

Hochwertige Mikroskopobjektive mit ausgefallenen Leistungsparametern

Manfred Matthä

Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen

matthae@zeiss.de

Die Vielfalt der lichtmikroskopischen Anwendungen führt zu ständig wachsenden Ansprüchen an die Leistungsfähigkeit der Mikroskopobjektive. Anhand der Entwicklung der C- Apochromate und der sogenannten Alpha Objektive der Firma Zeiss wird deutlich, wie mit außergewöhnlichen Leistungsdaten den Wünschen der Mikroskopanwender entsprochen wird.

1. Einleitung

Mikroskopobjektive werden für eine Vielzahl lichtmikroskopischer Anwendungen genutzt. Deshalb ist bei der Entwicklung moderner Mikroskopobjektive davon auszugehen, dass mittels der erreichten Leistungsdaten möglichst viele Anwendungsfälle bedient werden können. Die Schwerpunkte der Leistungsverbesserung sind außer einer möglichst planapochromatischen optischen Korrektur und guten Transmission im nahen UV, die Erhöhung der numerischen Apertur, die Vergrößerung des erfassten Objektfeldes und die Erweiterung des nutzbaren spektralen Bereichs in Richtung UV und IR.

2. C- Apochromate UV-VIS-IR

C- Apochromate sind Objektive mit besten Korrektur- und Leistungsdaten, die besonders in der konfokalen Mikroskopie eingesetzt werden, aber auch für andere Mikroskopieverfahren gut geeignet sind.

Besonders durch die wachsende Rolle der Fluoreszenzanwendungen in der konfokalen Mikroskopie und durch die zunehmende Bedeutung der Mehrphotonenanregungen mit gepulsten Laserquellen im Infrarot, entstand das Bedürfnis nach Objektiven, die einen großen Spektralbereich bedienen. Aus diesem Grund wurde der Versuch unternommen, C-Apochromate mit Wasserimmersion zu entwickeln, die mit großen Aperturen und Objektfeldern innerhalb eines extrem weiten spektralen Bereichs apochromatisiert und beugungsbegrenzt korrigiert sind. Das Ergebnis des Designversuchs sind die Objektive:

C- Apochromat 40x/1.2 W Korr UV-VIS-IR

C- Apochromat 63x/1.2 W Korr UV-VIS-IR

LD C- Apochromat 40x/1.1 W Korr UV-VIS-IR

Das letztgenannte Objektiv mit großem Arbeitsabstand ist besonders für Mehrphotonenfluoreszenzanwendungen im IR Bereich geeignet. Die Benennung UV-VIS-IR steht für Apochromasie und beugungsbegrenzte Abbildungsgüte innerhalb 365nm bis 850nm, bei der „Long Distance“ Variante sogar bis 950nm.

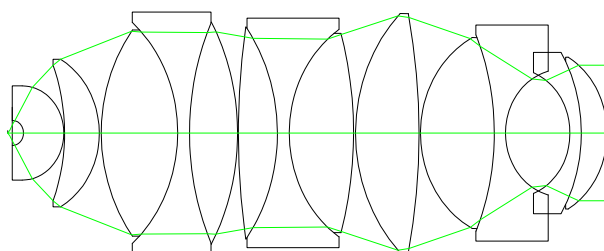


Abb.1 C- Apochromat 40x/1.2 W Korr UV-VIS-IR (Patentschrift US 7 268 953 B2)

Die genannten Objektive verfügen alle über eine Korrekturfunktion, welche es ermöglicht, dass auch im „live cell“ Bereich bei 37°C gute optische Abbildungseigenschaften existieren. Mittels dieser Funktion können Toleranzschwankungen des Deckglases kompensiert und ein deutlich größerer Fokussierbereich in der Probe genutzt werden.

