

Analyse eines neuen Systemkonzepts zur parallel scannenden Mikroskopie

Tim Stenau, Xiyuan Liu, Karl-Heinz Brenner
Lehrstuhl für Optoelektronik, Universität Heidelberg

<mailto:Stenau@stud.uni-heidelberg.de>

Das in dieser Arbeit entwickelte Systemkonzept zur parallel scannenden Mikroskopie ermöglicht eine schnelle und kostengünstige Untersuchung vieler Proben bei hoher Auflösung und einem großem Sichtfeld. Dazu wird eine eindeutige Punkt-zu-Flächen-Abbildung zwischen Objekt und Detektor benutzt. Die Rekonstruktion des Objekts erfolgt digital.

1 Motivation

Bei genomweiten Analysen in der Biologie werden eine große Anzahl von Einzelexperimenten mikroskopisch untersucht. Dies geschieht in der Regel mit automatisierten Weitfeld-Mikroskopen, mit denen jede Probe einzeln untersucht wird.

Um diesen zeitaufwendigen Prozess zu beschleunigen, soll die Untersuchung vieler Proben auf einem Substrat parallelisiert werden. Die Kombination von Mikro- und Makrolinsen [1] erlaubt die Realisierung eines kostengünstigen Mikroskops. Entscheidend für die schnelle parallele Untersuchung vieler Proben ist es, ein großes Sichtfeld bei einer hohen Auflösung zu haben. Diese Anforderungen erfüllt unser System. Zusätzlich kommt es ohne mechanische Bewegung aus.

2 Prinzip der Bildgebung

In Abb. 1 ist der Aufbau und der Strahlengang des neuen Systemkonzepts gezeigt.

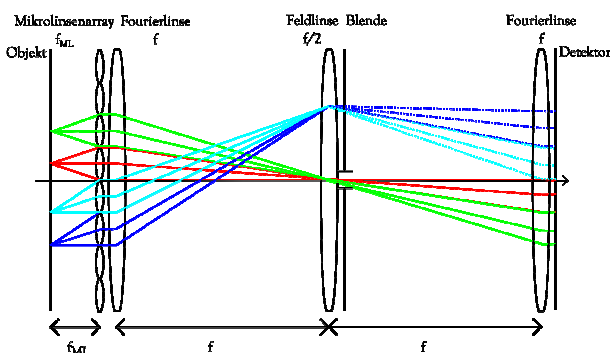


Abb. 1 Strahlengang für Objektpunkte, die sich in der Mitte (grün, rot) und am Rand eines Teilfeldes (cyan, blau) befinden.

Das Mikrolinsenarray unterteilt die Objektebene in viele Teilfelder, welche in die Blendenebene abgebildet werden. Dort existiert eine vergrößerte Überlagerung aller Teilfelder (siehe Abb. 2).

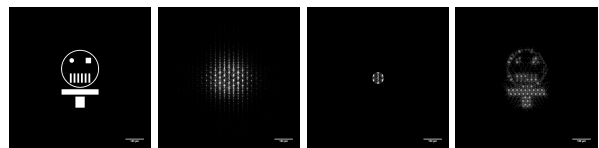


Abb. 2 Simulierte Intensitätsverteilungen an verschiedenen Stellen des Aufbaus. Von links nach rechts: Testbild in der Objektebene, Intensitätsverteilung in der Fourierebene vor und nach der Blende, Bild auf dem Detektor.

Die Fourier- und Feldlinsen bilden ein 2f-System, das die Mikrolinsenebene auf den Detektor abbildet. Die Blende filtert, welche Punkte des Objekts vor den einzelnen Mikrolinsen auf den Detektor abgebildet werden. Für nichtmechanisches Scannen kann die Blende durch einen LCD-Shutter realisiert werden.

3 Prinzip der Rekonstruktion des Objektbilds

Für die Rekonstruktion ist entscheidend, dass einzelne Flächen des Detektors eindeutig Punkten in der Objektebene zugeordnet werden können. Die integrierte Intensität dieser Flächen wird dann als Pixelhelligkeit im rekonstruierten Bild gespeichert.

Durch eine Referenzmessung des Aufbaus mit einer homogenen Beleuchtung lässt sich die Modulation des Mikrolinsenarrays entfernen und man erhält ein normalisiertes Bild der Rekonstruktion.

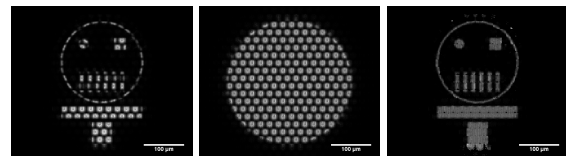


Abb. 3 Von links nach rechts: Rekonstruiertes Testobjekt, Rekonstruktion der Referenzmessung und normalisierte Rekonstruktion des Testobjekts.

Die Korrektur der Rekonstruktion ist nur bei kohärenter Beleuchtung notwendig, da die Modulation durch Interferenz an der Apertur der einzelnen Mikrolinsen entsteht.

4 Iterative Rekonstruktion des Objektes

Schon nach der Aufnahme mit der ersten Blendenposition lässt sich das Objekt mit niedriger Auflösung, d.h. mit nur einem Bildpunkt pro Mikrolinse, rekonstruieren. Mit wachsender Anzahl an Blendenpositionen lässt sich ein höher aufgelöstes Bild rekonstruieren.



