

Interferometrische Steigerung des Auflösungsvermögens optischer Rastermikroskope

D. Weigel, R. Förster, H. Babovsky, A. Kießling, R. Kowarschik
 Institut für Angewandte Optik, Friedrich-Schiller-Universität Jena
 mailto:Daniel.Weigel@uni-jena.de

Wir zeigen, dass es mit Hilfe eines bildinvertierenden Interferometers möglich ist das Auflösungsvermögen eines konventionellen Lichtmikroskops um 26% zu steigern. Dazu wurde die Punktbildverwaschungsfunktion vermessen und der Auflösungsgewinn an Zweipunktobjekten verifiziert. An zweidimensionalen Strukturen konnte die verbesserte Auflösung für komplexe Objekte demonstriert werden.

1 Einleitung

Konfokale Fluoreszenzmikroskope sind heutzutage wichtige und weit verbreitete Hilfsmittel in der medizinischen und biologischen Forschung. Daher ist es von großem Interesse das Auflösungsvermögen solcher Systeme weiter zu steigern. Wicker und Heintzmann [1] haben vorgeschlagen, dass laterale Auflösungsvermögen konfokaler Fluoreszenzmikroskope mit Hilfe eines bildinvertierenden Interferometers zu steigern. Nach ersten Hinweisen, dass mit diesem Verfahren das Auflösungsvermögen optischer Rastermikroskope tatsächlich gesteigert werden [2, 3] kann, zeigen wir nun, dass eine Auflösungssteigerung von 26% möglich ist.

2 Funktionsprinzip

Um den Kontrast im Bild zu erhöhen und das Auflösungsvermögen zu steigern, macht man sich die räumliche Inkohärenz des Lichtes in der Objektebene zu Nutze.

Bildet man ein einzelnes Punktobjekt an der Position \vec{d}_0 in der Objektebene durch ein Zweistrahlinterferometer ab, in dessen einem arm eine räumliche Inversion statt findet, so kann in der Bildebene nicht nur ein Punktbild an der Position $-\vec{d}$ beobachtet werden. Aufgrund der Inversion existiert ein weiteres Punktbild an der Stelle $+\vec{d}$, sowie ein Interferenzterm (Gleichung 1). Hierbei entspricht $h(\vec{r}+\vec{d})$ der Amplitudenpunktbildverwaschungsfunktion (APSF) und $|h(\vec{r}+\vec{d})|^2$ der Punktbildverwaschungsfunktion (PSF). Die Intensitätsverteilung am konstruktiven bzw. destruktiven Ausgang wird mit \pm bezeichnet.

$$I_{\pm}(\vec{r}, \vec{d}) = \left| h(\vec{r} + \vec{d}) \right|^2 + \left| h(\vec{r} - \vec{d}) \right|^2 \pm h(\vec{r} + \vec{d}) \cdot h(\vec{r} - \vec{d}) \quad (1)$$

Subtrahiert man nun die Intensitätsverteilung am destruktiven Ausgang von der am konstruktiven, bleibt einzig der Interferenzterm erhalten. Eine Integration

über dieses Differenzbild liefert ein Signal, welches nur noch von der Position \vec{d} der Punktlichtquelle abhängt. Es beschreibt die Übertragung eines Objektpunktes durch das Gesamtsystem (Interferometer + Nachverarbeitung) und kann somit als interferometrische Punktbildverwaschungsfunktion (IPSF) betrachtet werden.

$$IPSF(\vec{d}) = \int \int_{-\infty}^{+\infty} I_+(\vec{r}, \vec{d}) - I_-(\vec{r}, \vec{d}) dx dy = 2 \frac{J_1(2|\vec{d}|)}{2|\vec{d}|} \quad (2)$$

Die aus der Integration resultierende BSinc-Funktion ist nun vom doppelten Argument abhängig und damit schmaler, als das klassische Airy-Scheibchen $\left(\frac{J_1(|\vec{d}|)}{|\vec{d}|} \right)^2$. Besteht das Objekt aus räumlich inkohärent strahlenden Punkten (Fluoreszenzmarker) oder wird es räumlich inkohärent ausgeleuchtet ergibt sich durch Abrastern ein Bild, welches als Faltung der Objektstruktur mit der IPSF dargestellt werden kann.

3 Versuchsaufbau

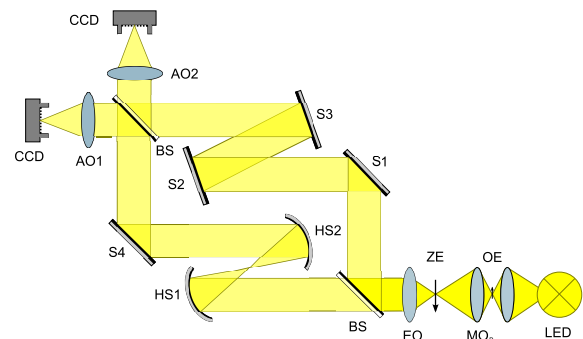


Abbildung 1 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Eine Skizze des von uns verwendeten Versuchsaufbaus ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Objektebene OE wird mit Hilfe einer LED ($\lambda \approx 516 \text{ nm}$, $\Delta\lambda$

≈ 16 nm) räumlich inkohärent ausgeleuchtet und durch das Beobachtungsmikroobjektive MO_B (3.2x, 0.10) in eine Zwischenebene ZE abgebildet. Diese befindet sich in der vorderen Brennebene des Eingangsobjektivs EO. Durch dieses wird mit Hilfe der Ausgangsobjektive AO1 und AO2 eine Abbildung der Objektebene durch das bildinvertierende Mach-Zehnder auf die beiden CCD-Kameras realisiert. Das Interferometer besteht aus einem invertierenden und einem nicht-invertierenden Arm. Die Inversion wird mit Hilfe eines 4-f-Systems aus zwei Hohlspiegeln (HS1 und HS2) umgesetzt, um chromatische Fehler zu vermeiden. Da mit breitbandigen Licht gearbeitet wird, muss der optische Weg im nicht-invertierenden Strahlengang entsprechend angepasst sein. Die Überlagerung des invertierten mit dem nicht-invertierten Bildes kann dann am destruktiven bzw. konstruktiven Ausgang beobachtet und am PC ausgewertet werden.

