

Mikroskopie mit unendlicher Schärfentiefe

Daniel Weigel, Armin Kießling, Richard Kowarschik
 Institut für Angewandte Optik, Abbe Center of Photonics,
 Friedrich-Schiller-Universität Jena, Fröbelstieg 1, 07747 Jena
 mailto:Daniel.Weigel@uni-jena.de

Wir stellen ein interferometrisches Verfahren vor, welches Abbildungen mit quasi unendlicher Schärfentiefe ermöglicht. Hierfür kommt ein bildinvertierendes Interferometer zum Einsatz, mit dem die Kohärenzfunktion der räumlich inkohärenten Objektverteilung gemessen wird.

1 Einleitung

Mit herkömmlichen optischen Systemen kann nur eine Ebene aus dem Objektraum scharf in die Bildebene abgebildet werden. Strukturen außerhalb dieser Objektebene werden aufgrund der begrenzten Schärfentiefe verwaschen dargestellt. Gerade in der Mikroskopie wird dieser Effekt aufgrund der großen numerischen Aperturen besonders deutlich. Eine kleine Schärfentiefe kann gewünscht sein, um beispielsweise Tiefeninformationen über das Objekt zu erhalten. In zahlreichen Anwendungsbereichen wäre es jedoch von großem Vorteil, das Objekt gleichzeitig über dessen gesamte Ausdehnung scharf abbilden zu können. Im folgenden wird gezeigt, dass mit Hilfe eines bildinvertierenden Interferometers Abbildungen mit quasi unendlicher Schärfentiefe möglich sind.

2 Funktionsprinzip

Das vorgestellte Verfahren basiert auf dem van Cittert-Zernike Theorem [1]. Dieses besagt, dass die komplexe Kohärenzfunktion im Fernfeld der Fouriertransformierten der inkohärenten Objektverteilung entspricht. In der Praxis kann man den Fernfeldfall in der hinteren Brennebene einer Linse beobachten, wenn sich die Objektverteilung a in der vorderen befindet. Eine Abweichung Δz von der vorderen Brennebene führt nach Gl. 1 zu einer Multiplikation der Fouriertransformierten mit einem quadratischen Phasenterm [2].

$$A(\mathbf{r}, \Delta z, t) = \frac{\exp\left(i \frac{k \Delta z}{2f^2} \mathbf{r}^2\right)}{i \lambda f} \cdot \mathcal{F}\{a(\mathbf{r}, t)\} \quad (1)$$

Hierbei entspricht f der Brennweite der Linse, k der Wellenzahl des quasi-monochromatischen Lichtes der Wellenlänge λ , i der komplexen Einheit und $\mathbf{r} = (x, y)$ den lateralen Koordinaten in der hinteren Brennebene der Linse.

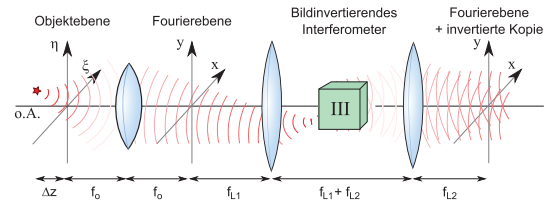


Abbildung 1 Schematische Darstellung des Funktionsprinzips. Die hintere Brennebene des Mikroskopobjektivs wird durch das bildinvertierende Interferometer hindurch in die Detektorebene abgebildet.

Um die komplexe Kohärenzfunktion Γ im Fernfeld zu messen, wird die Amplitudenverteilung aus der hinteren Brennebene $A(\mathbf{r}, \Delta z, t)$ durch ein bildinvertierendes Interferometer hindurch auf eine CCD-Kamera abgebildet (Abb. 1). Bei einem solchen Interferometer handelt es sich um ein Zweistrahlinterferometer, in dessen Armen die Amplitudenverteilungen durch eine geeignete Optik zueinander räumlich invertiert werden ($\mathbf{r} \rightarrow \mathbf{r}$). Neben einem Gleichlichtanteil kann an den Ausgängen ein Interferenzterm I_{IF} beobachtet werden, der dem Realteil der komplexen Kohärenzfunktion entspricht.

$$I_{IF}(\mathbf{r}) = \Re \{ \langle A(\mathbf{r}, \Delta z, t) \cdot A^*(-\mathbf{r}, \Delta z, t) \rangle_t \} \quad (2)$$

$$= \Re \{ \Gamma(\Delta \mathbf{r}) \} \quad (3)$$

Der quadratische Phasenterm in Gl. 1, welcher den Defokus beschreibt, wird durch die räumliche Inversion nicht beeinflusst. Dies führt dazu, dass er bei der Berechnung der Interferenzstruktur (Gl.2) verschwindet. Die so messbare Kohärenzfunktion enthält demnach keine Tiefeninformationen mehr. Durch geeignete Phasenschiebeverfahren kann aus der Interferenzstruktur an den Ausgängen des bildinvertierenden Interferometers die komplexwertige Kohärenzfunktion gewonnen werden. Durch die inverse Fouriertransformation von Γ ist es dann möglich, die Objektstruktur zu rekonstruieren.

$$I(\mathbf{r}) = \mathcal{F}^{-1} \{ \Gamma(\Delta \mathbf{r}) \} \quad (4)$$

Der Verlust der Tiefeninformation in der Kohärenzfunktion führt in der Rekonstruktion folglich zu einer unbegrenzten Schärfentiefe.

