

Optische Simulation von Mikrolinsen-Arrays für die Fluoreszenzmikroskopie

A.-L. Fritze*, A. Evertz*, L. Fütterer*, B. Reitz*, L. Overmeyer*

*Institut für Transport- und Automatisierungstechnik (ITA), Leibniz Universität Hannover

mailto: annalena.fritze@ita.uni-hannover.de

Unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie können Zellen in Mikroumgebungen untersucht werden. Um die Effizienz des Verfahrens zu optimieren, streben wir ein optisches Package an, das das selektive Ausleuchten einzelner Proben ermöglicht. Die Geometrie des Mikrolinsen-Arrays ist dabei abhängig von diversen Parametern und wird zunächst simulativ untersucht.

1 Einführung

Das Prinzip der Fluoreszenz wird unter anderem in der mikroskopischen Forschung auf zellulärer Ebene genutzt. Die Bestrahlung von Proben führt jedoch zur Photobleichung der Fluorophore [1] und zu photooxidativem Stress in den Proteinen [2], was die Repetitivität der Versuche begrenzt [3]. Eine Übermäßige Bestrahlung nicht beobachteter Proben gilt es daher zu vermeiden. Die Abb. 1 zeigt schematisch den Aufbau eines optischen Packages, das derzeit im Forschungsvorhaben angestrebt wird. Durch ein parallelisiertes und miniaturisiertes System soll das selektive Ausleuchten der Wells im Wellenlängenbereich von 395 nm bis 590 nm ermöglicht werden.

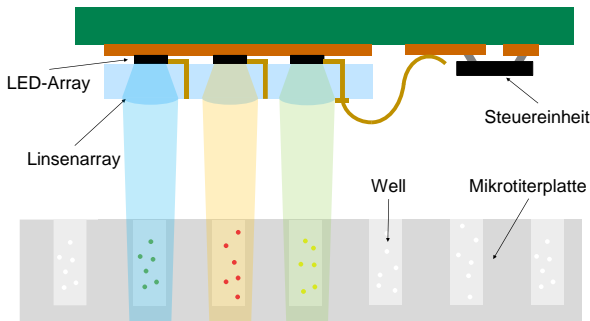


Abb. 1 Konzept zur selektiven Zellbeleuchtung

Um die Anzahl der parallel durchführbaren Beobachtungen zu maximieren, wird der Pitch der Wells minimal gehalten. Die resultierende Randstreuung in den benachbarten Proben soll mit einem Mikrolinsen-Array (MLA) reduziert werden. Zur Verifizierung der berechneten Designs werden Simulationen durchgeführt.

2 Ansatz

Den Ausgangspunkt der folgenden Überlegungen stellt ein 2x2-LED-Array bestehend aus vier LEDs mit verschiedenen Wellenlängen dar. Basierend auf der Kantenlänge der LEDs von ca. 500 µm und der Wells von 400 µm wird ein geeigneter Pitch von 1300 µm für die Mikrotiterplatte festgelegt. Aus den Geometrien resultiert, dass die Proben sich nicht zentral über einer LED, sondern mittig über dem

Array (siehe Abb. 2 links) befinden. Folglich soll mit Hilfe des Freiform MLAs nicht nur eine Fokussierung der Strahlkegel, sondern auch eine Verschiebung der Intensitätsmaxima in die Mitte erfolgen. Die angenommene lambertsche Lichtstärkeverteilung erschwert den Entwurf optischer Systeme im Nahfeld von LEDs [4]. Für jede LED wird daher ein individuelles MLA-Design, entsprechend der schematischen Darstellung in Abb. 2, benötigt. Rechts ist das Brechungsverhalten eines Lichtstrahls mit dem Abstrahlwinkel ε_0 an einer konkaven oberen Glasoberfläche zu sehen. Auf Basis der Komponentengeometrien und des Abstrahlverhaltens ergibt sich für jeden emittierenden Punkt der LED $(x_{LED,i}, y_{LED,i})$ einen Zielpunkt in der Probe $(x_{Probe,i}, y_{Probe,i})$. Um das Aspektverhältnis des MLAs gering zu halten, wird für jede LED ein Array aus j Abschnitten mit einem Pitch von dx_j ausgelegt. Da es sich um Voruntersuchungen handelt, wird für die Linse je Abschnitt vereinfacht eine lineare Steigung α_i angenommen.

