
BACHELORARBEIT

Herr
Songzhe Nie

**Design und Realisierung
eines
konfokalen Mikroskops**

Mittweida, 2024

Fakultät Ingenieurwissenschaften

BACHELORARBEIT

Design und Realisierung eines konfokalen Mikroskops

Autor:

Songzhe Nie

Studiengang:

Maschinenbau

Seminargruppe:

MB15wl-B

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. Richard Börner

Zweitprüfer:

Dr. rer. nat. Theo Pflug

Einreichung:

Mittweida, 08.01.2024

Bibliografische Beschreibung:

Nie, Songzhe:

Design und Realisierung eines konfokalen Mikroskops, 48 Seiten, 38 Abbildungen, Hochschule Mittweida, University of Applied Sciences, Fakultät Ingenieurwissenschaften, Bachelorarbeit, 2024

Referat:

In dieser Arbeit wurde ein modulares konfokales Mikroskop als Basismodell für Forschung und Lehre entworfen und realisiert. Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf dem Entwurf, der Optimierung und dem Aufbau des Strahlenganges des konfokalen Mikroskops. Einige Teile und Abschirmungen wurden eigenständig entworfen und hergestellt. Mit Hilfe von CAD-Simulationen wurden geeignete optische Komponenten ausgewählt und der gesamte Strahlengang so justiert, dass die grundlegenden Anforderungen für die Experimente erfüllt wurden.

Inhalt

Inhalt	I
1 Motivation	3
2 Grundlagen	4
2.1 Fluoreszenz und Stokes-Verschiebung	4
2.2 Prinzip des konfokalen Mikroskops.....	5
2.3 $\lambda/2$ -Plättchen	7
2.4 Polarisierende Strahlenteiler.....	7
2.5 Strahlversatzoptik (Planplatte).....	8
2.6 Lichtwellenleiter (LWL)	9
2.6.1 Singlemode-Fasern.....	9
2.6.2 Polarisationserhaltende Fasern.....	10
2.7 Faserkoppler	11
2.8 Objektive	11
2.9 Pinhole	12
2.10 Single Photon Avalanche Diode	13
3 Methoden	14
3.1 Anregungsstrahlengang	14
3.1.1 Entwurf des Anregungsstrahlengangs.....	14
3.1.2 Aufbau des Anregungsstrahlengangs	15
3.1.2.1 <i>Laserdiode</i>	16
3.1.2.2 <i>Fasereinkopplung und Justierung</i>	16
3.1.2.3 <i>Berechnung der Kopplungseffizienz von LWL</i>	18
3.1.2.4 <i>Abschirmung des Anregungsstrahlengangs</i>	19
3.2 Detektionsstrahlengang.....	20
3.2.1 Entwurf des Detektionsstrahlengangs	20

3.2.2	Konstruktion des Detektionsstrahlengangs	22
3.2.3	Aufbau des Detektionsstrahlengangs	24
3.2.3.1	<i>Abschirmung des Detektionsstrahlengangs</i>	24
3.3	Hauptkorpus	26
3.3.1	Cube.....	26
3.3.2	Probenhalterung	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Daten der verwendeten Komponenten	29
4.2	Ergebnisse der Berechnungen und Messungen.....	31
4.3	Strahlengang des konfokalen Mikroskops	34
5	Zusammenfassung und Ausblick	37
	Anhang A: Teileliste	38
	Anhang B : Protokoll der Faserkopplung	39
	Anhang C : Abbildungen der konstruierten Bauteile	42
	Literaturverzeichnis	45
	Danksagung	47
	Selbstständigkeitserklärung	48

1 Motivation

In der modernen wissenschaftlichen Forschung ist das Mikroskop ein unverzichtbares Werkzeug, um die Geheimnisse der mikroskopischen Welt zu erforschen. Die Mikroskop Technologie hat sich im Laufe der Zeit vom einfachen Lichtmikroskop über das Elektronenmikroskop bis hin zu den heutigen Spitzentechnologien wie der Konfokal-, Zwei-Photonen- und Superauflösungsmikroskopie entwickelt. Diese Fortschritte haben nicht nur die Auflösung und die Abbildungsgeschwindigkeit der Mikroskope drastisch erhöht, sondern auch ihre Anwendungsmöglichkeiten in der Biologie, den Materialwissenschaften, der Medizin und vielen anderen Bereichen erweitert. Eines dieser wichtigen Werkzeuge ist die konfokale Mikroskopie [1].

Aufgrund der hohen Kosten und der integrierten Bauweise beschränken sich die praktischen Erfahrungen der Studierenden oft auf ein grundlegendes Verständnis des Aufbaus und der Prinzipien. Der Aufbau eines offenen, modularen konfokalen Mikroskops im Laserlabor der Universität ist daher besonders wertvoll. Es unterstützt nicht nur Forschung und Lehre, sondern ermöglicht den Wissenschaftlern oder Studierenden auch, durch Zusammenbau und Fehlersuche ein tieferes Verständnis der Funktionsweise und der technischen Details zu erlangen. Der Selbstbau des Mikroskops spart nicht nur Kosten, sondern ermöglicht auch kontinuierliche Verbesserungen und Anpassungen an die Forschungsanforderungen. Modulare Komponenten vereinfachen Wartung und Reparatur und reduzieren die Abhängigkeit von externen Dienstleistungen. Durch wiederholte Experimente und Messungen wird eine hohe Kopplungseffizienz im Anregungsstrahlengang und ein signifikantes Lichtsignal im Detektionsstrahlengang erreicht. Der Schwerpunkt liegt auf Design und Aufbau, wobei geeignete optische Komponenten ausgewählt und einige Bauteile selbst hergestellt werden.

Für dieses Projekt orientieren wir uns an bereits existierenden, als Open-Source verfügbaren Mikroskopkonzepten, wie dem miCube von Prof. Hohlbein von der Universität Wageningen [2]. MiCube ist ein offenes, modulares Hardware-Framework, teilweise bestehend aus selbst entworfenen Komponenten, die je nach experimentellen Anforderungen selbst hergestellt und ausgetauscht werden können. Dies bietet nicht nur Optimierungsmöglichkeiten, sondern reduziert auch die Kosten, weshalb miCube als Vorlage für diese Arbeit dient.

2 Grundlagen

2.1 Fluoreszenz und Stokes-Verschiebung

In einem konfokalen Mikroskop wird, ähnlich wie bei herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopen, das durch Fluoreszenz erzeugte Licht der Probe zur Bildgebung genutzt. Dies basiert auf dem photophysikalischen Prozess der Fluoreszenz, der durch die Anregung von Molekülen mittels Photonen und der darauffolgenden spontanen Emission von Licht charakterisiert ist. Im vereinfachten Jablonski Diagramm wird dieser Vorgang veranschaulicht [14].

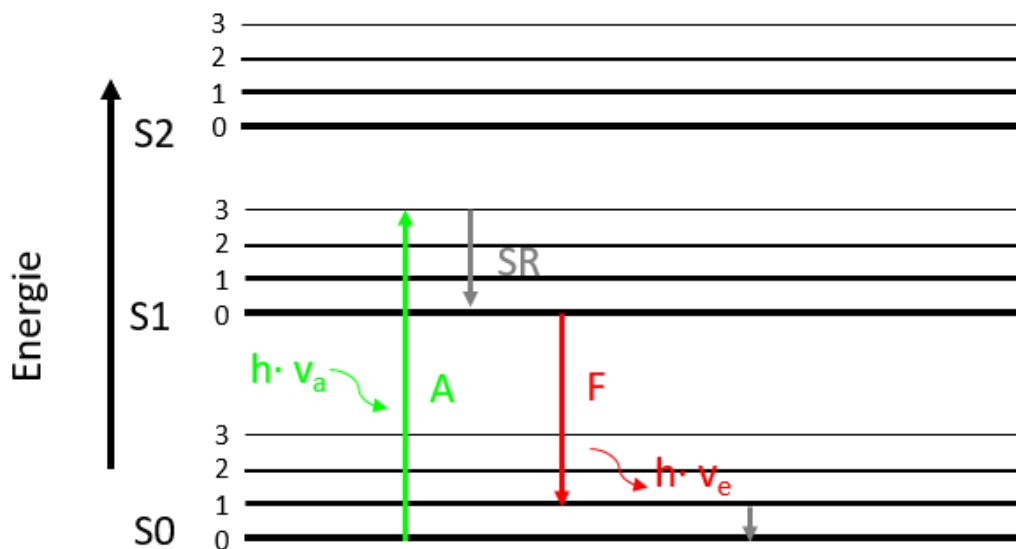


Abbildung 1: Darstellung des Vorgangs der Fluoreszenz im vereinfachten Jablonski Diagramm. (A...Absorption, F ..Fluoreszenz, SR...Schwingungsrelaxation, S...energetische Zustand)

Bei Raumtemperatur befinden sich die Elektronen eines Moleküls im energetischen Grundzustand S_0 . Die Absorption von Photonen bestimmter Energie (E_a) regt diese Elektronen in einen höheren Schwingungszustand des angeregten elektronischen Zustands S_1 , gemäß dem Franck-Condon-Prinzip, das besagt, dass die Elektronenübergänge schneller als die Kernbewegungen stattfinden und somit auf einer vertikalen Linie im Energie-Diagramm erfolgen. Typischerweise folgt darauf eine Schwingungsrelaxation (SR) in den Schwingungsgrundzustand von S_1 , wobei die Energie strahlungslos an die Umgebung abgegeben wird. Liegt der Schwingungsgrundzustand von S_1 energetisch sehr nahe am höchsten Schwingungszustand von S_0 , gehen die Elektronen meist durch interne Konversion (IC)

und Schwingungsrelaxation strahlungslos in den Grundzustand über. Alternativ können die Elektronen auch durch die Abgabe von Photonen mit der Energie E_e in einen Schwingungszustand von S_0 übergehen, wenn der energetische Abstand zwischen S_0 und S_1 groß ist. Die Energie der emittierten Photonen ist stets geringer als die der absorbierten, da ein Teil der Energie durch strahlungslose Übergänge verloren geht. Dies führt dazu, dass die Emissionswellenlänge λ_e länger ist als die Absorptionswellenlänge λ_a . Dieses Phänomen wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet.

$$E_a = h \cdot \nu_a > E_e = h \cdot \nu_e$$

2.2 Prinzip des konfokalen Mikroskops

In konfokalen Mikroskopen wird ein hochauflösendes Bild erzeugt, indem eine Pinhole in den Detektionsstrahlengang eingefügt wird. Dies ermöglicht, nur das Licht zu detektieren, das direkt aus der Fokusebene stammt, wodurch Unschärfe durch Licht aus anderen Ebenen reduziert wird. Konfokale Mikroskope erzeugen ein Bild durch schrittweises Scannen der Probe, sowohl lateral als auch axial. Laterale Scans betreffen die Seitwärtsbewegung der Probe, während axiale Scans Informationen über verschiedene Tiefenebenen liefern. Die Zusammenfassung aller Scan-Ergebnisse ergibt ein vollständiges Bild der Probe [3].

Wie die Abbildung 2 zeigt, wird der Strahl der Fokusebene durch die Objektiv auf die Lochblende (Pinhole) fokussiert und gelangt zum Detektor. Alle Strahlen außerhalb der Fokusebene werden abgeblockt. Zu diesem Zeitpunkt sind der Punkt in der Mitte der Lochblende und der beleuchtete Punkt in der Probe konfokal, d.h. sie befinden sich gleichzeitig im Fokus.

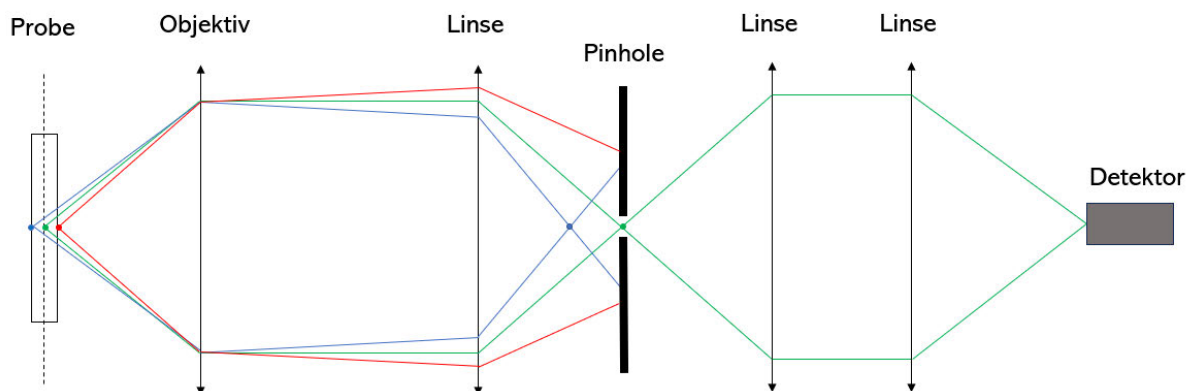


Abbildung 2: Blockierung der Strahlen außerhalb der Brennebene durch eine Lochblende

Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops. Ein Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge wird als Anregungsstrahl durch ein Objektiv auf die Probe fokussiert, die einen Teil dieses Strahls absorbiert und angeregte Fluoreszenzstrahlung erzeugt. Die emittierte Fluoreszenzstrahlung wird wiederum durch das Objektiv gesammelt und als Parallelstrahl weitergeleitet. Ein dichroitischer Spiegel (DC) im Strahlengang reflektiert den Anregungsstrahl und transmittiert die Fluoreszenzstrahlung. Anschließend wird der Strahl durch die Linse erneut fokussiert und mit Hilfe einer Diode gemessen [4].

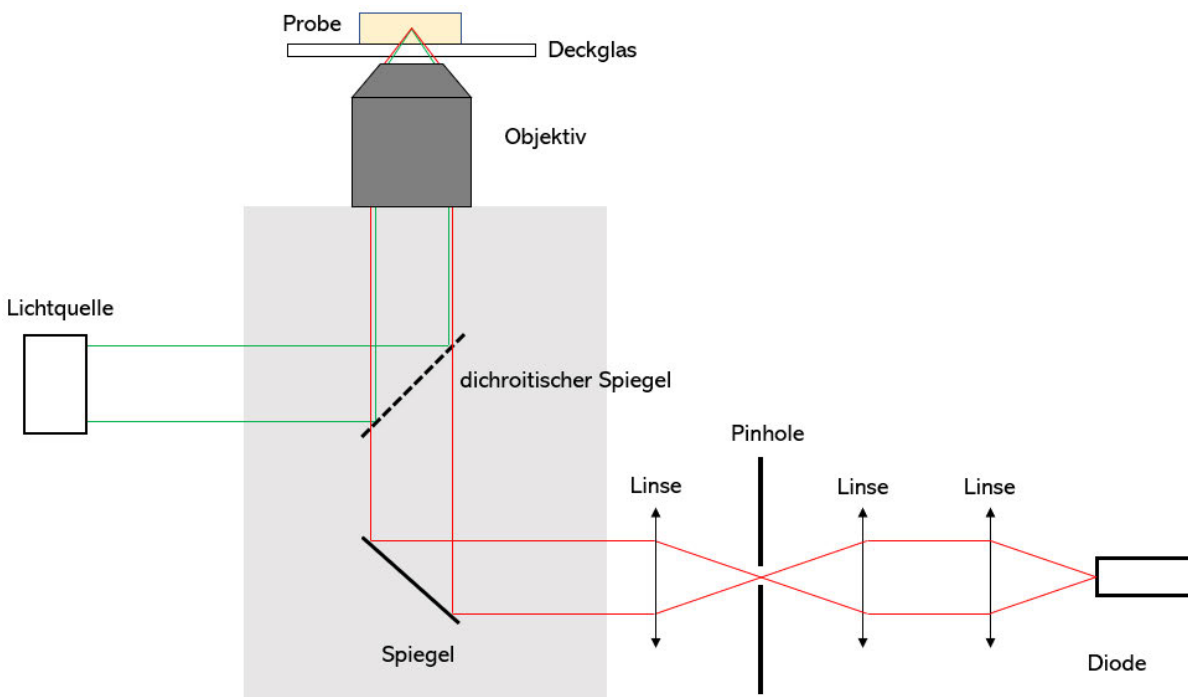


Abbildung 3: Anregungs- und Detektionsstrahlengang in der konfokalen Mikroskopie

Der Hauptvorteil der konfokalen Mikroskopie liegt in der höheren Auflösung der erzeugten Bilder. Sie ermöglicht auch das optische Schneiden der Probe anstelle eines physischen Schnitts, was die Erstellung dreidimensionaler Bilder von komplexen Strukturen erleichtert. Die konfokale Mikroskopie ermöglicht auch die gleichzeitige Aufnahme von Mehrfarben- und Fluoreszenzbildern, so dass verschiedene Arten von Molekülen in ein und derselben Probe untersucht werden können.

Die konfokale Mikroskopie hat aber auch Nachteile. Ein Preis von über 100.000 € ist für sie üblich. Sie ist nicht nur teuer, auch die Wartungskosten und der Bedarf an Bildanalysesoftware stellen eine finanzielle Belastung dar. Außerdem erfordert die Bedienung eines konfokalen Mikroskops eine spezielle Ausbildung und Erfahrung, was die Anwendung erschwert. Die Bilder haben zwar eine höhere Auflösung, sind aber langsam in der Aufnahme und Erstellung.

