

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Учебно-методическое пособие
к лабораторному практикуму
для студентов направления
03.04.02 Физика
очной формы обучения

Севастополь
СевГУ
2019

УДК 53.086(076.5)
ББК 22.34я73
М545

Р е ц е н з е н т:

А.О. Лантушенко - кандидат физ.-мат. наук,
доцент кафедры «Физика» СевГУ

Составитель: А.А. Мосунов

М545 Методы микроскопии высокого разрешения: учеб.-метод. пособие к лабораторному практикуму для студентов направления подготовки 03.04.02 Физика, профиль «Биофизика» очной формы обучения / сост. А. А. Мосунов. – Севастополь: СевГУ, 2019. – 51 с.

Цель учебно-методических указаний – помощь студентам при прохождении лабораторного практикума по курсу.

УДК 53.086(076.5)
ББК 22.34я73

Рассмотрено и утверждено на заседании кафедры «Физика» СевГУ, протокол № 3 от 20 ноября 2018 г.

Допущено учебно-методическим центром СевГУ в качестве учебно-методического пособия.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
1. Лабораторная работа № 1. Изучение устройства и общих принципов работы 3D сканирующего лазерного рамановского спектрометра Confotec NR500.....	5
2. Лабораторная работа № 2. Получение микрофотографий образцов при помощи инвертированного оптического микроскопа Nikon Ti-S и цветной CCD камеры для микроскопа с высоким разрешением.....	12
3. Лабораторная работа № 3. Обработка микрофотографий образцов в программе ImageSP.....	20
4. Лабораторная работа № 4. Получение лазерных конфокальных изображений образца	29
5. Лабораторная работа № 5. Получение рамановских спектров образца, обработка спектра	37
Библиографический список	51

ВВЕДЕНИЕ

Рамановская спектроскопия (спектроскопия комбинационного рассеяния, КР) представляет собой молекулярную спектроскопию для наблюдения за неэластично рассеянным светом и позволяет идентифицировать вибрационные состояния (фононы) молекул. Поэтому рамановская спектроскопия является бесценным аналитическим инструментом для молекулярного получения «отпечатков пальцев» и контроля изменений в молекулярной структуре связей (например, изменений состояний и нагрузок).

Рамановская спектроскопия не требует специальной подготовки образца и нечувствительна к полосам поглощения. Это свойство рамановской спектроскопии облегчает процесс непосредственного измерения в твердых, жидких и газообразных средах, а также измерения через прозрачные материалы, например, стекло, кварц, пластмассу.

В настоящее время данный вид анализа является широко распространенным и находит свое применение в следующих областях науки и техники:

- биологическая и медицинская диагностика;
- фармацевтика;
- рамановская микроскопия;
- полимерные и химические процессы;
- изучение окружающей среды;
- судебная экспертиза;
- геммология;
- геология и минералогия;
- сельскохозяйственная и пищевая промышленности;
- полупроводниковая и энергетическая промышленность.

В этой связи овладение студентами данной технологией является важным конкурентным преимуществом студентов в их дальнейшем трудоустройстве и профессиональной деятельности.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

Изучение устройства и общих принципов работы 3D сканирующего лазерного рамановского спектрометра Confotec NR500

Цель работы

1. Изучить основные структурные блоки 3D сканирующего лазерного рамановского спектрометра Confotec NR500.
2. Познакомиться с функционалом прибора.
3. Изучить возможные практические приложения спектрометра Confotec NR500.

Теоретическое введение

3D сканирующий лазерный рамановский спектрометр Confotec NR500 (далее - Confotec NR500) предназначен для измерения рамановских/люминесцентных спектров в точке, а также записи 2D и 3D изображений различных микрообъектов.

Confotec NR500 позволяет выполнять следующие измерения:

- проводить спектральные измерения в точке и получать спектральные характеристики различных материалов;
- проводить измерения рамановского сигнала в выбранном диапазоне длин волн в процессе XY (опционально XYZ) сканирования области образца;
- получать оптические изображения объектов.

Рассмотрим основные структурные блоки прибора (цифры в скобках соответствуют блокам на оптической схеме прибора, приведенной на рисунке 1.1).

Рамановский оптический блок (1-4, 7-17, 44, 55)

Узел ввода (31-43)

Узел регистрации отраженного излучения (25-27)

Монохроматор-спектрограф MS 5004i (17-23)

Микроскоп с 3-х позиционным автоматизированным переключателем зеркал (28-30, 54)

XY гальвано – сканнер (46-53)

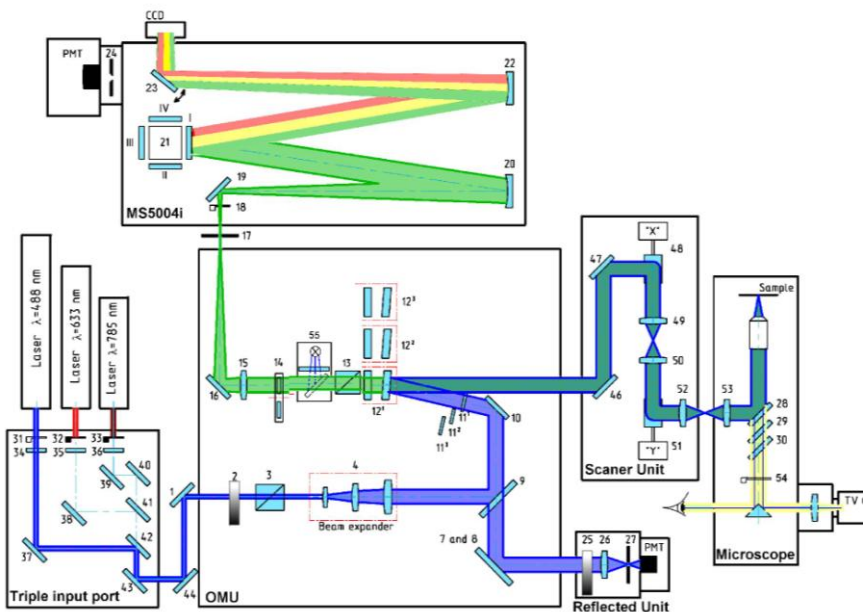


Рис. 1.1. Упрощенная оптическая схема Confotec NR500

Лазерный луч из узла ввода лазерного излучения при помощи зеркал 37-40, 43 направляется через нейтральный фильтр переменной плотности 2 к расширителю пучка лазерного излучения 4. Перенастраиваемый расширитель пучка 4 обеспечивает настройку диаметра и коллимированности лазерного луча для всего набора используемых лазеров и объективов. Зеркала 9, 10 направляют лазерный луч на отрезающий (Edge) фильтр 12. Отраженный от Edge фильтра 12 лазерный луч с помощью одного из зеркал 28, 29, 30 трёхпозиционного переключателя направляется в микрообъектив микроскопа, который фокусирует возбуждающее лазерное излучение на образце, собирает излучение отклика образца и направляет его в противоположном по отношению к возбуждающему лазерному излучению направлении (рис. 1.1).

Собранное микрообъективом микроскопа излучение отклика образца направляется на Edge фильтр 12, блокирующий лазерное излучение и пропускающий рамановское излучение. Прошедшее через Edge фильтр 12 излучение с помощью

объектива 15 и поворотного зеркала 16 фокусируется на конфокальное отверстие (пинхол) монохроматора-спектрографа. Спектральный состав вторичного излучения анализируется с помощью цифровой ПЗС (CCD) камеры, установленной на выходе монохроматора-спектрографа.

Узел совмещения пучков

Излучение трёх лазеров заводится в узел ввода. С помощью лазерных зеркал (37-40, 43) и дихроичных зеркал (41, 42) производится пространственное совмещение лазерных пучков.

На входе узла ввода для каждого лазера установлены автоматизированные световые затворы (31-33) и лазерные фильтры (34 - 36). Необходимость использования лазерных фильтров обусловлена тем, что кроме основной лазерной линии лазеры генерируют излучение других длин волн. Такое излучение может появляться, например, у газовых лазеров в результате не лазерных переходов в газовой плазме. Хотя это излучение намного слабее основной лазерной линии, но его присутствие в рамановском спектре нежелательно, так как оно может внести искажения в спектр и вызывает дополнительный шум. Поэтому до попадания лазерного пучка на образец, лазерное излучение фильтруется от нежелательного света лазерным фильтром. Каждый лазерный фильтр установлен в держателе с угловой юстировкой.

Пространственно совмещённые лазерные пучки с выхода узла ввода с помощью двух зеркал (1, 44) заводится в рамановский оптический блок.

Рамановский оптический блок

Рамановский оптический блок предназначен для формирования возбуждающих лазерных пучков, а также для формирования и оптического разделения излучения отклика образца от возбуждающего излучения. Рамановский оптический блок имеет порты для ввода лазерного излучения, присоединения микроскопа, спектрометра и узла регистрации отражённого излучения.

Оптические элементы, входящие в состав Рамановского оптического блока, образуют два оптических канала: канал возбуждения и канал регистрации.

Канал возбуждения

Вошедшее в рамановский оптический блок лазерное излучение проходит, по ходу луча, через нейтральный фильтр переменной плотности (VND), поляризатор (призма Глана-Тейлора) и расширитель пучка (Beam expander).

Отражённое от Edge фильтра возбуждающее излучение направляется на выходной порт Рамановского оптического блока, к которому подключён оптический ХУ гальвано-сканер. Прошедшее через гальвано-сканер излучение с помощью одного из зеркал трёхпозиционного переключателя направляется в объектив микроскопа, который фокусирует возбуждающее лазерное излучение на образце, собирает рассеянный образцом свет и направляет его в противоположном по отношению к возбуждающему лазерному излучению направлении. Если возбуждающее лазерное излучение сфокусировано на образце, то в описанной выше оптической ветви (канал возбуждения) будет присутствовать как возбуждающее лазерное излучение, так и излучение отклика образца. Оба этих излучения распространяются в противоположных направлениях и идут по одному оптическому пути.

