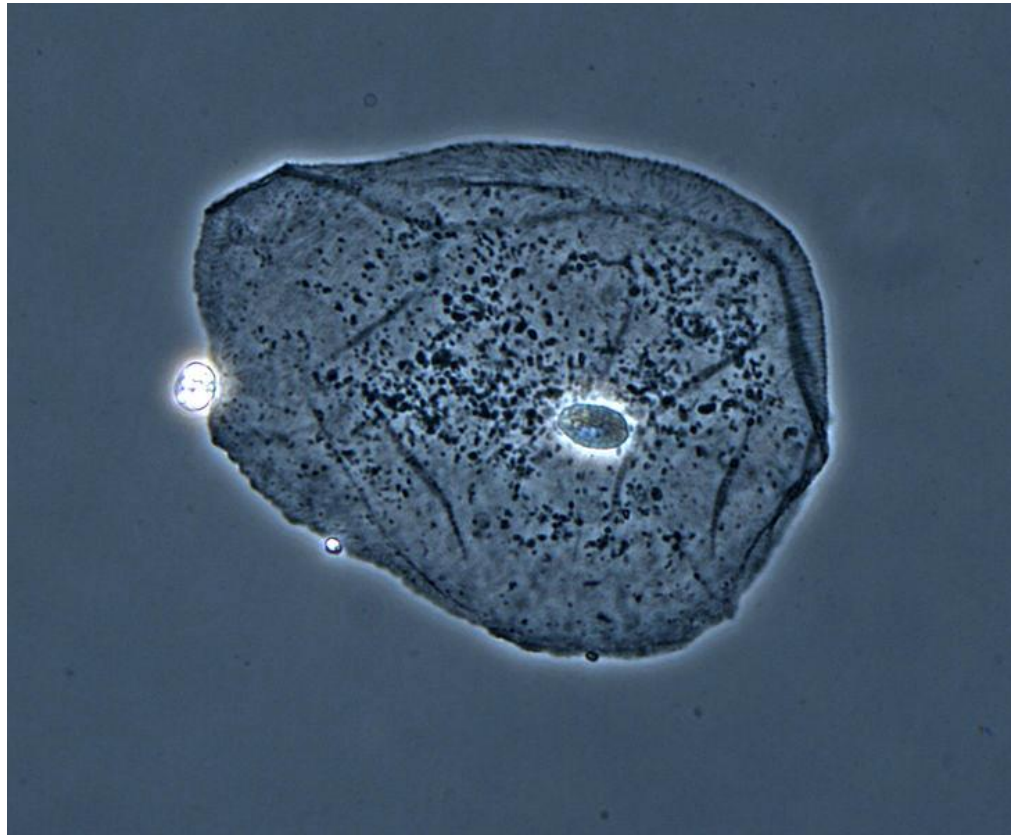


Mikroskopia fazowo-kontrastowa

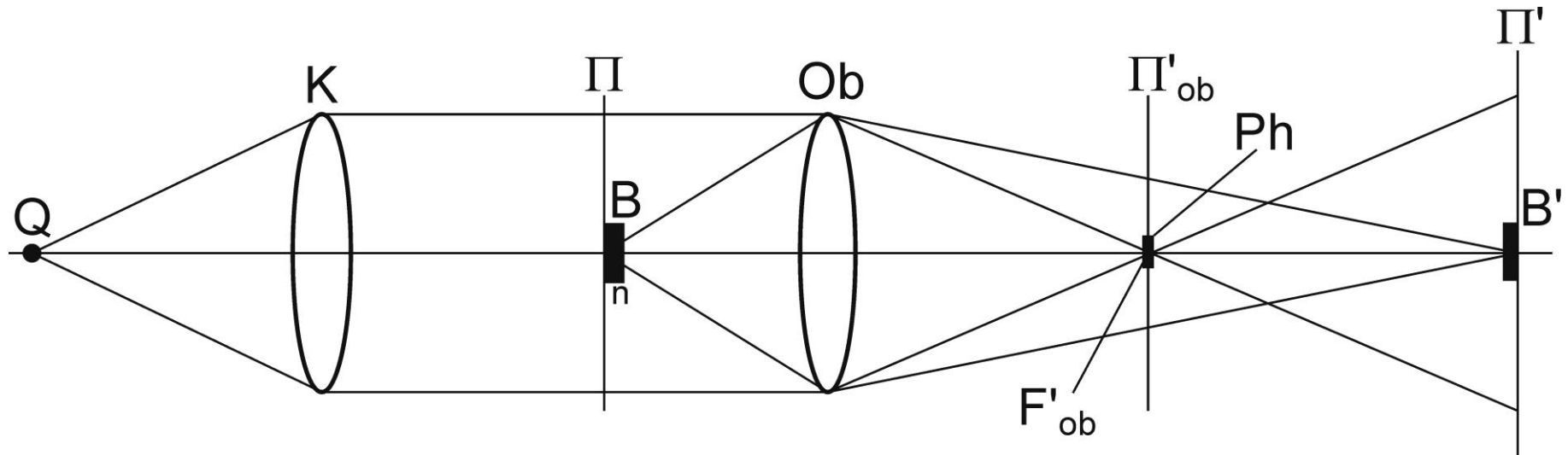


Klasyfikacja obiektów mikroskopowych

- Przedmiot amplitudowy
- Przedmiot fazowy
- Przedmiot amplitudowo-fazowy

- Przedmiot izotropowy
- Przedmiot anizotropowy

Zasada kontrastu fazowego



Q – źródło światła
 K – kondensor
 B – obiekt fazowy o wsp. zał. n
 Ob – obiektyw
 Ph – płytka fazowa
 B' – obraz obiektu B

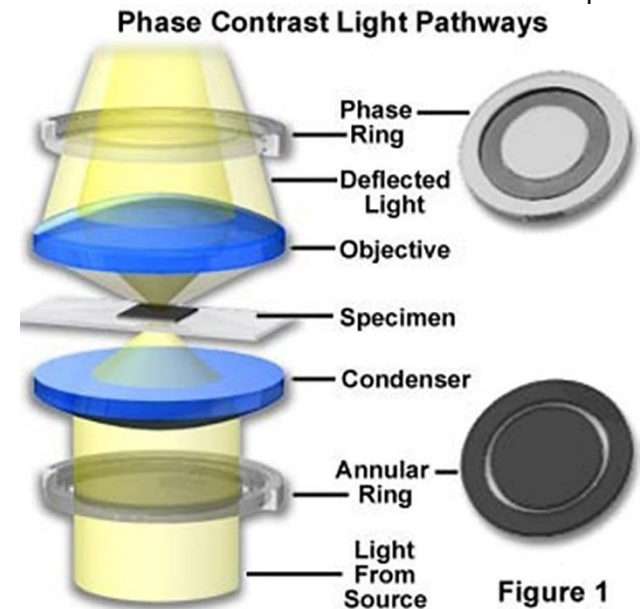
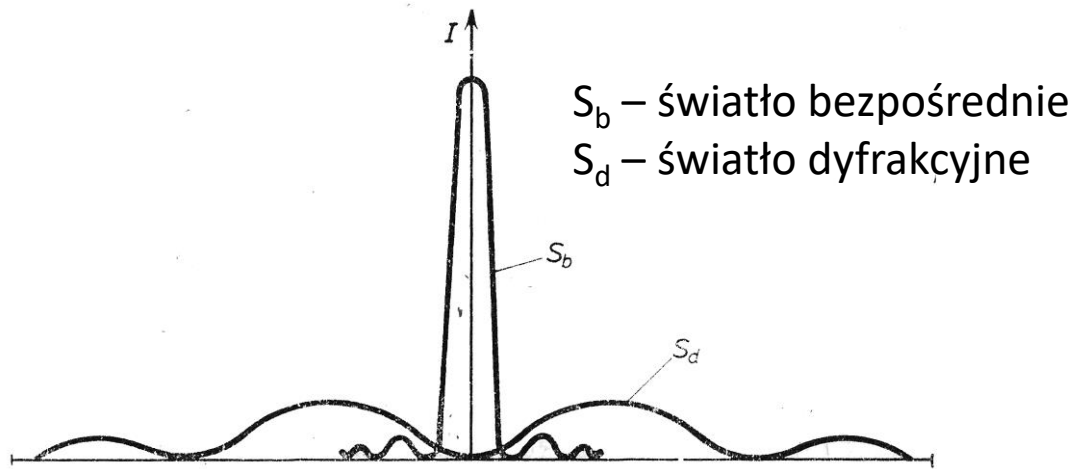