2.3 $\lambda/2$ -Plättchen

Eine Verzögerungsplatte ist ein optisches Element, das aus einem doppelbrechenden Material besteht. Sie lässt den Strahl durch und ändert seine Polarisation und Phase. Bei einer Phasenverschiebung von 90° spricht man von einer $\lambda/4$ -Plättchen und bei einer Phasenverschiebung von 180° von einer $\lambda/2$ -Plättchen oder Halbwellenplatte. Alle Verzögerungsplatten werden normalerweise mit einer Antireflexionsbeschichtung (engl. *AR-coating*) beschichtet, die auf eine bestimmte Wellenlänge abgestimmt ist [5].

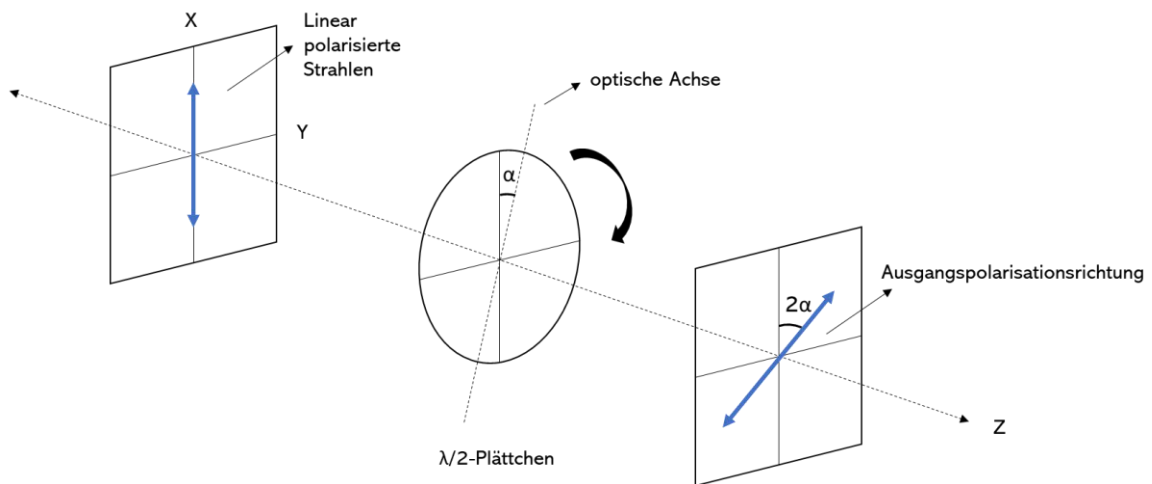


Abbildung 4 : Der Strahl durchläuft das $\lambda/2$ -Plättchen und die Polarisationsrichtung des Strahls wird abgelenkt

Abbildung 4 zeigt ein typisches $\lambda/2$ -Plättchen. In der Mitte befindet sich eine optische Achse. α ist der Winkel zwischen der optischen Achse und der Polarisationsrichtung des einfallenden polarisierten Strahls. $\lambda/2$ -Plättchen dreht die Polarisationsrichtung des linear polarisierten Strahls um einen Winkel von 2α . Bei einem Winkel von $\alpha = 45^\circ$ wird der vertikal polarisierte Strahl in einen horizontal polarisierten Strahl umgewandelt.

2.4 Polarisierende Strahlenteiler

Ein polarisierender Strahlenteiler (engl. *polarizing beam splitter*, kurz PBS) ist eine optische Komponente, die einen Laserstrahl in zwei Strahlen mit unterschiedlichen linearen Polarisationsrichtungen teilt. Der Würfel ist die häufigste Form eines polarisierenden Strahlenteilers.

Der polarisierende Strahlteilerwürfel besteht aus zwei rechtwinkligen Prismen und die Hypotenuse eines der Prismen ist beschichtet. Der einfallende unpolarisierte Strahl wird in einen reflektierten s-polarisierten Strahl (die Polarisationsrichtung des Strahls ist senkrecht

zur Einfallsebene) und einen transmittierten p-polarisierten Strahl (die Polarisationsrichtung des Strahls ist parallel zur Einfallsebene) aufgeteilt. Das Verhältnis der beiden Strahlen ist 50:50 [6].

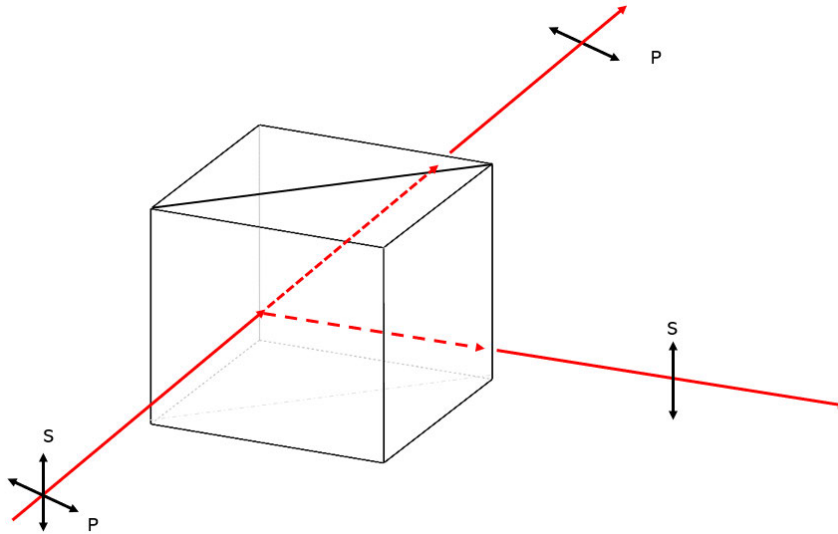


Abbildung 5 : Der Strahlteilerwürfel teilt den einfallenden unpolarisierten Strahl in einen reflektierten s-polarisierten Strahl und einen transmittierten p-polarisierten Strahl

2.5 Strahlversatzoptik (Planplatte)

Die Strahlversatzoptik (Planplatte) besteht aus einem durchsichtigen Material. Wenn Strahl auf eine planparallele Platte trifft, wird es an den beiden Grenzflächen gebrochen. Wie in Abbildung 6 gezeigt, wird der Strahl parallel verschoben.

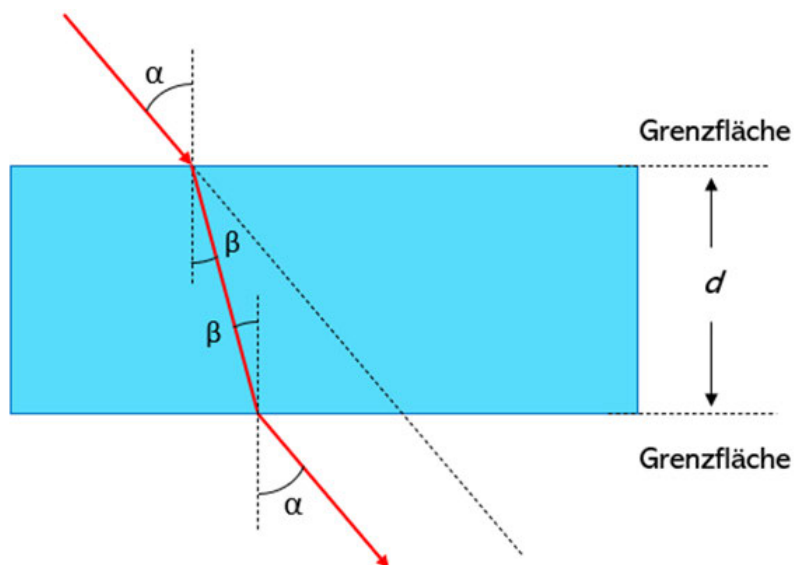


Abbildung 6 : Schematische Darstellung der Strahlversetzung durch eine planparallele Glasplatte

Die Größe der Parallelverschiebung hängt vom Einfallswinkel α , von der Dicke der Platte d und vom Brechungsindex des Materials ab, aus dem sie besteht. Im Strahlengang kann die Platte verwendet werden, um die durch andere optische Komponenten erzeugte Strahlverschiebung auszugleichen [20].

2.6 Lichtwellenleiter (LWL)

Ein Glasfaserkabel ist ein Lichtwellenleiter (LWL), der aus sehr dünnen Glasfasern besteht. Lichtsignale transportieren Daten auf Glasfaser über große Entfernungen mit Lichtgeschwindigkeit nahezu verlustfrei. Der Aufbau des Glasfaserkabels besteht aus vier Schichten: Kern (Core), Mantel (Cladding), Schutzbeschichtung (Coating) und Außenmantel (Jacket).

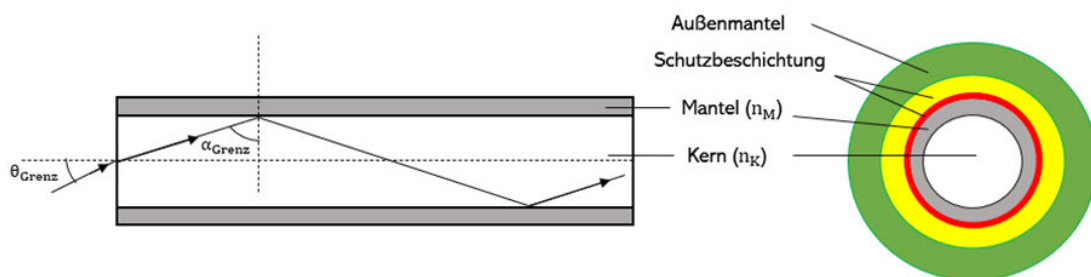


Abbildung 7 : links: Totalreflexion an der Grenzflächen zwischen dem Mantel und dem Kern; rechts: Der Aufbau eines Glasfaserkabels aus verschiedenen Schichten

Der Kern besteht aus Quarzglas und transmittiert das Lichtsignal. Er ist von einem Mantel umgeben. Der Mantel besteht ebenfalls aus Quarzglas und begrenzt die Ausbreitung der Lichtwellen. Sobald das Lichtsignal an die Grenze des Mantels tritt, wird es zurück in den Kern reflektiert (Totalreflexion). Deshalb ist der Brechungsindex des Kerns größer als der des Mantels ($n_K > n_M$).

Die Schutzschicht hat zwei Teile: Primär-Schutzbeschichtung und Sekundär-Schutzbeschichtung. Die Primär-Schutzbeschichtung besteht aus Kunststoff zum Schutz vor mechanischer Beschädigung und Feuchtigkeit. Die Sekundär-Schutzbeschichtung bietet weiteren Schutz gegen Druck und Spannung von außen. Die äußerste Schicht ist der Außenmantel. Er bietet Schutz gegen Flammen und Chemikalien [7].

2.6.1 Singlemode-Fasern

Singlemode-Fasern sind ein Typ von Glasfasern. Ihr Durchmesser beträgt nur ein paar Mikrometer. Aufgrund des sehr kleinen Kerndurchmessers übertragen Singlemode-Fasern nur

eine einzelne Mode des eingekoppelten Strahls, d.h. das Lichtsignal breitet sich geradlinig aus [8].



Abbildung 8 : Lichtausbreitung im Glasfaserkabel

2.6.2 Polarisationserhaltende Fasern

Polarisationserhaltende (engl. *polarization maintaining*, kurz PM) Fasern sind eine spezielle Art von Singlemode-Fasern. Sie behalten den Polarisationszustand des eingekoppelten Lichts während der Übertragung. Solche Lichtwellenleiter werden unter anderem in Biomedizin und Spektroskopie eingesetzt.

Bei der Herstellung von PM-Fasern werden zwei zusätzliche Stresszonen hinzu-gefügt. Diese Konstruktion erzeugt Doppelbrechung in der Glasfaser. Durch die Doppelbrechung entstehen in der Faser zwei Hauptübertragungsachsen, die sogenannte schnelle und die langsame Achse der Faser.

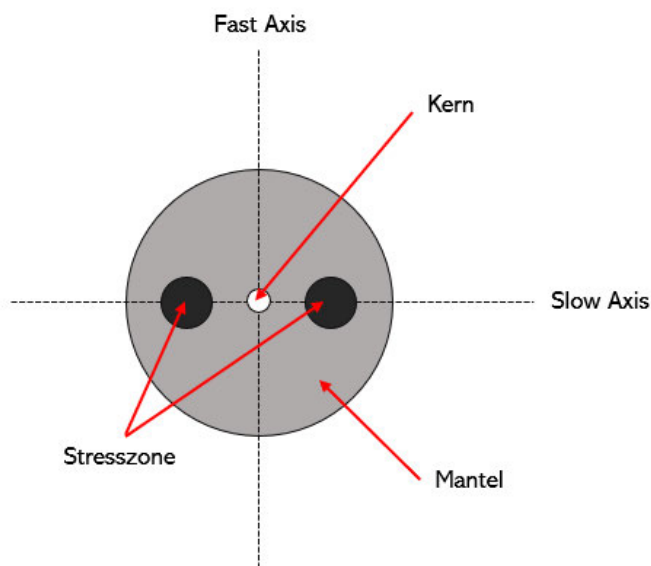


Abbildung 9 : Schematische Darstellung des Aufbaus einer polarisationserhaltenden Fasern

Die schnelle Achse (fast axis) läuft senkrecht durch den Mittelpunkt der Verbindungslinie zwischen den Mittelpunkten der beiden Stresszonen. Die langsame Achse (slow axis) läuft dagegen direkt durch die beiden Spannungszonen. Der Brechungsindex auf der schnellen

Achse ist kleiner als die langsame Achse. Der Anteil des Lichtes, der in Richtung der schnellen Achse eingekoppelt wird, wird bevorzugt weitergeleitet [9].

2.7 Faserkoppler

Zur präzisen Einkopplung des Laserstrahls in das Faserkabel ist ein Faserkoppler eine sehr wichtige optische Komponente. Es besteht in der Regel aus einer Reihe von Linsen oder anderen optischen Komponenten, die einen Laserstrahl auf eine sehr dünne Glasfaser fokussieren. An der Außenseite befinden sich Flansche zur Befestigung und Schrauben zur Justierung. Mit Hilfe dieser Schrauben kann die Position des Laserstrahls optimiert werden, um eine maximale Kopplungseffizienz zu erreichen.

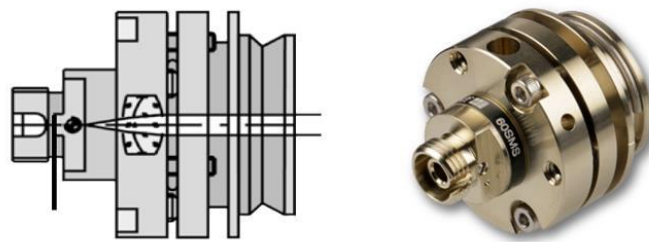


Abbildung 10 : Faserkoppler 60SMS [12]

2.8 Objektive

In jedem Fall ist das Objektiv die wichtigste Komponente eines konfokalen Mikroskops. Es sammelt die von der Probe kommenden Lichtstrahlen und fokussiert sie auf den Detektor. In konfokalen Mikroskopsystemen werden häufig hochauflösende Objektive verwendet, um eine genaue Abbildung der Probe zu ermöglichen und die Auflösung zu verbessern. In der Praxis können wir verschiedene Objektive austauschen, um unterschiedlichen experimentellen Anforderungen zu entsprechen.

Ein Beispiel für ein solches hochauflösendes Objektiv ist das Nikon CFI Plan Apochromat Lambda 100x Objektiv mit der Katalognummer MRD01905. Mit NA von 1.45 bietet dieses Objektiv eine ausgezeichnete Auflösung und sorgt für klare, kontrastreiche Bilder. Die hohe Vergrößerung von 100x ermöglicht eine detaillierte Betrachtung der Probe, während die Ölimmersionstechnik die Bildqualität weiter verbessert.



Abbildung 11 : NIKON CFI PLAN APO 100X LAMBDA OBJECTIVE [15]

2.9 Pinhole

Das Pinhole, auch Lochblende genannt, ist ein entscheidendes Element in einem konfokalen Mikroskop. Es handelt sich um eine kleine, präzise geformte Öffnung im Strahlengang des Mikroskops. Wie in Kapitel 2.1 erläutert, blockieren Pinholes alle Strahlen außerhalb der Fokusebene, um ein scharfes Bild zu erzeugen.



Abbildung 12 : Pinhole [16]

Die Größe des Pinholes ist entscheidend für die Bildqualität. Ein kleineres Pinhole verbessert die räumliche Auflösung, kann aber die Helligkeit des Bildes verringern. Ein größeres Pinhole hingegen lässt mehr Licht durch, was zu helleren Bildern führt, aber auf Kosten der Auflösung geht. Daher muss ein Gleichgewicht zwischen der Größe des Pinholes und den spezifischen Anforderungen der jeweiligen Anwendung gefunden werden [16].

2.10 Single Photon Avalanche Diode

Konfokale Mikroskope setzen häufig Dioden als Detektoren ein, und dabei stellt die Single Photon Avalanche Diode (SPAD) eine besonders herausragende Wahl dar. Die SPAD ist ein hochempfindlicher Photodetektor, der sich durch seine einzigartige Fähigkeit auszeichnet, einzelne Photonen zu detektieren. Beim Auftreffen eines Photons auf die SPAD wird ein Lawineneffekt ausgelöst, der ein deutlich messbares elektrisches Signal erzeugt. Diese Diode zeichnet sich außerdem durch eine extrem kurze Ansprechzeit aus, die typischerweise im Pikosekundenbereich liegt, was eine sehr hohe zeitliche Auflösung ermöglicht [17].

Aufgrund der hohen Kosten von SPADs müssen die Betriebsbedingungen bei der Verwendung von SPADs sorgfältig kontrolliert werden, um Schäden an dieser empfindlichen Komponente zu vermeiden.



Abbildung 13 : Single Photon Avalanche Diode [17]

3 Methoden

Der vollständige Strahlengang des konfokalen Mikroskops setzt sich aus drei Teilen zusammen: dem Anregungsstrahlengang, dem Hauptkorpus und dem Detektionsstrahlengang. In den folgenden Abschnitten wird ein detaillierter Überblick über die Designkonzepte und die technische Umsetzung jedes Segments gegeben.

