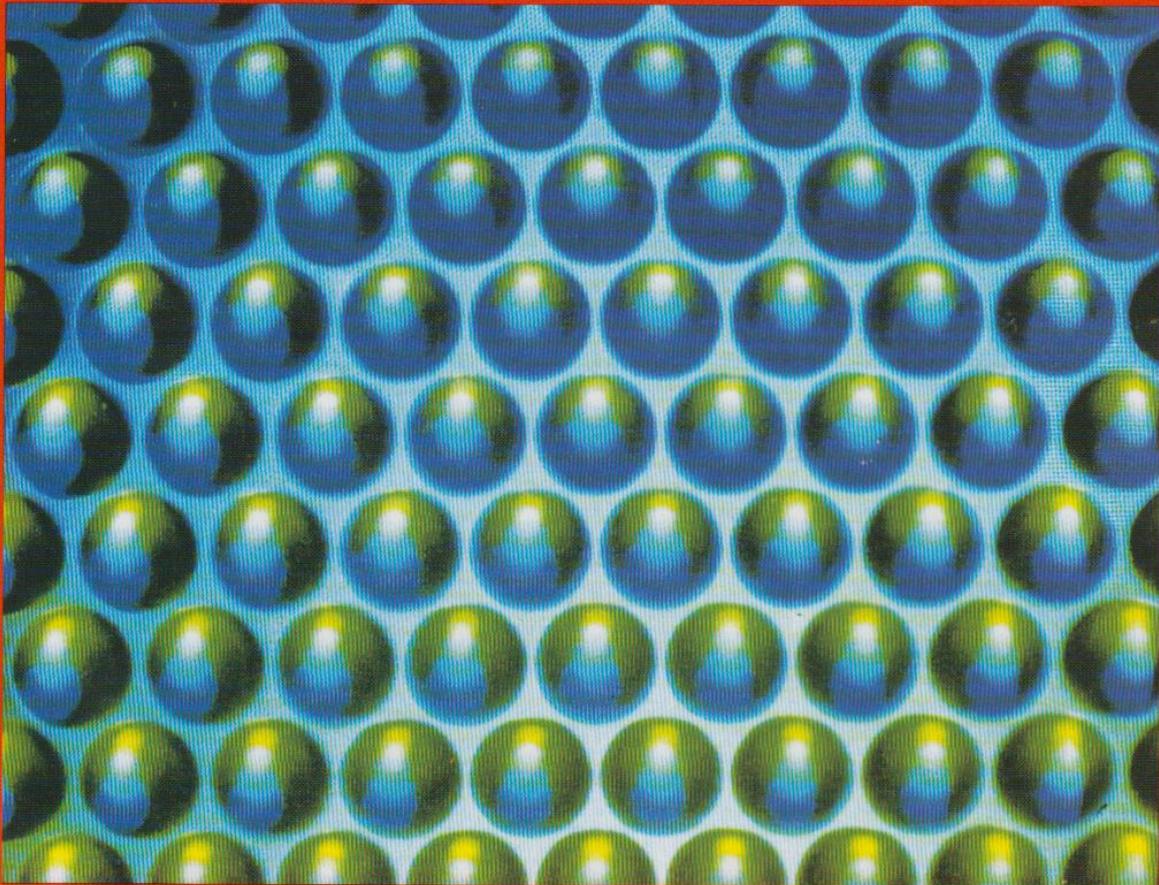


forschung

Mitteilungen der **DFG** 4|96



Deutsche Forschungsgemeinschaft

Hochgenau, sekundenschnell und dreidimensional – Die Möglichkeiten der konfokalen Mikroskopie • Eine Nationalbibliothek des 17. Jahrhunderts – online • Das letzte Fenster zum Weltall wird geöffnet • Eine technologische Hilfe für Querschnittsgelähmte • Von der Waldgrenze im oberen Fimbertal • Wie Schnecken Fische fangen

