



Abb. 1.1: Sonnenlicht fällt durch ein metallenes Gitter in eine staubige Scheune. Die Staubpartikel streuen das Licht in alle Richtungen und können deshalb von außerhalb des Strahlverlaufes wahrgenommen werden (Dunkelfeld). Abgesehen von der Geometrie ist dies bereits „Lichtblattphotographie“.



Abb. 2.1: Goldrubinglas mit der typischen roten Färbung im Durchlicht einer Schreibtischlampe. Die rote Färbung kommt durch die Absorption kurzer Wellenlängen. Rotes Licht wird nicht absorbiert, daher sieht man nur noch den roten Anteil des weißen Lichtes. Herkunft des Glases: Farbglasshütte Reichenbach GmbH; Reichenbach/OL. Mechanische Bearbeitung: Optische Lehrwerkstätten, Leica in Wetzlar.

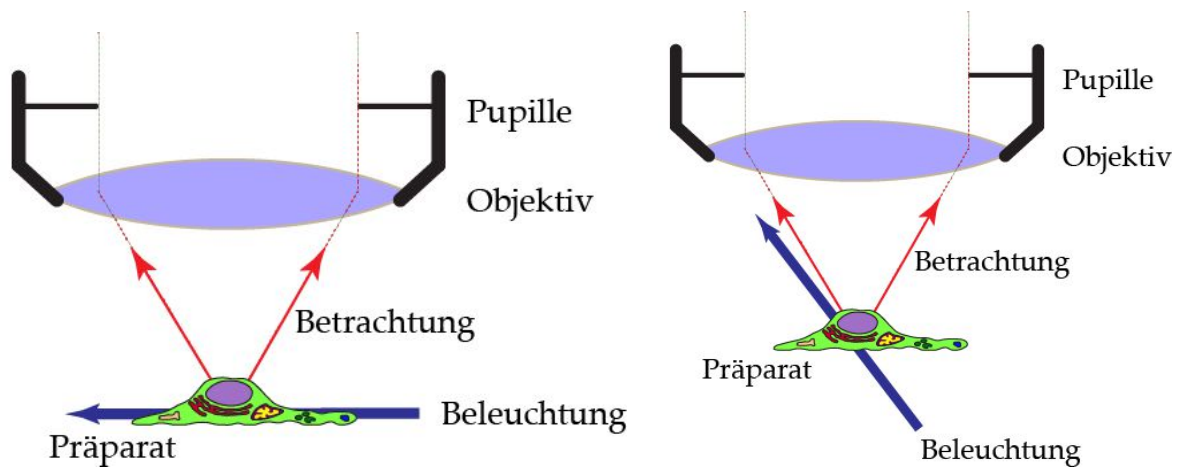


Abb. 2.2: links: Dunkelfeld. Wird in einem Winkel beleuchtet (blauer Pfeil), der nicht in den Öffnungswinkel des Objektives (aufgespannt durch die beiden roten Pfeile) fällt, dann bleibt für den Beobachter der Hintergrund (das Feld) dunkel. Rechts: der extreme Fall ist eine Beleuchtung senkrecht zur optischen Achse des Mikroskopes. Das ist bei der Lichtblatt-Mikroskopie der Fall