3.1 Anregungsstrahlengang

Der Anregungsstrahlengang basiert auf dem Entwurf von Herrn Hannes Michaelson. In seinem Bericht über das Forschungs- und Entwicklungsmodul wurden die Designkonzepte für den Aufbau des Anregungsstrahlenganges vorgestellt. Basierend auf seinem Entwurf wurden einige Änderungen vorgenommen, um diesen an die spezifischen Bedingungen des Labors anzupassen.

3.1.1 Entwurf des Anregungsstrahlengangs

Der Zweck des Entwurfs des Anregungsstrahlengangs besteht darin, Laser verschiedener Wellenlängen in eine gemeinsame Faser zu koppeln, um die benötigte Anregungslichtquelle für verschiedene Proben bereitzustellen. Es ist geplant, so wenig optische Komponenten wie möglich zu verwenden und den gesamten Strahlengang so klein wie möglich zu bauen. Dies wird die Kosten des Projekts senken und die Justierung der Faserkopplung erleichtern.

Das erste zu lösende Problem ist die Aufteilung des Laserstrahls. Ein Laserstrahl soll in zwei Teile geteilt werden: einer für die Anregung des konfokalen Mikroskops und der andere für das bereits gebaute Totalreflexionsfluoreszenzmikroskop (engl. total internal reflection fluorescence microscope, kurz TIRFM). Das TIRFM benötigt einen vertikal polarisierten Strahl, und die verwendeten Glasfasern sind polarisationserhaltende Singlemode-Fasern, d. h., die Polarisation des Strahls muss erhalten bleiben, während er aufgeteilt wird. Ein PBS kann diese Anforderungen erfüllen. Es teilt das einfallende Licht in einen reflektierten, vertikal polarisierten Strahl und einen transmittierten, horizontal polarisierten Strahl. Das Verhältnis von reflektierten zu transmittierten Strahlen beträgt nahezu 50:50, so dass beide Mikroskope gleichzeitig einen Laser mit ausreichender Leistung erhalten können.

Da der Laser einen horizontal polarisierten Strahl abgibt, wurde ein $\lambda/2$ -Plättchen am Ausgang des Lasers hinzugefügt. Der Strahl durchläuft die Halbwellenplatte und wird in einem Winkel von 45° zur Horizontalen polarisiert. Anschließend wird der Laser über die Reflexion

der beiden Spiegel in den Koppler gelenkt. Die Spiegel sind auch für die spätere Justierung der Laserkopplung von großer Bedeutung.

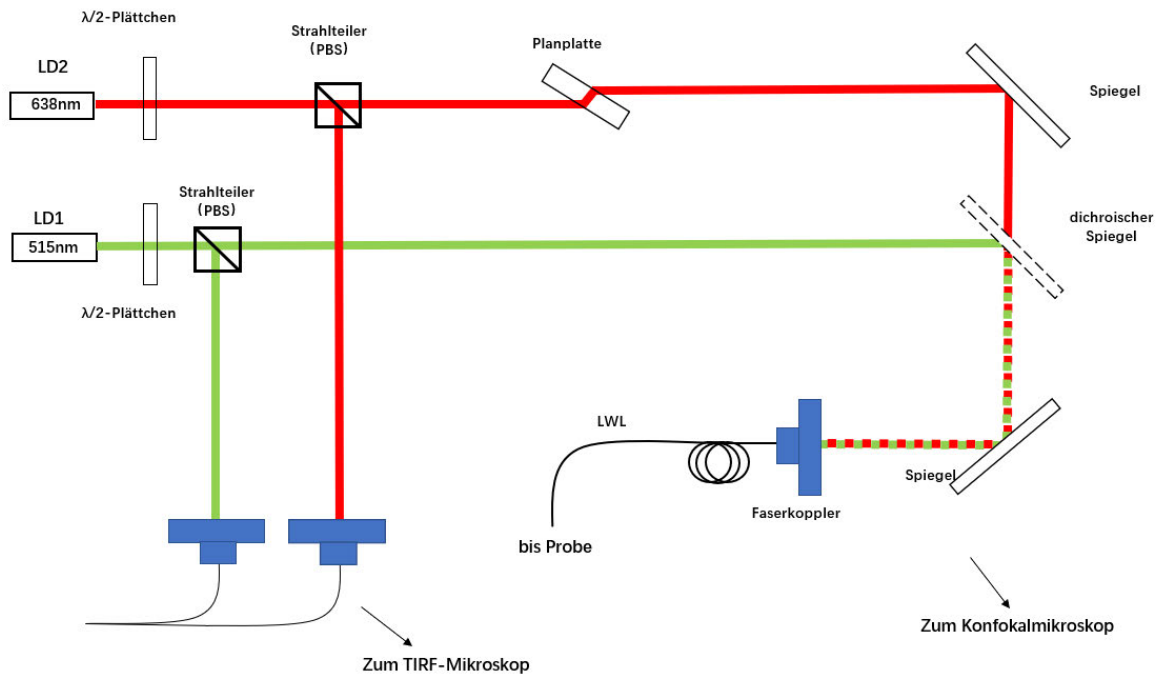


Abbildung 14 : Schematische Darstellung des Anregungsstrahlengangs

Es gibt zwei Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen, die zum Testen verschiedener Proben verwendet werden können. Das zweite zu lösende Problem ist, die beiden Laserstrahlen mit unterschiedlichen Wellenlängen zu kombinieren und in einen Faserkoppler einzukoppeln. Hier wird versucht, dieses Ziel mit einem dichroitischen Spiegel zu erreichen. Der dichroitische Spiegel kann einen Laserstrahl von 638 nm durchlassen und einen Laserstrahl von 515 nm reflektieren. Durch Verstellen des ersten Spiegels können die beiden Laserstrahlen zusammenfallen. Da der Laser, der den dichroitischen Spiegel durchläuft, selbst eine kleine optische Verschiebung erzeugt, wird eine Planplatte in den Strahlengang des ersten Lasers eingesetzt, um dieser Verschiebung auszugleichen.

Am Ende werden die beiden Laser über einen Faserkoppler in eine polarisationserhaltende Singlemode-Faser eingekoppelt und gelangen so in den Hauptkörper des konfokalen Mikroskops, um die Proben zu beleuchten.

3.1.2 Aufbau des Anregungsstrahlengangs

Beim Aufbau des Strahlengangs ist darauf besonders zu achten, dass der Laserstrahl immer horizontal zum optischen Tisch verläuft. Um die Justierung vorzunehmen, wurden zwei Blenden mit der gleichen Höhe wie der Laserausgang verwendet. Durch die Platzierung der

Blende vor und hinter jeder optischen Komponente und die Einstellung der Höhe der Komponenten befinden sich alle Komponenten in der richtigen Position. Mit Hilfe des Einstellknopfes des Spiegels wird der Laserstrahl im Faserkoppler zentriert. Der Laserstrahl soll auch möglichst zentral zu allen anderen optischen Komponenten stehen.

3.1.2.1 Laserdiode

Als Lichtquellen werden zwei Diodenlaser der Firma Oxxius mit den Wellenlängen 515 nm und 638 nm verwendet. Diese Laser zeichnen sich durch gute Strahleigenschaften aus und sind über eine RS232-Schnittstelle bis in den Nanosekunden-Bereich digital modulierbar. Die Einstellung der Laserleistung, die im Bereich von 1 mW bis 150 mW variierbar ist, kann entweder über einen Analog-Schalter mit Potentiometer beim Einschalten oder über einen BNC-Analogeingang auf der Rückseite des Steuerkastens beim Ausschalten vorgenommen werden [18].

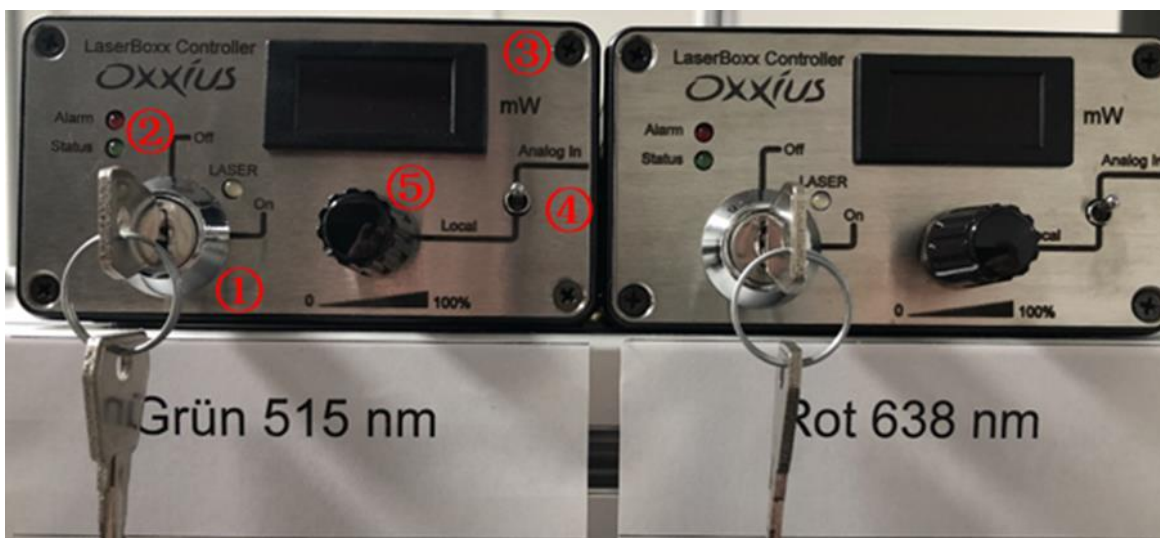


Abbildung 15 : Steuerkasten für die Laserdioden. ① Hauptschlüsselschalter ② Emission- und Alarmanzeiger ③ Leistungsanzeiger ④ Analog-Schalter ⑤ Lokale Potentiometer

3.1.2.2 Fasereinkopplung und Justierung

Um die höchstmögliche Kopplungseffizienz zu erreichen, müssen die folgenden Bedingungen erfüllt werden [11] :

- Der Laser und die Faser befinden sich auf der gleichen Achse
- Gaußsches räumliche Intensitätsprofil
- Strahltaile in der Ebene der Faserendfläche
- Strahltaile zentriert auf den Kern der Faser

- Der Durchmesser der Strahltaile ist gleich dem Modenfelddurchmesser (MFD) der Faser

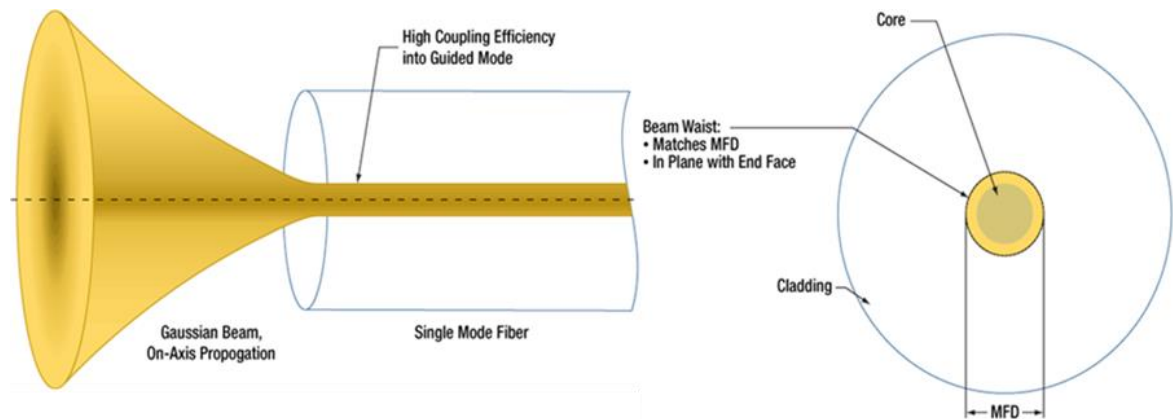


Abbildung 16 : Ideale Einkopplung von Singlemode-Fasern [11]

Die ideale Situation für eine Fasereinkopplung ist in der Abbildung 16 dargestellt. Wenn alle Bedingungen erfüllt sind, kann theoretisch eine Kopplungseffizienz von 90 % erreicht werden.

Nachdem der Lichtwellenleiter erfolgreich an den Koppler gekoppelt worden ist, kann die Kopplungseffizienz weiter verbessert werden, mit Hilfe der Einstellung des Faserkopplers. Der Faserkoppler hat insgesamt drei Kopfschrauben, drei Stiftschrauben und ein Justierloch. Die Kopfschrauben dienen zur groben Anpassung der Neigung. Die Stiftschrauben dienen zur feinen Anpassung der Neigung. Das Justierloch wird verwendet, um die Position der Linsen im Koppler auf der z-Achse zu justieren, d.h. um die Position des Brennpunkts anzupassen [12]. Die genauen Schritte und Abläufe der Justierung sind im Anhang B aufgeführt.

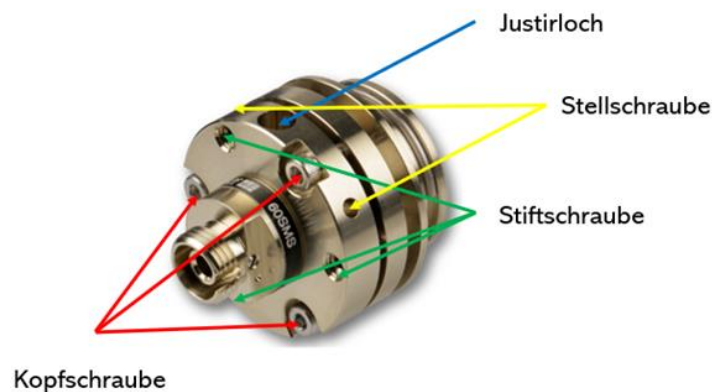


Abbildung 17 : Faserkoppler [12]

3.1.2.3 Berechnung der Kopplungseffizienz von LWL

Modenfelddurchmesser (MFD) ist ein wichtiger Parameter für die Kopplung von Singlemode-Fasern. Das Licht breitet sich nicht als Strahl durch den LWL-Kern aus, der einen punktförmigen Querschnitt hat, sondern als Mode mit endlichem Durchmesser. Ein Singlemode-Lichtwellenleiter unterstützt nur einen Leitungsmodus. Gemäß der wellenoptischen Analyse kann dieser Modus durch eine Besselfunktion beschrieben werden. Die Amplitudenprofile der Gauß - und der Besselfunktion sind sehr ähnlich, so dass die Verwendung der Gaußfunktion die Faserzeichnung vereinfachen kann und dennoch genaue Ergebnisse liefert [13]. Die Feldverteilung über den Querschnitt kann durch eine Gaußfunktion angenähert werden.

Die Breite der gaußförmigen Mode wird durch den Modenfelddurchmesser charakterisiert. Er ist der Abstand zwischen den Punkten, bei denen die Feldverteilung auf den Wert $1/e \approx 37\%$ abgefallen ist. Der Modenfelddurchmesser entspricht einem Intensitätsabfall bezüglich des Maximalwertes auf $1/e^2 \approx 13,5\%$. Abbildung 18 zeigt schematisch die Fokussierung eines Laserstrahls auf eine Singlemode-Faser [10].

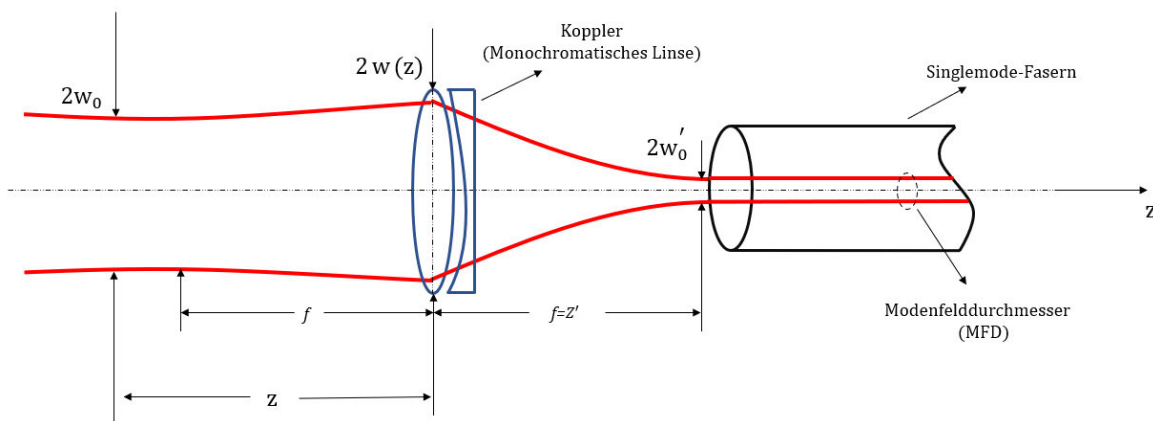


Abbildung 18 : Fokussierung eines Laserstrahls auf eine Singlemode-Faser

Der Strahlenradius vor dem Glasfaserkoppler ist mit dem Abstand z in Z-Achse dann:

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{\lambda z}{\pi w_0^2} \right)^2}$$

Die Gleichung zur Berechnung der neuen fokussierten Strahltaile hinter der Linse $2w'_0$ folgt :

$$w'_0 = \frac{\lambda f}{\pi w(z)}$$

mit der Strahltaile $2w'_0$, der Brennweite f , dem Strahlradius $w(z)$ und der Wellenlänge λ . MFD ist gleich $2w'_0$.

