اثر نوردهی مایل در افزایش توان‌تفکیک در میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی میرائو با میکروکره

یاسمن گنج‌خانی[۱]، وحید عباسیان[۱]، احسان احدی اخلاقی[۱و۲]، و علیرضا مرادی[۲و۳]
[۱]دانشکده فیزیک، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان کد پستی ۴۵۱۳۷-۶۶۷۳۱
[۲] مرکز پژوهشی اپتیک، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان کد پستی ۴۵۱۳۷-۶۶۷۳۱
[۳] دانشکده علوم نانو، پژوهشگاه دانش‌های بنیادی، تهران، ایران کد پستی ۱۹۳۹۵-۵۵۳۱

چکیده – بنا بر نظریه آبه نوردهی مایل به نمونه به فرکانس‌های بالاتر اجازه ورود به سیستم تصویرساز می‌دهد و موجب افزایش توان تفکیک سیستم می‌شود. در این مقاله از ایده نوردهی مایل برای ابرتفکیک در میکروسکوپ تمام‌نگاری دیجیتالی میرائو استفاده کرده‌ایم. شیئی‌های تداخلی میرائو با بزرگ‌نماییِ زیاد گران هستند و شیئی‌های با بزرگ‌نماییِ کم‌تر توان‌تفکیک عرضی کمی دارند. پیش‌تر نشان داده‌ایم با وارد کردن یک میکروکره شفاف در فاصله کار شیئی میرائو توان‌تفکیک عرضی زیاد می‌شود و در اینجا بصورت تجربی نشان داده‌ایم با نوردهی غیرعمود توان‌تفکیک بالاتری بدست می‌آید. بر روی نمونه‌های مختلف روش فوق را امتحان کرده و افزایش توان تفکیک عرضی و تیزی لبه را در دو حالت بدون میکروکره و با میکروکره نشان داده‌ایم.

کلید واژه- تمام‌نگاری دیجیتالی، ابر تفکیک، میرائو، میکروسکوپی سه‌بعدی.

The effect of inclined illumination on enhancing the resolution in microsphere-assisted Mirau digital holographic microscopy

Yasaman Ganjkhani[1], Vahid Abbasian[1], Ehsan A. Akhlaghi[1, 2], and Ali-Reza Moradi[2, 3]

[1]Department of Physics, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), 45137-66731, Zanjan , Iran
[2]Optics Research Center, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), 45137-66731, Zanjan, Iran
[3] School of Nano Science, Institute for Research in Fundamental Sciences (IPM), PO Box 19395-5531, Tehran, 19395, Iran

Abstract- According to Abbe, oblique illumination in imaging systems allows the entrance of higher spatial frequencies into the system's aperture and thus increases the resolution power of it. We have extended the idea to Mirau digital holographic microscopy to obtain super-resolution in 3D images. High magnification Mirau objectives are expensive and low magnification ones suffer from low lateral resolution. We have already demonstrated the increase in lateral resolution through introducing a transparent microsphere into the working distance of the Mirau objective. In this paper, we show that by applying inclination to the illumination direction in Mirau system the resolution can be further improved. We have tested the technique on different samples and verified the increase in lateral resolution and edge sharpness in the presence and in the absence of the microsphere.

Keywords: digital holography, super-resolution, Mirau, 3D microscopy

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from opsi.ir on 2024-03-29]

