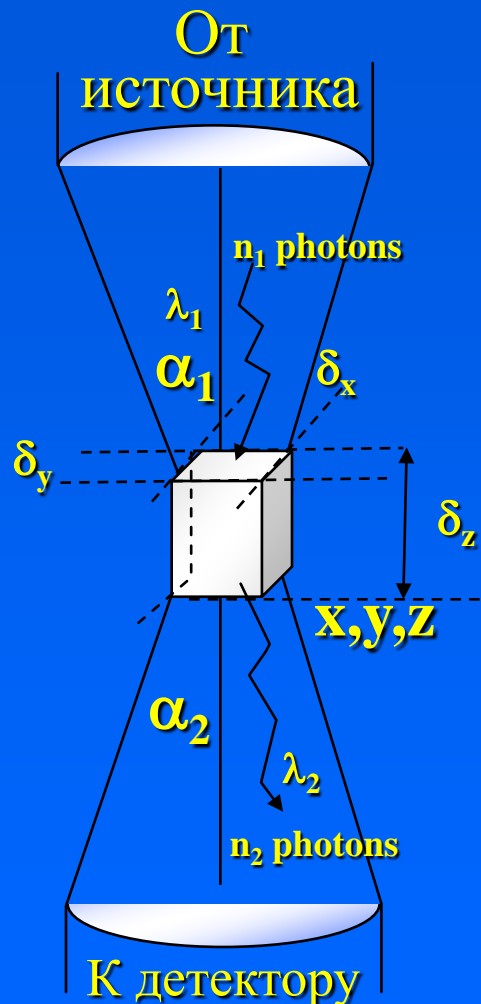


Система включает несколько лазеров и детекторов, переключение осуществляется с помощью колес со светофильтрами.

# Физические ограничения в конфокальной микроскопии

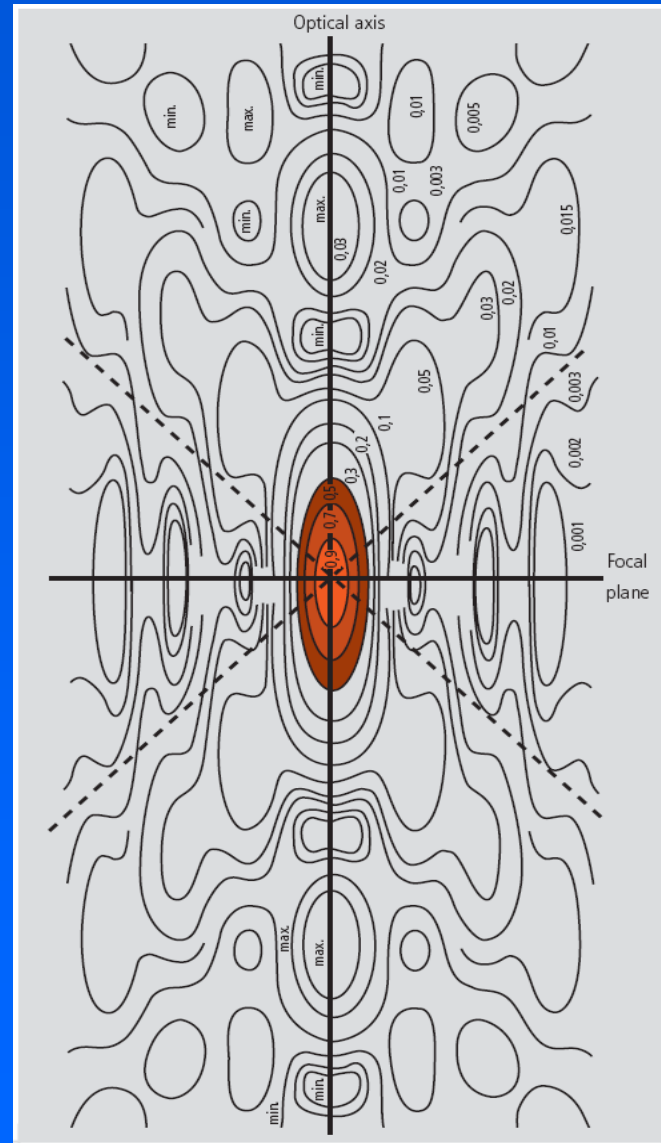
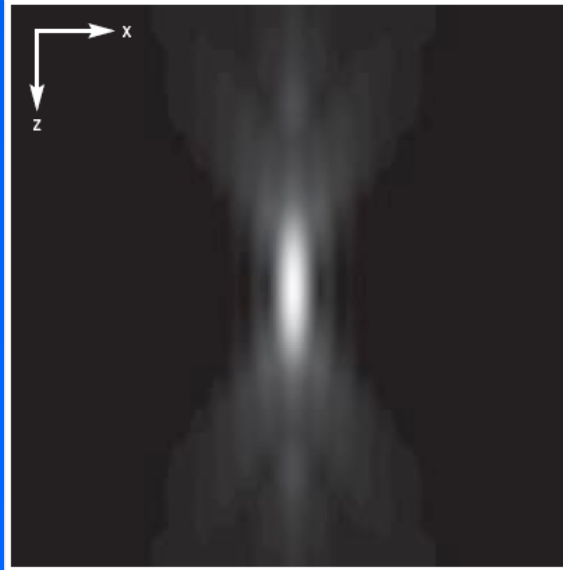
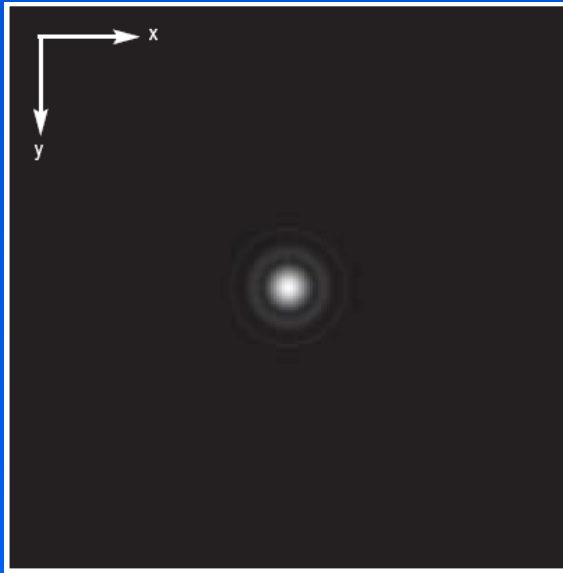
ПИКСЕЛ – X,Y