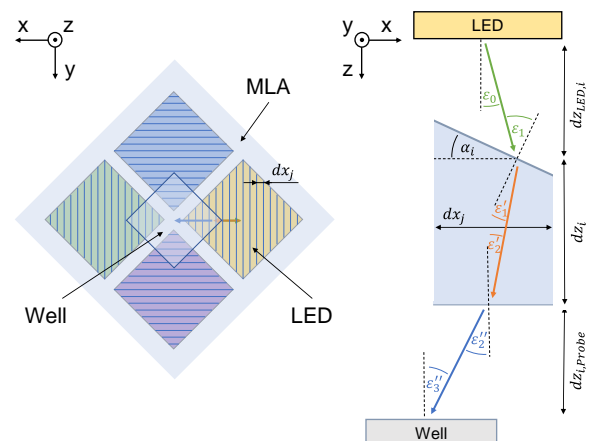


Abb. 2 Strahlengang in der Draufsicht (links) und im vergrößerten Querschnitt der Linse i (rechts)

Die optimale Steigung α_i im Mittelpunkt der Linse wird algorithmisch ermittelt. Die Brechung der Lichtstrahlen an den Oberflächen erfolgt nach dem Snelliusschen Brechungsgesetz.

$$\sin(\varepsilon) \cdot n_{Luft} = \sin(\varepsilon') \cdot n_{Glas} \quad (1)$$

Mit $\varepsilon_1 = \alpha_i + \varepsilon_0$ bzw. $\varepsilon_2 = \alpha_i - \varepsilon_1$ in (1) und den trigonometrischen Verhältnissen zwischen den Komponenten ergeben sich über das Newton-Raphson-Verfahren die vier approximierten Arrays. Die Abb. 3 zeigt beispielhaft das ermittelte MLA-Design über einer LED mit $\lambda = 488 \text{ nm}$ mit $dz_i = 200 \mu\text{m}$ sowie $dz_{LED,i} = 143 \mu\text{m}$ und $dz_{i,Probe} = 800 \mu\text{m}$. Für $j = 25$ liegen die berechneten Steigungen des Arrays zwischen $\alpha_1 = 8,6^\circ$ und $\alpha_{25} = 10,8^\circ$.

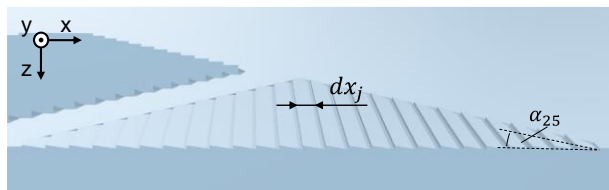


Abb. 3 Querschnitt des MLAs für eine LED (488 nm)

3 Simulationsergebnisse

Zur Validierung der berechneten MLA-Geometrien, wird eine Simulation in Zemax aufgesetzt. Neben dem LED-Array, bestehend aus lambertschen Emitttern, und dem MLA, entsprechend der berechneten Geometrie, werden Detektorebenen auf Probenhöhe eingesetzt. Die Überprüfung der Strahlverschiebung erfolgt mittels Raytracing. Simuliert wurden die in Abb. 4 schematisch dargestellten Modelle.

