

Entwicklung eines scannenden Mikroskops mit diffraktiven Mikrolinsen

K.-H. Brenner, T. Stenau, M. Azizian

Lehrstuhl für Optoelektronik, ziti, Universität Heidelberg

<mailto:brenner@ziti.uni-heidelberg.de>

Die Pixelzahl heutiger Bildsensoren kann in der Weitfeldmikroskopie wegen grundlegender optischer Prinzipien nicht mehr voll ausgeschöpft werden. Nur mit scannender Mikroskopie ist es möglich, diese Grenze zu überwinden. Die damit verbundene Scanzeit kann durch hochgradige Parallelisierung mit diffraktiven Mikrolinsen minimiert werden

1 Einführung

In der Weitfeldmikroskopie besteht ein fester Zusammenhang zwischen der Vergrößerung, dem Auflösungsvermögen und der Größe des Bildfelds. Die Konsequenz hieraus ist, dass die Gesamtzahl der auflösbaren Bildpunkte (Pixel) nahezu unabhängig von der gewählten Vergrößerung ist und deutlich unterhalb der maximalen Pixelzahl heutiger Sensoren liegt. Eine Steigerung der Zahl der auflösbaren Bildpunkte ist nur durch eine scannende Mikroskopie erreichbar. Ein weiterer Vorteil der scannenden Mikroskopie ist die inkohärente Bildentstehung - selbst bei Beleuchtung mit Laserlicht, wodurch der Einfluss von Speckle-Rauschen praktisch nicht mehr vorhanden ist. Ein wesentlicher Nachteil der scannenden Mikroskopie ist der höhere zeitliche Aufwand bei der Bildaufnahme. In diesem Beitrag stellen wir ein neues Konzept für ein scannendes Mikroskop vor, bei dem der Zeitaufwand durch einen hohen Parallelitätsgrad deutlich reduziert wird. Ein weiterer Vorteil ergibt sich durch die Verwendung diffraktiver Mikrolinsen, wodurch es möglich wird, hochgeöffnete Foki bei großem Arbeitsabstand und hoher Packungsdichte zu realisieren.

2 Realisierung diffraktiver Mikrolinsen

Ausgangspunkt für den Entwurf eines diffraktiven Linsenarrays [1-3] ist die Forderung nach einer maximalen Amplitude auf der optischen Achse. Das Optimierungsproblem kann analytisch gelöst werden und liefert wegen der Periodizität die komplexe Pupillenverteilung:

$$U(v, \mu) = \delta\left(v - \frac{n}{P}\right) \delta\left(\mu - \frac{m}{P}\right) e^{-iz\sqrt{\left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - \left(\frac{2\pi}{P}\right)^2 (n^2 + m^2)}} \quad (1)$$

Durch gewählte Beschränkung des Pupillenradius auf NA_{design} und Rücktransformation in den Ortsraum kann hieraus das ideale optische Element mit vorgegebener numerischer Apertur ermittelt werden. Für die einfachere Herstellung ist es günstig, die Amplitude des Elements als eins zu wählen und die Phase zu binarisieren. Abbildung 1 zeigt

den Amplituden-Fokalverlauf für ein so entworfenes diffraktives Element. Auffällig ist, dass hiermit numerische Aperturen realisiert werden können, die nicht durch Linsendurchmesser und die Brennweite begrenzt sind. In einem Extremfall war es sogar möglich, gut fokussierende Linsen mit einem Pitch von 0.3 mm und einer Brennweite von 10 cm zu realisieren.

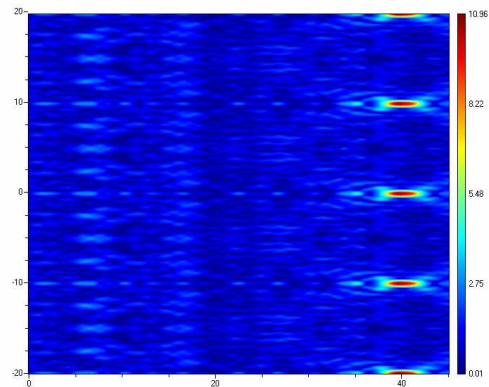


Abb. 1 Amplituden-Fokalverlauf eines diffraktiven Linsenarrays. Hiermit können Linsen mit extrem hoher NA und großem Arbeitsabstand realisiert werden.

Möglich wird dies, da die Linsendurchmesser überlappend entworfen werden können. Verwenden wir einen Pitch P und eine Brennweite f , so ist die numerische Apertur einer Zelle gegeben durch

$$NA_{cell} = \sin\left(\text{atan}\left(\frac{P}{2f}\right)\right) \quad (2)$$

Der Überlappfaktor Ω wird bestimmt durch die gewählte Beschränkung des Pupillenradius NA_{design} gemäß

$$\Omega = \frac{NA_{design}}{NA_{cell}} \quad (3)$$

Für die Minimierung der Scanzeit ist ein Element mit möglichst kleinem Pitch von Interesse, da das Verhältnis von Pitch zu Spotdurchmesser die Zahl der Scanpositionen bestimmt. Abbildung 2 zeigt

das Intensitätsprofil des Fokus, wie er für das Scanmikroskop verwendet wurde.

