

Universität Bremen, Fachbereich Physik / Elektrotechnik

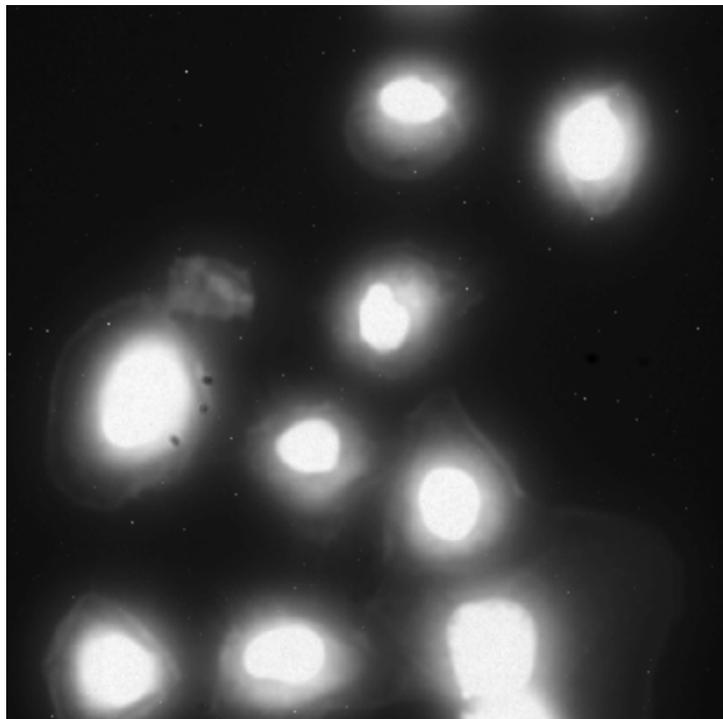
Lichtmikroskopie

Versuchs-Protokoll zum Fortgeschrittenen-Praktikums-Versuch

FP 22

Autor
Alexander Erlich

Tutor:
Meike Gummich



Durchführung: Freitag, 21. Mai 2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Hintergrund	1
2.1	Mikroskop, Vergrößerung und Auflösungsvermögen	1
2.2	Brown'sche Molekularbewegung	2
2.3	Kontrastmethoden	3
3	Versuchsdurchführung und -auswertung	5
3.1	Kalibrierung von Objektiven; Anmerkung zur Tiefenschärfe	5
3.2	Bestimmung der Avogadrokonstante	5
3.3	Vergleich der verschiedenen Mikroskopiemethoden	7
4	Fazit	10

1 Einleitung

Die Lichtmikroskopie ist ein sehr nützliches Werkzeug, um Objekte in der Größenordnung der Lichtwellenlänge aufzulösen. Die Biophysik, welche die Untersuchung von Zellen und lebenden Organismen als Gegenstand hat, hat bei der Mikroskopie ganz eigene Anforderungen. Diese können mit verschiedenen Modifikationen und Erweiterungen des klassischen Mikroskops erfüllt werden, wobei in den unterschiedlichen Mikroskopieverfahren unterschiedliche Aspekte hervorgehoben werden (z.B. Kontrast, Plastizität, Zellkern vs. Zellkörper etc.).

Nach einer Kalibrierung der Objektive soll bei diesem Versuch ein numerischer Wert für die Avogadrokonstante mit Hilfe der Brown'schen Bewegung ermittelt werden. Danach sollen Aufnahmen unterschiedlicher Mikroskopieverfahren betrachtet und vergleichend diskutiert werden.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Mikroskop, Vergrößerung und Auflösungsvermögen

Die wichtigsten Bestandteile eines Mikroskops sind in Abb. 1 eingezeichnet und beschriftet. Das Objektiv vergrößert das Objekt und erzeugt ein reelles Zwischenbild. Das Okular dient als Lupe und bewirkt eine weitere Vergrößerung. Es entsteht ein deutlich vergrößertes virtuelles Bild, das letztendlich beobachtet wird. Aus diesem Grund setzt sich die Gesamtvergrößerung V_{Gesamt} aus den Vergrößerungen V_{Objektiv} und V_{Okular} einfach zu

$$V_{\text{Gesamt}} = V_{\text{Objektiv}} \cdot V_{\text{Okular}}$$

zusammen.

Die Abb. 1 zeigt ein sehr vereinfachtes Bild; bei handelsüblichen Mikroskopen kommen in der Regel ganze Linsensysteme (statt jeweils nur *einer* Linse für Okular und Objektiv) zum Einsatz, um Abbildungsfehler (z.B. sphärische und chromatische Aberration) möglichst zu unterdrücken. Ebenfalls typisch sind z.B. Blenden zur Regulierung der Lichtintensität, Spiegel zur Umleitung des Strahlengangs, oder auch monochromatische Filter und Polarisationsfilter, wie sie bei bestimmten Variationen der Lichtmikroskopie (siehe Abschnitt 2.3) zum Einsatz kommen.

Auflösungsvermögen

Das Auflösungsvermögen ist die kleinste Strecke, auf der man Objekte noch unterscheiden kann (d.h. die kleinste Strecke, die man noch auflösen kann). Sie ist durch das RAYLEIGH'sche Kriterium

$$\Delta x = 1,22 \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \tag{1}$$

Dabei ist n der Brechungsindex, λ die Wellenlänge des verwendeten Lichtes und α der Öffnungswinkel des Objektivs. Man nennt die Größe $n \sin \alpha$ numerische Apertur; sie kann z.B. durch Zugabe eines Immersionsöls erhöht werden (da dieses die Brechzahl n erhöht).