Die Gleichung zur Berechnung der Kopplungseffizienz η folgt :

$$\eta = \frac{P_2}{P_1} \times 100\%$$

mit Leistung vor der Fasereinkopplung P_1 , Leistung nach der Fasereinkopplung P_2 .

3.1.2.4 Abschirmung des Anregungsstrahlengangs

In alltäglichen optischen Experimenten werden optische Abschirmungen vornehmlich zum Schutz vor Umgebungslicht und zur Bewahrung optischer Komponenten eingesetzt. Sie isolieren den Experimentierbereich effektiv und schützen die optischen Elemente vor Umwelteinflüssen wie Staub, was entscheidend für die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der experimentellen Daten ist.

Für den Anregungsstrahlengang ist der Einsatz von optischen Abschirmungen hauptsächlich dazu da, die Stabilität und Genauigkeit des Anregungsstrahls zu gewährleisten. Diese Vorrichtungen schützen effektiv vor Störungen durch externe Lichtquellen und stellen sicher, dass der Anregungsstrahl nicht durch äußere Einflüsse beeinträchtigt wird. Sie helfen auch, die Streuung des Anregungsstrahls in die Umgebung zu verhindern, was sowohl für die Sicherheit im Labor als auch für die Genauigkeit der experimentellen Daten sehr wichtig ist.

Der entworfene Abschirmkasten besteht aus zwei Teilen: der Abschirmwand und dem Deckel. In der Abschirmwand sind entsprechend den Anforderungen Öffnungen für die Stromversorgung des Lasers und für den Ausgang der Glasfaserkabel vorgesehen, während die restlichen Teile komplett abgedichtet sind. Der Abschirmkasten wird mit einer selbst konstruierten Befestigung am optischen Tisch befestigt.



Abbildung 19: Abschirmkasten für den Anregungsstrahlengang

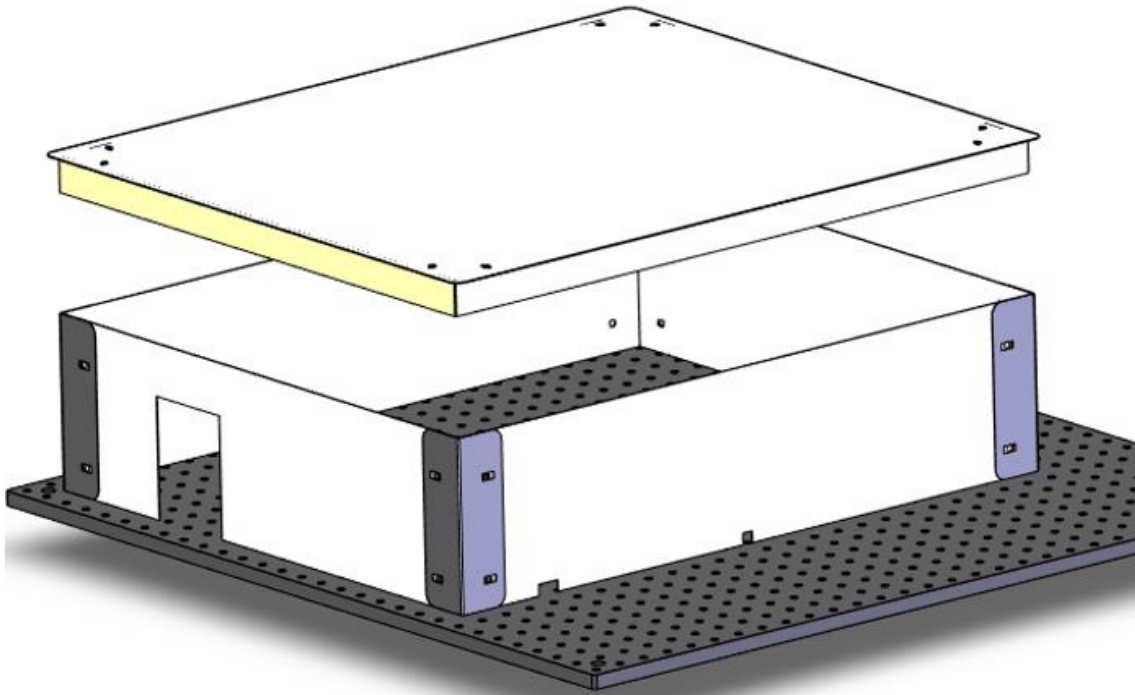


Abbildung 20 : CAD-simulierter Abschirmkasten für den Anregungsstrahlengang

3.2 Detektionsstrahlengang

Im Vergleich zum Anregungsstrahlengang ist der Detektionsstrahlengang komplexer. Es muss nicht nur die Stabilität des Gesamtsystems gewährleistet sein, sondern auch sichergestellt werden, dass der zu detektierende Strahl genau durch das Pinhole verläuft und sich im Zentrum aller Linsen befindet.

3.2.1 Entwurf des Detektionsstrahlengangs

Der Zweck des Detektionsstrahlengangs ist es, den von der Hauptkorpus des Mikroskops emittierten Fluoreszenzstrahl einzufangen und diesen durch verschiedene optische Komponenten erfolgreich zum Detektor zu leiten. Es muss sichergestellt sein, dass nur der Strahl aus der Fokusebene der Probe erfasst wird.

Um die Stabilität von Linsen und Pinhole zu gewährleisten, wird ein Cage-System eingesetzt. Das System ist speziell für die genaue Justierung und Positionierung optischer Komponenten konzipiert, was die Präzision optischer Experimente und Anwendungen sicherstellt. Es besteht üblicherweise aus Montagegestangen und Verbindungsplatten, um einen dreidimensionalen Rahmen zu bilden. Innerhalb dieses Rahmens können verschiedene

optische Komponenten installiert werden. Das Cage-System bietet große Flexibilität und Erweiterbarkeit, sodass Benutzer Komponenten leicht hinzufügen oder austauschen können. Zugleich zeichnet sich das System durch eine robuste Konstruktion aus, die effektiv gegen Vibrationen und andere externe Störungen schützt und somit die Stabilität der Experimente sichert. Ein Nachteil ist jedoch der hohe Preis, und auch die Wartung und Justierung des Systems kann vergleichsweise komplexer und zeitaufwendiger sein.

Innerhalb des Cage-Systems sind zwei Linsen und eine Pinhole installiert. Die erste Linse konzentriert den erzeugten Fluoreszenzstrahl auf die Mitte der Pinhole. Die zweite Linse transformiert anschließend den durch die Pinhole-Blende hindurchgegangenen Strahl (aus der Fokusebene kommend) wieder in einen parallelen Strahl. Beide Linsen haben die gleiche Brennweite von 100 mm, wodurch eine 1:1 Abbildung der Probe erreicht wird. Linse und Pinhole sind in XY-Translationshalterungen innerhalb des Cage-Systems montiert, die eine Justierung von ± 1 mm in Richtungen senkrecht zur optischen Achse des Systems (X- und Y-Achse) ermöglichen.

Um die Fluoreszenzstrahlen zu messen, die durch Anregung der Probe mit Lasern unterschiedlicher Wellenlängen erzeugt werden, wird im Detektionsstrahlengang auch ein Kurzpass-Strahlenteiler eingesetzt. Dieser lässt kurzwellige Fluoreszenzstrahlung passieren und reflektiert langwellige Fluoreszenzstrahlung. Anschließend wird die Fluoreszenzstrahlung durch eine Sammellinse erneut fokussiert, bevor sie schließlich mit einem Einzelphotonen-Avalanche-Diodendetektor (SPAD) detektiert wird [4].

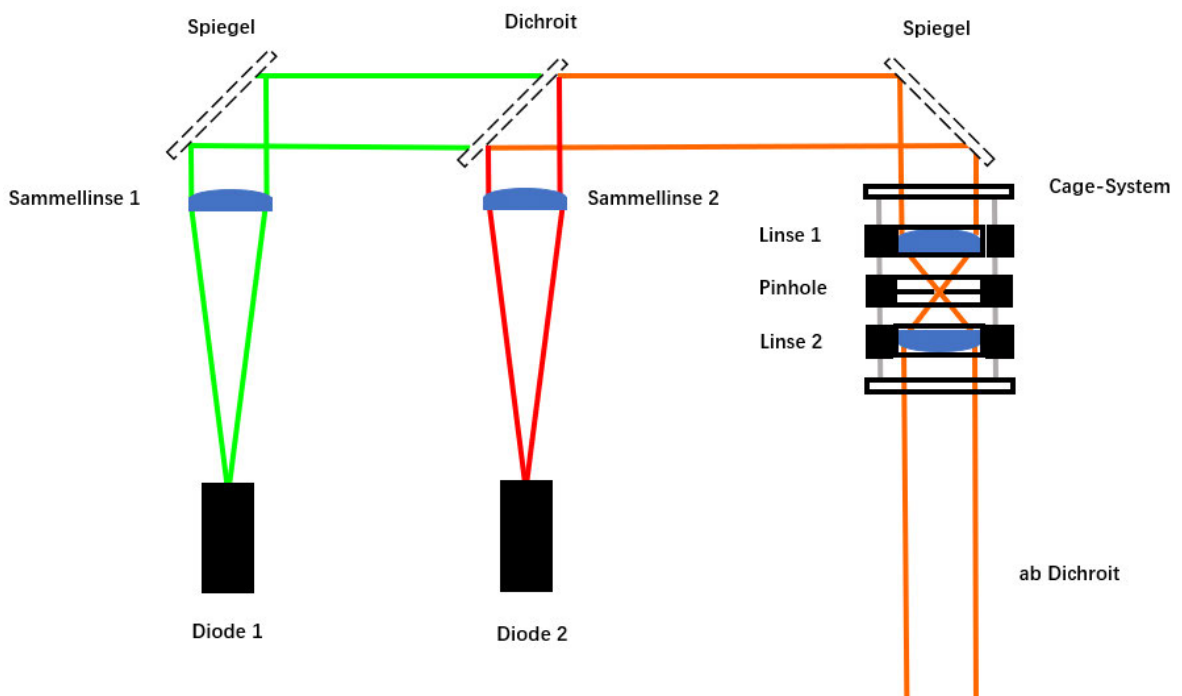


Abbildung 21 : Schematische Darstellung des Detektionsstrahlengangs

3.2.2 Konstruktion des Detektionsstrahlengangs

Bei der Konstruktion des Detektionsstrahlengangs wurde das gesamte System mit SolidWorks simuliert. Dies ermöglichte nicht nur eine realitätsnahe Nachbildung der Einbaubedingungen, sondern unterstützte auch die Auswahl geeigneter optischer Komponenten. Diese Vorgehensweise ermöglichte auch eine genaue Bestimmung der Abmessungen des gesamten Detektionsstrahlengangs. Dies war sowohl für den Aufbau des Strahlengangs als auch für das Design der Abschirmung sehr hilfreich.

Zusätzlich erlaubte die Simulation eine visuelle Überprüfung der Strahlweginterferenzen und potenzieller Reflexionspunkte, was entscheidend für die Minimierung von Signalstörungen war. Darüber hinaus erleichterte die genaue Modellierung in SolidWorks die Auswahl und Integration von käuflich erwerbbarer optischer Komponenten. Insgesamt führte dieser umfassende Simulationsansatz zu einer effizienteren Gestaltung und einem reibungsloseren Aufbau des gesamten Detektionssystems.

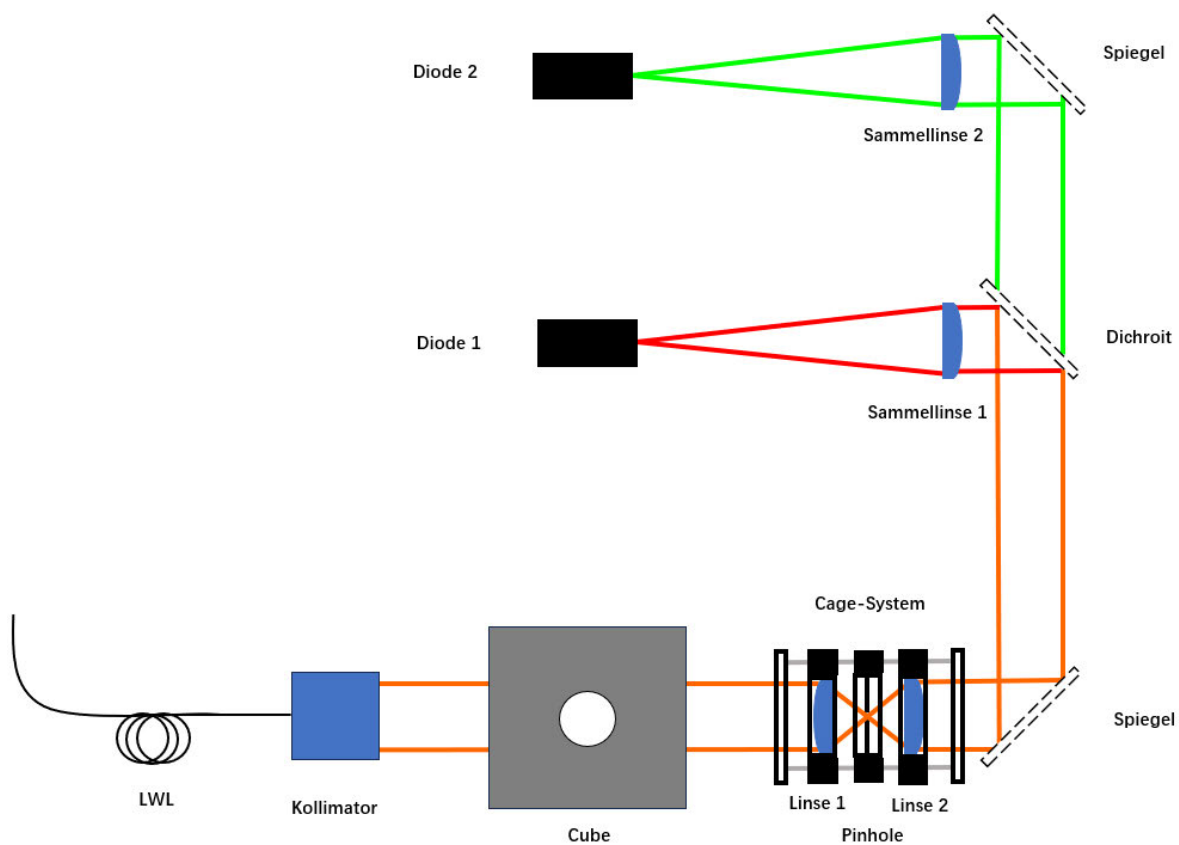


Abbildung 22 : Schematische Darstellung des Detektionsstrahlengangs mit Cube.

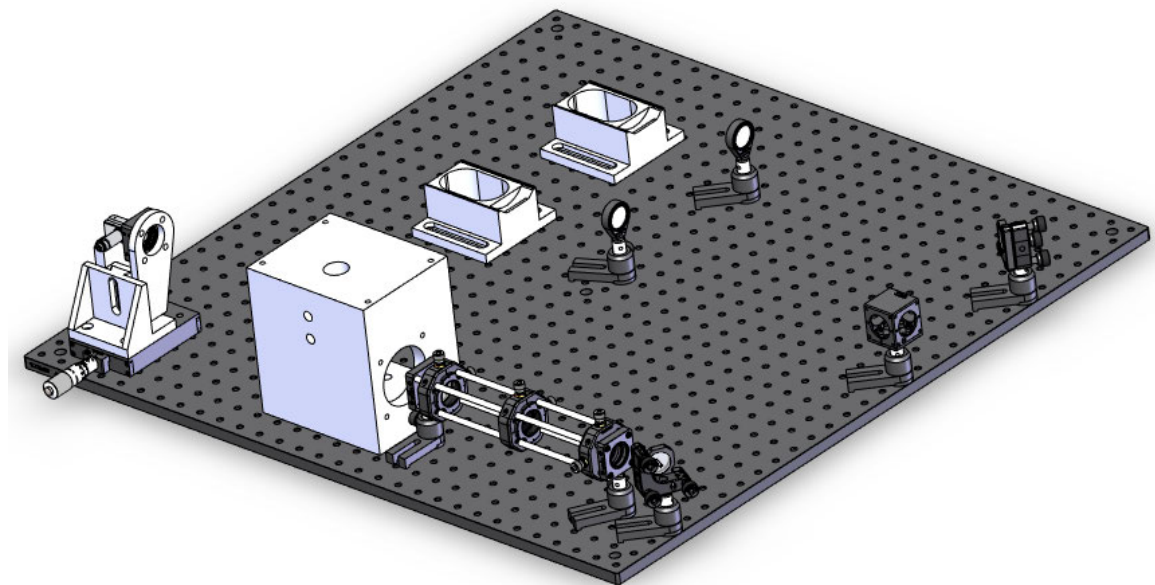
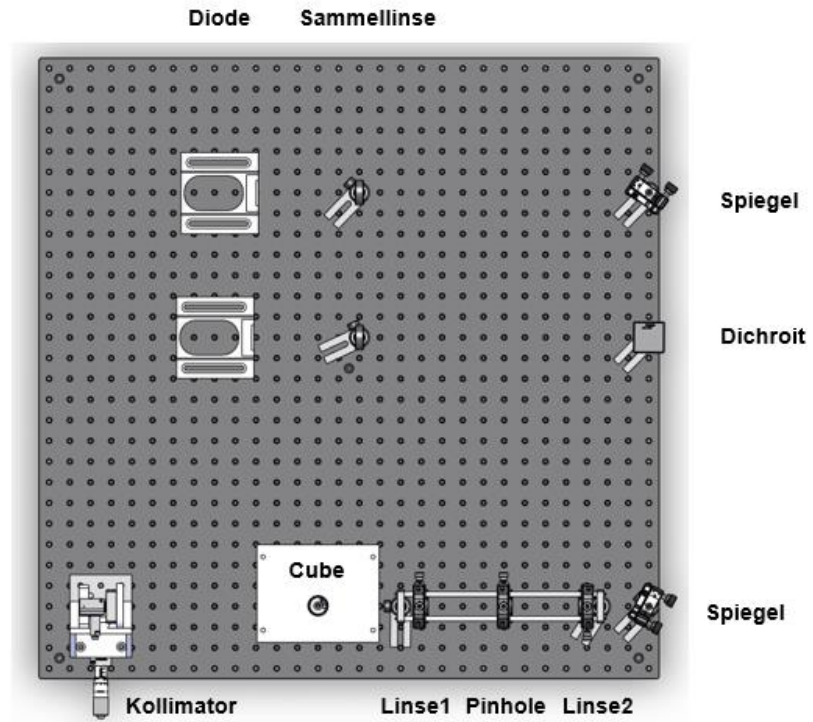


Abbildung 23 : Mit CAD simulierter Detektionsstrahlengang.

