

Microscopia confocal

**Fundamentos de la técnica
Implementaciones de campo lejano**

Presentación para la materia Nano-óptica

Víctor A. Bettachini

16 de Setiembre de 2010

Point Spread Function en plano imagen ($z = 0$, $x, y \perp \hat{z}$)

Haces Gaussianos en aproximación paraxial.

$$\vec{\mu} \perp \hat{z}$$

$$\lim_{\theta_{\max} \ll \pi/2} |\mathbf{E}(x, y, z=0)|^2 = \frac{\pi^4}{\varepsilon_0^2 n n'} \frac{\mu_x^2}{\lambda^6} \frac{NA^4}{M^2} \left[2 \frac{J_1(2\pi \tilde{\rho})}{(2\pi \tilde{\rho})} \right]^2, \quad \tilde{\rho} = \frac{NA\rho}{M\lambda}$$

- *Disco de Airy*: elíptico $\Delta_x > \Delta_y$, entre primeros mínimos

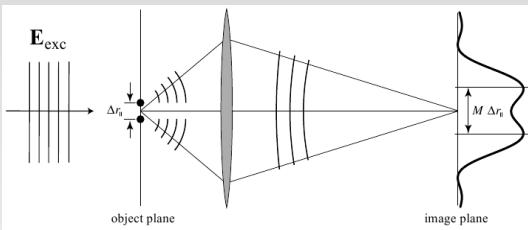
$$\Delta_x = 0,6098 \frac{M\lambda}{NA}$$

$$\vec{\mu} \parallel \hat{z}$$

$$\lim_{\theta_{\max} \ll \pi/2} |\mathbf{E}(x, y, z=0)|^2 = \frac{\pi^4}{\varepsilon_0^2 n^3 n'} \frac{\mu_z^2}{\lambda^6} \frac{NA^6}{M^2} \left[2 \frac{J_2(2\pi \tilde{\rho})}{(2\pi \tilde{\rho})} \right]^2, \quad \tilde{\rho} = \frac{NA\rho}{M\lambda}$$

- no tiene componente $\parallel \hat{z}$
- $\Delta_x(\vec{\mu} \parallel \hat{z}) > \Delta_x(\vec{\mu} \perp \hat{z})$

Límite de resolución lateral

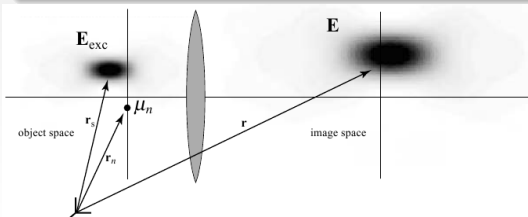


Illuminando toda la muestra:
 Δ_x disco de Airy /
 magnificación lateral M
 (Abbe)

$$\text{Min} \Delta r_{||} = 0,6098 \frac{\lambda}{NA}$$

Confocal de alta resolución lateral: Ingeniería de la PSF

- Barrer muestra con \vec{E}_{exc} que excite un $\vec{\mu}$ a la vez
- Se quiere: extensión de $\vec{E}_{exc} \leq \Delta r_{||}$ separación dipolos a resolver

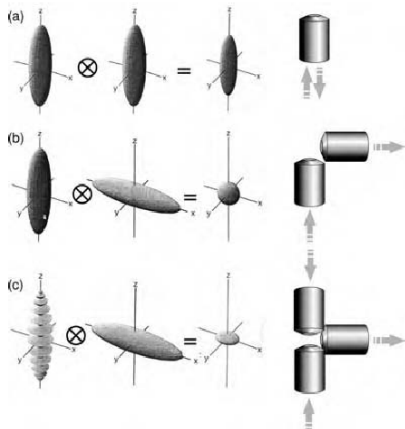


$$\vec{\mu} = f[\text{material}, \vec{E}_{exc}(\vec{r}_s - \vec{r}_n)]$$

\vec{r}_s fijo $\Rightarrow s = \int d\vec{r} |\vec{E}(\vec{r})|^2$ en
 plano imagen, depende de \vec{r}_n