Figure 1

Teoria powstawania obrazu fazowo-kontrastowego

Przedmiot fazowy –

natężenie światła w obrazie mikroskopowym (zwykłym) takie samo jak w tle



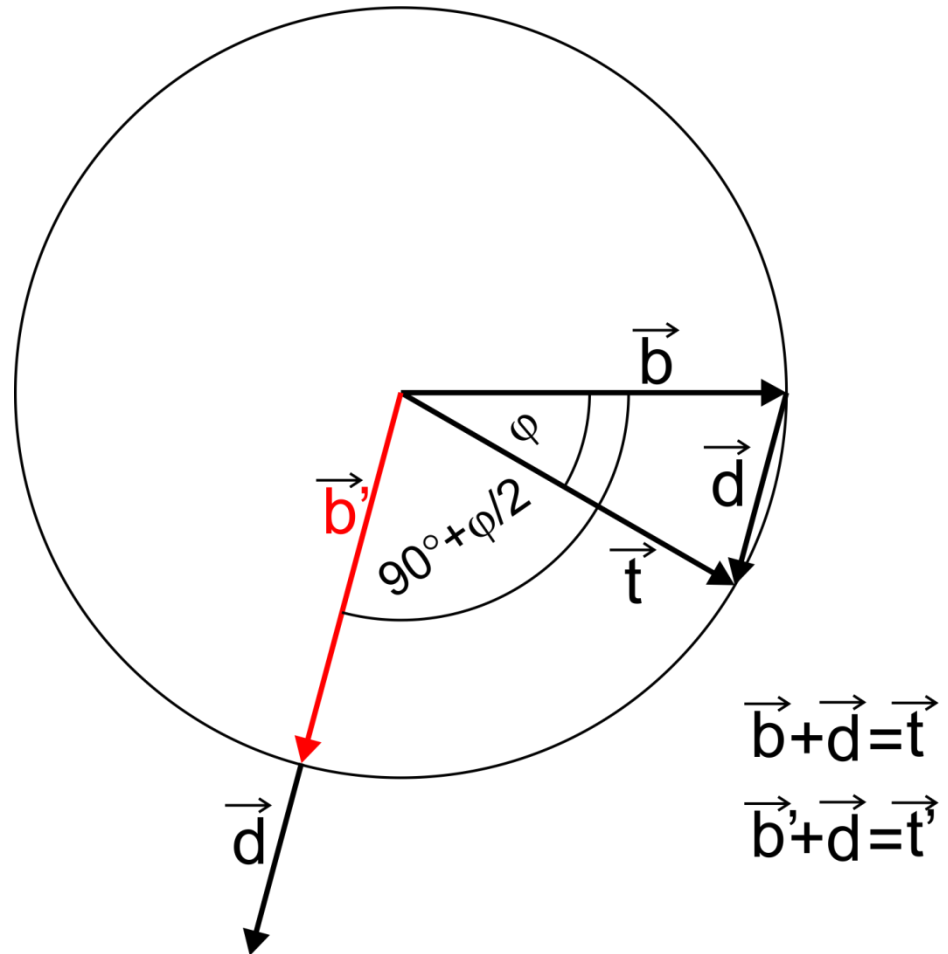
Rozkład natężenia
światła bezpośredniego i dyfrakcyjnego
w żrenicy wyjściowej obiektywu

Wektorowa interpretacja kontrastu fazowego

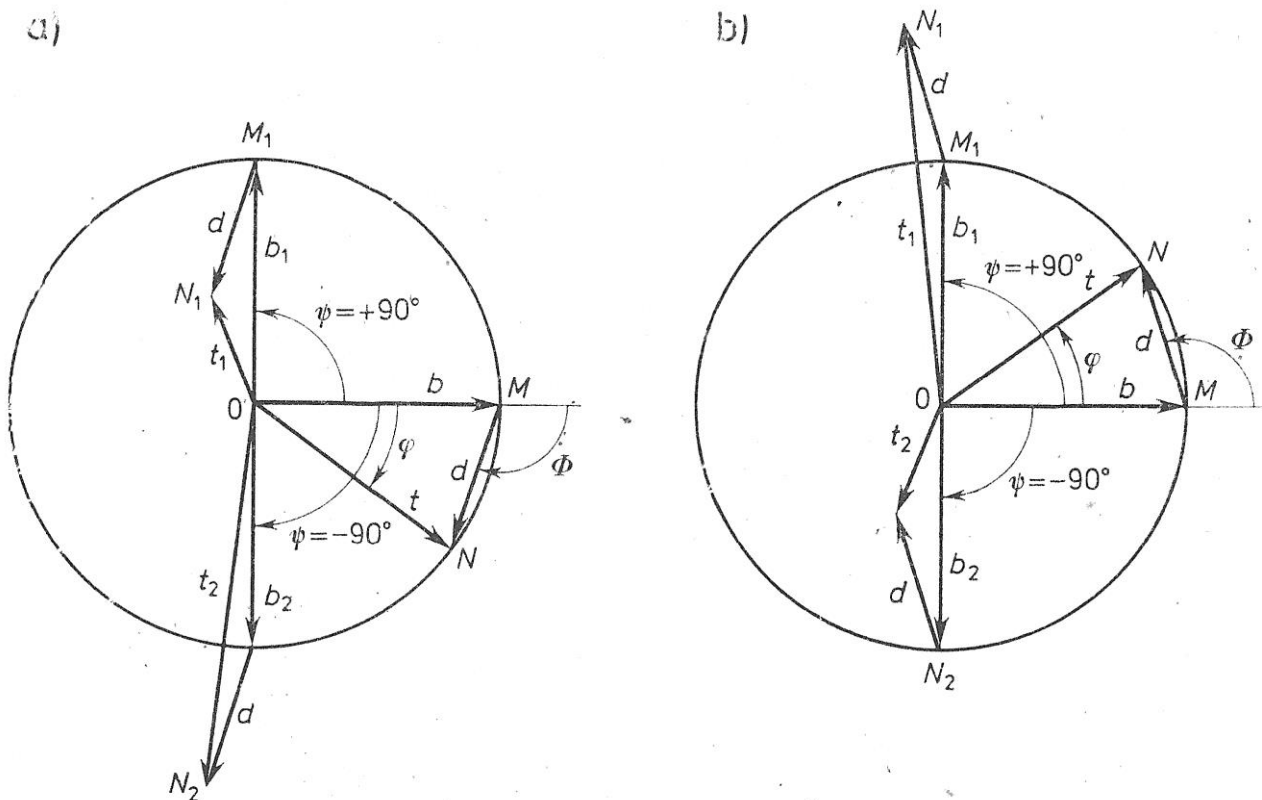
- \vec{b} - światło nieugięte
- \vec{d} - światło ugięte
- \vec{t} - światło całkowite
- \vec{b}' - światło ugięte po przejściu przez płytkę fazową ćwierćfalową