ВОКСЕЛ – X,Y,Z

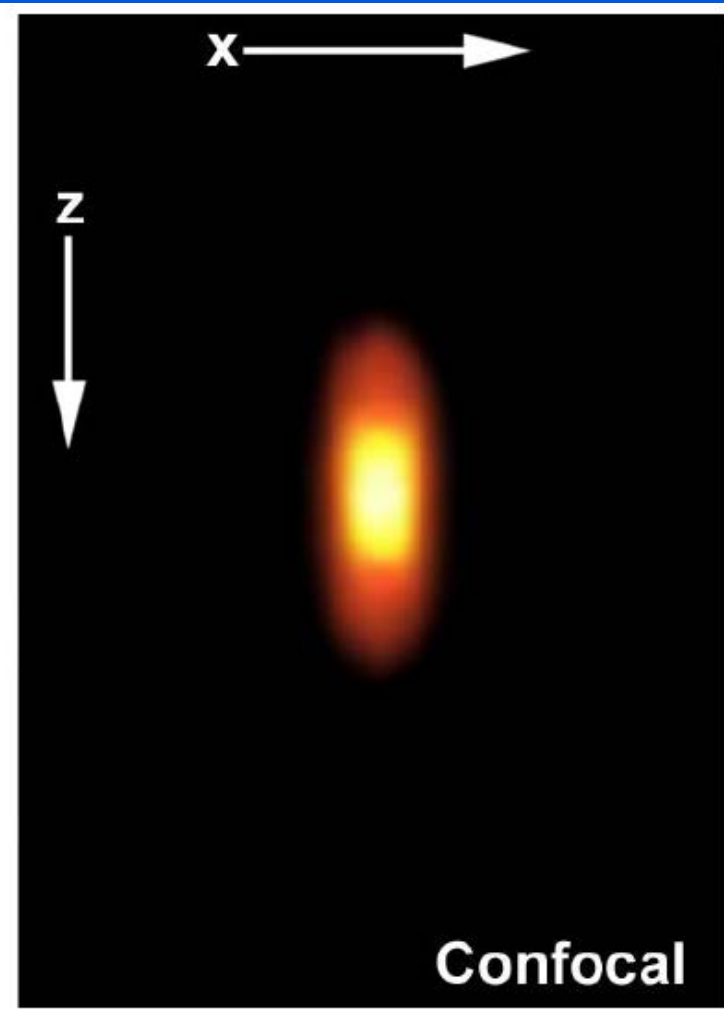
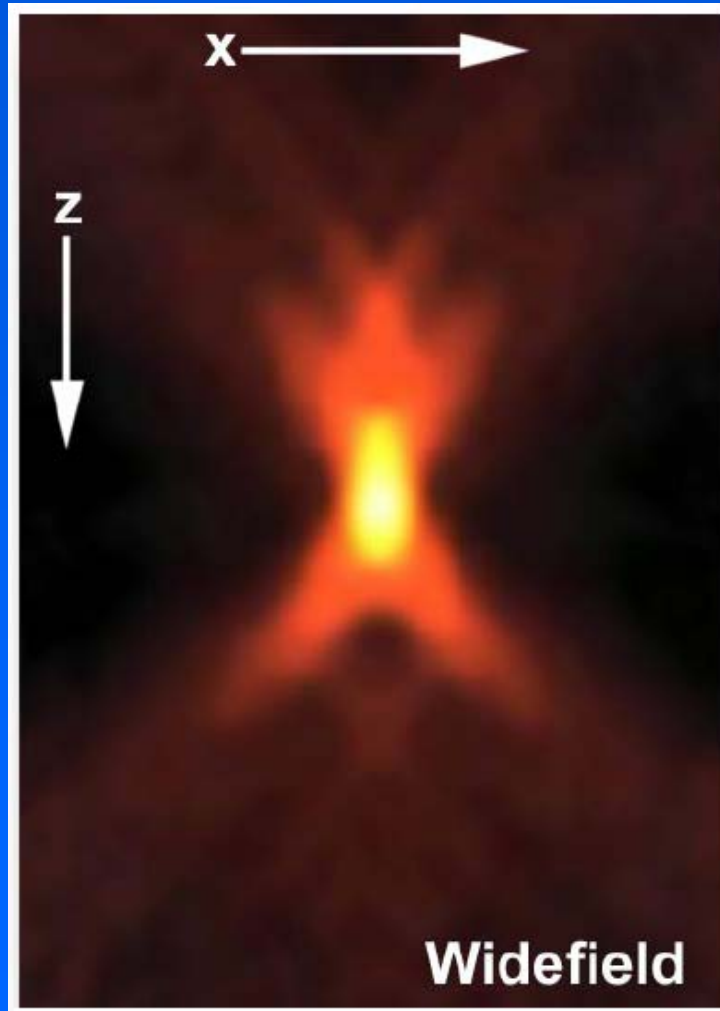


