

Optische Instrumente: Mikroskop - OIN

Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München – Grundpraktikum für Humanmediziner
(20. MÄRZ 2021)

MOTIVATION UND VERSUCHSZIELE

Das Mikroskop hat die Aufgabe, sehr kleine, mit dem Auge allein nicht mehr wahrnehmbare Objekte der visuellen Beobachtung zugänglich zu machen. Die Einführung mikroskopischer Methoden hat zu zahlreichen grundlegenden Entdeckungen auf dem Gebiet der Medizin geführt. Die meisten histologischen Schnitte sind sog. Amplitudenobjekte, d.h. das Licht, das den Schnitt durchdringt, wird dabei an verschiedenen Objektstellen unterschiedlich stark geschwächt. Wir erhalten so mikroskopische Bilder mit Hell-Dunkel-Kontrast (**Hellfeldmikroskopie**).

Der vorliegende Versuch soll eine Einführung in die Funktionsweise des Mikroskops geben und es Ihnen ermöglichen, später seine Qualität zu beurteilen. Die optischen Grundlagen werden im Versuch LIN behandelt.

Die Leistungsfähigkeit eines im sichtbaren Bereich arbeitenden Mikroskops ist jedoch durch die Wellennatur des Lichts begrenzt. Kennzeichnend sind die Begriffe **Vergrößerung** und **Auflösungsvermögen**. Der erstgenannte ist intuitiv leicht verständlich. Das Auflösungsvermögen drückt die Eigenschaften Schärfe und Kontrastreichtum bzw. Detailerkennungsvermögen quantitativ messbar aus. Ein billiges Kaufhausmikroskop mag sehr wohl hohe Vergrößerungen erlauben ($600\times$ und mehr). Jedoch stellt man meist fest, dass es keine scharfe, „gute“ Abbildung mehr liefert. Die Bilder werden im höheren Vergrößerungsbereich neblig und flau, d.h., das Auflösungsvermögen des Geräts ist schlecht. Sie werden beim vorliegenden Versuch sehen, dass hohe Vergrößerungen mühelos zu erreichen sind. Ein gutes Auflösungsvermögen dagegen ist „teuer“!

Contents

I. Teilversuche	2
II. Physikalische Grundlagen	2
II.1. Begriffe und Definitionen	2
II.2. Lupe	2
II.3. Mikroskopvergrößerung	3
II.4. Das Auflösungsvermögen des Mikroskops nach Abbe	3
1. Beugung	3
2. Auflösungsvermögen	5
3. Sinnvolle Vergrößerung	6
III. Versuchsaufbau und Geräte	7
III.1. Zubehör	7
III.2. Versuchsaufbau	7
1. Mikroskop	7
2. Apparatur zur Messung von Beugung	7
IV. Versuchsdurchführung	7
IV.1. Direkte visuelle Bestimmung der Mikroskopvergrößerung	7
1. Kurzbeschreibung	7
2. Messgrößen und Durchführung	7
IV.2. Bestimmung der Wellenlänge eines Lasers mittels eines Beugungsgitters	9
1. Kurzbeschreibung	9
2. Messgrößen und Durchführung	9
IV.3. Nachweis der Auflösungsgrenze des Mikroskops	9
1. Kurzbeschreibung	9
2. Messgrößen und Durchführung	10
V. Auswertung	11
V.1. Direkte visuelle Bestimmung der Mikroskopvergrößerung	11
V.2. Bestimmung der Wellenlänge eines Lasers mittels eines Beugungsgitters	11
V.3. Nachweis der Auflösungsgrenze des Mikroskops	11
VI. Ausblick	11

I. TEILVERSUCHE

1. Direkte visuelle Bestimmung der Mikroskopvergrößerung
2. Bestimmung der Wellenlänge eines Lasers mittels eines Beugungsgitters
3. Nachweis der Auflösungsgrenze des Mikroskops

II. PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN

Die physikalischen Grundlagen bauen an verschiedenen Stellen auf die des Versuchs LIN auf. Dies gilt insbesondere für die Optik von Linsen. Bitte ziehen Sie bei Unklarheiten die Anleitung des LIN-Versuchs, insbesondere die dortigen Kapitel II.4 bis II.6 und II.8, zu Rate.

II.1. Begriffe und Definitionen

Die einfachste Art, einen Gegenstand zu „vergrößern“, besteht darin, ihn näher an das Auge heranzuführen, wodurch das Bild auf der Netzhaut größer wird (vgl. Abb. 1). Für das Auge entscheidend ist daher der **Sehwinkel** σ und die **scheinbare Objektgröße** $\tan \sigma$, vgl. Abb. 1.

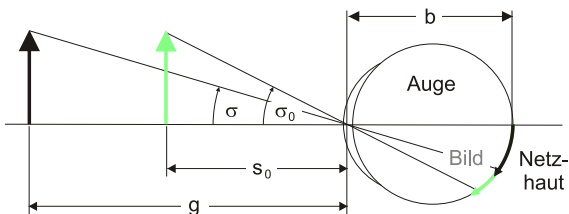


Abb. 1: Zusammenhang zwischen Bildgröße und Sehwinkel

Die Gegenstandsgröße selbst tritt nicht auf. Ein Fernrohr „vergrößert den Mond“ natürlich nicht. Es vergrößert den Sehwinkel, unter dem uns der Mond im Vergleich zum unbewaffneten Auge erscheint. Als Vergrößerung eines Instruments bezeichnet man das Verhältnis

$$v = \frac{\text{scheinb. Objektgröße mit Instrument}}{\text{scheinb. Objektgröße ohne Instrument}}$$

Bei Gegenständen in unserer „greifbaren“ Umgebung bezieht man den Begriff Vergrößerung immer auf den Sehwinkel σ_0 bzw. die scheinbare Objektgröße $\tan \sigma_0$ ohne Instrument. Das Objekt wird dabei im Abstand der **konventionellen Sehweite** s_0 betrachtet. Die konventionelle Sehweite ist definitionsgemäß auf 25 cm festgelegt. Drückt man die Vergrößerung durch die Winkel aus, unter denen das Objekt jeweils erscheint (vgl. Abb. 1), erhält man

$$v = \frac{\tan \sigma}{\tan \sigma_0} \tag{1}$$

Um greifbare Gegenstände „sehr stark“ zu vergrößern, müsste man sie „sehr nahe“ an das Auge heranbringen. Das geht nur, wenn man die Brechkraft des „Systems Auge“ hilfreich unterstützt. In einem ersten Schritt benutzt man dabei die Lupe.

II.2. Lupe

In der Regel handelt es sich bei einer Lupe nur um eine einfache Sammellinse mit wenigen, typischerweise 10 Zentimetern Brennweite.

