
Das Auflösungsvermögen optischer Mikroskope - wo liegt die Grenze?

Stephan Winnerl

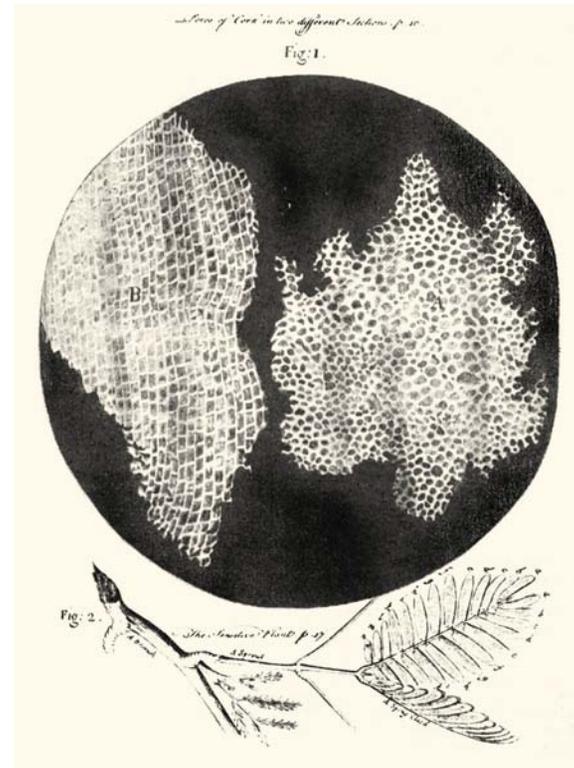
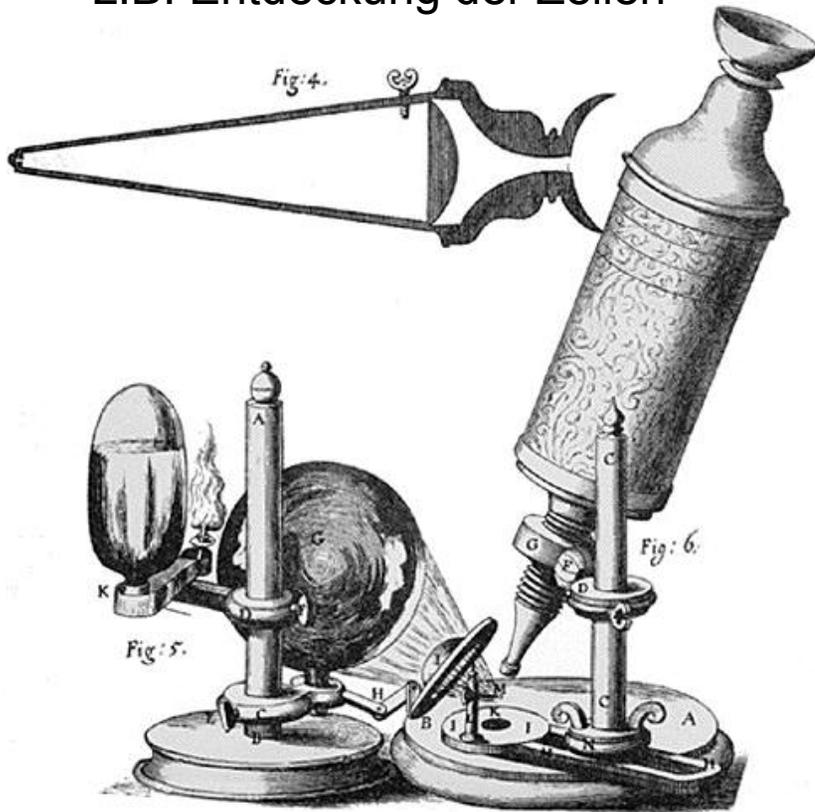
*Abteilung Halbleiterspektroskopie
Institut für Ionenstrahlphysik und
Materialforschung*

Gliederung

- Einführung in die optische Mikroskopie
- Abbe'sches Prinzip und Rayleigh Kriterium
- Spezielle Mikroskoptypen
 - Konfokalmikroskop
 - Fluoreszenzmikroskop
 - STED-Mikroskop (Stimulated Emission Depletion)
- Nahfeldmikroskopie
 - Prinzip, Bauformen
 - Kombination IR-Nahfeldmikroskop und Freie-Elektronen-Laser

Einführung

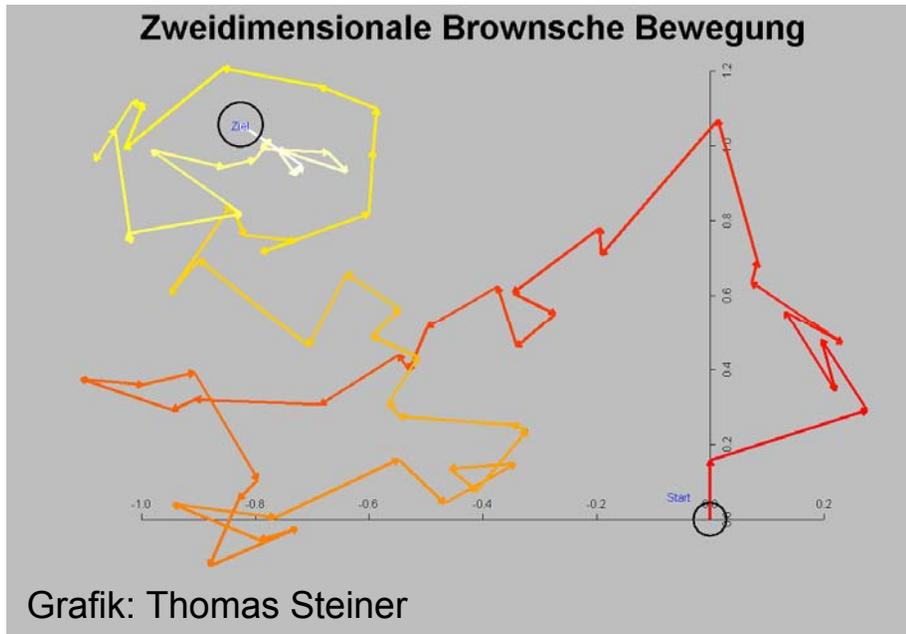
Bahnbrechende Entdeckungen mit Hilfe opt. Mikroskope:
z.B. Entdeckung der Zellen



Robert Hooke, Micrographia, 1665

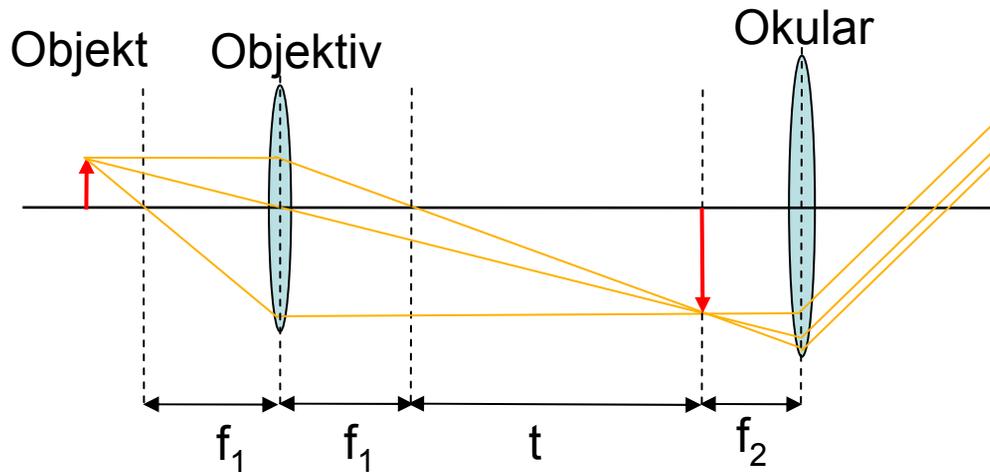
Einführung

Brown'sche Bewegung: 1827 von Robert Brown wiederentdeckt;
Thermisch getriebene Eigenbewegung von Teilchen.
(Bereits 1785 entdeckte Jan Ingenhousz die Bewegung von Holzkohlestaub auf Alkohol.)



Einstein 1905: Erklärung der Brown'schen Bewegung mittels statistischer Mechanik. Molekularer Aufbau der Materie gezeigt.