3.2.3 Aufbau des Detektionsstrahlengangs

Die Justierung des Detektionsstrahlengangs ist grundsätzlich ähnlich wie beim Anregungsstrahlengang. Zwei Blenden werden so positioniert, dass ihre Mittelpunkte auf gleicher Höhe mit dem Laserstrahl liegen, um sicherzustellen, dass alle optischen Komponenten richtig positioniert sind.

Besonders wichtig ist die Justierung der Positionen der optischen Komponenten im Cage-System. Zunächst werden alle optischen Komponenten im Cage-System platziert und grob ausgerichtet. Dann wird sichergestellt, dass der durch Anregung erzeugte Laserstrahl korrekt in das System eingeführt und ausgerichtet wird, sodass der Strahl entlang des vorgesehenen Strahlengangs verläuft. Sobald alle Komponenten korrekt ausgerichtet sind und der Strahlengang den Anforderungen entspricht, werden alle optischen Komponenten fixiert, um ihre Position während des späteren Betriebs zu sichern.

Aufgrund der Größe des verwendeten Pinholes von nur 50 Mikrometern sind mehrere Feinjustierungen mit den Knöpfen der XY-Translationshalterungen erforderlich, bis ein klares, helles und rundes Bild hinter dem Pinhole entsteht.

3.2.3.1 Abschirmung des Detektionsstrahlengangs

Da die im Detektionsstrahlengang schließlich detektierten Signale sehr schwach sind, kann Störlicht leicht zu ungenauen Daten oder Signalverlust führen. Daher ist die Abdichtung des Strahlengangs für den Detektionsstrahlengang von entscheidender Wichtigkeit. Die Abschirmung des Detektionsstrahlengangs ähnelt der des Anregungsstrahlengangs und besteht aus einer Abschirmwand und einem Deckel. Der Unterschied besteht darin, dass einige Abschirmwände entsprechend den Anforderungen speziell konstruiert sind.

Zunächst wurden über den Einstellknöpfen der X- und Y-Achse des Pinholes jeweils ein Loch gebohrt, um unter Beibehaltung eines abgedichteten Strahlengangs mithilfe eines 2mm Innensechskantschlüssels eine präzise Justierung der Position des Pinholes zu ermöglichen.

Auf der Diode-Seite der Abschirmwand wurde ein Loch zur Montage der Halterung der Sammellinse gebohrt. Diese Halterung ist ebenfalls eine XY Translationshalterung, die durch manuelles Drehen der Knöpfe eine genaue Positionierung des Strahls im Zentrum der Linse ermöglicht. Da die optische Abschirmung aus 1 mm dickem, eloxiertem Aluminium besteht, wurde in der Mitte der Abschirmwand eine zusätzliche Befestigung angebracht, um die Stabilität zu erhöhen.

Zwischen der Sammellinse und dem Einzelphotonen-Avalanche-Diodendetektor (SPAD) wird ein undurchsichtiges Aluminiumrohr eingefügt, und die Verbindungsstellen werden mit Moosgummiklebeband abgedichtet, um den Strahlengang vollständig abzudichten.

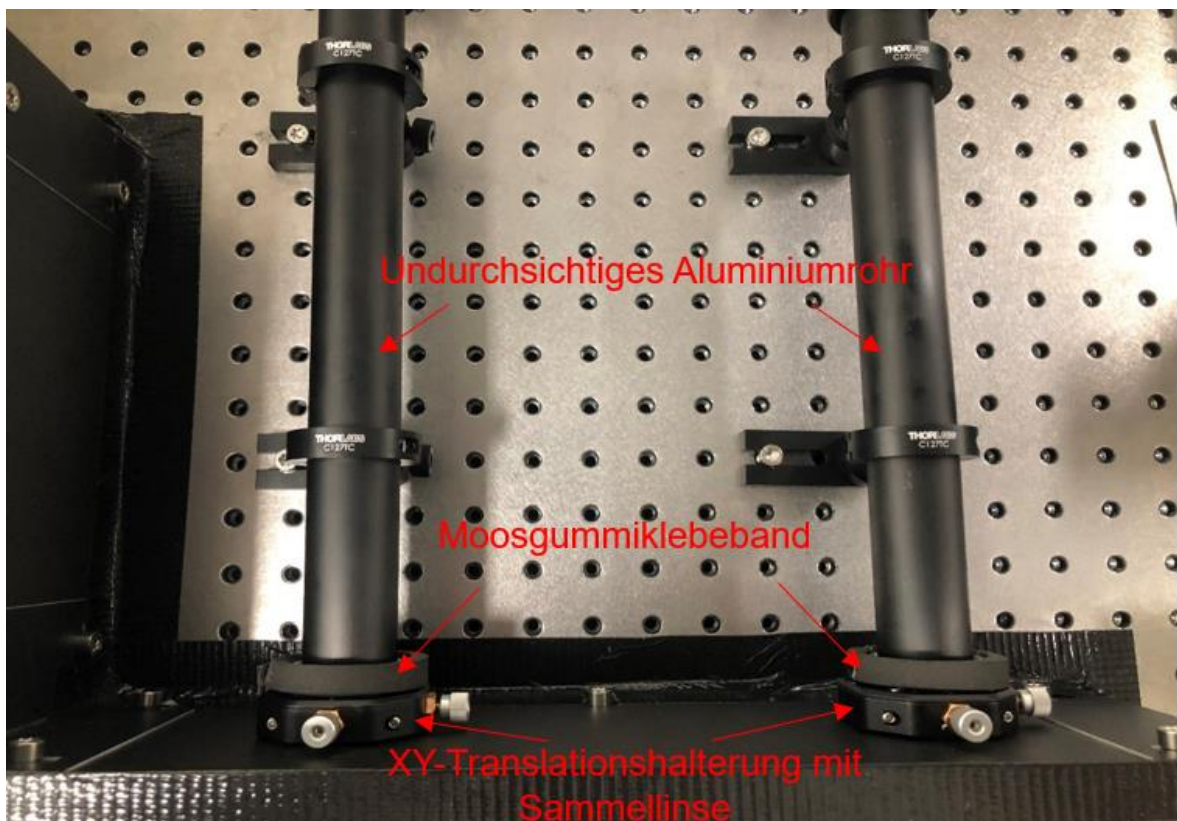
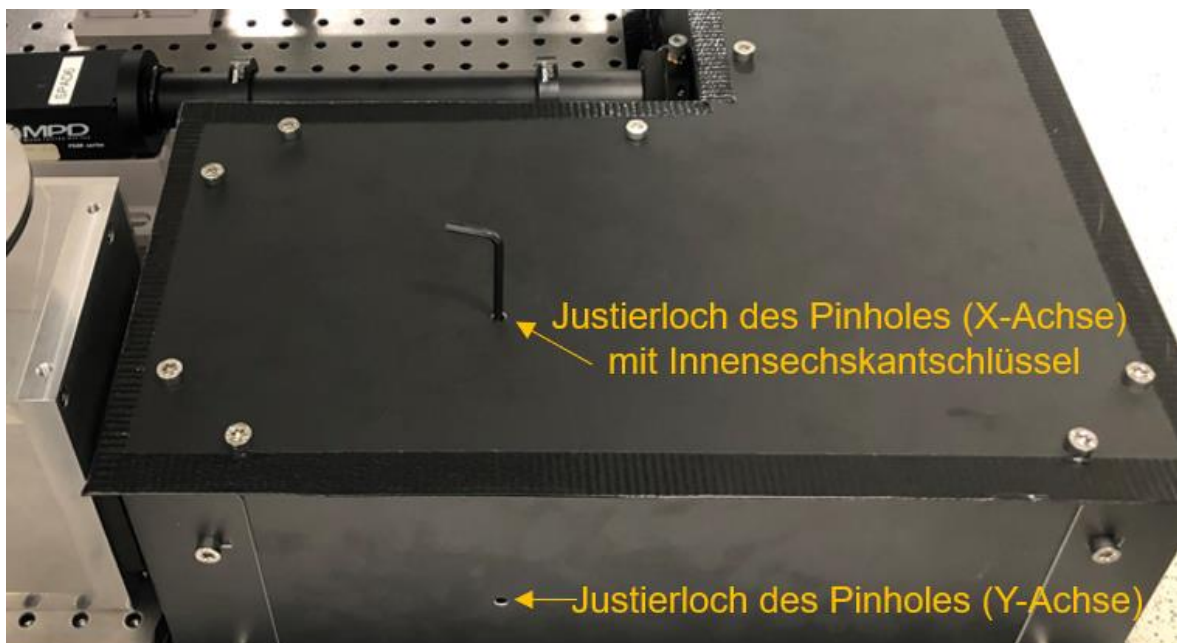


Abbildung 24 : Abschirmkasten und lichtundurchlässiges Rohr für den Detektionsstrahlengang.

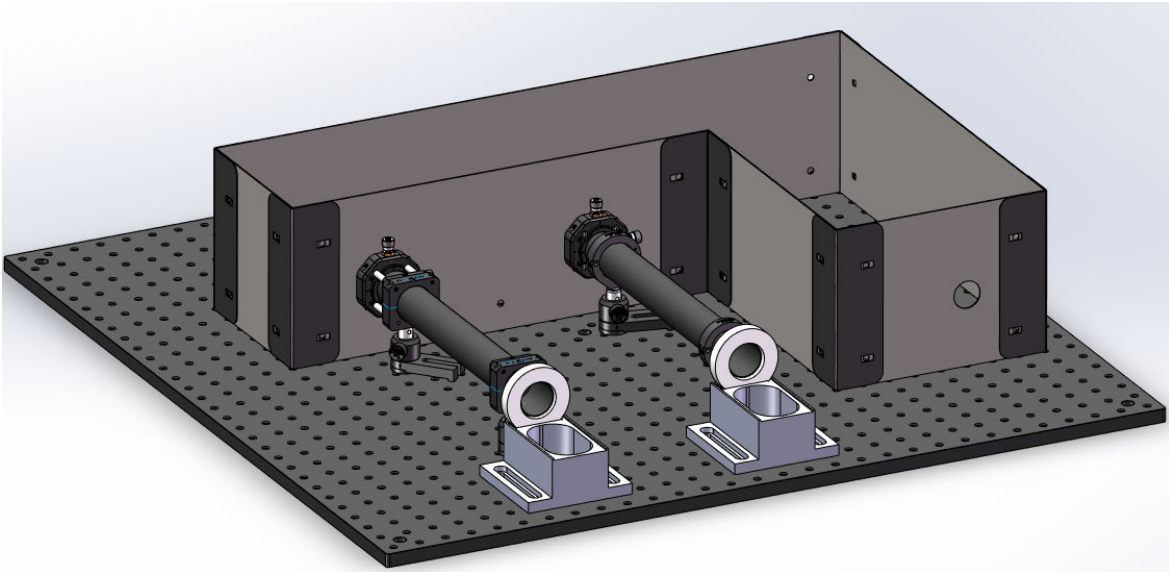


Abbildung 25 : CAD-simulierter Abschirmkasten für den Detektionsstrahlengang.

3.3 Hauptkorpus

Der Hauptkorpus des Mikroskops wurde ebenfalls von Herrn Hannes Michaelsen entworfen und besteht hauptsächlich aus zwei Teilen: dem Cube und der Probenhalterung. Inspiriert vom Design des miCube, konzipierte er diese vereinfachte Version des Hauptkorpus.

3.3.1 Cube

Das Design des Cubes im Mikroskop folgt der Vorlage des Prinzips des konfokalen Mikroskops aus Kapitel zwei. Der Cube dient als Brücke zwischen dem Anregungsstrahlengang und dem Detektionsstrahlengang. Im Inneren des Cubes sind dichroitische Spiegel zur Strahlteilung montiert. An der Oberseite des Cubes befindet sich eine Öffnung mit Gewinde für die direkte Montage des Objektivs.

Der einfallende Anregungsstrahl wird von den dichroitischen Spiegeln reflektiert und durch das Objektiv auf die Probe fokussiert. Der von der Probe erzeugte Fluoreszenzstrahl wird vom Objektiv gesammelt, durch die dichroitischen Spiegel geleitet und schließlich vom Spiegel in den Detektionsstrahlengang gelenkt. Die im Cube verwendeten dichroitischen Spiegel lassen Anregungsstrahlen mit einer Wellenlänge zwischen 550-615 nm und 660-750 nm passieren und reflektieren Strahlen anderer Wellenlängen. Sie sorgen nicht nur dafür, dass der einfallende Anregungsstrahl in das Objektiv reflektiert wird, sondern blockieren auch die reflektierten Anregungsstrahlen, damit diese nicht in den Detektionsstrahlengang gelangen.

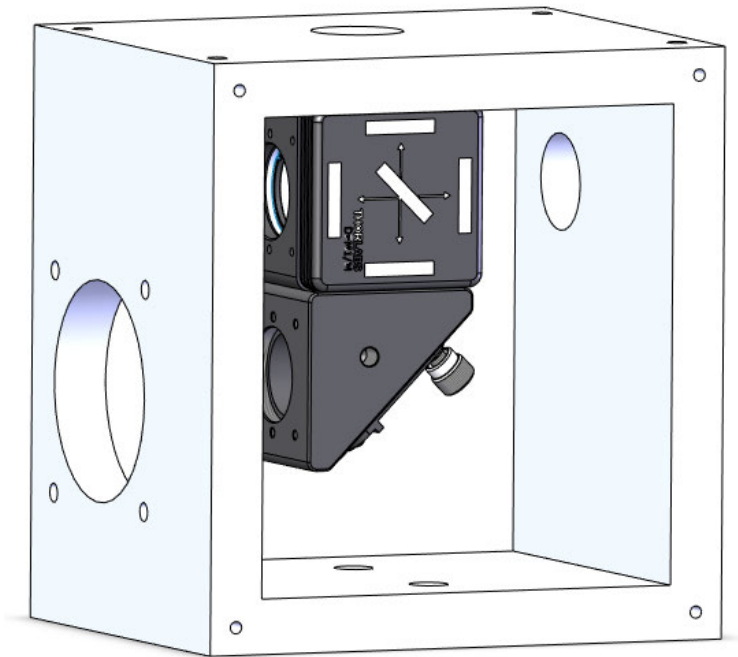


Abbildung 26 : CAD-simulierter Cube mit installiertem Dichroit und Spiegel

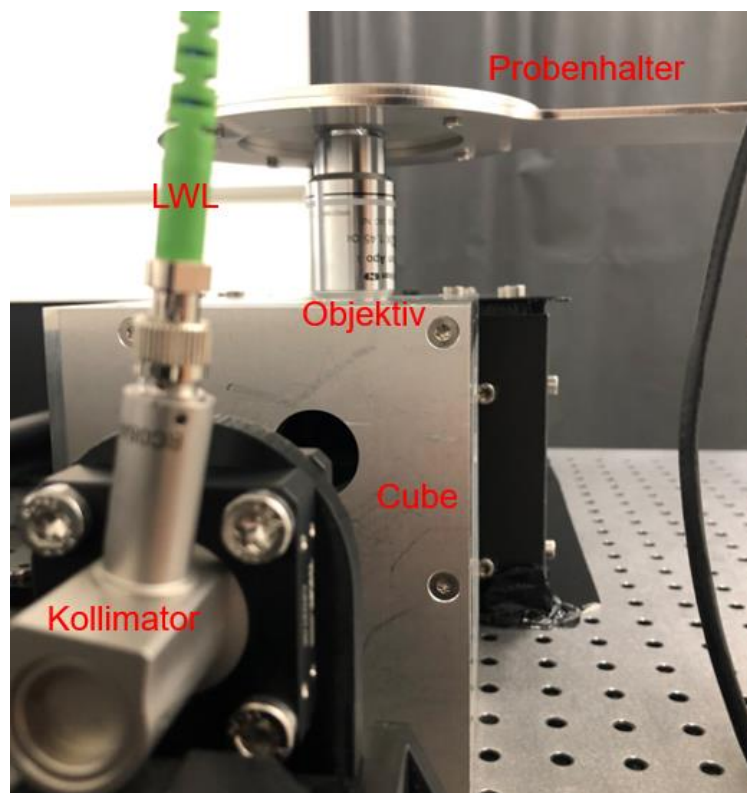


Abbildung 27 : Cube

Aufgrund des integrierten Designs des Cubes müssen alle optischen Komponenten darin genau positioniert sein. Zuerst muss der Einbau des dichroitischen Spiegels und der Spiegel im Inneren des Cubes abgeschlossen werden. Anschließend ist die Position des einfallenden Anregungslichtstrahls zu justieren. Es ist dabei sicherzustellen, dass sich der vom

dichroitischen Spiegel reflektierte Anregungsstrahl genau in der Mitte der Montageöffnung des Objektivs positioniert. Gleichzeitig ist die Halterung für die Probe (Probenhalter) an der Seite des Cubes zu montieren. Auch hier muss der reflektierte Anregungsstrahl genau in der Mitte des Inlays des Probenhalters liegen. Der durch den Spiegel reflektierte Fluoreszenzstrahl muss horizontal auf den optischen Tisch ausgerichtet sein. Auf dem Spiegelhalter befinden sich zwei Einstellknöpfe zur Einstellung der Neigung und des Kippwinkels des Strahls.