۱- مقدمه

میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی روشی موثر، ساده و غیرمخرب برای تصویربرداری کمی از اجسام فازی است و از این رو برای تصویربرداری از نمونه‌های زیستی مناسب است. در این روش تمام‌نگاشت‌های ثبت‌شده توسط آشکارساز به طور عددی بازسازی می‌شوند و اطلاعات میدان شیئ تصویرشده به طور کامل ثبت می‌شود [۱]. در تمام‌نگاری دیجیتالی خارج‌محوری که در آن به هنگام ثبت تمام‌نگاشت زاویه‌ای میان باریکه‌های شیئ و مرجع وجود دارد، تصاویر حقیقی و مجازی و نیز باریکه پراش-نیافته در بازسازی از یکدیگر جدا می‌شوند. چیدمان‌های متداول تمام‌نگاری خارج‌محوری معمولا در مقابل ارتعاشات مکانیکی حساس‌ترند و این به نوفه و خطای بازسازی بیشتر منجر می‌شود. اخیرا چیدمان‌های ساده‌تر هم‌مسیر و خودمرجع مختلفی مثلا با استفاده از آینه لوید [۲]، تداخل چینشی جانبی از طریق یک تیغه شیشه‌ای [۳و۴] و نیز میکروسکوپ تک چشمی [۵] به وجود آمده-اند که اثرهای مزاحم در میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی هم‌مسیر را کاهش می‌دهند. بعلاوه، استفاده از شیئی‌های تداخلی نظیر مایکلسون، لینیک و میرائو برای چیدمان‌های خودمرجع و فشرده مناسب‌اند. در شیئی‌های میرائو باریکه مرجع از یک آینه کوچک که در داخل شیئی تعبیه شده است، بازتاب می‌شود. شیئی‌های میرائو با بزرگ‌نمایی زیاد گران هستند و در مقابل، شیئی‌های با بزرگ‌نمایی کم توان تفکیک عرضی بسیار کمتری نسبت به توان تفکیک محوری دارند.

بنا بر نظریه آبه در میکروسکوپ‌های نوری توان تفکیک عرضی به $\lambda/2NA$ محدود می‌شود، که در آن λ طول‌موج نور و NA گشودگی عددی سیستم تصویرساز است. به تمامی روش‌هایی که بر این محدودیت فائق آیند، روش-های تصویرگیری ابرتفکیک می‌گویند. بعنوان مثال در میکروسکوپی میدان دور می‌توان NA سیستم تصویرساز را دستکاری و آن را به شکل مصنوعی زیاد کرد. این کار را می‌توان از طریق مبادله درجات آزادی سیستم، از جمله شکل و رفتار زمانی شیئ، ابعاد، طول‌موج و قطبش انجام داد [۶]. بعنوان مثال استفاده از میکروکره‌ی شفاف برای ابرتفکیک در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه بوده و جوانب مختلف کار با آن‌ها مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است [۷]. با نوردهی ساختاریافته نیز می‌توان گشودگی عددی سیستم‌های تصویرساز را بصورت مصنوعی زیاد کرد [۸]. در این روش با تشکیل فریزهای ماره و وارد کردن فرکانس‌های بالایی که پیش از این از طریق سیستم قابل دریافت نبودند توان تفکیک سیستم زیاد می‌شود [۹]. از طرف دیگر نوردهی ساختاریافته را می‌توان بصورت ترکیبی از باریکه‌های مایل در نظر گرفت. مطابق با نظریه آبه [۱۰] اگر به جای نوردهی قائم، شیئ توسط نوردهی مورب روشن شود، فرکانس‌های بالاتری اجازه ورود به سیستم خواهند یافت.

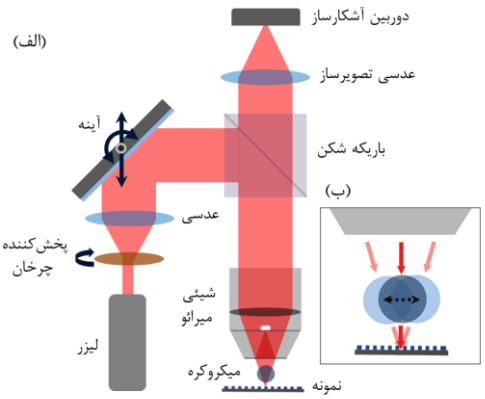
در میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی توان تفکیک عرضی به توان تفکیک سیستم تصویرساز، کیفیت آشکارساز و نیز به تابع پنجره پالایه فوریه استفاده شده در فرآیند بازسازی تمام‌نگاشت بستگی دارد. غالب روش‌های ابرتفکیک برای میکروسکوپ‌های نوری را می‌توان برای میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی نیز به کار برد. ما قبلا از نوردهی ساختاریافته با بکارگیری توری‌های یک‌بعدی در جهت‌های مختلف یا توری‌های دوبعدی با طرح‌های شطرنجی و لانه‌زنبوری برای افزایش موثر توان تفکیک در میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی با میرائو استفاده کرده‌ایم [۱۱]، همچنین نشان داده‌ایم که با وارد کردن یک میکروکره شفاف در طول کار یک شیئی میرائو با بزرگ‌نمایی کم می‌توان NA آن را افزایش داد [۱۲]. از این روش برای تشخیص گلبول‌های قرمز دارای بیماری تالاسمی خفیف و نیز برای تشخیص وجود نانوذرات در نانوکامپوزیت‌های پلیمری استفاده کرده‌ایم [۱۳]. در این مقاله ایده نوردهی مایل را با میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی میرائو همراه با میکروکره ترکیب کرده‌ایم تا به میزان زیادتری توان تفکیک را بهبود ببخشیم. برای تایید تجربی از نمونه‌هایی همچون DVD استفاده کرده و افزایش توان تفکیک را نشان داده‌ایم.