$$I = |\vec{t}| = |\vec{b} + \vec{d}|^2 = I_0$$

$$I' = |\vec{t}'| = |\vec{b}' + \vec{d}|^2 > I$$



Wektorowa interpretacja kontrastu fazowego



t – światło przechodzące przez badany obiekt B

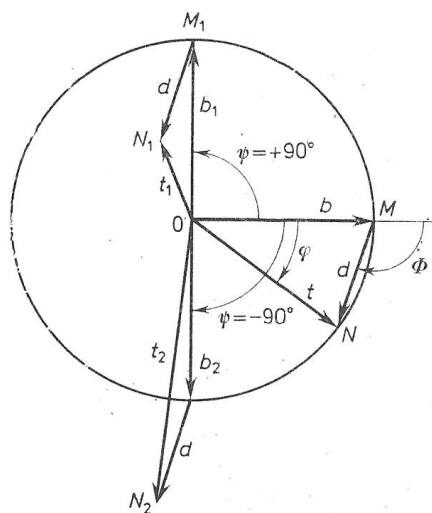
b – światło przechodzące obok obiektu B

d – światło ugięte na obiekcie B

$$|\vec{b}| \approx |\vec{t}|$$

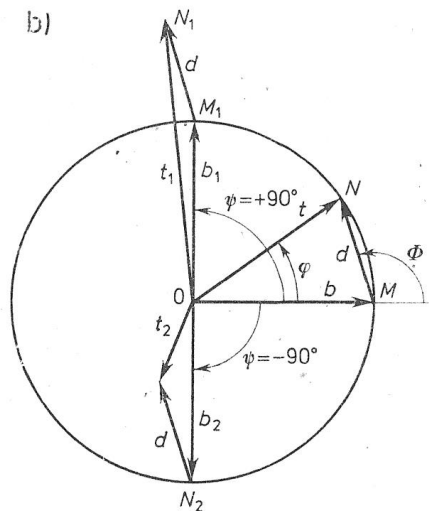
Wektorowa interpretacja kontrastu fazowego

a)



$$\begin{aligned} \vec{b} &\rightarrow \vec{b}_1 & \vec{b} &\rightarrow \vec{b}_2 \\ \vec{t} &\rightarrow \vec{t}_1 & \vec{t} &\rightarrow \vec{t}_2 \\ |\vec{t}_1| &< |\vec{b}_1| & |\vec{t}_2| &> |\vec{b}_2| \end{aligned}$$

b)

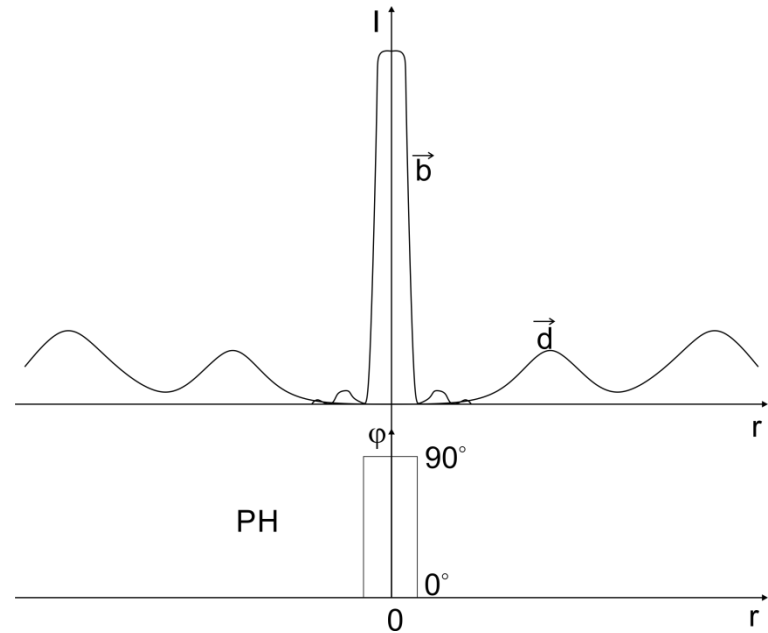


$$\begin{aligned} \vec{b} &\rightarrow \vec{b}_1 & \vec{b} &\rightarrow \vec{b}_2 \\ \vec{t} &\rightarrow \vec{t}_1 & \vec{t} &\rightarrow \vec{t}_2 \\ |\vec{t}_1| &> |\vec{b}_1| & |\vec{t}_2| &< |\vec{b}_2| \end{aligned}$$

$$K = \frac{I_t - I_0}{I_t} = 1 - \frac{|t_1|^2}{|b_1|^2} \approx -2\varphi \text{ dla } \psi = +90^\circ$$

$$K = \frac{I_t - I_0}{I_t} = 1 - \frac{|t_2|^2}{|b_2|^2} \approx +2\varphi \text{ dla } \psi = -90^\circ$$

Fourierowska analiza kontrastu fazowego



$$T = 1 \cdot \exp(i \cdot \varphi)$$

$$T_{Ph} = \begin{cases} \exp(i \cdot \pi/2) = i & \text{dla } (k_x, k_y) = (0, 0) \\ 1 & \text{dla } (k_x, k_y) \neq (0, 0) \end{cases}$$

Fourierowska analiza kontrastu fazowego

Przejście światła od przedmiotu do obrazu: etap dwustopniowy

1. Płaszczyzna przedmiotu \rightarrow płaszczyzna ogniskowa obrazowa obiektywu:
prosta transformata Fouriera
2. Płaszczyzna ogniskowa obrazowa obiektywu \rightarrow płaszczyzna obrazowa obiektywu:
odwrotna transformata Fouriera

Fourierowska analiza kontrastu fazowego

$$T(x, y) = \exp(i\phi) \approx 1 \pm i\phi \quad \phi \ll 2\pi$$

FFT

$$T(k_x, k_y) = FFT(1 \pm i\phi) = PSF(k_x, k_y) \pm i\Phi(k_x, k_y)$$

PH

$$PSF(k_x, k_y) \rightarrow \exp(i\pi/2) \cdot PSF(k_x, k_y) = iPSF(k_x, k_y)$$

$$i\Phi(k_x, k_y) \rightarrow 1 \cdot i\Phi(k_x, k_y) = i\Phi(k_x, k_y)$$

$$T(k_x, k_y) \rightarrow T'(k_x, k_y) = iPSF(k_x, k_y) \pm i\Phi(k_x, k_y) = i(PSF \pm i\Phi)$$

FFT⁻¹

$$T(x, y) = i(1 \pm \phi)$$

$$I = (1 \pm \phi)^2 \approx 1 \pm 2\phi$$

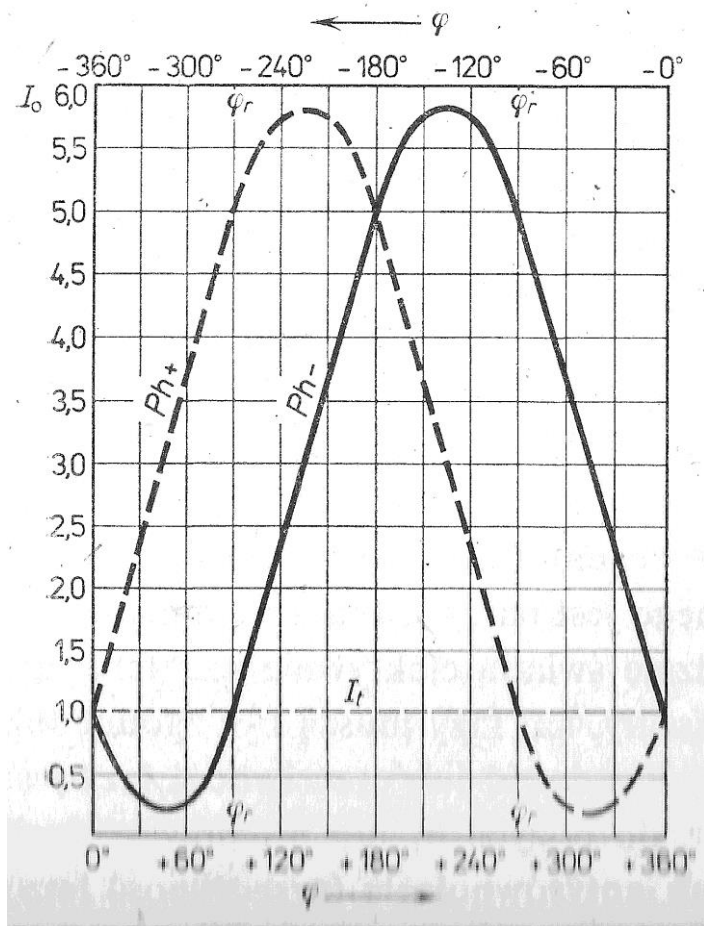
Absorbująca płytka fazowa

N – natężeniowy współczynnik transmisji fazowej płytki Ph ($I_{ph}=1/N \cdot I_0$)

$$K = -2\varphi\sqrt{N} \quad dla \quad \psi = +90^\circ$$

$$K = +2\varphi\sqrt{N} \quad dla \quad \psi = -90^\circ$$

Duże przesunięcia fazowe



Przedział nieodwróconego kontrastu φ_r –
użyteczny zakres rejestrowanych zmian fazy

