

Auflösungssteigerung bei optischen Rastermikroskopen mit Hilfe eines bildinvertierenden Interferometers



Institut für Angewandte Optik
Friedrich-Schiller-Universität Jena
D. Weigel, H. Babovsky, A. Kießling, R. Kowarschik
(Daniel.Weigel@uni-jena.de)



Einführung

Im Bereich der medizinischen und biologischen Forschung sind konfokale Fluoreszenzmikroskope weit verbreitet. Aus diesem Grund ist es von besonderem Interesse, das Auflösungsvermögen solcher Systeme weiter zu verbessern. Bei herkömmlichen Verfahren nutzt man einzig die Intensitätsverteilung in der Bildebene, um auf die Objektstruktur zurück zu schließen. Mit Hilfe eines bildinvertierenden Interferometers ist es möglich, über die Auswertung der Interferenzstrukturen das Auflösungsvermögen zu steigern.

Wir zeigen, dass mit Hilfe eines Mach-Zehnder-Interferometers und eines bildinvertierenden Systems das Auflösungsvermögen eines herkömmlichen Mikroobjektivs deutlich gesteigert werden kann.

Funktionsprinzip

Bildet man einen Objektpunkt durch ein bildinvertierendes Interferometer ab, kann an den Ausgängen, neben dessen Bild (Airy-Scheibchen), auch eine an der optischen Achse gespiegelte Kopie beobachtet werden. Da der Punkt durch die Amplitudenpunktverwaschungsfunktion h des Systems "verschmiert", wird interferieren die beiden Punktbilder im abgeglichenen Fall miteinander (Gl. 1).

$$I(\vec{r}, \vec{r}_0) = |h(\vec{r} + \vec{r}_0)|^2 + |h(\vec{r} - \vec{r}_0)|^2 \pm h(\vec{r} + \vec{r}_0)h(\vec{r} - \vec{r}_0) \quad (1)$$

Subtrahiert man die Intensitätsverteilung am destruktiven Ausgang von der des konstruktiven, bleibt einzig die Interferenzstruktur bestehen. Die Integration über dieses Interferenzmuster liefert ein Signal in Abhängigkeit von der Position \vec{r}_0 , der Punktlichtquelle (Gl. 2).

$$IPSF(\vec{r}_0) = 2 \iint_{-\infty}^{+\infty} h(\vec{r} + \vec{r}_0)h(\vec{r} - \vec{r}_0) dx dy \quad (2)$$

Dieses Signal beschreibt die Übertragung des Objektpunktes durch das gesamte System und kann somit als interferometrische Punktbildverwaschungsfunktion IPSF bezeichnet werden.