۲- چیدمان آزمایش

شکل۱ شمایی از چیدمان بکار رفته در آزمایش‌ها را نشان می‌دهد. باریکه لیزر هلیوم-نئون (پویا فرآزما، ۲mW، ۶۳۲٫۸ nm) پس از عبور از یک پخش‌کننده چرخان که به منظور کاهش همدوسی فضایی نور لیزر و کم کردن اثرات پراش و تداخل‌های ناخواسته بر سر راه لیزر تعبیه

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from opsi.ir on 2024-03-29]

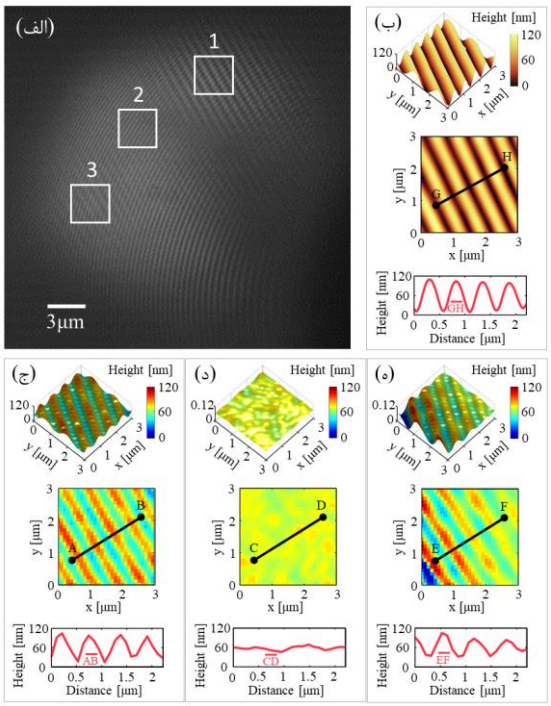


شکل ۱(الف) چیدمان تمام‌نگاری دیجیتالی میرائو با میکروکره تحت نوردهی مایل؛ (ب) تصویر بزرگ‌نمایی‌شده از چیدمان

شده، توسط یک عدسی جمع شده و بر یک آینه واقع بر یک نگه‌دارنده قابل‌چرخش فرود می‌آید. باریکه از آینه با زاویه دلخواه به سمت باریکه‌شکن واقع در بالای شیئی میرائو (Nikon, NA=۰/۳, ۱۰X) و از آنجا به داخل شیئی میرائو هدایت می‌شود. بخشی از باریکه ورودی به میرائو از شیئی عبور کرده به نمونه می‌رسد و از آن بازتاب می‌شود. بخش دیگری از باریکه ورودی از آینه مرجع تعبیه‌شده درون شیئی بازتاب می‌شود و باریکه مرجع را تشکیل می‌دهد. دو باریکه بازتابی از شیئ و آینه مرجع با هم تداخل می‌کنند. باریکه‌های تداخلی از عدسی دوم واقع در بالای باریکه‌شکن به سمت آشکارساز (Thorlabs، DC 1545) هدایت می‌شوند و تمام‌نگاشت توسط این آشکارساز ثبت می‌شود. برای رسیدن به چیدمان خارج‌محور برای تمام‌نگاری به نمونه که بر روی یک نگهدارنده با ۵ درجه آزادی قرار دارد، قدری زاویه داده می‌شود. آزمایش‌ها در دو مرحله انجام شده‌اند. در مرحله اول از طریق یک فیبر نوری متصل به یک جابجاگر میکرونی، یک میکروکره بوسیله جابجاگر به دقت وارد فاصله کار شیئی میرائو می‌شود و چیدمان مهیای نوردهی مایل بر میرائوی همراه با میکروکره می‌شود. مرحله دوم آزمایش‌ها برای نمایش اثر نوردهی مورب بطور مستقیم، بدون میکروکره انجام می‌شود. آینه قابل‌چرخش امکان نوردهی مورب نمونه را فراهم می‌کند. زوایای قابل دسترسی به این طریق از ۳- تا ۳ درجه و با دقت یک زاویه قوسی هستند. در هر دو مرحله، بازسازی از طریق انتشار طیف زاویه‌ای انجام می‌شود که دامنه مختلط شیئ را بدست می‌دهد. برای از بین بردن اثر ابیراهی همواره یک تمام‌نگاشت مرجع با استفاده از یک تیغه بازتابان خالی از نمونه ثبت شده و فاز آن در حین بازسازی از فاز تمام‌نگاشت شیئ کسر می‌شود.