Warunki Richtera

Warunki Richtera:

optymalne przesunięcie płytki fazowej
oraz optymalna przepuszczalność płytki

$$\psi_{opt} = \pm 90^\circ + \varphi/2$$

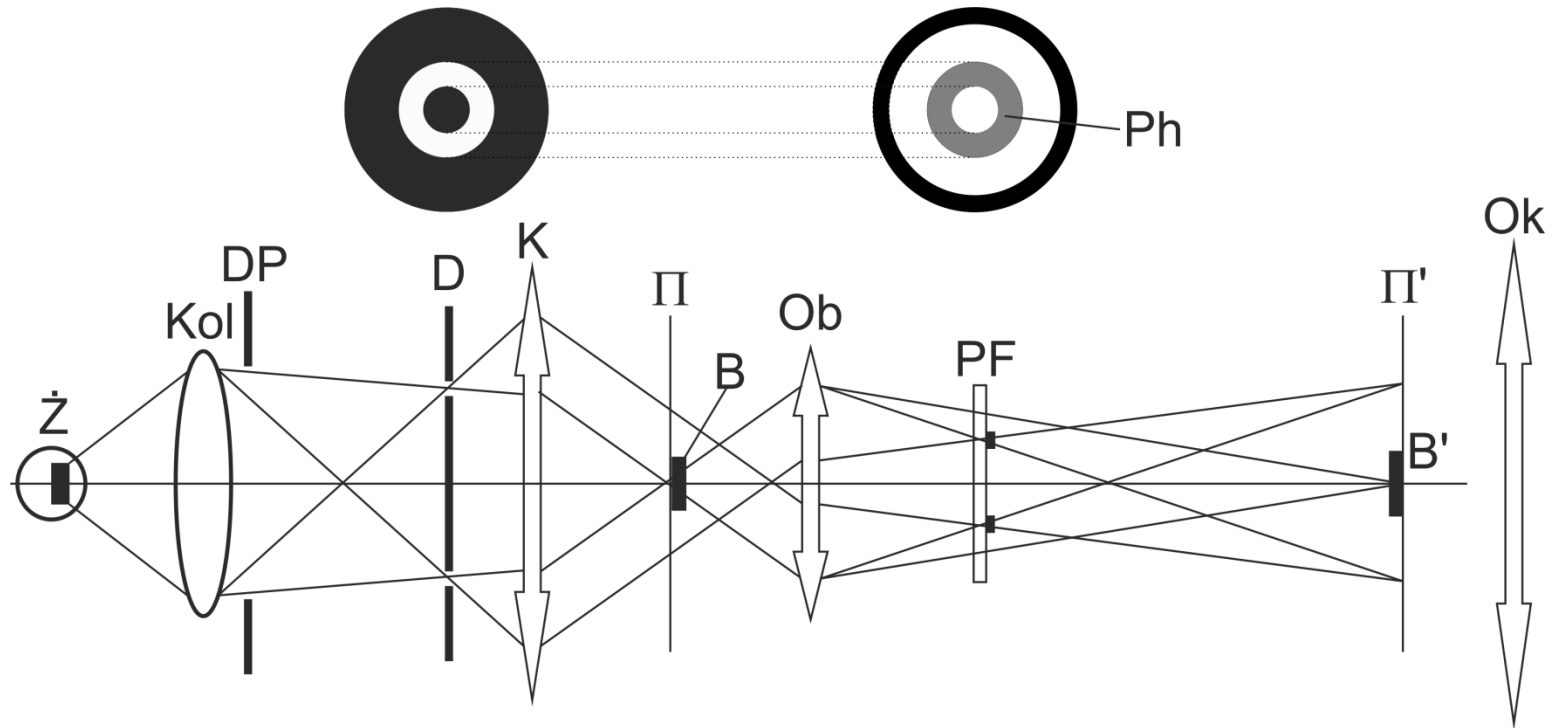
Dopasowanie
fazowe

$$\tau_{opt} = 1/N = 4 \sin^2(\varphi/2)$$

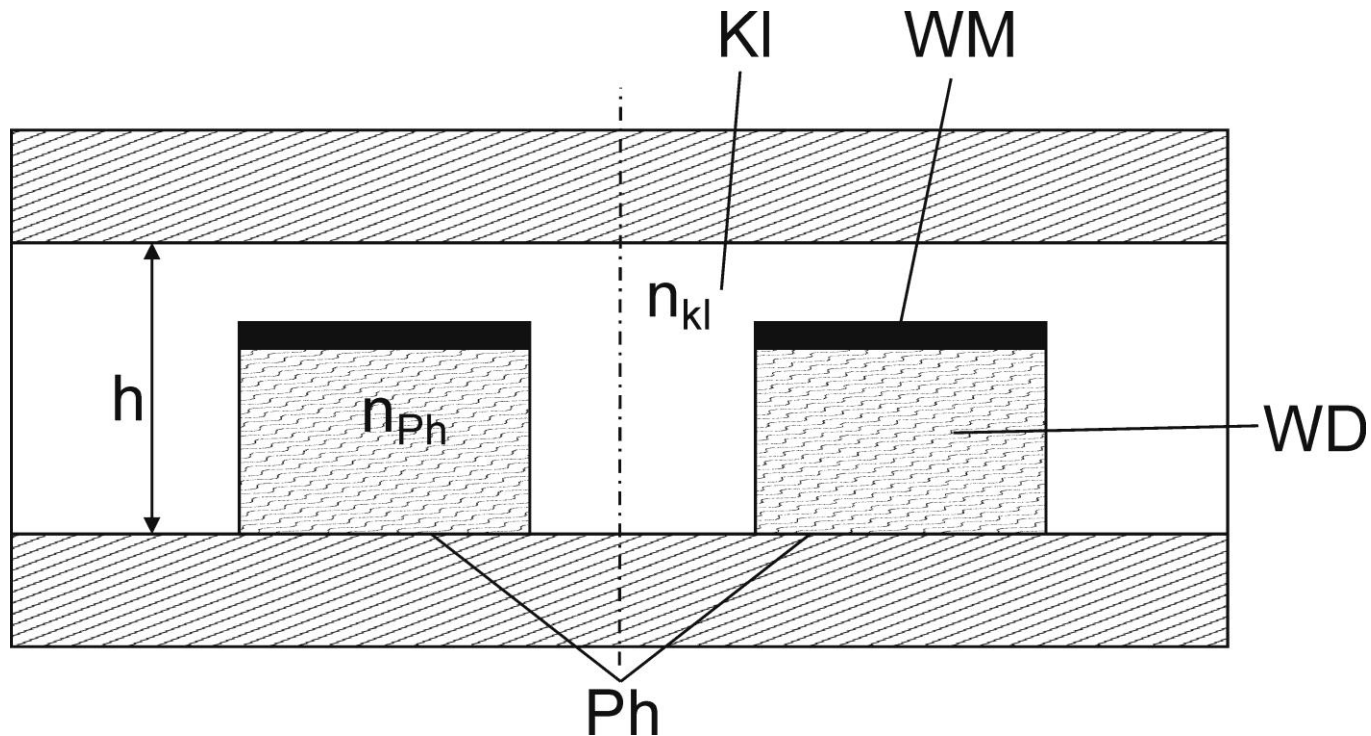
Dopasowanie
natężeniowe

(maksymalna konstruktywna lub destruktywna
interferencja światła bezpośredniego i dyfrakcyjnego)