Grundaufbau eines optischen Mikroskops



f_1 : Objektivbrennweite

f_2 : Okularbrennweite

t : Tubuslänge

$s_0 = 250$ mm

Vergrößerung:

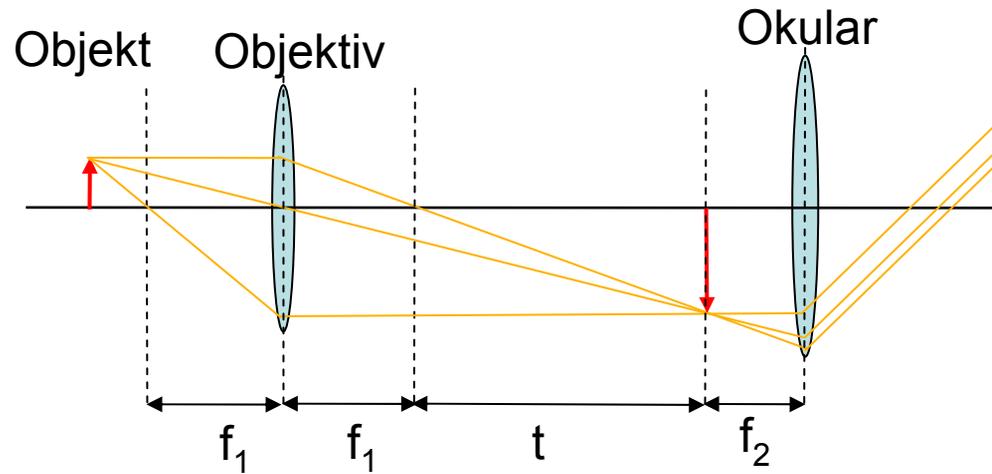
$$\Gamma_M = \frac{t \cdot s_0}{f_1 \cdot f_2}$$

Was bestimmt die Auflösung?

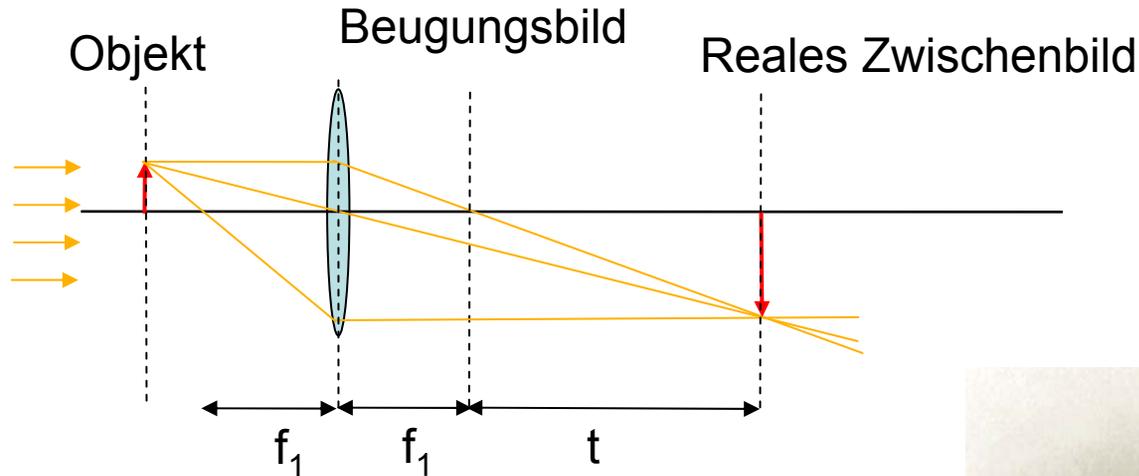
Wo liegt die Grenze?

→ Wellennatur des Lichts

Abbe'sche Theorie



Abbe'sche Theorie (Jena, 1873)

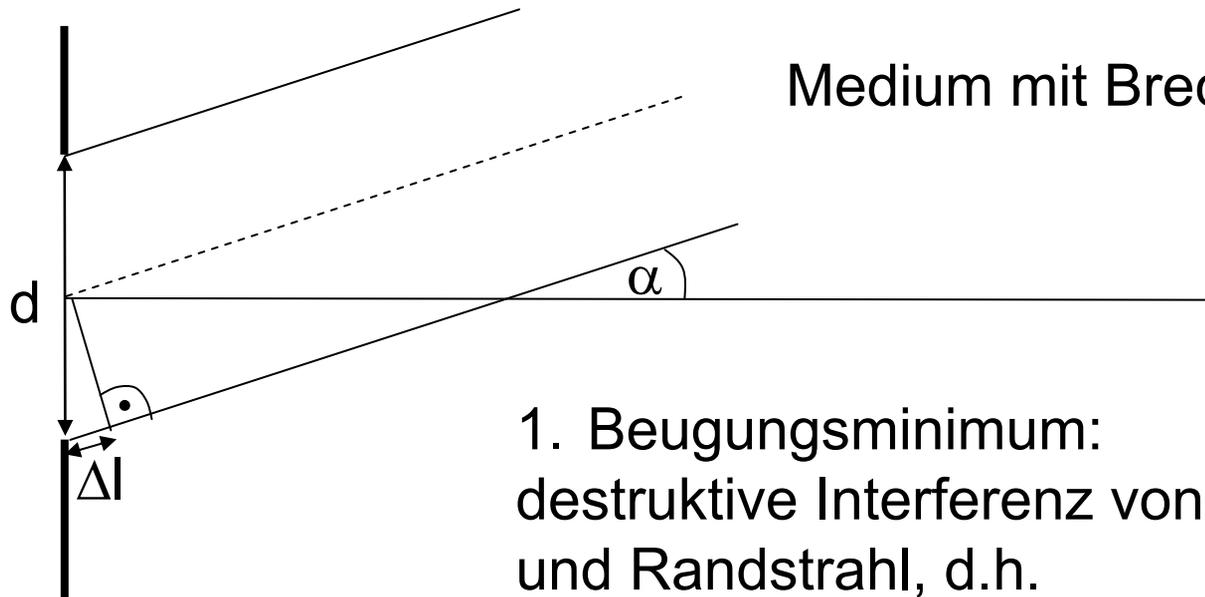


Wir betrachten das Objekt als Beugungsgitter, das mit parallelem Licht bestrahlt wird.
Um das Bild rekonstruieren zu können, muss neben der nullten mindestens die erste Beugungsordnung übertragen werden.



Ernst Abbe

Beugung an kleiner Öffnung mit Durchmesser d



Medium mit Brechungsindex n

1. Beugungsminimum:
destruktive Interferenz von Zentralstrahl
und Randstrahl, d.h.

$$n \cdot \Delta l = \lambda/2$$

$$n \cdot d/2 \cdot \sin \alpha = \lambda/2$$

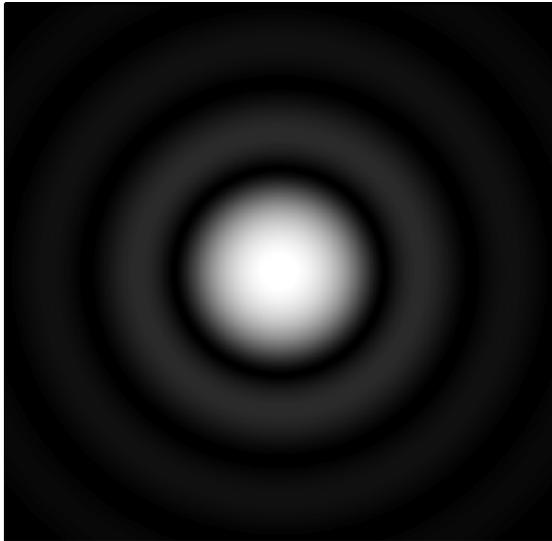
$$d = \frac{\lambda}{n \sin \alpha}$$

$n \sin \alpha$: numerische Apertur

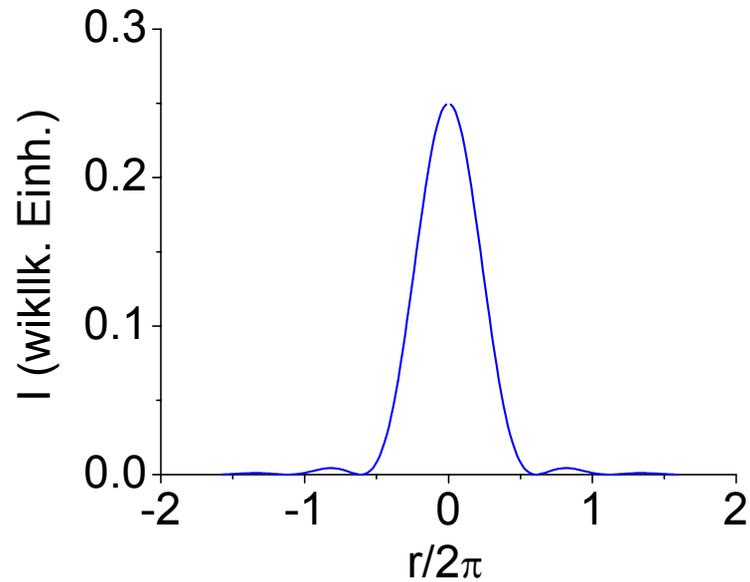
(Wert z.B. 0.95 für gute Objektive, damit $d \approx 0.5 \mu\text{m}$)

Beugung genauer

Berechnung der Intensitätsverteilung



$$I(r) = \left(\frac{J_1(r)}{r} \right)^2$$



J_1 : Besselfunktion 1. Ord.