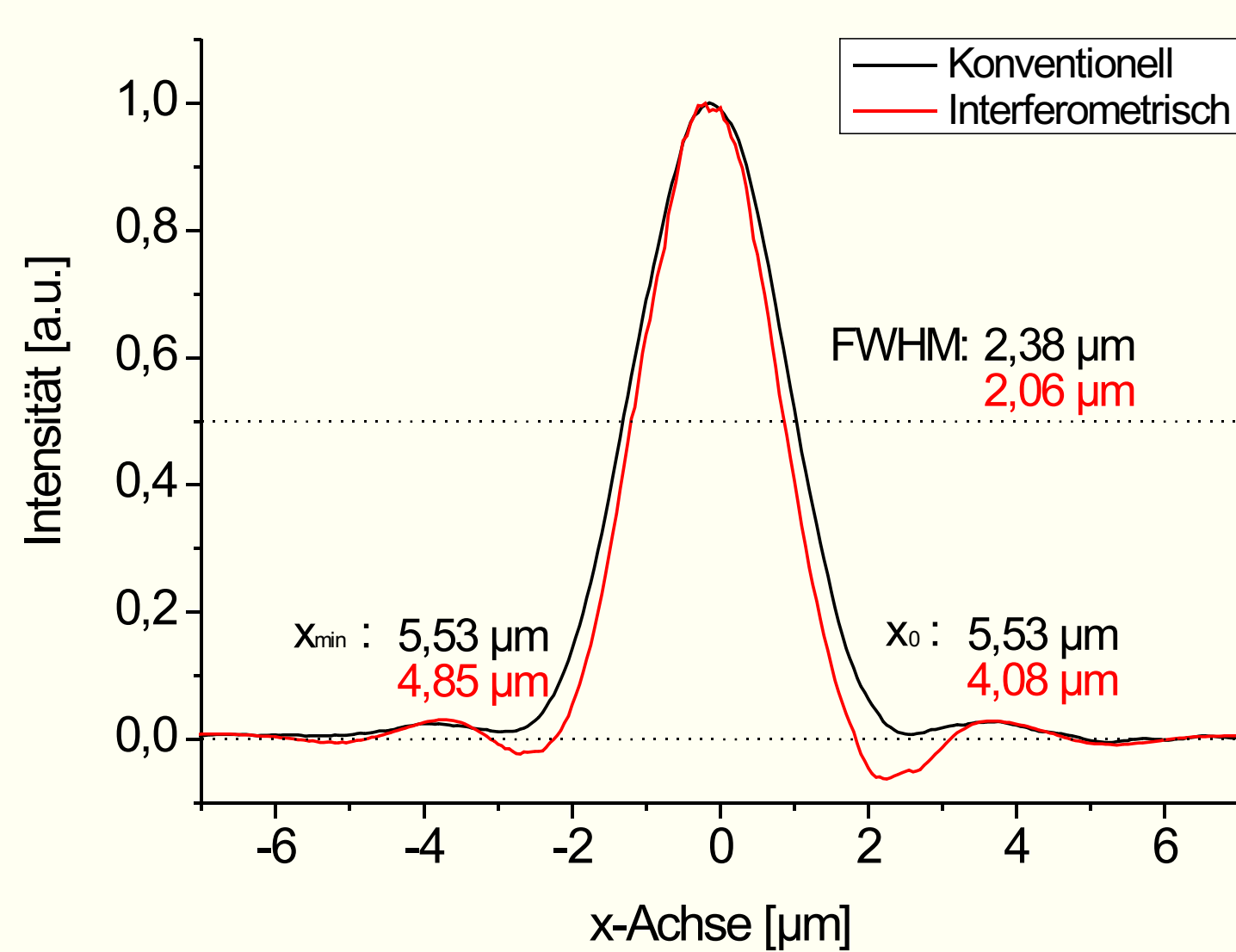


Abb. 2: Vergleich des konventionell gewonnenen Punktbilds mit dem interferometrisch aufgenommenen ($\lambda = 516 \text{ nm}$)

PSF und Zweipunktauflösung

Um die PSF des interferometrischen Systems ($NA = 0,113$) zu bestimmen, wurde ein in Chrom geätztes Pinhole ($D = 1,0 \mu\text{m}$) untersucht. Als Beleuchtung diente eine LED ($\lambda = 516 \text{ nm}$). Abbildung 2 zeigt den direkten Vergleich der konventionellen mit der interferometrischen PSF. Die Halbwertsbreite (FWHM) verringert sich im interferometrischen Fall um ca. 13 %. Der Abstand der Nullstellen sinkt dabei um ca. 26 %.

Um die tatsächliche Verbesserung der Zweipunktauflösung zu bestimmen, wurden jeweils zwei Pinholes mit verschiedenen Abständen zueinander untersucht. Bezogen auf das Rayleigh-Kriterium konnte so eine Auflösungssteigerung von ca. 10 % nachgewiesen werden.