Zasada budowy mikroskopu fazowego wg Zernikego



Typowa płytki fazowa



WD – warstwa dielektryczna
WM – warstwa metaliczna
Ph – pierścień fazowy

$$\psi = \frac{2\pi}{\lambda} h (n_{kl} - n_{ph})$$

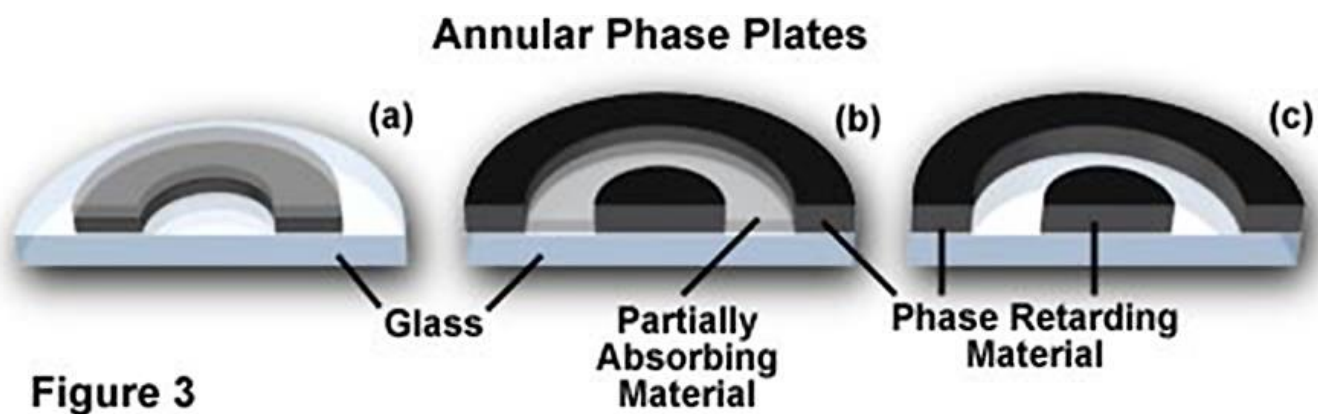


Figure 3

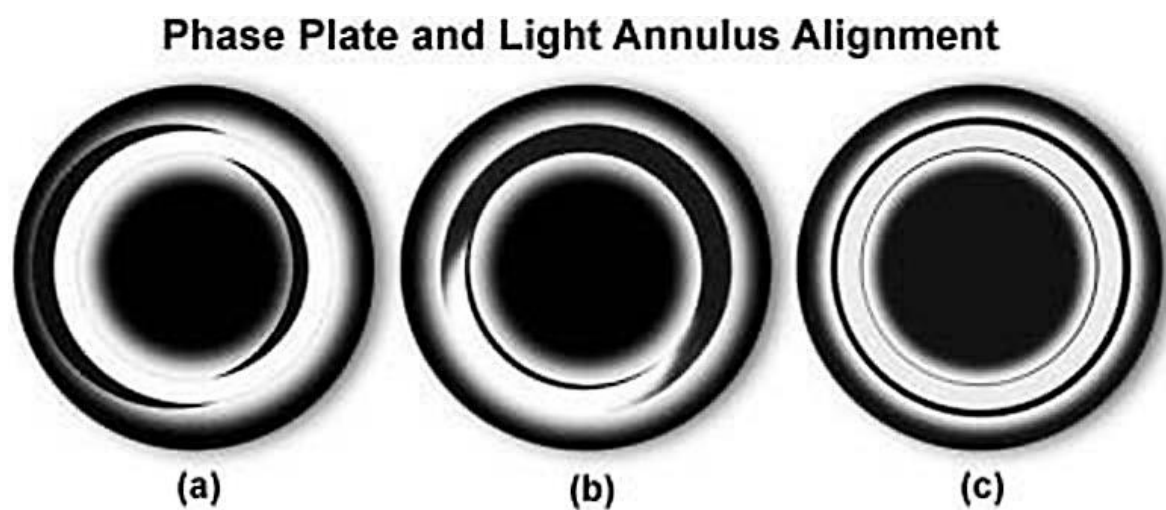


Figure 4

Objective Apertures and Phase Contrast Optics

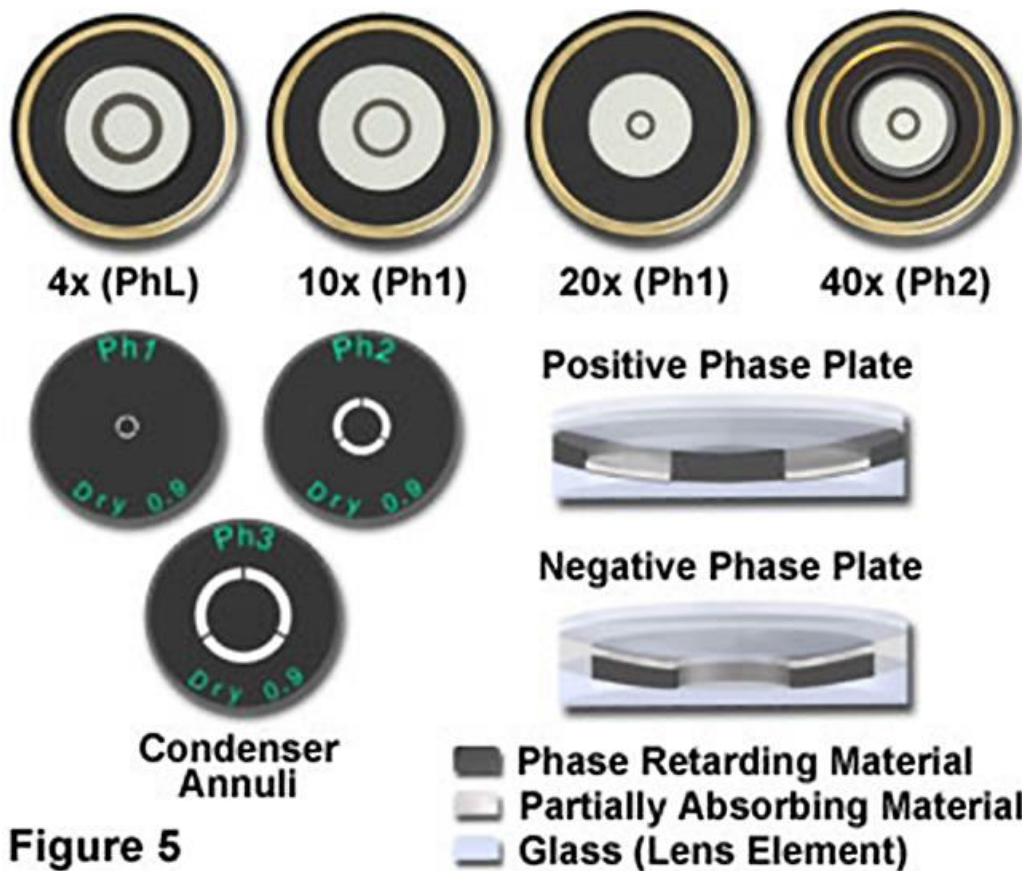
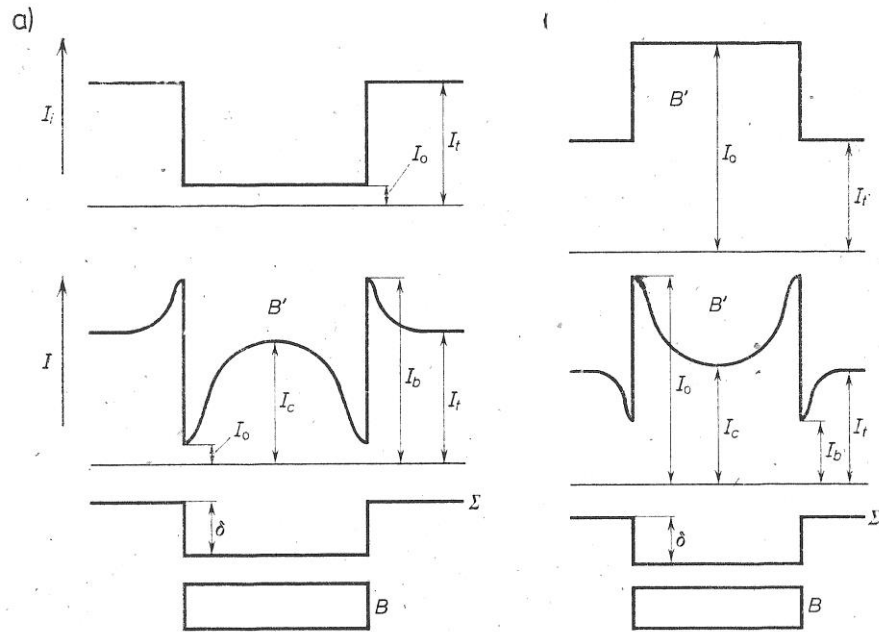