4 Experimentelle Ergebnisse

Abbildung 2 zeigt die interferometrische PSF im direkten Vergleich zur PSF des konventionellen Systems. Dazu wurde ein Pinhole mit einem Durchmesser von $1 \mu\text{m}$ sowohl konventionell, als auch interferometrisch abgebildet. Die Halbwertsbreite (FWHM) verringert sich um ca. 24,5% von $2,51 \mu\text{m}$ auf $1,89 \mu\text{m}$. Der Abstand der ersten Nullstellen der PSFs sinkt dabei um fast 48% von $6,30 \mu\text{m}$ auf $3,29 \mu\text{m}$ und der Abstand der ersten Minima von $6,30 \mu\text{m}$ auf $4,45 \mu\text{m}$.

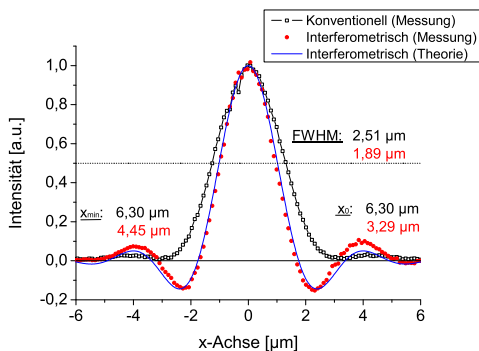


Abbildung 2 Direkter Vergleich der konventionellen PSF mit der interferometrischen

Durch die Aufnahme von jeweils zwei Pinholes mit verschiedenen Abständen zueinander konnte die Steigerung des Auflösungsvermögens untersucht werden. Als Maß für das Auflösungsvermögen wurde das Rayleigh-Kriterium verwendet. Beim konventionellen Lichtmikroskop besagt dieses, dass zwei Punkte noch dann als getrennt wahrgenommen werden können, wenn das Maximum des einen Punktbildes genau im Minimum des anderen liegt. Es

kommt dabei zu einer Einsattelung zwischen den beiden Punktbildern auf 74%. Im konventionellen Fall konnte eine solche Einsattelung bei einem Pinholeabstand von ca. $3,29 \mu\text{m}$ beobachtet werden, während bei der interferometrischen Wiedergabe erst bei $2,44 \mu\text{m}$ ein entsprechender Dip messbar war. Daraus ergibt sich eine Auflösungssteigerung von ca. 26%.

Abbildung 3 zeigt zwei Cluster aus Polystyrolkugeln (ca. $1 \mu\text{m}$ Durchmesser). Konventionell abgebildet kann die innere Struktur der Cluster nicht aufgelöst werden. Der vergrößert dargestellte Bereich zeigt zudem eine Struktur, welche als Balken interpretiert werden könnte. Durch die interferometrische Wiedergabe können einzelne Kugeln mit einem deutlich höheren Kontrast dargestellt werden. Zudem ist es möglich die innere Struktur der beiden Cluster aufzulösen. Die vergrößert dargestellte vermeintliche Balkenstruktur kann nun als zwei getrennte Kugeln wahrgenommen werden.

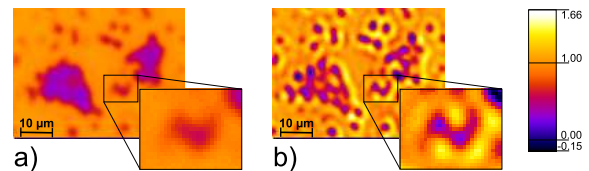


Abbildung 3 Konventionelle (a) und interferometrische Darstellung (b) zweier Cluster aus Polystyrolkugeln

5 Zusammenfassung

Anhand eines konventionellen Lichtmikroskops konnten wir nachweisen, dass das laterale Auflösungsvermögen optischer Rastermikroskope um bis zu 26% gesteigert werden kann. Desweiteren konnte eine starke Verbesserung des Bildkontrastes erreicht werden.

In weiteren Versuchen muss nun gezeigt werden, inwieweit sich diese Auflösungssteigerung auf konfokale Fluoreszenzmikroskope übertragen lässt.

Literatur

- [1] K. Wicker, R. Heintzmann, „Interferometric resolution improvement for confocal microscopes,“ *Opt. Express* **15**, 12206 - 12216, (2007)
- [2] D. Weigel, H. Babovsky, A. Kiessling, R. Kowarschik, „Investigation of the impulse response of an image inversion interferometer,“ *Opt. Commun.* **283**, 368-372 (2010)
- [3] D. Weigel, H. Babovsky, A. Kiessling, R. Kowarschik, „Investigation of the resolution ability of an image inversion interferometer,“ *Opt. Commun.* **284**, 2273-2277 (2011)