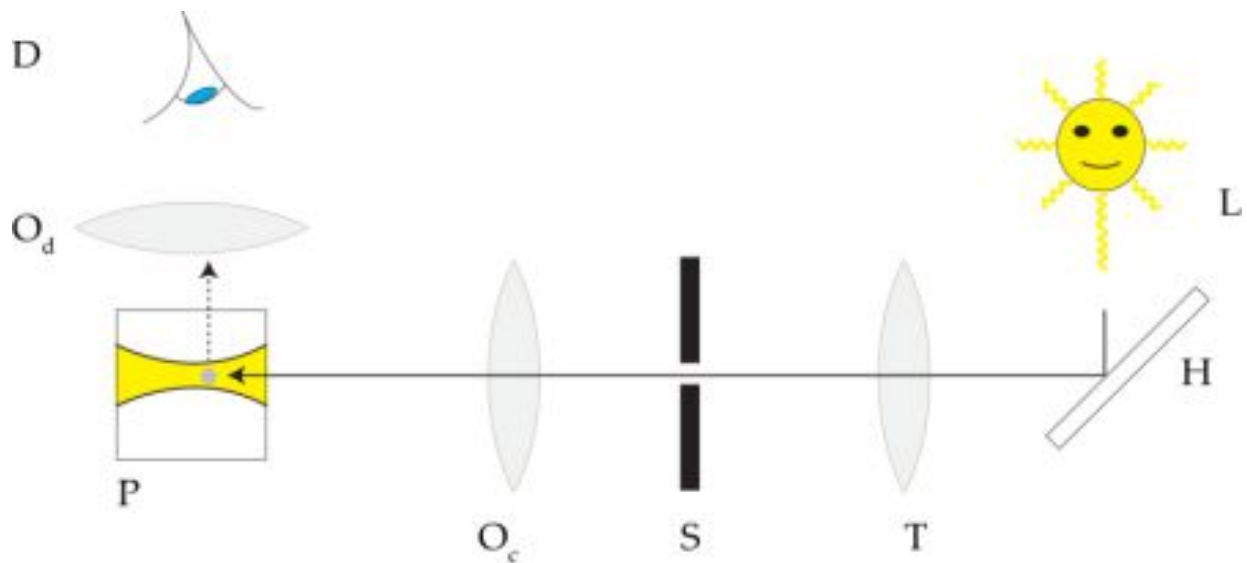


Abb. 2.3: Spalt-Ultramikroskop von Henry Siedentopf (schematisch). Die Lichtquelle L, hier die Sonne, wird über einen Heliostaten H mittels eines Teleskopes T auf einen einstellbaren Spalt S abgebildet. Dieser Spalt wird anschließend mittels eines Objektives OC in das Präparat P übertragen. Dort wird eine in Höhe und Breite einstellbare dünne Schicht stark beleuchtet. Kleine Partikel (hier: grauer Kreis) streuen das Licht auch senkrecht zur Beleuchtungsachse und können mit einem weiteren Objektiv OD dem Detektor D zugeführt werden.

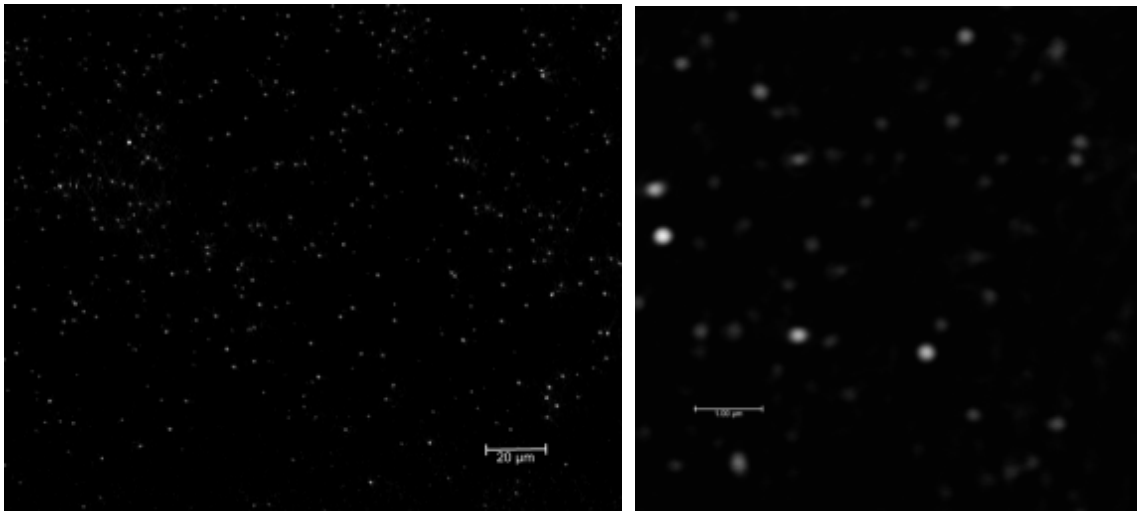


Abb. 2.4: Sterne im Glas. Das Stückchen Goldrubinglas aus Abb. 2.1 im Lichtblatt-Mikroskop (links) und im konfokalen Mikroskop (rechts). Der Unterschied ist ausschließlich im Abbildungsmaßstab und in der Größe der Beugungsscheibchen zu finden, beides wird durch die verwendete Optik bestimmt. Ein Ausschnitt aus dem Sternenhimmel bietet genau den gleichen Eindruck, da auch hier nur die Beugungsmuster weit entfernter Objekte zu sehen sind, die für uns hier nicht aufgelöst werden können, die Quellen also quasi punktförmig sind.