Собранное микрообъективом микроскопа излучение отклика образца, пройдя в обратном ходе через ХУ гальвано-сканер, направляется на Edge фильтр, блокирующий лазерное излучение и пропускающий рамановское или люминесцентное излучение. Часть излучения отклика образца отражается Edge фильтром. Проходя далее по ветви возбуждения в обратном направлении, небольшая часть этого излучения проходит сквозь поворотное зеркало (9) и с помощью двух зеркал (7, 8) направляется на выходной порт ОМУ, к которому подключен Узел регистрации отражённого излучения.

Канал регистрации

Излучение отклика образца, прошедшее сквозь Edge фильтр 12 и отфильтрованное этим фильтром от возбуждающего лазерного излучения, направляется на объектив 15,

фокусирующий излучение на конфокальном отверстии (пинхол) 17.

Монохроматор-спектрограф изображения MS 5004i

Излучение, прошедшее сквозь конфокальное отверстие, поступает в монохроматор-спектрограф MS5004i, предназначенный для спектральных исследований излучения отклика образца: комбинационного рассеяния (рамановское излучение) и люминесценции в видимом и ближнем ИК спектральном диапазоне.

Монохроматор-спектрограф изображения MS5004i – это высокоэффективный монохроматор-спектрограф с турелью на четыре решетки и двумя выходами. В качестве входной щели служит конфокальное отверстие (пинхол 17). MS5004i переносит изображение пинхола на выход с увеличением 1:1 (imaging spectrograph).

Для обеспечения требуемых спектральной области и спектрального разрешения в MS5004i используются дифракционные решетки с различной плотностью штрихов (числом штрихов, приходящихся на 1 мм решетки).

Узел регистрации отражённого излучения (Reflection Unit)

Узел регистрации отражённого излучения обеспечивает работу Confotec NR500 в режиме лазерного конфокального микроскопа, т. е. построение изображений с использованием в качестве отклика релеевского рассеяния образца.

Оптический микроскоп

В качестве оптического микроскопа в Confotec NR500 используется микроскоп NIKON Eclipse Ti-S, дооснащённый специальным узлом стыковки с микроскопом, позволяющим направлять возбуждающее излучение через микрообъектив на образец и собирать генерируемое образцом излучение, минуя штатные оптические элементы микроскопа. Узел стыковки с микроскопом выполнен в виде трёхпозиционной автоматизированной турели, в которую установлены три зеркала, каждое из которых оптимизировано для длины волны используемого лазера возбуждения.

Для наблюдения образца в отражённом и прошедшем свете используются штатные осветители микроскопа и окуляры, а также цифровая цветная видеокамера высокого разрешения.

Для сканирования по Z при построении 3D конфокальных изображений возможно использовать Z пьезо – сканер, обеспечивающий сканирование по фокусу с минимальным шагом в 50 нм и диапазон сканирования 80 микрон. На Z пьезо - сканнер могут поочерёдно устанавливаться все объективы микроскопа.

Лазеры

В Confotec NR500 одновременно может использоваться до трёх лазеров (с длинами волн от 400 до 800 нм) с автоматическим переключением, что дает возможность сформировать универсальную систему, пригодную для решения различных задач.

Модуль оптического XY гальвано-сканера

Отражённое от Edge фильтра (12) возбуждающее излучение направляется в модуль оптического XY гальвано-сканера, осуществляющего сканирование объекта, расположенного в предметной плоскости микроскопа, лазерным пучком по осям X и Y. Модуль выполнен на базе двух гальваноприводов VM1000 (фирма GSI Lumonics – поз. 48 и 51, рис. 2.1). В состав модуля входят два поворотных зеркала (46, 47) и четыре объектива (49, 50, 52, 53). Объективы служат для получения необходимых линейных размеров поля сканирования и сопряжения полей зрения и зрачков микрообъективов микроскопа и пинголов (15 и 26). В прямом ходе объективы проектируют отклоненные гальвано-сканерами лучи через микрообъектив в любую точку предметной плоскости микроскопа; в обратном ходе они же собирают излучение отсканированной точки в пинхол 17, установленный в фокусе объектива 15, а также в пинхол 27, установленный в фокусе объектива 26.

Порядок работы с Confotec NR500

1. Включить прибор в сеть, подать питание на все элементы установки.

2. Включить компьютер, запустить управляющую программу NanoSP.

3. В открывшемся диалоговом окне Nano30 PRE-starting (рис. 1.2), отвечающем за инициализацию прибора, выбрать Full или Fast.

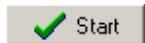


Рис. 1.2. Диалоговое окно Nano30 PRE-starting

Full Pre-starting приводит систему в рабочее положение, последнее перед выключением системы. Список тестируемого оборудования представлен в окне “Nano30 pre-Starting”.

Fast Pre-starting служит для повторной проверки выбранного элемента системы, отмеченного галочкой. Например, после устранения неисправности. Кроме того, “Fast Pre-Starting” выбирается после перезагрузки программы, если система “Confotec NR500” не выключалась. В этом случае нет необходимости в тестировании оборудования, и программа сразу переходит к следующему шагу загрузки, пропуская “Pre-starting”.

После выбора типа “Pre-starting” нажмите кнопку



. Начнётся процедура тестирования.

4. После окончания “Pre-starting” имеются две возможности: “Start” (повторное применение одного из выбранных типов “Pre-starting”) или “Next” (для окончания “Pre-starting”). При успешном тестировании нажмите “Next”. Появится главное окно программы NanoSP для управления Confotec NR500.

Контрольные вопросы

1. Перечислите виды исследований, которые можно производить на 3D сканирующем лазерном рамановском спектрометре Confotec NR500.
2. Перечислите основные функциональные блоки спектрометра, дайте их краткую характеристику.
3. Опишите порядок включения прибора.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

Получение микрофотографий образцов при помощи инвертированного оптического микроскопа Nikon Ti-S и цветной CCD камеры для микроскопа с высоким разрешением

Цель работы

1. Отработать навыки фокусировки на объекте с использованием оптического микроскопа.
2. Ознакомиться с возможностью наблюдения объекта с использованием окуляров и встроенной цифровой камеры.
3. Научиться перемещать двухпозиционный столик для выбора точки наблюдения на образце.

Теоретическое введение

1. Принцип работы конфокального микроскопа

Главной особенностью конфокального микроскопа является наличие конфокального отверстия (пинхола), расположенного в плоскости, сопряженной с плоскостью объекта. В результате детектор может регистрировать только тот свет, который проходит через пинхол. Принцип конфокального микроскопа показан на рис. 2.1.

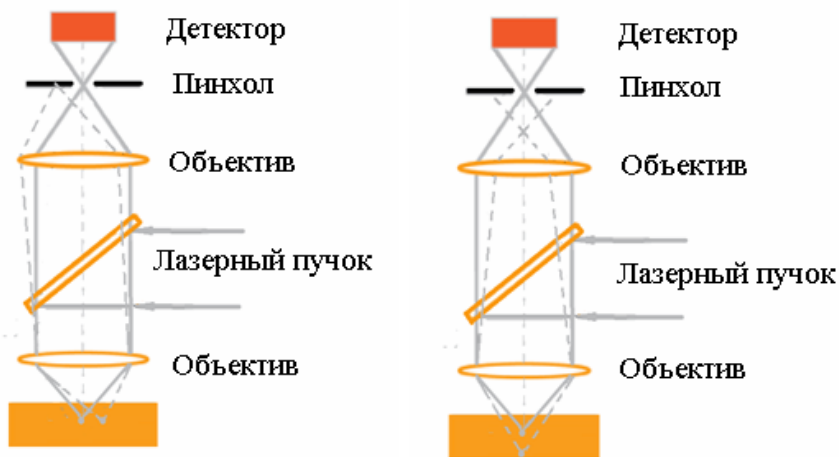


Рис. 2.1. Принцип конфокального микроскопа

Только излучение, идущее с фокальной точки на образце, проходит через пинхол (Рис.2.1), а излучение с других точек образца блокируется пинхолом и не попадает на детектор.

Перемещая образец относительно сфокусированного лазерного луча, получают изображение тонкого оптического слоя, расположенного в фокальной плоскости (XY-сканирование). Меняя положение фокальной плоскости относительно поверхности образца (Z - сканирование), и каждый раз производя XY-сканирование, получают изображения нескольких слоёв (3D изображение образца).

2. Пространственное разрешение конфокального микроскопа

2.1. Пространственное разрешение в плоскости

Под разрешающей способностью микроскопа обычно понимают возможность различить два близких по интенсивности точечных объекта. Распределение интенсивности света в фокальной плоскости объектива имеет вид концентрических колец. Центральное светлое пятно носит название пятна Эйри.

Рэлеем был предложен критерий, согласно которому две точки считаются разрешенными, если величина "провала" в интенсивности по центру между изображениями точек составляет 26% от максимума. При этом расстояние между разрешаемыми точками должно быть больше радиуса пятна Эйри (рис. 2.2). Диаметр Эйри диска составляет величину

$$1AU = \frac{1.22 \cdot \lambda}{NA} \quad (2.1),$$

и согласно критерию Релея разрешение в XY плоскости определяется формулой

$$R_{Lateral} = \frac{0.61 \cdot \lambda}{NA} \quad (2.2),$$

Где λ – длина волны света; NA – числовая апертура объектива.

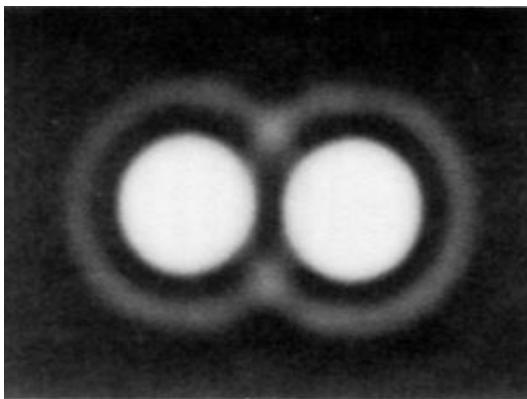


Рис. 2.2. Дифракционные изображения двух близко расположенных точечных объектов

Размер конфокального пинхола Confotec NR500 должен согласовываться с размером диска Эйри (AU). При выборе пинхола меньшего размера будут потери полезного сигнала. Если выбирать пинхол большего размера, то возможно детектирование

света, приходящего с вне фокальных точек. Величина пинхола, соответствующая 1AU, вычисляется по формуле:

$$D_{pinhole} = \frac{1,22 \cdot \lambda}{NA} \cdot M \quad (2.3),$$

где

λ – длина волны лазера;

NA – числовая апертура объектива;

M – общее увеличение оптической системы.