۳- نتایج تجربی

شکل۲(الف) تمام‌نگاشت حاصل از یک DVD را در حضور یک میکروکره به قطر ۲۵۰ µm نشان می‌دهد. همانطور که دیده می‌شود ساختار DVD در نواحی اطراف میدان دید ظاهر شده است. این بدان معناست که دسته پرتوهایی که بدون انحراف از مرکز میکروکره گذشته و نمونه را بطور عمودی روشن کرده‌اند نتوانسته‌اند ساختار نمونه را آشکار کنند، ولی آن دسته از پرتوها که در گذر از میکروکره منحرف شده و با زاویه به نمونه می‌تابند امکان بازیابی فرکانس‌های بالاتر را یافته و ساختار نمونه را ظاهر کرده‌اند.



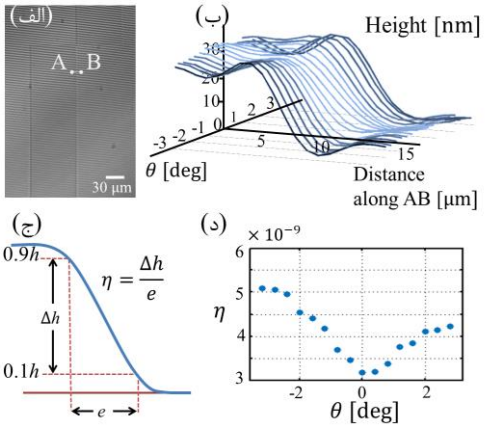
شکل ۲(الف) تمام‌نگاشت ثبت‌شده از یک DVD در سیستم تمام‌نگاری میرائو با میکروکره؛ (ب) تصاویر ۳بعدی، ۲بعدی و ۱بعدی بدست‌آمده توسط AFM برای اعتبارسنجی؛ (ج)، (د) و (ه) به ترتیب تصاویر بازسازی‌شده از نواحی (۱)، (۲) و (۳) شکل (الف) هستند.

در شکل ۲(ب) تصاویر AFM (ثبت شده توسط دستگاه Ara-A.F.M. ساخت شرکت آرا پژوهش) از ساختار نمونه مورد آزمایش آورده شده است. با این روش عمق شیارها ۸۹/۹ ± ۵ nm بدست آمده است. بازسازی‌های سه‌بعدی و دوبعدی و نمایه خطی سطوح برای نواحی ۱، ۲ و ۳ تمام‌نگاشت شکل ۲(الف) به روش انتشار طیف زاویه‌ای به

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from opsi.ir on 2024-03-29]

ترتیب در شکل ۲(ج)، (د) و (ه) نشان داده شده‌اند. مقدار عمق شیارها از نمایه خطی شکل ۲(ج) معادل nm ۵ ± ۷۶/۱۱ بدست آمد که تطابق خوبی با نتیجه AFM دارد.



شکل ۳(الف) تمام‌نگاشت بخشی از یک عدد نگاشته‌شده بر لبه یک CD؛ (ب) نمایه‌های خطی در راستای خط $A\overline{B}$ در شکل (الف) برای زاویه‌های نوردهی مختلف؛ (ج) تعریف پارامتر تیزی لبه؛ (ه) نمودار تیزی لبه بر حسب زاویه نوردهی.