Минимальный размер воксела ограничен дифракционным пределом ( $\delta_x, \delta_y, \delta_z$ )

# Интенсивность света в перетяжке



# Перетяжка в обычной и конфокальной микроскопии

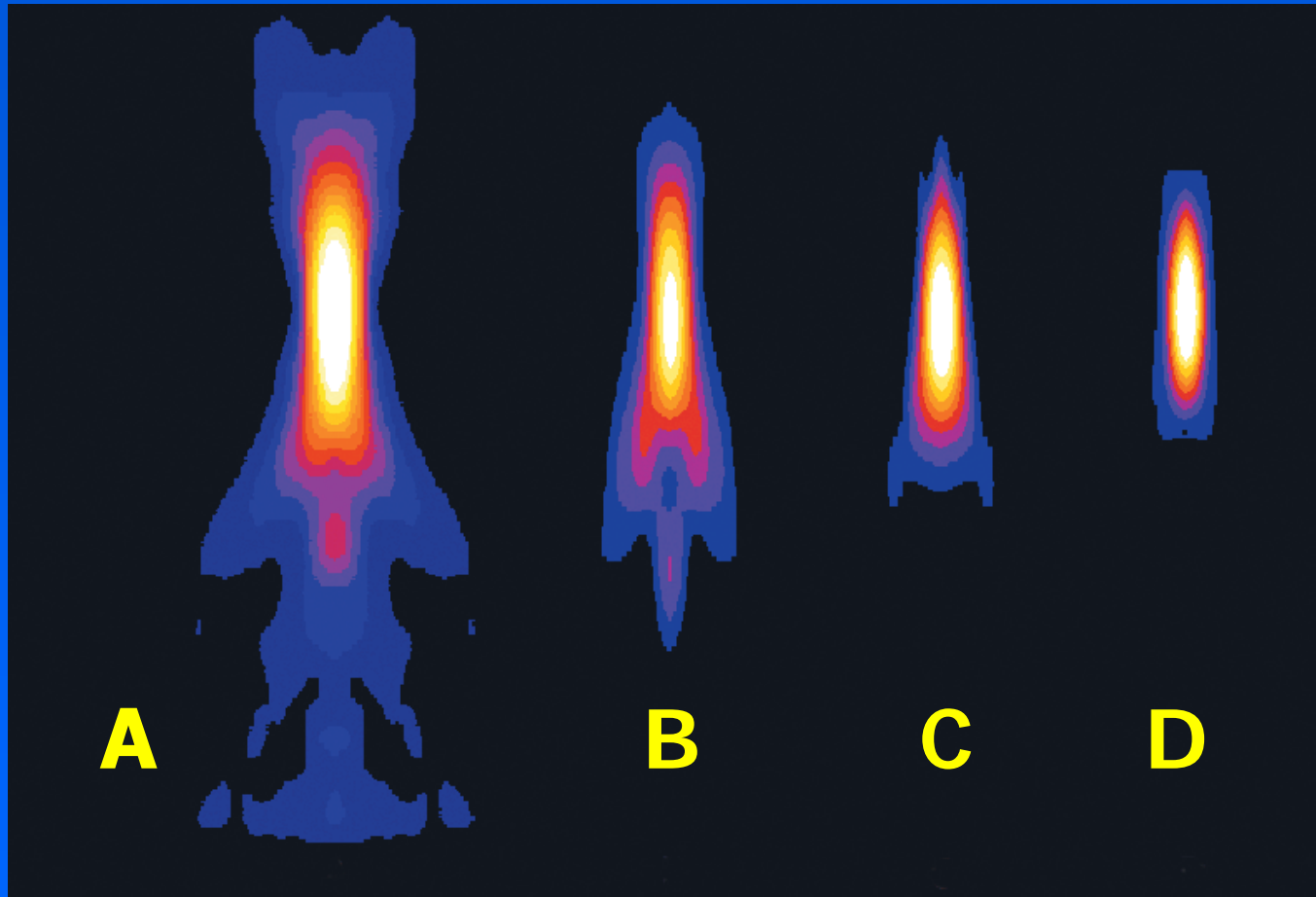


# Зависимость конфокального эффекта от размера диафрагмы



Размер диафрагмы детектора измеряется в диаметрах первого минимума диска Эри (AU – Airy units), то есть зависит от апертуры объектива.