Der Strahlengang ist in Abb. 2 für den Fall angegeben, dass sich das Objekt knapp innerhalb des Abstands der Lupenbrennweite f befindet. Die rückwärtige, gestrichelte

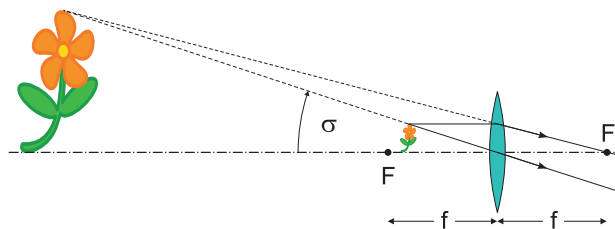


Abb. 2: Einfluß des Abstands zwischen Lupe und Gegenstand auf die Größe des virtuellen Bildes

zeichnete Verlängerung der auf das Auge treffenden Strahlen zeigt den Ort an, an dem sich das vergrößerte **virtuelle Bild** des Gegenstands befindet. Es wird so bezeichnet, weil auf einem Schirm (Photoplatte) an dieser Stelle kein wirkliches (reelles) Bild erscheinen würde. Auch unser „Bild“ im Spiegel an der Badezimmerwand ist virtuell. Rückt man den Gegenstand genau in den Brennpunkt (Abb. 3), so verlagert sich der Schnittpunkt der rückwärtigen Strahlenverlängerungen und damit der Ort des virtuellen Bildes ins Unendliche. Es entsteht ein unendlich großes virtuelles Bild, das un-

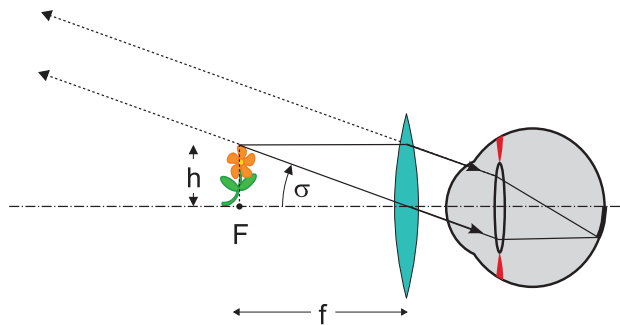


Abb. 3: Lupe (Gegenstandsweite = Brennweite. Das virtuelle Bild rückt ins Unendliche.)

endlich weit entfernt ist. Das Auge merkt von alledem

aber nicht viel, denn der Sehwinkel σ bleibt fast unverändert. Das Auge kann lediglich „entspannter“ wie „weit über das Meer“ schauen. Fernrohre und Mikroskope bestehen aus mehreren Linsen. Als Okular bezeichnet man die Linse direkt am Auge. Das Okular hat reine Lupenfunktion. Stellt man Mikroskope und Fernrohre „scharf“, so stellt man ganz intuitiv den Strahlengang von Abb. 3 hinter dem Okular her. Die Vergrößerung der Lupe ergibt sich aus dem Vergleich mit Abb. 4 zu

$$v = \frac{\tan \sigma}{\tan \sigma_0} = \frac{h/f}{h/s_0} = \frac{s_0 h}{f h} = \frac{s_0}{f}. \quad (2)$$

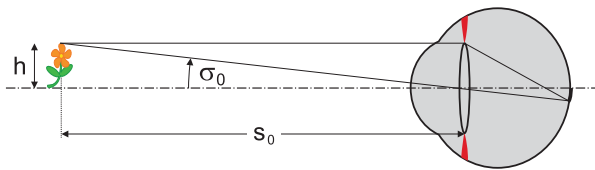


Abb. 4: Konventionelle Sehweite

II.3. Mikroskopvergrößerung

Will man die Lupenvergrößerung steigern, so muss man f gemäß Gl. 2 kleiner wählen, z.B. bei 25-facher Vergrößerung schon $f = 1$ cm. Der zu betrachtende Gegenstand gemäß Abb. 3 befindet sich dann aber auch in 1 cm Abstand hinter der Lupe und das Auge knapp auf der anderen Seite. In der Praxis ist das unbequem und die sich zunehmend bemerkbar machenden Linsenfehler (sphärische und chromatische Aberration, vgl. Versuch LIN) sind störend. Bei höheren Vergrößerungen verwendet man deswegen zusammengesetzte Linsensysteme wie das Mikroskop. Es besteht aus zwei Linsen, dem Objektiv und dem Okular. Mit Hilfe des sehr kurz-brennweitigen Objektivs erhält man zunächst ein reelles, vergrößertes Bild des Gegenstands. Dieses wiederum bringt man in die Brennebene einer „Lupe“ (=Okular), mit deren Hilfe man das reelle **Zwischenbild** nochmals vergrößert betrachtet, vgl. Abb. 5.

Mikroskopobjektivbrennweiten liegen im Millimeterbereich, die Okularbrennweiten im Zentimeterbereich. Man benutzt statt der einfachen Linsen in der Praxis (z.B. auch bei Fotoapparaten) Linsensysteme, um die schon erwähnten Linsenfehler zu reduzieren und die Abbildungsqualität zu verbessern. Das reelle Bild des Gegenstands (des Objekts) erscheint vergrößert, wenn er wie in Abb.5 zwischen der einfachen und doppelten Brennweite (f_1) des Objektivs liegt. f_2 ist die Brennweite des Okulars. Der Abstand der beiden einander zugekehrten Brennpunkte von Objektiv und Okular im Mikroskoptubus wird als **optische Tubuslänge** t bezeichnet. In Abb. 6 ist das zur Herleitung der Formel für die Vergrößerung des Mikroskops Wesentliche schematisch wiedergegeben. Zunächst gilt im Dreieck Δ_3

$$\tan \sigma_2 = \frac{H}{f_2}. \quad (3)$$

Aus der Ähnlichkeit der Dreiecke Δ_1 und Δ_2 folgt

$$\frac{H}{h} = \frac{t}{f_1}, \text{ so dass } \tan \sigma_2 = \frac{h t}{f_1 f_2} \quad (4)$$

wird, wenn man die Größe H in Gl. (3) einsetzt. Betrachtet man den kleinen Gegenstand andererseits in 25 cm Entfernung mit bloßem Auge, so gilt gemäß Abb. 4

$$\tan \sigma_0 = \frac{h}{s_0}. \quad (5)$$

Definitionsgemäß erhält man damit für die Gesamtvergrößerung des Mikroskops

$$v = \frac{\tan \sigma_2}{\tan \sigma_0} = \frac{h t}{f_1 f_2} / \frac{h}{s_0} = \frac{h t s_0}{f_1 f_2 h} \quad (6)$$

oder gekürzt

$$v = \frac{s_0}{f_2} \frac{t}{f_1}. \quad (7)$$

Der Faktor s_0/f_2 repräsentiert nach Gl. (2) den Anteil der Lupenvergrößerung des Okulars an der Gesamtvergrößerung des Mikroskops. Der zweite Faktor t/f_1 gibt die Vergrößerung bzw. den Abbildungsmaßstab des Objektivs an (Gl. 4)). Schreibt man die Objektiv- und Okularvergrößerung als

$$v_1 = \frac{t}{f_1} \text{ bzw. } v_2 = \frac{s_0}{f_2}, \quad (8)$$

so lässt sich die Gesamtvergrößerung des Mikroskops v als Produkt von Objektiv- und Okularvergrößerung auffassen:

$$v = v_1 \cdot v_2 \quad (9)$$

II.4. Das Auflösungsvermögen des Mikroskops nach Abbe

Um den Begriff des Auflösungsvermögens richtig zu verstehen, muss zunächst das Phänomen der Beugung geklärt werden.