اثر نوردهی مایل بر افزایش توان‌تفکیک و تیزی لبه در یک نمونه غیرتناوبی را این بار در میرائو بدون میکروکره امتحان کرده‌ایم. در شکل ۳(الف) تمام‌نگاشت حاصل از بخشی از یک عدد حک‌شده بر لبه یک CD توسط میرائو بدون میکروکره ثبت شده‌است. شکل ۳(ب) نمایه‌های خطی در راستای عمود بر لبه و بموازات خط $\overline{AB}$ را برای تمام‌نگاشت‌هایی که با تغییر زاویه فرود نور ثبت شده‌اند، نشان می‌دهد. افزایش تیزی لبه با افزایش زاویه فرود با دقت در این نمایه‌ها مشهود است. برای داشتن معیاری کمی از تیزی لبه، پارامتر تیزی را مطابق شکل۳(ج) بصورت $\eta = \Delta h / e$ تعریف می‌کنیم که در آن e پهنای لبه مابین نقاط نظیر ۱۰٪ تا ۹۰٪ بیشینه ارتفاع پله است و Δh میزان تغییر ارتفاع میان این دو نقطه است. شکل ۳(ه) مقادیر تیزی را برای نمایه‌های خطی شکل ۳(ب) نشان می‌دهد. از این نمودار مشخص است که با افزایش قدر مطلق زاویه فرودی تیزی لبه اندازه‌گیری شده افزایش می‌یابد.

۴- نتیجه‌گیری

در این مقاله اثر نوردهی مایل در افزایش توان‌تفکیک و تیزی لبه در میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی میرائو به همراه میکروکره و بدون آن نشان داده شد و دیدیم اگر زاویه فرود نور بر نمونه به نحوی از راستای عمود منحرف شود، فرکانس‌های بالاتر که متناظر با جزئیات ریزتر شیئ هستند، امکان ورود به سیستم می‌یابند و به این ترتیب توان‌تفکیک سیستم افزایش می‌یابد.

سپاسگزاری

نویسندگان از جناب آقای دکتر چارسوقی برای بحث‌های مفید و از سرکار خانم مهناز هاشمی برای فراهم کردن داده‌های AFM کمال تشکر را دارند.

مراجع

[1] K. M. Kim, *Digital Holographic Microscopy*, Vol. 162, Springer, New York, NY: Springer Series in Optical Sciences, 2011.
[2] V. Chhaniwal, et al., "Quantitative phase-contrast imaging with compact digital holographic microscope employing Lloyd's mirror", Optics letters, p. 5127-5129, 2012.
[3] A.S Singh et al., "Lateral shearing digital holographic imaging of small biological specimens", Optics express, p. 23617-23622, 2012.
[4] Priyanka Vora, et al., "Wide field of view common path lateral shearing digital holographic interference microscope", Journal of Biomedical Optics, 2017.
[5] S. Ebrahimi et al., "Digital holographic microscopy with coupled optical fiber trap for cell measurement and manipulation", Optics letters, p. 2916-2919, 2014.
[6] M. Martínez-Corral, and G. Saavedra, "The resolution challenge in 3D optical microscop", Progress in Optics, p. 1-67, 2009.
[7] A. Darafsheh et al., "Optical super-resolution by high-index liquid-immersed microspheres". Applied Physics Letters, p. 141128, 2012.
[8] M.A Neil, R. Juškaitis, and T. Wilson, "Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope". Optics letters, p. 1905-1907, 1997.
[9] M. G. Gustafsson, "Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy", Journal of microscopy, p. 82-87, 2000.
[10] E. Abbe, "Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung", Archiv für mikroskopische Anatomie, p. 413-418, 1873.
[11] Y. Ganjkhani, M. A. Charsooghi, E. A. Akhlaghi, and A. R. Moradi, "Superresolved Mirau digital holography by structured illumination," Opt. Comm. pp. 58-65, 2017.
[12] M. Aakhte, et al., "Microsphere-assisted super-resolved Mirau digital holographic microscopy for cell identification", Applied Optics, p. D8-D13, 2017.
[13] V. Abbasian, E. A. Akhlaghi, M. A. Charsooghi, M. Bazzar, and A. R. Moradi, "Digital Holographic Microscopy for 3D Surface Characterization of Polymeric Nanocomposites", to appear in Ultramicroscopy 2017.

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from opsi.ir on 2024-03-29]