

Fázový kontrast

Hana Cempírková, Ph.D.

Význam fázového kontrastu

- **objekty amplitudové** = barevné nebo nabarvené – větší nebo menší měrou absorbují světlo = mění amplitudu procházejícího vlnění
- **objekty fázové** = od svého okolí se liší jen malou změnou indexu lomu = nemění amplitudu vlnění, ale posunují jeho fázi
- lidské oko není citlivé na posun fáze

- fázový kontrast přeměňuje fázové posuny vlnění na změnu amplitudy a umožňuje tak pozorování **živých nebarvených objektů**

Fritz Zernike – holandský fyzik nositel Nobelovy ceny za fyziku v roce 1953

- Formuloval zásady fázového kontrastu
- Poprvé je publikoval v roce 1935
- Podle jeho patentu byl v roce 1941 vyroben prototyp ve firmě Zeiss Jena.
- Od roku 1945 se toto zařízení začalo sériově vyrábět a získalo si mnoho uživatelů.
- Léta 1948 – 1955 byla obdobím největšího rozkvětu aplikací fázově - kontrastní mikroskopie, především v biologii.



1888 – 1966

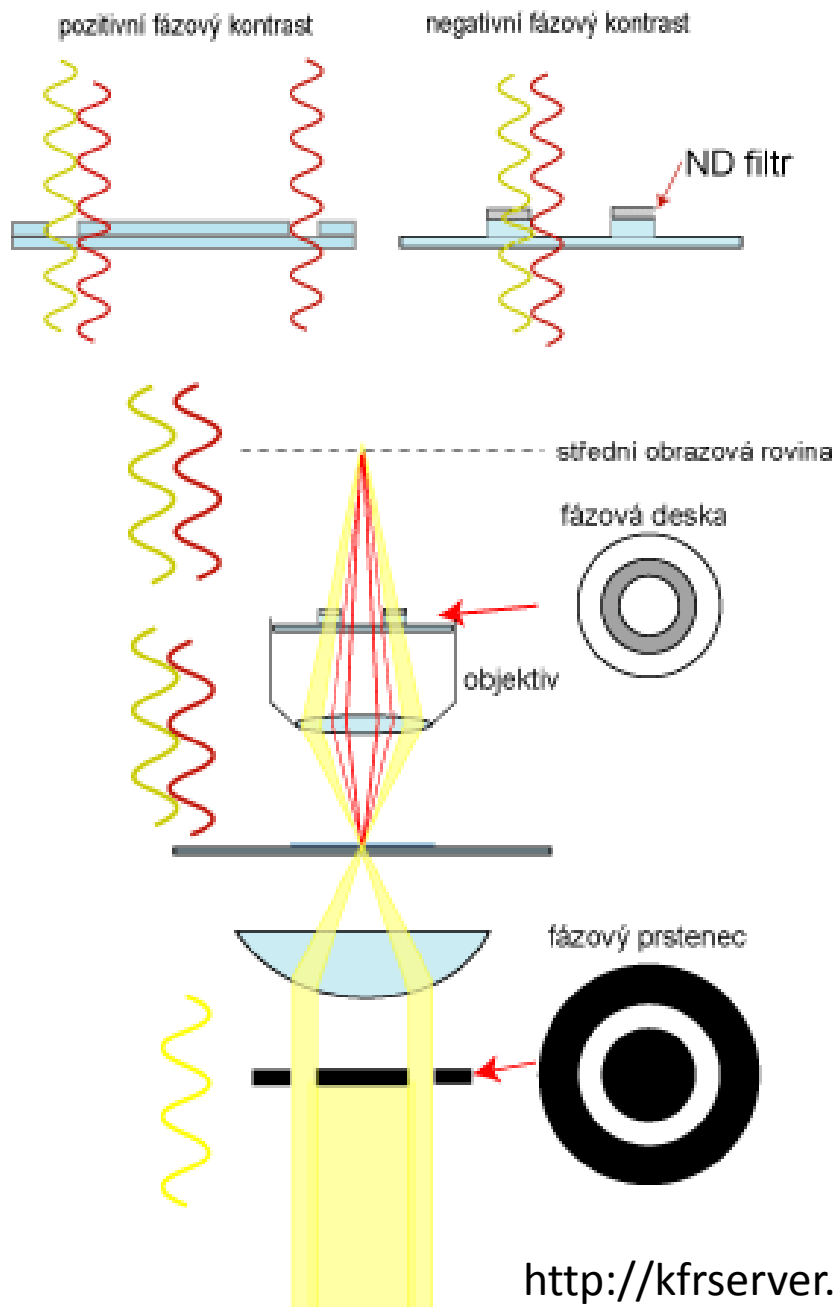
Souprava pro fázový kontrast

fázové objektivy
s fázovou deskou
Phz



pomocný mikroskop
pro centrování
clony a fázové desky

fázový kondenzor s prstencovými clonami

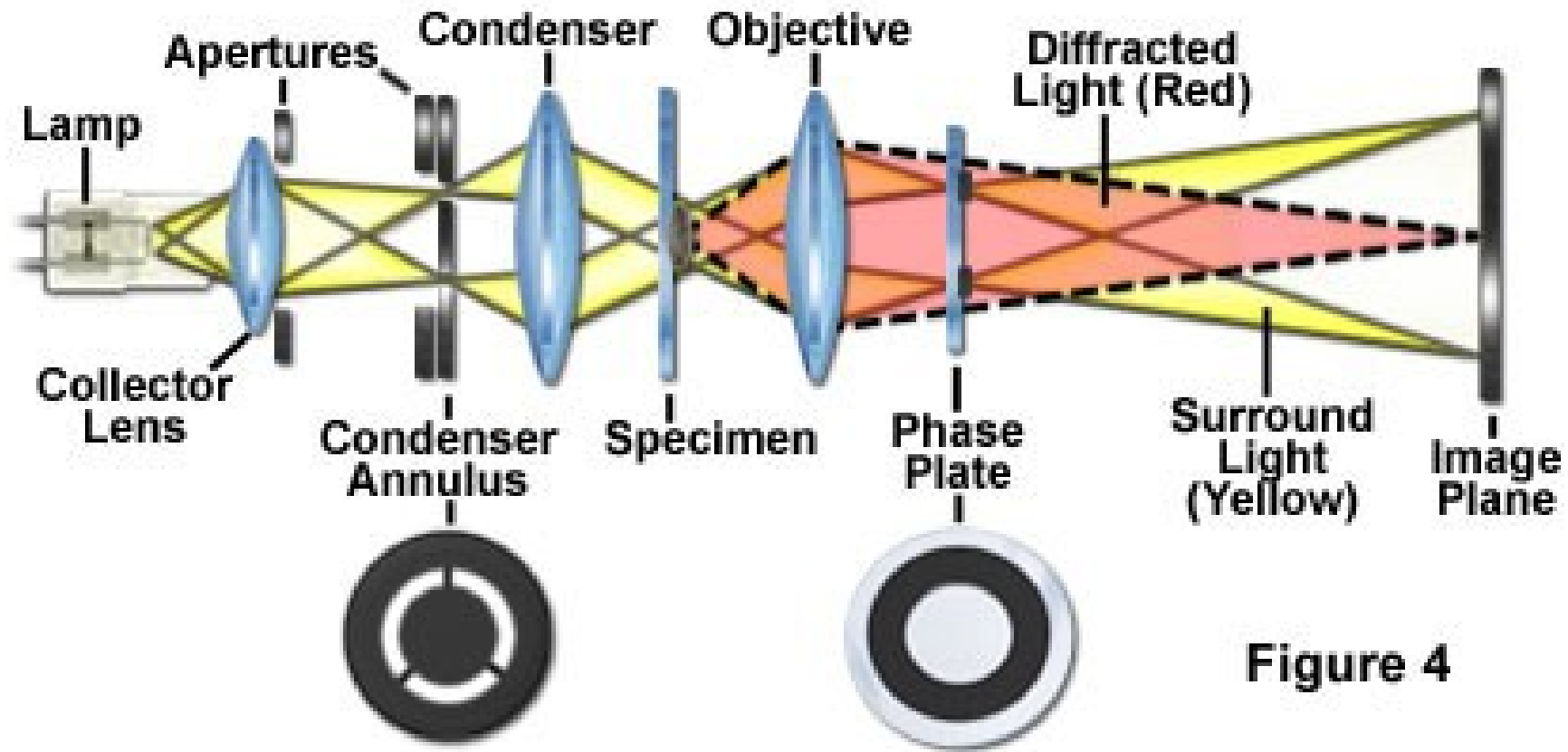


