

Kombination der digitalen Holografie mit der Bildinversionsmikroskopie



D. Weigel, H. Babovsky, A. Kiessling, R. Kowarschik*
Institut für Angewandte Optik, Friedrich-Schiller-Universität Jena

* *Daniel.Weigel@uni-jena.de*

institute
iao
 of applied optics

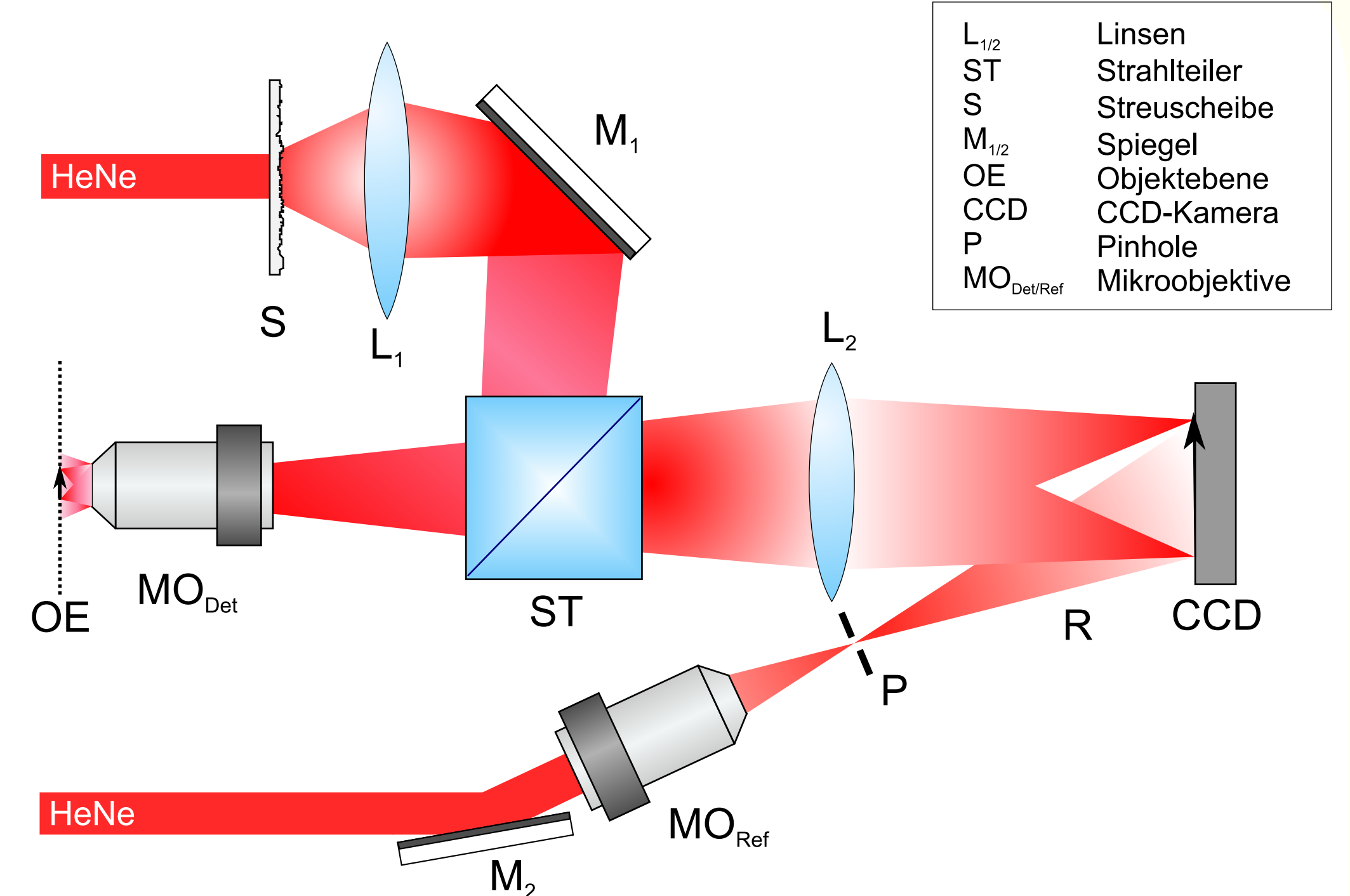
Mit der Bildinversionsmikroskopie[1,2] existiert ein Verfahren, mit welchem es möglich ist, das laterale Auflösungsvermögen optischer Rastermikroskope um ca. 32 % zu verbessern. Dazu wird zwischen Mikroskopobjektiv und Detektor ein bildinvertierendes Interferometer geschaltet. Auf dem Detektor wird dann das Bild des Objekts mit seiner räumlich invertierten Kopie überlagert. Handelt es sich um eine räumlich inkohärente Objektverteilung (Fluoreszenzlicht), können nur in Bereichen nahe der Inversionsachse Interferenzen beobachtet werden. Dieser Bereich ist kleiner als das Punktbild des Mikroskopobjektivs. Beim Abrastern des Objekts führt dies dann zu einer gesteigerten lateralen Auflösung.