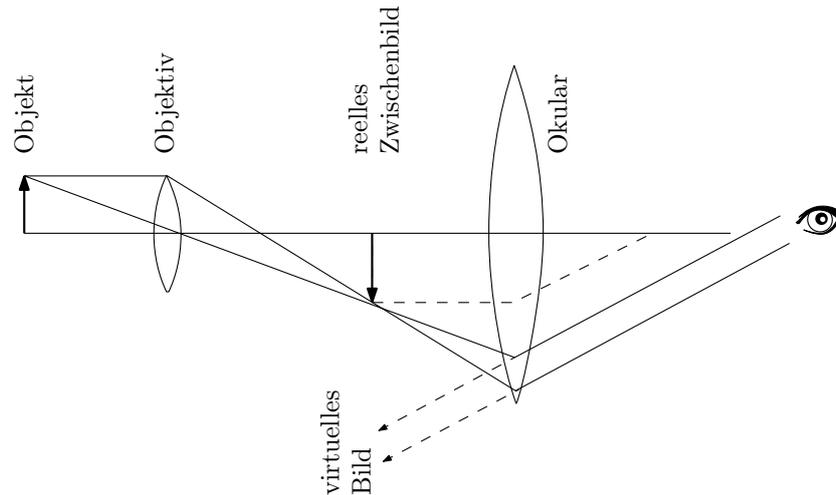


Abbildung 1: Schematische Skizze der wichtigsten Bestandteile eines Mikroskops

Erniedrigt man in Gl. (1) den Öffnungswinkel α , wird weniger Licht durchgelassen, worunter das Auflösungsvermögen leidet. Eine Erhöhung der Wellenlänge (d.h. Verwendung von Strahlung geringerer Energie) hat denselben Effekt. Gl. (1) hat ihren Ursprung in einer optischen Überlegung: Die Beugungsbilder zweier Objekte sind gerade noch unterscheidbar (d.h. die Auflösungsuntergrenze ist erreicht), wenn das 1. Minimum des einen mit dem Hauptmaximum des anderen Objekts zusammenfällt. Rücken die Objekte weiter zusammen, verschmelzen die Beugungsbilder; eine Unterscheidung ist dann nicht mehr möglich.

2.2 Brown'sche Molekularbewegung

Eine Gleichung für die Avogadro-Konstante N_A

Bei der Brown'schen Bewegung beobachtet man bei diesem Versuch eine Art Zitterbewegung von kleinen Latex-Kügelchen (Radius $1,1 \mu\text{m}$), die dadurch entsteht, dass die Latex-Kügelchen von Molekülen der sie umgebenden Lösung auf rein statistisch verteilte Weise gestoßen werden. Somit ändert ein im Mikroskop beobachtetes Kügelchen ständig scheinbar zufällig seine Richtung (random walk).

Es wird also durch die umgebende Lösung thermische Energie auf Latex-Kügelchen übertragen. Die Energie wird wiederum durch Reibung wieder ans Medium (die Lösung) abgegeben:

$$D f = k_B T \quad (2)$$

Dabei ist D die Diffusionskonstante, k_B die Boltzmann-Konstante und f der Stokes'sche Reibungskoeffizient

$$f = 6 \pi \eta r \quad (3)$$

Hier ist wiederum η die Viskosität und r der Radius des Kügelchens.

Zwischen k_B , der Avogadro-Zahl N_A sowie der allgemeinen Gaskonstante R besteht der Zusammenhang

$$R = k_B N_A \quad (4)$$

Setzt man den Reibungskoeffizienten gemäß Gl. (3) in Gl. (2) ein und berücksichtigt dabei Gl. (4), ergibt sich für die Avogadro-Zahl der Zusammenhang

$$N_A = \frac{RT}{6 \pi \eta r D} \quad (5)$$

Für die Bestimmung eines Zahlenwertes für N_A sind die Messgrößen T , η und r leicht zugänglich; eine umfangreichere Aufgabe des Experimentes wird es sein, die Diffusionskonstante D zu bestimmen.

Zur Bestimmung von D

Das Diffusionsgesetz beschreibt den zeitlichen Zusammenhang der mittleren Fluktuation $\langle r^2 \rangle$ eines Teilchens:

$$\langle r^2 \rangle = 2 n D t \quad (6)$$

Über eine Messung wird es in dem Versuch möglich sein, die Diffusionskonstante D über einen linearen Fit zu erhalten und somit nach Gl. (5) einen empirischen Wert für die Avogadro-Konstante N_A zu bekommen.

2.3 Kontrastmethoden

Phasenkontrast

Ein Strahlenbündel trifft zuerst auf eine ringförmige Blende, die das Licht einen dünnen Spalt (in Ringform) durchqueren lässt. Wenn das Strahlenbündel durch eine Kondensor-Linse auf die biologische Probe (z.B. Zelle) fokussiert wird, treffen benachbarte Lichtstrahlen auf unterschiedliche Teile der Probe. Da der Brechungsindex nicht homogen verteilt ist und auch die Form der Probe nicht homogen ist, hat z.B. ein aus der Probe austretender Lichtstrahl eine Phasenverschiebung gegenüber dem Hintergrundlicht (markiert in Abbildung 2 links).

Die Phasenlage des Hintergrundlichts wird mittels eines in der hinteren Brennebene des Objektivs befindlichen optisch dichten Elements (ein Ring aus durchsichtigem, optisch dichtem Material, der sogenannte Phasenring) so weit verschoben, dass das Hintergrundlicht bei Interferenz mit dem phasenverschobenen Licht (welches durch die Probe gegangen ist) das phasenverschobene Licht möglichst weitgehend schwächt. Dadurch erscheint nun die Probe dunkel vor hellem Hintergrund.

