

Mikroskopie mit synthetischer Apertur

Johannes Bühl*, Holger Babovsky, Armin Kießling, Richard Kowarschik

Institut für Angewandte Optik, Friedrich-Schiller-Universität Jena

<mailto:oik@uni-jena.de>

Wir zeigen, wie die Auflösung eines digitalen holografischen Mikroskops mit Hilfe einer synthetischen Apertur vergrößert werden kann. Dazu wird ein Objekt mit verschiedenen verkippten Beleuchtungswellen beleuchtet. So werden verschiedene Ausschnitte des Fourierpektrums holografisch aufgezeichnet. Wir stellen ein Verfahren zur Synthese der Ausschnitte vor, das alle Parameter aus den Hologrammen bestimmt und sonst keine Messdaten benötigt.

1. Einführung

Nach dem Abbeschen Auflösungskriterium $\Delta d \sim \lambda/NA$ (Δd kleinster auflösbarer Abstand, λ Wellenlänge, NA numerische Apertur) kann das Auflösungsvermögen eines Mikroskops gesteigert werden, indem die Wellenlänge verkleinert und die numerische Apertur vergrößert wird. Bei optischen Mikroskopen kann die Wellenlänge des Beleuchtungslichts jedoch nicht unbegrenzt verkleinert werden, da Linsen im kurzwelligen Bereich immer stärker absorbieren und sehr kurzwellige Strahlung (UV) für Mikroorganismen schädlich ist. Mikroobjektive mit großer NA dagegen haben ein kleines Bildfeld und müssen außerdem aufgrund der geringen Brennweite sehr nahe an das zu untersuchende Objekt herangeführt werden.

In diesem Experiment wird daher eine synthetische Apertur verwendet, um das Auflösungsvermögen eines Mikroskops zu vergrößern, ohne bauliche Veränderungen am Mikroobjektiv vorzunehmen.

Die Idee, eine synthetische Apertur in der Optik einzusetzen, stammt von W. Lukosz [1] und wurde in letzter Zeit auf vielfältige Weise umgesetzt [2,3]. Wir verwenden in diesem Experiment eine verkippte Beleuchtung, um zu selektieren, welcher Ausschnitt aus dem Fourierpektrum eines Objektes vom Mikroobjektiv übertragen wird. Gleichzeitig wird die digitale Holografie eingesetzt, um Amplitude und Phase dieser Ausschnitte aufzuzeichnen. Die Ausschnitte werden dann im Computer zusammengesetzt (synthetisiert) und ergeben schließlich

ein Fourierspektrum des Objektes, welches höhere Raumfrequenzen beinhaltet, als eigentlich vom Mikroobjektiv übertragen werden können. Wir haben ein Verfahren entwickelt, welches einen Überlapp zwischen den einzelnen Ausschnitten ausnutzt, um alle zur Synthese notwendigen Parameter aus den aufgezeichneten digitalen Hologrammen zu bestimmen.

2. Experiment

In Abbildung 1 ist die experimentelle Anordnung dargestellt. Es handelt sich um ein Mach-Zehnder-Interferometer. Im Objektarm befinden sich zunächst zwei gekreuzte holografische Gitter, welche die Beleuchtungswelle in verschiedene Wellen aufspalten. Mit Hilfe des LCOS SLM (Liquid Crystal on Silicon Spatial Light Modulator) kann die Polarisationsrichtung des einfallenden Lichtes verändert und somit entschieden werden, welche Beleuchtungswelle auf das Objekt fällt. Das vom Objekt gebeugte Licht wird anschließend vom Mikroobjektiv abgebildet und mit Hilfe der Referenzwelle auf dem Detektor (CCD-Chip) holografisch aufgezeichnet.