# Перетяжка в конфокальной микроскопии

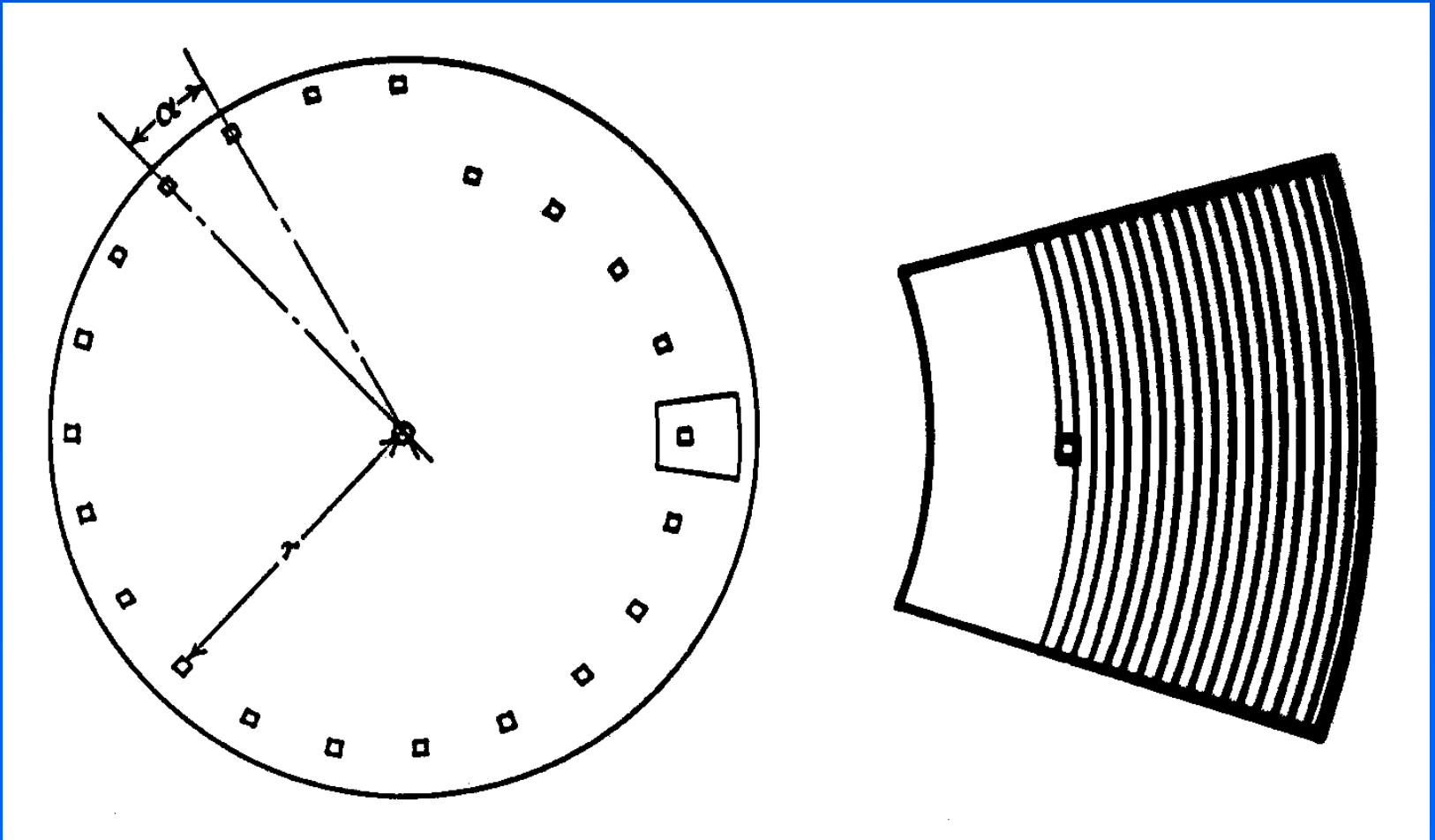


A – широкое поле, B – 4,3 диска; C – 2,5 диска; D – 0,7 диска Эри

# Варианты конфокальных систем

1. Лазерный сканирующий микроскоп (переменные диафрагмы, изображение только электронное)
2. Тандемный микроскоп с диском Нипкова (постоянные диафрагмы, изображение реальное)
3. Лазерный сканирующий микроскоп со сканированием в линии (одна диафрагма постоянная, конфокальный микроскоп реального времени)

# Диск Нипкова



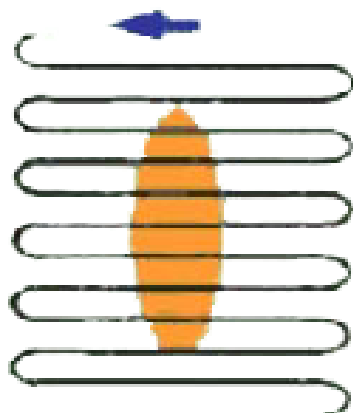
Отверстия в диске расположены по спирали и на равном угловом расстоянии ( $a$ ) друг от друга. На диске может быть несколько параллельных спиралей.



# Конфокальные системы

Сканирование  
лазерным пучком  
(развертка)

