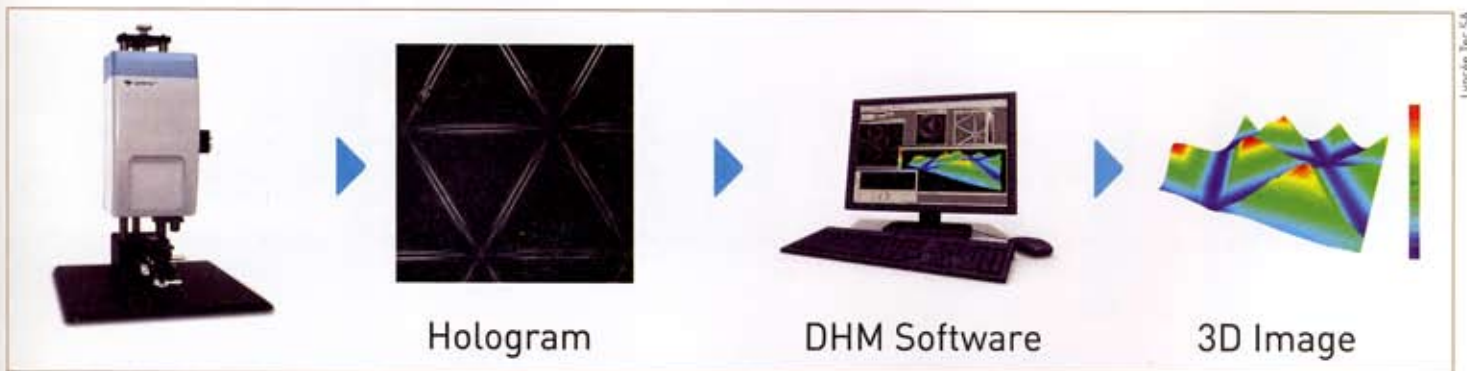


Ein Mikroskop der Superlative

Von Jean-Jacques Daetwyler*



(1.) Prinzip des Digitalen Holografischen Mikroskops (DHM).

Das Digitale Holografische Mikroskop liefert in einem Sekundenbruchteil 3D-Bilder berührungsfrei mit einer Höhenauflösung von einem Nanometer. Diese Technologie aus der Forschung der ETH Lausanne, die heute von einer Start-up-Firma vermarktet wird, kann sowohl in der Forschung wie auch in der Industrie eingesetzt werden, für Anwendungen in der Mikro- und Nanotechnologie sowie in den Materialwissenschaften und der Biologie.

Die Holografie, 1947 von Dennis Gabor erfunden (Nobelpreis 1971), hat inzwischen Anwendungen in zahlreichen Bereichen gefunden. Bekannte Beispiele sind die Aufnahme, Speicherung und Wiedergabe dreidimensionaler Bilder oder noch das Sichtbarmachen von Verformungen, die Gegenstände unter verschiedenartigen Belastungen erfahren. Neuerdings wird das Verfahren auch in der Mikroskopie genutzt. Seit rund zehn Jahren ist an der ETH Lausanne das Laboratorium für angewandte Optik in diese Richtung tätig und hat dabei Pionierarbeit geleistet. Die Forschung wurde in Zusammenarbeit mit dem physiologischen Institut der Universität Lausanne durchgeführt. Es besteht nicht nur in der Mikro- und Nanotechnologie, sondern auch bei den Biologen ein Interesse für ein effizientes Verfahren, mit dem in der Mikroskopie dreidimensionale Bilder bester Qualität effizient erhalten werden können.

Aus diesen Bemühungen ist eine Technologie entstanden, welche die industrielle Reife erreicht und zu einem innovativen Produkt geführt hat: das Digitale Holografische Mikroskop (DHM). Für dieses Gerät wurden die Entwickler anlässlich des Swiss Technology Award ausgezeichnet. Das DHM wurde Ende April zudem an der Hannover Messe ausgestellt. Es wird in zwei Versionen (Reflexion und Transmission) mit der zugehörigen Software ausgeführt. Das DHM wird von der vor drei Jahren als Start-up-Unternehmen gegründeten Firma Lyncée Tec SA vermarktet.