Общее увеличение оптической системы M для объективов, используемых в Confotec NR500, приводится в таблице 2.1:

Таблица 2.1.

Объектив	100 ^x	60 ^x	40 ^x	10 ^x
Увеличение M	75	45	30	7.5

Существует и несколько иной критерий пространственного разрешения в плоскости – две точки возможно различить, если расстояние между ними больше *полуширины* (англ. FWHM — full width at half maximum) пятна Эйри. Разрешение в XY плоскости в таком случае можно определять по формуле:

$$R_{Lateral} = \frac{0,51 \cdot \lambda}{NA} \quad (2.4)$$

Предельное же разрешение в конфокальной микроскопии определяется величиной

$$R_{Lateral} = \frac{0,4 \cdot \lambda}{NA} \quad (2.5),$$

которая соответствует 1/4AU.

2.2. Аксиальное разрешение

Аксиальное разрешение (Z разрешение) несколько хуже разрешения в плоскости.

При величине пинхола, соответствующего 1AU, аксиальное разрешение определяется формулой

$$R_{Axial} = \frac{0.88 \cdot \lambda}{n - \sqrt{n^2 - (NA)^2}} \quad (2.6).$$

При величине пинхола, соответствующего 1/4AU, аксиальное разрешение будет

$$R_{Axial} = \frac{0.64 \cdot \lambda}{n - \sqrt{n^2 - (NA)^2}} \quad (2.7),$$

Где n – показатель преломления среды.

Таким образом, пространственное разрешение зависит от длины волны света (λ), среды (n) и числовой апертурой объектива (NA).

Ход работы.

1. Включить спектрометр Confotec NR500. Провести стартовую диагностику всех узлов прибора.

2. Выбрать рабочий объектив. В текущей конфигурации прибора доступны два объектива:

- объектив Nikon CF Plan APO 100x, $NA=0,95$, рабочий отрезок 0,32 мм

- объектив Canon UPlan FLN 40x, $NA=0,75$, рабочий отрезок 0,63 мм, для использования с покровным стеклом 0,17 мм.

Первый из них предназначен для работы непосредственно с образцом, рабочий отрезок фокусировки второго позволяет использовать стандартные покровные стекла для размещения исследуемых объектов на нем. В этой связи первый объектив может быть рекомендован для максимально детального анализа

твердых либо хорошо зафиксированных образцов, в то время как второй позволяет работать с жидкостями и сыпучими материалами, расположенными на покровном стекле.

3. Поместить образец на предметный столик, накрыть его металлической крышкой.

4. Включить освещение образца нажатием на кнопку (рис. 2.3). При помощи регулятора в процессе фокусировки можно менять мощность лампы осветителя и, соответственно, яркость освещения образца.



Рис. 2.3. Кнопка включения освещения и ручка регулировки мощности лампы осветителя

4. Поворотом ручки справа на микроскопе (рис. 2.4) выбрать режим наблюдения образца: Side – наблюдение через камеру на экране компьютера, Eye – наблюдение непосредственно через окуляры.



Рис. 2.4. Ручка выбора режима наблюдения образца

5. Вращением ручки микрометрического винта справа или слева от корпуса микроскопа сфокусироваться на образце. Если фокусировка на образце затруднительна из-за отсутствия на нем ярких контрастных областей, можно ввести вспомогательный айрис (рис. 2.5). В этом случае фокусировку можно проводить по четкому наблюдению края данной диафрагмы.



Рис. 2.5. Ручка управления айрисом и регулировки его размера

6. После фокусировки на образце можно изменить область для исследования путем перемещения моторизованного столика вместе с закрепленным на нем образцом. Для перемещения

столика используется специальный пульт управления (рис. 2.6). Он дает две возможности: используя джойстик столик можно перемещать сразу на большие расстояния (порядка нескольких миллиметров), либо использовать специальные диски, находящиеся по обе стороны от манипулятора. В этом случае сдвиг столика будет составлять несколько микрон за счет использования пьезодвижков. Переключение между режимами движения столика осуществляется нажатием на соответствующие кнопки на контроллере.



Рис. 2.6. Контроллер движения столика

7. После фокусировки на интересующей исследователя точке образца можно получить цифровую фотографию данной области. Для этого, если фокусировка проводилась через окуляры необходимо переключиться в режим наблюдения через камеру (положение Side, рис. 2.4). При наблюдении через камеру,

возможно, будет необходимо провести коррекцию фокусировки, яркости освещения. Далее в программе NanoSP можно сохранить полученную микрофотографию образца (рис. 2.7).

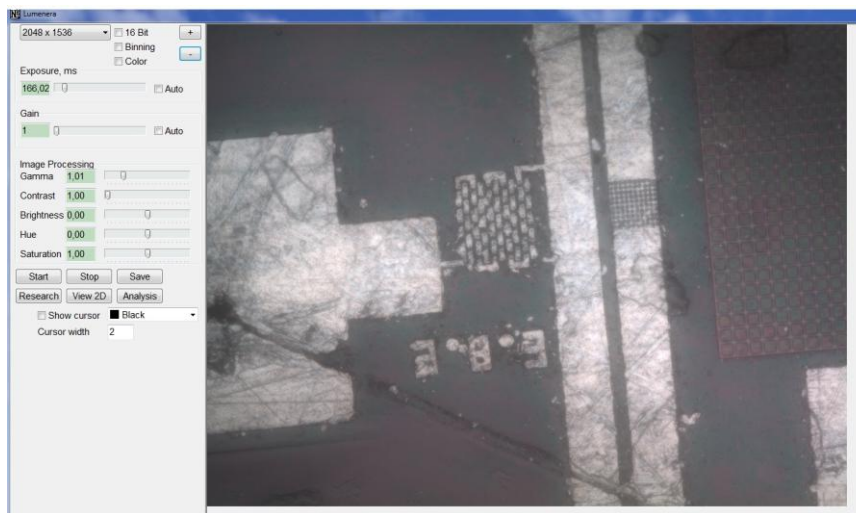


Рис. 2.7. Сохранение микрофотографии образца

Контрольные вопросы

1. Опишите основную деталь конфокального микроскопа и результат ее работы.
2. Запишите формулу для расчета латерального и аксиального разрешения оптической системы.
3. Для чего используется айрис?
4. Как выбрать режим фокусировки в микроскопе?
5. Каким образом можно изменить шаг движения моторизованного столика?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

Обработка микрофотографий образцов в программе ImageSP

Цель работы

1. Научиться обработке полученных микрофотографий образцов в программе ImageSP.

2. Познакомиться с основными командами и блоками команд программы.
3. Выполнить измерение различных особенностей на микрофотографии.

Теоретическое введение

Программный пакет ImageSP предназначен для сканирования изображений при помощи электронных микроскопов и научных камер, а также последующей обработки полученных изображений и серий изображений. ImageSP разрабатывается и поддерживается компаниями СисПрог и TRS. Главное меню программы содержит основные команды ImageSP и позволяет вызвать все окна программы. Его внешний вид представлен на рисунке 3.1.

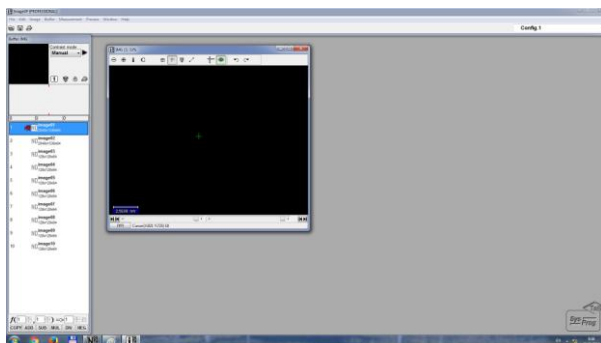


Рисунок 3.1. Внешний вид главного окна программы ImageSP

Перечислим основные подменю программы и входящие в них команды.

Файл

Открыть Данная команда позволяет загрузить в буфер одно изображение, несколько изображений или серию изображений. Чтобы загрузить несколько изображений выберите нужные изображения посредством Shift или Control в открывшемся окне Открыть: Изображение и кликните кнопку Открыть. Изображения загрузятся последовательно в не заблокированные ячейки буфера начиная с активной ячейки. Чтобы загрузить одно изображение из серии изображений, кликните данную команду и в появившемся окне Открыть:

Изображение используйте ползунок находящийся под экраном предварительного просмотра (справа внизу) чтобы выбрать нужное изображение, затем кликните кнопку Открыть.

Открыть вновь Данное подменю содержит список путей к десяти последним загружавшимся изображениям. Чтобы опять загрузить какое-либо из данных изображений кликните путь к нему.

Сохранить Данное меню содержит подменю состоящее из команд Активное и Выделенные. Опция Активное позволяет сохранить активное в буфере изображение в одном из основных поддерживаемых форматов файлов изображений. Опция Выделенные > Группа сохраняет все выделенные в буфере изображения под их именами в буфере в одном из основных форматов. (Чтобы выделить изображения в буфере кликните ячейки нужных изображений не отпуская [Shift] или [Control].) Опция Выделенные > Серия сохраняет все выделенные в буфере изображения как серию изображений в TIFF формате. Опция Выделенные > Фильм сохраняет все выделенные в буфере изображения как фильм в AVI формате (все изображения должны иметь одинаковые размеры).

Экспортировать Данная команда позволяет сохранить активное изображение в любом из поддерживаемых программой форматов файлов изображений.

Снимок Данная команда позволяет сохранить снимок активного изображения. Изображение будет сохранено с текущим контрастированием примененным навсегда, без данных сканирования, в одном из стандартных форматов файлов изображений: 8-битный монохромный TIFF, 24-битный RGB TIFF или 24-битный JPEG.

Печать Данная команда открывает окно Предварительный просмотр печати. Перед тем как окно откроется необходимо указать печатать ли все выделенные в буфере изображения (если таковые имеются) или только активное изображение и печатать ли видимые на изображении инструменты. В окне Предварительный просмотр печати документ с изображением оформляется далее перед непосредственной печатью.