1. Beugung

Beugung von Licht tritt immer dann auf, wenn Hindernisse die ungestörte Ausbreitung des Lichts beeinträchtigen – also an kleinen Objekten oder kleinen Öffnungen wie Spalte und Blenden. Alle beobachteten Beugungsphänomene lassen sich mit Hilfe des *Huygensschen Prinzips* erklären:

Jeder von einer Welle getroffene Punkt im Raum kann als Quelle einer kugelförmigen Elementarwelle gleicher Wellenlänge betrachtet werden.

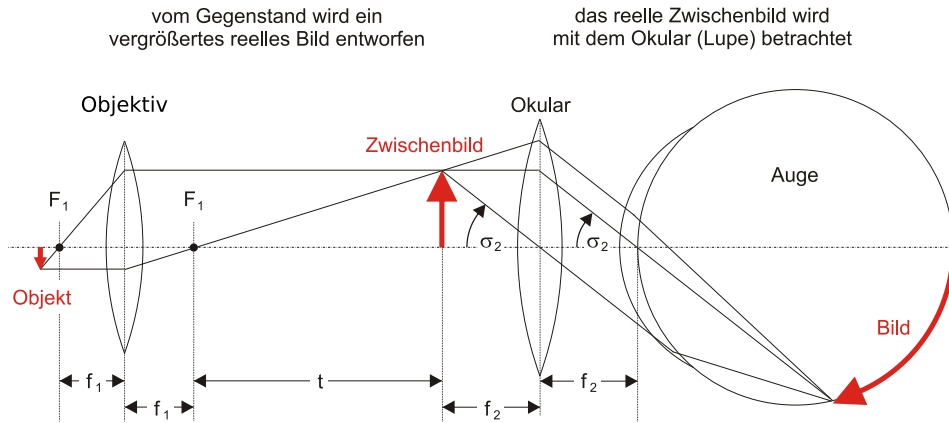


Abb. 5: Abbildung durch das Mikroskop

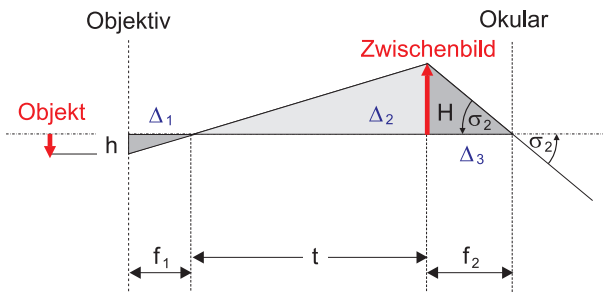


Abb. 6: Schematische Darstellung des Strahlenverlaufs im Mikroskop. Die Dreiecke sind mit Δ_1 bis Δ_3 bezeichnet.

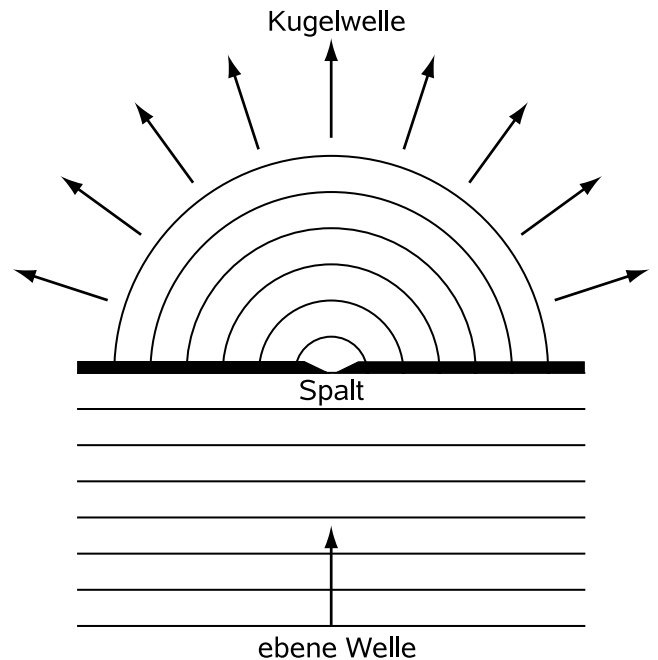


Abb. 7: Zum Huygensschen Prinzip: eine ebene Welle trifft auf einen kleinen Spalt.

Abb. 7 illustriert, wie eine ebene Welle von unten kommend auf eine kleine Öffnung trifft. Der Spalt greift dort gewissermaßen „einen Punkt“ der einfallenden Wellenfront heraus. Hinter der Öffnung breitet sich die Welle konzentrisch aus.

Lässt man die Welle auf einen Doppelspalt mit zwei kleinen Öffnungen im Abstand d fallen, so überlagern sich die beiden kugelförmigen Elementarwellen hinter den Öffnungen. Allgemein bezeichnet man eine solche Überlagerung von beliebig vielen Elementarwellen als *Interferenz*. Die Interferenz am Doppelspalt wird in Abb. 8 veranschaulicht.

Es treten bestimmte Richtungen auf, in denen sich die Elementarwellen zu maximaler Helligkeit verstärken (Beugungsmaxima) und solche, in denen sie sich gegenseitig auslöschen (Beugungsminima). Abb. 8 zeigt das Entstehen der nullten, ersten, und zweiten Beugungsmaxima.

Wie diese zustandekommen, überlegen wir uns im Folgenden.

Die beiden Elementarwellen aus den beiden Spalten verstärken sich, wenn sie mit demselben Schwingungszustand (Phase) aufeinandertreffen. Dies ist notwendig für Beugungsmaxima. Der Gangunterschied für eine vorgegebene Ausbreitungsrichtung ist die Strecke, die eine Elementarwelle mehr zurücklegen muss als die

andere, mit der sie interferiert. Bei Beugungsmaxima muss also der Gangunterschied beider Elementarwellen $0, 1 \cdot \lambda, 2 \cdot \lambda \dots$ sein. In Abb. 9 ist dies für $1 \cdot \lambda$ dargestellt. Hierzu wurden an die entsprechenden Wellenfronten der Elementarwellen gemeinsame Tangenten gelegt. Sie beschreiben die Wellenfronten der Interferenzwelle und stehen damit senkrecht auf ihrer Ausbreitungsrichtung. Sie weisen paarweise einen *Gangunterschied* von einer Wellenlänge λ auf. In Richtung des Winkels ϕ_1 hat man also das 1. Beugungsmaximum. Betrachtet man das rechtwinklige Dreieck mit der Hypotenuse d und der Gegenkathete λ , so erhält man als Bedingung für das 1. Beugungsmaximum:

$$\sin \phi_1 = \frac{1 \cdot \lambda}{d} . \tag{10}$$

Für den Gangunterschied $2 \cdot \lambda$ gilt dann analog

$$\sin \phi_2 = \frac{2 \cdot \lambda}{d} , \tag{11}$$

was der Ausbreitungsrichtung für das zweite Beugungsmaximum entspricht. Allgemein folgt für die Ausbreitungsrichtung des k -ten Maximums:

$$\sin \phi_k = \frac{k \cdot \lambda}{d} \quad \text{mit } k = 0, 1, 2, 3, \dots \tag{12}$$