Da sich der Brechungsindex annähernd proportional mit der Dichte der Probe ändert, entspricht die Helligkeitsverteilung des Bildes in etwa der Dichteverteilung im Proben-Material. Dies ist ein besonders wichtiger Aspekt bei der Deutung der Bilder. Lediglich Halos, die bei Phasenkontrast-Bildern oft an Rändern von z.B. Zellen zu sehen sind, verfälschen den räumlichen Eindruck, d.h. Halos bewirken einen dreidimensionalen (bzw. dreidimensional wirkenden) Effekt, der nicht unbedingt der räumlichen Struktur des Objekts entsprechen muß.

Differentialkontrast-Mikroskopie (DIC)

Das erste Nomarski-Prisma (es besteht aus zwei doppelbrechenden Calcit-Prismen, die an der Unterseite zusammengekittet sind, siehe Abb. 2 rechts) sorgt dafür, dass das Objektiv von zwei senkrecht zueinander polarisierten Wellenzügen durchstrahlt wird. Diese erfahren beim Durchgang durch die Probe eine Phasenverschiebung. Wenn aber nur *einer* der Teilstrahlen eine Phasenverschiebung beim Durchgang durch die Probe erfährt, während der andere sie ungestört passiert, ist der Phasenunterschied besonders groß – deshalb wird der Rand in DIC-Bildern oft besonders plastisch (daraus kann man natürlich nicht einfach auf die Form der Probe schließen). Nach Zusammenführung der Teilstrahlen im zweiten Nomarski-Prisma werden die Polarisationsrichtungen durch den Analysator zusammengeführt, so dass es zu Interferenz kommen kann.

Es ist übrigens auch wichtig, wie die Probe orientiert ist, d.h. unter Drehung der Probe ergeben sich andere Bilder. Es ist ebenfalls möglich, mit einem $\lambda/4$ -Plättchen zusätzlich ein Farbkontrast zu erzeugen.

Wie angedeutet ist das räumliche Aussehen von DIC-Aufnahmen mit Vorsicht zu betrachten, da Phasenverschiebungen teilweise aus Gradienten im Brechungsindex (d.h. Proben-Dichteverteilung), teilweise aus Gradienten im Gangunterschied (d.h. Probenform) resultieren. Dies ist ein ähnliches Problem wie bei der Phasenkontrast-Methode. Allerdings kann DIC verwendet werden, um Bereiche aufzulösen, die bei der Phasenkontrast-Methode von Halos überdeckt sind.

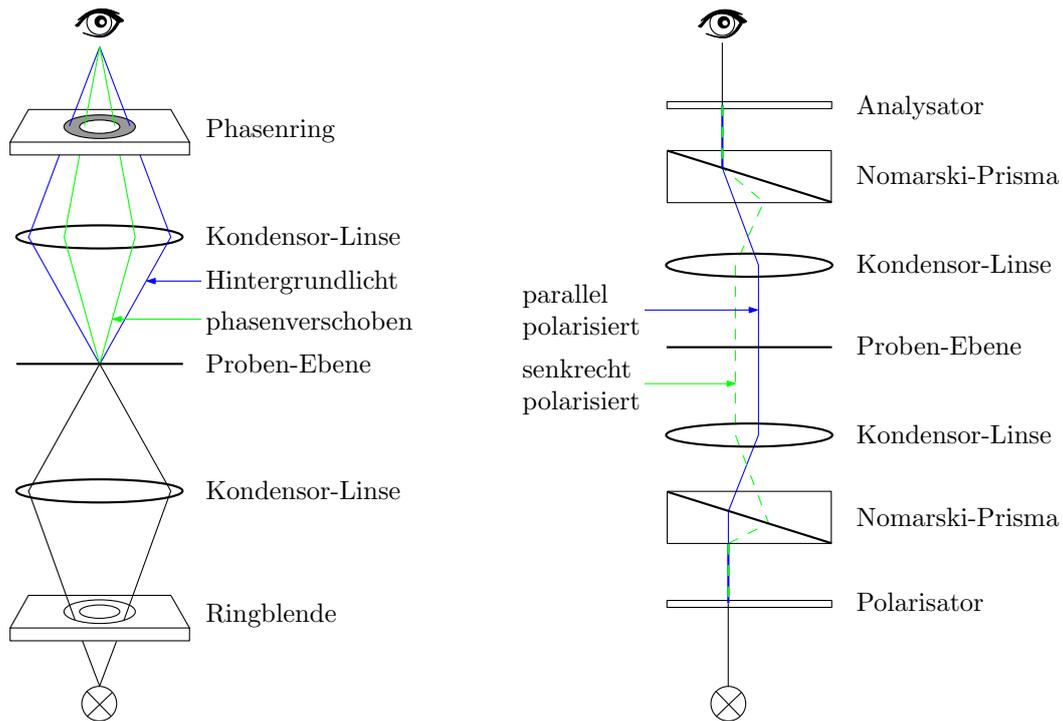


Abbildung 2: Schematische Skizzen für Phasenkontrast (links) und DIC (rechts)

Reflexions-Interferenzkontrast-Mikroskopie (Antiflex-Technik)