Figure 5

Halo i cieniowanie



Halos in Phase Contrast and DIC Microscopy

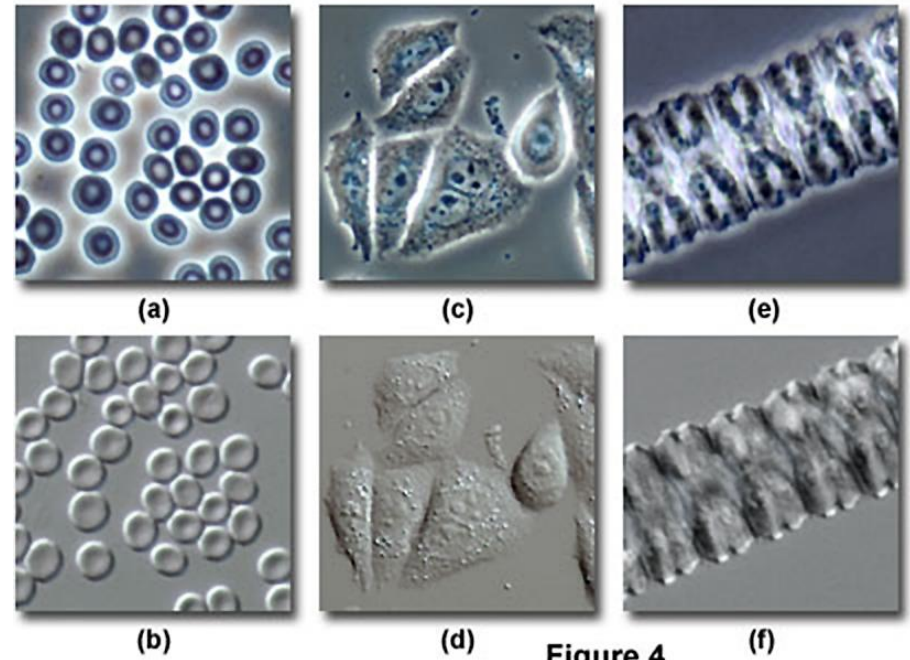
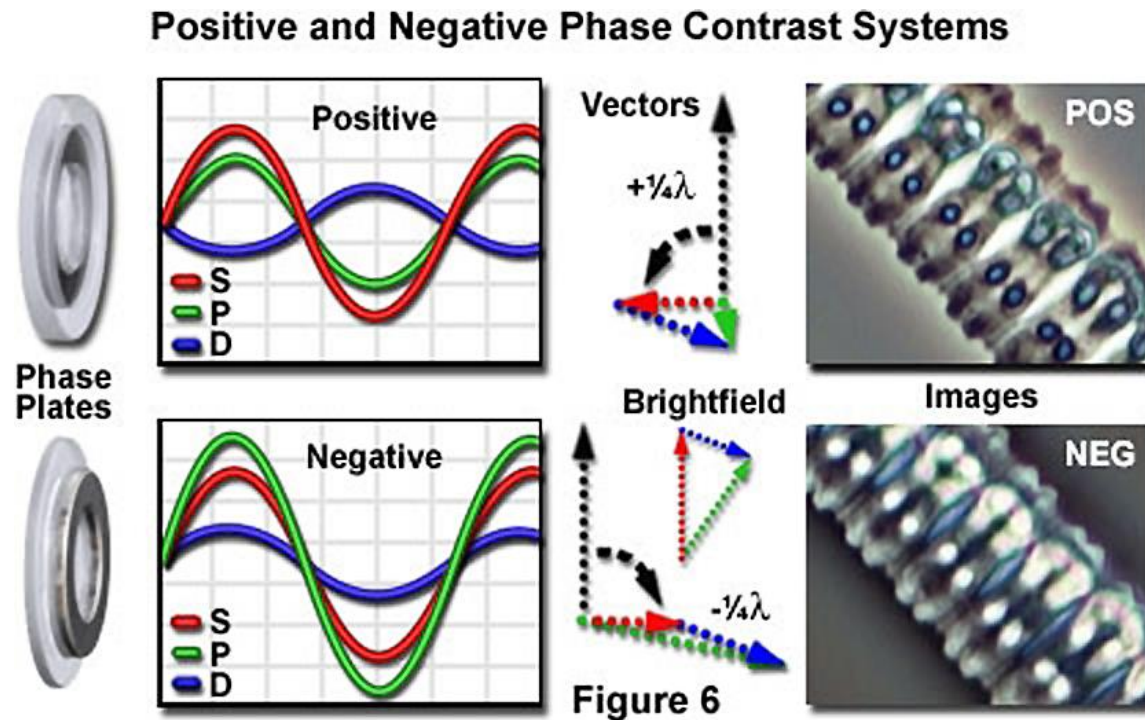


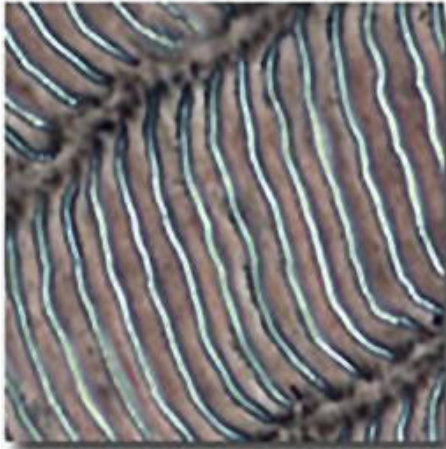
Figure 4

Kontrast fazowy dodatni i ujemny

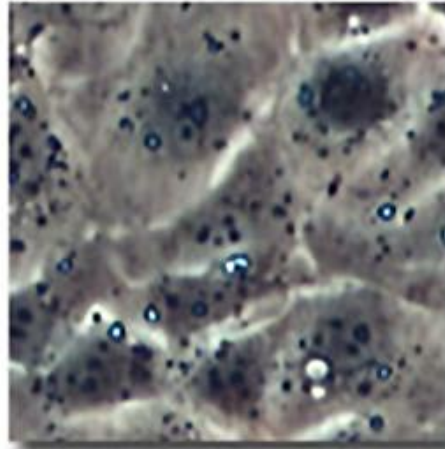


Kontrast fazowy dodatni i ujemny

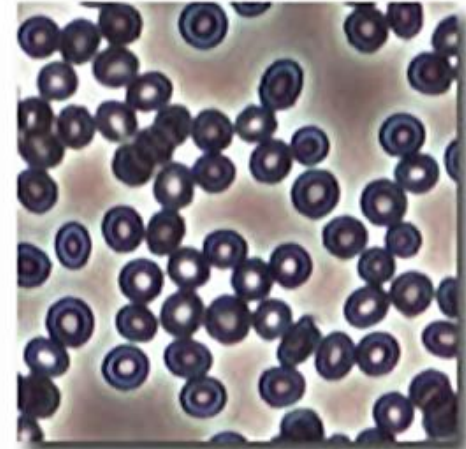
Specimens in Positive and Negative Phase Contrast