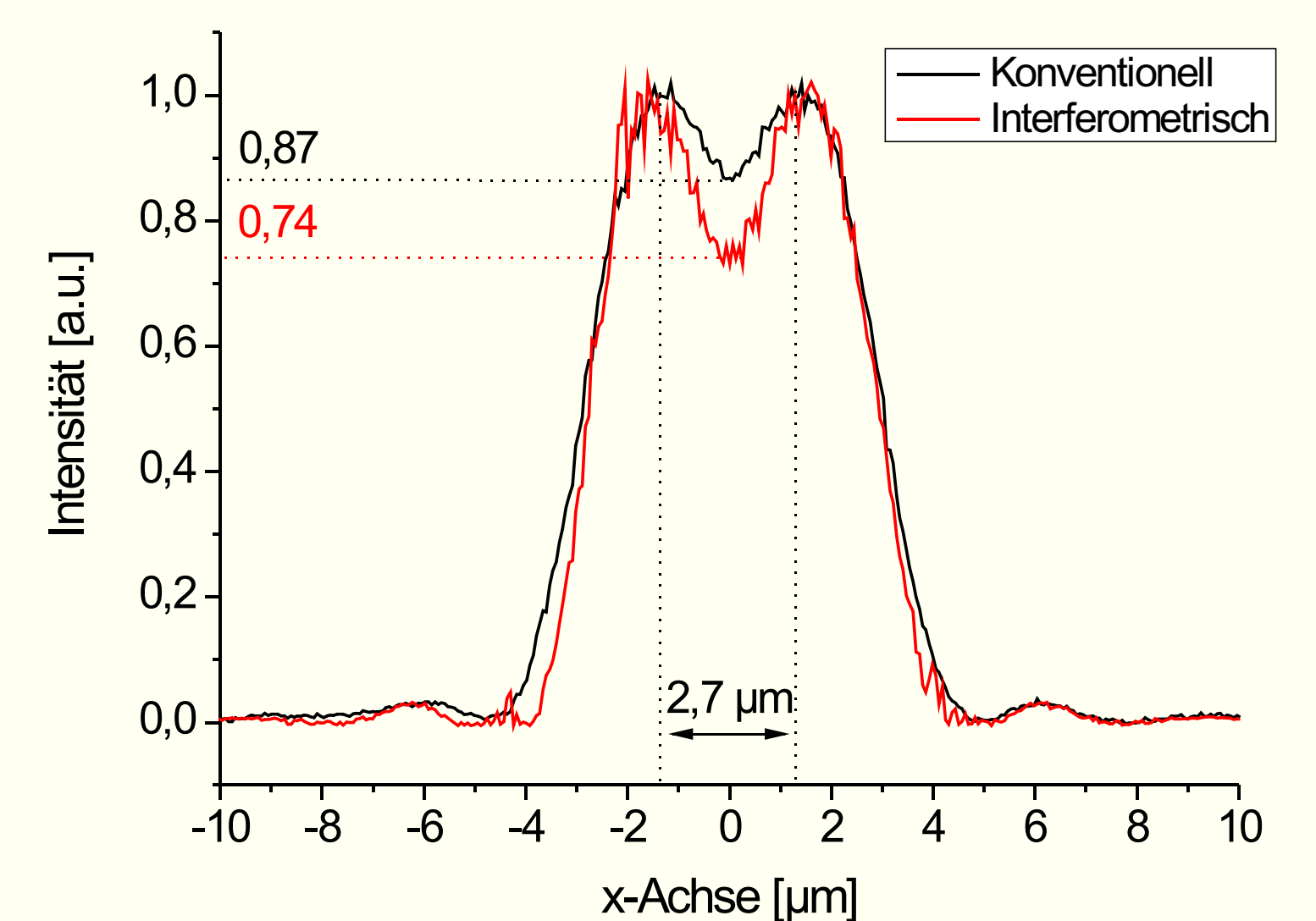


Abb. 3: Schnitt durch zwei Pinholes im Abstand d von $2,7 \mu\text{m}$. Die für das Rayleigh-Kriterium typische Einsattelung auf 74 % tritt konventionell erst bei $d = 3,0 \mu\text{m}$ auf.