Man kann einen Doppelspalt als Spezialfall eines *optischen Gitters* betrachten. Beim Gitter ist eine große Zahl von parallelen Spalten jeweils im Abstand d (= *Gitterkonstante*) angeordnet. Auch für Gitter gilt Gl. 12. Da man die Gitterkonstante herkömmlicher optischer Gitter z.B. mit einem Okularmikrometer ausmessen kann, lassen sich Lichtwellenlängen durch Beugungsversuche am Gitter direkt bestimmen.

2. Auflösungsvermögen

Entscheidend für die Bildschärfe im Mikroskop ist der kleinste Abstand d_{\min} zweier paralleler Linien, die gerade noch getrennt werden können und nicht zu einer einzigen, breiteren verschmieren. Den reziproken Wert dieser Größe bezeichnet man als **Auflösungsvermögen**,

$$\mu = \frac{1}{d_{\min}} , [\mu] = \text{m}^{-1} . \tag{13}$$

Ein größeres Auflösungsvermögen bedeutet also ein besseres Unterscheidungsvermögen zweier paralleler

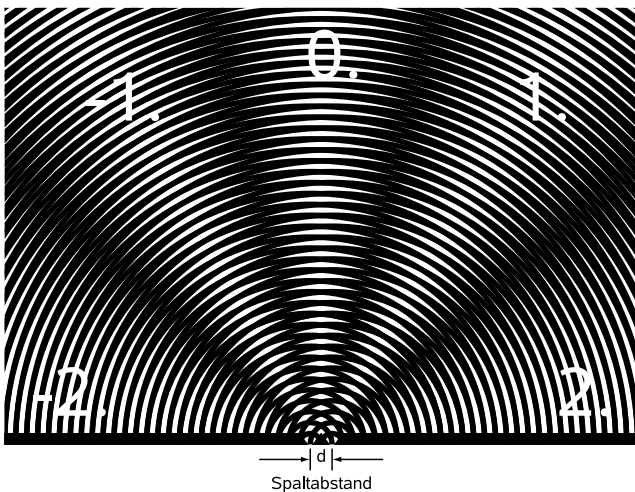


Abb. 8: Veranschaulichung der Beugung am Doppelspalt (Moiré-Muster): die ebene Welle kommt von unten.

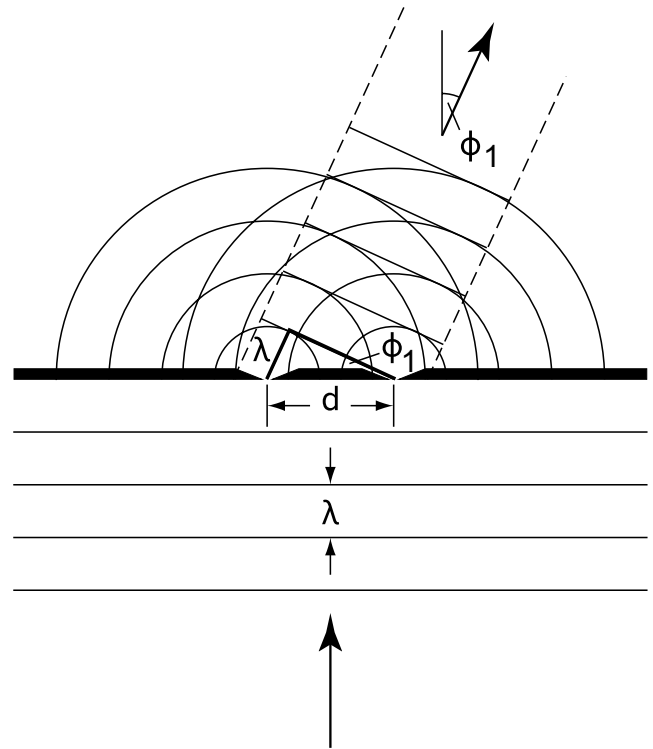


Abb. 9: Ausbreitungsrichtung der 1. Beugungsordnung konstruiert mit Hilfe der Wellenfronten als Tangenten an die Elementarwellen

Linien mit kleinerem Abstand d .

Um die Güte eines Mikroskops zu testen, nimmt man einen engen Doppelspalt oder ein Gitter als Objekt. Der vollständige Strahlengang vom Objektiv bis zur Ebene des reellen Zwischenbildes im Mikroskop ist in Abb. 10 dargestellt.

Die gebeugten ebenen Wellen werden zunächst vom Objektiv in je einem Punkt seiner Brennebene zu einem primären Interferenzbild vereinigt. Die von diesen Punkten ausgehenden Elementarwellen interferieren in der Zwischenbildebene zum sekundären Interferenzbild. Hier sieht man zwei deutliche Hauptmaxima, die die beiden Spalte abbilden. Hätte man nur die 0. Ordnung zur Verfügung, ergäbe sich ein unscharfes Bild, bei dem man die beiden Spalte nicht mehr unterscheiden könnte. Je mehr höhere Ordnungen in die Interferenz eingehen, desto größer und schmaler werden die Hauptmaxima und desto kleiner werden die Nebenmaxima. Das Bild wird also schärfer. Durch die endliche Ausdehnung der Linse können in der Regel höhere Beugungsordnungen nicht mehr erfasst werden (in Abb. 10 bereits ab der zweiten Beugungsordnung).