(a)



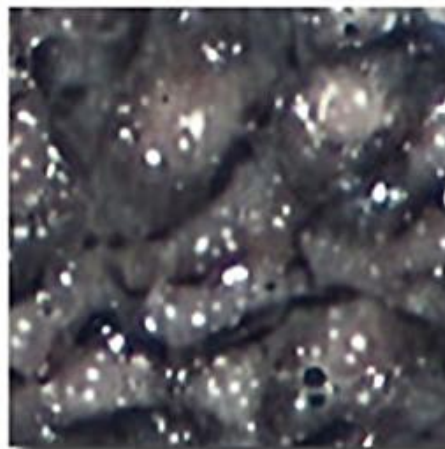
(c)



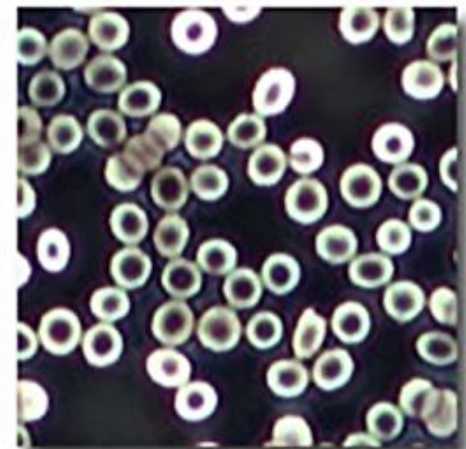
(e)



(b)



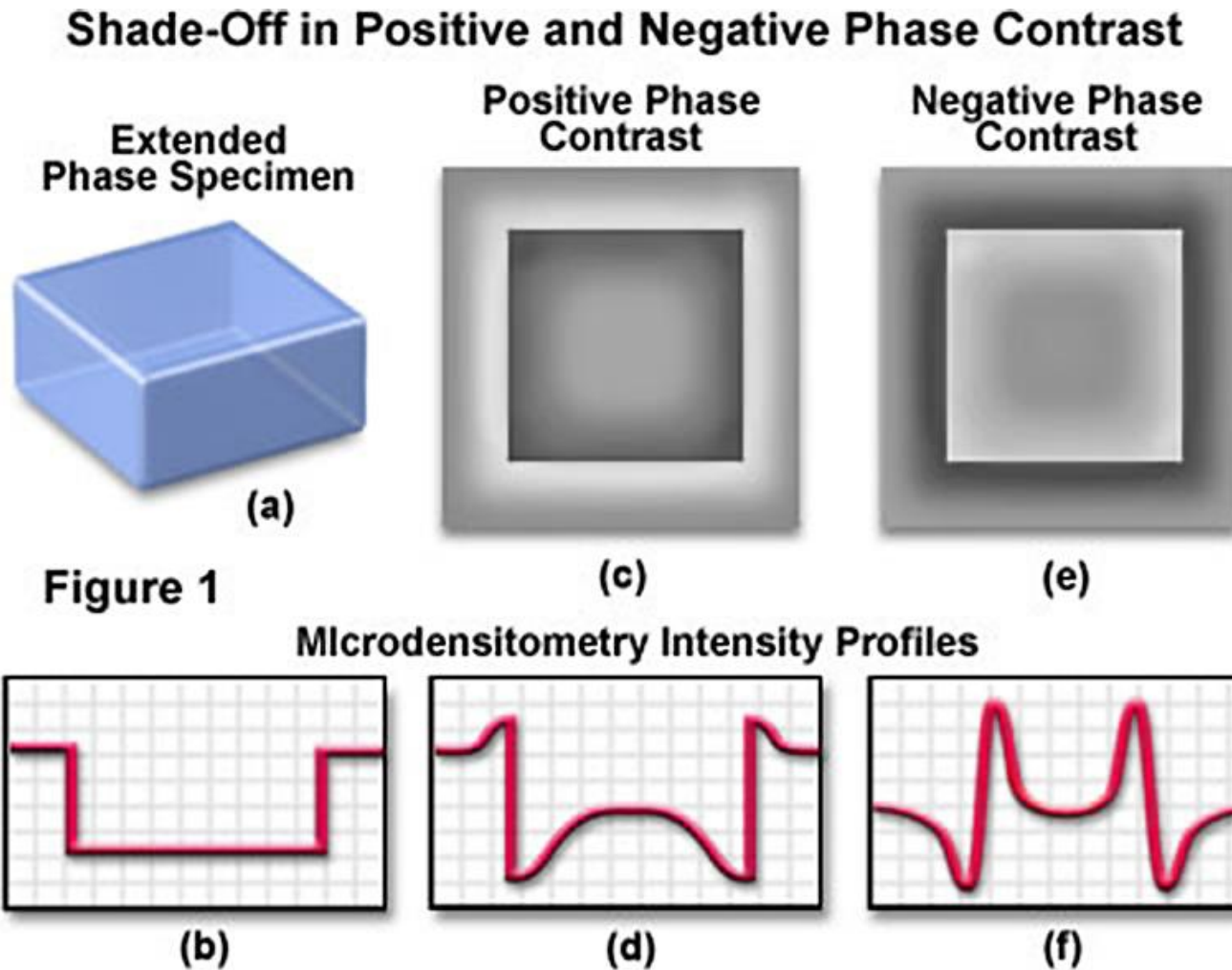
(d)



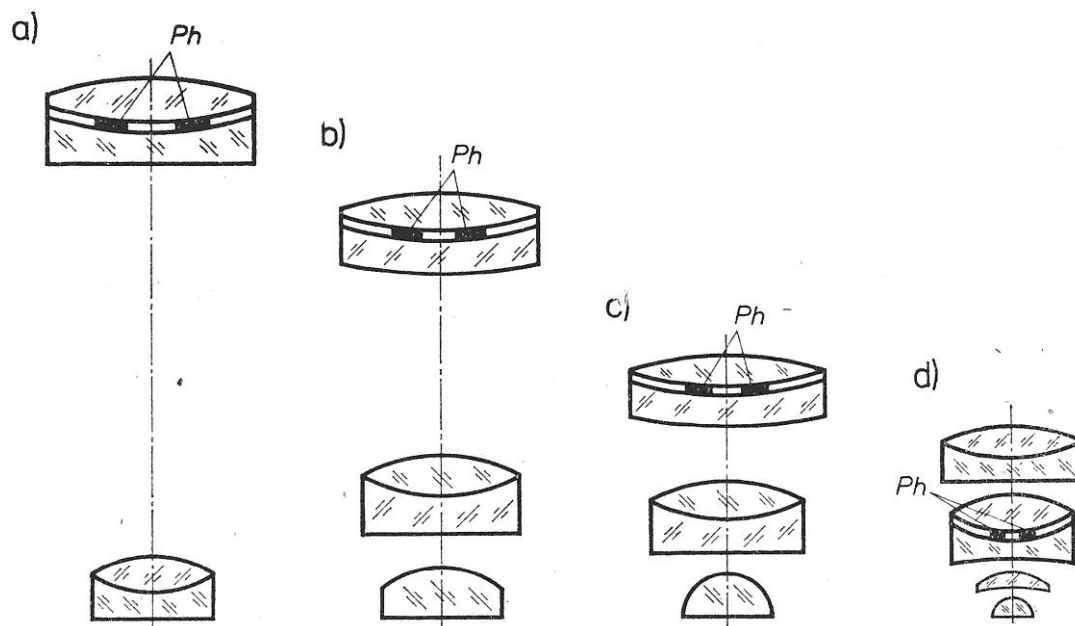
(f)