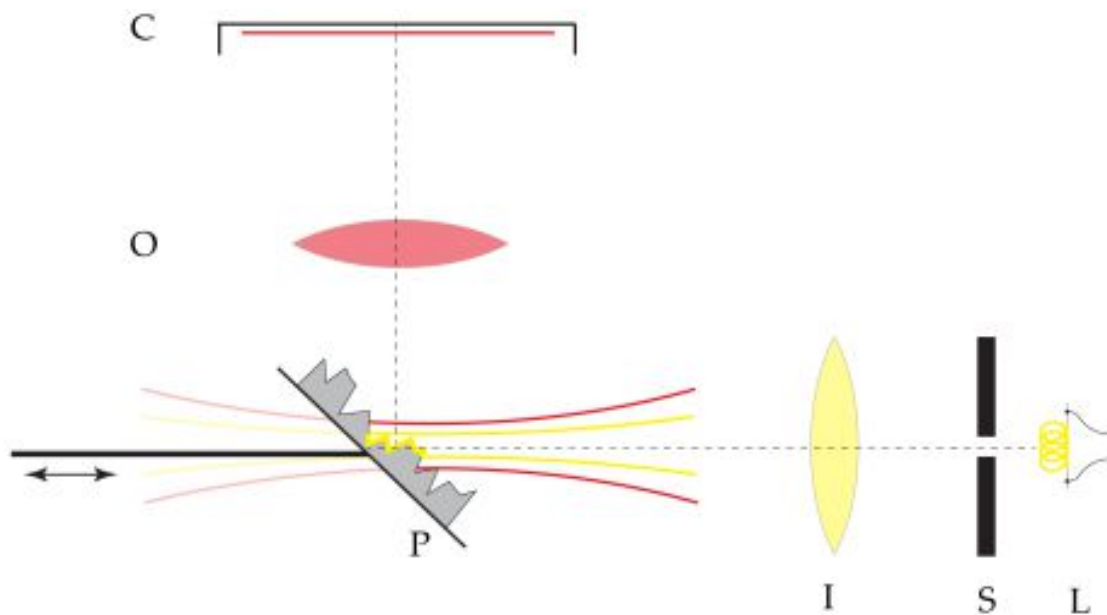


Abb. 3.1: Aufbau des Mikroskopes mit extremer Tiefenschärfe (nach McLachlan 1964). Eine Lichtquelle L beleuchtet einen dünnen Spalt S. Dieser Spalt wird mit einer Beleuchtungsoptik I in das Präparat P abgebildet und erzeugt dort entlang der Beleuchtungsachse ein Lichtblatt. Die Beleuchtung ist in gelber Farbe gehalten. Zur Beobachtung dient eine Kamera C, deren Objektiv O einen Bereich des Präparates scharf abbildet. Dieser Bereich ist die Tiefenschärfe, angedeutet durch die roten gekrümmten Linien und steht senkrecht zur Beobachtungsachse. Das Lichtblatt liegt damit eingebettet in den Tiefenschärfebereich der Kamera. Folglich werden nur scharfe Bildanteile aufgezeichnet (gelbe Linie auf der Präparateoberfläche). Um das ganze Objekt abzubilden, kann das Präparat entlang der Beleuchtungsachse kontinuierlich verschoben werden (Doppelpfeil). Es entsteht ein Bild, dessen Tiefenschärfe durch den Verfahrbereich definiert wird, der theoretisch beliebig groß sein könnte.