Mimo optické komponenty pro pozorování ve světlém poli jsou zde ještě dvě "fázové desky" umístěné do optické dráhy mikroskopu. První, umístěná v kondenzoru mikroskopu, vymezuje dutý kužel světla dopadající na objekt. Vytváří se tak v podstatě dvě hlavní optické dráhy. První, osvětlující objekt a beze změny procházející preparátem v místě bez objektu (na obrázku žlutá barva) a druhý, procházející objektem, jehož dráha a fáze je ovlivněna právě průchodem objektem. Rozdíl těchto dvou optických drah odráží různé indexy lomu objektu a jeho okolního prostředí. Při průchodu objektem obvykle dojde ke spoždění fáze o méně než $1/4\lambda$, tento posun nejsme schopni detekovat očima. Tuto fázovou změnu lze převést na změnu amplitudy (jasu), pokud posuneme fázi světla, které prošlo beze změny preparátem v místě bez objektu (osvětlení pozadí objektu) o $1/4\lambda$ pomocí fázové desky v objektivu a následnou interferencí paprsků těchto dvou optických drah ve střední obrazové rovině. Pokud došlo ke zpoždění světla pozadí o $1/4\lambda$, tak se světlo pozadí dostává do stejné fáze jako světlo po průchodu objektem a jejich následnou pozitivní interferencí ke zvýšení jasu objektu pozorovaného na tmavším pozadí (**negativní fázový kontrast**). To je dobře patrné vzhledem k relativně nízké intenzitě osvětlení pozadí omezené fázovým prstencem kondenzoru a často ještě potlačené neutrálním šedým (ND) filtrem, který je součástí fázového prstence fázové desky objektivu.