направление  
сканирования

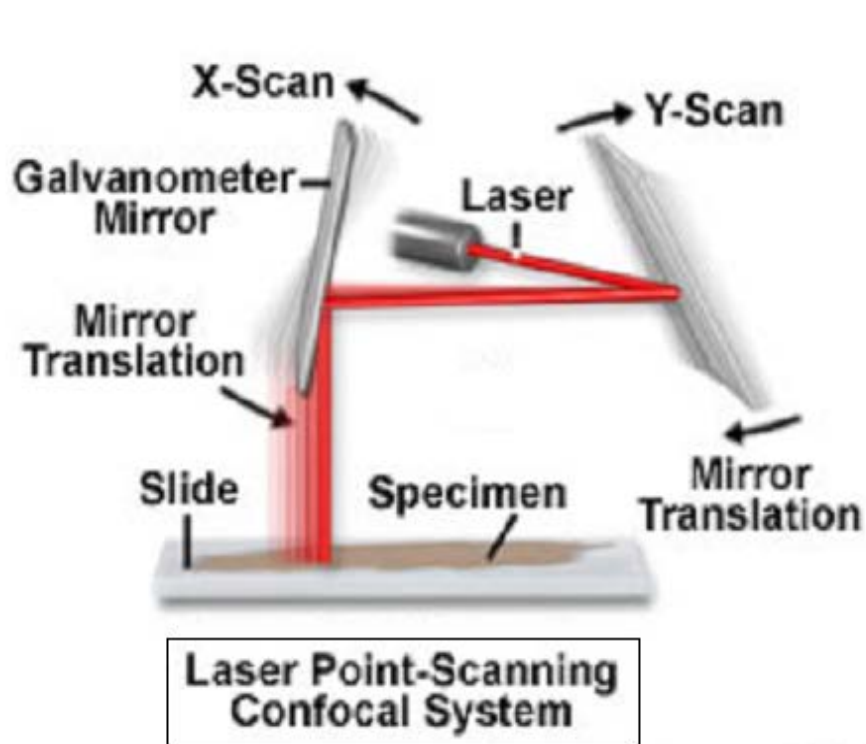


Вращающийся диск Нипкова  
с конфокальными парами  
диафрагм

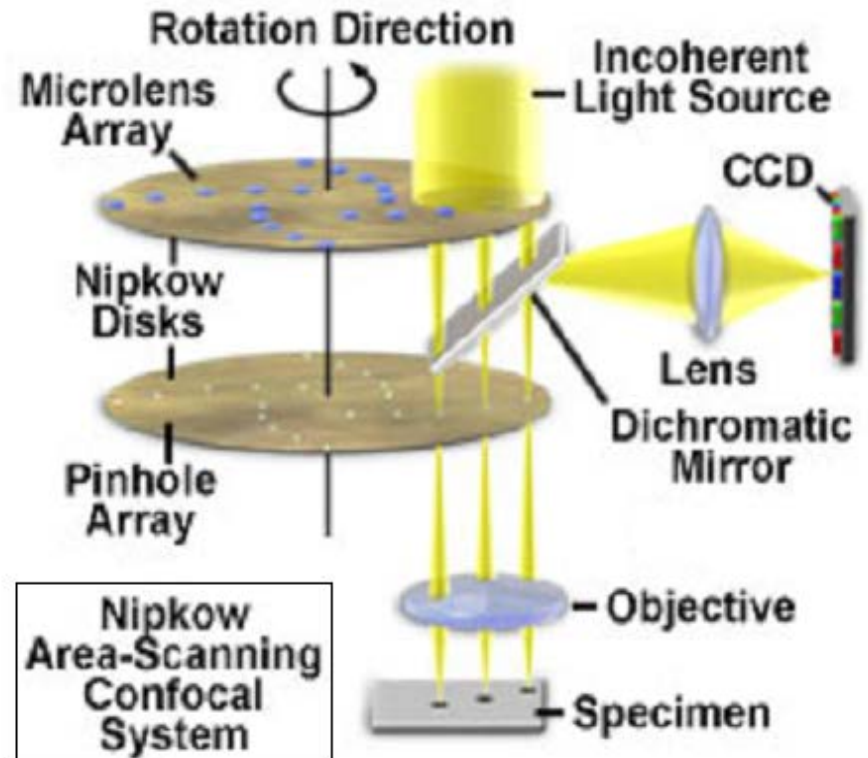
направление  
вращения



# Конфокальные системы



Сканирующая



С диском Нипкова

# Детекторы

В лазерном сканирующем микроскопе – фотоэлектронный умножитель (ФЭУ).

ФЭУ позволяет регулировать усиление, но имеет квантовый выход не более 20% в районе 500 нм и низкий квантовый выход для красного света (>600 нм).

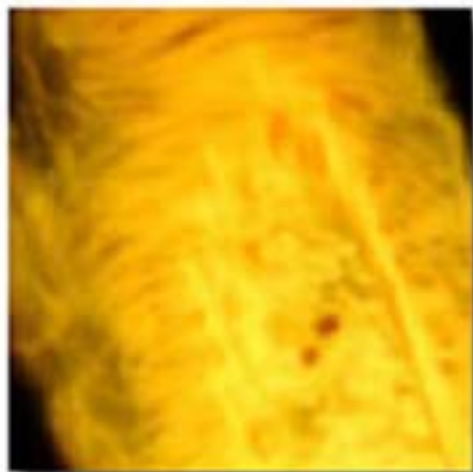
В микроскопе с диском Нипкова – охлаждаемая ПЗС камера.

Имеет высокий квантовый выход (60-90%) в широком диапазоне (500-800 нм), но относительно низкий квантовый выход (около 30%) в синем свете (450 нм).