Im Gegensatz zu anderen hochauflösende Mikroskopieverfahren wie beispielsweise STED, PALM oder SIM werden keine besonderen Fluoreszenzfarbstoffe oder Mikroskope benötigt.

Allerdings bringt dieses Verfahren auch Einschränkungen mit sich. So muss eine inkohärente Objektverteilung vorliegen, das Objekt muss gescannt werden und das Interferometer muss entsprechend stabilisiert sein.

Versuchsaufbau

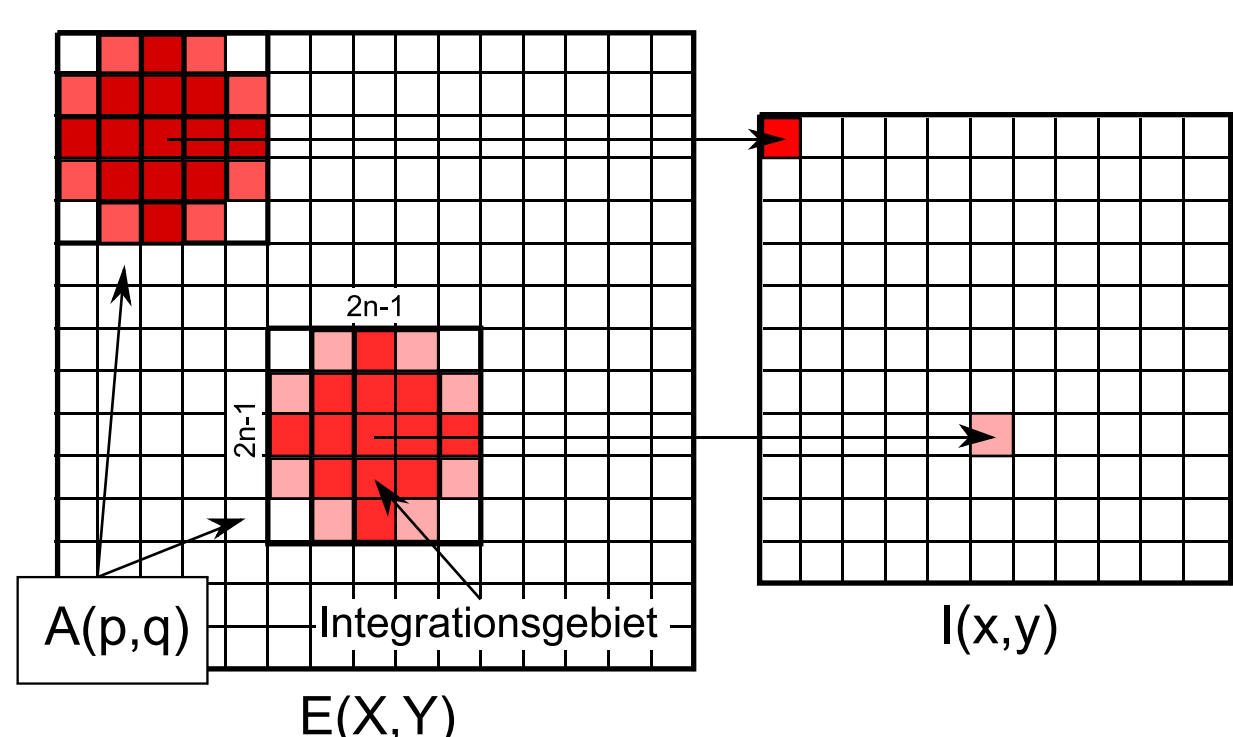
Abb. 1



Schematische Darstellung des Laboraufbaus

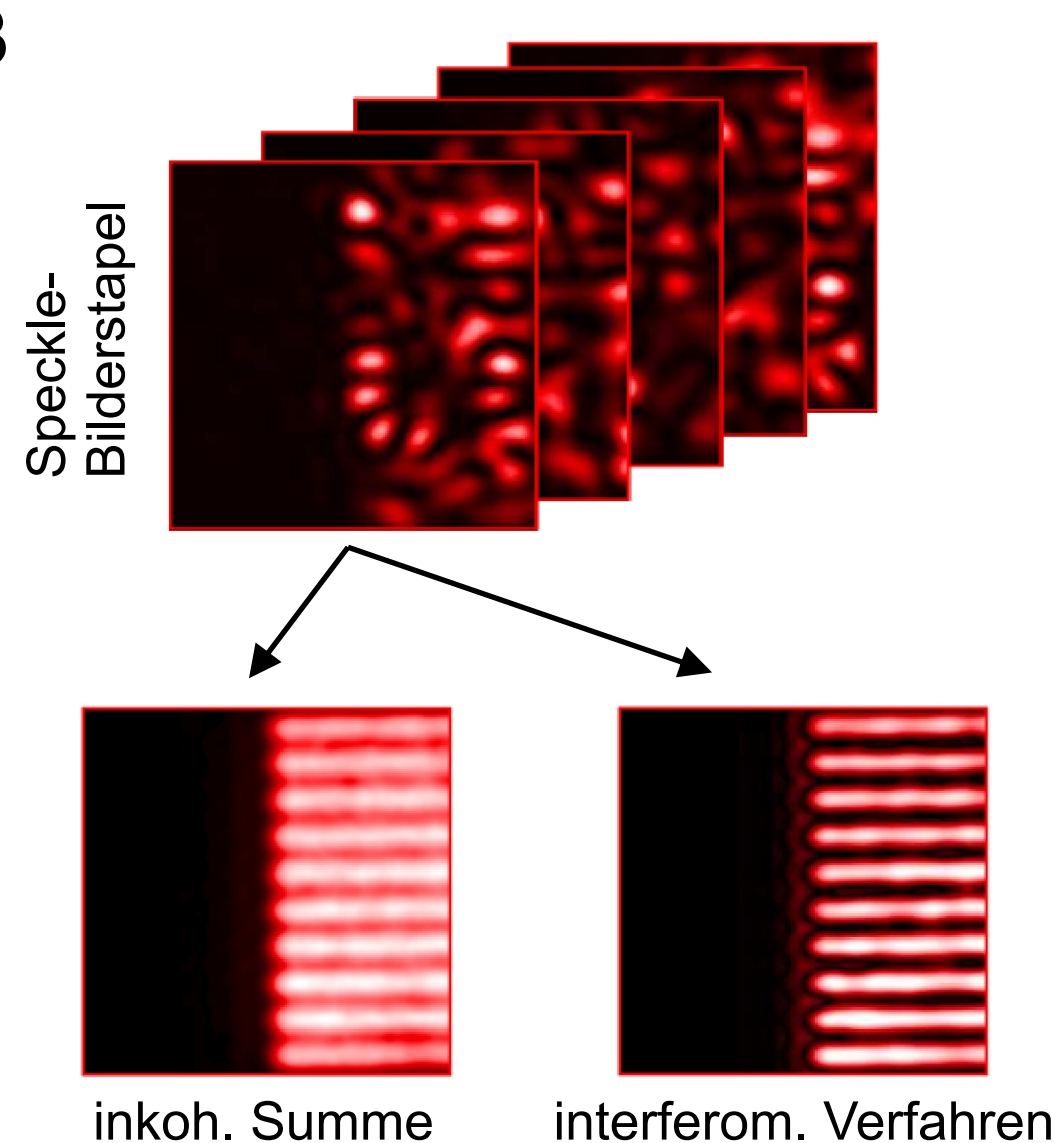
Über die Linse L_1 und den Strahlteiler wird die Streuscheibe in die hintere Brennebene des Mikroobjektivs MO_{Det} abgebildet. Die Objektebene wird auf diesem Weg mit einem statistischen Steckle-Muster ausgeleuchtet. Das vom Objekt gestreute Licht wird wieder über das Mikroobjektiv MO_{Det} , den Strahlteiler und die Linse L_2 auf die CCD-Kamera abgebildet. Dort interferiert es mit der Referenzwelle R . Diese wird durch das Mikroobjektiv MO_{Ref} und das Pinhole P erzeugt und entspricht einer sphärischen Welle. Nach der Aufnahme eines Hologramms wird die Streuscheibe weitergedreht, sodass ein neues stat. Beleuchtungsmuster entsteht. Daraufhin wird ein weiteres Hologramm aufgezeichnet. Dieser Vorgang wiederholt sich, bis hinreichend viele Hologramme aufgenommen wurden.