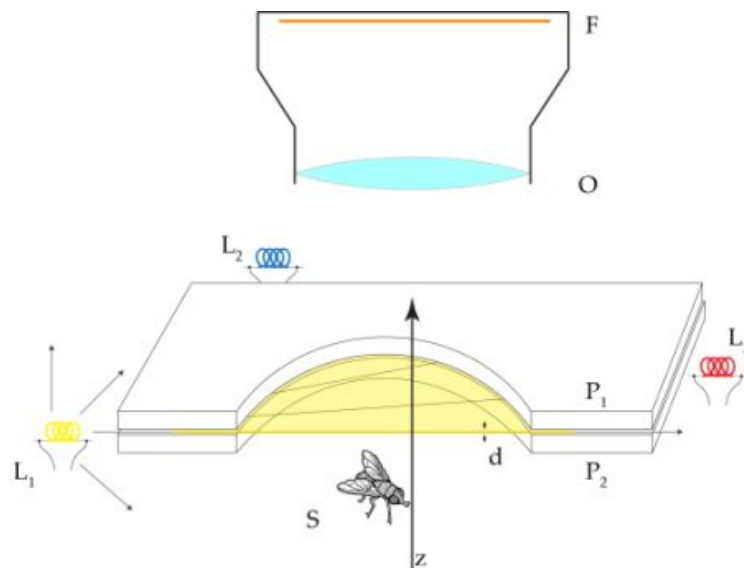


Abb. 3.2: Vereinfachte Vorrichtung, mit der Bilder mit extremer Tiefenschärfe aufgenommen werden können (verändert nach Root 1991). Zwei planparallele Platten P_1 und P_2 im Abstand d werden so mit Lichtquellen $L_1 \dots L_n$ beleuchtet, dass in der Öffnung der Platten ein Lichtblatt entsteht. Das Subjekt S wird in z -Richtung durch dieses Lichtblatt bewegt und das gestreute, reflektierte oder emittierte Licht durch ein Objektiv O auf den Detektor F abgebildet.

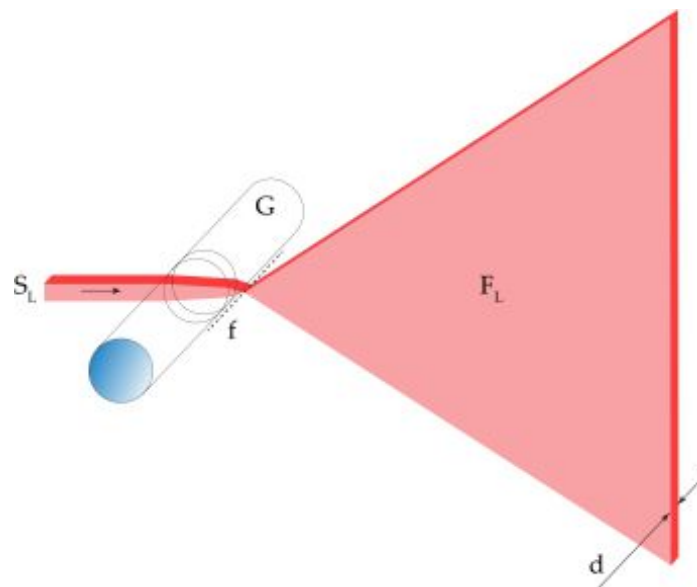


Abb. 4.1: Lichtblatt durch Aufweitung eines Laserstrahles mit einem Glasstab. Ein Lichtstrahl SL (hier der Einfachheit halber mit quadratischem Profil der Kantenlänge d) wird in einem Glasstab G in einer Fokuslinie f gesammelt. Hinter f weitet sich der Strahl zu einem Lichtblatt FL der Dicke d auf. Hinter der Fokuslinie nimmt die Intensität des Lichtes linear in der Ausbreitungsrichtung des Lichtes ab.