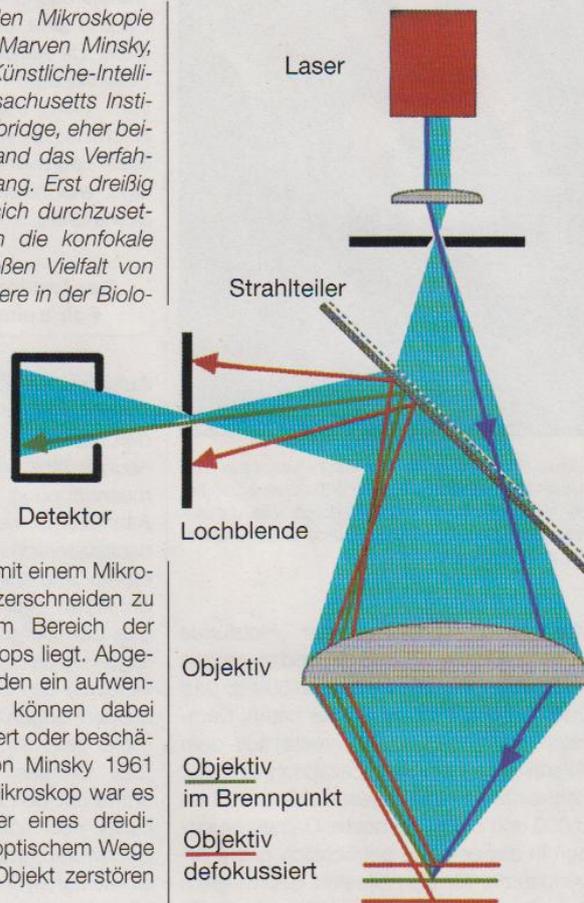
Hochgenau, sekundenschnell und dreidimensional

Die Möglichkeiten der konfokalen Mikroskopie

Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie wurde bereits 1955 von Marvin Minsky, einem der Pioniere der Künstliche-Intelligenz-Forschung am Massachusetts Institute of Technology in Cambridge, eher beiläufig erfunden. Damals fand das Verfahren allerdings keinen Anklang. Erst dreißig Jahre später begann es sich durchzusetzen. Mittlerweile hat sich die konfokale Mikroskopie mit einer großen Vielfalt von Anwendungen, insbesondere in der Biologie etabliert.

Minsky entwickelte das Verfahren der konfokalen Mikroskopie, um Proben von menschlichen Gehirnzellen untersuchen zu können. Er wollte verhindern, das zu untersuchende Objekt mit einem Mikrotom in dünne Schichten zerschneiden zu müssen, deren Dicke im Bereich der Schärfentiefe des Mikroskops liegt. Abgesehen davon, daß Schneiden ein aufwendiger Arbeitsvorgang ist, können dabei feine Objektdetails verändert oder beschädigt werden. Mit dem von Minsky 1961 patentierten konfokalen Mikroskop war es nun möglich, Schnittbilder eines dreidimensionalen Objekts auf optischem Wege zu gewinnen, ohne das Objekt zerstören zu müssen.

Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie, bei der das gesamte Objektfeld möglichst gleichmäßig beleuchtet wird, erfolgt dies bei der konfokalen Mikroskopie punktweise. Beispielsweise wird ein Laserstrahl durch die Objektivlinse auf einen Objektpunkt fokussiert. Für reflektierende beziehungsweise undurchsichtige Objekte wird das reflektierte Licht vom selben Objektiv über einen Strahlteiler auf eine



Das konfokale Meßprinzip. Erst 30 Jahre nach Erfindung des Verfahrens begann es sich durchzusetzen.

Blende fokussiert, hinter der sich ein Detektor befindet. Die Blende ist für die tiefendiskriminierende Wirkung des konfokalen Prinzips verantwortlich, denn nur, wenn der Meßpunkt sich im Fokus des Objektivs befindet, gelangt der Großteil des Lichts durch die Blende zum Detektor.

Befindet sich das Meßobjekt nicht im Fokus, vergrößert sich der Lichtfleck auf der Blende, und es passiert weniger Licht. Der Lichtpunkt auf dem Detektor wird dadurch dunkler. Bei dem konfokalen Prinzip wird ein Laserstrahl oder eine Punktlichtquelle auf das Objekt abgebildet und das vom Objekt ausgehende Licht auf einen Punktdetektor fokussiert, so daß stets nur ein einziger Objektpunkt vermessen werden kann. Um einen kompletten optischen Höhenschnitt erstellen zu können, muß das Objekt daher noch abgerastert werden. Das Abtasten des Meßobjekts im Rasterverfahren ist mittlerweile auf vielfältige Weise umgesetzt worden, zum Beispiel durch Verfahren des Objektisches. Durch die Abrasterung ist es nun möglich, von einem dreidimensionalen Objekt nur die Zone (optischer Schnitt) wiederzugeben, die in der Brennebene des Objektivs liegt. Ein Zeitvorteil bei der Aufnahme eines kompletten Bildes ergibt sich, wenn mehrere Objektpunkte gleichzeitig abgebildet werden. Dazu kann die Punktlichtquelle durch eine rotierende Lochscheibe (Nipkow-Scheibe) in der Zwischenebene ersetzt werden, die flächenhaft mit einer inkohärenten Lichtquelle beleuchtet wird. Bei der Nipkow-Scheibe handelt es sich um eine Lochscheibe, bei der sich auf mehreren spiralförmigen Bahnen zehn Mikrometer große Löcher mit einem Abstand von 100 Mikrometern befinden (sie wurde erstmals 1884 von Paul Nipkow für die erste Kamera zur elektrischen Übertragung von Bildern benutzt). Durch die Beleuchtung wird das rotierende Punktraster auf die Oberfläche projiziert und jeder Punkt in der Fokusebene überstrichen. Das vom Objekt reflektierte Licht trifft wieder auf die jeweilige Lochblende und gelangt über einen Strahlteiler auf eine sogenannte CCD-(Charge-Coupled-Device)-