Soll eine Struktur mit dem Minimalabstand d noch aufgelöst werden, so muss das Objektiv mindestens die Beugungsmaxima 1. Ordnung noch registrieren können. Der Beugungswinkel α der 1. Beugungsordnung entspricht dann gerade dem halben Winkel, unter dem die Frontlinse des Objektivs vom Gegenstand aus erscheint (Öffnungswinkel). Aus Gl. (12) folgt mit $k = 1$ (1. Ordnung) somit für den kleinsten Abstand (Auflö-

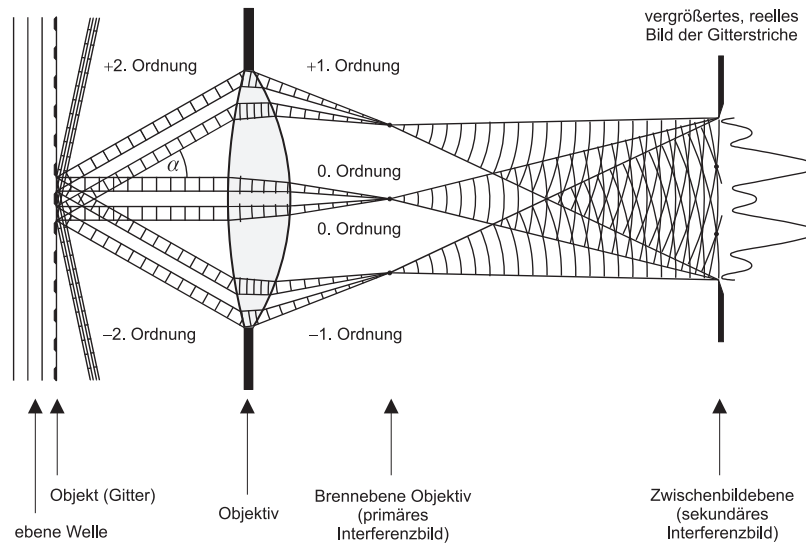


Abb. 10: Wellenoptische Darstellung der Abbildung eines Doppelspalts durch ein Mikroskopobjektiv.

sungsgrenze) d_{\min} zweier gerade noch getrennt erscheinender (paralleler) Linien

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{\sin \alpha}. \tag{14}$$

Da stets $\sin \alpha \leq 1$ gilt, ist hier $d_{\min} \geq \lambda$. Dies bedeutet, dass man mit einem Lichtmikroskop nur Objekte sehen kann, die größer als die Wellenlänge des verwendeten Lichts sind.

Die Auflösungsgrenze d_{\min} kann noch weiter erniedrigt werden, wenn das Objekt nicht senkrecht, sondern schräg beleuchtet wird. Dann resultiert nämlich der gleiche Öffnungswinkel aus einem kleineren effektiven Spaltabstand. Mit einem Zahlenfaktor κ (griechisch Kappa), dessen Wert zwischen 1 für senkrechten Einfall und 0,5 für streifenden Einfall variiert, gilt allgemein:

$$d_{\min} = \kappa \frac{\lambda}{\sin \alpha} \tag{15}$$

Nachdem in optisch dichteren Medien schräg einfallende Strahlen zum Lot hin gebrochen werden, kann man den Beugungswinkel α verkleinern, indem man zwischen Objekt und Objektiv eine Flüssigkeit mit dem Brechungsindex $n > 1$ einfügt. Es handelt sich dabei meist um einen Tropfen Öl, der zwischen Deckgläschen und Objektiv sehr leicht hängen bleibt. Diese sog. **Ölimmersionsmethode** erlaubt eine Steigerung des Auflösungsvermögens μ . Die Lichtwellenlänge im Öl verkürzt sich dabei auf λ/n , so dass nunmehr

$$d_{\min} = \kappa \frac{\lambda}{n \sin \alpha} \tag{16}$$

wird. Hieraus sieht man schließlich, dass die Verwendung kurzwelligen Lichts (λ klein: blau!) mehr Details erkennen lässt als die Verwendung langwelligen Lichts (rot). Am Nenner von Gl. (16) erkennt man, welche

Größen die Qualität des Objektivs beeinflussen: Luftobjektiv ($n = 1$) bzw. Ölimmersionsobjektiv ($n \approx 1,5$) und halber Öffnungswinkel α . Die Größe

$$A = n \sin \alpha \tag{17}$$

bezeichnet man als **numerische Apertur (n. A.)**. Je größer sie ist, desto kleiner ist d_{\min} und desto besser ist das Mikroskop. Sie wird auf guten Objektiven neben Brennweite oder Vergrößerung als Zahlenwert eingraviert.

3. Sinnvolle Vergrößerung

Die Untersuchung des Auflösungsvermögens eines Mikroskops hat gezeigt, dass seine Vergrößerung von Beugungseffekten und der Apertur des Objektivs begrenzt wird. Aber auch das menschliche Auge hat eine Auswirkung auf die sinnvolle Vergrößerung eines Mikroskops. Die Auflösung des menschlichen Auges ist von dem kleinsten Abstand zwischen den Zapfen in der Netzhaut beeinflusst. Dieser Abstand ist am kleinsten in der Fovea centralis, nämlich etwa $3 \mu\text{m}$. Bei einer Augenzweite von ca. 2 cm entspricht dies einem Sehwinkel von $\sigma \approx 0,5$ Bogenminuten. Zusätzliche Effekte, wie Lichtbeugung an der Pupille (Pupillendurchmesser zwischen 0,1 cm und 0,8 cm), und Linsenfehler, wie sphärische und chromatische Aberration, verschlechtern die Auflösungsgrenze des Auges auf ca. $10 \mu\text{m}$ oder den Sehwinkel auf $\sigma \approx 1,7$ Bogenminuten. Dies entspricht zwei Punkten, die auf die konventionelle Sehweite entfernt einen Abstand von ca. 0,1 mm voneinander haben. Das beste Lichtmikroskop hat eine Auflösungsgrenze von ca. 130 nm für violettes Licht mit $\lambda = 400 \text{ nm}$, numerische Apertur $A \approx 1,5$ und $\kappa \approx 0,5$. Das entspricht einem Sehwinkel von $\sigma_0 \approx 0,1$ Bogenminuten. Dann ist die

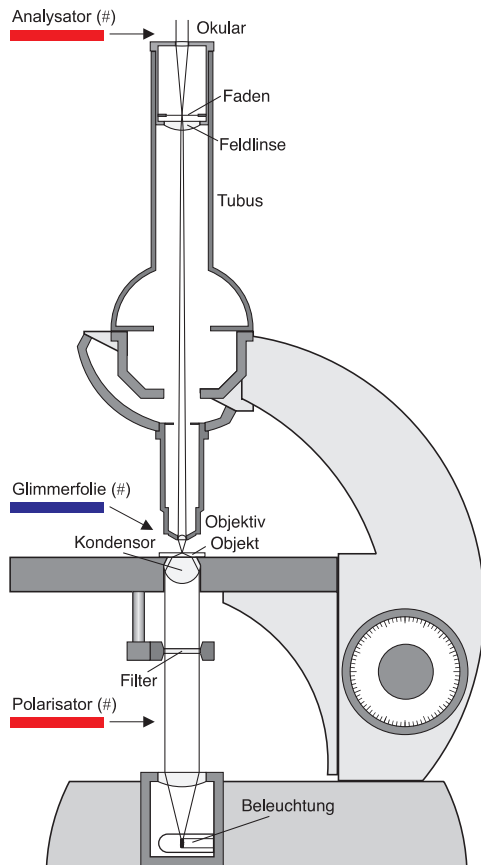


Abb. 11: Mikroskop.

sinnvolle Vergrößerung nach Gl. 1 auf

$$v = \frac{\tan \sigma}{\tan \sigma_0} = 1 \cdot 10^3$$

begrenzt. In der Praxis werden Vergrößerungen bis etwa 2000 verwendet. Höhere Vergrößerungen bringen keine weiteren Verbesserungen.