Rayleigh Kriterium für die Auflösung

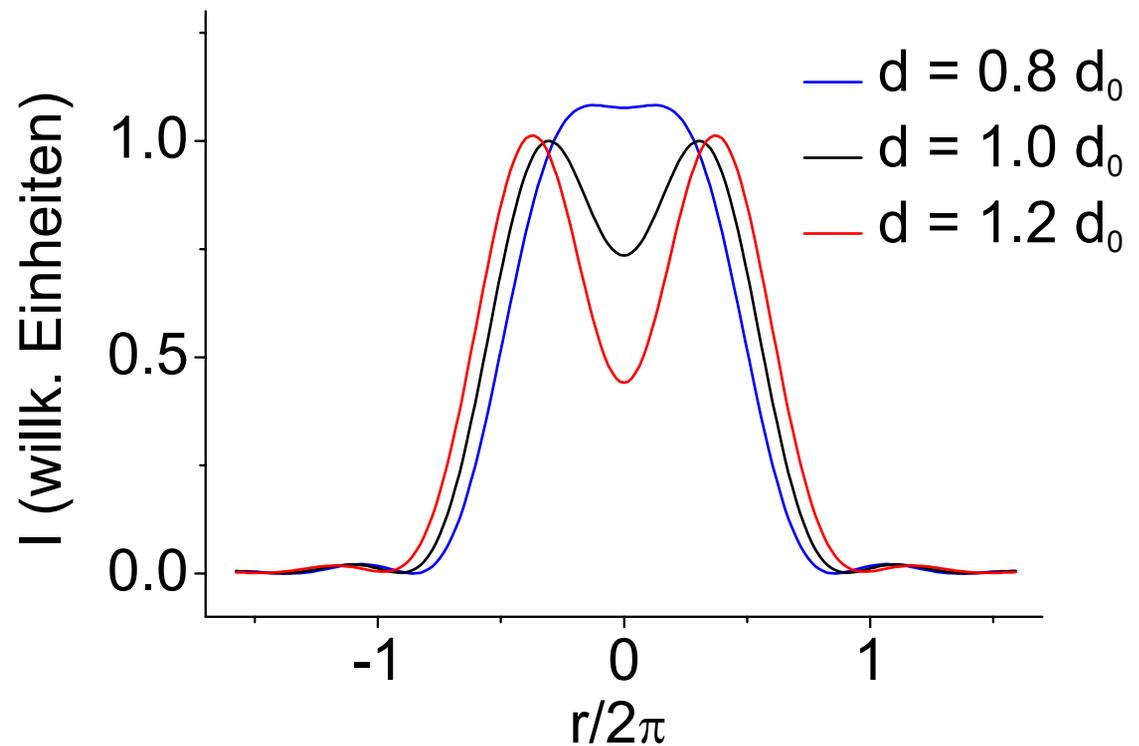
Zwei Punkte mit Abstand d werden getrennt, wenn das Maximum des einen in das erste Minimum des anderen fällt: $d = d_0$

$$d_0 = \frac{0.61 \lambda}{n \sin \alpha}$$

Hohes Auflösung:

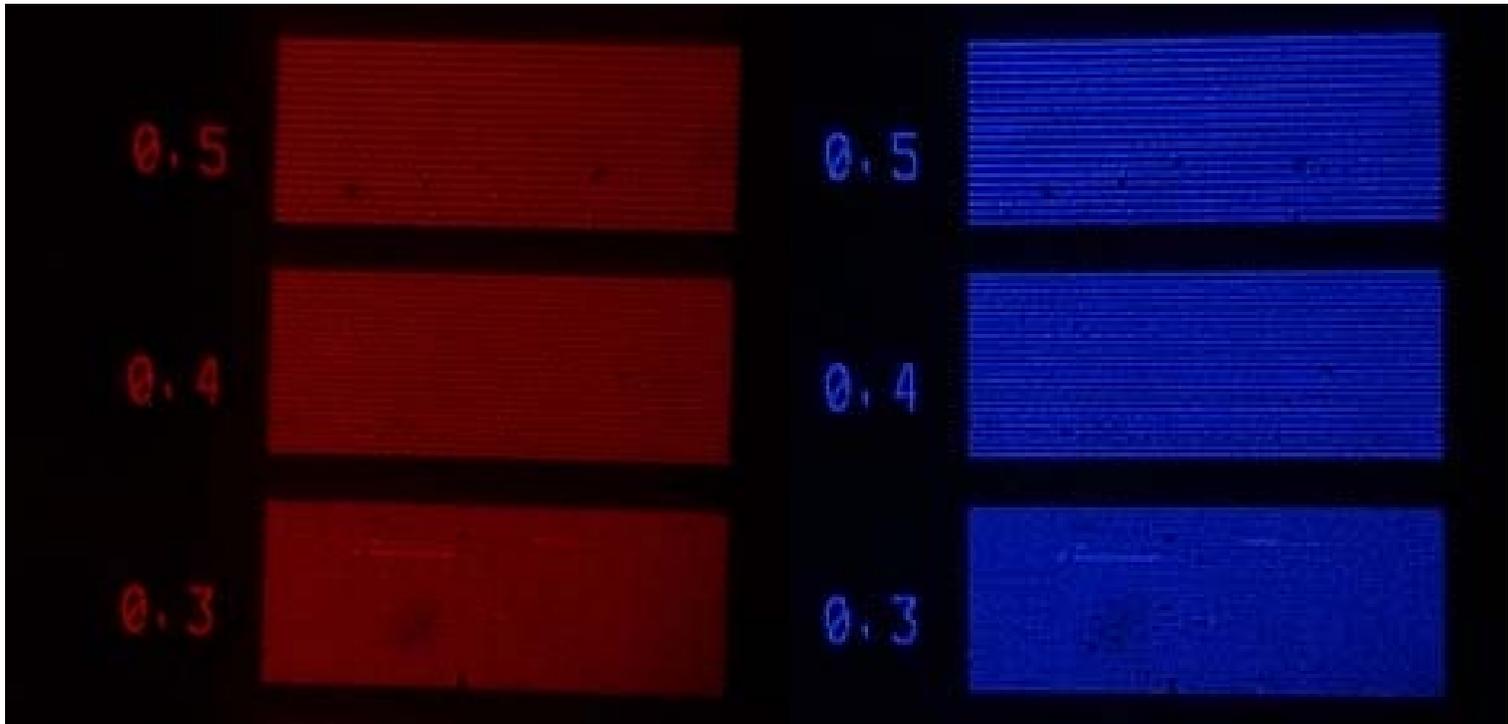
- $\lambda \downarrow$

- $n \uparrow$ Immersions-
objektiv



Variation der Wellenlänge

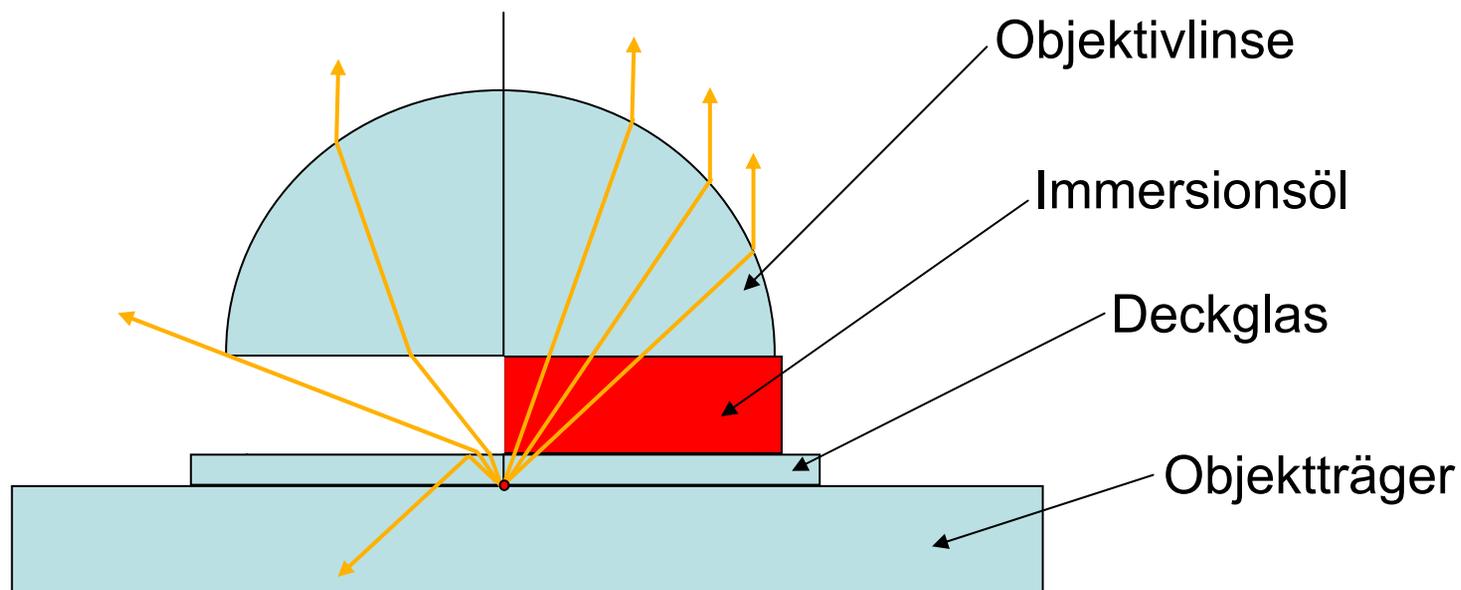
Gitter unterschiedlicher Linienstärke (in μm)
unter rotem und blauem Licht