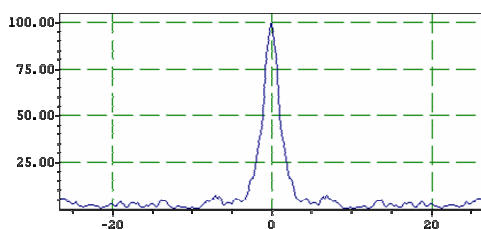


Abb. 2 Intensitätsprofil des DOE- Fokus für das scannende Mikroskop. Die FWHM beträgt $2,2 \mu\text{m}$.

3 Entwurf des Scanmikroskops

Abbildung 3 zeigt den prinzipiellen Aufbau des parallelen Scanmikroskops. Die Kombination aus Laser und Kollimationslinse erzeugt eine parallele Beleuchtungswelle für das diffraktive Element (DOE).

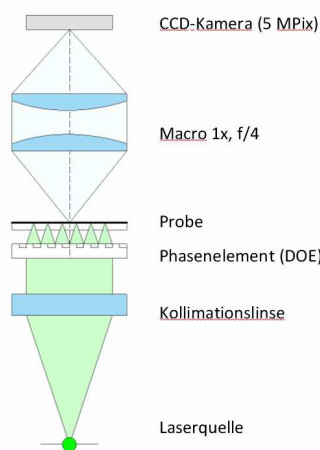


Abb. 3 Prinzipskizze des parallel scannenden Mikroskops.

Im Aufbau wurde eine Periode von $50 \mu\text{m}$ und eine Brennweite von 3 mm gewählt. Die Spotgröße im Fokus kann Abb. 2 entnommen werden. Für die Probe kommen derzeit im Wesentlichen Amplitudenelemente im Durchlicht zum Einsatz, jedoch sind bei geeigneter Pupille zukünftig auch Phasenelemente und Fluoreszenz möglich. Die beleuchtete Probe wird mittels eines Makroobjektivs in einfacher Vergrößerung auf eine CCD-Kamera abgebildet. Die Auflösung des Objektivs kann wesentlich geringer gewählt werden als die des DOE, da es für die Aufnahme nur erforderlich ist, dass die Beiträge, benachbarter Perioden deutlich getrennt sind. Im gezeigten Aufbau haben wir mit $f/4$ die Auflösung an den Pixel-Pitch der Camera ($2,2 \mu\text{m}$) angepasst. Für die mechanische Bewegung des DOE wurde eine drei-Achsen-Piezo-Stellsystem mit einem maximalen Verfahrweg von $500 \mu\text{m}$ verwendet. Das Stellsystem enthält eine Koordinatenkontrolle mit einer Genauigkeit von ca. 50 nm .

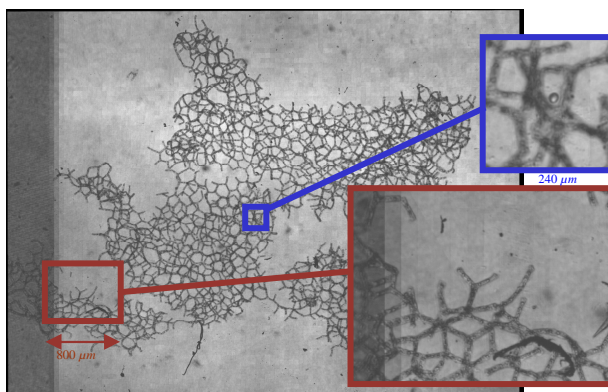


Abb. 4 Erstes experimentelles Ergebnis des parallel scannenden Mikroskops. Die Teilbilder zeigen, dass eine Auflösung von $2 \mu\text{m}$ erreicht wurde. Das Gesamtbild hat 5 Megapixel.

Durch Scannen des DOE über eine Periode wurden im ersten Experiment 32×32 Bilder aufgenommen und im Rechner zu einem Bild zusammengesetzt. Abbildung 4 zeigt das erste Ergebnis für eine Algenart mit ca. 20 mm dicken Ästen und einer dreidimensionalen Struktur. In diesem Experiment wurde bereits eine Gesamtpixelzahl von 5 Megapixeln erreicht. Das Bild zeigt auch zwei Teilansichten, die belegen, dass die Aufnahme bis auf Pixelebene scharf ist. Man erkennt innerhalb der Äste eine Unterstruktur mit einer Auflösung von etwa $1,5 \mu\text{m}$. Wegen der dreidimensionalen Struktur lässt sich ebenfalls die Tiefenaufklärung abschätzen. Durch Steigerung der NA auf $0,95$ ließe sich mit diesem Aufbau und dieser Kamera ein Maximum von 100 Megapixeln pro Bild erreichen.

4 Zusammenfassung

Durch die Verwendung diffraktiver Mikrolinsen wurde ein Scanmikroskop mit extrem hohem Parallelitätsgrad und einer Gesamtpixelzahl von 5 Megapixel realisiert. Mit einem heutigen Bildsensor kann diese Zahl bis auf 100 Megapixel gesteigert werden. Die inkohärente Bildaufnahme ermöglicht Speckle-freie Bilder mit hoher Auflösung.

Literatur

- [1] K.-H. Brenner, R. Buschlinger, "Parallel image scanning with binary phase grating," J. Europ. Opt. Soc. Rap. Publ. **6**, 11024 (2011)
- [2] B. Hulsken, D. Vossen, S. Stallinga, "High NA diffractive array illuminators and application in a multi-spot scanning microscope," J. Europ. Opt. Soc. Rap. Publ. **7**, 12026 (2012)
- [3] X. Liu, T. Stenau, K.-H. Brenner, "Diffractive micro lens arrays with overlapping apertures," 11th Euro-American Workshop on Information Optics, Quebec, Canada (2012)