III. VERSUCHSAUFBAU UND GERÄTE

III.1. Zubehör

Objektskala, große Skala auf dem Stativ, halbdurchlässiger Spiegel, Lochblende, Apparatur zur Messung von Beugung, Beugungsgitter, Stahlmaßstab (30 cm), verschiebbare Blende, Filter rot, Filter grün

III.2. Versuchsaufbau

1. Mikroskop

Abb. 11 zeigt den Aufbau des Mikroskops und den Strahlengang. Ein drehbarer Revolver stellt zwei Objektive mit 6,3-facher bzw. 40-facher Vergrößerung zur

Verfügung. Für Ihre Versuche verwenden Sie nur die 6,3-fache Vergrößerung. Die Beleuchtungsstärke kann mittels eines Drehknopfes stufenlos geregelt werden. Die Beleuchtung des Objekts soll möglichst streifend erfolgen, was nach Gl.(15) mit $\kappa \rightarrow 0,5$ ein optimales Auflösungsvermögen ergibt. Dazu wird ein kurzbreitweitiiger Kondensator (zwei geeignete Sammellinsen) mit parallelem Licht beleuchtet. Er sorgt dafür, dass möglichst viel Licht gleichmäßig in den Strahlengang kommt. Eine starke Vergrößerung lässt sich am besten durch einen langen Tubus erzielen. Damit aber das Mikroskop handlich bleibt, wurde die Tubuslänge auf 160 mm beschränkt und dafür die Objektivbrennweite klein gemacht.

Diverse Anbauteile und Hilfsinstrumente sind in Abb. 12 dargestellt.

2. Apparatur zur Messung von Beugung

Der Versuchsaufbau zur Messung von Beugung ist in Abb. 13 gezeigt. Fällt der Laserstrahl durch das Beugungsgitter, hinterlässt er am äußeren zylinderförmigen Mattscheibenring (20 cm Durchmesser) Lichtpunkte (Interferenzbild). Die schwächeren Lichtpunkte können problemlos lokalisiert werden, wenn man von außen senkrecht auf den Mattscheibenring schaut.

Der 360°-Messring aus Plexiglas ist drehbar und enthält vier rote Hauptmarkierungen in 90°-Abständen. Weitere Unterteilungen sind im 10°- und 5°-Rhythmus zu finden. Der Ring enthält keine Zahlenangaben – alle Winkel müssen durch Abzählen ermittelt werden.

IV. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

IV.1. Direkte visuelle Bestimmung der Mikroskopvergrößerung

1. Kurzbeschreibung

Sie bestimmen die Gesamtvergrößerung v des Mikroskops für die konventionelle Sehweite. Über einen halbdurchlässigen Spiegel am Mikroskop vergleichen Sie dazu zwei Skalen.

2. Messgrößen und Durchführung

– Objektiv 6,3-fach –

- Legen Sie eine in Glas geritzte Skala (**Objektskala**) auf den Objektstisch und leuchten Sie sie gut aus. Notieren Sie sich dabei den Strichabstand der Objektskala. 200 bzw. 100 Skalenteile der Objektskala entsprechen einer Länge von 10 mm.
- Stellen Sie die Gegenstandsweite durch Verschieben des Objektstisches (Rändelschraube) so ein,

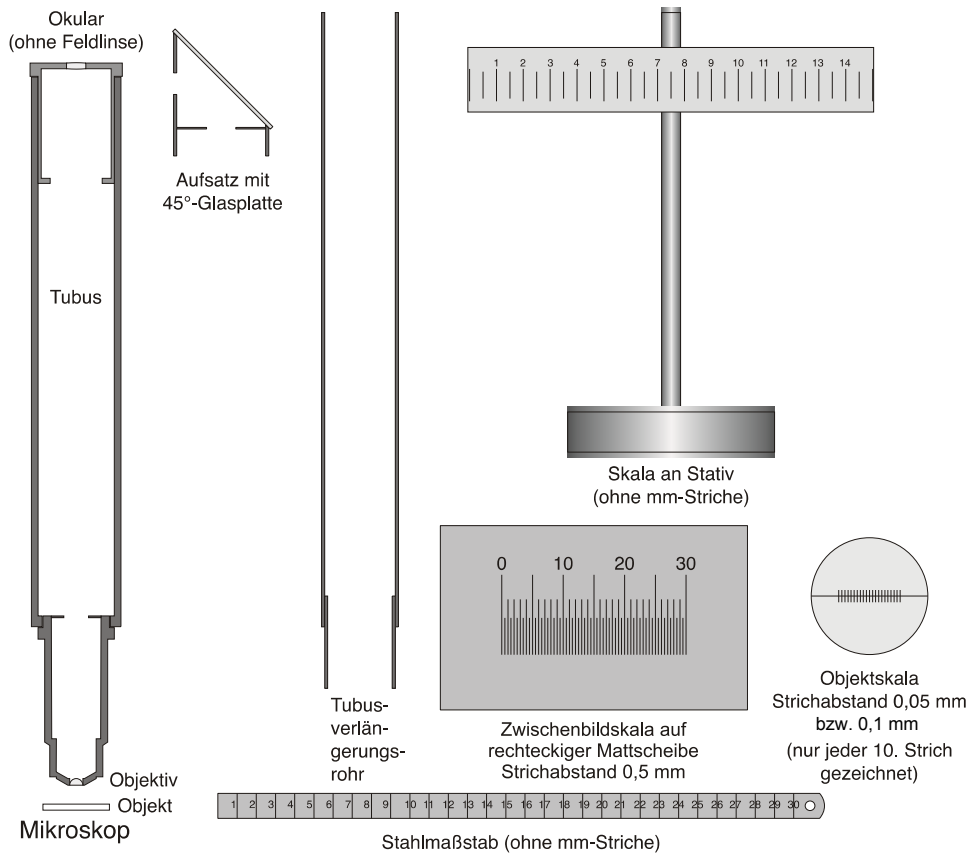


Abb. 12: Mikroskopzubehör (nur teilweise benötigt)

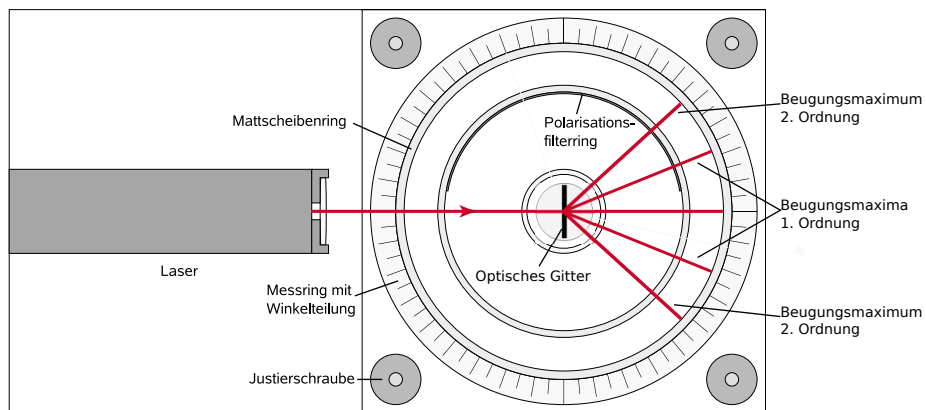


Abb. 13: Versuchsaufbau zur Messung von Beugung.

dass man durch das Okular ein scharfes Bild des Objektmaßstabes erhält.