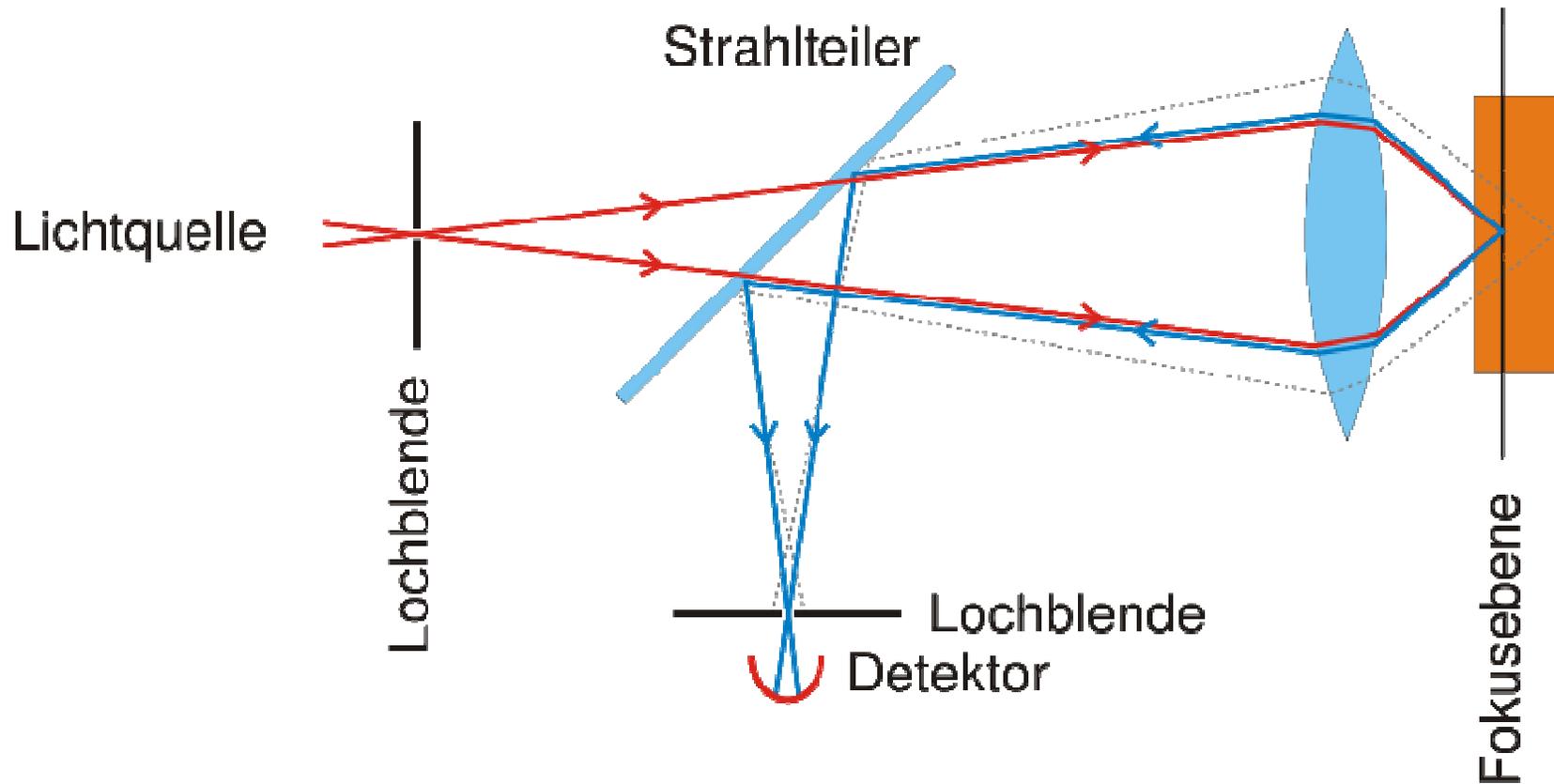
Bilder: Oliver Kurmis, Uni Jena

Immersionmikroskopie

Eine numerische Apertur größer 1 ist mit Hilfe von Immersionsöl ($n \approx 1.5$) möglich:



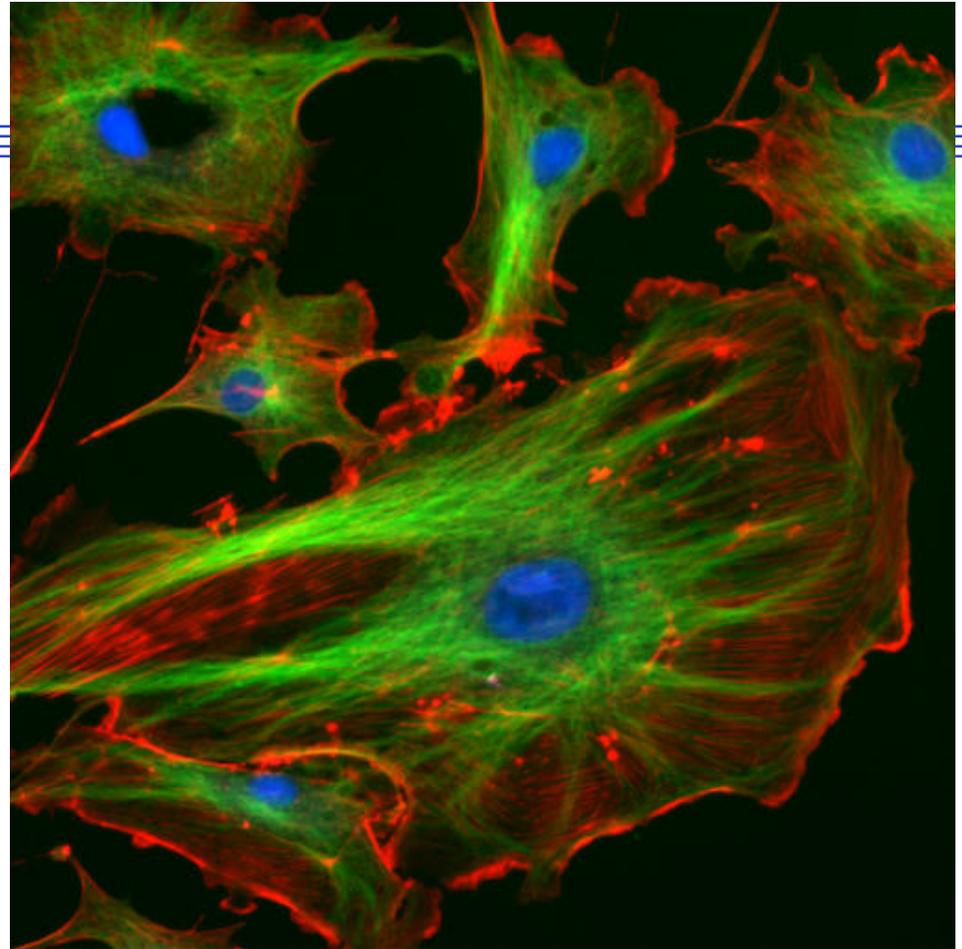
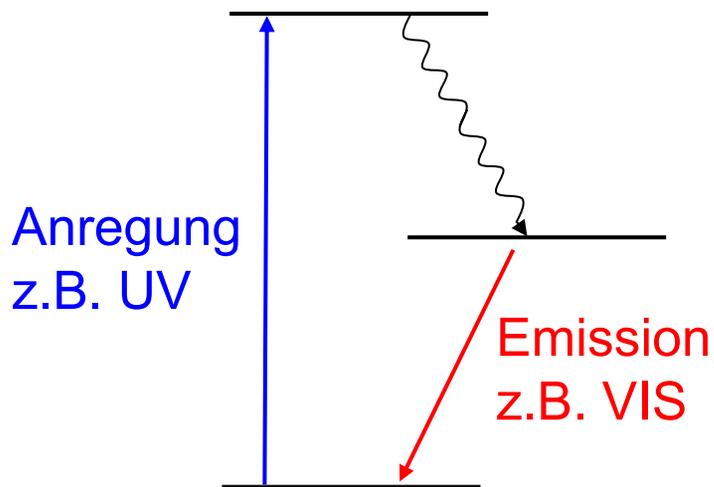
Konfokalmikroskop