Ingeniería de PSF: PSF Total = PSF Excitación \otimes PSF Detección

Configuraciones



Reproducido de: Principles of Nano-Optics, L. Novotny y B. Hecht, Cambridge University Press, 2006

Técnicas de ingeniería

- Interacciones no-lineales
- desplazamiento espacial una PSF respecto a la otra
- Interferencia de haces coherentes contra-propagantes

Mejoras

- Resolución
- Contraste

Point Spread Function: aproximación paraxial en eje \hat{z}

$$\mu \perp \hat{z}$$

$$\lim_{\theta_{\max} \ll \pi/2} |\mathbf{E}(x=0, y=0, z)|^2 = \frac{\pi^4}{\varepsilon_0^2 n n'} \frac{\mu_x^2}{\lambda^6} \frac{NA^4}{M^2} \left[\frac{\sin(\pi \tilde{z})}{(\pi \tilde{z})} \right]^2, \quad \tilde{z} = \frac{NA^2 z}{2n' M^2 \lambda}$$

$$\Delta_z = 2n' \frac{M^2 \lambda}{NA^2} \gg \Delta_x$$

- $M = 60 \times NA = 1,4 \lambda = 500 \text{ nm} \Rightarrow \Delta_x \approx 13 \mu\text{m} \Delta_z \approx 1,8 \text{ mm}$

Barriendo la muestra: $\vec{\mu}$ en el eje axial

$s = \int d\vec{r} |\vec{E}(\vec{r})|^2$ en plano imagen de $\vec{\mu}$ en eje \hat{z} , no depende de z

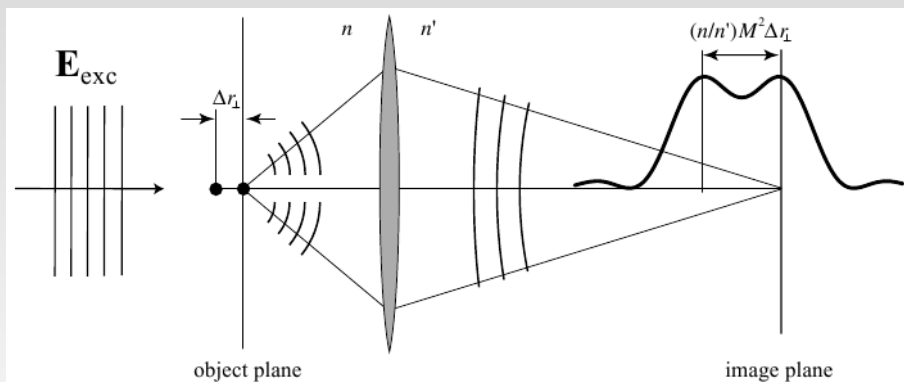
$$\begin{aligned} s_1(z) &\equiv \int_0^{2\pi} \int_0^{\infty} \mathbf{E}(\rho, \varphi, z) \mathbf{E}^*(\rho, \varphi, z) \rho \, d\rho \, d\varphi & (4.27) \\ &= \frac{\pi^4 n}{24 \varepsilon_0^2 \lambda^4 n'} \left[(\mu_x^2 + \mu_y^2) (28 - 12 \cos \theta_{\max} - 12 \cos^2 \theta_{\max} - 4 \cos^3 \theta_{\max}) \right. \\ &\quad \left. + \mu_z^2 (8 - 9 \cos \theta_{\max} + \cos 3\theta_{\max}) \right]. \end{aligned}$$