3. Apertursynthese

Die einzelnen Ausschnitte des Fourierspektrums werden zunächst rekonstruiert, indem mit einer Fresnel-Transformation die Lichtverteilung in der Fourierebene des Mikroobjektivs numerisch wiederhergestellt wird. In diesem Experiment werden die Beleuchtungswellen so eingerichtet, dass sich die äußeren Ausschnitte mit dem mittleren Ausschnitt überlappen. Durch eine Korrelation des mittleren Ausschnitts mit den äußeren können daher ihre relativen Positionen zunächst auf 1 Pixel genau bestimmt werden.

Die verschiedenen Beleuchtungswellen legen alle unterschiedliche Wege zurück, daher haben sie auf dem Objekt auch alle eine unterschiedliche Phasenlage. Diese Phasendifferenzen müssen bekannt sein, um bei der Rekonstruktion der Amplitu-

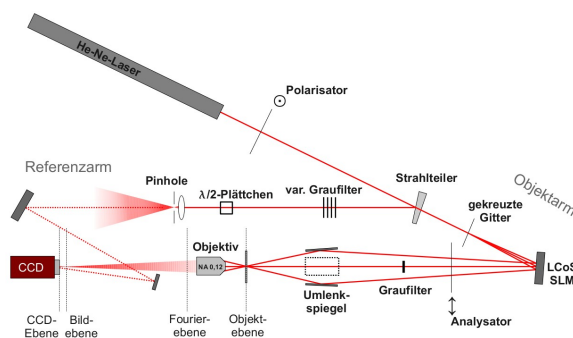


Abbildung 1: Der experimentelle Aufbau

denverteilung in der Objektebene eine phasenrichtige Überlagerung zu gewährleisten.

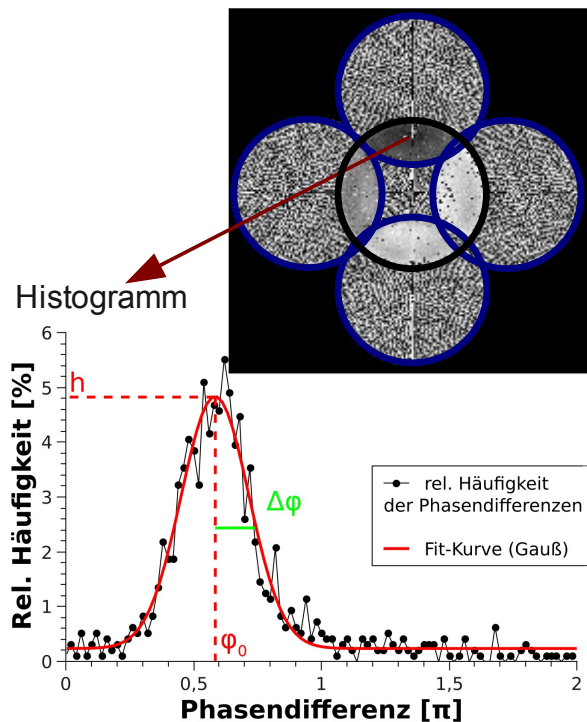


Abbildung 2: Die Verteilung der Phasendifferenzen und das Histogramm im oberen Überlappbereich

Die Phasenwerte werden daher in den Überlappbereichen direkt voneinander abgezogen und in ein Histogramm aufgetragen (Abbildung 2). Aus diesem Histogramm kann dann die mittlere Phasenverschiebung (gestrichelte Linie) und deren statistischer Fehler (FWHM) ermittelt werden. Im hier gezeigten Histogramm liefert der Gauß-Fit den Mittelwert $\varphi_0 = (0,584 \pm 0,004)\pi$ und eine mittlere Abweichung von $\Delta\varphi = (0,092 \pm 0,003)\pi$ (halbe Breite bei halber Höhe). Die maximale Höhe der Kurve (hier $h = 4,80 \pm 0,10$) Prozent ist ein Indikator für die Güte der Übereinstimmung der beiden Ausschnitte im Überlappbereich.