Текстовый редактор Данная команда открывает окно Текстовый редактор.

Пользователь Данная команда открывает окно Пользователь, в котором вы можете добавить своего пользователя с помощью инструментов окна или выбрать уже существующего пользователя. Чтобы добавить пользователя введите имя и нажмите кнопку Добавить. Список пользователей храниться вместе с настройками программы. Текущий пользователь приписывается снятым изображениям как автор (данная информация отображается в окне Инфо).

Выход Данная команда закрывает программу ImageSP.

Редактировать

Копировать снимок Данная команда копирует снимок активного изображения в буфер обмена. Снимок представляет собой текущее отображение на экране, то есть текущее контрастирование применяется как постоянное для снимка и он автоматически конвертируется в 8-битное монохромное изображение или 8-битное RGB изображение. Данная команда копирует снимок в буфер обмена только при обмене с другими приложениями по обработке изображений; если вы копируете изображение внутри ImageSP, то изображение копируется полностью.

Вставить Данная команда вставляет изображение из буфера обмена в активную ячейку буфера.

Переименовать Данная команда позволяет переименовать активное изображение. Кликните команду, введите новое имя в активированной для редактирования ячейке буфера и нажмите [Enter].

Очистить Данная команда очищает активное или все выделенные, если таковые имеются, изображения в буфере.

Конвертировать в ... Данная команда позволяет конвертировать активное (или все выделенные) изображение в буфере в один из основных поддерживаемых ImageSP форматов изображений: 8, 16, 32 или 64 -битное монохромное или 8 или 12 -битное на канал RGB.

Инфо Данная команда открывает окно Инфо. Быстрый вызов: [Alt] + [Enter].

Мастер Коррекции Данная команда открывает окно Мастер Коррекции.

Свойства инструментов Данная команда открывает окно Инструменты.

Масштабная линейка Если в данном меню отмечена опция Показать, то масштабная линейка отображается в окне изображения. Если также отмечена опция Прожечь на изображении, то масштабная линейка будет "прожжена" на изображении автоматически при его сохранении в файл на диске.

Таблица увеличений Данная команда открывает окно Таблица увеличений. Окно Таблица увеличений описано в разделе Калибровка.

Калибровка Данная команда открывает окно Калибровка.

Галерея изображений Команда Новая данного меню открывает пустое окно Галерея изображений. Команда Открыть позволяет загрузить существующую галерею изображений из файла с расширением *.glr.

Панорама Данная команда открывает окно Панорама.

Аксонометрия Данная команда открывает окно Аксонометрия.

Гистограмма Данная команда открывает окно Гистограмма.

Баланс цвета Данная команда открывает окно Баланс цвета.

Палитра Данная команда открывает окно Палитра, где вы можете выбрать цветовую палитру для отображения активного изображения, то есть таблицу сопоставления монохромных значений яркости цветам таблицы.

Установки сканирования Команда Цикл >> Бесконечный устанавливает бесконечный режим сканирования в цикле: после начала сканирования оно продолжается без остановки пока вы не кликните кнопку СКАН Старт/Стоп на главном окне программы или не нажмете F9. Команда Ограниченный устанавливает ограниченный режим сканирования: сканирование останавливается после определенного числа сделанных сканов. Число сканов можно установить при помощи следующей команды Число сканов. Максимальное число сканов равняется

текущему размеру буфера. Если в меню Цикл опция Режим серии не отмечена, то при сканировании все полученные изображения помещаются в одну и ту же ячейку буфера (Начальную позицию) заменяя друг друга, то есть позиция получения скана в буфере не перемещается во время сканирования. Если опция Режим серии выбрана, то позиция получения скана перемещается в буфере с каждым новым получаемым изображением. В результате каждый новый скан помещается в новую ячейку буфера.

Подменю Начальная позиция: Когда выбрана опция Начало, первая ячейка буфера устанавливается как начальная позиция получения скана вне зависимости от активной в момент начала сканирования ячейки буфера. Когда в подменю Начальная позиция выбрана опция Текущая, то в качестве начальной позиции сканирования устанавливается активная в момент начала сканирования ячейка буфера. Если выбрана опция След. и скан., то в качестве начальной позиции сканирования выбирается следующая за активной ячейка буфера. Если выбрана опция Скан. и след., то в качестве начальной позиции сканирования выбирается активная ячейка буфера, но после остановки сканирования следующая за активной позицией активизируется автоматически.

Выделить С помощью команд данного меню вы можете Выделить все изображения в буфере, Отменить все выделения или Инвертировать все выделения.

Блокировать Команды данного меню позволяют блокировать Активное изображение или все Выделенные изображения. Если изображение заблокировано, то сканирование и загрузка изображений в его ячейку буфера запрещены, таким образом изображение защищено от замещения другим изображением. Заблокированные ячейки буфера также пропускаются при загрузке файла с серией изображений или при загрузке нескольких изображений одновременно.

Разблокировать Команды данного меню позволяют разблокировать Активное изображение, все Выделенные изображения или Все заблокированные изображения.

Статистика Данная команда отображает статистику активного изображения в автоматически открывающемся окне Текстовый редактор.

Точная гистограмма Данная команда отображает точную гистограмму активного изображения в автоматически открывающемся окне Депо графиков. При построении точной гистограммы учитываются все пиксели изображения, без прореживания.

Таблица пикселей Данная команда вызывает окно Таблица пикселей для текущей позиции курсора на активном изображении.

График Данная команда открывает окно График для текущего активного метрического инструмента на активном изображении.

Курсор ... Команды Курсор, Отрезок, Отрезок-полоса, Прямоугольник, Полигон, Ломаная, Маркер, Окружность, Сектор, Двойной круг, Эллипс и Цветная сетка активируют соответствующий метрический инструмент на активном изображении и вызывают окно Измерение для этого инструмента.

Фильтрация Данная команда открывает окно Фильтрация.

Анализ Фурье Данная команда открывает окно Анализ Фурье.

Анализ Данная команда открывает окно Анализ.

Кросс-корреляция Данная команда открывает окно Кросс-корреляция.

Коррекция сдвига Данная команда открывает окно Коррекция сдвига.

Гамма-коррекция Данная команда открывает окно Гамма-коррекция.

Автоматический эксперимент Данная команда открывает окно Автоматический эксперимент.

Коррекция освещенности Данная команда открывает окно Коррекция освещенности.

Преобразование Данная команда открывает окно Преобразование.

Депо графиков Данная команда открывает окно Депо графиков.

Буфер: IMG Данная команда активизирует окно Буфера.

IMG [1] ... Данные команды позволяют вывести на передний план одно из открытых окон изображений.

Разместить в центре Данная команда центрирует все открытые окна.

Справка

Задание к лабораторной работе.

В работе необходимо провести следующие операции:

1. Откалибровать изображение. Изображение называется *калиброванным* если известен его коэффициент калибровки. *Коэффициент калибровки* это расстояние между двумя соседними пикселями на изображении выраженное в непиксельных метрических единицах (например миллиметрах).

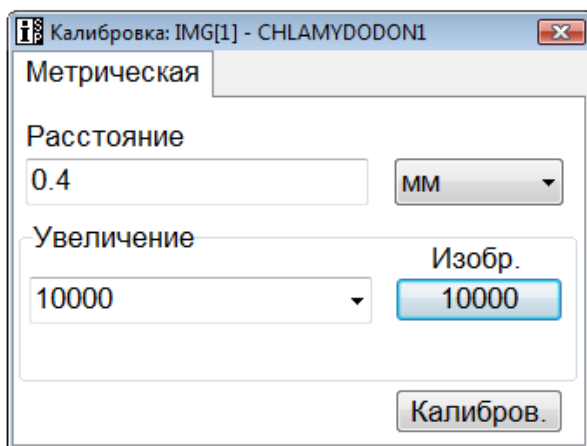


Рисунок 3.2. Окно калибровки изображения.

Для этого необходимо получить фотографию специальной пластины, на которой нанесены особые периодические структуры с заведомо известным размером.

После этого:

1.1. Откройте окно Калибровка. При открытии окна Калибровка в окне активного изображения автоматически включается инструмент отрезок-полоса.

1.2. На изображении, разместите отрезок-полосу над объектом, длина которого известна. Отрезок-полоса должен измерять эту длину.

1.3. В окне Калибровка, выберите или введите значение увеличения активного изображения в списке Увеличение. Нажатие кнопки расположенной справа от списка берет значение увеличения из параметров активного изображения и отображает полученное значение в списке Увеличение.

1.4. Выберите нужную не-пиксельную единицу измерения в списке Метрическая единица, расположенном в правом верхнем углу окна Калибровка.

1.5. В окне Калибровка, введите известное значение длины объекта на изображении в выбранных метрических единицах в поле Расстояние.

1.6. Нажмите кнопку Калибров.

Если увеличение изображения калибровано, то есть имеет присвоенный коэффициент калибровки, данный коэффициент автоматически используется для пересчета всех размеров на изображении из пикселей в непиксельные метрические единицы измерения. Для всех изображений снятых с одинаковым значением увеличения используется один и тот же коэффициент калибровки.

Чтобы поменять текущую метрическую единицу выберите нужную единицу в списке *Метрическая единица* окна **Калибровка**. В данном списке отображается установленная в текущий момент метрическая единица измерения.

2. После калибровки изображения выбрать на полученной в предыдущей работе микрофотографии образца несколько областей, которые могут быть описаны соответствующим инструментом измерения (Отрезок, Отрезок-полоса, Прямоугольник, Полигон, Ломаная, Маркер, Двойной круг, Окружность, Сектор, Эллипс). Обвести соответствующий объект, измерить его размеры, сделать фото образца с результатом измерения.

Контрольные вопросы

1. Описать механизм калибровки изображения.
2. Зачем необходима калибровка изображения?

3. Необходимо ли проводить повторную калибровку при изменении рабочего объектива и почему?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

Получение лазерных конфокальных изображений образца

Цель работы

1. Изучить методику построение лазерного конфокального изображения образца на рамановском спектрометре ConfotecNR500.
2. Познакомиться с основными параметрами настройки прибора для получения данного изображения.
3. Получить лазерного конфокальное изображение образца.