Filtrando en el plano imagen con un *pinhole* de radio del orden de Δ_x

$$\begin{aligned} s_2(z) &\equiv \mathbf{E}(\rho = 0, z) \mathbf{E}^*(\rho = 0, z) \, dA \\ &= \frac{\pi^4}{\varepsilon_0^2 n n'} \frac{\mu_x^2 + \mu_y^2}{\lambda^6} \frac{NA^4}{M^2} \left[\frac{\sin(\pi \tilde{z})}{(\pi \tilde{z})} \right]^2 \, dA, \quad \tilde{z} = \frac{NA^2 z}{2n' M^2 \lambda} \end{aligned}$$

- Hay dependencia en $z \Rightarrow$ resolución en z
- Pero $\vec{\mu} \parallel \hat{z}$ es invisible

Resolución axial del confocal



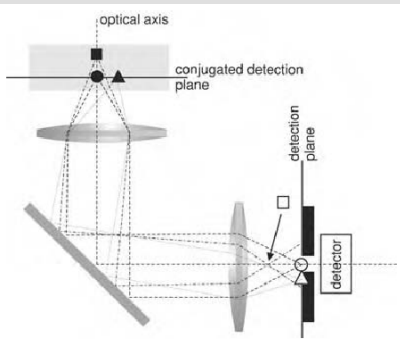
Reproducido de: Principles of Nano-Optics, L. Novotny y B. Hecht, Cambridge University Press, 2006

En plano imagen: $s_2(z)$ max para $\vec{\mu} @ z = 0$ y min para $\vec{\mu} @ z = \Delta r_{\perp}$

$$s_2(z) \propto \frac{\sin^2[\pi NA^2 \Delta r_{\perp} / 2n\lambda]}{[\pi NA^2 \Delta r_{\perp} / 2n\lambda]^2} \Rightarrow \text{Min}[\Delta r_{\perp}] = 2 \frac{n\lambda}{NA^2} \text{ Profundidad focal}$$

$(n = 1,515 \quad NA = 1,4 \quad \lambda = 500 \text{ nm} \Rightarrow \text{Profundidad focal} \sim 0,8 \mu\text{m})$

Principio confocal



- círculo: en el eje óptico en el plano de detección conjugado en el espacio objeto forma imagen en el *pinhole* y es detectado
- triángulo: es enfocado a un lado del *pinhole*
- cuadrado: imagen fuera de foco en *pinhole*, se suprime su señal

Hace máximo uso del limitado ancho de banda impuesto por iluminación y detección de campo lejano

Principios: veamos las cuentas

Cálculos para obtener $s_2 = s_2(\vec{r}_n)$

① \vec{E}_{exc} en espacio objeto: PSF de excitación

② Interacción: generación de $\vec{\mu}_n(\omega) = \vec{\alpha} \vec{E}_{exc}(\mathbf{r}_n, \omega)$

③ \vec{E} en espacio imagen: PSF de detección $\mathbf{E}(\mathbf{r}) = \frac{\omega^2}{\epsilon_0 c^2} \vec{\mathbf{G}}_{PSF} \cdot \vec{\mu}_n$

④ Señal de \vec{r}_n $s_2(x_n, y_n, z_n) = |\mathbf{E}(x_n M, y_n M, z_n M^2 n' / n)|^2 dA$

$$s_2(x_n, y_n, z_n) = \frac{\omega^4}{\epsilon_0^2 c^4} \left| \vec{\mathbf{G}}_{PSF}(\rho_n, \varphi_n, z_n) \cdot \vec{\mu}_n \right|^2 dA$$