3.3.2 Probenhalterung

Die vollständige Probenbefestigungseinrichtung setzt sich zusammen aus einer motorisierten Linearachse, einer optischen Schiene und einem eigens entworfenen Probenhalter. Der Probenhalter verfügt über ein rundes, magnetisches, einsetzbares Inlay, das zur Fixierung der zu analysierenden Proben dient. Die motorisierte Linearachse ermöglicht es der Probe, sich bis zu 25 mm in der Z-Achse zu bewegen und präzise Einstellungen im Mikrometerbereich vorzunehmen. Um die Position der Probe in der X- und Y-Achse anzupassen, kann ein linearer Achsen-Scanner am Boden hinzugefügt werden, um eine noch genauere Justierung zu ermöglichen.

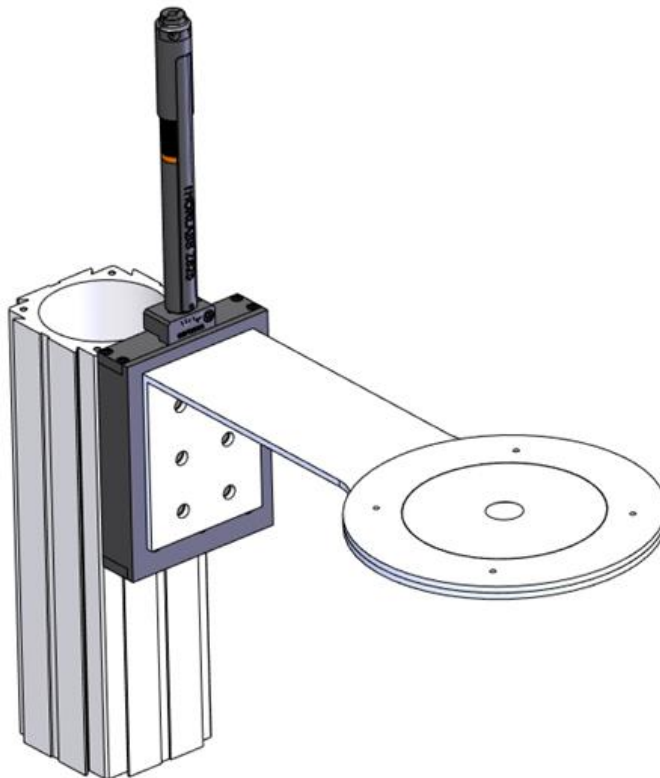


Abbildung 28 : CAD-simulierte Probenhalterung

4 Ergebnisse

4.1 Daten der verwendeten Komponenten

Laser

Tabelle 1: Spezifikation der Laserdioden [18]

Wellenlänge λ	515 nm	638 nm
max. Laserleistung P_{\max}	150 mw	150 mw
Strahldurchmesser d_{86}	0,61 mm	0,9 mm
Beugungsmaßzahl M^2	1,19	1,19
Strahldivergenz Θ	0,65 mrad	1,07 mrad
max. Modulationsfrequenz	150 MHz	150 MHz
Anstiegs-/Abfallzeit	≤ 2 ns	≤ 2 ns
Polarisation	linear senkrecht	linear senkrecht

LWL

Entsprechend den Forschungsanforderungen sollte der gekoppelte Laserstrahl weiterhin eine horizontale Polarisation beibehalten. Nach eingehender Prüfung und Analyse verschiedener Möglichkeiten wurde schließlich eine Single-Mode-Polarisationserhaltende Faser der Firma Thorlabs ausgewählt. Diese Entscheidung basierte auf der herausragenden Qualität und den spezifischen Eigenschaften der Faser, die perfekt auf die Anforderungen des Projekts abgestimmt waren.

Tabelle 2: Spezifikation der Fasern [19]

Bestellnummer	Betriebswellenlänge	MFD	NA	Stecker TYPE
P3-405BPM-FC-2	400-680nm	3,3 \pm 0.5 μm @ 405 nm 4,6 \pm 0.5 μm @ 630 nm	0,12	FC/APC

Koppler

Nach sorgfältiger Auswahl wurde ein monochromatischer Faserkoppler der Firma Schäfter + Kirchhoff für den Einsatz ausgewählt. Dieser ist speziell für die verwendeten Glasfasern geeignet und erreicht eine hohe Kopplungseffizienz bei Laserstrahlen mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen.

Tabelle 3 : Spezifikation der Faserkoppler [12]

Brennweite	12 mm
Optik Typ	Doppeloptik, monochromatisch
AR-Beschichtung	390 - 670 nm
Stecker Typ	FC/APC
NA	0,23

Objektiv

Als Objektiv wird das CFI Plan Apochromat Lambda 100x Oil von Nikon verwendet. Dieses speziell für die Fluoreszenzmikroskopie entwickelte Objektiv ist nicht temperaturkorrigiert, bietet jedoch eine angemessene numerische Apertur. Die Wahl fiel auf dieses Objektiv aufgrund seiner guten hochauflösenden Abbildungsqualität bei vergleichsweise niedrigem Preis.

Tabelle 4 : wichtige Daten des verwendeten Objektivs [15]

Numerische Apertur	1,45
Vergrößerung	100 x
Arbeitsabstand	0.13 mm
Fokustiefe	0.20 μm
Bildfeldgröße (\emptyset)	0.25 mm

4.2 Ergebnisse der Berechnungen und Messungen

Anregungsstrahlengang :

Bei der Konstruktion des Anregungsstrahlengangs des konfokalen Mikroskops werden gemäß den Formeln in Kapitel 3.1.2.3 die Laserwellenlänge λ , die Brennweite f der Linse im Faserkoppler, der Abstand z und die Strahltaile $2w_0$ vor dem Faserkoppler als Eingangsgrößen betrachtet. Der Strahlenradius $w(z)$ vor dem Faserkoppler und die neue fokussierte Strahltaile w'_0 hinter der Linse sind die berechneten Größen. Diese Berechnungen helfen bei der Bestimmung der optimalen MFD für die geeignete Singlemodefaser für die vorhandenen Laserdioden. Unter Berücksichtigung von Kosten und Qualität wurde die Glasfaser mit dem besten Preis-Leistungs-Verhältnis ausgewählt.

Tabelle 5 : Berechnungsergebnisse für die Singlemodefaser [19]

	λ	z	w_0	f	$w(z)$	w'_0	<i>MFD</i>
Laser 1	515nm	0,77m	0,35mm	12mm	0,50mm	3,91 μ m	7,82 μ m
Laser 2	638nm	0,81m	0,45mm	12mm	0,58mm	4,2 μ m	8,4 μ m

Nach erfolgreicher Faserkopplung muss die Leistung vor Fasereinkopplung P_1 und die Leistung nach Fasereinkopplung P_2 gemessen werden. Die Kopplungseffizienz der Faser wird dann mit Hilfe der Formeln berechnet. Wenn zwei Laser unterschiedlicher Wellenlänge in dieselbe Faser eingekoppelt werden sollen, sind Kopplungseffizienzen von über 30% für Laser 1 und über 20% für Laser 2 für unsere experimentellen Anforderungen ausreichend.

Tabelle 6 : Einkopplungseffizienz Laser 1 mit 515nm

Leistung	1	2	3	4	5	\bar{P}
$P1/mw$	0,724	0,735	0,733	0,730	0,698	0,724

P_2/mw	0,294	0,305	0,285	0,294	0,296	0,294
-----------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Die Kopplungseffizienz von Laser1 beträgt $\eta_1=40\%$.

Tabelle 7 : Einkopplungseffizienz Laser 2 mit 638nm

Leistung	1	2	3	4	5	\bar{P}
P_1/mw	0,795	0,801	0,800	0,812	0,799	0,801
P_2/mw	0,191	0,185	0,192	0,192	0,187	0,189

Die Kopplungseffizienz von Laser2 beträgt $\eta_2=24\%$.

Gesamtstrahlengang:

Bei den Messungen nach dem Aufbau des gesamten Strahlenganges: P_0 ist die Ausgangsleistung der Laserdiode. P_1 ist die Leistung vor der Fasereinkopplung. P_2 ist die Leistung nach der Fasereinkopplung. P_3 ist die Leistung vor dem Pinhole. P_4 ist die Leistung nach dem Pinhole. P_5 ist die Leistung an der Position des SPAD.

Bei der Analyse der Daten wurde festgestellt, dass beim Durchgang des Lasers durch die optischen Komponenten und den Strahlengang ständig Leistungsverluste auftreten. Insbesondere ist die Laserleistung nach der Sammlung durch das Objektiv (P_3) deutlich geringer als die Leistung nach der Faserkopplung (P_2). Der Unterschied zwischen der Leistung vor und nach dem Pinhole ist jedoch nicht sehr groß. Ziel des Experiments war es, bei einer Ausgangsleistung des Lasers von 1 mW eine Leistung von 1 bis 10 μW zu messen. Obwohl die gemessene Leistung am Ort des SPAD geringer war als erwartet, ist dies auf die Verwendung eines Spiegels als Probe zurückzuführen. Ein Austausch der Probe durch eine präparierte Probe und weitere Verbesserungen der Probenhalterung sollten bessere experimentelle Ergebnisse liefern.

Tabelle 8 : Messergebnisse für Laser 1 mit 515nm (mit Spiegel als Probe)

Leistung	1	2	3	4	5	\bar{P}
----------	---	---	---	---	---	-----------

P_0/mw	7,55	8,01	7,09	7,80	7,30	7,55
P_1/mw	3,02	3,30	2,80	3,22	2,88	3,04
P_2/mw	1,06	1,23	0,95	1,15	0,97	1,07
$P_3/\mu\text{w}$	1,77	1,95	1,61	1,82	1,72	1,77
$P_4/\mu\text{w}$	1,67	1,85	1,50	1,77	1,63	1,68
$P_5/\mu\text{w}$	1,39	1,55	1,25	1,50	1,35	1,41

Tabelle 9 : Messergebnisse für Laser 2 mit 638nm (mit Spiegel als Probe)

Leistung	1	2	3	4	5	\bar{P}
P_0/mw	7,15	7,45	6,85	7,25	6,95	7,13
P_1/mw	3,22	3,45	3,05	3,30	3,10	3,22
P_2/mw	0,71	0,75	0,68	0,73	0,69	0,71
$P_3/\mu\text{w}$	2,53	2,60	2,45	2,55	2,50	2,53
$P_4/\mu\text{w}$	2,12	2,20	2,05	2,15	2,10	2,12
$P_5/\mu\text{w}$	1,75	1,80	1,72	1,76	1,73	1,75

4.3 Strahlengang des konfokalen Mikroskops

Nach der Montage und Justierung aller optischen Komponenten ergibt sich der vollständige Strahlengang des konfokalen Mikroskops, wie in der folgenden Abbildung gezeigt.