Ziel: Bild nur aus Fokusebene

Fluoreszenzmikroskop

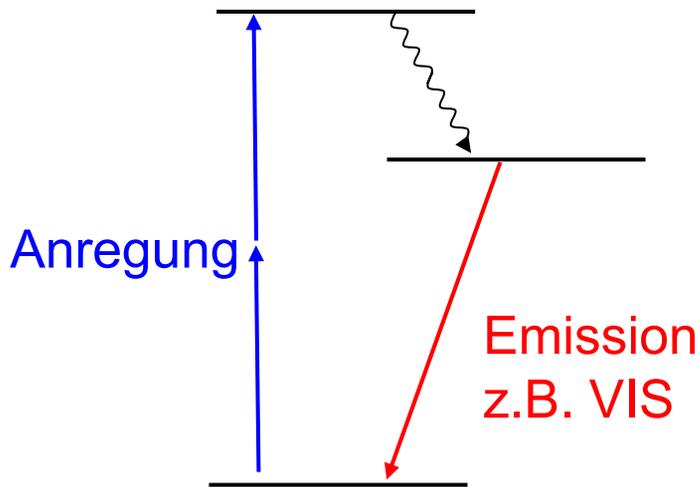
Energieschema Fluoreszenz



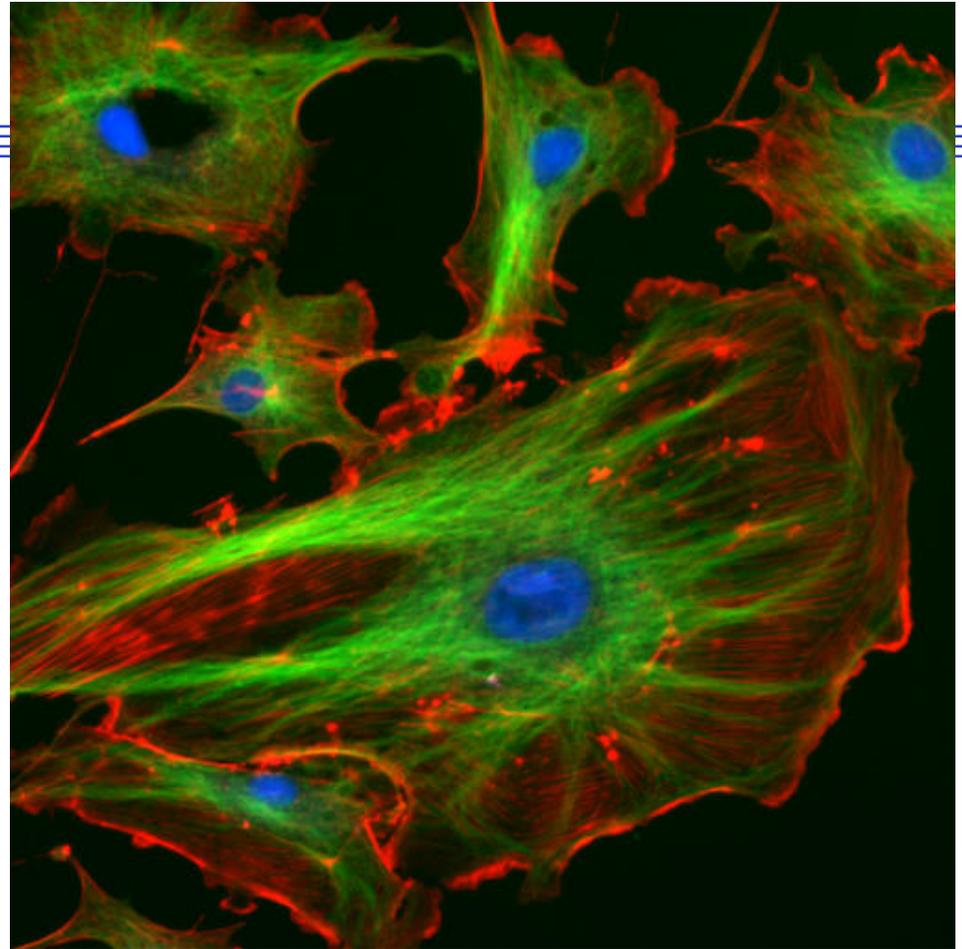
Endothelzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop.
Die Mikrotubuli sind grün, Aktinfilamente rot und
die DNA blau markiert.

Fluoreszenzmikroskop

Fluoreszenz mit
Zwei-Photon-Anregung



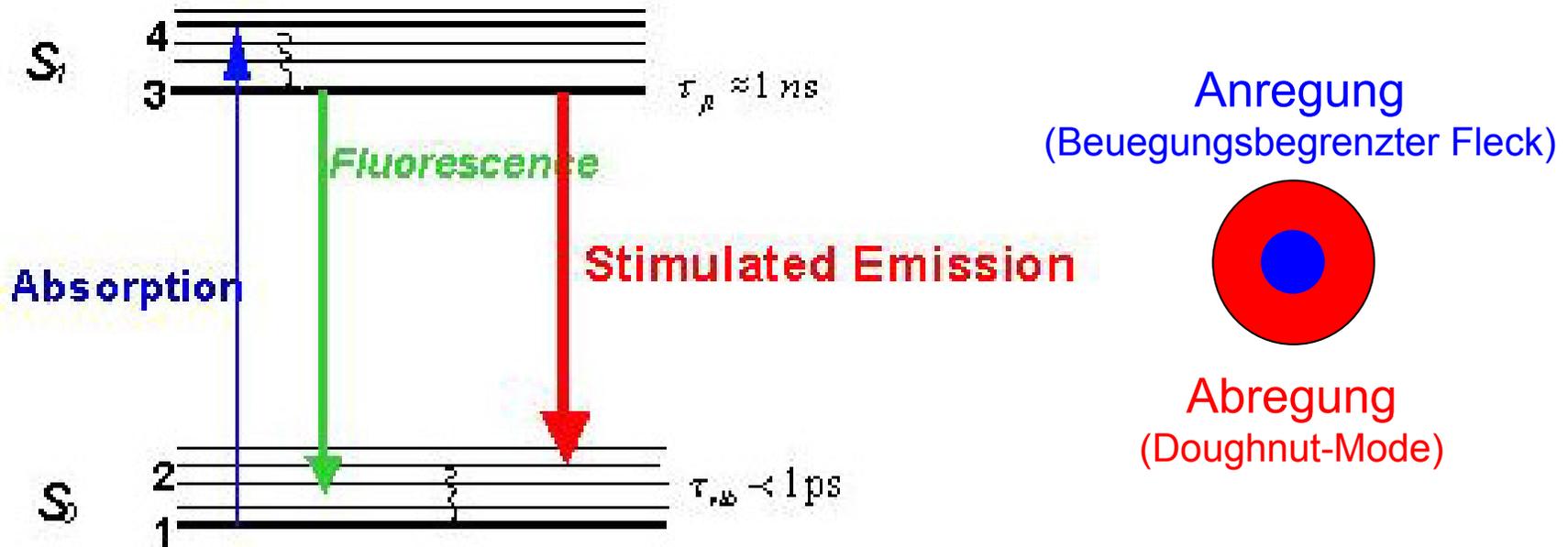
Lichtquelle: Femtosekunden-
Laser



Endothelzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop.
Die Mikrotubuli sind grün, Aktinfilamente rot und
die DNA blau markiert.

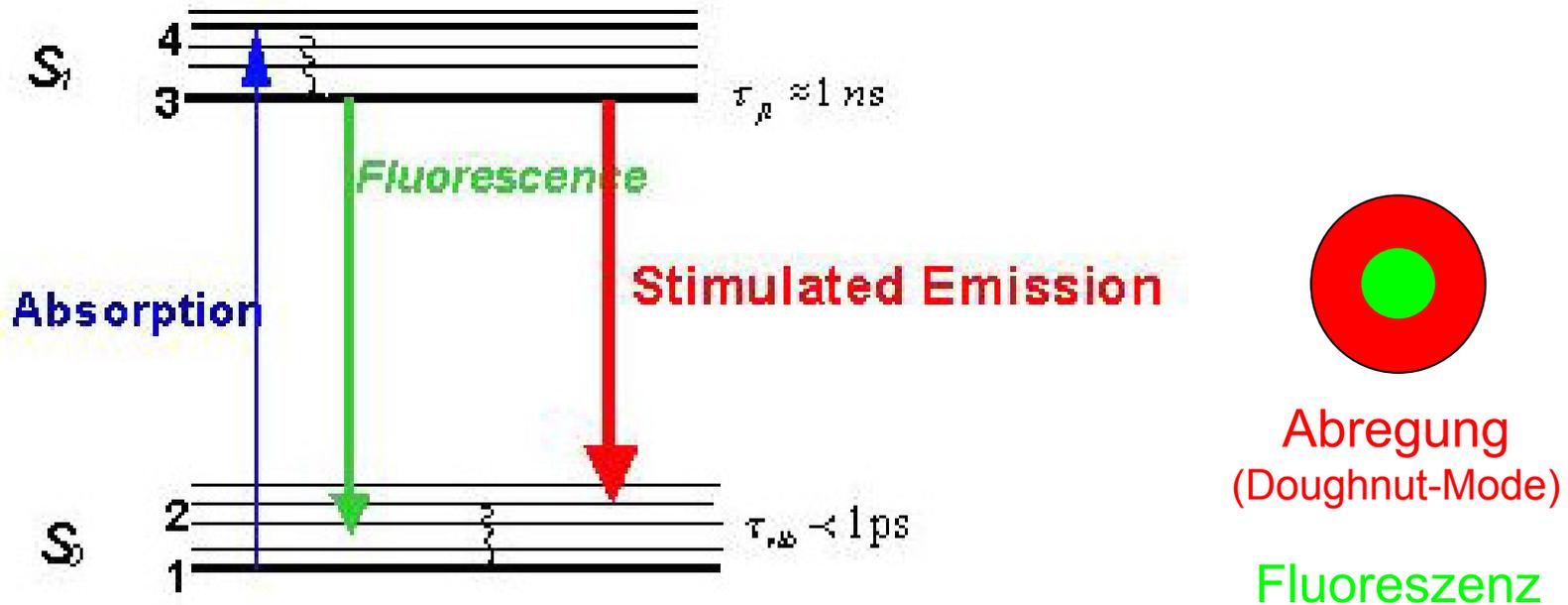
STED (Stimulated Emission Depletion) Mikroskop