Vom Licht einer HBO-Lampe wird zunächst die grüne Farbe gefiltert (siehe Abb. 3). Das Strahlenbündel durchquert ein Blendensystem (Aperturblende und Feldblende) und trifft auf den Polarisator, der das Licht linear polarisiert. Über einen halbdurchlässigen Spiegel gelangt das Strahlenbündel auf eine Kondensatorlinse (hier gleichbedeutend mit dem Objektiv), die eine Besonderheit hat: Es ist darin ein $\lambda/4$ -Plättchen verbaut, welches eine zirkulare Polarisation bewirkt. Das Strahlenbündel wird somit (in zirkular polarisierter Form) auf die Proben-Oberfläche fokussiert. Von der Probe gehen die Lichtstrahlen (gebündelt) in Richtung des Beobachters ab. Auf dem Weg dahin treffen die Lichtstrahlen nochmal die $\lambda/4$ -Platte (wo sie wieder linear polarisiert werden) und treten durch halbdurchlässigen Spiegel und Analysator wieder zum Auge des Beobachters, um dort zur Interferenz zu gelangen. Da aber – wenn man zwei unterschiedliche Lichtstrahlen betrachtet – die Probe (je nach ihrem Höhenprofil) einen Gangunterschied zwischen den Lichtstrahlen bewirkt, kommt es (je nach Gangunterschied) zu konstruktiver oder destruktiver Interferenz. Daher ist eine Antiflex-Aufnahme im Prinzip eine (qualitative) Höhendarstellung.

Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird ausgenutzt, dass bei Molekülen in der Regel die Anregungsfrequenz nicht der Relaxationsfrequenz entspricht. Der Grund sind Molekülschwingungen, die vor dem Relaxieren bereits Energie dissipieren, so dass die Relaxationsfrequenz etwas niedriger ist als die Anregungsfrequenz. Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird eine Probe mit Fluoreszenzfarbstoff markiert, dessen Anregungs- und Relaxationsfrequenz charakteristisch und somit vorher genau bekannt sind. Filter 1 in Abb. 3 lässt nur die Anregungsfrequenz durch, während Filter 2 nur die Relaxationsfrequenz durchlässt. Der Strahlengang wird damit leicht verständlich: Licht, das Filter 1 passiert hat, wird mit einem halbdurchlässigen Spiegel auf die Probe gelenkt, wo es den Fluoreszenzfarbstoff anregt. Vor der zweiten Kondensatorlinse (sie entspricht hier im Prinzip dem Okular) sorgt Filter 2 dafür, dass nur das Licht der Relaxationsfrequenz durchgelassen wird, so dass man die Probe deutlich hervorgehoben sieht (in unterschiedlichen Intensitäten, je nach Dicke der Probe und Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffs).

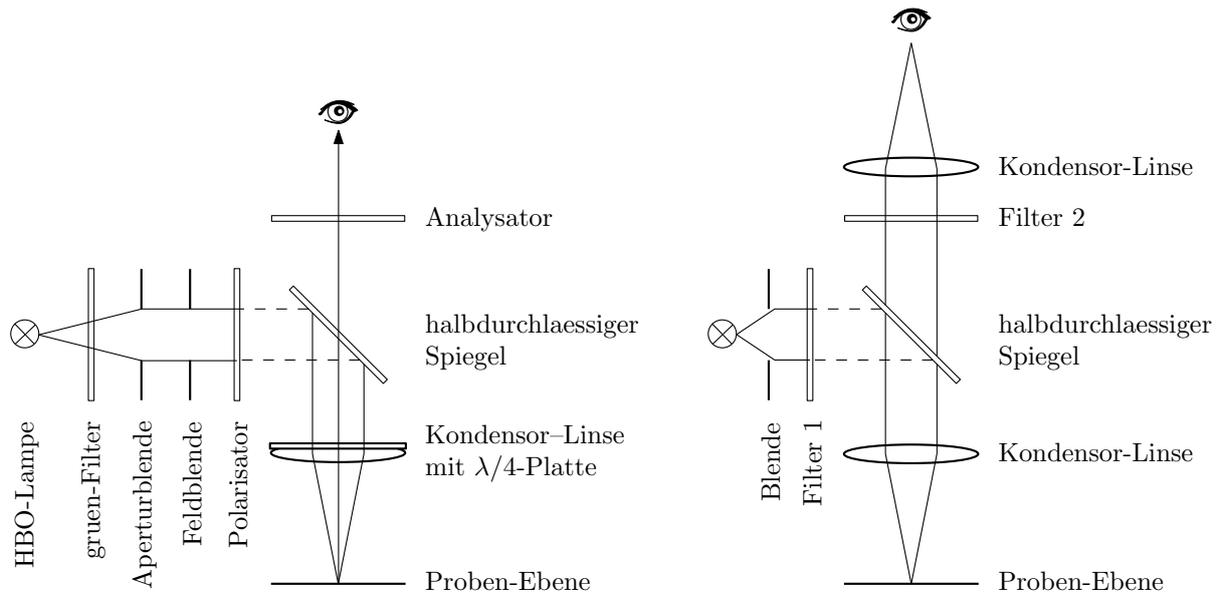


Abbildung 3: Schematische Skizze für Antiflex-Mikroskopie (links) und Fluoreszenzmikroskopie (rechts)

3 Versuchsdurchführung und -auswertung

3.1 Kalibrierung von Objektiven; Anmerkung zur Tiefenschärfe

Auf die Probenebene wird ein Kalibriermaßstab gelegt. Um bei den jeweiligen Objektiven einer bestimmten Vergrößerung eine Pixelzahl zuzuordnen, wird ein Kalibrierungsfaktor $k = l/p$ benötigt, der eine reale Länge l (abgelesen auf dem Kalibriermaßstab) mit einer Pixelzahl p des Computerbildes verknüpft. Ein Pixel entspricht der kleinsten auflösbaren Größe und setzt somit die Auflösungsgrenze fest.