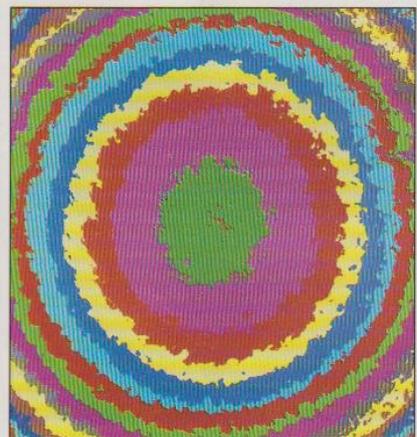
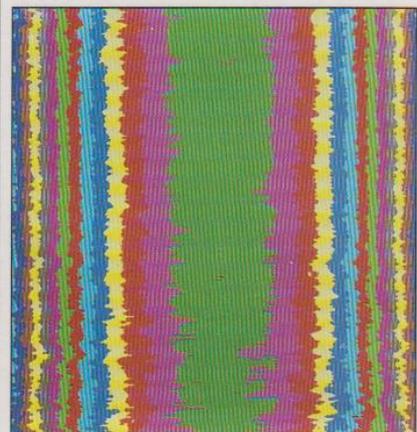
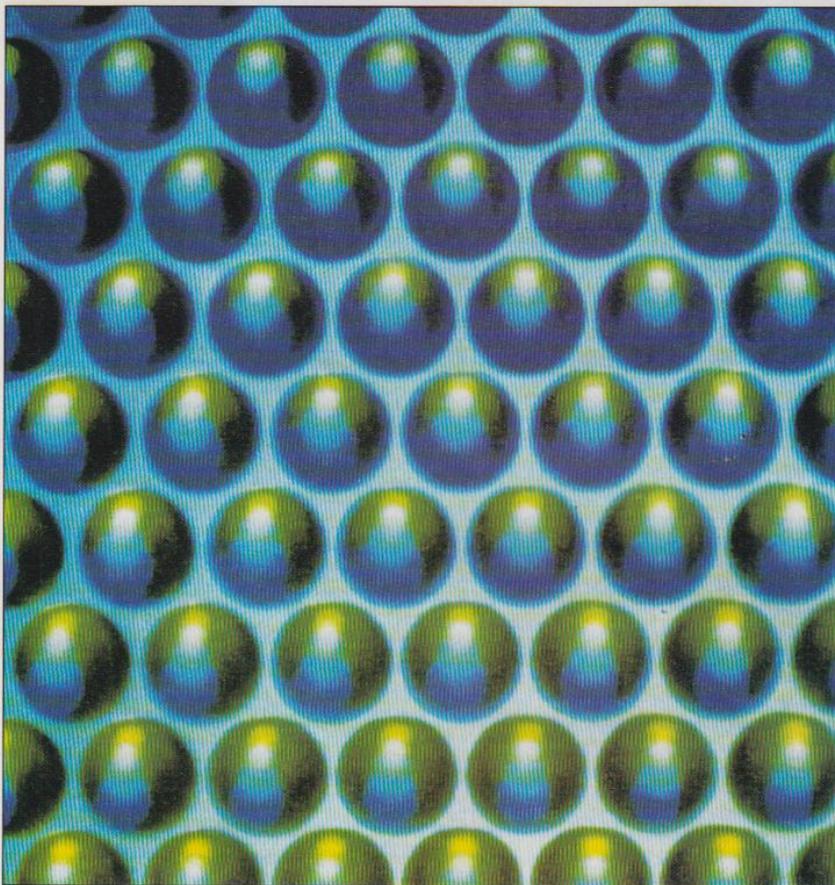
Kamera, die ein Ladungsverschiebe-Element (CCD-Element) enthält und als Detektor eingesetzt wird. Mit diesem Verfahren läßt sich ein kompletter Höhengschnitt im Videotakt gewinnen. Solch ein Aufbau wurde am Institut für Technische Optik der Universität Stuttgart weiterentwickelt, um hochgenaue 3D-Topographien von technischen Oberflächen erstellen zu können.