Untersuchung von 2D Strukturen

Neben der Vermessung der interferometrischen PSF und der Ermittlung der Zweipunktauflösung konnten bereits erste Aufnahmen von Gittern und weiterer zweidimensionaler Strukturen angefertigt werden. Abbildung 4 zeigt einen Ausschnitt aus dem Logo der FSU Jena schematisch sowie konventionell und interferometrisch aufgenommen. Interferometrisch können noch Details erkannt werden, welche konventionell dargestellt nicht mehr aufgelöst werden. Offensichtlicher noch als der Auflösungsgewinn ist der gesteigerte Kontrast im interferometrisch wiedergegebenen Bild. Der Bildeindruck dieser Aufnahme verbessert sich dadurch deutlich.

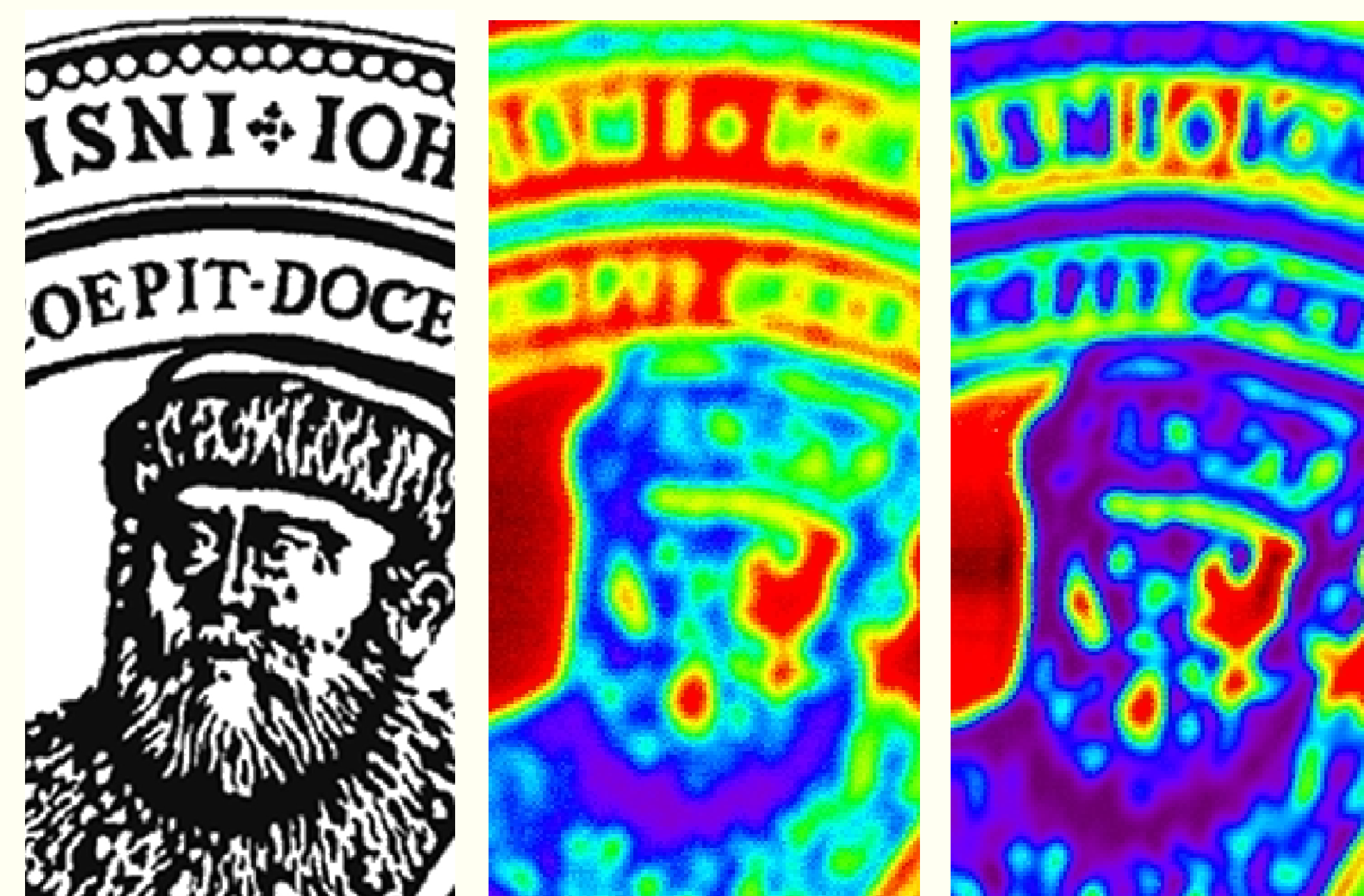


Abb. 4: Ausschnitt aus dem Logo der FSU Jena (ca. $42,7 \times 85,4 \mu\text{m}$) links: Schematische Darstellung der in Chrom geätzten Objektstruktur, mitte: konventionelle Aufnahme, rechts: interferometrische Aufnahme

Diskussion

Wir konnten experimentell zeigen, dass das Auflösungsvermögen eines herkömmlichen Mikroskops mit Hilfe eines bildinvertierenden Interferometers um ca. 10 % gesteigert werden kann. Die Ursache für die signifikanten Abweichungen der theoretischen IPSF von der gemessenen sind Wellenfrontkrümmungen im Interferometer. Zur Zeit werden Anstrengungen unternommen, um diese Deformationen zu minimieren. Als Folge dessen sollte das Auflösungsvermögen bis auf ca. 30 % gesteigert werden können.