Für die Fehlerwerte wurde $\Delta l = 0.01l$ und $\Delta p = 3px$ gewählt. Der Fehler berechnet sich gemäß Größtfehlerabschätzung zu

$$k = \frac{l}{p} \Rightarrow \Delta k = \left| \frac{\Delta l}{p} \right| + \left| \frac{l \Delta p}{p^2} \right|$$

Die Vergrößerung der Objektive und der dazugehörige Kalibrierparameter mit zugehörigem Fehlerbereich sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Objektiv	Kalibrierparameter k (in nm/px)
4x	1860 ± 30
20x	369 ± 4
40x	190 ± 2
63x	118 ± 1
100x	75 ± 1

Die Tiefenschärfe entspricht der maximalen Länge, in der die Probe vom Fokus des Objektivs weg bewegt werden kann, so dass das Bild hinreichend scharf bleibt. Prinzipiell könnte man sie wie folgt messen: Würde man den Kalibriermaßstab nicht gerade, sondern leicht schräg auf die Probenebene legen, so könnte man direkt auf der Skala des Kalibriermaßstabes ablesen und abschätzen, ab welcher Länge das die Skala verschwommen und nicht mehr lesbar ist.

3.2 Bestimmung der Avogadrokonstante

Es soll eine Lösung mit Latex-Kügelchen in einer geschlossenen Kammer (Radius $1.1\mu m$) verstaubt werden. Die Moleküle der Lösung stoßen – statistisch verteilt – mit den Latex-Kügelchen und lassen diese einen random walk vollführen. Wichtig ist hier, dass die Kammer dicht verschlossen ist und keine Luft enthält, um thermischen Drift zu vermeiden. Diese Kammer wird realisiert, indem zunächst Vakuumpaste quadratförmig auf ein Glasplättchen aufgetragen wird, so dass man eine Art „Becken“ hat. Dieses

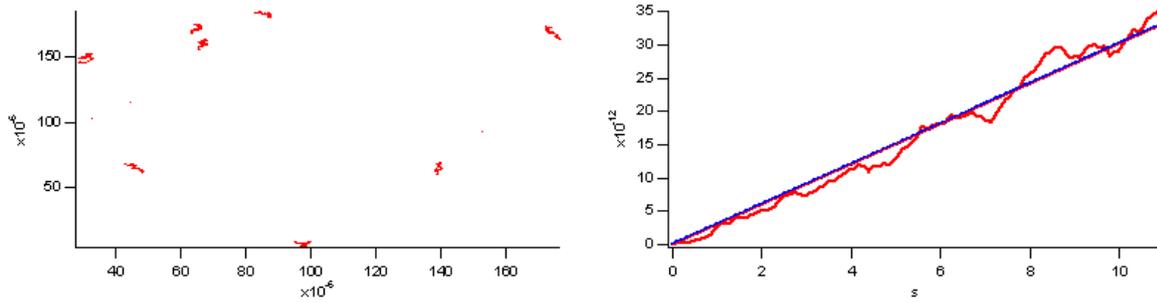


Abbildung 4: Spuren der Latex-Kügelchen über einen Zeitraum von 11 s (links) und dazugehöriger linearer fit $y(t) = \langle r^2 \rangle = 4Dt$ (rechts)

wird dann mit der Lösung mit Latex-Kügelchen gefüllt. Schließlich wird das gefüllte Becken mit einem weiteren Glasplättchen von oben verschlossen, so dass man eine geschlossene Kammer hat. Bei einem random walk sollten die Latex-Kügelchen Stöße erfahren, die ihre Bewegung „zufällig“ erscheinen lassen: nach zufälliger Zeit verursacht ein Stoß eine zufällige neue Richtung mit zufälliger neuer Geschwindigkeit.

Ziel ist es, mit Hilfe einer Videoaufnahme (Sequenz von 100 Bildern, die einen Zeitraum von 11 s beschreiben) die Bewegung der Kügelchen softwaregesteuert zu verfolgen und gemäß

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt \quad (7)$$

(dies entspricht Gl. (6) mit $n = 2$ Freiheitsgraden) die Diffusionskonstante D per linearem fit zu bestimmen.

Einzelne Latex-Kügelchen

Zunächst werden probeweise zwei Kügelchen manuell ausgewählt und deren Weg in der Ebene über die Zeit verfolgt. Es wird r_i^2 über t aufgetragen, so dass aus der Steigung des zugehörigen fits D_i bestimmt werden kann. Es ergibt sich:

$$D_1 = 2,499 \cdot 10^{-12} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$$

$$D_2 = 1,438 \cdot 10^{-12} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$$

Mittelung über Schar von Latex-Kügelchen

Die Gleichung (7) benötigt eigentlich eine Mittelwertbildung, wobei aber bei der Betrachtung der einzelnen Latex-Kügelchen $\langle r^2 \rangle = r_i^2$ gesetzt wurde, was einer sehr starken Vereinfachung entspricht und die starke Abweichung von D_1 zu D_2 erklärt. Es ist softwaregesteuert aber auch möglich, eine Schar von Kügelchen automatisch zu verfolgen und auch automatisch eine Mittelung $\langle r^2 \rangle$ durchzuführen. Hier ergab sich

$$D_{\text{Schar}} = (0,76 \pm 0,08) \cdot 10^{-12} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$$

Eine Auftragung der Spuren der betrachteten Schar von Kügelchen sowie des zugehörigen linearen fits sind in Abb. 4 dargestellt.