STED-Mikroskop: ein hochauflösendes Fluoreszenzmikroskop



STED (Stimulated Emission Depletion) Mikroskop

STED-Mikroskop: ein hochauflösendes Fluoreszenzmikroskop



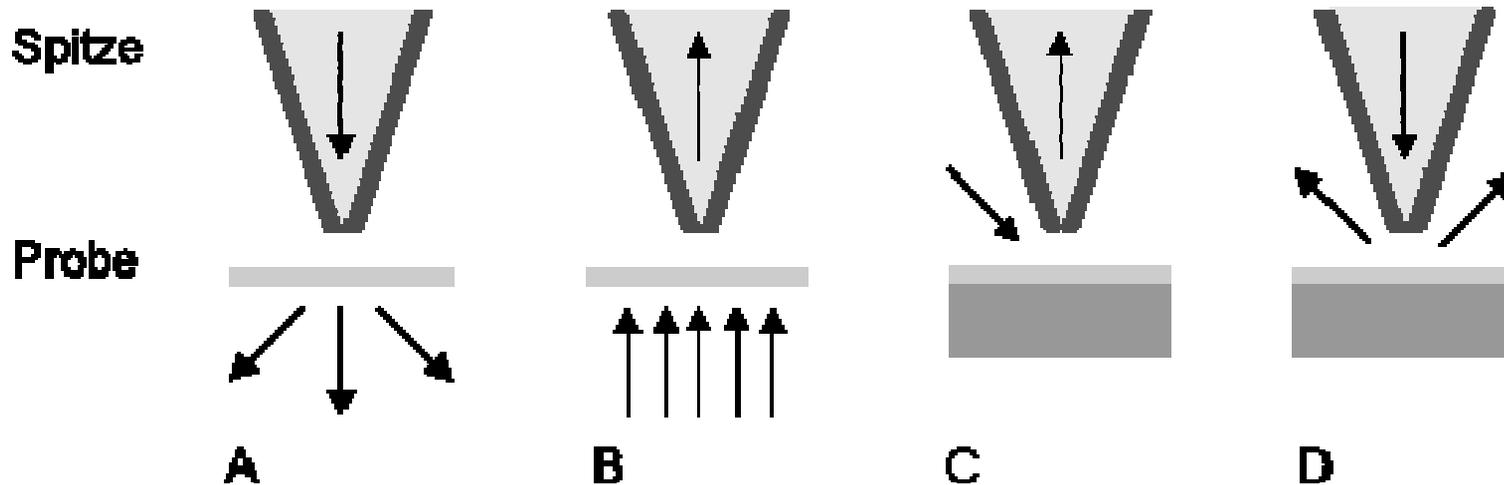
Auflösung: 20 nm demonstriert, 10 mal kleiner als Abbe-Limit
Aufnahmen von Molekülen möglich

Zukunftspreis 2006 für Prof. Dr. Stefan W. Hell vom MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen

Optische Nahfeldmikroskopie

SNOM: scanning near field optical microscope

Typisch: eine metallbeschichtete Faser mit kleiner Öffnung rastert die Probe ab.