Um dies zu ermöglichen, ist die CCD-Kamera an ein digitales Bildverarbeitungs-

weniger Sekunden mit einer Höhengauflösung von bis zu zehn Nanometern bei einem Bildfeld kleiner als ein Quadratmillimeter vermessen. Die hohe Genauigkeit des Meßverfahrens eröffnet ein großes Spektrum von Anwendungsmöglichkeiten, so zum Beispiel in der Halbleiter- und Materialforschung.

Neue Möglichkeiten in der konfokalen Mikroskopie ergeben sich durch den Einsatz von Mikrolinsenrastern. Die Mikrolinsen

den auf eine Trägerschicht aus Glas zylinderförmige Inseln aus Fotoresist aufgetragen, die anschließend erhitzt und zum Schmelzen gebracht werden. Beim Erkalten bilden sich aufgrund der Oberflächenspannung aus den Zylindern Kugelsegmente. Anstelle von brechenden können alternativ beugende Mikrolinsen eingesetzt werden, die auf einem lithographischen Verfahren basierend hergestellt werden. Die beugenden Strukturen werden direkt in ein lichtempfindliches Material geschrie-



system angeschlossen. Zur Bestimmung der Topographie wird das Objekt rechnergesteuert axial verschoben und ein Stapel von Höhengschnittbildern erstellt – analog der Serie dünner Schnittpräparate in der konventionellen Mikroskopie. Im Rechner werden die Höhengschnitte gespeichert, und aus diesen Daten wird mittels geeigneter Software die 3D-Topographie rekonstruiert. Mit dem konfokalen Verfahren lassen sich technische Objekte innerhalb

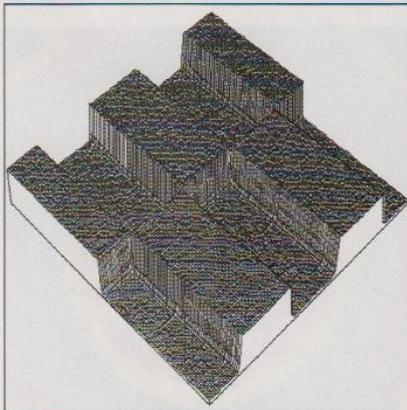
Oben: Ein nach dem Schmelzverfahren hergestelltes refraktives Mikrolinsenraster. Rechts: Falschfarbendarstellung eines Zylinders und eines Kugellagers, vermessen mit dem konfokalen Mikroskop mit Nipkow-Scheibe. Das Bildfeld beträgt $510 \mu\text{m} \times 602 \mu\text{m}$. Die Konturlinien stellen Linien gleicher Höhe dar.

können beugende oder brechende Elemente sein. Brechende Mikrolinsen können mit einem Schmelzverfahren hergestellt werden. Bei diesem Verfahren wer-

ben, zum Beispiel mit Hilfe eines sehr feinen Laserspots eines rechnergesteuerten Laserplotters. Durch den Einsatz von Mikrolinsenrastern konnte das konfokale Meßverfahren auch auf große Objektfelder ausgedehnt werden. In unseren Anwendungen wurden Raster mit einem Einzellinsendurchmesser von 150 Mikrometern und einer Brennweite von 250 Mikrometern verwendet. Als Lichtquelle wird in unserem Aufbau ein Halbleiterlaser mit einer