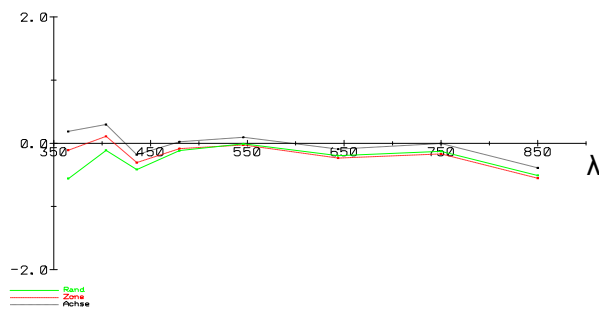


Abb.2 C- Apochromat 40x/1.2 W Korr UV-VIS-IR. Verlauf des Farblängsfehlers zwischen 365nm bis 850nm. Fokusablagen in Rayleigh Einheiten der Wellenlänge 546nm.

3. Alpha Objektive

Die Benennung „Alpha“ steht für Objektive mit extrem großen numerischen Aperturen. Neuere Mikroskopieverfahren, wie die „Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy“ (TIRF) und das Superauflösungsverfahren „Photoactivated Localization Microscopy“ (PALM) steigerten den Bedarf nach sehr großen numerischen Aperturen. In beiden Verfahren nutzt man den folgenden Sachverhalt aus:

Eine in den Rand der Objektivaustrittspupille fokussierte Beleuchtung wird unter einem so großen Winkel der Probe zugeleitet, dass der Flächen-

durchtritt vom Deckglas zur Probe infolge von Totalreflexion nicht möglich ist. Lediglich das bei Totalreflexion entstehende evaneszente Feld dringt einen kleinen Betrag in die Probe ein und beleuchtet die unmittelbar am Deckglas liegende Schicht. Dadurch entsteht keine störende Hintergrundstrahlung und man erkennt viel mehr Details.

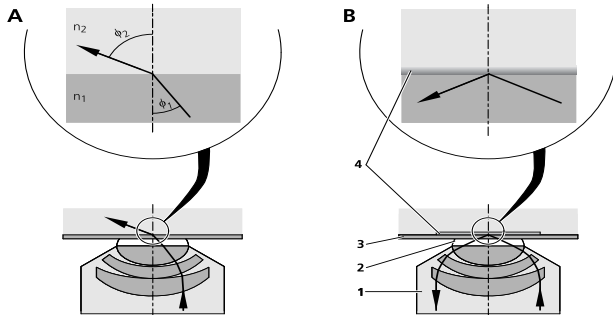


Abb.3 Prinzip der TIRF Mikroskopie

Die großen Aperturen der Alpha Objektive sind nicht nur die Basis für mehr Detailauflösung und Lichtstärke. Sie bringen auch erhebliche Verfahrensvorteile für die TIRF- und PALM Mikroskopie. Damit im TIRF Verfahren überhaupt Totalreflexion entstehen kann, muss die Apertur deutlich größer als die Brechzahl im Probenraum sein. Ein weiterer Vorteil einer großen Apertur ist das bessere Handling, da man in größeren Abständen zu den Fassungsrandern arbeiten kann und damit das Entstehen von störendem Falschlicht umgeht. Die Eindringtiefe δ der evaneszenten Welle in die Probe ist ebenfalls aperturabhängig und kann mit der Formel

$$\delta = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{n_D^2 \sin^2 \alpha - n_P^2}}$$

berechnet werden. Dabei sind α der halbe Öffnungswinkel, n die Brechzahlen des Deckglases (D) und der Probe (P) und λ die Wellenlänge. Der Term $(n \times \sin \alpha)$ in der o.g. Formel ist die numerische Apertur.

Das erste in der Patenliteratur beschriebene Objektiv, welches mit der allgemein üblichen Ölimmersion die Apertur 1,4 wesentlich überschritten hat, war der

Alpha Plan Fluor 100x/1.45 Oil.