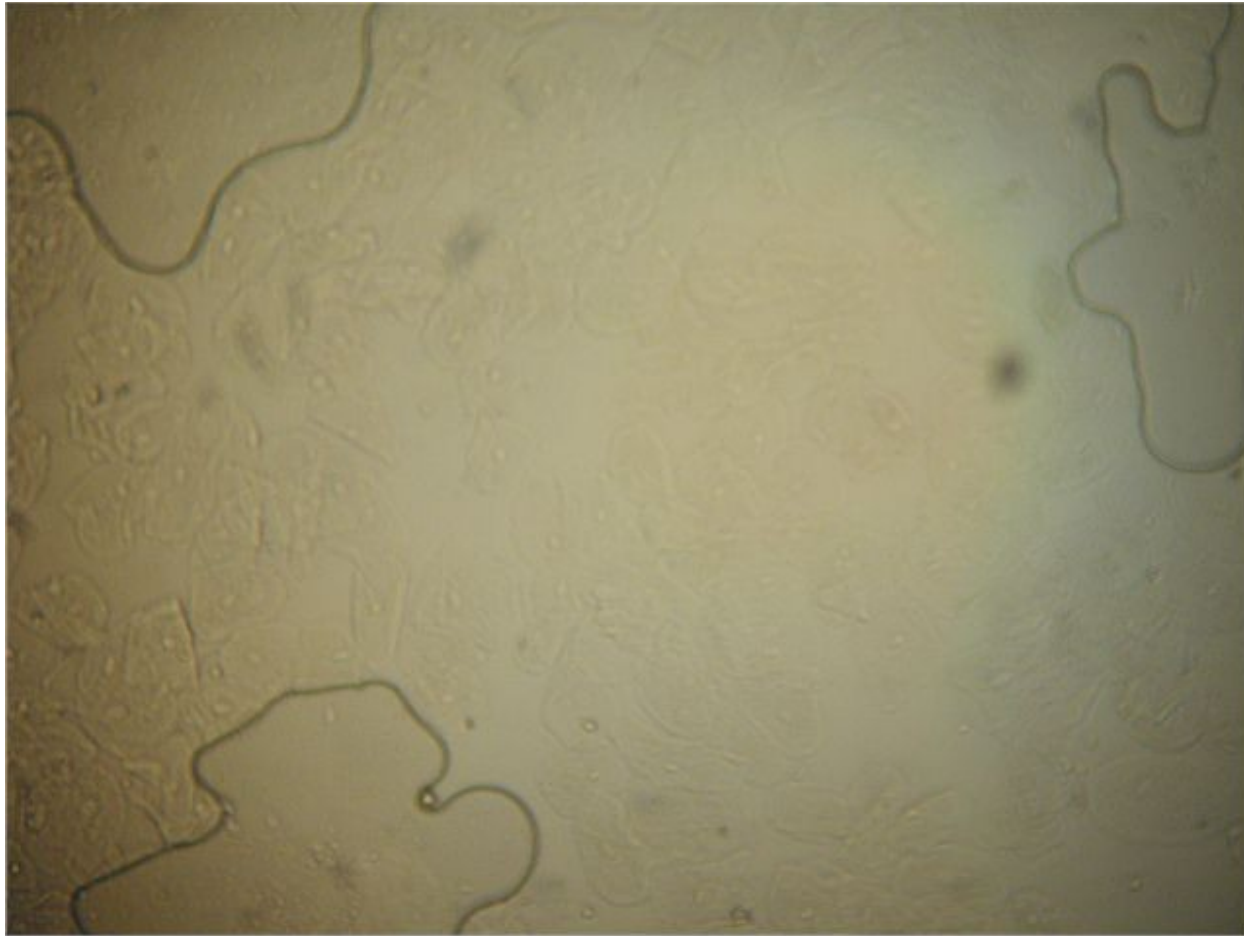
Naopak, pokud dojde na fázové desce ke zpoždění fáze světla po průchodu objektem, tak je výsledkem rozdíl $1/2\lambda$ mezi oběma optickými drahami. Výsledkem je destruktivní interference ve střední obrazové rovině a tmavší objekty na světlém pozadí (**pozitivní fázový kontrast**)