Wellenfront aus Hologramm rekonstruiert

Das DHM liefert auf dem Bildschirm eine «topografische» Ansicht der Probenoberfläche mit einer aussergewöhnlich starken Höhenauflösung (d. h. Auflösung längs der optischen Achse) von rund einem Nanometer. Das Verfahren funktioniert im Wesentlichen wie folgt: Eine Laserquelle schwacher Intensität (sichtbares Licht oder nahes Infrarot) beleuchtet die Probe und liefert auch den Referenzstrahl, der mit dem Licht, das die Probe reflektiert oder durchlässt, zu einem Hologramm interferiert. Dieses wird von einer CCD-Kamera erfasst. Aus dem digitalisierten Bildsignal wird dann computertechnisch das dreidimensionale Bild rekonstruiert. «Diese Rekonstruktion ist auch die eigentliche Herausforderung bei der Entwicklung

des Verfahrens gewesen», erklärt Dr. Christian Depeursinge, Professor am Laboratorium für angewandte Optik: «Es geht hier um viel mehr als nur die digitale Bildverarbeitung. Die Software berechnet aus dem Hologramm die Wellenfront als komplexe Zahl, die zwei Informationen umfasst: die Amplitude, welche die Helligkeit darstellt, und die Phase, welche die Topologie beschreibt.»

Die Lateralauflösung (also die Auflösung senkrecht zur optischen Achse) ist beim DHM vergleichbar mit derjenigen eines üblichen Lichtmikroskops: je nach Objektiv bis 300 Nanometer in Öl. Die Höhenauflösung hingegen ist viel höher: bis 0,6 Nanometer in Luft. «Dies ist rund hundert Mal höher als beim Lichtmikroskop», betont Christian Depeursinge. «Höhenunterschiede der untersuchten Oberfläche von einigen Nanometern können beobachtet und gemessen werden, zum Beispiel winzige Verformungen auf der Membran einer Nervenzelle oder winzige Defekte einer Halbleiteroberfläche. Dies ist mit keiner anderen Methode berührungsfrei und ohne Präparation möglich.»

«Filmen» rascher Vorgänge

Ein weiterer Vorteil ist nämlich, dass bei der Untersuchung die Probe nicht berührt wird. Es ist auch keine Vorbehandlung, Fixierung oder Färbung derselben nötig. Die Beobachtung findet ferner bei einer extrem tiefen Leuchtstärke statt: Diese ist 10 000 Mal geringer als beim konfokalen Mikroskop, ei-

nem Standardgerät für nicht invasive 3D-Mikroskopie. So besteht praktisch keine Fototoxizität. Dies ermöglicht Langzeitbeobachtungen von Zellkulturen über Hunderte von Stunden, ohne dass die Entwicklung und das Verhalten des lebendigen Materials merklich beeinträchtigt oder beeinflusst werden.

Bemerkenswert ist ferner die schnelle Erzeugung der Bilder in einer Zeit von weniger als 20 Mikrosekunden. Eine Folge davon ist, dass die Bildqualität kaum von Vibrationen aus der Umgebung beeinflusst wird. Die kurze Entstehungszeit der Bilder ermöglicht auch rasche Folgen von Aufnahmen, um dy-

namische Prozesse zu beobachten. Die Frequenz von zehn Bildern pro Sekunde bei Beobachtungen in Echtzeit kann mit einer passenden Kamera bis auf über 10 000 Aufnahmen je Sekunde während einiger Sekunden erhöht werden, womit schnelle transitorische Phänomene «gefilmt» werden können. Auch

Vielfältige Anwendungsmöglichkeiten

Mit der DHM-Technologie der Lyncée Tec SA können erstmals Mikroskope hergestellt werden, die in Echtzeit und berührungsfrei 3D-Beobachtungen mit einer Höhengauflösung im Nanometerbereich ermöglichen. Für solche Mikroskope gibt es vielfältige Anwendungen:

Industrielle Metrologie

Aufgrund der hohen Bilderrate und der Digitalisierung lässt sich die DHM-Technologie gut in Produktionslinien diverser Industriezweige (z. B. medizinische Technik, Uhren, Autos, Luft- und Raumfahrt) integrieren. Geeignet ist sie insbesondere für automatisierte Qualitätskontrollen der Ebenheit, der Dimensionen und der Oberflächenbeschaffenheit sowohl von durchsichtigen als auch von reflektierenden Bauteilen.

Halbleiter

Kontaktlos und zerstörungsfrei lassen sich beispielsweise die Ebenheit einer Siliziumscheibe messen, Kratzer und andere Oberflächendefekte aufdecken, die Homogenität der Beschichtung kontrollieren.

Mikrooptik

Die frühzeitige Feststellung defekter mikrooptischer Komponenten (optische Gitter, Mikroprismen u. Ä.) hilft, Kosten zu sparen, da ein fehlerhafter Bestandteil dann das ganze Produkt unbrauchbar macht. Das Verfahren ist sehr schnell: Die Prüfung einer Mikrolinse (Messung der Krümmung der Linse und Kontrolle deren Oberfläche) lässt sich beispielsweise in 0,1 s durchführen.