Es folgten die Objektive:

Alpha Plan Apochromat 100x/1.46 Oil (UV)-VIS-IR

Alpha Plan Apochromat 63x/1.46 Oil Korr

Alpha Plan Apochromat 100x/1.57 Korr
mit Sonderimmersion und speziellem Deckglas

Das Objektiv *Alpha Plan Fluor 100x/1.45 Oil* ist achromatisch korrigiert und hat ein sehr geringes sekundäres Spektrum, weshalb die Farbkorrektur der eines Apochromaten sehr nahe kommt. Die

Fokusablagen zwischen den Wellenlängen C' und F' liegen deutlich unter einer Rayleigh Einheit.

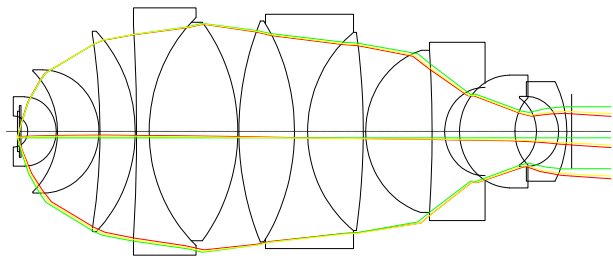


Abb.4 *Alpha Plan Fluor 100x/1.45 Oil*
(Europäische Patentschrift EP 1362256 B1)

Alle Alpha Objektive, mit Ausnahme des *Alpha Plan Apochromat 100x/1.57*, haben bereits bei 340nm eine sehr gute Transmission von mehr als 20%. Die gute UV Transmission wurde durch den konsequenten Einsatz von Kurzflinten bei gleichzeitigem Verzicht auf Schwerflinte möglich.

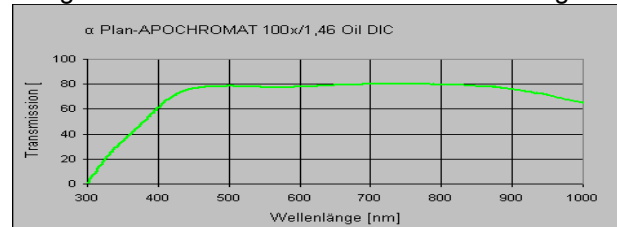


Abb.5 *Alpha Plan Apochromat 100x/1.46 Oil.*
Spektrales Transmissionsverhalten.

Die extreme numerische Apertur des Objektivs *Alpha Plan Apochromat 100x/1.57 Korr* wird durch einen überdurchschnittlich großen Öffnungswinkel von 71° und durch ein hochbrechendes Immersionsmittel mit der Brechzahl 1.66 erreicht. Das spezielle Immersionsöl wurde bei der Fa. Zeiss in Oberkochen entwickelt. Es hat gegenüber der allgemein üblichen Standardimmersionsflüssigkeit keine funktionellen Nachteile. Erforderlich ist lediglich ein der höheren Immersionsbrechzahl angepasstes Deckglas. Die größere Deckglasbrechzahl und die erhöhte numerische Apertur von 1.57 ermöglichen die TIRF Mikroskopie mit höher brechenden Proben bzw. Einbettmitteln bis zu einem Brechungsindex von ca.1.5. Im Vergleich dazu sind Objektive mit Aperturen nahe 1.45 nur für TIRF Anwendungen in wässrigen Proben mit einer Brechzahl bis ca.1.4 geeignet. Das von Fluorophoren im Probenraum abgestrahlte Licht kann auf Grund des Brechungsgesetzes nur mit einer maximalen Apertur detektiert werden, die der Brechzahl im Probenraum entspricht. Bei der Arbeit in höher brechenden Medien erhöht sich somit die Apertur des detektierten Lichtes, was mit einem direkten Gewinn an zusätzlicher Lichtstärke und Detailauflösung verbunden ist.

Literatur

- [1] M. Kramer „Evaneszente Wellen in der Mikroskopie“
Photonik 2/2004 S. 42-44