Abb. 2



Schematisches Funktionsprinzip (nach [3])

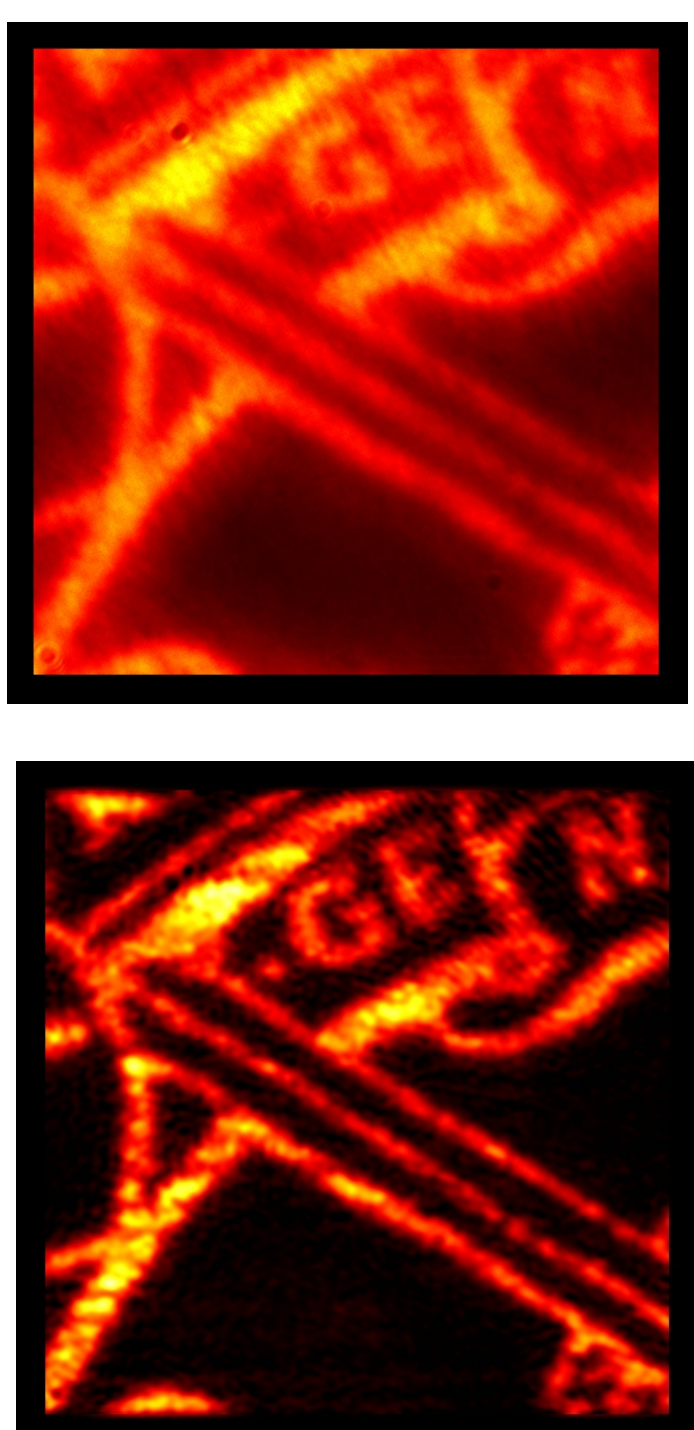
Abb. 3



Mit Hilfe der digitalen Holografie können diese Einschränkungen umgangen werden[3]. Der Anwendungsbereich kann somit auch auf technische Proben und kohärente Objektverteilungen ausgedehnt werden.