Теоретическое введение

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (CLSM) является методом оптического трехмерного (3D) поверхностного профилирования с высокой разрешающей способностью.

Высокая числовая апертура линзовых объективов (до 0.95) и короткая длина волны лазерного излучения обеспечивают получение изображений с высоким разрешением вдоль оптического и поперечного направлений.

Также конфокальные микроскопы обладают значительным контрастом по сравнению с классическими оптическими микроскопами за счет использования специальной диафрагмы (пинхол), отсекающей поток фонового рассеянного света – это помогает улучшить качество изображения.

В конфокальном микроскопе в каждый момент времени регистрируется изображение одной точки объекта, а полноценное изображение строится путем сканирования (движение образца или перестройка оптической системы). Для того чтобы регистрировать свет только от одной точки после объектива располагается пинхол таким образом, что свет, испускаемый анализируемой точкой, проходит через него и будет зарегистрирован, а свет от остальных точек отрезается данным пинхолом.

Повышение контраста изображения также достигается за счет того, что осветитель создает не равномерную освещенность поля зрения, а фокусирует свет в анализируемую точку. Это

может достигаться за счет использования светоделительной пластинки, так чтобы и падающий и отраженный свет фокусировались одним объективом. Такая схема к тому же облегчает юстировку.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия является техникой оптического неразрушающего контроля для профилирования поверхностей микроструктур с высоким разрешением. Это является идеальным решением для измерения и проверки полупроводниковых пластин, MEMS (Микроэлектромеханические) устройств, поверхностей стекла и других материалов.

Наиболее часто встречающейся задачей для конфокальной микроскопии, благодаря ее высокому разрешению и контрасту, является изучение структуры клеток и их органелл, например, цитоскелета, ЭПР, лизосом, митохондрий, ядра, хромосом и даже генов. Исследуется также колокализация (пространственное взаиморасположение) в клетке двух и более веществ. Еще одна задача – исследование динамических процессов, происходящих в живых клетках. Например, клеточного транспорта биологически-активных соединений, изменений концентрации и распределения ионов кальция. Записав в памяти компьютера серию оптических срезов, можно провести объемную реконструкцию объекта и получить его трехмерное изображение, не используя трудоемкую методику изготовления и фотографирования серийных гистологических срезов.

Благодаря улучшенному разрешению, особенно повышенному разрешению по оси Z, и возможности создавать серии «оптических» срезов, конфокальный микроскоп позволяет исследовать тонкую структуру объекта в трехмерном пространстве. Специальные программы позволяют создать из серии оптических срезов объемное изображение объекта (3D) и как бы рассматривать его под разными углами зрения, что может дать ценную информацию о форме клеток, цитоскелете, структуре ядра, хромосомах и даже локализации в них отдельных генов, а так же о взаиморасположении этих элементов.

Использование мультиспектрального (с несколькими флуорохромами) режима работы лазерного сканирующего

конфокального микроскопа позволяет исследовать колоколизацию (пространственное взаиморасположение) в клетке двух или более разных веществ, например, белков, помеченных разными флуоресцентными красителями. Исследуя такие препараты в обычном флуоресцентном микроскопе, нельзя с уверенностью утверждать, находятся эти вещества рядом или одно под другим. С помощью метода оптических срезов и дальнейшей 3D-реконструкции объекта можно воссоздать объемное распределение веществ.

Режим “Fast Mapping”

Режим “Fast Mapping” используется для скоростного построения изображений в режиме лазерного или рамановского конфокального микроскопа. Сканирование осуществляется с помощью гальванических зеркал. Сигналы детектируются на ФЭУ. Один фотоумножитель (Reflected) детектирует отраженное от образца лазерное излучение, а другой фотоумножитель (Spectral) устанавливается на одном из выходных портов спектрографа и детектирует спектральный сигнал (рамановское рассеяние или люминесценцию).

Для работы в режиме “Fast Mapping” перейдите в соответствующее окно программы (Рис. 4.1).

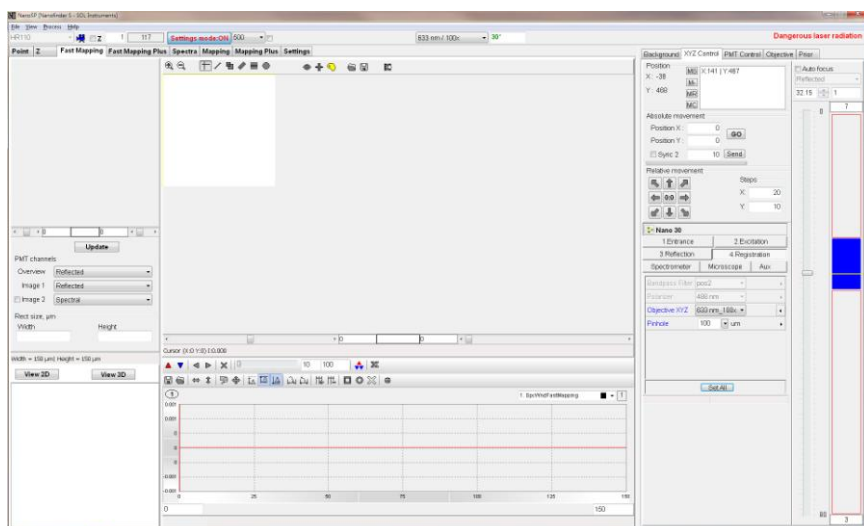


Рис. 4.1. Режим “Fast Mapping”

Режим “Fast Mapping Plus”

При наличии в системе моторизованного стола микроскопа (например, PRIOR стола) возможно проведение измерений больших участков образца. Алгоритм работы в таком режиме измерений следующий:

- с помощью гальванических зеркал получается изображение участка образца;
- происходит смещение образца с помощью автоматизированного столика;
- проводится новый скан с помощью гальванических зеркал и получается изображение соседнего участка образца;
- процесс повторяется;
- проводится склейка ряда изображений и получение панорамного изображения (Рис. 4.2).

Панорамное изображение получается путем сшивания изображений Fast Mapping при выполнении точно рассчитанных перемещений образца с помощью автоматизированного стола.

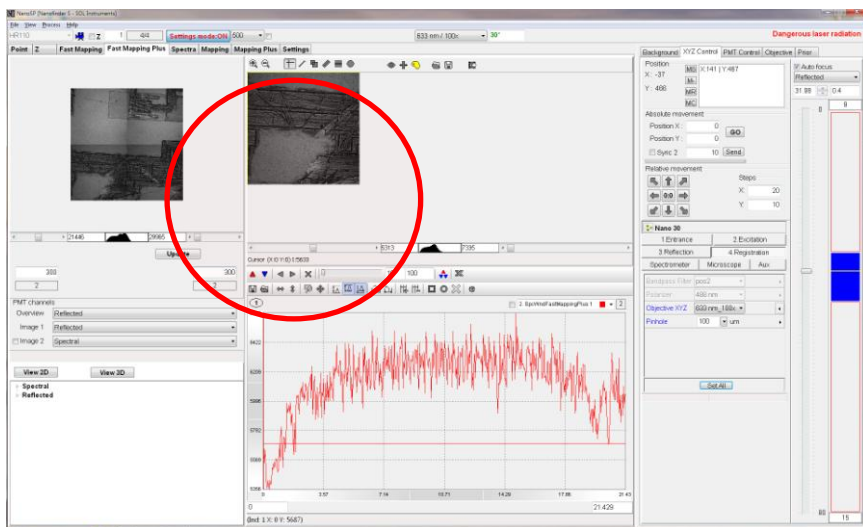


Рис. 4.2. Режим “Fast Mapping Plus”

На рис. 4.3 представлен результат «склейки» четырех изображений.

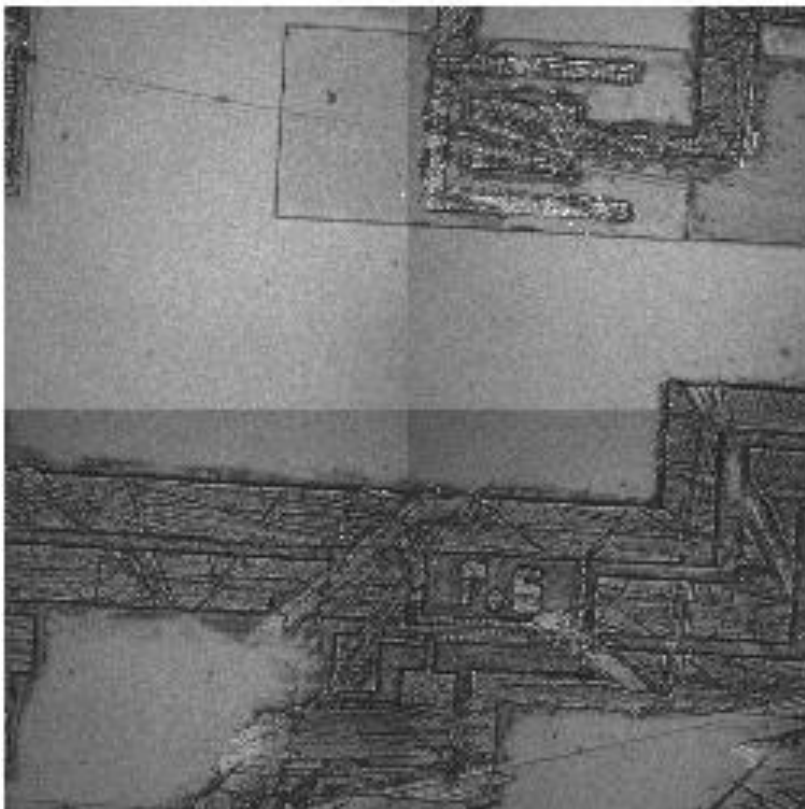


Рис. 4.3. Результирующее изображение образца в режиме “Fast Mapping Plus”

Порядок выполнения работы:

1. Включить прибор.
2. Запустить программу NanoSP, провести первичное тестирование всех узлов прибора.
3. Если планируется снимать рамановское изображение образца, охладить матрицу камеры.