Bestimmung eines Wertes für N_A

Die Avogadro-Konstante N_A lässt sich über

$$N_A = \frac{R}{k} = \frac{RT}{6\pi\nu x D}$$

berechnen, mit ν als Viskosität des Mediums (hier Wasser mit $\nu = 1\text{mPas}$), T als Temperatur ($T = 300\text{K}$) und der universellen Gaskonstanten $R = 8,314472 \frac{\text{J}}{\text{mol K}}$. Es ergibt sich:

$$N_A = (1,5829 \pm 0,1) \cdot 10^{23} \frac{1}{\text{mol}} \quad \text{Literaturwert: } 6,02214 \cdot 10^{23} \frac{1}{\text{mol}}$$

Die deutliche Abweichung vom Literaturwert könnte sich dadurch erklären lassen, dass für die Bewegung tatsächlich $f < 2$ galt, d.h. dass die Bewegung teilweise eingeschränkter war als zweidimensional. Dies würde bei gleichbleibender Steigung $m = 2Df$ einen kleineren Wert für D und somit einen größeren für N_A ergeben. Es ist z.B. denkbar, dass ein benachbartes (nicht im mikroskopierten Abschnitt sichtbares) Luftbläschen, oder ein herausstechendes Stück der Vakuumpaste die Einschränkung der Bewegung bewirkte.

Alternative Verfahren zur Bestimmung von N_A

- Eine Alternativmethode, um die Avogadro-Konstante zu messen, ist den Zusammenhang $F = N_A e$ zwischen der Faraday-Konstante F und der Elementarladung e auszunutzen.
- Eine weitere Möglichkeit ist Röntgenspektroskopie: Nimmt man einen Kristall (z.B. kubisches Gitter) und misst spektroskopisch seine Kantenlänge, lässt sich N_A aus Kenntnis über die Elementarzelle (Zahl der Atome, Volumen) bestimmen.

3.3 Vergleich der verschiedenen Mikroskopiemethoden

Im Vergleich zwischen Phasenkontrast und Hellfeld (Abb. 5) ist der augenfälligste Unterschied, dass die Phasenkontrast-Aufnahme kontrastreicher und plastischer wirkt. Man sieht wichtige Merkmale (Zellkern, Zellrand) darin besser als in der Hellfeldaufnahme. Problematisch sind die Halos, welche im Inneren der Zelle das Auflösungsvermögen deutlich verringern. Insgesamt scheint bei dieser Gegenüberstellung die Phasenkontrast-Methode vorteilhafter. Die Hellfeld-Aufnahme kann die Phasenkontrast-Aufnahme ergänzen, wenn es um Details geht sowie um den Bereich, der im Phasenkontrast durchs Halo verborgen ist.

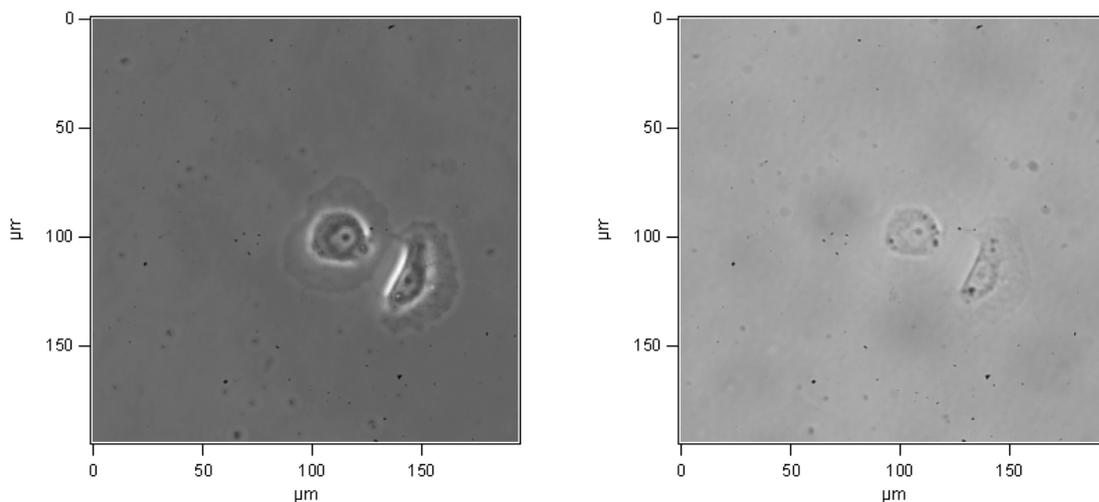


Abbildung 5: Phasenkontrast- (links) und Hellfeldaufnahme (rechts) desselben Probenausschnitts von Ratten-Nieren (NRK: normal rat kidney)

Die DIC-Aufnahmen in Abb. 6 sind leider wenig geglückt; es ist zweifelhaft, ob die abgebildete Struktur eine Zelle ist. Einige wichtige Merkmale der DIC-Mikroskopie sind trotzdem zu erkennen: Die Strukturen wirken sehr plastisch, und es ist ein deutlicher Unterschied in der Tiefenschärfe zu sehen (die rechte Bildhälfte ist deutlich unschärfer und somit weiter vom Objektiv entfernt als die linke Bildhälfte).