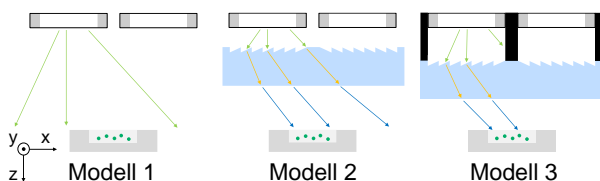


Abb. 4 Prinzipskizze Modell 1-3

Es ergeben sich die Verteilungen der Strahlungsleistung E in den Wells aus Tab. 1. Well 2.2 ist das Ziel-Well, in dem die Leistung maximiert werden soll. Die gewünschte Intensitätsverschiebung kann in Modell 2 erreicht werden, die Randstrahlungen sind jedoch weiterhin verhältnismäßig hoch. Daher werden in Modell 3 vereinfacht Blenden mit einer Höhe von $500 \mu\text{m}$ aus absorbierendem Material hinzugefügt, die die Abstrahlwinkel und damit die Randstrahlen der LEDs reduzieren sollen. Das MLA wurde entsprechend für $dz_{LED,i} = 343 \mu\text{m}$ und $dz_{i,Probe} = 600 \mu\text{m}$ angepasst.

	Leistung E in μW		
	Modell 1	Modell 2	Modell 3
Well 1.1	137	218	2
Well 1.2	200	218	48
Well 1.3	78	110	8
Well 2.1	448	124	45
Well 2.2	891	939	872
Well 2.3	197	208	51

Well 3.1	261	204	34
Well 3.2	436	204	76
Well 3.3	129	129	3

Tab. 1 Verteilung der optischen Leistung in den Proben

Während $E_{2,2}$ im Modell 3 trotz optischer Verluste bei $872 \mu\text{W}$ liegt, konnte die Randstrahlung in der Umgebung durch die Blende deutlich eingeschränkt werden. $E_{2,1}$ wurde um 90 % von $448 \mu\text{W}$ auf $45 \mu\text{W}$ reduziert, auch für $E_{3,1}$ & $E_{3,2}$ konnten 82-87 % der Intensität eingespart werden. Die Abb. 5 zeigt die Raytracing-Ergebnisse für Modell 1 & 3.

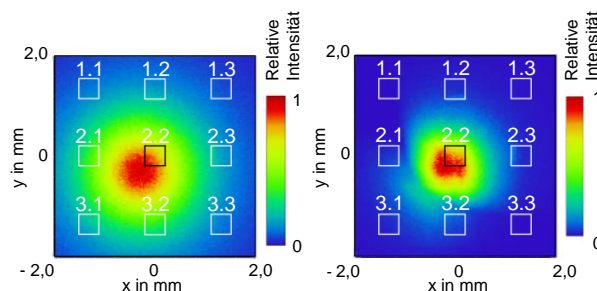


Abb. 5 Simulationsergebnisse für die Bestrahlungsstärke (Modell 1 (links) und Modell 3 (rechts))

4 Fazit und Ausblick

Es konnte simulativ gezeigt werden, dass das errechnete Freiform MLA-Design unter zusätzlicher Verwendung einer Blende eine deutliche Reduzierung der Randstreuungen in den benachbarten Proben sowie eine Verschiebung der Intensitätsmaxima ermöglicht. Der entwickelte Algorithmus ermöglicht eine Anpassung des MLAs bei Veränderung der Systemparameter. Die MikroLEDs stellen, bedingt durch die Größe und den Abstrahlwinkel, den kritischsten Faktor für die Kontrolle der Probenbeleuchtung dar. Durch eine Erweiterung des Modells mit der realen Strahlverteilung kann mit Hilfe einer nichtlinearen Optimierung eine spezifischere Linsengeometrie ermittelt werden.

5 Förderung

Gefördert durch das BMBF im Rahmen des Vorhabens SELFLED (FKZ: 13N16780).

Literatur

- [1] A. P. Demchenko: „Photobleaching of organic fluorophores: qualitative characterization, mechanisms, protection“ in: *Methods and Applications in Fluorescence* **8**, (2020)
- [2] D. I. Pattison, A. Suryo Ramanto & M. J. Davies: „Photo-oxidation of proteins“ in: *Photochemical & Photobiological Sciences* **11**, 38-53 (2012)
- [3] L. Song. et. al.: „Photobleaching Kinetics of Fluorescein in Quantitative Fluorescence Microscopy“ in: *Biophysical Journal* **68**, 2588-2600 (1995)
- [4] S. Wendel, *Freiform-Optiken im Nahfeld von LEDs* (KIT Scientific Publishing 2014)