Schéma fázového kontrastu podle Zernikeho

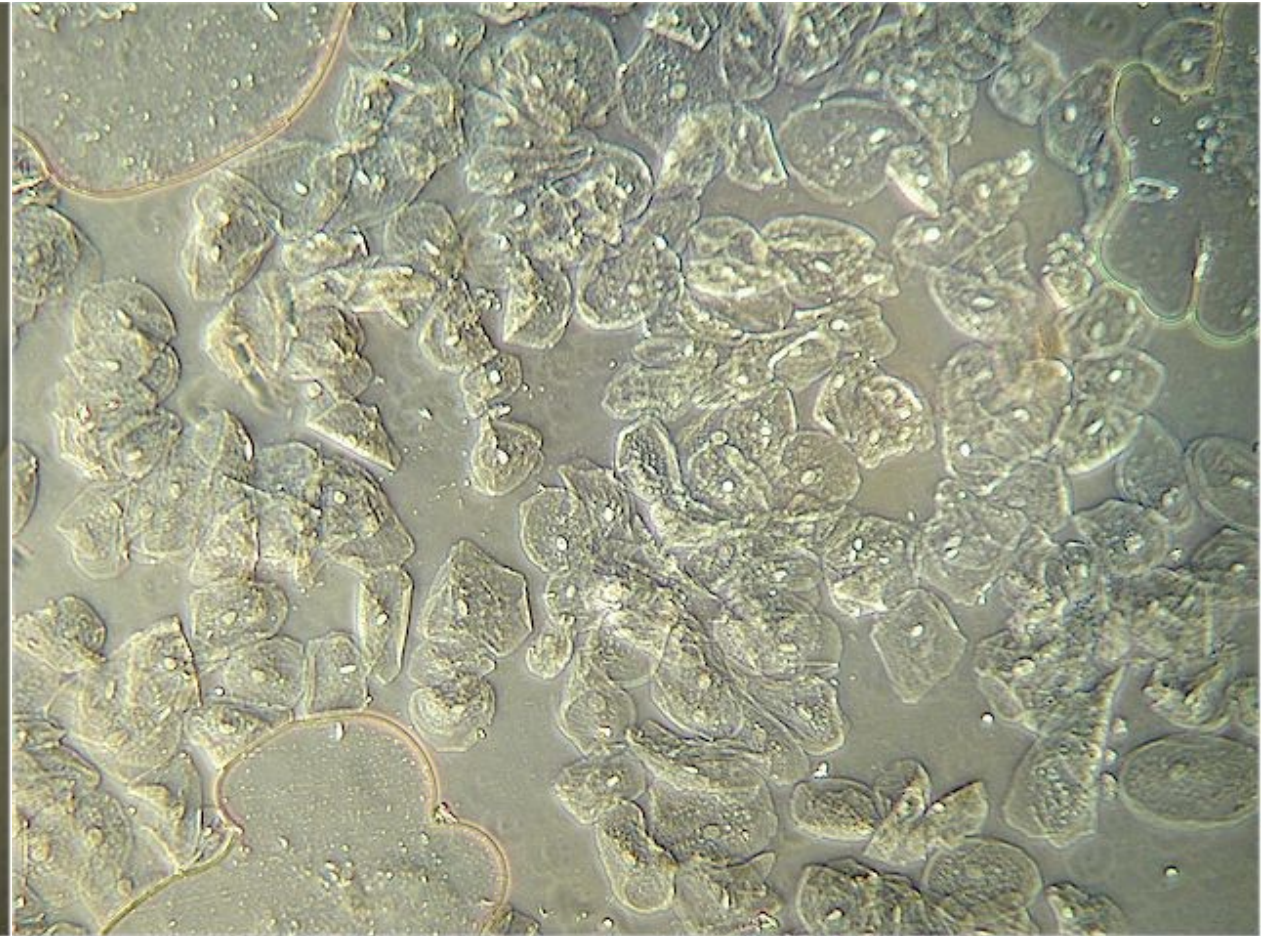
Phase Contrast Microscope Optical Train



Srovnání obrazu preparátu epiteliálních buněk sliznice



v procházejícím světle



ve fázovém kontrastu

Srovnání obrazu projasněného semene

Capsella bursa-pastoris