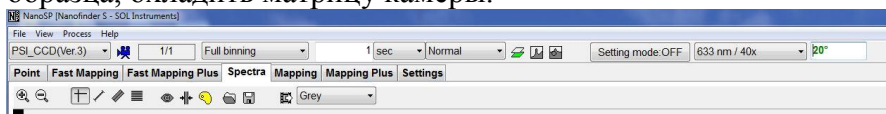


Рис. 4.4. Основная панель программы NanoSP.

4. Подготовить прибор для получения микрофотографий образца (во вкладке Microscope установить положение Empty для

позиции 3D Position Switch). Проверить, чтобы объектив, с которым планируется работать был выбран в программе.

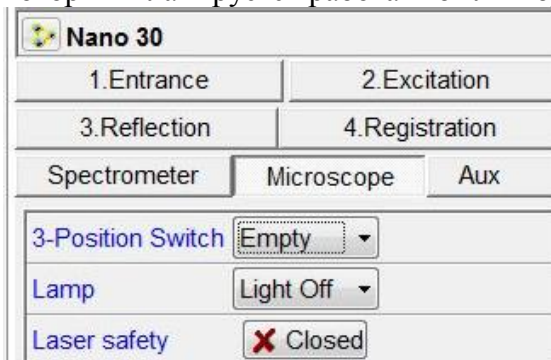


Рис. 4.5. Кнопка выбора режима работы микроскопа.

5. Сфокусироваться на образце.
6. Поменять во вкладке Microscope, 3D Position Switch положение Ag Mirror.
7. Перейти во вкладку “Fast Mapping” (см. рисунок 4.1).
8. Для получения конфокального лазерного изображение выбрать “Reflected” для Overview и Image1. В верхнем левом углу для регистрации выбрана камера HR110.

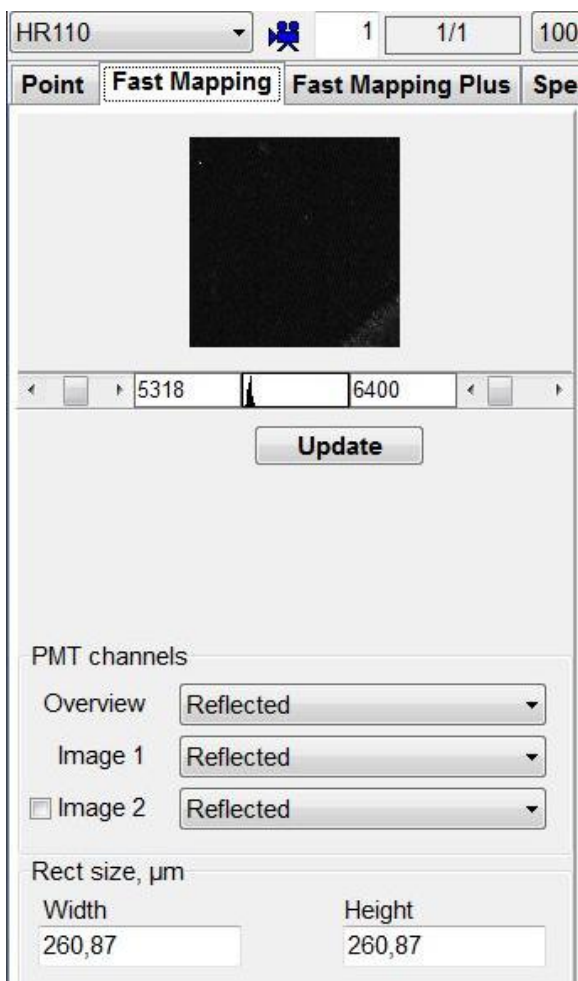


Рис. 4.6. Выбор камеры для регистрации конфокального или рамановского изображения образца.

9. Нажать синюю кнопку в виде кинокамеры или кнопку Update под миниатюрой изображения в левой колонке.

10. В основном окне появится черно-белое изображение образца, полученное в режиме конфокального сканирующего лазерного микроскопа. Если вместо изображения образца в окне появился белый квадрат с серой рябью, проверить, что все шатры открыты (вкладки Entrance, Excitation, Reflection, Spectrometer в

правой колонке).

11. Под ним будет показана кривая, соответствующая изменению интенсивности релеевского рассеивания лазерного света вдоль одной из координатных осей.

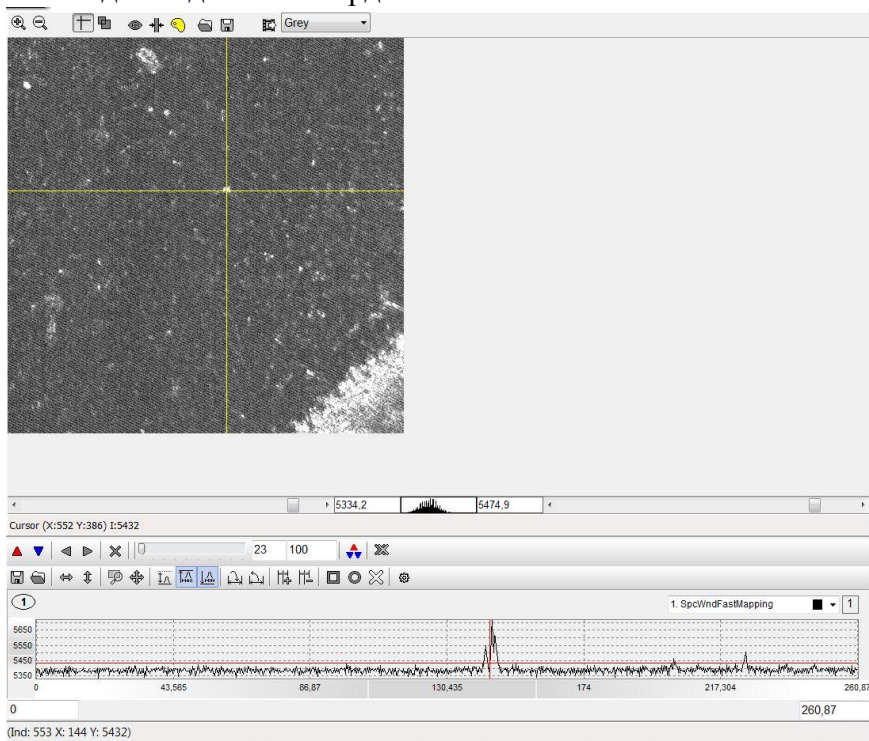


Рис. 4.7. Внешний вид рабочего окна программы NanoSP в режиме работы конфокального лазерного сканирующего микроскопа.

12. Для изображения доступны следующие настройки: изменение яркости, контрастности, увеличение/уменьшение, выделение интересующей области, изменение вида отображения.



Рис. 4.8. Возможные операции с лазерным конфокальным изображением.

13. Сохранить получившееся изображение.

Контрольные вопросы

1. В чем состоит основная особенность конфокальной микроскопии?
2. Что такое Pinhole? Для чего он нужен?
3. В чем отличие режимов работы “Fast Mapping” и “Fast Mapping Plus”?
4. Опишите порядок получения изображения в режиме лазерного конфокального микроскопа на спектрометре ConfotecNR500.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

Получение рамановских спектров образца, обработка спектра

Цель работы

1. Научиться получать спектры комбинационного рассеяния с использованием лазерного рамановского спектрометра Confotec NR500.
2. Получить спектры исследуемого вещества.

Теоретическое введение

Комбинационное рассеяние света, КР (Raman scattering, RS) возникает в результате неупругого рассеяния света материальным объектом. В результате этого процесса исходный фотон возбуждающего излучения с энергией исчезает, испускаются фотоны с другой энергией, а в объекте возникают элементарные возбуждения.

Стоксова рамановская линия – переход молекулы с нижнего на верхний колебательный уровень в результате поглощения и рассеяния кванта света.

Антистоксова рамановская линия – переход молекулы с верхнего на нижний колебательный уровень.

Интенсивность антистоксовых линий мала, т.к. вероятности перехода с верхних на нижние колебательные уровни малы, вследствие больших заселенностей нижних уровней. В практике спектроскопии комбинационного рассеяния используют стоксовы линии (см. рис. 5.1).

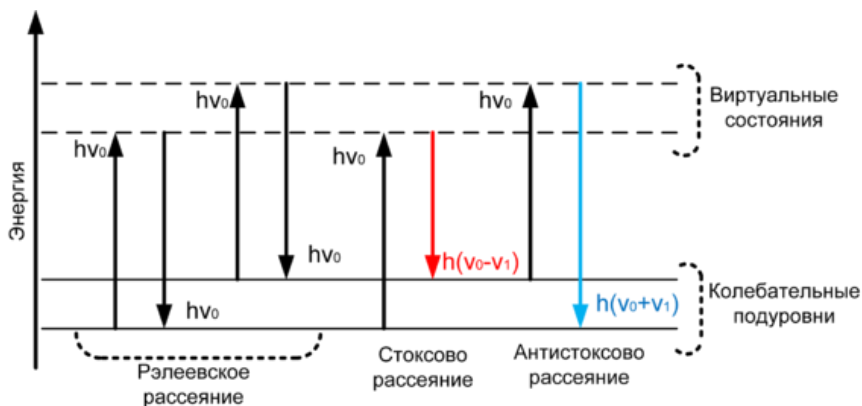


Рис. 5.1. Диаграмма Яблонского

В опытах по КР образец освещают пучком монохроматического света и исследуют излучение, рассеянное под прямым углом к падающему пучку света. До начала 60-х годов в большинстве установок спектры КР возбуждались излучением ртутного разряда. Из-за сравнительно низкой интенсивности обычных источников света и малой интенсивности самих спектров КР время экспозиции при регистрации спектра достигало нескольких часов и даже суток.

Первые эксперименты по применению импульсного рубинового лазера для получения спектров КР были описаны в 1962 г. Наиболее распространенным источником для возбуждения спектров КР стал гелий-неоновый лазер. Как источники возбуждения КР лазеры имеют целый ряд преимуществ. Прежде всего, это очень высокие интенсивность и монохроматичность излучения при практически полном отсутствии непрерывного фона. Гелий-неоновый лазер излучает свет с длиной волны 6328 Å, и имеет ширину линии менее $0,1 \text{ см}^{-1}$ и мощность до 200 МВт. С помощью фильтра слабые лишние линии удаляются из спектра. Лазер испускает излучение в виде узкого пучка с очень малым сечением. С учетом использования фокусирующей оптики плотность потока света на образце может быть очень велика, и в этом заключается еще одно преимущество лазеров.