Mit einem Laser wird eine Streuscheibe beleuchtet und in die Objektebene abgebildet. Es entsteht ein statistisches Specklemuster, welches das Objekt ausleuchtet. Das gestreute Licht wird auf eine CCD-Kamera abgebildet und dort mit einer Referenzwelle überlagert (Bildfeldholografie). Die räumliche Inkohärenz kann nun simuliert werden, indem viele Hologramme unter jeweils verschiedenen Streuscheibenstellungen aufgenommen werden. Durch die digitale Rekonstruktion der Hologramme erhält man Zugriff auf die komplexe Amplitudenverteilung E . Es wird dazu ein Bereich A um den zu untersuchenden Bildpunkt herausgegriffen. Dieser wird mit seiner invertierten Kopie überlagert. Der Wert des über alle Hologramme gemittelten und aufintegrierten Interferenzterms kann dann dem Bildpunkt auf der Inversionsachse zugeordnet werden (Abb. 2). Dies wiederholt man für jedes der Hologramme. Das gemittelte Ergebnis entspricht dann dem interferometrisch verbesserten Bild. In der Praxis reichen je nach Objektstruktur 500-1000 Einzelhologramme aus, um die Specklestruktur im rekonstruierten Bild zu unterdrücken. Abbildung 3 zeigt einen solchen Stapel von einzeln rekonstruierten Hologrammen. Darunter dargestellt sind deren inkohärent aufaddierte Summe, sowie das durch das Bildinversionsverfahren erhaltene Bild.

Abb. 4



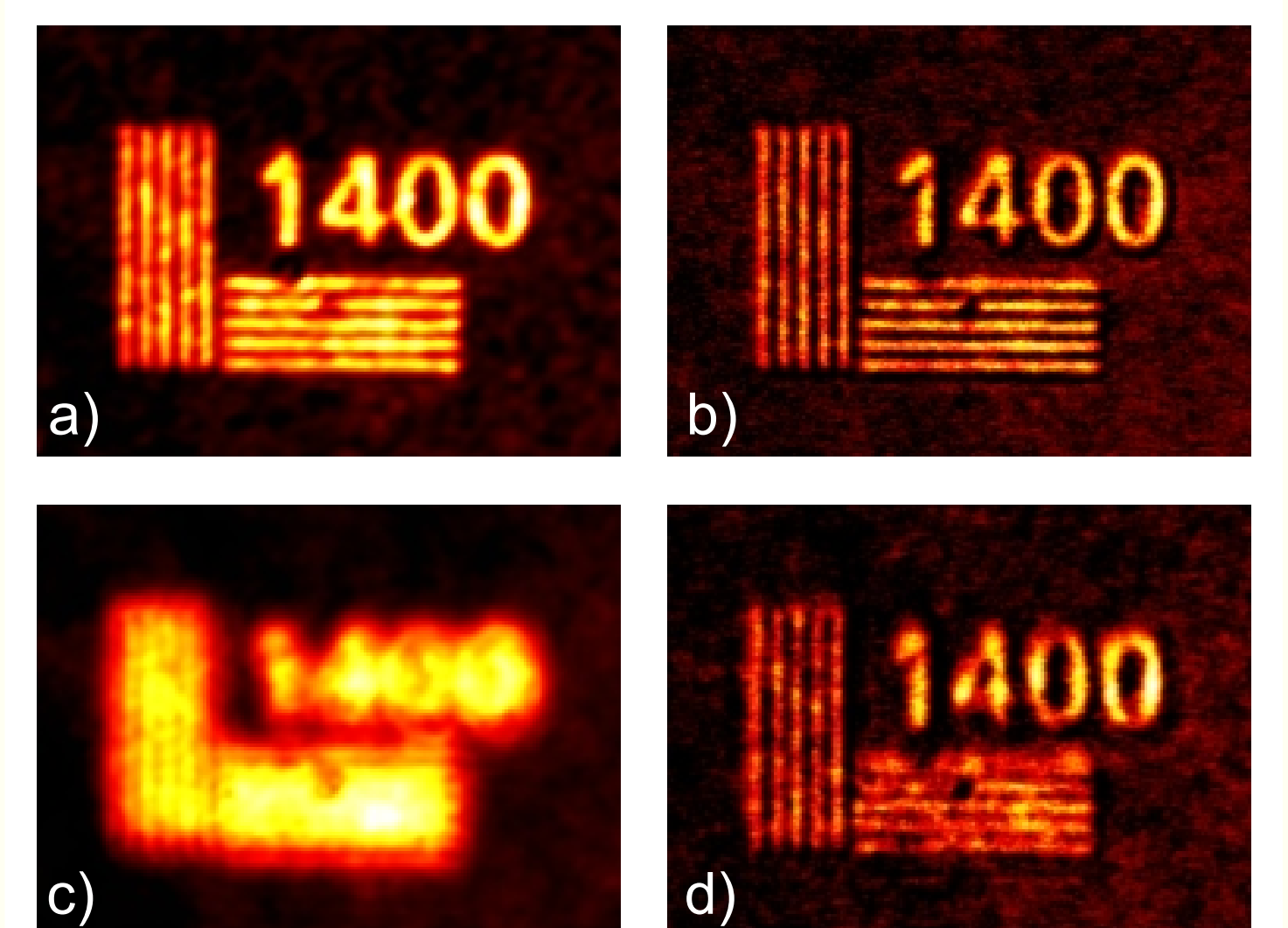
Ausschnitt aus dem Logo der FSU Jena. Die obere Abbildung zeigt den Ausschnitt inkohärent beleuchtet. Die Strukturen wirken sehr verwaschen. Darunter der gleiche Bereich mit dem Bildinversionsverfahren dargestellt.