Prinzip: Evaneszente Welle dringt durch kleine Öffnung

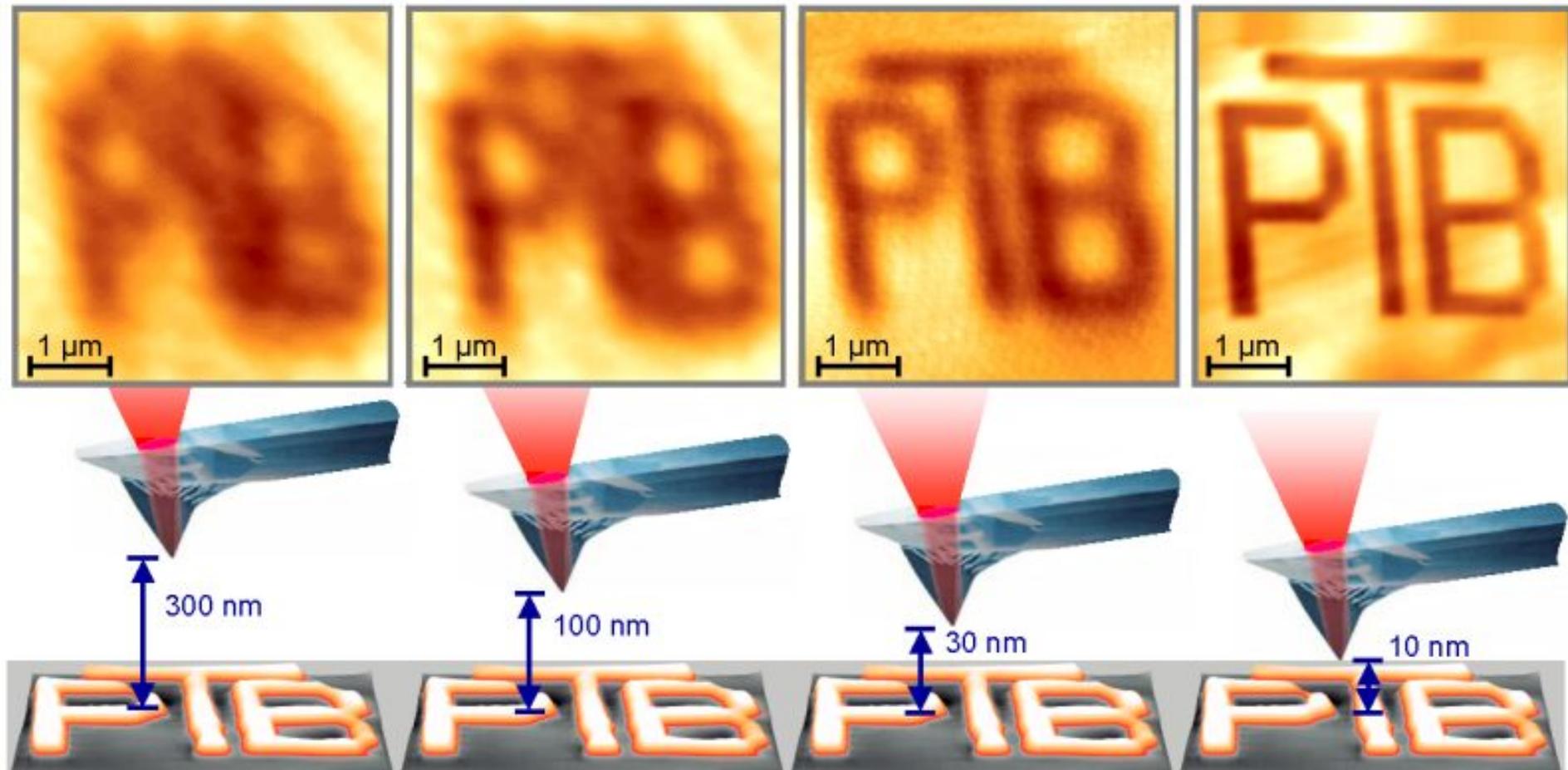
Analogie: Tunneleffekt

Typische Größen: Abstand Spitze-Probe ~ 10 nm

Aperturdurchmesser ~ 100 nm, Transmission $\sim 0,001$

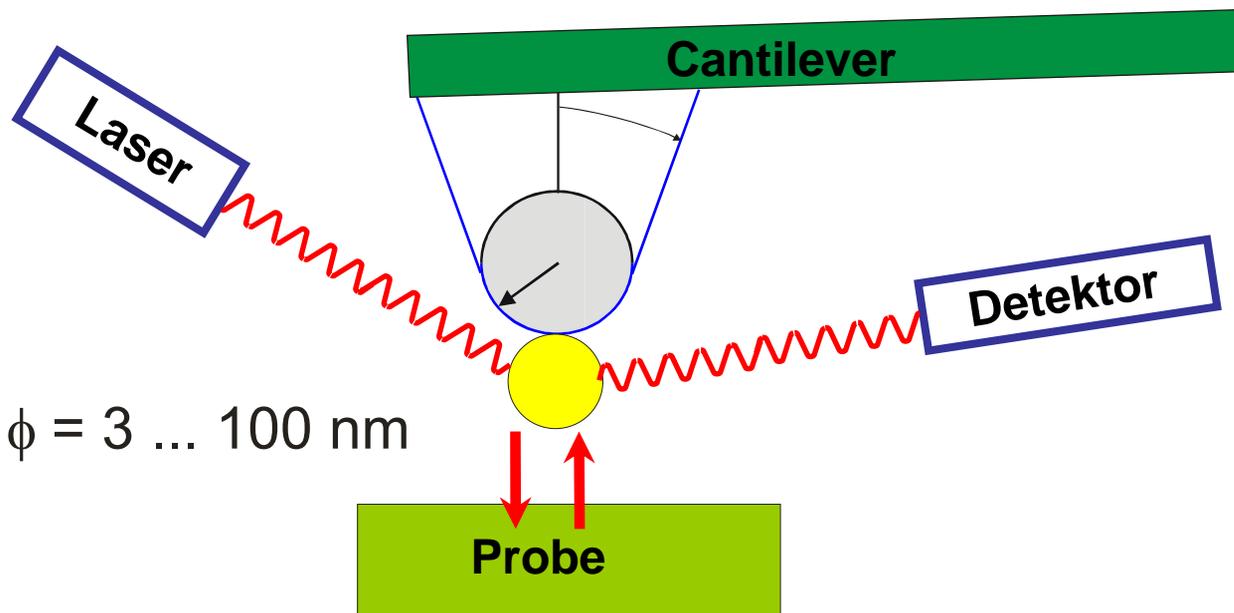
Besispiel: Aperture-SNOM,

$\lambda = 1064 \text{ nm}$, Probe: 20 nm Au auf Si



Bilder: Dr. Hans U. Danzebrink, PTB Braunschweig

Es geht auch ohne Apertur: s-SNOM (scattering SNOM)



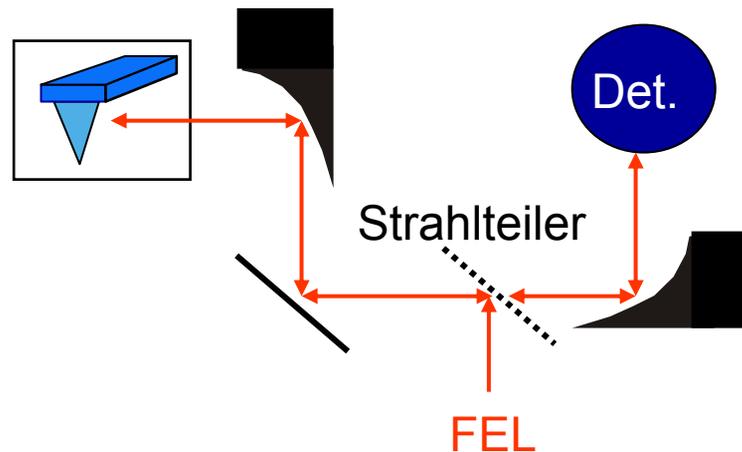
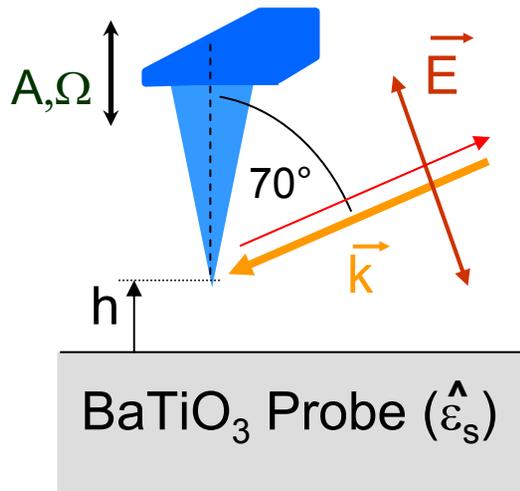
Prinzip:

Die in der Rasterkraftmikroskop-Spitze induzierte Schwingung polarisiert die Probe;
Intensität des rückgestreuten Lichts hängt von optischen Konstanten der Probe ab

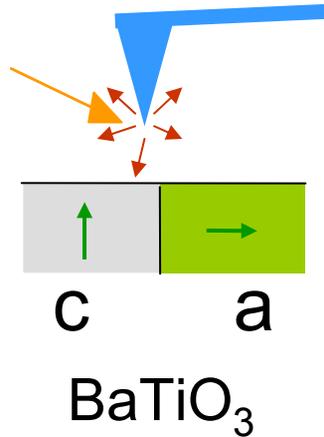
s-SNOM am Freie-Elektronen-Laser des FZD

FELBE = FEL @ ELBE (Freie-Elektronen-Laser am FZD)

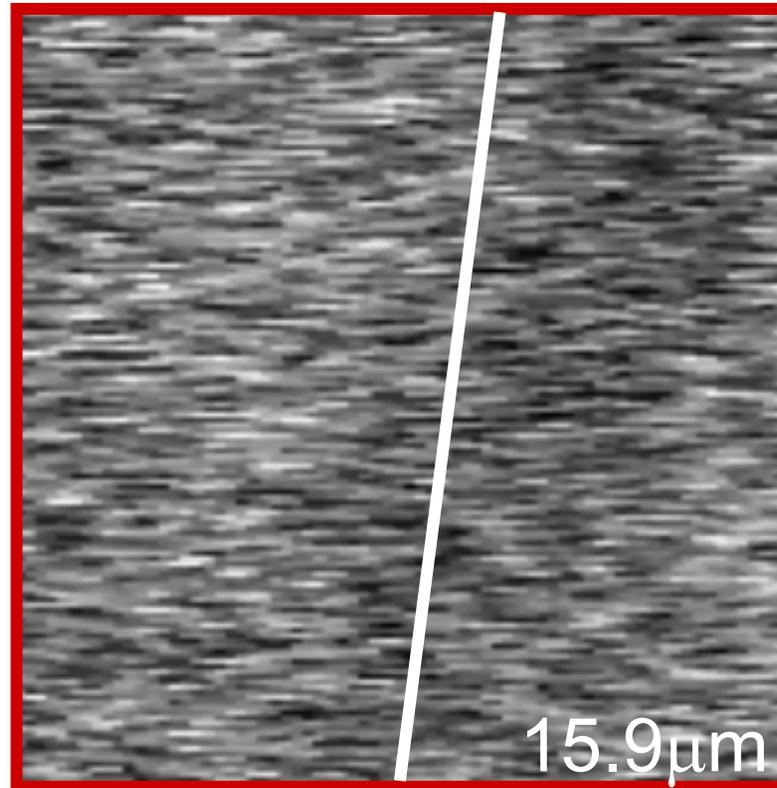
Wellenlängenbereich: 4 – 150 μm ; Leistung: einige W



s-SNOM am Freie-Elektronen-Laser des FZD

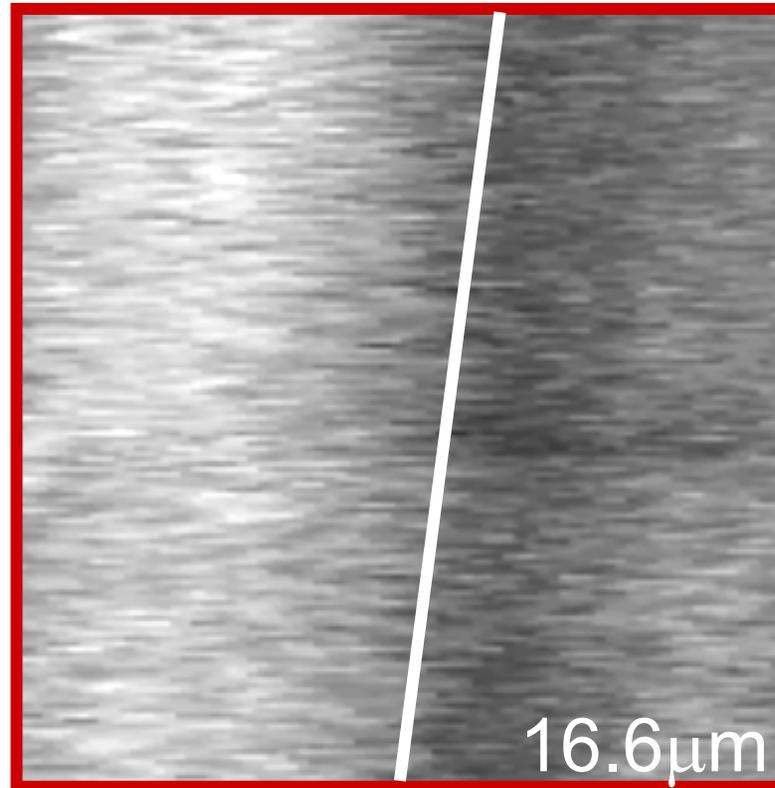
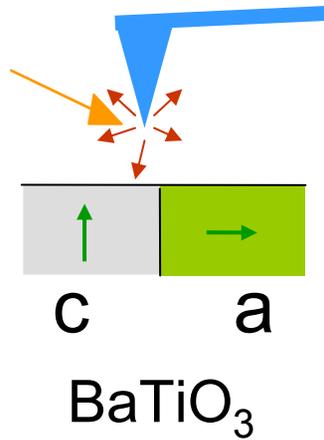