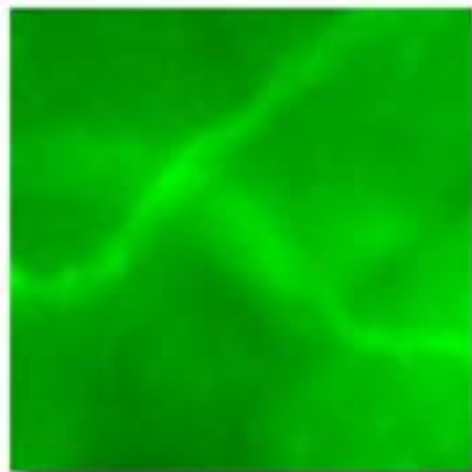
# Сравнение конфокальных систем

- Лазерная сканирующая микроскопия – регулируемый конфокальный эффект, но низкая чувствительность; увеличение может изменяться за счет шага сканирования без смены объектива; простое управление обесцвечиванием (FRAP, FLIP). Время получения изображения составляет секунды-десятки секунд.
- С диском Нипкова – фиксированный конфокальный эффект (диаметр диафрагмы примерно равен дискуау Эри для объектива  $\times 60$ ); изображение в реальном времени; большая чувствительность в желто-красной области. Время получения изображения зависит только от камеры.