Колебательная спектроскопия является одним из наиболее часто используемых в химии физических методов анализа. Важным преимуществом колебательной спектроскопии является возможность исследования практически любого агрегатного состояния вещества – газообразного, жидкого или твёрдого.

Основная информация, получаемая в колебательной спектроскопии, – частоты нормальных колебаний молекулы или кристаллической решётки. Сравнение этих частот с литературными данными позволяет проводить идентификацию вещества, а отнесение тех или иных частот к характерным частотам определённых групп, составляющих молекулу, – помогает в определении строения неизвестных веществ. Интенсивности полос спектра, соответствующих колебаниям молекулы, позволяют получать информацию и о количественном составе смесей. Возможности колебательной спектроскопии по качественному и количественному анализу создают пути для анализа равновесий, а также механизмов и кинетики протекания реакций.

Спектры КР в большей степени, чем спектры люминесценции характерны для материалов. Это связано с тем, что частоты фононов однозначно определяются химическим составом материала и внутренними напряжениями в нем, а соответствующие полосы КР, как правило, в десятки раз уже, чем полосы люминесценции, что повышает избирательность определений. В то же время, интенсивность КР на 3-5 порядков меньше, чем интенсивность люминесценции, поэтому для возбуждения спектров КР обычно используется интенсивное узкополосное лазерное излучение. Малая интенсивность КР требует применения специальных мер по подавлению интенсивного «паразитного» фона, возникающего при рассеянии возбуждающего излучения на неоднородностях образца. Это достигается путем использования двойных монохроматоров или специальных полосовых фильтров, избирательно подавляющих возбуждающее излучение. Хотя имеется ряд эффектов, приводящих к размерной зависимости параметров фононов, они проявляются только при размерах наночастиц в несколько постоянных решетки, поэтому спектроскопия КР может быть

использован для характеристики наноструктур с размерами более 1-2 нм.

Колебания, которые не изменяют симметрии молекулы (при колебательном движении), так называемые «полносимметричные колебания», имеют большую интенсивность в спектрах КР, а те, которые максимально искажают ее, наиболее интенсивны в ИК-спектрах. Если в колебании участвуют сильно поляризующиеся атомы (пример: сера или йод), то эти колебания имеют в спектрах КР линии большой интенсивности вне зависимости от симметрии молекулы.

Можно сформулировать четыре эмпирических правила по поводу интенсивности линий КР полимеров:

1. Валентным колебаниям (периодическое сжатие-растяжение химической связи) должны соответствовать в КР спектре более интенсивные линии, чем деформационным колебаниям.

2. Чем выше кратность химической связи, тем больше интенсивность соответствующей ей линии в спектре КР. Например, линии КР, соответствующие $C=C$ колебанию, должны быть более интенсивными, чем линии, соответствующие колебанию $C-C$.

3. Связям, образованным атомами с большими массами, соответствуют линии валентных колебаний с большой интенсивностью в спектрах КР. Хорошей иллюстрацией этому служит линия валентного колебания $S-S$ в белках и в бумагах при сульфатной варке.

4. Линии КР, которые соответствуют синфазному колебанию двух валентных колебаний, обладают большей интенсивностью, чем те, что колеблются в противофазе. То же наблюдается и в спектрах КР циклических соединений: синфазные («дыхательные») моды всегда более интенсивны.

В любом спектрометре имеются три основных компонента: источник возбуждения, аппарат получения сигнала от образца, детектор. Все три компонента претерпели изменение в течение многих лет, в современном рамановском спектрометре использует лазер в качестве источника возбуждения, детектор и

микроскоп или оптоволоконный датчик для получения сигнала от образца.

Поскольку рамановская спектроскопия основана на измерении изменений в длинах волн (или частоты), обязательно необходим источник монохроматического возбуждения. Несмотря на то, что лазер является наилучшим источником возбуждения, не все лазеры подходят для рамановской спектроскопии. Частота лазера должна быть чрезвычайно стабильной и без скачков, в противном случае, это приводит к ошибкам в рамановском сдвиге. Также следует использовать узкополосный лазер, так как качество рамановских пиков зависит от четкости и точности источника возбуждения света.

Заключительным фактором, на который следует обратить пристальное внимание при выборе лазера для рамановской спектроскопии, является длина волны. Чем короче длина волны, тем мощнее рамановский сигнал. Но это не единственное условие, в частности, для работы с органическими молекулами. Большинство органических молекул склонны к флуоресценции при облучении фотонами высокой энергии (короткой длины волны). Несмотря на то, что флуоресценция рассматривается как процесс слабого свечения, она способна подавлять сигнал рамановского спектра. Это связано с тем, что рамановский эффект содержится в очень малой доли (примерно 1 к 10^7) падающих фотонов. Лазеры видимого спектра обычно используются только для анализа неорганических материалов, например углеродных нанотрубок.

Эффективность КР может быть резко увеличена при использовании спектроскопии, т.н. гигантского КР, ГКР (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, SERS). Эта техника использует эффект усиления напряженности оптических полей вблизи поверхности наночастиц или шероховатостей серебра и золота при резонансном возбуждении в них коллективных колебаний электронного газа – плазмонов. Такие ГКР-активные среды формируются либо на поверхности подложек, либо в виде коллоидных растворов наночастиц. При локализации наноструктуры вблизи поверхности наночастиц или шероховатостей, интенсивность КР от нее может увеличиться на

3-6 порядков в зависимости от материала, формы и размера частицы металла.

Методы релеевского рассеивания и раман-спектроскопии хорошо зарекомендовали себя как высокоинформативные методы быстрого неразрушающего контроля химического состава и других параметров наноструктурированных объектов и ансамблей наночастиц. Однако их предельное пространственное разрешение определяется дифракционным пределом, что в случае использования конфокальной микро-рамановской техники составляет примерно половину длины волны света (200–350 нм), позволяя получать лишь усредненную по наноструктуре или по ансамблю наночастиц информацию.

В настоящее время в связи с техническим прогрессом в области Фурье-спектроскопии эта техника стала применяться для получения спектров КР. Благодаря большой светосиле Фурье-спектрометров удалось использовать для возбуждения спектров КР инфракрасные лазерные источники, что позволило устранить мешающую флуоресценцию. В настоящее время выпускаются, как дисперсионные, так и Фурье КР-спектрометры.

В спектроскопии КР применяются разные источники возбуждения спектра: УФ- и ИК-лазеры. Отметим некоторые достоинства и недостатки инфракрасной Фурье-спектроскопии КР.

Достоинства:

1. Отсутствие мешающей люминесценции (флуоресценции). Принцип многоканальной регистрации. Число каналов не лимитируется устройством и характеристиками приемно-регистрирующего тракта.

2. Высокое разрешение, не зависящее от физических размеров диспергирующего элемента.

3. Высокая точность определения частот линий в спектре, обусловленная наличием внутреннего стандарта частоты (обычно He-Ne лазера) в Фурье-спектрометре.

4. Необходимость применения двойного предварительного монохроматора отпадает и заменяется фильтром для подавления паразитного рассеянного возбуждающего КР лазерного

излучения, что позволяет получать низкочастотный спектр КР в области частот вплоть до 50 см^{-1} .

Недостатки:

1. Уменьшение сечения КР в инфракрасной области спектра.
2. Высокие требования к стабильности лазерного источника возбуждения КР (по частоте и интенсивности).

Порядок выполнения работы.

1. Включить компьютер, провести первичное тестирование прибора.

2. Охладить камеру, при помощи которой будет регистрироваться рамановский спектр. На главной панели программы имеется окно для отображения температуры сенсора цифровой камеры. Это окно используется как поле ввода для установки желаемой температуры. После загрузки программы NanoSP для CCD поддерживается температура $+20\text{C}^{\circ}$ (рис. 5.2).

Для изменения температуры переместите курсор в поле ввода температуры и после этого введите новое значение температуры. Нажмите Enter. Появятся два значения температуры: текущая температура (будет изменяться в процессе охлаждения/нагрева ПЗС камеры) и заданная температура).

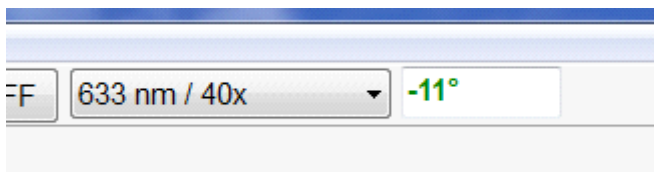


Рис. 5.2. Окно выбора температуры охлаждения камеры.

Когда значение температуры достигнет заданного, эта величина окрасится в зеленый цвет.

3. Проверить соответствие фактически выбранного объектива и выбора объектива в программе.

4. Получить качественное визуальное изображение исследуемого образца при помощи микроскопа (см. лабораторную работу №2).

5. Перейти в режим лазерного сканирующего конфокального микроскопа (см. лабораторную работу №4).

6. На полученном изображении выбрать точку, в которой будет регистрироваться рамановский спектр (рис. 5.3).