Durch das Bildinversionsverfahren wird die Grenzfrequenz des Systems nicht vergrößert, hohe Ortsfrequenzen werden aber deutlich kontrastreicher übertragen. Dadurch ist es möglich, detailreiche Strukturen auch dann noch erkennen zu können, wenn sie herkömmlich abgebildet nicht mehr sichtbar wären.

Abbildung 4 demonstriert den Gewinn an Abbildungsqualität durch dieses Verfahren. Feine Strukturen können noch sehr kontrastreich dargestellt werden, während sie in der inkohärenten Abbildung kaum mehr zu erkennen sind. Zudem wird das Streulicht der umliegenden Strukturen deutlich unterdrückt, was zusätzlich zu einem verbesserten Bildeindruck führt.

Neben der gesteigerten lateralen Auflösung kann eine erhöhte Schärfentiefe erzielt werden (siehe auch Poster P 31). Dies wird in Abbildung 5 dargestellt. Es handelt sich dabei um den Ausschnitt aus einem Testchart der eine Struktur mit 1400 Linienpaaren pro Millimeter zeigt.

Abb. 5



Ausschnitt aus einem Auflösungstestchart. Dargestellt ist eine Struktur mit 1400 Linienpaaren pro Millimeter aufgenommen mit einem 40x / 0.65 Mikroobjektiv (Grenzfrequenz $f_c = 2000$ Lp/mm). Bereits in der Fokusebene ist wird die Struktur mit Hilfe des holografischen Bildinversionsverfahrens (b) deutlich kontrastreicher dargestellt, als inkohärent abgebildet (a). Noch deutlicher wird der Unterschied außerhalb der Fokusebene. Während die Struktur inkohärent abgebildet stark verwäuscht (c), kann sie durch mit dem holografischen Verfahren noch deutlich erkannt werden.

- [1] K. Wicker, R. Heintzmann, "Interferometric resolution improvement for confocal microscopes", Optics Express, 15, 12206–12216 (2007)
- [2] D. Weigel, R. Foerster, H. Babovsky, A. Kiessling, and R. Kowarschik, "Enhanced resolution of microscopic objects by image inversion interferometry", Optics Express, 19, 26451-26462 (2011)
- [3] D. Weigel, T. Elsmann, H. Babovsky, A. Kiessling, R. Kowarschik, "Combination of the resolution enhancing image inversion microscopy with digital holography", Optics Communications, 291, 110-115 (2012)