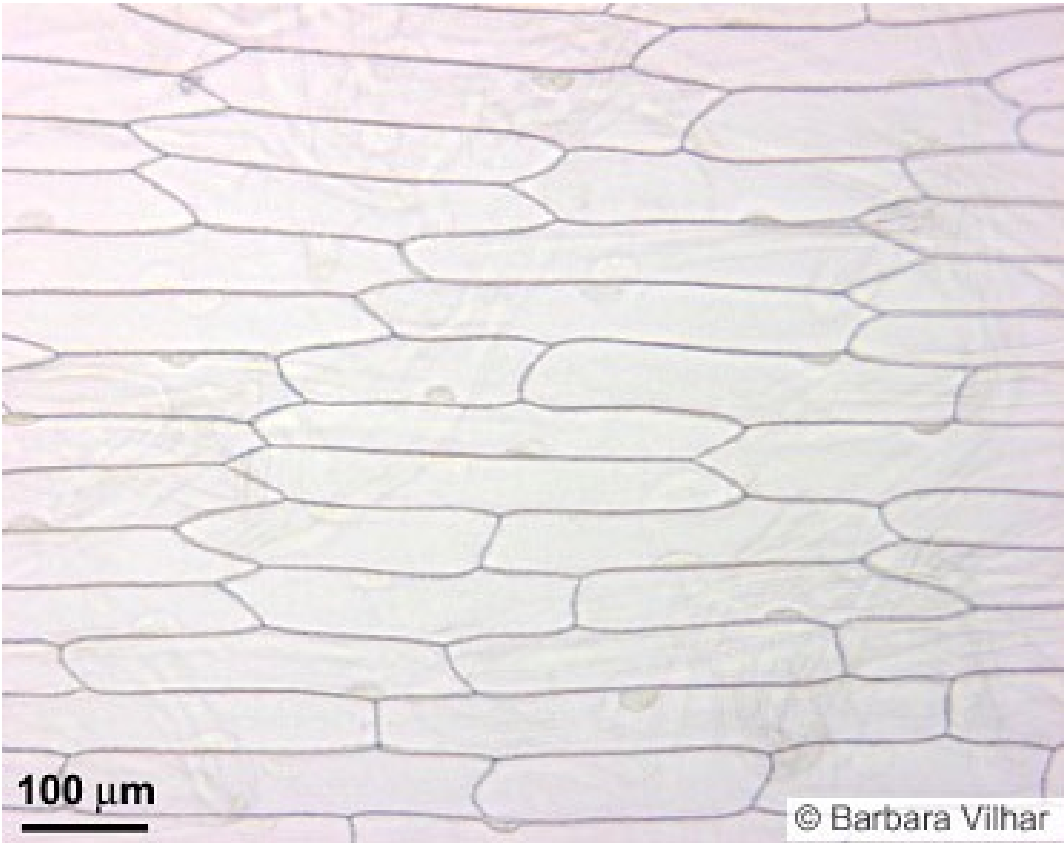


při šikmém osvětlení

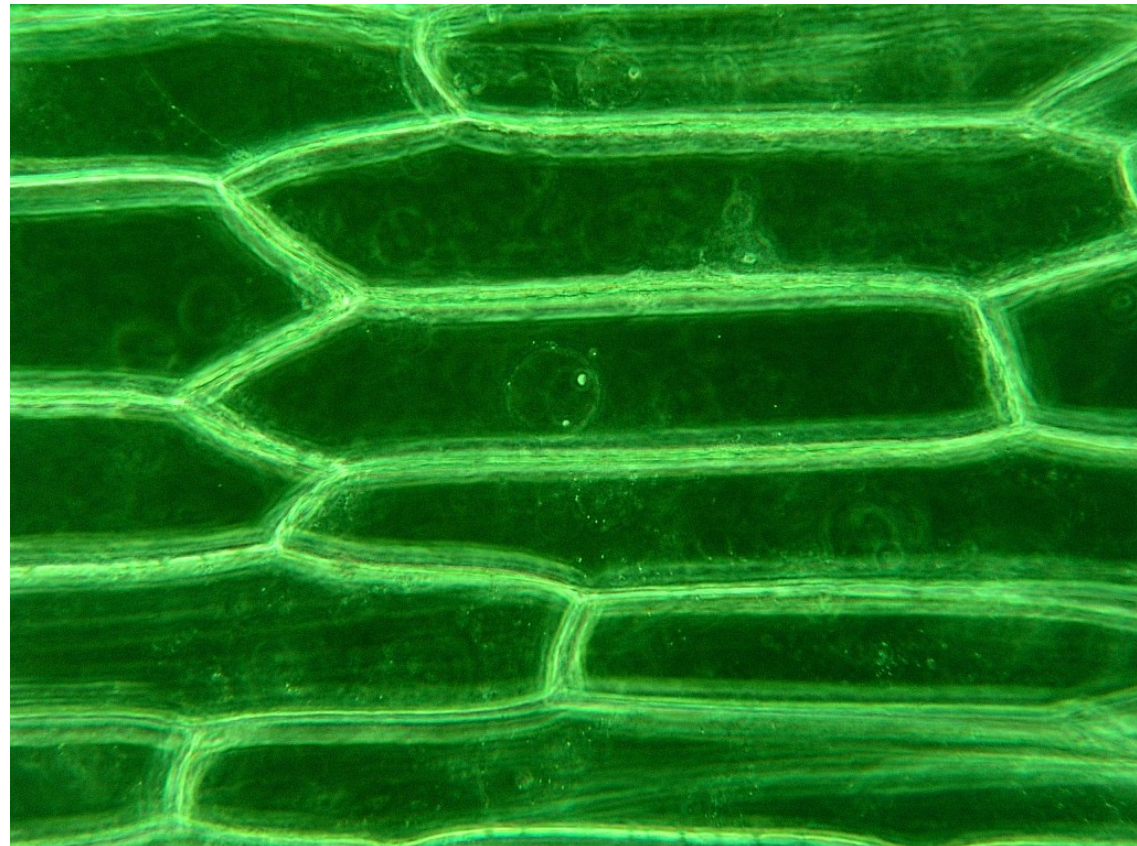


ve fázovém kontrastu

Srovnání obrazu epidermis cibule



v procházejícím světle



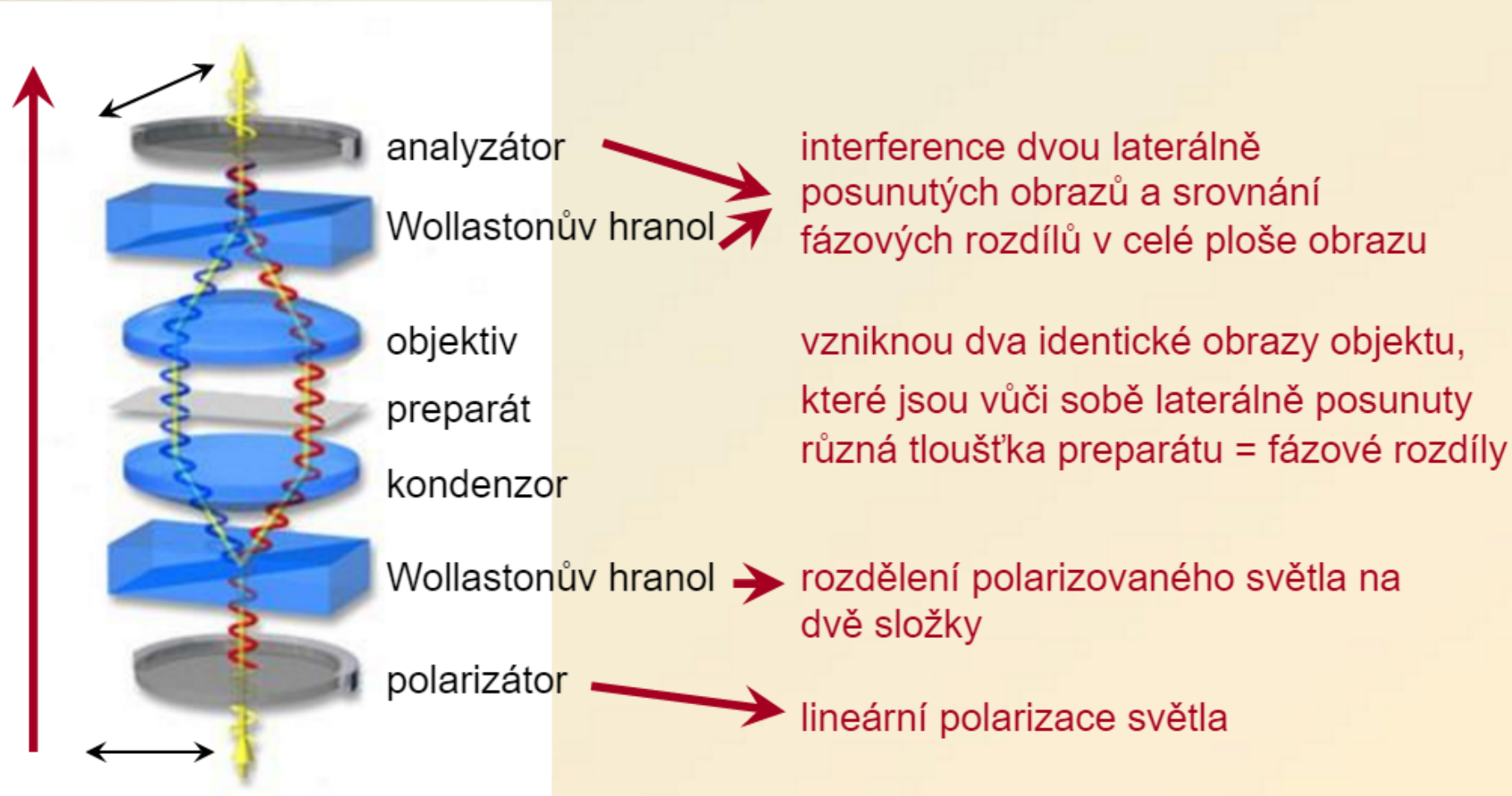
ve fázovém kontrastu

Diferenciální Interferenční Contrast