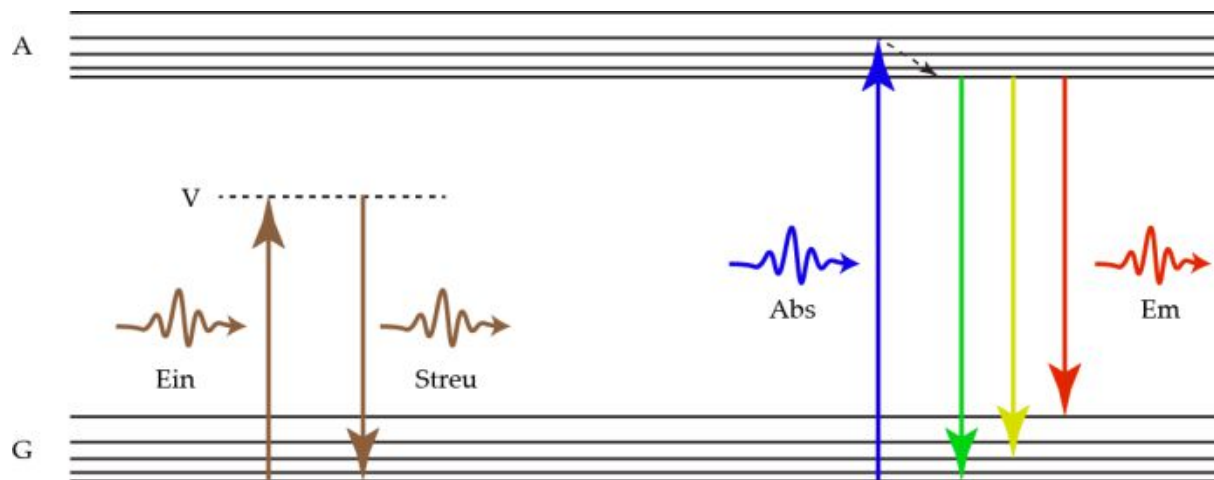


Abb. 4.2: Streuung und Fluoreszenz im Termschema. Streuung (links): ein angestrahltes Objekt befindet sich zunächst im Grundzustand G. Passt die Energie der eintreffenden Photonen (Ein) nicht zu einem höheren Energiezustand, dann nimmt das System einen virtuellen Zustand V ein, aus dem das Photon sofort wieder freigesetzt wird (Streu). Die Energie ist unverändert (und damit auch die Farbe des gestreuten Lichtes), aber die Richtung kann sich geändert haben. Fluoreszenz (rechts): Kann das eingestrahlte Photon das elektronische System des Objektes in einen angeregten Zustand A versetzen, dann wird das Photon absorbiert (Abs). Es fällt sehr schnell in den unteren Schwingungszustand (gestrichelter Pfeil). Nach einer charakteristischen Zeit wird die Energie wieder als Licht abgegeben (Em), wobei das System wieder in einen der Schwingungszustände des Grundzustandes zurückkehrt. Hier ist die Energie des emittierten Photons geringer, die Wellenlänge also größer, die Farbe „röter“.

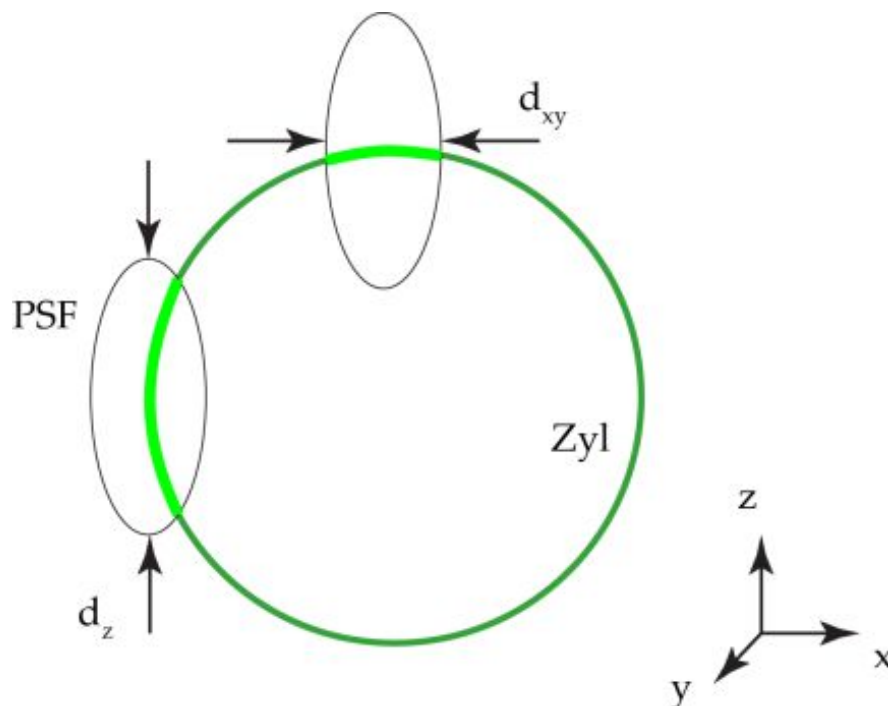


Abb. 5.1: Anisotropie in der Mikroskopie. Die Punktverwaschungsfunktion PSF schneidet aus einem horizontal liegenden Zylinder (Zyl, hier nur ein Querschnitt dargestellt) an den seitlichen Flanken mehr Fläche und der Bildpunkt ist deshalb heller als bei den polaren Flanken. Die Auflösung, umgekehrt proportional zur Ausdehnung d der PSF ist axial schlechter (d_z ist größer) als lateral (d_{xy} ist kleiner).