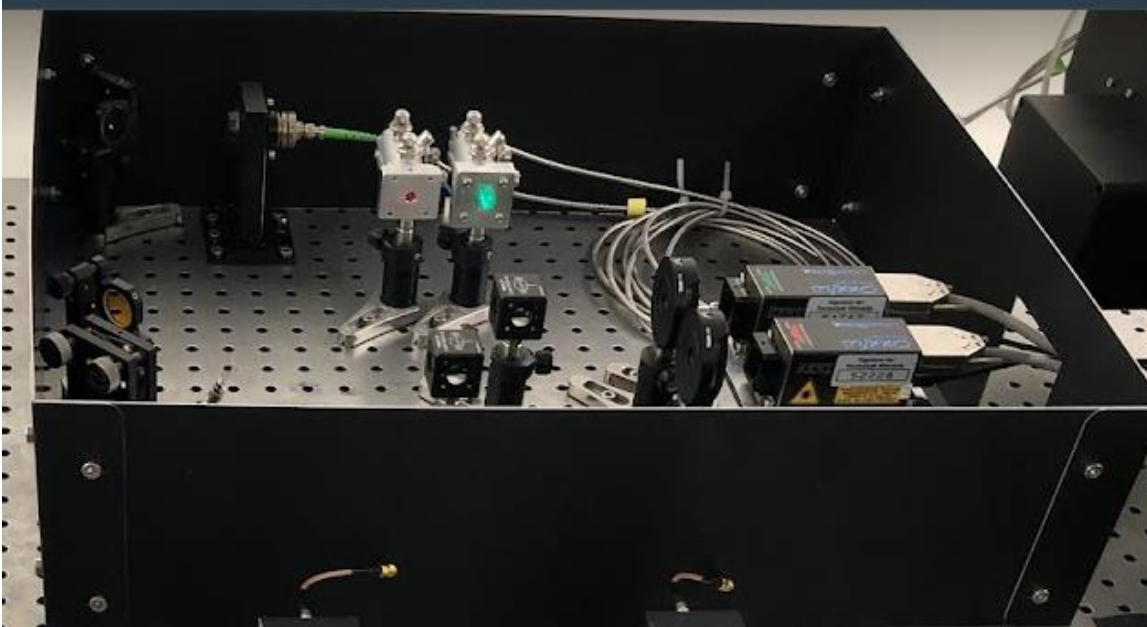


Abbildung 29 : Vollständiger Anregungsstrahlengang

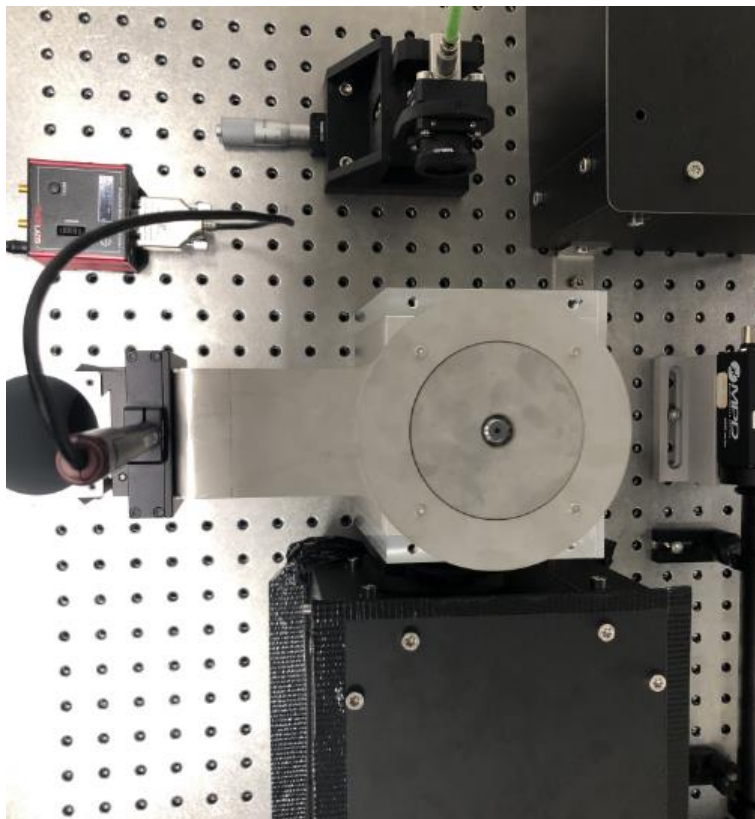


Abbildung 30 : Hauptkorpus

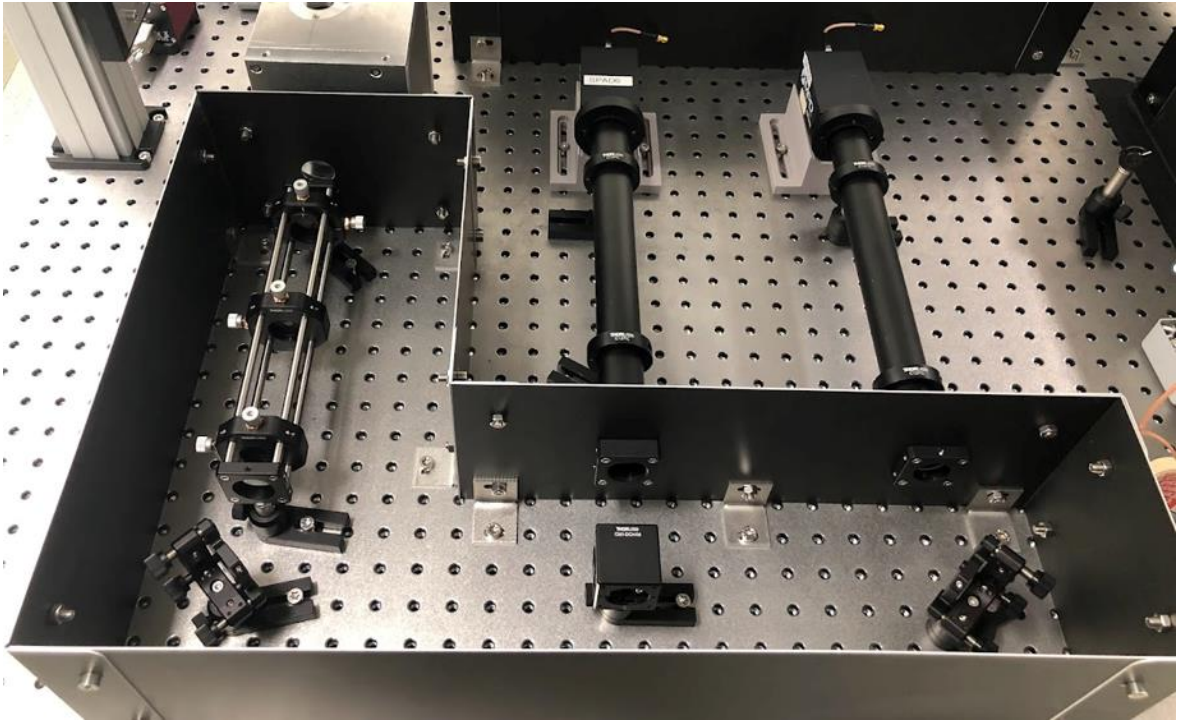


Abbildung 31 : Vollständiger Detektionsstrahlengang

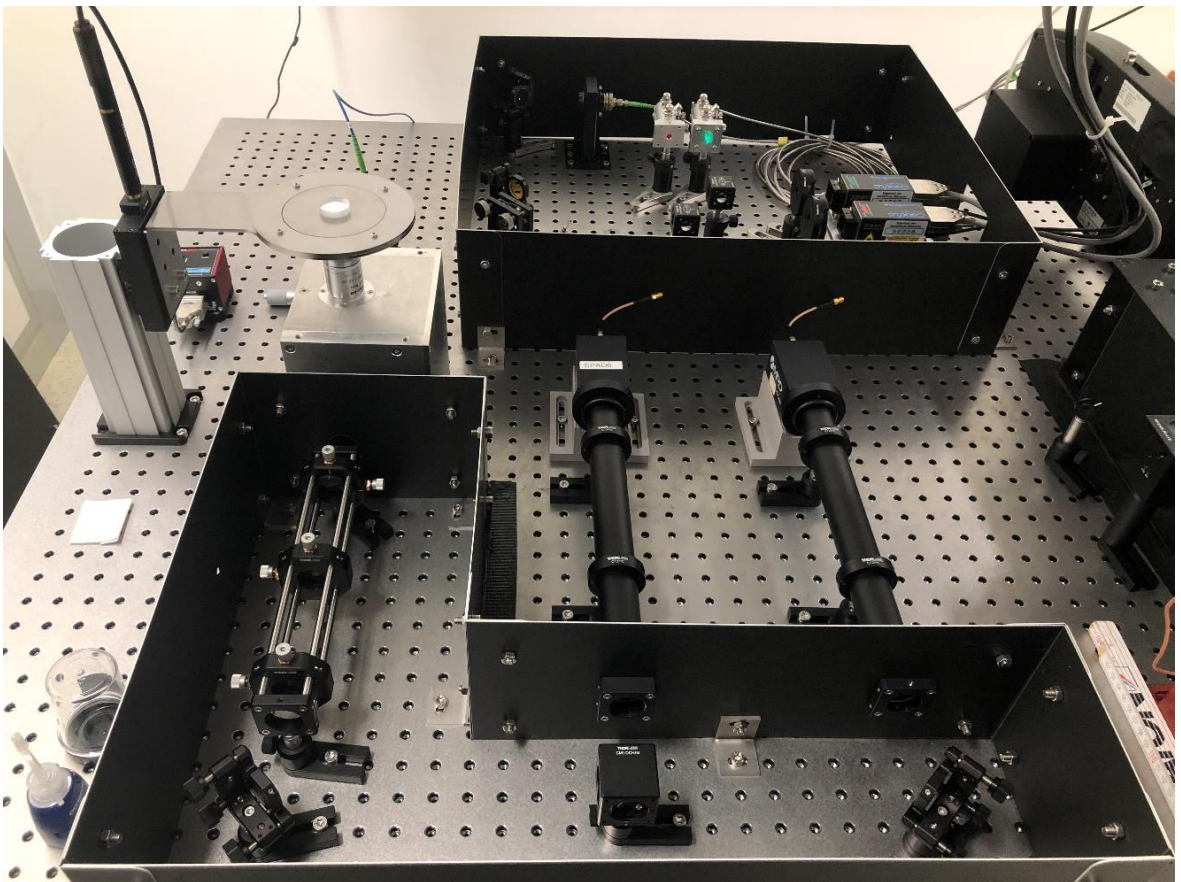


Abbildung 32 : Ein offenes, modulares konfokales Mikroskop

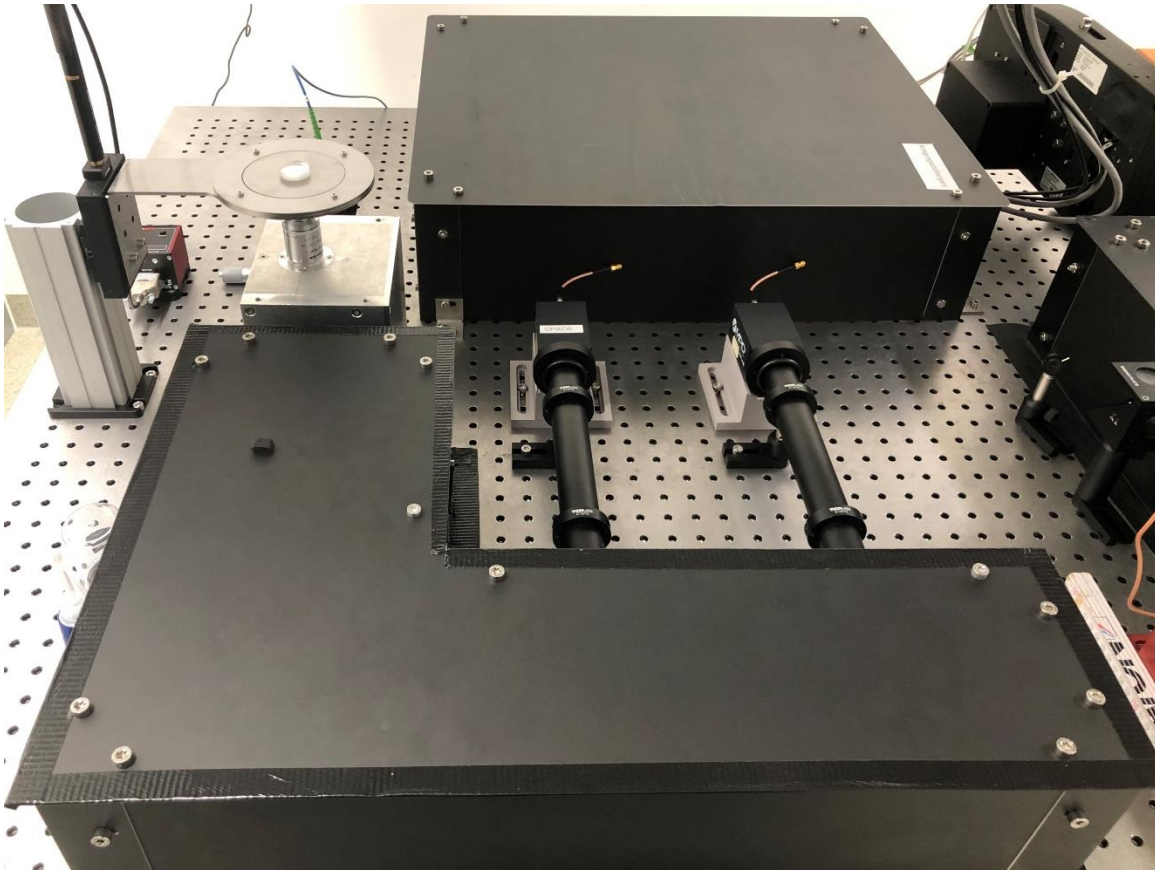


Abbildung 33 : Mit Abschirmungen abgedichtetes konfokales Mikroskop

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein konfokales Mikroskop aufgebaut, das durch einen modularen Entwurf sowohl Flexibilität als auch Effizienz bei der Montage und Justierung der optischen Komponenten bietet. Nach wiederholten Justierungen und Messungen im Labor wurde eine Kopplungseffizienz von 40% für den 515 nm Laser (grün) und 24% für den 638 nm Laser (rot) im Anregungsstrahlengang erreicht. Im Detektionsstrahlengang konnte ein etwas geringeres Lasersignal als erwartet am Ort des SPAD gemessen werden. Die Gesamtstruktur des offenen konfokalen Mikroskops als Basismodell ist ausreichend, es wurde erfolgreich aufgebaut und justiert und bildet die Grundlage für zukünftige Optimierungen und Anpassungen. Mit den vorhandenen Mitteln wurde ein kostengünstiges offenes konfokales Mikroskop für Lehrzwecke erfolgreich aufgebaut.

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit ist der Einsatz von CAD-Simulationen, die nicht nur im Designprozess eine Rolle spielen, sondern auch für die Auswahl und Anpassung der optischen Komponenten notwendig sind. Diese Simulationen ermöglichen es, die ideale Anordnung und Ausrichtung der Komponenten zu bestimmen, bevor diese physisch in das Mikroskopsystem integriert werden.

Zukünftige Arbeiten könnten weitere Verbesserungen und Erweiterungen des Systems beinhalten. Beispielsweise könnte die Integration eines Softwaretools zur Verarbeitung und Analyse, der von den SPADs gesammelten Daten die Erstellung detaillierter und aussagekräftiger Bilder der untersuchten Proben ermöglichen. Das Hinzufügen weiterer Laser und Detektoren könnte die Bandbreite der analysierbaren Fluoreszenzsignale erweitern. Eine Präzisierung der Probenhalterung würde eine genauere Positionierung der Proben ermöglichen, was wiederum die Qualität der gewonnenen Messdaten erhöhen würde. Außerdem könnte die Einführung von Bandpassfiltern in den Detektionsstrahlengang dazu beitragen, unerwünschte Lichtsignale zu eliminieren und die Bildqualität zu verbessern. In den Mikroskopen können wichtige Komponenten wie Koppler und Lichtwellenleiter durch präzisere und besser angepasste optische Komponenten ersetzt werden, um bessere Messergebnisse zu erzielen.

Die bisher geleistete Arbeit ist erst der Anfang eines offenen, modularen konfokalen Mikroskops. Mit der kontinuierlichen Optimierung und Aktualisierung des Gesamtsystems wird es erfolgreich in der wissenschaftlichen Forschung eingesetzt werden und einen größeren Wert entfalten.

Anhang A: Teileliste

Nr.	Name	Artikel Nr.	Bezeichnung	Firma	Anzahl
Anregungsstrahlengang					
1	Lasere 515 nm	LBX-515	Lasere diode 515nm	Oxxius	1
2	Lasere 638 nm	LBX-638	Lasere diode 638nm	Oxxius	1
3	$\lambda/2$ -Plättchen	WPH05M-532		Thorlabs	2
4	PBS	CCM5-PBS201/M	Polarisierende Strahlenteiler	Thorlabs	2
5	Tweaker-Plate	XYT/M-A	Planplatte	Thorlabs	1
6	Spiegel	PF10-03-P01		Thorlabs	2
7	Dichroitische Spiegel	DMLP550	Langpass Dichroic Mirror, 550 nm Cut-On	Thorlabs	1
8	Faserkoppler	60SMS-1-4-M12-33		S+K	1
9	Faserkopplerhalterung	Eigenbau			1
10	Lichtwellenleiter	P3-405BPM-FC-2		Thorlabs	1
11	Kollimator	RC08APC-P01	450 nm - 20 μm , RFL = 33 mm, FC/APC	Thorlabs	1
12	Kollimatorhalter A			Eigenbau	1
13	Kollimatorhalter B			Eigenbau	1
14	Adapter SM05 zu SM1	SM1A6		Thorlabs	1
15	Shearing Interferometer	SI100	mit 5-10 mm Strahldurchmesser Shear Plate	Thorlabs	1
Hauptkorpus					
16	Korpus (Main Cube)			Eigenbau	1
17	Filter Würfel	DFM1/M	Right-Turning, M6 Tapped Holes	Thorlabs	1
18	Cube Verbinder	C4W-CC		Thorlabs	1
19	Spiegelhalter	KCB1E/M	Spiegelhalter in Korpus	Thorlabs	1
20	Dichroit	ZT532/640rpc	Transmission 550-615 und 660-750 nm	AHF	1
21	Elliptischer Spiegel	BBE1-E02		Thorlabs	1
22	motorisierte Z-Achse	PT1/M-Z8		Thorlabs	1
23	Controller	KDC101		Thorlabs	1
24	Stromkabel	KPS101		Thorlabs	1
25	Optische Schiene	XT66-200		Thorlabs	1
26	Befestigungsplatte	XT66P1		Thorlabs	1
27	Befestigungsschlitten	XT66P2/M		Thorlabs	1
28	Probenhalter			Eigenbau	1
Detektionsstrahlengang					
29	Cage Plate (Halte rung)	CP35/M	Zur Befestigung des Cage-Systems	Thorlabs	2
30	Linse	LA4380-A	Plankonvexlinse, f=100 mm, ARC: 350 - 700	Thorlabs	2
31	Pinhole	P50D	50 \pm 3 μm Pinhole Durchmesser	Thorlabs	1
32	Montage Stangen	ER10	Cage Assembly Rod	Thorlabs	4
33	Cage XY Translator	CXY1A	XY Translating Lens Mount for \varnothing 1" Optics	Thorlabs	5
34	Dichroit	ZT647rdc-UF3		AHF	1
35	Spiegel	PF10-03-P01	Spiegel für Detektionsstrahlengang	Thorlabs	2
36	dichroitische Spiegelhalter	CM1-DCH/M		Thorlabs	1
37	Spiegelhalter	KS1		Thorlabs	2
38	Sammellinse	LA4579	f=301,1mm	Thorlabs	2
39	Linsenhalter	LMR1/M		Thorlabs	2
40	Detektordioden (SPAD)			MPD	2
41	Diodenhalter			Eigenbau	2
42	Aluminum Lens Tube Cover	SC600	L=609,6 mm D=1,27"	Thorlabs	1
43	Klemmhalterung	C127TC	Klemmhalterung für Rundrohr	Thorlabs	4

Anhang B : Protokoll der Faserkopplung

Der von den Laserdioden emittierte Laserstrahl wird über einen geeigneten Faserkoppler in eine polarisationserhaltende Singlemodefaser eingekoppelt. Die beiden Laserdioden haben eine maximale Ausgangsleistung von 150 mW und gehören zur Laserschutzklasse 3B. Beim Anschluss der Faser muss eine geeignete Laserschutzbrille getragen werden.

Geräte:

- Laserschutzbrille, Detektorkarte
- Oxxius Laserdiode 515 nm und 638 nm
- Schäfter + Kirchhoff Faserkoppler
- Leistungsmesser

Arbeitsschritte:

1) Grundlegende Strahleinstellungen:

- Laser einschalten über den hintere Hauptschalter und den Schlüssel.
- Laserleistung durch Potentiometer oder Micromanager auf 1 mW reduzieren.
- Das $\lambda/2$ -Plättchen auf $22,5^\circ$ einstellen.
- Mit Hilfe einer Detektorkarte die beiden Laserdioden und den Faserkoppler auf der Metallplatte auf gleiche Höhe einstellen.
- Laserstrahl in die Mitte des Faserkopplers positionieren.

2) Faserverbindung:

- Beim Einsetzen des Fasersteckers die Ferrule (A) schräg einführen und den Steckerschlüssel (B) korrekt zur Nut des Kopplers (C) ausrichten.
- Sobald die Spitze der Ferrule sicher im inneren Zylinder des Kopplers positioniert ist, Stecker und Koppler ausrichten und den Stecker vorsichtig in den Faserkoppler einführen.
- Den Steckerschlüssel ausrichten und sanft auf die rechte Seite der Nut des Kopplers drücken.
- Die Steckermutter vorsichtig auf den Koppler schrauben, bis sie handfest ist.
- Die andere Seite der Faser mit denselben Schritten in den Kollimator einführen.

3) Grobeinstellung:

- Auf dem Leistungsmesser die richtige Detektionswellenlänge auswählen und den Messkopf hinter dem Kollimator platzieren.
- Mit dem Sechskantschlüssel 50HD-15 die drei Kopfschrauben um 2 bis 3 Umdrehungen lösen.
- Kopfschrauben drehen, um jeden möglichen Justierungspunkt zu erreichen. Eine Schraube leicht drehen, dann die nächste Kopfschraube in einem weiten Bereich hin und her bewegen. Diesen Vorgang wiederholen, bis der Leistungsmesser eine Lesung anzeigt und der Strahl gefunden wird.
- Sobald ein Signal gefunden wird, eine Kopfschraube festziehen, um das Signal zu maximieren. Empfindlichkeit des Leistungsmessers nach Bedarf einstellen. Im Uhrzeigersinn oder gegen den Uhrzeigersinn zur nächsten Kopfschraube bewegen und die beschriebenen Schritte ausführen. Nach zwei bis drei vollständigen Zyklen der Justierung aller Kopfschrauben, mit der letzten Schraube die maximale Leistung am Faserende erreichen.