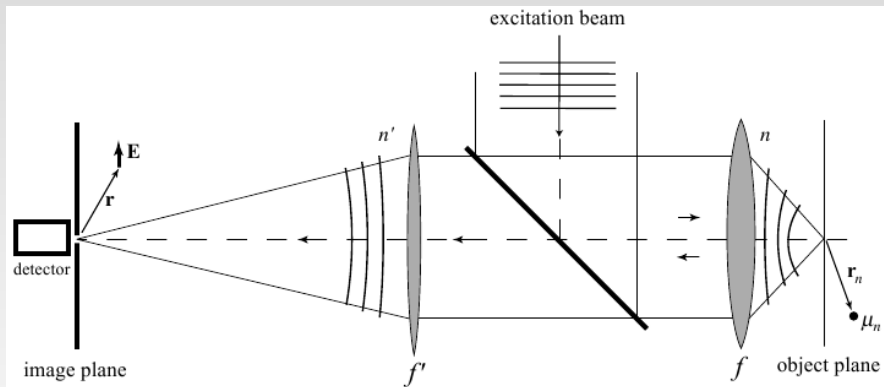
$$\vec{\mathbf{G}}_{PSF}(\rho_n, \varphi_n, z_n) \propto \frac{k}{8\pi} \frac{1}{M} \begin{bmatrix} (\tilde{I}_{00} + \tilde{I}_{02} \cos 2\varphi_n) & \tilde{I}_{02} \sin 2\varphi_n & -2i\tilde{I}_{01} \cos \varphi_n \\ \tilde{I}_{02} \sin 2\varphi_n & (\tilde{I}_{00} - \tilde{I}_{02} \cos 2\varphi_n) & -2i\tilde{I}_{01} \sin \varphi_n \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad \vec{\mu}_n(\omega) = ik f E_0 e^{-ikf} \frac{1}{2} \begin{bmatrix} \alpha_{xx}(I_{00} + I_{02} \cos 2\varphi_n) \\ \alpha_{yy}(I_{02} \sin 2\varphi_n) \\ \alpha_{zz}(-2iI_{01} \cos \varphi_n) \sqrt{\frac{n'}{n}} \end{bmatrix}$$

⑤ Asumiendo $|I_{00}| \gg |I_{0x}|$ $s_2(x_n, y_n, z_n; \omega) \propto |\alpha_{xx} I_{00}^2|^2 dA$

vs. $s_1(x_n, y_n, z_n; \omega) \propto |\alpha_{xx} I_{00}|^2 dA$ (microscopia ordinaria)

\Rightarrow PSF confocal = PSF ordinaria²

Dispositivo de microscopia confocal: en forma esquemática

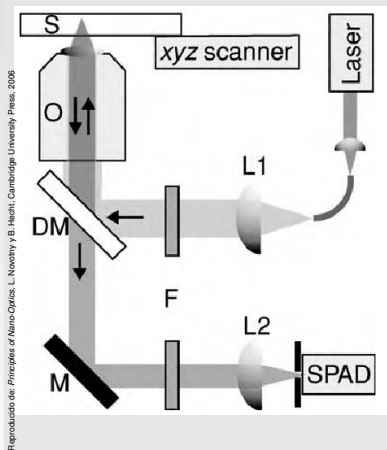


Reproducido de: Principles of Nano-Optics, L. Novotny y B. Hecht, Cambridge University Press, 2008

elementos centrales

- Haz gaussiano de excitación que “sobrellena” el objetivo
- Objetivo (alta NA) enfoca haz \Rightarrow confinamiento espacial
- Mismo objetivo recoge respuesta que es enfocada en *pinhole*

Dispositivo de microscopia confocal: armado usual



elementos

- *Pinhole* o Fibra: filtra haz para darle perfil Gaussiano
- L1: lentes coliman haz excitación
- Beamsplitter / Dicroico (DM): Sobrellenan objetivo (O) de alta NA
- Barredor xyz: mueve muestra respecto al foco
- *Single Photon Avalanche Photodiode*: Registra señal encauzada por O y L2/M a través de *pinhole*

Marvin Minsky



Obra

- Patente del microscopio confocal (1955)
- Coautor con Seymour Papert de “Perceptrones”, que redefinió el estudio de redes neuronales artificiales (1969)
- Con Papert (inventor del lenguaje LOGO) creo la primer “tortuga robot LOGO” para educación, en base a estudios de Piaget
- “Pope” del área de inteligencia artificial, director vitalicio del grupo de IA en el MIT