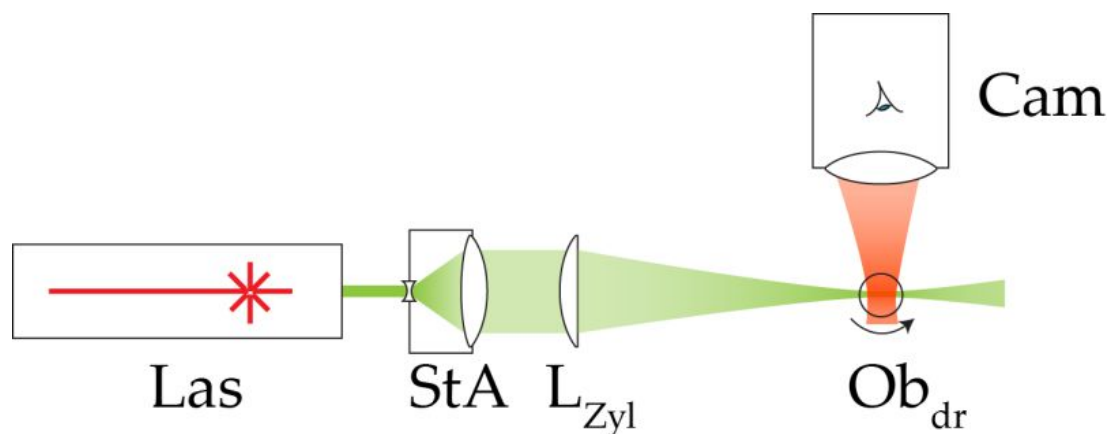


Abb. 5.2: Lichtblattmikroskop für biologische Objekte mit Fluoreszenzfärbung. Das Licht (in grün) aus einem Laser (Las) wird mit einem Strahlaufweiter (StA) aufgeweitet und mithilfe einer Zylinderlinse (L_{Zyl}) fokussiert. Im Fokusbereich wird das Objekt (Ob) drehbar (dr) montiert. Die Emission (in rot) wird senkrecht zur Beleuchtung mit einer Kamera (Cam) aufgezeichnet.