Der äußere Ausschnitt wird nun um weniger als 1 Pixel verschoben, indem das Ausgangshologramm vor der Rekonstruktion mit einem linearen Phasenfaktor mit einem Anstieg von weniger als 2π multipliziert werden. Anschließend wird wieder ein Histogramm berechnet und die Höhe des Peaks ausgewertet. Hat er sich vergrößert, so ist die Übereinstimmung zwischen den Ausschnitten besser geworden. Auf diese Weise werden alle Ausschnitte abgerastert und die Position gesucht, an denen die Histogramm-Peaks die größten Werte annehmen. So kann die relative Verschiebung zwischen den einzelnen Ausschnitten auf weniger als 1 Pixel genau bestimmt werden. In [4] wird dieses Verfahren im Detail beschrieben.

4. Ergebnisse

In Abbildung 3 sind zwei rekonstruierte Amplitudenverteilungen eines Testobjektes dargestellt. Das Auflösungsvermögen des verwendeten Mikroobjektivs (Zeiss Planachromat 6,3x/∞, NA=0,12) wird durch das Zusammensetzen von 5 Ausschnitten in axialer Richtung von $4,4\mu\text{m}$ (Struktur 1) auf $2,3\mu\text{m}$ (Struktur 2) gesteigert.

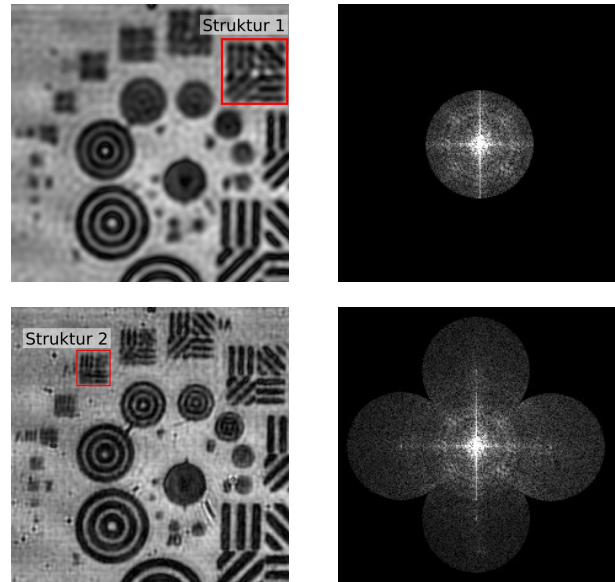


Abbildung 3: Die rekonstruierten Amplitudenverteilungen des Objekts und deren zugehörige Fourier-Spektren

5. Zusammenfassung

Durch die Synthese von 5 einzelnen Ausschnitten des Fourier-Spektrums konnte das Auflösungsvermögen eines Mikroskops um ca. den Faktor 2 gesteigert werden. Das vollautomatische Syntheseverfahren kann die relativen Positionen der Ausschnitte im Fourier-Spektrum mit Sub-Pixel-Genauigkeit bestimmen und deren Phasendifferenzen auf $0,09\pi$ genau messen.

Literatur

- [1] W. Lukosz. „Optical systems with resolving powers exceeding the classical limit.“ J. Opt. Soc. Am., 56(11):1463–1471, 1966.
- [2] S. A. Alexandrov, T. R. Hillman, Th. Gutzler, and D. D. Sampson. „Synthetic aperture fourier holographic optical microscopy.“ Physical Review Letters, 97(16):168102, 2006.
- [3] V. Mico, Z. Zalevsky, P. Garcia-Martínez, and Javier Garcia. „Synthetic aperture superresolution with multiple off-axis holograms.“ J. Opt. Soc. Am. A, 23(12):3162–3170, 2006.
- [4] J. Bühl, H. Babovsky, A. Kießling, R. Kowarschik. „Digital synthesis of different off-axis holograms with overlapping Fourier spectra.“ Optics Comm., 2010 (accepted 18.05.2010).