kolem 1950, Georges Nomarski
mikroskop - 1959 Carl Zeiss

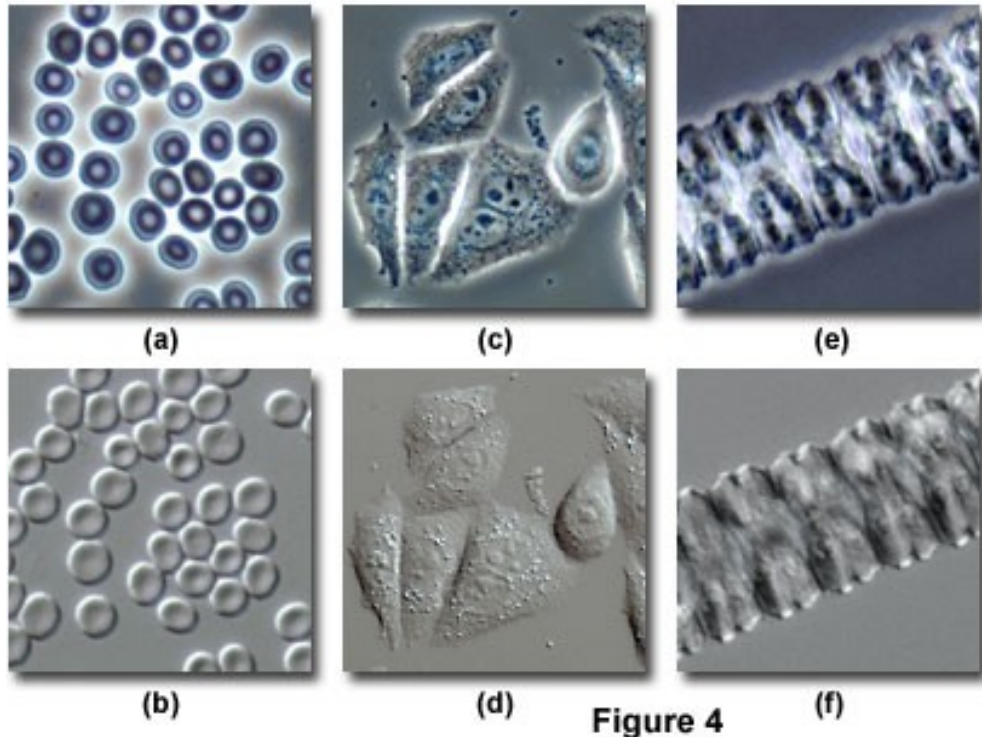
zvětšený obraz vzorku se jeví jako
šikmo osvětlený trojrozměrný objekt

ní kontrast (DIC) využívá
indexech lomu prostředí,
používá k pozorování
né konstrukce, kterou
nad objektivem a není
DIC. Obraz pozorovaný