- Setzen Sie einen halbdurchlässigen Spiegel unter 45° auf das Okular. Stellen Sie dahinter im Abstand von $s_0 = 25\text{ cm}$ vom Auge die **große Skala am Stativ** auf (Abb. 14 und Abb. 15).

Mit Hilfe dieser Anordnung ist es möglich, die Skala und das Bild der Objektskala gleichzeitig zu sehen und miteinander zu vergleichen.

- Messen Sie, welche Strecke H auf der großen Skala einer vorgegebenen Strecke h auf der Objektskala entspricht.¹
- Schätzen Sie die Messunsicherheit ab.

¹ Hilfsvideo zum Teilversuch: <https://www.youtube.com/watch?v=UkMXHUankGc>



Abb. 14: Versuchsaufbau zum Teilversuch IV IV.1.

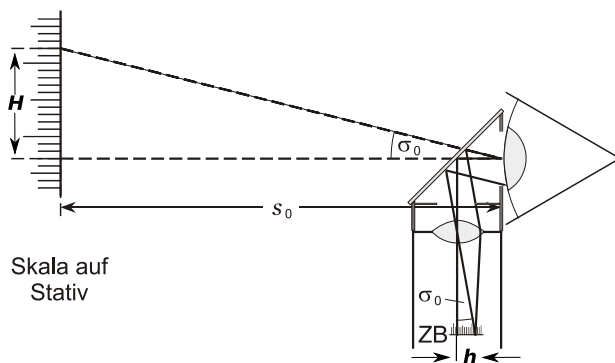


Abb. 15: Strahlengang bei der Bestimmung der Mikroskopvergrößerung. Auf den Tubus wird zu diesem Zweck das Modul mit der um 45° geneigten Glasplatte aus Abb. 12 gesetzt.

IV.2. Bestimmung der Wellenlänge eines Lasers mittels eines Beugungsgitters

1. Kurzbeschreibung

Sie beleuchten ein Beugungsgitter mit einem Laserstrahl. Es ergeben sich Beugungsmaxima. Anhand ihrer Lage bestimmen Sie die Wellenlänge des Laserlichts.

2. Messgrößen und Durchführung

- Setzen Sie das Beugungsgitter in der Aluminiumhalterung zentral in die Versuchsanordnung so ein, dass der am Glas reflektierte Laserstrahl in sich zurück geworfen wird.
- Messen Sie den Winkel zwischen zwei Beugungsmaxima der Ordnung k (welche Sie selber wählen)

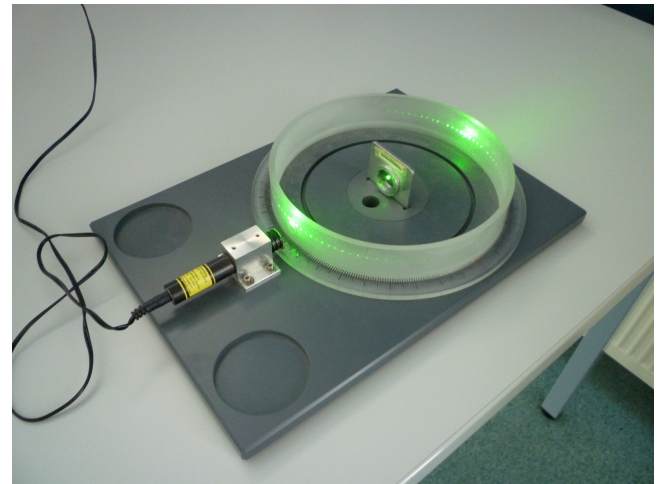


Abb. 16: Versuchsaufbau zum Teilversuch IV IV.2.

in der Transmission sowohl links als auch rechts (vgl. Abb. 16). Begründen Sie diese Wahl. Warum ist dieses Verfahren genauer, als wenn man den Winkel direkt zwischen der nullten und der ausgewählten Ordnung misst? Schätzen Sie die Messunsicherheit ab.

- Bestimmen Sie genauso den Ablenkungswinkel für die Beugungsordnung $2k$.
- Bestätigen Sie, dass die in der Reflexion beobachteten Beugungsmaxima innerhalb der Messgenauigkeit dieselben Ablenkungswinkel ergeben.

IV.3. Nachweis der Auflösungsgrenze des Mikroskops

1. Kurzbeschreibung

Sie untersuchen experimentell das Auflösungsvermögen. Statt eines Doppelspalts verwenden Sie ein Beugungsgitter als Objekt. Sein Spaltabstand von $d = 10\mu\text{m}$ ist d_{min} (die linke Seite von Gl.(14)).

Sie variieren den Öffnungswinkel 2α , indem Sie vor dem Objektiv eine Lochblende vom Durchmesser D in Richtung der optischen Achse verschieben (Abb. 17, 18, 19). Die Gitterstruktur ist mit dem Mikroskop deutlich zu erkennen, solange der Winkel α den Minimalwert nach Gl.(14) übersteigt. Bei kleinerem α sieht man dagegen nur noch eine gleichmäßig helle Fläche.

Der Winkel α , bei dem dieser Übergang stattfindet, ergibt sich nach Abb. 18 aus dem dazugehörigen Blendendurchmesser D und dem messbaren Abstand s zwischen Objekt und Blende:

$$\tan(\alpha) = \frac{D/2}{s} \tag{18}$$



Abb. 17: Versuchsaufbau zum Teilversuch IV IV.3.

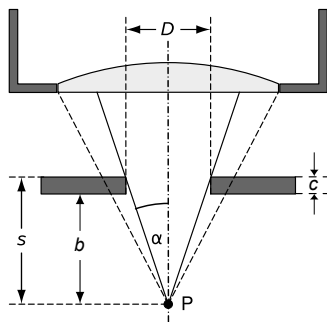


Abb. 18: Abbildung eines Objektivs zur Verkleinerung des Öffnungswinkels 2α der eintretenden Strahlen. Durch Verschieben der Blende in Richtung der optischen Achse des Objektivs wird der Winkel α verändert. Der Winkel α ergibt sich aus dem Lochdurchmesser D (hier: 0,5 mm) und dem Abstand s Oberseite der Blende - Objekt P. Da die Bohrung in der Blende zylindrisch statt konisch ist, muss zur Berechnung von s zum Abstand b Objekt - Unterseite der Blende noch die Plattendicke c (hier: 1 mm) addiert werden.