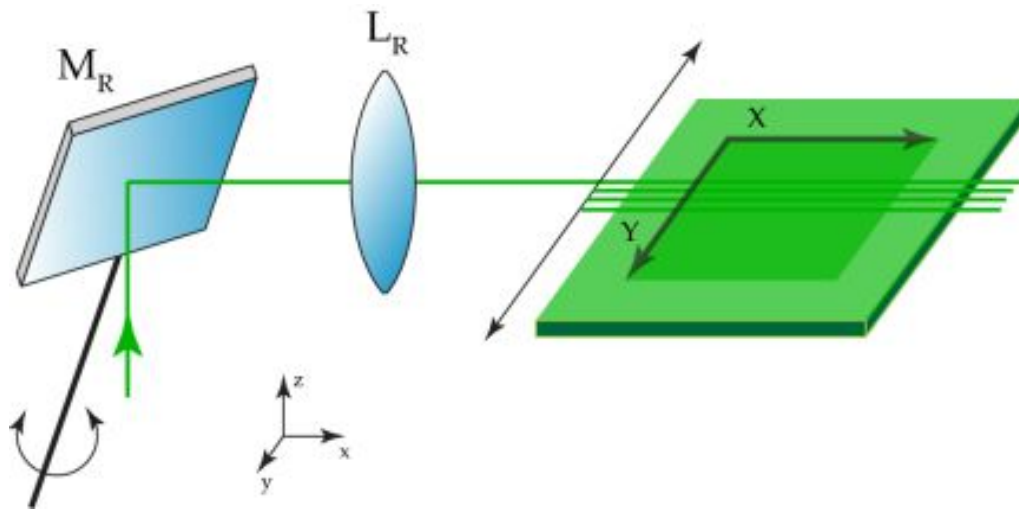


Abb. 6.1: Raster Lichtblatt. Laserlicht (grüner Pfeil) wird von einem Rasterspiegel M_R in eine Rasteroptik L_R geführt. Diese Optik erzeugt einen Bereich um den Brennpunkt herum, der als Lichtfaden bezeichnet werden kann. Wenn durch den Rastervorgang der Lichtfaden im Präparat in der xy-Ebene bewegt wird, erfolgt dadurch eine Beleuchtung des gesamten Feldes. Die Aufnahmezeit der Kamera muss mit diesem Rastervorgang synchronisiert werden oder sehr viel größer als ein Rastervorgang sein.

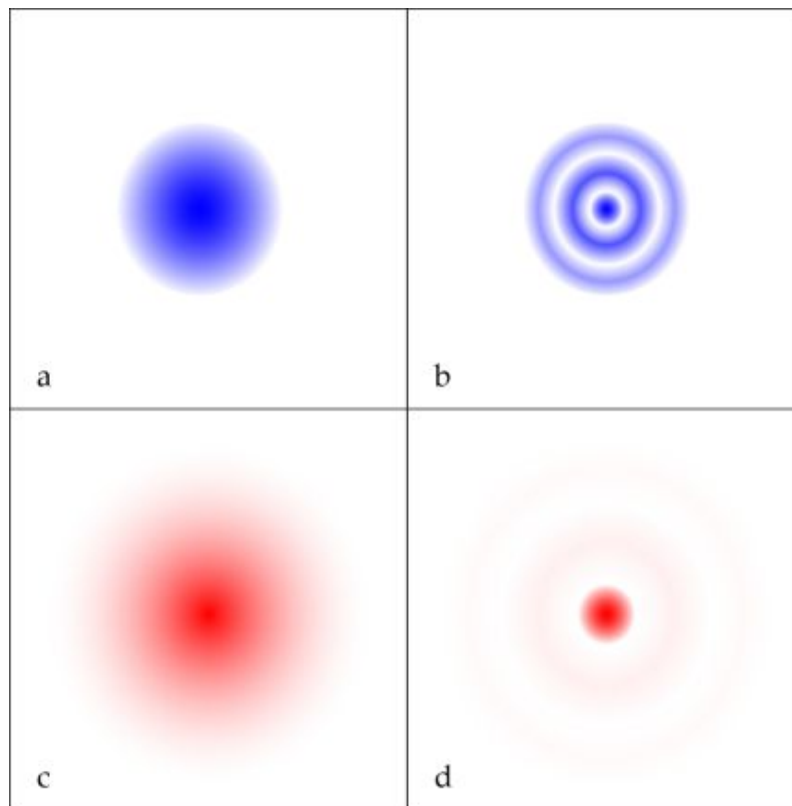


Abb. 6.2: Wirkung der Zweiphotonenanregung in einem Lichtstrahl. Links für ein Gauß-Profil, rechts für ein Bessel-Profil. Während bei der Einphotonenanregung (oben in blau) ein Bessel-Strahl auch Fluoreszenz in den äußeren Hüllen erzeugt, wird dies bei der Zweiphotonenanregung unterdrückt (unten in rot), obwohl dort größere Wellenlängen eingesetzt werden, die die Auflösung proportional verschlechtern.