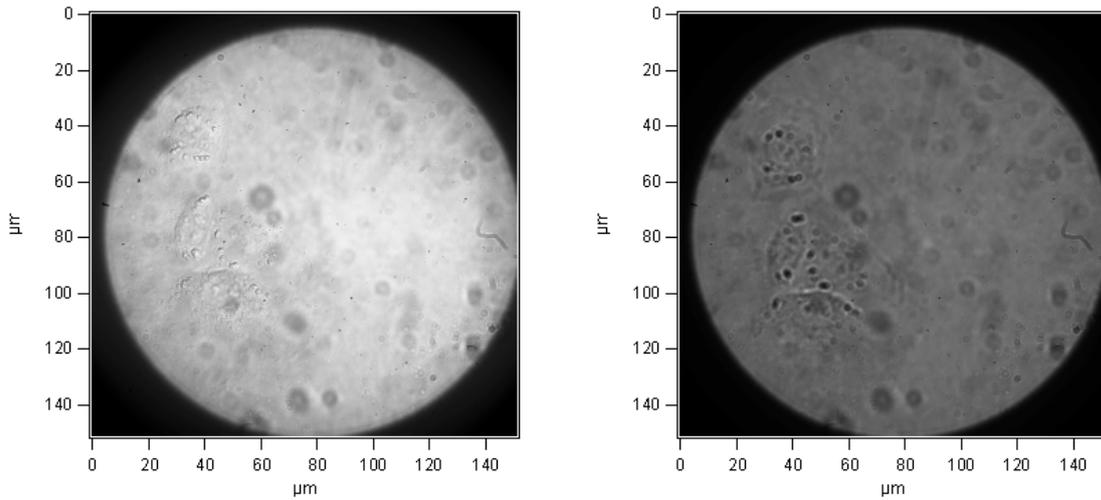


Abbildung 6: DIC-Aufnahmen desselben Probenausschnitts (verschiedene Helligkeitseinstellungen)

In Abb. 7 wird ein Fluoreszenzbild einer Phasenkontrastaufnahme gegenübergestellt. Das Ethidium-Bromid zeigt besonders starke Reaktion im Fluoreszenzbild, weil es an DNA/RNA bindet, während Rhodamin-Phalloidin bei actinreichen (Actin ist ein Protein des Cytoskeletts) Materialien stark fluoresziert. Dies erklärt die Färbung im Fluoreszenzbild: Ethidium-Bromid hebt die Zellkerne hervor, Rhodamin-Phalloidin den Zellkörper. Im Zellkern-Bereich kommt es zur Überlagerung und somit zu besonders starker Fluoreszenz. Der Bereich außerhalb des Kerns ist deutlich schwächer hervorgehoben, weil nur noch Rhoadmin-Phalloidin allein für die Fluoreszenz verantwortlich ist.

Die Phasenkontrast-Aufnahme reagiert natürlich nicht auf die Fluoreszenz-Farbstoffe und ist damit eine gewöhnliche Aufnahme mit den typischen Merkmalen der Methode: Das Bild ist kontrastreich und lässt die Inneren Bestandteile der plastisch und gut erkennbar erscheinen (verglichen mit der Fluoreszenz-Aufnahme), doch es gibt auch einige Halos im oberen Bereich des Bildes, die die Auflösung insbesondere im Zellinneren erniedrigen. Trotzdem ist für detailliertere Betrachtungen der Zellen und ihrer Bestandteile bei diesem Ausschnitt die Phasenkontrastmethode deutlich vorzuziehen, wohingegen für größere Bildausschnitte die Fluoreszenz-Methode deutlich besser verraten würde, wo sich Zellen befinden (z.B. für computergestützte Methoden, um für statistische Zwecke Zellen pro Fläche zu zählen).

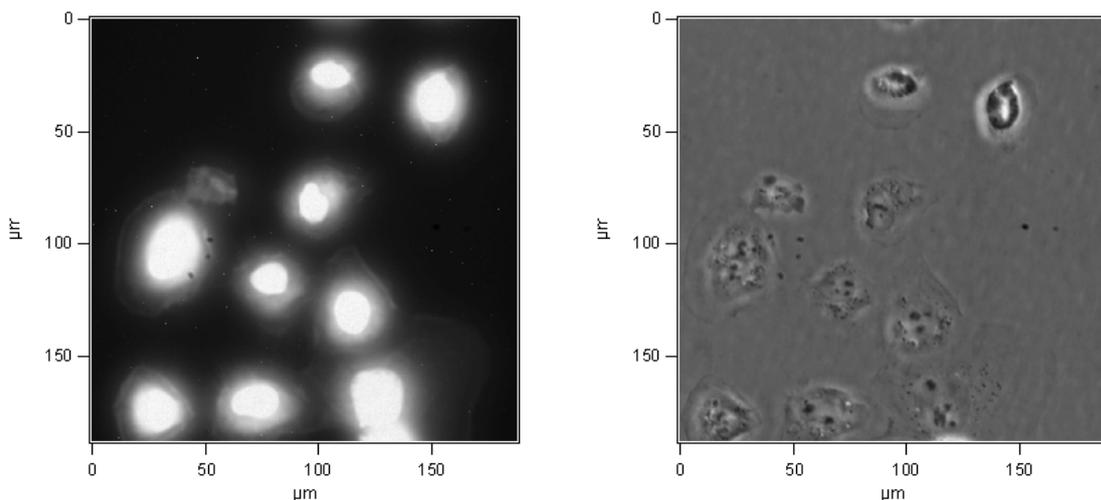


Abbildung 7: Fluoreszenz- (links) und Phasenkontrastaufnahme (rechts) desselben Probenausschnitts. Der Farbstoff für Fluoreszenzmikroskopie sind Ethidium-Bromid sowie Rhoadmin-Phalloidin.