2. Messgrößen und Durchführung

1. Vorbereitung der Apparatur

– Objektiv 6,3-fach –

- Versuchen Sie, das Mikroskop auf die Gitterstruktur scharfzustellen. Verändern Sie danach die Tischposition nicht mehr.
- Stecken Sie den Aufsatz mit der Lochblende auf das Objektiv mit dem Abbildungsmaßstab 6,3:1 (bis zum Anschlag). Ziehen Sie die Madenschraube mit dem kleinem Imbusschlüssel vorsichtig **leicht** fest. Objektiv in den Strahlengang schwenken (vgl. Abb. 17).

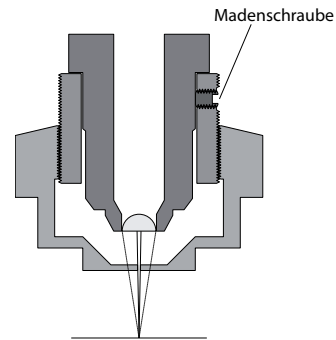


Abb. 19: Technische Realisierung einer verschiebbaren Blende vor dem Objektiv. Ein Rohrstützen mit Außengewinde wird mithilfe einer Madenschraube auf das Objektiv geklemmt. Die Blende besitzt ein Innengewinde und kann so durch Drehen in Richtung der optischen Achse verschoben werden. Die Verschiebung b ergibt sich aus der Zahl der Umdrehungen. Der Blendendurchmesser ist $D = 0,5$ mm.

- Legen Sie den roten Lichtfilter auf die Austrittsöffnung der Beleuchtungseinrichtung. Dieser Filter lässt nur Licht im Bereich der Wellenlänge $\lambda = 630$ nm durch.

2. Messung

- Verschieben Sie bei scharfgestelltem Mikroskop die Lochblende, bis sie die Gitteroberfläche leicht berührt. Lesen Sie die dazugehörige Position des Nullstriches der Rändelmutter ab.
- Verschieben Sie dann die Lochblende durch Drehen der Rändelmutter zum Objektiv hin, bis die Gitterstruktur gerade vollständig verschwunden ist. Zählen Sie dabei die Umdrehungen.

Die Umdrehungszahl multipliziert mit dem Vorschub 0,5 mm für eine Umdrehung ergibt den Gesamtvorschub b der Lochblende mit hinreichender Genauigkeit. Die Dicke c der Platte, in der sich das Loch mit dem Durchmesser $D = 0,5$ mm befindet, beträgt 1 mm (s. Abb. 18). Somit gilt für den Abstand s

$$s = b + c. \tag{19}$$

- Legen Sie den grünen Lichtfilter auf die Austrittsöffnung der Beleuchtungseinrichtung. Dieser Filter lässt nur Licht im Bereich der Wellenlänge $\lambda = 532$ nm durch. Was beobachten Sie?

V. AUSWERTUNG

V.1. Direkte visuelle Bestimmung der Mikroskopvergrößerung

Berechnen Sie die Gesamtvergrößerung als das Verhältnis der scheinbaren Bildgröße H zur Objektgröße h aus Ihren „Peilversuchen“ mitsamt Unsicherheit.

V.2. Bestimmung der Wellenlänge eines Lasers mittels eines Beugungsgitters

- Berechnen Sie die Wellenlänge des Lasers mit Hilfe von Gl. (12) für die Beugungsordnungen k und $2k$ für $d = 10 \mu\text{m}$.
- Geben Sie den Mittelwert mit Messunsicherheit als Ergebnis an. Diskutieren Sie eine eventuelle Abweichung vom Literaturwert $\lambda_{\text{Lit}} = 532 \text{ nm}$.

V.3. Nachweis der Auflösungsgrenze des Mikroskops

- Berechnen Sie den halben Aperturwinkel α nach Gl.(18).
- Ermitteln Sie über die Gl. (16) den Zahlenfaktor κ . Setzen Sie dabei $d_{\text{min}} = 10 \mu\text{m}$ und für n die Brechzahl von Luft ($n = 1$) ein.
- Geben Sie zum Vergleich die theoretischen Grenzen für κ an.

VI. AUSBLICK

Damit das Lichtmikroskop in Klinik und Forschung möglichst vielseitig einsetzbar ist, kann das normale **Hellfeldmikroskop** durch verschiedene Zusatzeinrichtungen ausgebaut werden.

Anders ist es bei Präparaten, welche die Polarisationsebene (Schwingungsebene) oder die Phasenlage (Auslenkungszustand) der Lichtwelle verändern. Beide sind

für unser Auge unsichtbar. Das **Polarisationsmikroskop** erzeugt auch von anisotropen Präparaten wie z.B. Knochenschliffen kontrastreiche Bilder.

In der medizinischen Forschung sind Zellkulturen unentbehrlich. Oft verändern Objekte die Amplitude des Lichts, man spricht von Amplitudenobjekten. Wir haben dann einen Hell-Dunkel-Kontrast. Lebende Zellen ändern kaum die Amplitude, verschieben aber die Phase der einfallenden Lichtwellen. Je nach Brechungsindex wird sie an verschiedenen Objektstellen unterschiedlich stark verschoben. Die Strukturen lebender Zellen sehen wir erst im **Phasenkontrastmikroskop** gut. Hier wird der Phasenunterschied zwischen nullter Ordnung und gebeugtem Licht durch eine ringförmige Phasenplatte in der hinteren Brennebene des Objektivs so vergrößert, dass er den Verhältnissen beim Amplitudenobjekt entspricht, wir also einen Hell-Dunkel-Kontrast beobachten.

Das **Interferenzkontrastmikroskop** vermittelt zwischen Phasenkontrast- und klassischer Hellfeldmikroskopie. Es benötigt einen Polarisator und einen Analysator sowie ein sog. doppelbrechendes Prisma (Wollastonprisma), das einen Lichtstrahl in zwei Teilstrahlen aufspaltet. Diese Teilbündel haben verschiedene Phasenlage. Sie werden zur Interferenz gebracht und erzeugen damit sogar von transparenten Präparaten kontrastreiche, plastische Bilder.

Beim **Dunkelfeldmikroskop** sorgt ein geeigneter Kondensator durch Schrägbeleuchtung des Präparats dafür, dass kein direktes Licht (nullte Ordnung) ins Objektiv gelangt. Nur an Objektstrukturen gebeugtes Licht gelangt ins Objektiv. Kleine Strukturen sind dann auf dunklem Hintergrund hell abgebildet und sehr gut sichtbar.

Die Theorie des Auflösungsvermögens für das Lichtmikroskop gleicht formal derjenigen für das **Elektronenmikroskop** (\rightarrow Vorlesung)! Viele moderne Erkenntnisse der Cytologie konnten erst durch das sehr hohe Auflösungsvermögen des Elektronenmikroskops gewonnen werden: Man erreicht ca. 1 nm gegenüber 500 nm beim Lichtmikroskop.