„Halo“ efekt

Halos in Phase Contrast and DIC Microscopy

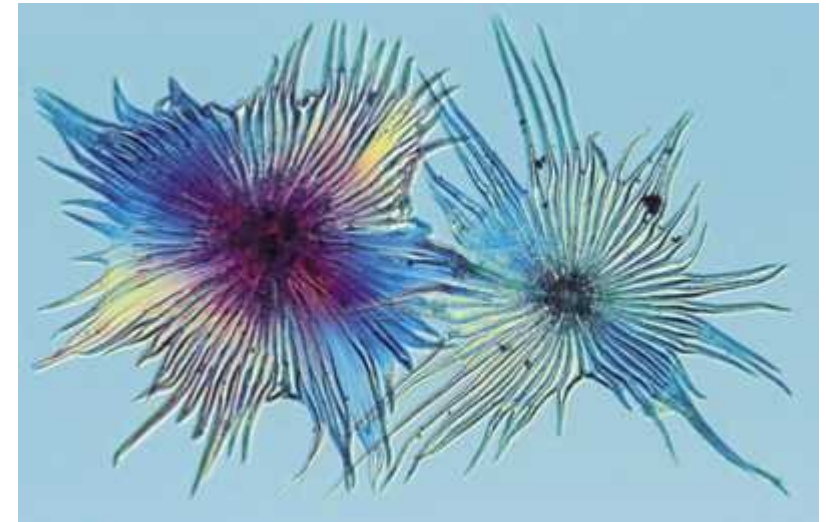


Jedním z typických artefaktů vznikajících při pozorování ve fázovém kontrastu je **"halo efekt"** ohraničující objekty. Tmavé objekty jsou v pozitivním fázovém kontrastu ohraničeny světlým "stínem" a naopak jasné objekty v negativním fázovém kontrastu mají "stín" tmavý. Tento efekt je výsledkem neúplného prostorového oddělení optických drah světla pozadí a světla procházejícího objektem. Část světla po průchodu objektem sdílí optickou dráhu se světlem pozadí i během průchodu fázovou deskou objektivu a dochází tak k posunu fáze odlišnému od ostatního světla procházejícího objektem. Výsledkem je právě vznik "halo" na hranicích objektu.



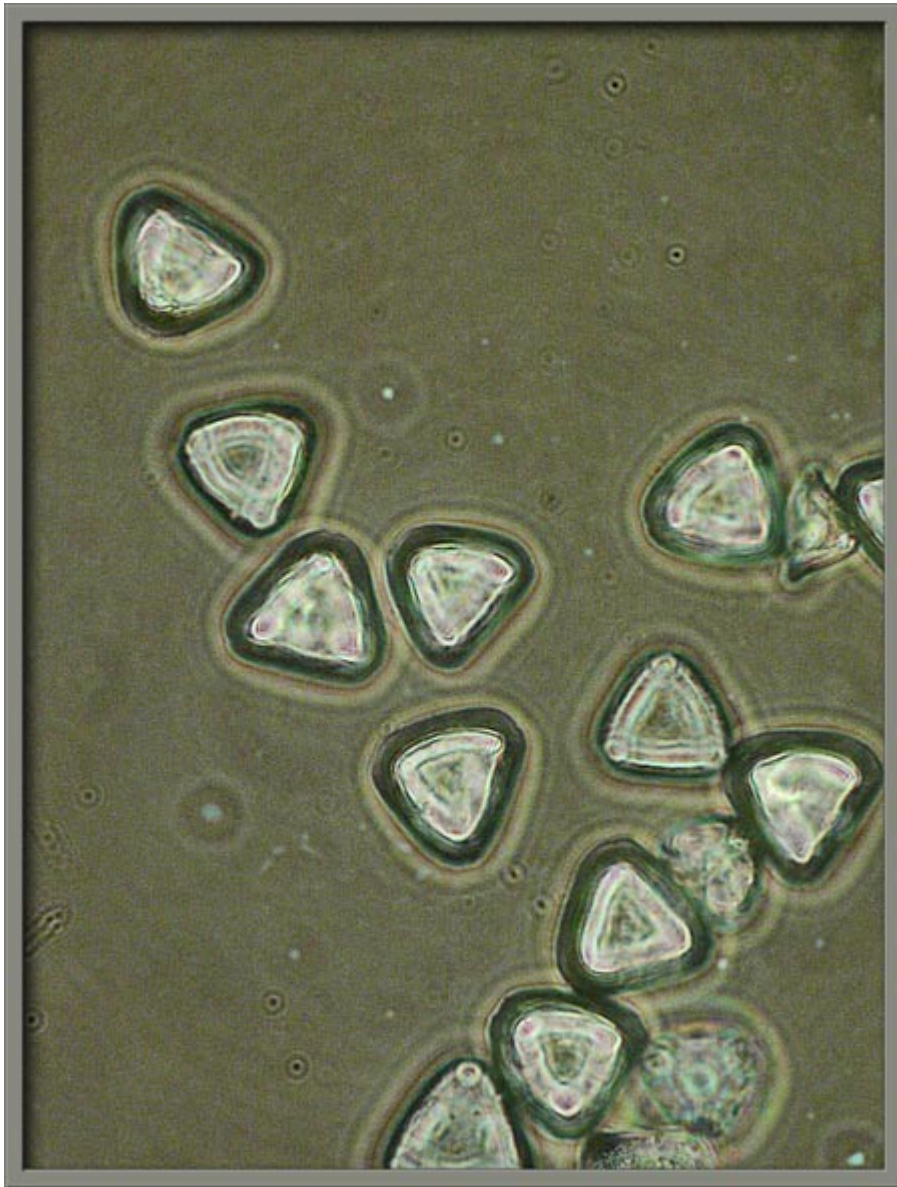
Grain of pollen from the lesser celandine (*Ranunculus ficaria*) which has produced a pollen tube. Kept in a 15% sugar solution for approximately 6 hours. Phase contrast. Field = 0.25 mm.

