

# Angleichen der spektralen Eindringtiefen des evaneszenten Feldes in der TIRF Mikroskopie (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy)

Manfred Matthä

Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen

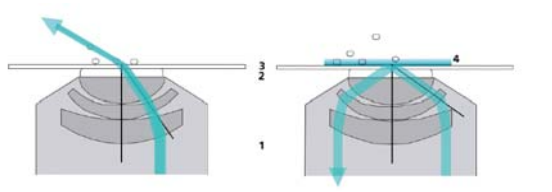
<mailto:matthae@zeiss.de>

Bei "Multi Color" Anwendungen in der TIRF Mikroskopie ist es von großer Bedeutung, dass die chromatischen Unterschiede in der Fluoreszenzanregung ausgeglichen werden. Eine aussichtsreiche Methode zur Kompensation der wellenlängenabhängigen Eindringtiefendifferenzen des evaneszenten Feldes ist der laterale Spektralversatz in der Objektivaustrittspupille, welcher durch Farbquerfehler erzeugt wird.

## 1 Einführung

In der Fluoreszenzmikroskopie ist es wichtig, dass störende Hintergrundaufhellungen vermieden werden, um in der Beobachtungsebene gute Kontrast- und Auflösungsverhältnisse zu erreichen. Die TIRF Mikroskopie ist eine Methode in der dies sehr gut umgesetzt wird.

Bei der TIRF Mikroskopie wird eine in den Rand der Objektivaustrittspupille fokussierte Beleuchtung unter einem so großen Winkel der Probe zugeleitet, dass der Flächendurchtritt 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.



**Abb. 1** TIRF Prinzip

Bei „Multi- Color“ TIRF Anwendungen, wo mehrere Farben über eine Faser in die Objektivaustrittspupille fokussiert werden, gibt es das Problem der Wellenlängenabhängigkeit der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes, was dazu führt, dass die Anregungsvolumen der Fluorophore oder Farbstoffe spektral sehr unterschiedlich sind und damit der Bildeindruck verfälscht wird.

## 2 Grundlagen

Die evaneszente Welle wird durch die Gleichung

$$E(z) = E(0) * e^{-\frac{z}{\delta}} \quad (1)$$

beschrieben. Dabei ist  $\delta$  die Eindringtiefe, in der die Amplitude des Feldes auf  $1/e$  (ca. 36,8%) abgesunken ist. Die Formel zur Berechnung der Eindringtiefe ist

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

wobei  $n(D)$  und  $n(P)$  die Brechzahlen des Deckglases und des Probenmittels sind.  $\lambda$  ist die Wellenlänge und  $\alpha$  der Winkel am Deckglas. Der Ausdruck  $n(D) \sin \alpha$  entspricht der Apertur am Deckglas. Um praktische Berechnungen durchführen zu können, ist es vorteilhaft, die Formel (2) in Beziehung zur Beleuchtungshöhe innerhalb der Objektivaustrittspupille zu bringen. Dies erreicht man durch Einbeziehung der Sinusbedingung bei unendlicher Bildweite, welche bei korrigierten Mikroobjektiven zwingend erfüllt sein muss. Es gilt somit

$$h = (n_D \sin \alpha) f \quad (3)$$

Mit den Formeln (2) und (3) erhält man einen analytischen Zusammenhang zwischen der Beleuchtungshöhe  $h$ , der objektseitigen Apertur und der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes. Der Wert  $f$  entspricht der Brennweite des Mikroskopobjektivs.

## 3 Praktische Umsetzung

Das Ziel ist, an der Objektivaustrittspupille einen spektralen Beleuchtungsversatz zu erzeugen, welcher die wellenlängenabhängigen Unterschiede der Feldeindringtiefen kompensiert. Geht man davon aus, dass es bei 100nm Eindringtiefe in physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl) mit dem Zeiss Objektiv „Alpha Plan Apochromat 100x/1.46 VIS-IR“ keine wellenlängenabhängigen Unterschiede geben soll, ergeben sich die in der Tabelle 1 dargestellten Vorgaben.

$\lambda$	$n(P)$	$n(D)$	$f$ Obj	NA	$h$
405	1,34421	1,53965	1,6165	1,3823	2,2346
458	1,34024	1,53271	1,6299	1,3889	2,2637
488	1,33854	1,52983	1,6364	1,3937	2,2808
514	1,33728	1,52775	1,6416	1,3984	2,2956
532	1,33651	1,52649	1,6448	1,4020	2,3059
561	1,33540	1,52471	1,6495	1,4080	2,3226
639	1,33303	1,52104	1,6600	1,4267	2,3683

**Tab. 1**

Die Brechzahlen der Probe  $n(P)$  und des Deckglases  $n(D)$ , sowie die spektralabhängigen Objektivbrennweiten  $f_{Obj}$  sind bekannt. Unter  $\lambda$  stehen die ausgewählten Wellenlängen in nm. NA ist die objektseitige numerische Apertur und dient der Bereichskontrolle, da dieser Wert größer der Probenbrechzahl und kleiner der Objektivapertur sein muss. In der Spalte  $h$  ist für jede Farbe die erforderliche Beleuchtungshöhe in der Objektivaustrittspupille angegeben, welche die Eindringtiefe 100nm realisiert.