3 Versuchsaufbau

Abb. 2 zeigt schematisch den von uns gewählten Versuchsaufbau. Zum Einsatz kam ein Mikroskopobjektiv mit einer numerischen Apertur von 0,07 und einer Vergrößerung von 2,5. Als Testobjekt diente eine LED ($\lambda = 633 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 30 \text{ nm}$), welche durch ein zweites Mikroskopobjektiv (0,40, 20x) verkleinert in die Objektebene abgebildet wurde. Zum Nachweis des Funktionsprinzipes wurde die LED in verschiedenen Abständen zur Objektebene (OE) des Mikroskopobjektivs (MO) aufgenommen. Hierfür wurde die Fourierebene (FE) mit Hilfe der Linsen L_1 und L_2 durch das bildinvertierende Interferometer hindurch auf die CCD-Kameras ($\text{CCD}_{1/2}$) abgebildet. Die Bildinversion wurde durch zwei Dove-Prismen ($\text{DP}_{1/2}$) realisiert, die um 90° zueinander verdreht waren. Durch einen Piezo-Aktuator (P) an einem der Eckspiegel konnte eine Phasendifferenz zwischen den beiden Armen eingestellt werden. Im quasi-monochromatischen Fall genügen theoretisch bereits drei Phasenschritte, um die komplexe Kohärenzfunktion zu ermitteln. Aufgrund der großen spektralen Bandbreite der LED haben wir uns jedoch dazu entschieden, das Interferometer wie ein Fourier-Spektrometer zu verwenden. Aus einem Stack von 43 Interferogrammen konnte so Γ für die mittlere Wellenlänge von 633 nm ermittelt werden.

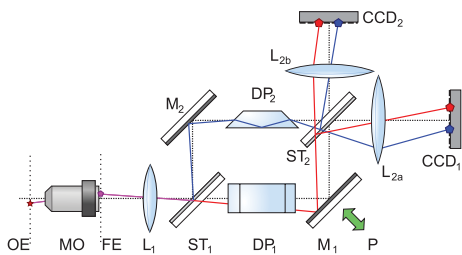


Abbildung 2 Schematische Darstellung des verwendeten Laboraufbaus.

4 Ergebnisse

Der Betrag und die Phase einer so gewonnenen Kohärenzfunktion sind beispielhaft in Abb. 3 zu sehen. Durch eine inverse Fouriertransformation lässt sich daraus die Objektstruktur (Abb. 4.a) gewinnen.

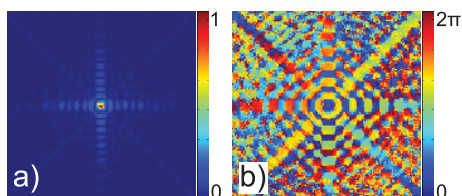


Abbildung 3 Betrag (a) und Phase (b) der komplexen Kohärenzfunktion im Fernfeld einer LED, aufgenommen mit Hilfe eines bildinvertierenden Interferometers.

Der direkte Vergleich mit der konventionell aufgenommenen LED (Abb. 4.b) zeigt, dass die Objektstruktur korrekt rekonstruiert werden konnte.

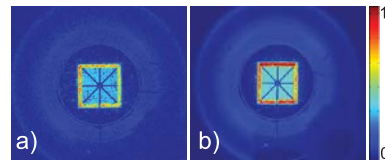


Abbildung 4 Aus Abb. 3 rekonstruierte Objektverteilung (a) im Vergleich zur konventionell gewonnenen Aufnahme (b).

Zum Nachweis der erhöhten Schärfentiefe wurde eine weitere LED in verschiedenen Abständen zur Objektebene aufgenommen. Insgesamt wurde ein Bereich von $\pm 200 \mu\text{m}$ um die Objektebene in $1 \mu\text{m}$ -Schritten abgefahren. Abb. 4 zeigt aus dem gewonnenen Bilderstack die Objektebene (oben) und die Ebene bei $+200 \mu\text{m}$ (unten). Dargestellt ist der direkte Vergleich zwischen der konventionellen Aufnahme (a, b) und der Rekonstruktion nach dem hier vorgestellten Verfahren (c, d).

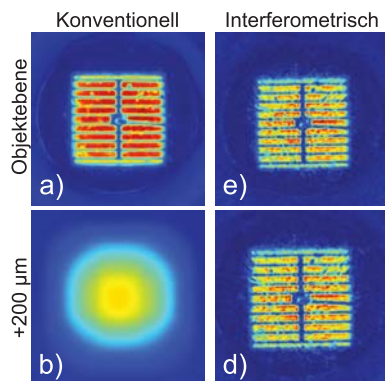


Abbildung 5 Vergleich zwischen der konventionellen Abbildung (links) und dem vorgestelltem Verfahren (rechts). Die Bildausschnitte entsprechen jeweils ca. $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$.

Während die konventionelle Aufnahme bei $+200 \mu\text{m}$ so stark verschwommen ist, dass keinerlei Objektstruktur zu erkennen ist, bleibt die interferometrische Rekonstruktion unverändert scharf. Einzig die scheinbare Objektgröße ändert sich leicht aufgrund des verringerten Abstandes zum Mikroskopobjektiv und des somit vergrößerten Seh winkels.

Literatur

- [1] M. Born and E. Wolf, *Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light* (CUP Archive, 1999).
- [2] J. Goodman, *Introduction to Fourier optics* (McGraw-Hill, 1968).