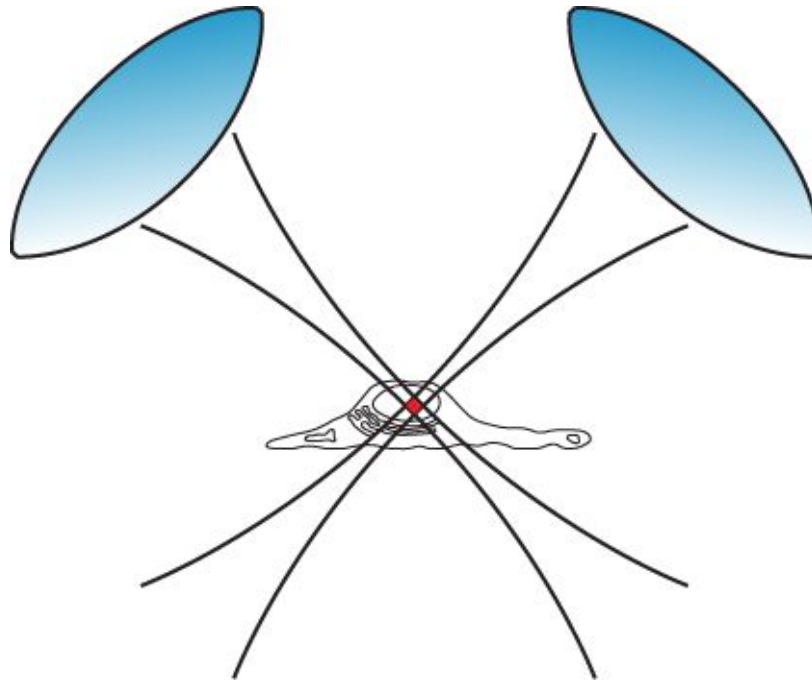


Abb. 6.3: Isotrope Auflösung durch gekreuzten Einsatz von zwei identisch gestalteten Lichtblättern. Einzelheiten im Text.

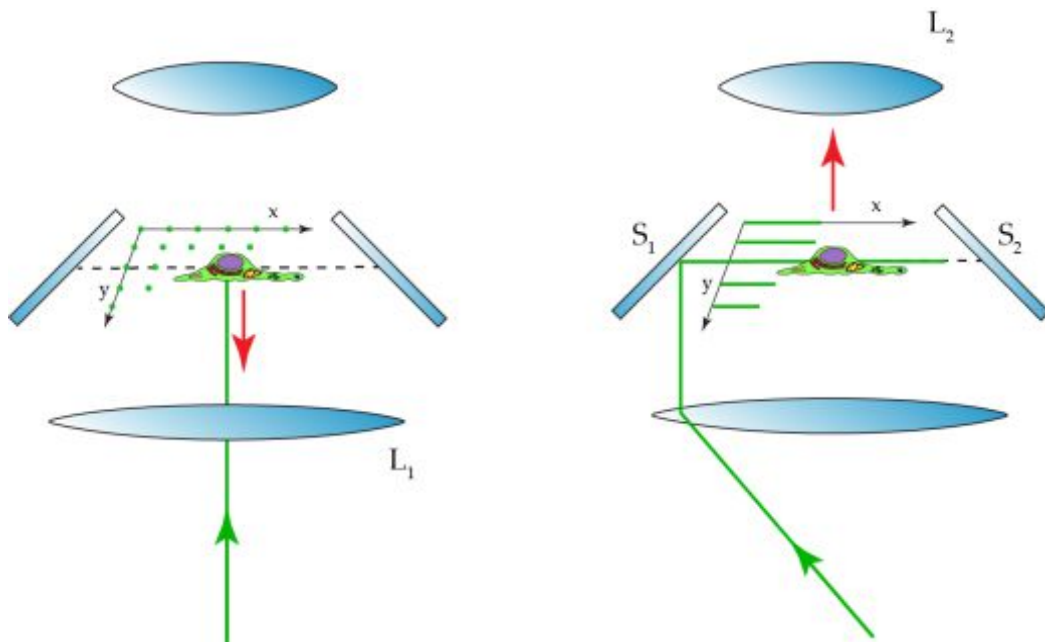


Abb. 6.4: Vertical turn Prinzip. Links: konfokaler Rastermodus. Anregungslicht (grün) wird durch ein Mikroskop-Objektiv L_1 auf die Probe geführt und diese punktuell in x und y abgerastert (grüne Punkte). Das Emissionslicht (rot) wird durch L_1 aufgesammelt und dem Detektor zugeführt (nicht dargestellt). Rechts: Lichtblattmodus. Anregungslicht (grün) wird durch L_1 auf den Spiegel S_1 geführt und dadurch horizontal in der Fokusebene (gestrichelte Linie) in die Probe geleitet. Die Probe wird zeilenweise abgerastert. Das Emissionslicht (rot) wird durch L_2 aufgesammelt und dem Detektor zugeführt (nicht dargestellt). Alternativ kann auch mit dem Spiegel S_2 von der Gegenseite beleuchtet werden.