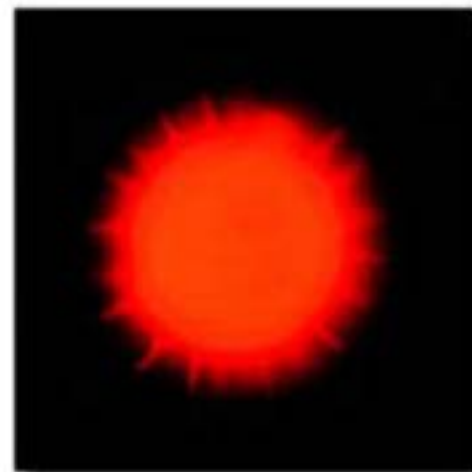
# Широкопольная и конфокальная микроскопия (толстые препараты)



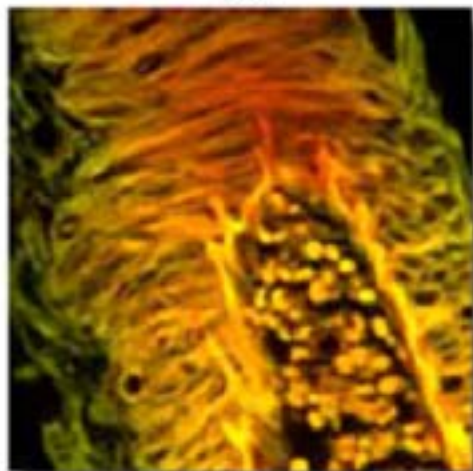
(a)



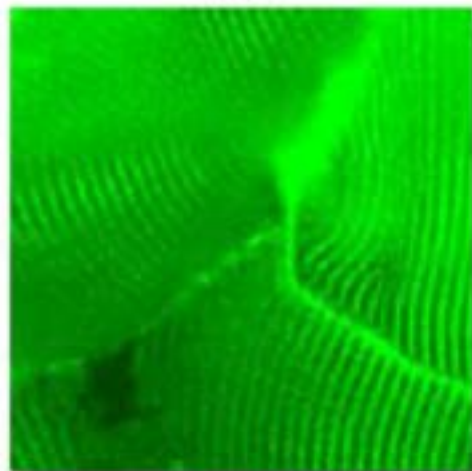
(b)



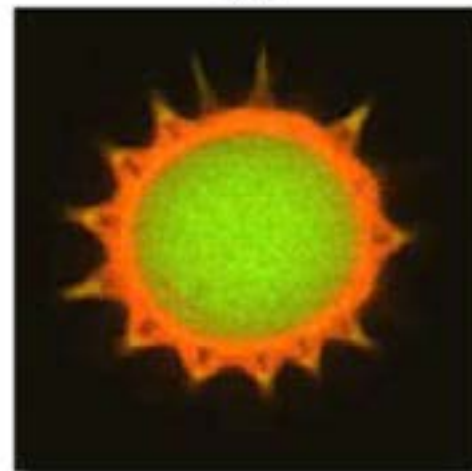
(c)



(d)