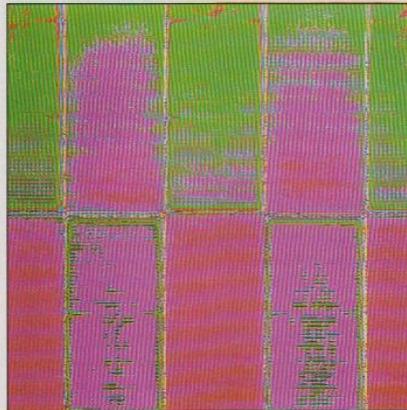
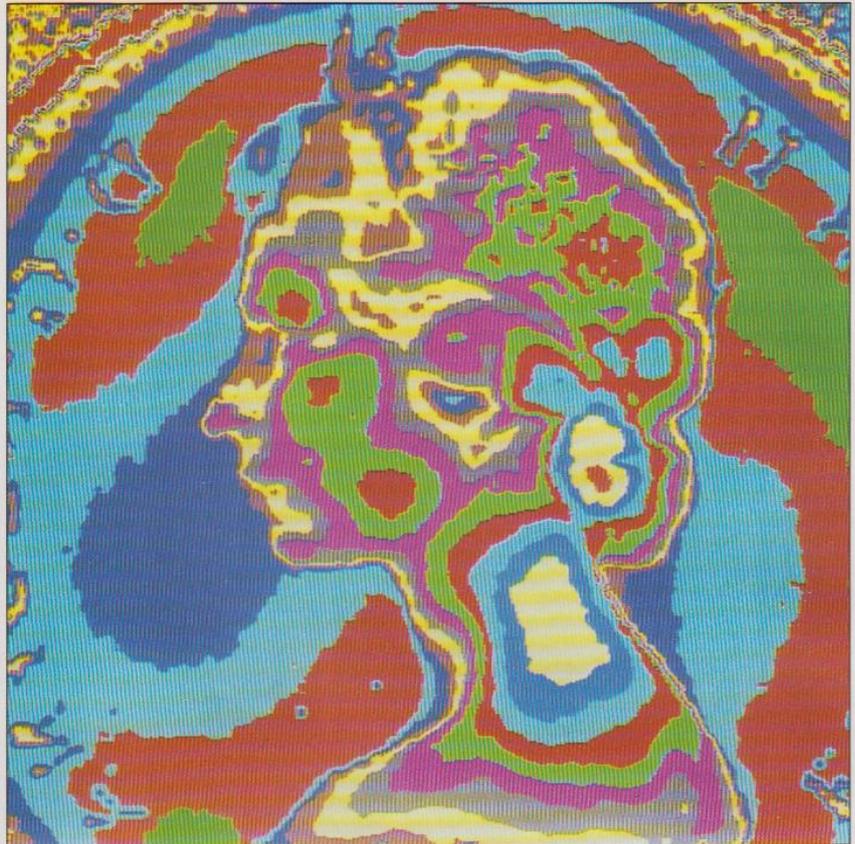
Wellenlänge von 780 Nanometern eingesetzt. Das Mikrolinsenraster transformiert die ebene Laserwellenfront der Beleuchtung in ein zweidimensionales Punktraster, mit dem das Objekt abgetastet wird. Beispielfhaft verwenden wir für die Parallelverarbeitung ein Raster von 10 000 Laserspots.

Das reflektierte Licht passiert das Mikrolinsenraster ein zweites Mal und wird mit Hilfe einer Abbildungslinse auf eine Lochblende als Raumblyende fokussiert, hinter



der sich eine CCD-Kamera befindet. In der CCD-Detektorebene werden die einzelnen Laserspots mehr oder weniger hell abgebildet. Um die Topographie erfassen zu können, ist eine Fokussierung erforderlich, das heißt, die Objektebene wird in z-Richtung (Tiefe) verschoben, die jeweiligen Bildschnitte werden ausgewertet und zu einem 3D-Bild zusammengefügt.

Anhand zahlreicher Messungen konnte gezeigt werden, daß es mit diesem Aufbau möglich ist, große Objektfelder (bis zu 30 mm x 30 mm) parallel zu vermessen.



Oben: Kanadische Zehn-Cent-Münze. Links als höhenkodiertes Grauwertbild, rechts als Falschfarbendarstellung. Das Bildfeld beträgt 11 mm x 11 mm. Links: 3D-Netplot und Falschfarbendarstellung einer lithographisch hergestellten Teststruktur mit einer Stufenhöhe von 400 nm. Die Größe des Objektfeldes beträgt 160 µm x 160 µm.

Mikrolinsenanordnungen aus Zonenplatten in geradezu idealer Weise geeignet, da sie einen linearen Zusammenhang zwischen Brennweite und Wellenlänge besitzen. Es muß nun nicht mehr eine Vielzahl von Höhenschnitten aufgenommen und ausgewertet werden, sondern nur noch eine begrenzte Zahl Farbaufnahmen, aus denen dann die Farbe ermittelt wird. Die Höhe jedes einzelnen Objektpunkts wird dann aus dem Vergleich seines Farbwerts mit dem in der Kodierungskurve zugeordneten Höhenwert gewonnen. Zur sicheren Bestimmung der Farbe reichen drei Farbaufnahmen komplett aus.

Prof. Dr. Hans J. Tiziani
Dipl.-Phys. René Achi
Dipl.-Phys. Hans-Joachim Jordan
Universität Stuttgart

Das Projekt wurde von der DFG im Schwerpunktprogramm „Sensorsysteme“ gefördert.