Mikro- und Mikrooptoelektromechanische Systeme (MEMS und MOEMS)

Das DHM ist ohnegleichen, um bewegliche Teile von MEMS und MOEMS in Echtzeit zu beobachten, so beispielsweise Mikropumpen, Beschleunigungssensoren, Mikrospiegel von Videoprojektoren. Bei sehr schnellen Bewegungen können bis über 10 000 Bilder pro Sekunde aufgenommen werden.

Oberflächenanalysen

Dicke, Rauheit, Ebenheit und generell die Topografie einer Oberfläche können dank der starken Höhengauflösung des DHM mit grosser Präzision untersucht werden, dies auch grossflächig und sowohl bei organischen als auch bei nichtorganischen Materialien, zerstörungsfrei und ohne vorherige Präparation.

Materialwissenschaften

Dank ihrer starken Höhengauflösung können mit der DHM-Technologie auch geringe Änderungen des Brechungsindex, die von Defekten im Kristallgitter durchsichtiger Proben hervorgerufen werden, sehr empfindlich festgestellt werden.

Oberflächenrauheit

Dank seiner starken Höhengauflösung ermöglicht das DHM eine detaillierte Untersuchung der Oberflächenbeschaffenheit so-

wohl von harten als auch von weichen Materialien. Auch Profile der Oberflächentopografie können im Nu hergestellt werden.

Mikroinjektion

Fehlerhafte Mikroinjektionsteile können das ganze System, in dem sie integriert werden, unbrauchbar machen. Da solche Systeme (z. B. in der Medizintechnik) oft teuer sind, ist für die Mikroinjektion eine hundertprozentige Qualitätskontrolle erforderlich. Das DHM ist eine benutzerfreundliche Technologie für eine effiziente und schnelle Prüfung solcher Komponenten.

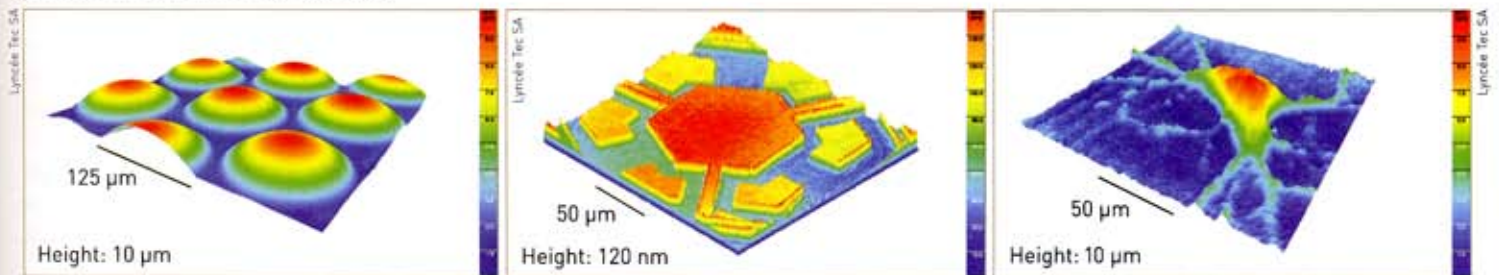
Markerfreie Qualitätskontrolle von Biochips

DNA-Moleküle auf dem Chip werden durch ihren Brechungsindex identifiziert. Eine vorherige Markierung erübrigt sich.

Biowissenschaften

Das DMH bietet einmalige Eigenschaften für die Untersuchung biologischer Proben. Das Verfahren ist nicht invasiv (erfordert auch keine Färbung der Probe und kein Kontrastmittel) und benötigt eine 100 000 Mal geringere Lichtintensität als konfokale Mikroskope. Zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten finden sich in der Zellbiologie, in der Diagnostik, in der Genomik und in der Proteomik wie auch in der Lebensmittelindustrie sowie für systematisches Screening.

(l.) Aufnahme von Mikrolinsen aus Silizium. (m.) Untersuchung von Oberflächenverformungen bei MEMS. (r.) DHM-Bild einer Nervenzelle, gemessen an der Universität Lausanne.



eine so hohe Frequenz erreichen konfokale Mikroskope nicht, da diese die Probe mit einem Lichtspot scannen, was ein ziemlich zeitaufwändiges Vorgehen ist.