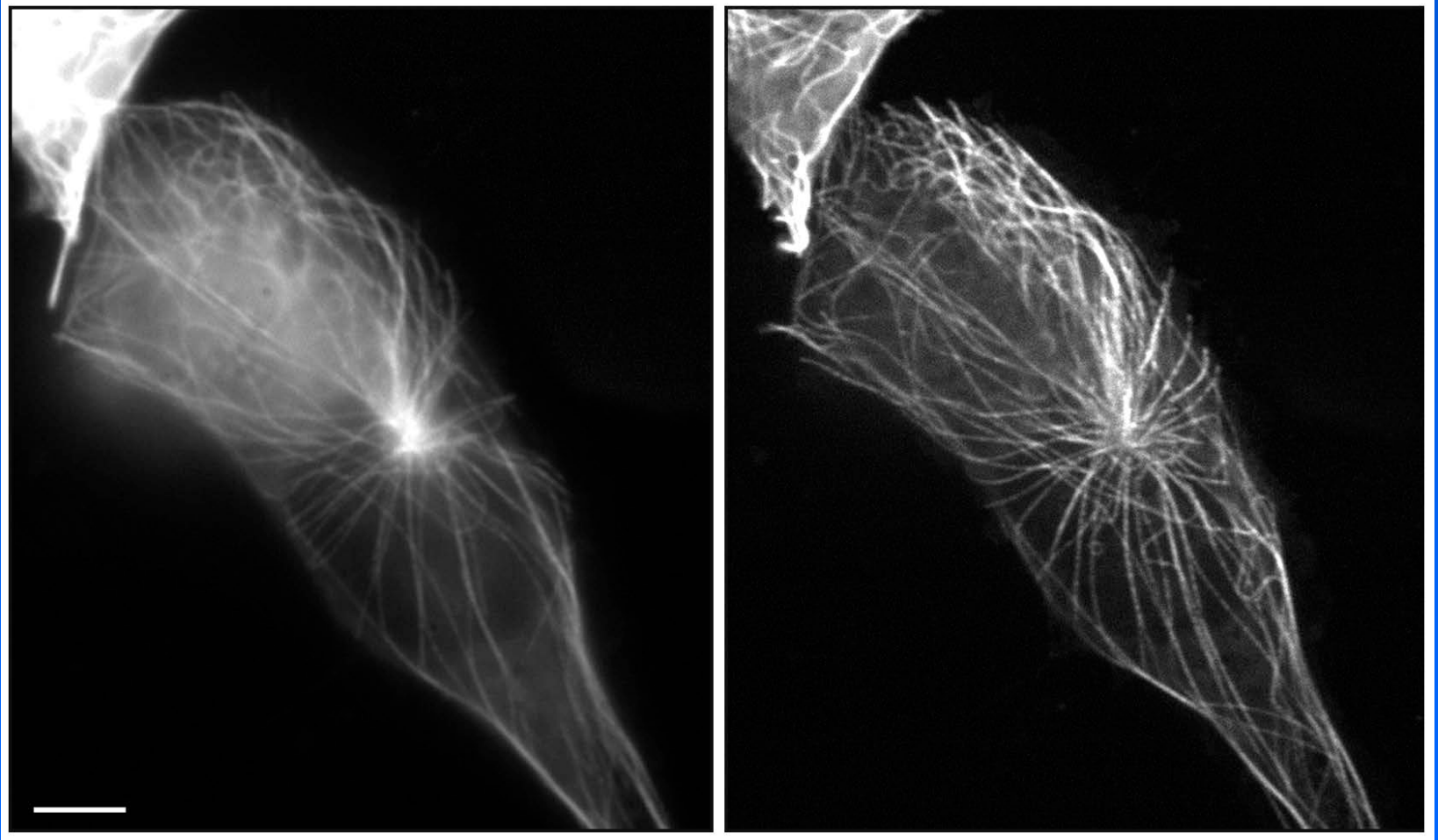


(e)



(f)

# Широкопольная и конфокальная микроскопия (тонкий препарат)



Микротрубочки в живой клетке. Слева - обычная флюоресцентная микроскопия; справа - конфокальная система с диском Нипкова.

# Параметры, определяющие качество изображения

1. Отношение сигнал/шум.
2. Настройки микроскопа (юстировка лазерного пучка, установка конфокальной диафрагмы, установка мощности лазера).
3. Скорость сканирования (время экспозиции точки при растровой микроскопии).
4. Точность работы сканнера.
5. Фотообесцвечивание.
6. Затекание сигнала из соседних каналов.
7. Автофлуоресценция препарата.
8. Сферическая абберация для толстых препаратов.

# Оценка скорости сканирования

Максимальное количество фотонов от одной молекулы  $F_{max}$  :

$$F_{max} = S \cdot Q_e \cdot I_{нас} \cdot \Delta t \text{ [фотонов]}, \text{ где}$$

$S$  – площадь эффективного сечения молекулы;

$Q_e$  – квантовый выход при данной длине волны возбуждающего света;

$I_{нас}$  – максимальная интенсивность потока возбуждающего света

$\Delta t$  – время освещения одного воксела ( $\sim 10^{-6}$  с)

Количество собранного света уменьшается пропорционально квадрату апертуры объектива и степени закрытия диафрагмы перед детектором.

При сканировании с максимально закрытыми диафрагмами мощность лазера должна быть близка к насыщающей, и время записи одного воксела должно быть достаточно велико.



# Лазеры для конфокальной микроскопии

Газовые лазеры – аргоновый (488, 514,5 нм и др.), гелий неоновые (541, 633 нм).

Недостаток – ограниченное время жизни (5000 часов и менее) маломощных лазеров.

Диодные лазеры – индивидуальные длины волн. Время жизни зависит от мощности. Оптимальная мощность составляет более 50 мВт.

Для ограничения мощности лазерного пучка применяется либо управление мощностью с помощью регулируемых акусто-оптических затворов, либо светофильтры.