4) Feineinstellung:

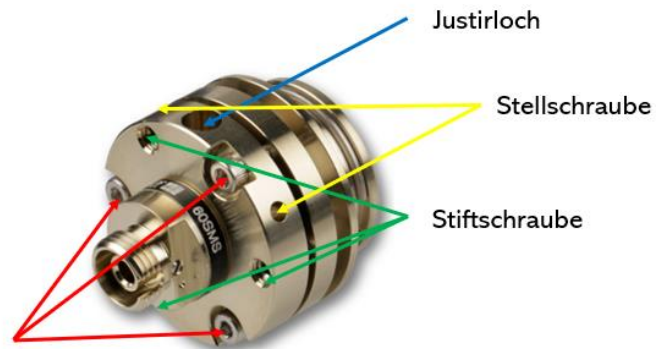
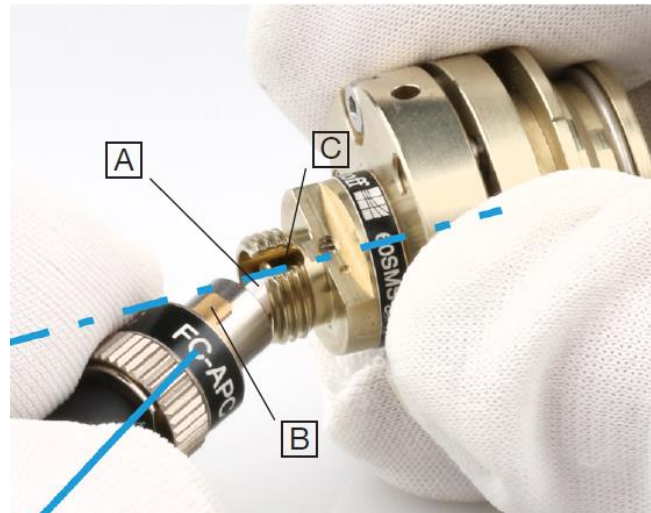
- Mit dem Sechskantschlüssel 50HD-15 die drei Stiftschrauben gleichmäßig und vorsichtig festziehen, bis ein Widerstand spürbar wird. Der Leistungsmesser zeigt nun ein Signal, welches vom zuvor beobachteten Maximum abweichen kann.
- Jede der drei Stiftschrauben anziehen, zum Beispiel im Uhrzeigersinn. Jede Schraube festziehen, bis das Leistungssignal leicht über das Maximum hinausgeht.
- Die Justierung jeder Schraube wiederholen, bis zwei bis drei vollständige Justierzyklen abgeschlossen sind. Mit der letzten Schraube des letzten Justierzyklus wird die maximale Leistung am Detektor am Faserende erreicht.

5) Fokuseinstellung:

- Mit einem Schraubendreher Typ 9D-12 die beiden Stellschrauben lösen, die die Position der Linse fixieren.
- Den Exzentrerschlüssel Typ 60EX-5 in das Justirloch einsetzen. Den Fokus durch langsames Drehen des Exzentrerschüssels auf maximale Leistung einstellen.
- Nach der Justierung die beiden Stellschrauben wieder anziehen, um die Fokuseinstellung zu sichern.

6) Maximierung der Kopplungsleistung:

- Strahlversatzoptik in horizontaler und vertikaler Richtung einstellen.
- Die horizontalen und vertikalen Einstellknöpfe an beiden Spiegeln einstellen. Die gleichen Knöpfe an beiden Spiegeln abwechselnd in kleinen Schritten in die gleiche Richtung drehen.
- Alle oben genannten Justierschritte wiederholen, bis die maximale Kopplungsleistung erreicht ist.



a) Kopfschraube



b)

Abbildung 34 : a) Faserkoppler b) Justierungswerkzeug ① Schraubendreher Typ 9D-12

② Sechskantschlüssel 50HD-15 ③ Exzentrerschlüssel Typ 60EX-5 [12]

Anhang C : Abbildungen der konstruierten Bauteile

Die folgenden Bilder zeigen alle selbst entworfenen und hergestellten Komponenten, die für den Aufbau des Strahlenganges verwendet wurden. Einige Entwürfe basieren auf Arbeiten von Hannes Michaelsen und miCube [4]. Sie wurden mit dem CAD-Programm SolidWorks erstellt und fotografiert.

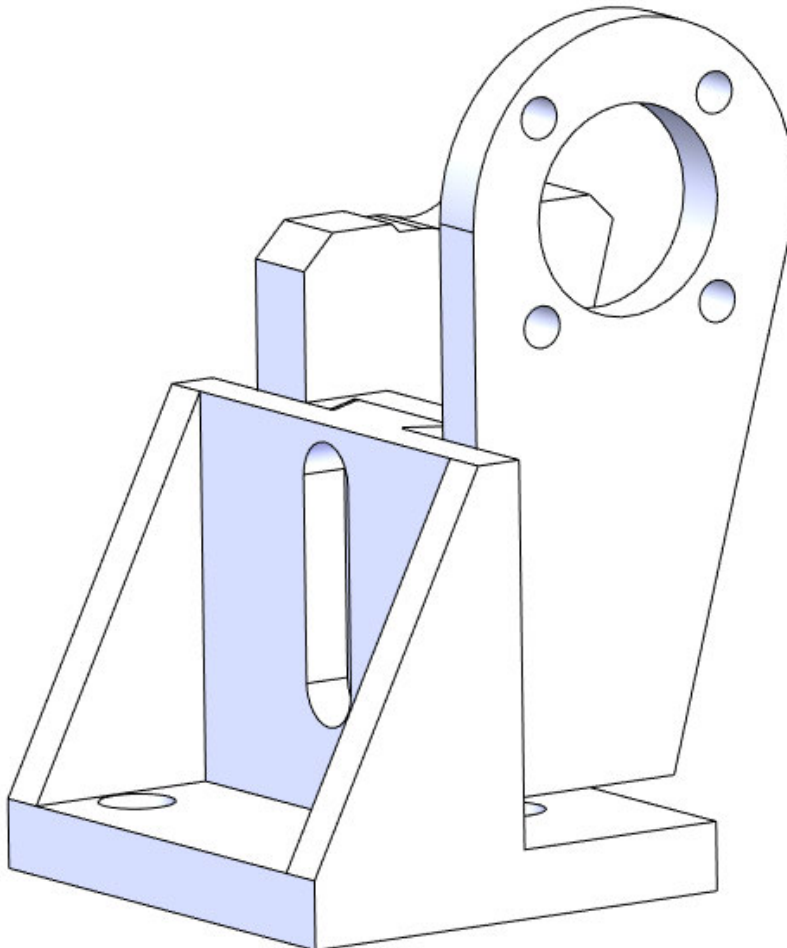


Abbildung 35 : Kollimatorhalterung, die zur Befestigung des Kollimators dient und mit einer Linearachse verbunden ist.

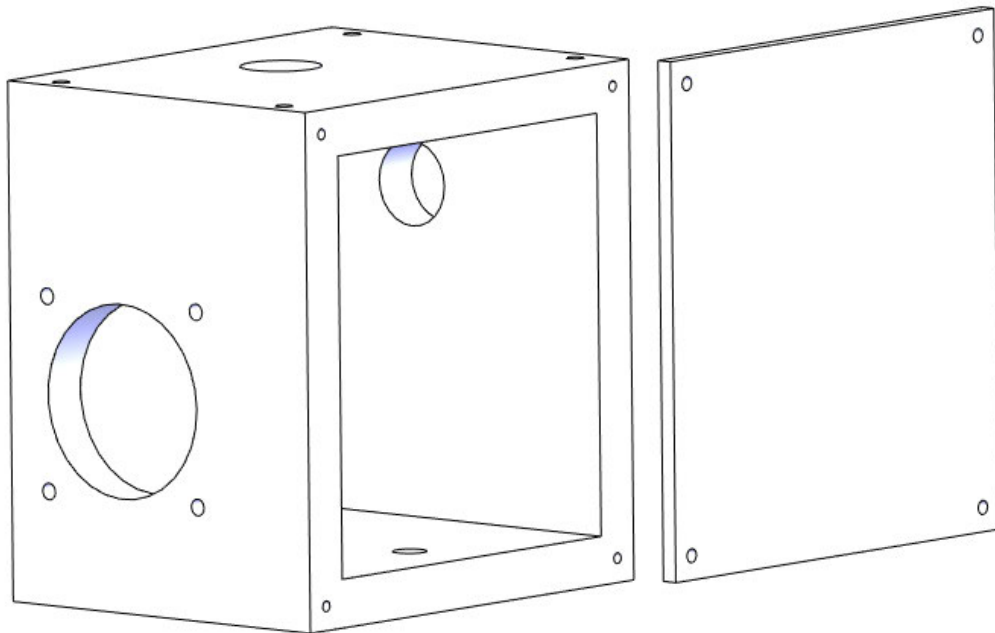


Abbildung 36 : Cube (Mikroskopkorpus), Cube (Mikroskopkorpus), verwendet für die Montage von Dichroit, Spiegel und Objektiv.

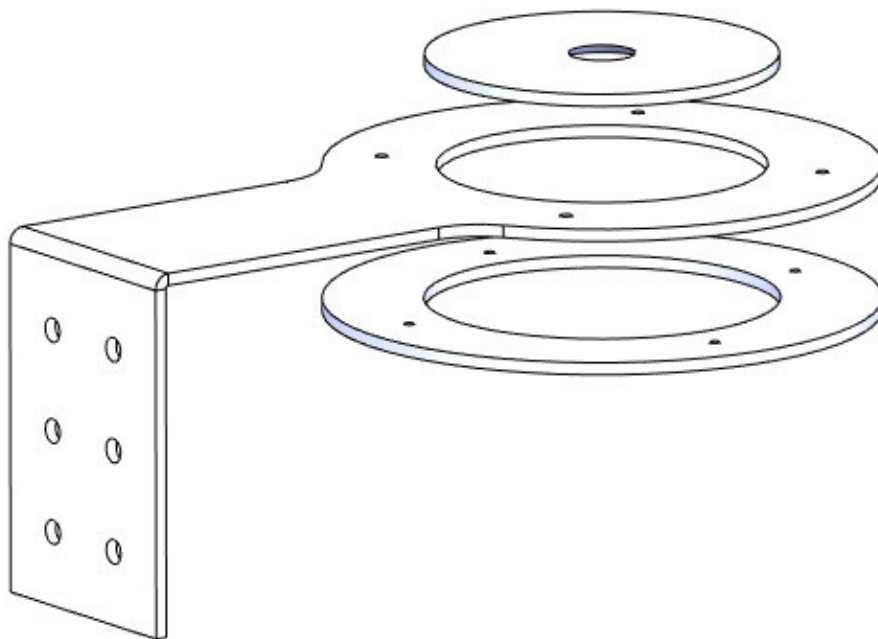


Abbildung 37 : Probenhalterung, verwendet zur Befestigung von Proben und ist mit einer motorisierten Linearachse verbunden.

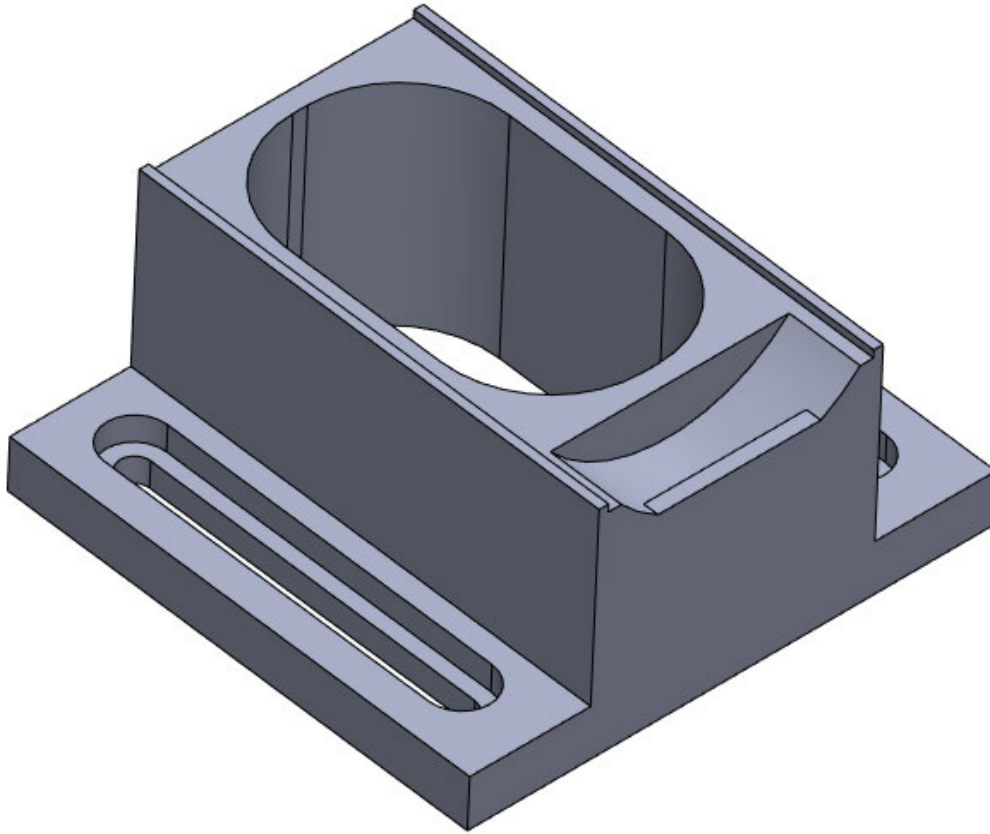


Abbildung 38 : Diodenhalterung, verwendet zur Positionierung der SPADs und platziert diese in der Höhe des Strahls.

Literaturverzeichnis

- [1] Binghua Xie, Aifen Yang, Huaping Tao & Xiaofeng Zhao. (2022). Die Verwendung und Verwaltung des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops. Zeitschrift des Qingyuan Vocational and Technical College (03), 67-72.
- [2] J. Hohlbein, K. Martens, S. Baas, and J. Philippi: “#micube: Modular fluorescence microscopy.” <https://hohlbeinlab.github.io/miCube/index.html>. 01.09.2022
- [3] Konfokalmikroskop – Wikipedia : https://de.wikipedia.org/wiki/Konfokalmikroskop#cite_note-CoxCh5-1 01.09.2022
- [4] Hannes Michaelsen: Optimierung eines mikroskopischen Aufbaus für TIRF- und konfokale Mikroskopie, Bericht ,Mittweida ,2020.
- [5] Thorlabs, Mounted Zero-Order Half-Wave Plates: https://www.thorlabs.com/newgroup-page9.cfm?objectgroup_id=711 03.09.2022
- [6] Thorlabs,Polarizing Beamsplitter Cube:
https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=739 03.09.2022
- [7] Löffler-Mang, Martin. Optische Sensorik Lasertechnik, Experimente, Light Barriers. 2012. SpringerLink Bücher.
- [8] Pedrotti, Physiker, Saint Louis, Marquette University, Institute of Jesuit Sources, 31.05. .05.2010, Bausch, Schmidt, Center for Occupational Research Development, 21.05. .08.2010, Pedrotti, Leno S, Bausch, Werner, and Schmidt, Hartmut. Optik Für Ingenieure Grundlagen. 3., Bearbeitete Und Aktualisierte Auflage ed. 2005. SpringerLink Bücher. Web.
- [9] Eberlein, Dr. Rer. Nat., Physik, Physiker, Reichenbach Im Vogtland, Manzke, Sattmann, Physikerin, Dr.-Ing., Manzke, Christina, Sattmann, Ralph, Dr.-Ing, Expert-Verlag GmbH Fachverlag Für Wirtschaft Und Technik, Verlag, Renningen, and 08.06. Lichtwellenleiter-Technik. 12., überarbeitete Und Erweiterte Auflage ed. 2020. Print.
- [10] Eberlein, Dr. Rer. Nat., Physik, Physiker, Reichenbach Im Vogtland, and Eberlein, Dieter. Grundlagen Der Lichtwellenleitertechnik Studienausgabe. 2021. Utb-studi-e-book. Web.
- [11] Thorlabs, „Why is MFD an important coupling parameter for single mode fibers“:
https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=12211&tabname=Fiber%20Optics#SMFiberCoupling
- [12] Schäfter + Kirchhoff, 60SMS-Adjustment Manuel 2022
- [13] Andrew M. Kowalevicz Jr. and Frank Bucholtz, Beam Divergence from an SMF-28 Optical Fiber (NRL/MR/5650--06-8996) (Naval Research Laboratory, Washington, DC, 2006).
- [14] Joseph R. Lakowicz: Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer, 2006

- [15] Nikon Instruments Inc. (n.d.). CFI Plan Apochromat Lambda Series. : <https://www.microscope.healthcare.nikon.com/products/optics/cfi-plan-apochromat-lambda-series> verfügbar am 20.12.2023
- [16] Thorlabs, Circular Precision Pinholes : https://www.thorlabs.com/newgroup-page9.cfm?objectgroup_id=14350 verfügbar am 21.12.2023
- [17] Micro-Photon-Devices FastGatedSPAD : <http://www.micro-photon-devices.com/Products/Photon-Counters/FastGATED-SPAD> verfügbar am 21.12.2023
- [18] Oxxius: Oxxius LaserBoxx User's Guide, 2012
- [19] Thorlabs: Data Sheet P3-405BPM-FC-2, 2023
- [20] Witlof Brunner, Klaus Junge: Wissenspeicher Lasertechnik, VEB Fachbuchverlag-Leipzig, 1987

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben. Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Börner, der mir die Möglichkeit gab, dieses Projekt durchzuführen, sowie Herrn Dr. Pflug für ihre wertvolle Betreuung und Unterstützung bei meiner Arbeit. Mein Dank gilt auch Herrn Thurm, Herrn Klötzer, Herrn Hartwig und Herrn Grundmann für ihre Unterstützung im Bereich der konventionellen Fertigung. Ein besonderer Dank geht an die gesamte Börner-Gruppe für die Förderung und Ermutigung während meiner Arbeit. Weiterhin bin ich dem Laserforschungsinstitut der Universität Mittweida für die finanzielle und technische Unterstützung bei der Realisierung des gesamten optischen Aufbaus des konfokalen Mikroskops zu großem Dank verpflichtet.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

[REDACTED]