Abb. 4 Die Auflösung des rekonstruierten Bildes beträgt $2^n \times 2^n$ Bildpunkte pro Mikrolinse. Sie steigt von links ($n=0$) nach rechts ($n=4$).

5 Eigenschaften des Systems

5.1 Auflösung des rekonstruierten Objektbildes

Die Pixel-Auflösung des rekonstruierten Bildes $\delta r_{\text{Rekonstruktion}}$ wird nur durch die Anzahl der Blendenpositionen und den Mikrolinsendurchmesser $D_{\text{Mikrolinse}}$ bestimmt.

Die physikalische Auflösung des rekonstruierten Bildes $\delta r_{\text{physikalisch}}$ wird durch die numerische Apertur der Mikrolinse $NA_{\text{Mikrolinse}}$ und die verwendete Wellenlänge des Lichts λ begrenzt.

$$\delta r_{\text{Rekonstruktion}} = \frac{D_{\text{Mikrolinse}}}{\# \text{Blendenpositionen}} \quad (1)$$

$$\delta r_{\text{physikalisch}} = 0.61 \frac{\lambda}{NA_{\text{Mikrolinse}}} \quad (2)$$

Der Durchmesser der Blendenöffnung entspricht im optimalen Fall der Breite der Impulsantwort in der Fourierebene. Die Verschiebung der Blende wird in diesem Fall um die Hälfte des Durchmessers der Blendenöffnung durchgeführt.

5.2 Sichtfeld

Falls die Brennweite der Feldlinse $f_{\text{Feldlinse}}$ genau der Hälfte der Brennweite der Fourierlinse $f_{\text{Fourierlinse}}$ entspricht, liegt eine 1:1-Abbildung zwischen der Ebene der Fourierlinse und dem Detektor vor. Das Sichtfeld $FOV_{1:1}$ wird dann durch den Durchmesser des Detektors D_{Detektor} begrenzt.

In einem Aufbau mit $f_{\text{Feldlinse}} < 0.5 f_{\text{Fourierlinse}}$ wird die Ebene der Fourierlinse verkleinert im Maßstab

$M = \left(\frac{f_{\text{Fourierlinse}}}{f_{\text{Feldlinse}}} - 1 \right)^{-1}$ auf den Detektor abgebildet.

Die mögliche Verkleinerung ist nach unten dadurch begrenzt, dass eine Mikrolinse auf nur ein Pixel abgebildet wird. In diesem Fall mit maximalem Sichtfeld entspricht der abgebildete Linsendurchmesser gerade der Detektor-Pixelgröße und die Flächenintegration im Rechner entfällt dadurch.

$$FOV_{1:1} = D_{\text{Detektor}} \quad (3)$$

$$FOV_{\text{max}} = \# \text{Pixel}_{\text{Detektor}} \cdot D_{\text{Mikrolinse}} \quad (4)$$

5.3 Abdeckung des Objektes

Damit das Objekt lückenlos abgetastet werden kann, muss der Durchmesser der Feldlinse $D_{\text{Feldlinse}}$ eine Mindestgröße haben, welche aus dem Abbildungsmaßstab zwischen Objekt- und Blendenebene folgt:

$$D_{\text{Feldlinse}} > \sqrt{2} \cdot D_{\text{Mikrolinse}} \cdot \frac{f_{\text{Fourierlinse}}}{f_{\text{Mikrolinse}}} \quad (5)$$

Hieraus folgt, dass die numerische Apertur der Feldlinse $NA_{\text{Feldlinse}}$ größer als $\sqrt{2} NA_{\text{Mikrolinse}}$ sein muss.

6 Ausblick

Ersetzt man die Feldlinse durch zwei Linsen, die symmetrisch um die Blende stehen, sinken die Anforderungen an die numerische Apertur.

Da die Fourierlinse direkt vor dem Detektor nur eine Phasenkorrektur bewirkt, kann auf sie verzichtet werden.

Berücksichtigt man zusätzlich, dass in einem realen Aufbau die Abstände zwischen den optischen Komponenten nicht zu vernachlässigen sind, dann erhält man auf dem Detektor im Allgemeinen eine verschobene, gefilterte und skalierte Abbildung des Mikrolinsenarrays. Die Verschiebung ist abhängig von der Blendenposition und muss bei der Rekonstruktion berücksichtigt werden.

7 Fazit

Bei diesem Systemkonzept wird das Sichtfeld nur durch die Detektorgröße bzw. die Pixelzahl des Detektors begrenzt. Die maximale Auflösung ist durch die numerische Apertur der Mikrolinsen begrenzt und entspricht der des Rayleigh-Kriteriums. Die numerische Apertur der Fourier- und der Feldlinse werden durch die numerische Apertur der Mikrolinsen und den Grad der Abdeckung festgelegt. Ein wesentlicher Vorteil ist, dass das Scannen bei Verwendung eines LCD-Shutters nicht-mechanisch erfolgt.

Literatur

- [1] A. W. Lohmann: „Image formation of dilute arrays for optical information processing“ in: *Opt. Commun.*, **86**, 365-370 (1991)