Um den erforderlichen Spektralversatz in der Objektivaustrittspupille zu erzeugen, gibt es mehrere Möglichkeiten. In der Patentliteratur werden schräg gestellte Planplatten erwähnt. Die Analyse mit einer Planplatte aus dem Schott-Glas NKZFS8, deren Dicke und Kippung mit einem Optik-Optimierungsprogramm generiert wurde, zeigt, dass weitere optische Aufwände zur Korrektur des Hauptstrahlverlaufs und der Aberrationen des Beleuchtungsstrahlengangs nötig sind.



Abb.2 Kompensation mit einer Planplatte

Eine in der Umsetzung deutlich einfachere Lösung, mit der zusätzlich auch die spektrale Kompensationswirkung weiter verbessert wird, fanden wir in der Ausnutzung des Farbquerfehlers, welcher mit Hilfe einer vorgeschalteten Optik gezielt erzeugt wird. Dabei wird die Optik außeraxial durchlaufen und mit zur Fehleroptimierung des Beleuchtungsstrahlengangs genutzt.

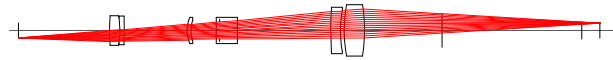


Abb.3 Kompensation mittels einer vorgeschalteten Optik

#### 4 Zusammenfassung

Die chromatische Kompensation der Eindringtiefen des evaneszenten Feldes mit der Hilfe eines gezielt korrigierten Farbquerfehlers ist ein bezüglich des erforderlichen Aufwandes und des qualitativen Ergebnisses sehr vorteilhaftes Verfahren den Bildeindruck in der „Multi- Color“ TIRF Mikroskopie deutlich zu verbessern.

#### Literatur

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

#### Eindringtiefen in nm

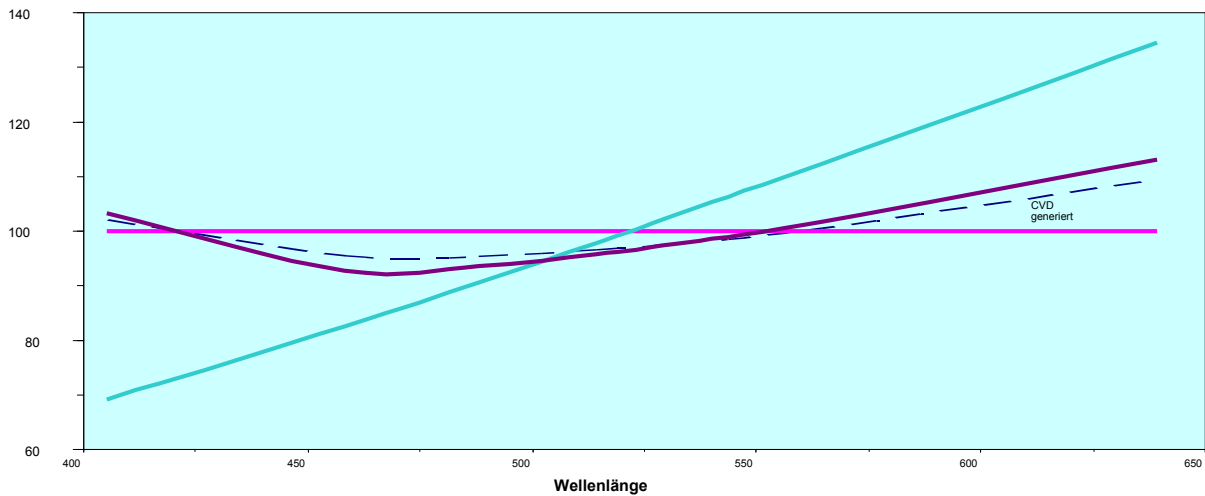


Abb. 4 Eindringtiefen: Grün- ohne spektralen Versatz. Schwarz- Farbversatz durch eine Planplatte. Gestrichelt- Versatz mittels eines erzeugten Farbquerfehlers.

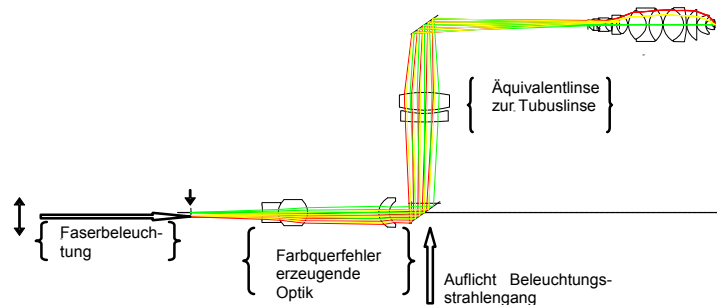


Abb. 5 Einkopplungsmöglichkeit in den Auflichtstrahlengang eines Mikroskops. Der spektrale Versatz in der Objektivaustrittspupille wird über eine außeraxial verlaufende Beleuchtung erzeugt, in welcher ein definiert großer Farbquerfehler hinein korrigiert wird.