Figure 7

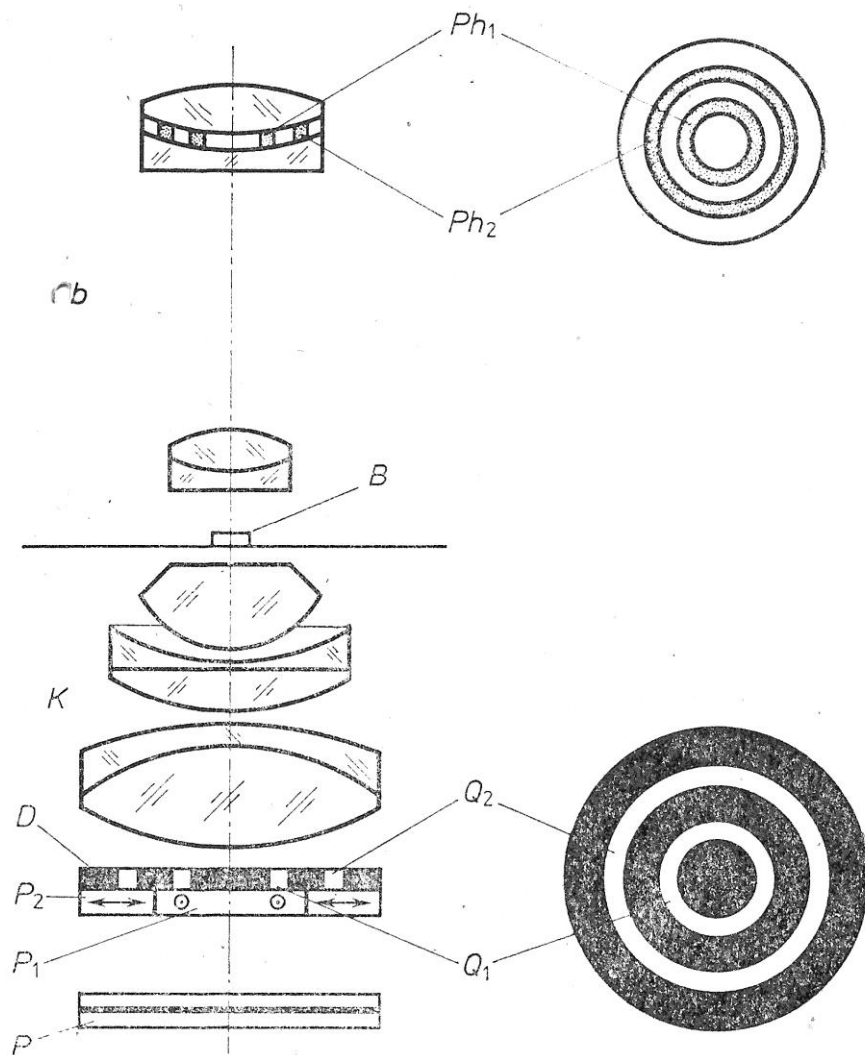
Kontrast fazowy dodatni i ujemny



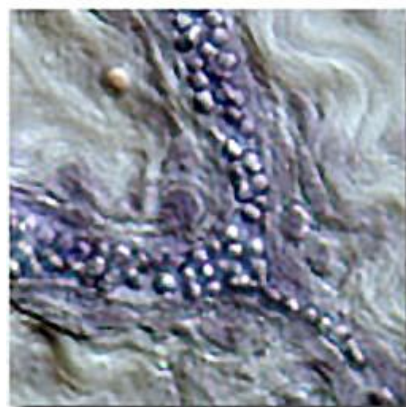
Pierścienie fazowe Ph w obiektywach PZO



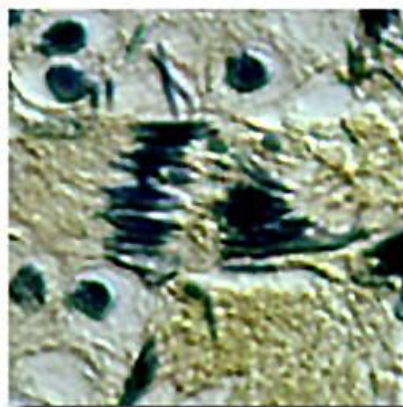
Kontrast przemienny



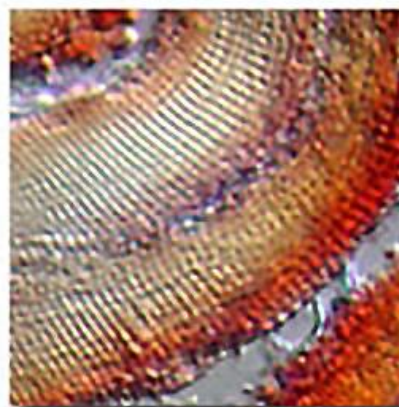
Stained Specimens in Phase Contrast and DIC



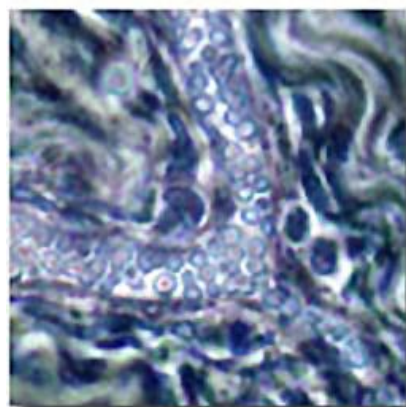
(a)



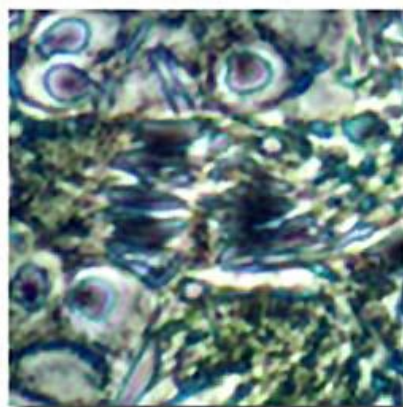
(c)



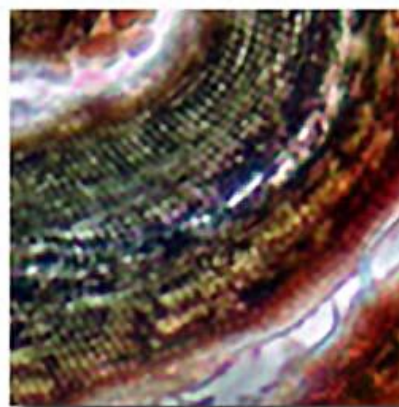
(e)



(b)



(d)



(f)

Figure 7

Characteristic	Phase Contrast	DIC
Image Brightness (Brightfield = 100 Percent)	1.3 Percent	0.36 - 2.3 Percent
Epi-Fluorescence Light Loss (Brightfield = 0 Percent)	28 Percent	73 Percent
Lateral Resolution	Condenser Annulus Restricted	Superior
Axial Resolution (Depth Discrimination)	Poor	Superior
Illuminating Aperture	10 Percent of Objective NA	Variable
Phase Shift Detection Limit	$< \lambda/100$	$< \lambda/100$
Utility at High Phase Shifts	Not Useful	Useful
Azimuthal Effects	No	Yes
Halos and Shade-Off	Yes	No
Stained Specimens	Not Useful	Useful
Birefringent Specimens	Useful	Not Useful
Birefringent Specimen Containers	Yes	No
Brightfield Image Deterioration	Slight	None
Cost	Moderate	High