Die Betrachtung der Antiflex-Aufnahmen (Abb. 8) zeigt sofort einen kritischen Aspekt der Antiflex-Mikroskopie auf. Zwar bekommt man (aufgrund der Gangunterschiede) ein tatsächliches Höhenprofil der Probe. Die Gangunterschiede bei destruktiver (im Bild dunkel) und konstruktiver (im Bild hell) Interferenz sind

$$\Delta s_{\text{destruktiv}} = \frac{\lambda}{2}, 3\frac{\lambda}{2}, 5\frac{\lambda}{2}, \dots, \frac{2n+1}{2}\lambda \quad \Delta s_{\text{konstruktiv}} = 0, \lambda, 2\lambda, \dots, n\lambda \quad n = 0, 1, 2 \dots$$

Dies bedeutet also, dass man sozusagen nur bei Höhen im Bereich $0 \leq h \leq \lambda/2$ eine eindeutige Zuordnung hat, nämlich $h = 0$ komplett konstruktive Interferenz (weiß) und $h = \lambda/2$ für komplett destruktive Interferenz (schwarz), und $0 < h < \lambda/2$ für die entsprechenden Graustufen. Die in Abb. 8 dargestellten Proben haben aber mit Sicherheit Höhen $h > \lambda/2$ (wenn man z.B. das Glasplättchen, auf dem sie liegen, als Nullniveau ansieht). Dies kann man daran erkennen, dass der Zellenrand dunkler als die Umgebung ist. Wäre nämlich in der tat $0 \leq h \leq \lambda/2$, würde in der Aufnahme der Zellrand einen „Krater“ im Glasplättchen verursacht haben (d.h. tiefer liegen als das Glasplättchen, also $h < 0$), was aber nicht gegeben ist. Insofern muss man bei der Interpretation von Antiflex-Aufnahmen als Höhenprofile, da der gleiche Farbwert zu Höhen gehören kann, die unterschiedlichen (halb- oder ganzzahligen) Vielfachen der verwendeten Lichtwellenlänge entsprechen.

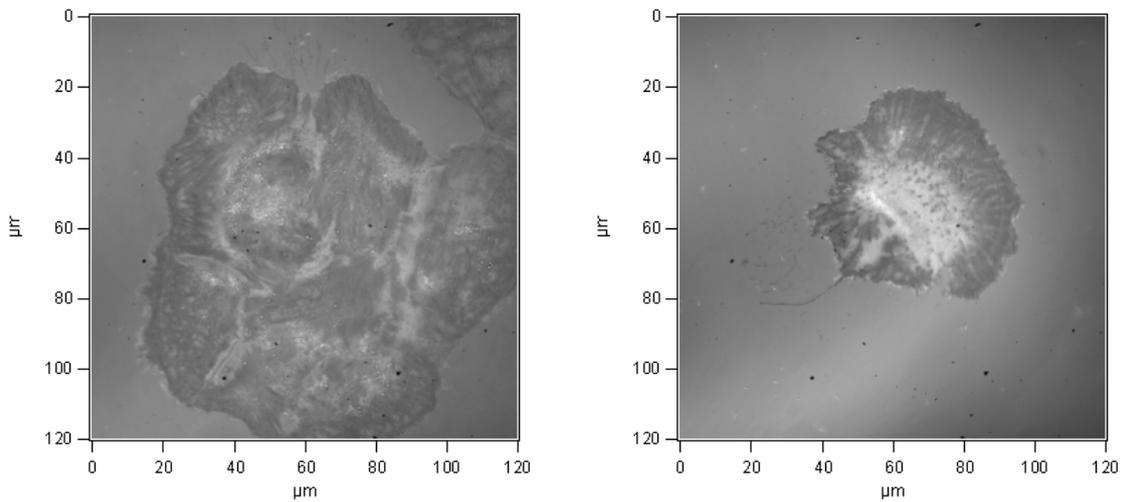


Abbildung 8: Zwei verschiedene Zellen in Antiflex-Aufnahme.

4 Fazit

Die Bestimmung der Avogadrokonstante lieferte zwar einen Wert in der richtigen Größenordnung, jedoch war der gemessene Wert zu klein. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Annahme von zwei Freiheitsgraden (Bewegung in zwei Dimensionen) hier falsch ist, da die tatsächliche Bewegung (zumindest im durchs Mikroskop betrachteten Bereich) eingeschränkter sein könnte (möglicherweise durch ein benachbartes, nicht im Ausschnitt gesehenes Luftbläschen).

Der Vergleich der Kontrastmethoden war weitgehend erfolgreich. Lediglich die DIC-Aufnahme ist wenig gelungen. Trotzdem konnte man auch mit der gegebenen Aufnahme die Eigenschaften des Differentialkontrast-Mikroskopie gut diskutieren. Auch bei den anderen Mikroskopie-Verfahren konnte man recht gut die Vor- und Nachteile sehen und diskutieren (z.B. Höhenverhältnisse, aber nicht absolute Höhen beim Antiflex-Verfahren) und es ist deutlich geworden, warum oft nur eine Kombination der Verfahren (z.B. DIC oder Hellfeld zum Auflösen der Artefakte, die von den Halos der Phasenkontrast-Methode überdeckt sind, oder aber Fluoreszenz zum Auffinden von Zellen bzw. Zellkernen und Phasenkontrast/DIC/Hellfeld für die anschließende Detailansicht der Zellen) zum bestmöglichen Messergebnis führt.

Literatur

- [1] Wolfgang Demtröder: *Experimentalphysik 2 – Elektrizität und Optik*. Springer, 2007
- [2] Paul A. Tipler: *Physik*. Spektrum Akademischer Verlag, 1994
- [3] Molecular Expressions – *Optical Microscopy Primer*. URL: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/anatomyjava.html>, letzter Zugriff: 16. Juni 2010
- [4] Versuchsanleitung „Lichtmikroskopie“. URL: <http://praktikum.physik.uni-bremen.de/images/pdf/fp/Lichtmikroskopie.pdf>, letzter Zugriff: 16. Juni 2010.