Versuchsaufbau

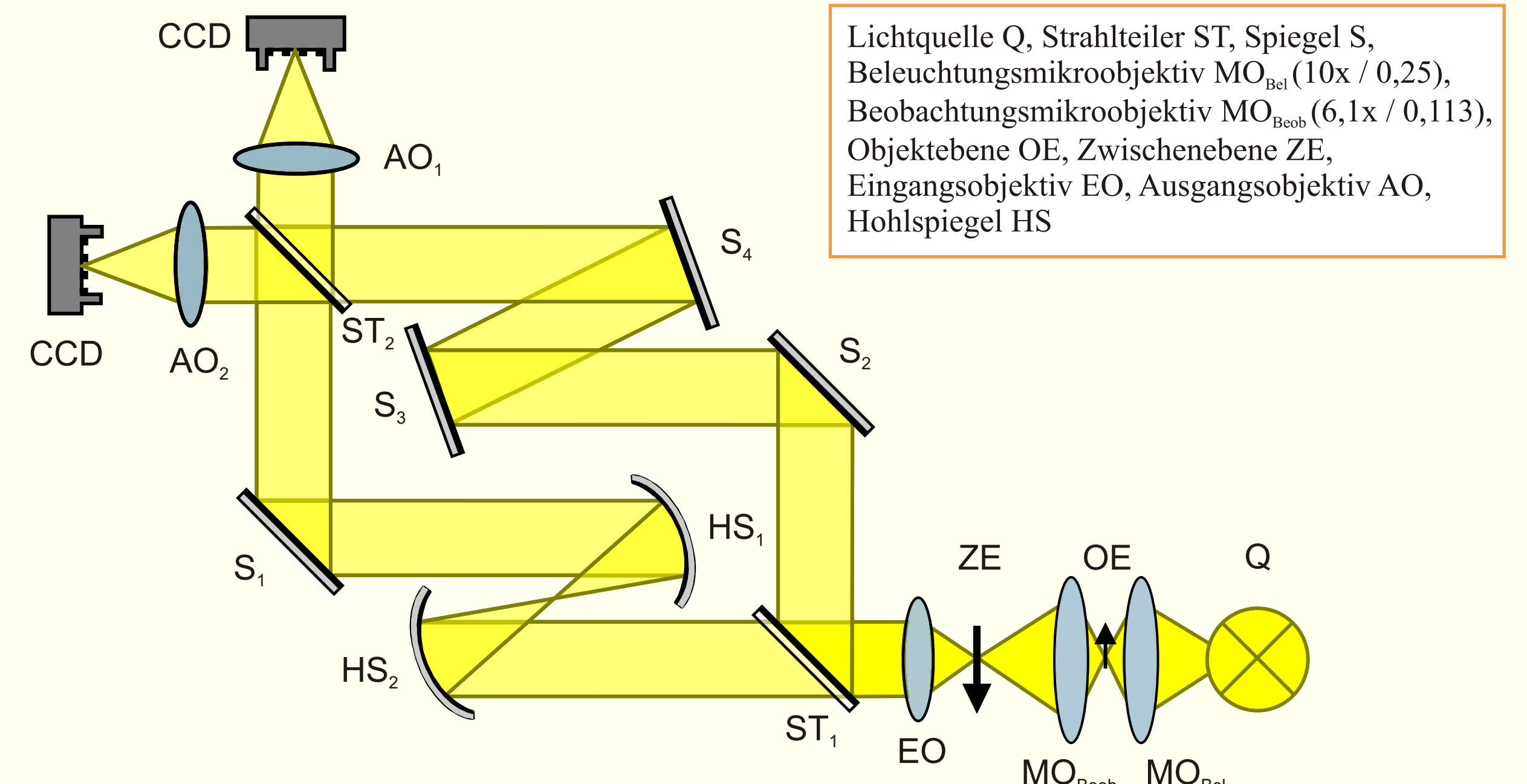


Abb.1: Schematische Darstellung

Das Objekt wird in eine Zwischenebene vergrößert. Mit den Objektiven EO und die AO wird das Zwischenbild durch das Mach-Zehnder-Interferometer auf die CCDs abgebildet. Dort kann dann die Überlagerung des nicht-invertierten mit dem invertierten Bild beobachtet werden. Die Bildinversion wird, um Dispersionseffekte zu vermeiden, mit Hilfe der Hohlspiegel HS₁ und HS₂ realisiert.

Die Punktbildverwaschungsfunktion PSF eines konventionellen Mikroobjektivs entspricht dem Betragsquadrat von h . Sie kann im Fall niedriger numerischer Aperturen durch das Airy-Scheibchen (Gl. 3) dargestellt werden.

$$PSF(r) = \left| \frac{J_1(r)}{r} \right|^2 \quad (3) \quad IPSF(r_0) = \frac{J_1(2r_0)}{2r_0} \quad (4)$$

Die IPSF entspricht dann einer BSinc-Funktion (Gl. 4). Der Abstand der Nullstellen der IPSF ist demnach nur halb so groß, wie der der PSF. Die Halbwertsbreite verringert sich dabei um ca. 30 %.

Besteht das Präparat aus unabhängig voneinander strahlenden Punkten, oder wird es räumlich inkohärent ausgeleuchtet, ergibt sich dessen Bild aus der Faltung der IPSF mit der Objektverteilung.

- [1] N. Sandeau, H. Giovannini, "Increasing the lateral resolution of 4pi fluorescence microscopes," J. Opt. Soc. Am. A 23, 1089 - 1095 (2006)
 [2] K. Wicker, R. Heintzmann, "Interferometric resolution improvement for confocal microscopes," Opt. Express 15, 12206 - 12216, (2007)
 [3] N. Sandeau, L. Wawrezynieck, P. Ferrand, H. Giovannini, H. Rigneault, "Increasing the lateral resolution of scanning microscopes by a factor of two using 2-Image microscopy", J. Eur. Opt. Soc. Rap. Public. 09040 4 (2009).
 [4] K. Wicker, S. Sindbert, R. Heintzmann, "Characterisation of a resolution enhancing image inversion interferometer" Opt. Express 17, 15491 - 15501 (2009)
 [5] D. Weigel, H. Babovsky, A. Kiessling, R. Kowarschik, "Investigation of the impulse response of an image inversion interferometer," Opt. Commun. 283, 368 - 372 (2010)