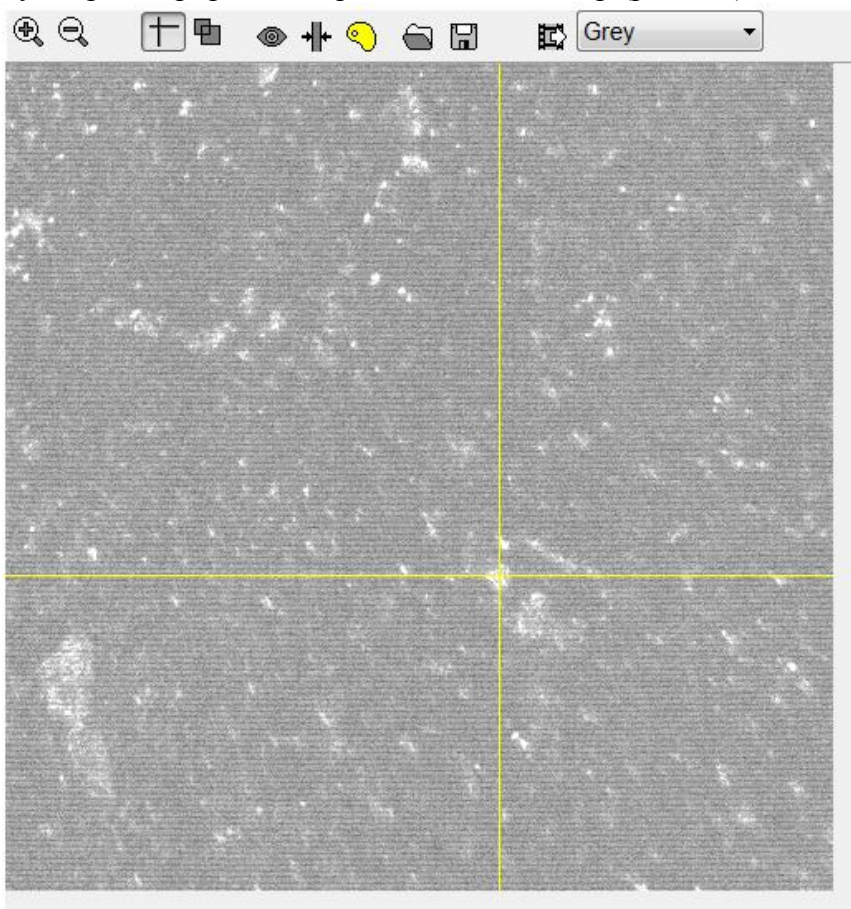


Рис. 5.3. Выбор точки, в которой будет регистрироваться рамановское изображение.

7. Перейти во вкладку "Spectra". Заголовок окна примет внешний вид, изображенный на рисунке 5.4.

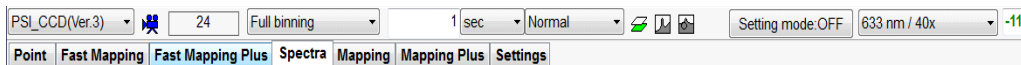


Рис. 5.4. Главная инструментальная панель для режима Spectra

На панели представлены следующие позиции:

Тип (модель) системы регистрации.

Кнопка запуска/остановки сканирования образца.

Счетчик количества сканов (измерений).

Выбор режима работы цифровой камеры используется для активации одного из следующих режимов её работы: “Full binning” или “Image” (рис. 5.5):

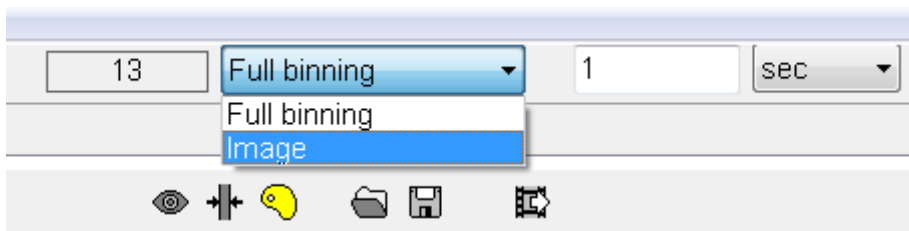


Рис. 5.5. Режимы работы цифровой камеры

В “Full binning” режиме строки ПЗС суммируются на аппаратном уровне и получается один спектр, что обеспечивает высокую скорость сканирования. Высокая скорость сканирования спектров очень важна при картировании образца. Это обстоятельство позволяет считать режим Full binning главным режимом сканирования CCD.

“Image” режим позволяет наблюдать спектральное изображение пинхола с помощью цифровой камеры. Этот режим полезен при выставлении камеры по фокусу и углу, а также для контроля качества изображения в спектрометре. Возможно получение спектра суммированием сигнала в заданном количестве строк CCD (инструмент Rectangle панели image).

Поле ввода времени накопления для цифровой камеры и выпадающий список для выбора единиц времени накопления (по умолчанию выставлена 1 с, в качестве единицы измерения может быть использована с, мс, мкс).

Режим сканирования

- Normal (разовое сканирование образца, после каждого сканирования вид спектра в рабочем окне обновляется, продолжаться сканирование будет до его остановки).

- Kinetic (в данном режиме можно наблюдать изменение рамановского спектра в некотором процессе, происходящем в образце)

- Accumulation (режим накопления сигнала. В данном случае возможны два варианта: Sum и Average. Также в этом режиме изменится внешний вид рабочей панели (рис. 5.6).

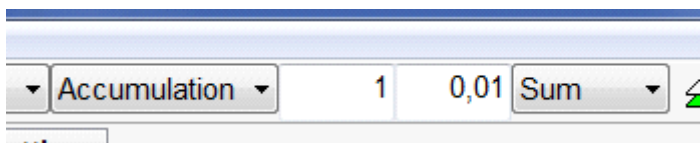


Рис. 5.6. Вид части рабочей панели при работе в режиме накопления сигнала.

В данном окне можно ввести количество сканирований, из которых будет формироваться конечный спектр и время задержки между сканами.

Режим вычитания фонового сигнала.

Индикатор режима работы: наладочный (Setting Mode) и безопасный (Safe Mode).

Выбор лазера/рабочего объектива.

Окно установки температуры камеры.

8. Выбрать режим сканирования, установить необходимые параметры в режимах Kinetic или Accumulation и нажать кнопку запуска сканирования.

9. Сканирование будет продолжаться до повторного нажатия на кнопку запуска сканирования.

10. Возможны дополнительные настройки системы.

Если мощность излучения слишком большая, что может привести к разрушению образца, мощность лазера можно понизить, при помощи специального фильтра. На рисунке 5.7 представлен внешний вид данного окна. В окне ND filter можно установить значение от 1 до 3. В окне Step можно менять шаг

фильтра. Есть возможность ввести и дробное значение. После введения значения, необходимо нажать кнопку Set All.

Nano 30		
1.Entrance	2.Excitation	
3.Reflection	4.Registration	
Spectrometer	Microscope	Aux
ND filter	0	
step: 1	◀ ▶	
Beam Expander	633 nm_40x ▼	
Half Wave Plate	pos1 ▼ ▶	
Beam Splitter	633 nm ▼	
Polarizer	pos1 ▼ ▶	
Set All		

Рис. 5.7. ND фильтр

Во вкладке Registration можно установить размер пинхолла для сканирования в режиме рамановского сканирования.

Nano 30		
1.Entrance		2.Excitation
3.Reflection		4.Registration
Spectrometer	Microscope	Aux
Bandpass Filter	pos2	▶
Polarizer	pos1	▶
Objective XYZ	633 nm_40x	▶
Pinhole	40	▼ um
Set All		

Рис. 5.8. Выбор рамановского пинхола

Вкладка Spectrometer позволяет выполнить следующие действия: открыть/закрыть шаттер лазера, выбрать камеру для регистрации изображения,

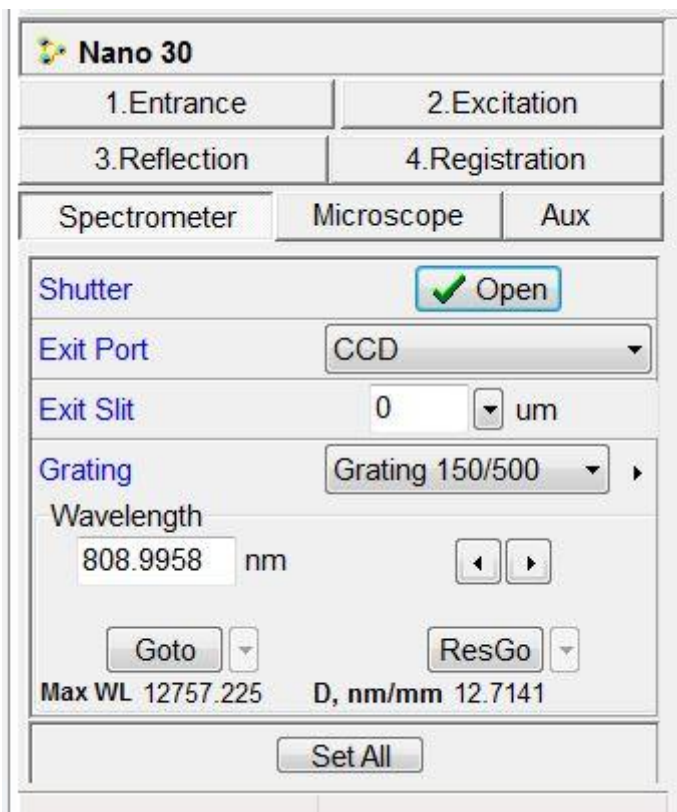


Рис. 5.9. Внешний вид вкладки “Spectrometer”

Также в данном окне есть возможность выбора дифракционной решетки (кнопка Grating). От этого выбора зависит конечное разрешение полученного спектра. После смены дифракционной решетки в окне Wavelength следует ввести длину волны, которая соответствует середине диапазона наблюдения спектра. Длину волны следует выбирать таким образом, чтобы длина волны возбуждающего лазера оставалась за левым краем рабочего окна спектрометра.

Контрольные вопросы:

1. Что такое комбинационное (рамановское) рассеивание?
2. Расскажите о способах усиления рамановского сигнала.
3. Какие данные можно получить из рамановского спектра.
4. Перечислите преимущества и недостатки рамановской спектроскопии.
5. Опишите порядок получения рамановского спектра.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Свищев Г.М. Конфокальная микроскопия и ультрамикроскопия живой клетки [Электронный ресурс]: учебное пособие / Г.М. Свищев. — Электрон. дан. — Москва: Физматлит, 2011. — 120 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/5292>. — Загл. с экрана.

2. Квеглис Л. И. Диссипативные структуры в тонких нанокристаллических пленках [Электронный ресурс]: монография / Л. И. Квеглис, В. Б. Кашкин ; отв. ред. В. Ф. Шабанов. - Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2011. - 204 с. - ISBN 978-5-7638-2101-7. - Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/441845>

МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

*Учебно-методическое пособие
к лабораторному практикуму*

Составитель: **Мосунов** Андрей Алексеевич

В авторской редакции

Изд. № 61/19. Объем 3,25 п.л.
РИИЦМ ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»