http://www.funsci.com/fun3_en/guide/guide4/micro4_en.htm

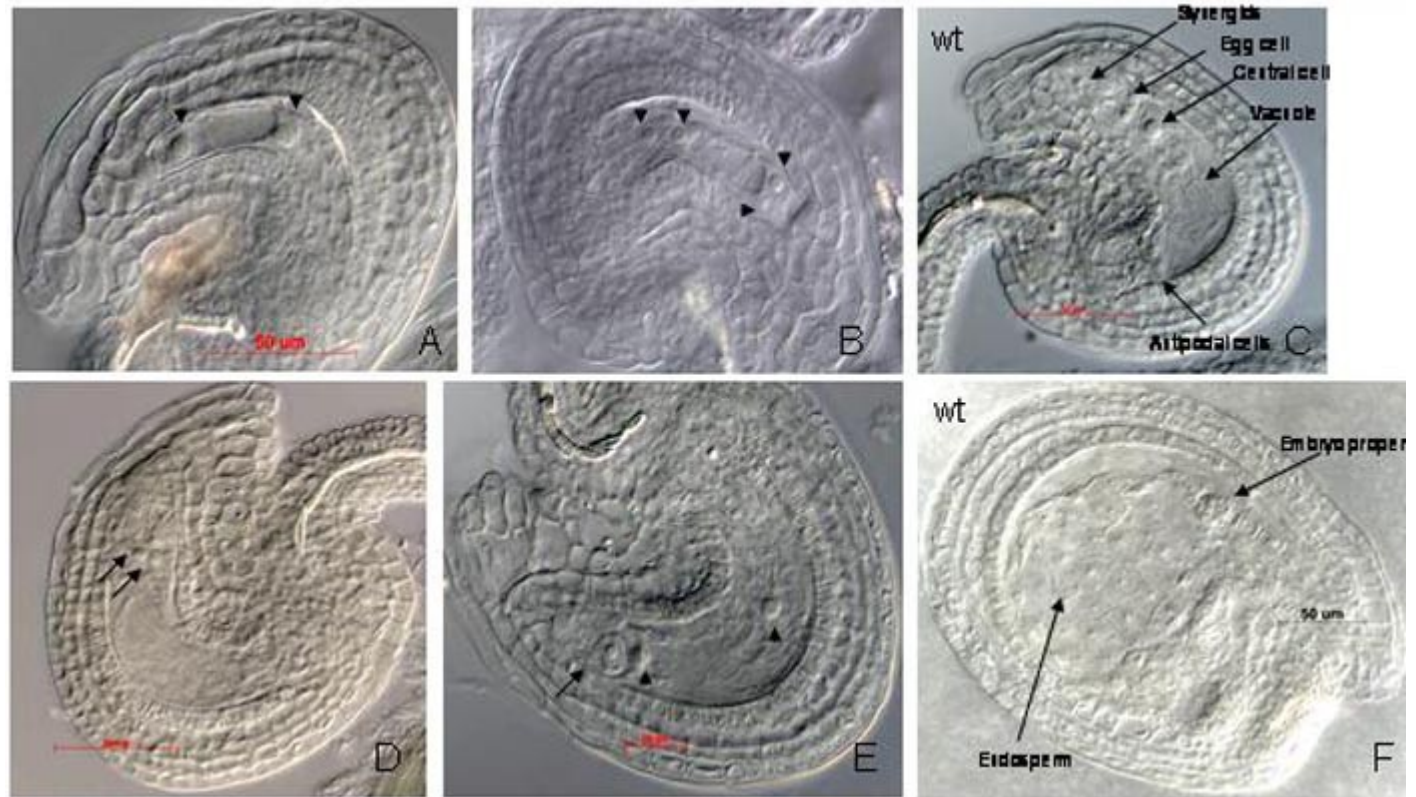


Štítkovité krycí trichomy hlošiny (*Elaeagnus* sp.), Nomarského diferenciální interferenční kontrast, zvětšení 360×

http://casopis.vesmir.cz/files/obr/nazev/2004_146_03.jpg/type/html



Pylová zrna rostliny *Protea mundii*,
fázový kontrast



Phenotype of mutants observed by DIC microscopy A

<http://www-plb.ucdavis.edu/labs/sundar/projects/gametogenesis.html>