$\lambda \approx 16.5 \mu\text{m}$
Nahe der
Resonanz der
Gitterschwingung

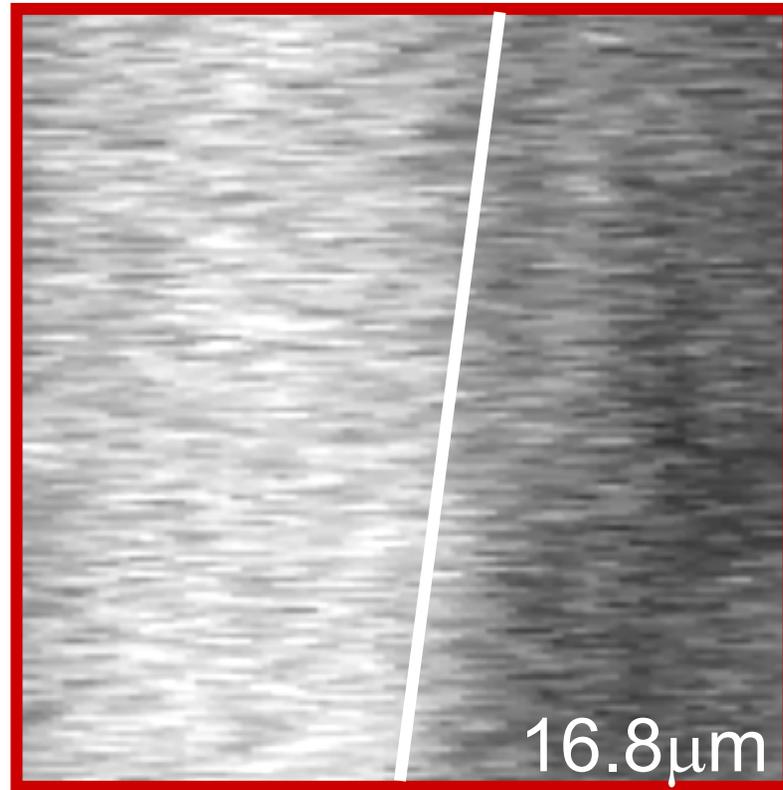
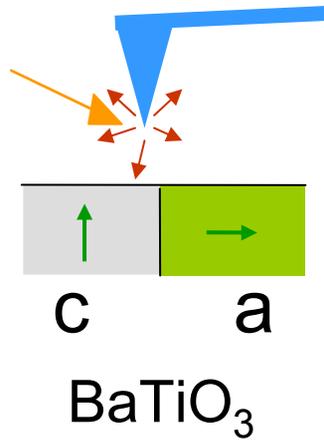


Scan range: $(7\mu\text{m})^2$

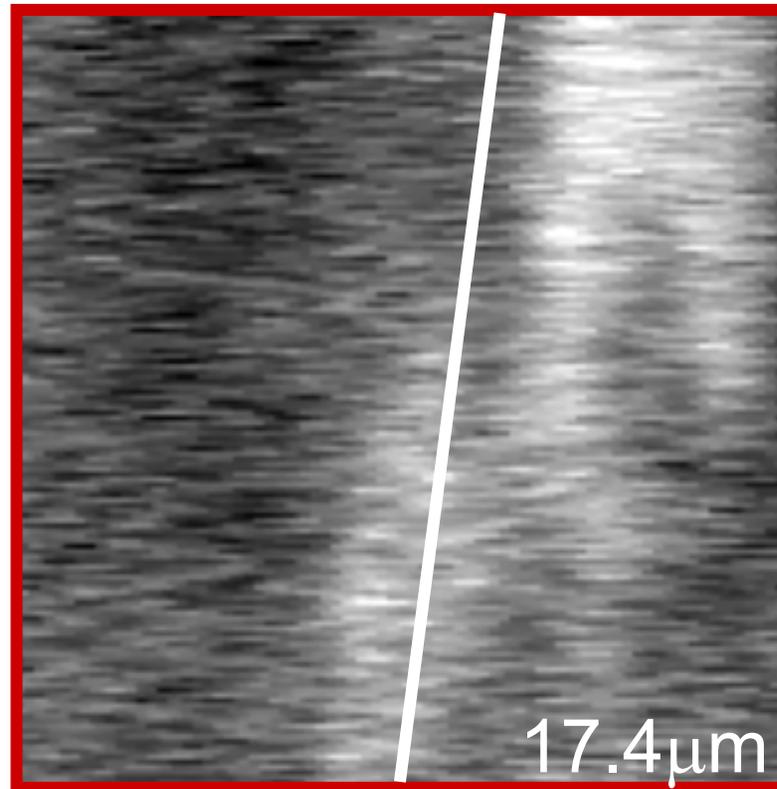
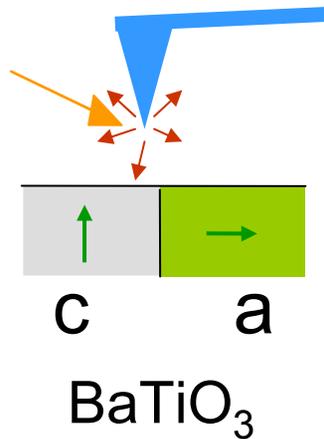
s-SNOM am Freie-Elektronen-Laser des FZD



s-SNOM am Freie-Elektronen-Laser des FZD



s-SNOM am Freie-Elektronen-Laser des FZD



Auflösung: $\sim 250 \text{ nm} < 0.015 \lambda$

Zusammenfassung

- Verständnis für Rolle der Beugung für Auflösungsvermögen (Abbe'sches Prinzip und Rayleigh Kriterium); Wert ca. 200 nm
- Abbildungen jenseits dieser Grenze mit Hilfe eines speziellen Fluoreszenzmikroskops: STED-Mikroskop
- Nahfeldmikroskopie kann Strukturen deutlich kleiner als die Wellenlänge auflösen

Danksagung

D. Stehr, A. Dreyhaupt, U. Lucchesi, H. Schneider, M. Helm,
P. Michel und ELBE-Team
FZD

S. Schneider, M. Cebula, J. Renger, J. Seidel, S. Grafström, L.M. Eng
TU-Dresden, www.iapp.de

Anhang Versuchsvorschlag: ein Blick auf eine CD

Betrachten Sie eine CD und DVD mit einem guten Mikroskop.

Beleuchten Sie beide mit einem Laser und beobachten Sie die Interferenzfigur in Reflexion, bestimmen Sie daraus den Spurabstand!
(1,6 μm für CD, 0,74 μm für DVD)

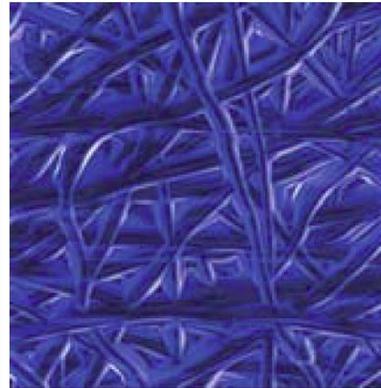
Bild: Uta Lucchesi, Stephan Winnerl, FZD

Anhang: Blick in ein Achromat-Objektiv

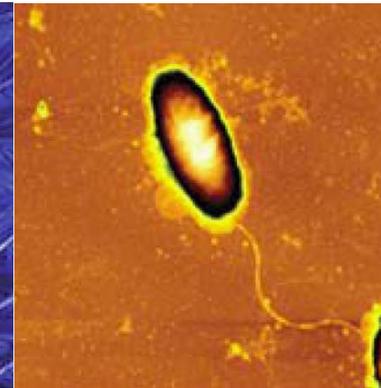


Bilder: Gert Wrigge & Ilja Gerhardt

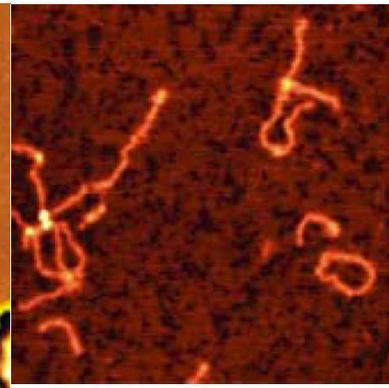
Anhang: Beispiel für ein kommerzielles Aperture-SNOM



15 µm x 15 µm
(Nylonfasern)



4,7 µm x 4,7 µm
(Bakterienzelle)



420 nm x 420 nm
(DNA mit Proteinen)

**Kooperation von JPK Instruments AG, Berlin und
Fraunhofer Gesellschaft e.V.
Institut für Physikalische Messtechnik (IPM),
Freiburg**