Auch Einsatz für automatisierte Qualitätskontrolle

Bei der Entwicklung des DHM am Laboratorium für angewandte Optik standen anfänglich die Bedürfnisse der Biologen im Vordergrund. Doch dieses neue Verfahren kennt im Moment den grösseren Einklang für Einsätze ausserhalb des biologischen Bereichs, für Anwendungen in Mikro- und Nanotechnologie, in Materialwissenschaften und dergleichen. Das DHM eignet sich gut für die Qualitätskontrolle von Bestandteilen in der Mikrooptik, Mikromechanik, Uhrtechnologie, Chipherstellung und in weiteren technischen und industriellen Produktionen, bei denen eine sehr hohe, sogar hundertprozentige Qualitätsgarantie erfordert wird. Da es die Bilder in digitaler Form liefert, lässt es sich auch in automatischen Systemen zur restlosen Qualitätskontrolle eingliedern.

Dass der Durchbruch des DHM im biologischen Bereich auf sich warten lässt, habe damit zu tun, vermutet Christian Depeursinge, dass DHM-Bilder vielen Biologen eher fremd erscheinen: Diese müssten erst erfahren, wie sie die neuartigen Bilder interpretieren sollen, um daraus aufschlussreiche biologische Information zu erhalten. Zurzeit wird in der Biologie viel mit fluoreszierenden Markers gearbeitet. Im heutigen Stand kann mit dem DHM keine Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden. Letztere liefert eine funktionelle, das DHM eine morphologische Infor-

mation – beide Verfahren könnten sich aber nutzbringend ergänzen. Ein entsprechendes Produkt von Lyncée Tec SA wird voraussichtlich noch dieses Jahr auf den Markt kommen.

Die DHM-Technologie hat noch ein grosses Entwicklungspotenzial. Auch am Laboratorium für angewandte Optik der ETH Lausanne wird an der Technologie weitergeforscht. Da ist unter anderen ein Verfahren entwickelt und patentiert worden, mit dem die Digitale Holografische Mikroskopie ähn-

lich wie in der Computertomografie zum Scannen mikroskopischer Proben eingesetzt wird. Das Labor präsentiert sich somit als Brutstätte für zukünftige Anwendungen der Digitalen Holografischen Mikroskopie. Die Erfahrung und Technologie wird zum Teil in neue Generationen von Mikroskopieanlagen im Dienste der Forschung und der Industrie einfließen. ■

**Dr. Jean-Jacques Daetwyler, Wissenschaftsjournalist, Bern, sciencepress@bluewin.ch*

Lyncée Tec: Profil eines Start-ups

Die DHM-Technologie aus der Forschung der ETH Lausanne wird von der Lyncée Tec SA in Produkten verwertet. Aufgabe des 2003 gegründeten Start-ups ist die Entwicklung, Herstellung und Vermarktung neuer bildgebender Systeme, die auf dieser Technologie beruhen. Vier der fünf Gründungsmitglieder waren selbst an der Erfindung des DHM beteiligt. Die Weiterentwicklung der Technologie und ihrer Anwendungen erfolgt weiterhin in Zusammenarbeit mit dem Labor für angewandte Optik wie auch mit der Fakultät der «Lebenswissenschaften» an der ETH Lausanne (Gruppe von Professor Dr. Pierre Magistretti). «Wir haben zwei Märkte im Visier: einerseits den F&E-Bereich und andererseits die Qualitätskontrolle bei der Produktion spezifischer Komponenten», erklärt Yves Emery, CEO der Firma. Diese bietet das Mikroskop in zwei verschiedenen Versionen an: die eine für die Beobachtung von Proben im Reflexionsmodus, die andere für die Untersuchung durchsichtiger Proben im Transmissionsmodus. Sie liefert auch die zugehörigen Softwares. Kostenpunkt: rund 150 000 Franken für das Basissystem für F&E.

Die Firma ist im Parc scientifique der ETHL in Ecublens niedergelassen, zählt heute zehn Mitarbeiter und ist in zwanzig Ländern auf drei Kontinenten (Europa, Asien und Nordamerika) vertreten. Für die Startphase erhielt die Firma die Unterstützung der Programme «TopNano 21» und «Nano Micro» der KTI. Sie hat ihre Technologie unter anderem an der NanoEurope 2005 in St. Gallen präsentiert, an der Nanotech 2005 in Montreux, an der Photonics Europe in Strassburg im letzten April, an der Hannover Messe ebenfalls im April als Preisträgerin des Swiss Technology Award, an der EPHJ (Salon International Environnement Professionnel Horlogerie – Joaillerie) im Mai in Lausanne.