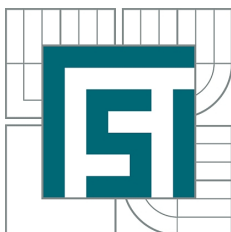


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

KOMPONENTY PRO LASEROVOU MIKROMANIPULACI V KOHERENCÍ RÍZENÉM DIGITÁLNÍM HOLOGRAFICKÉM MIKROSKOPU

COMPONENTS FOR LASER MICROMANIPULATION IN A COHERENCE-CONTROLLED
DIGITAL HOLOGRAPHIC MICROSCOPE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

BRANISLAV STRAKA

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. ZBYNĚK DOSTÁL

Abstrakt

V bakalárskej práci bol popísaný obecný princíp fungovania optickej pasce, spolu s rôznymi možnosťami vytvorenia optickej pinzety. Taktiež bola popísaná funkcia a hlavné parametre holografických mikroskopov s mimoosovým achromatickým a priestorovo invariantným interferometrom. Boli navrhnuté, podrobne popísané a prepočítané dva varianty laserovej pinzety pripojiteľnej ku koherenciou riadenému holografickému mikroskopu druhej generácie, ktorý bol skonštruovaný na ÚFI VUT v Brne. Bola spravená ich optimalizácia v programe ZEMAX. Pre vybraný návrh bol vytvorený 3D model v programe Autodesk Inventor PROFESSIONAL 2010.

Summary

In the Bachelor's thesis, there was described the general principle of operation of the optical trap, along with various options for creating optical tweezers. The function and the main parameters of holographic microscope with the off-axis achromatic and spatially invariant interferometer were described, too. Two variations of laser tweezers connectable to coherence-controlled second generation holographic microscope were described in detail, calculated and designed at IPE VUT. The optimization of the two variations was performed in the software ZEMAX. A 3D model in the Autodesk Inventor PROFESSIONAL 2010 was created for the chosen design.

Klíčová slova

Optická pinzeta, koherenciou riadený holografický mikroskop, laserové mikromanipulačné techniky, návrh.

Keywords

Optical tweezer, coherence-controlled holographic microscope, laser micromanipulation techniques, design

STRAKA, B. *KOMPONENTY PRO LASEROVOU MIKROMANIPULACI V KOHERENCÍ RÍZENÉM DIGITÁLNÍM HOLOGRAFICKÉM MIKROSKOPU*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2011. 57 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Zbyněk Dostál.

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne pod vedením Ing. Zbyňka Dostála, a že všetky podklady, z ktorých som čerpal, sú uvedené v zozname literatúry.

Branislav Straka

Rád by som poďakoval Ing. Zbyňkovi Dostálovi za odborné vedenie práce, cenné pripomienky, časté konzultácie a rady. Taktiež ďakujem Ing. Tomášovi Slabému a Ing. Mojmirovi Šerému, Ph.D. za konzultácie a rady.

Branislav Straka

Obsah

1 Úvod	13
2 Optická pinzeta	14
2.1 História optickej pasce a pinzety	14
2.2 Princíp fungovania a veľkosť sily pôsobiacej na časticu v optickej pasci . . .	14
2.3 Základná optická schéma optickej pasce	17
2.4 Manipulácia s objektom v opticej pasci - optická pinzeta	18
2.4.1 Laserová pinzeta vytvorená pohyblivými šošovkami	18
2.4.2 Laserová pinzeta vytvorená naklápacími zrkadlami	20
2.4.3 Priestorové modulátory svetla a holografická laserová pinzeta	20
3 Koherenciou riadená holografická mikroskopia	23
3.1 História interferenčnej a holografickej mikroskopie	23
3.2 Koherenciou riadený holografický mikroskop prvej generácie	24
3.3 Druhá generácia CCHM	27
4 Návrh laserovej pinzety pre CCHM druhej generácie	31
4.1 Laserová pinzeta polohovaná galvanooptickými zrkadlami	32
4.1.1 Výpočet parametrov laserovej pinzety	33
4.1.2 Návrh komponentov pre laserovu pinzetu	34
4.2 Laserová pinzeta polohovaná pohybom optického vlákna	40
4.2.1 Výpočet parametrov laserovej pinzety	40
4.2.2 Návrh komponentov pre laserovu pinzetu	42
4.3 Porovnanie návrhov laserovej pinzety pre CCHM druhej generácie	47
4.4 Mechanický návrh laserovej pinzety polohovanej GO zrkadlami	47
5 Záver	51
Literatúra	51
Zoznam použitých skratiek a symbolov	54
Zoznam príloh	57

1. Úvod

Transparentné biologické preparáty sa zriedka pozorujú v svetlom poli. Hlavným dôvodom je rozptyl a odraz svetla na pozorovaných objektoch čo má za následok nízku kvalitu obrazu vzorky. Preto sa často v biológii stretávame s interferenčnou mikroskopiou.

Interferenčná mikroskopia umožňuje pozorovanie tzv. fázových objektov, ktoré sú v klasických mikroskopoch sú zle pozorovateľné. Pri prechode svetla fázovým objektom sa mení jeho fáza a zachováva sa amplitúda svetelnej vlny. Na VUT v Brne bolo navrhnutých a zkonštruovaných niekoľko typov holografických mikroskopov.

Najnovšie vyvíjaný holografický mikroskop umožňuje pracovať jak v transmisnom, tak v reflexnom režime. Ide o koherenciou riadený holografický mikroskop druhej generácie. Hlavnou zmenou oproti predchádzajúcej generácii je možnosť použitia mikroskopových objektívov korigovaných na nekonečnú vzdialenosť. Táto zmena umožnila pripojenie ďalších pozorovacích a manipulačných techník.

Cielom bakalárskej práce je navrhnúť laserovú pinzetu, ktorá by tvorila samostatný modul pripojiteľný ku koherenciou riadenému holografickému mikroskopu druhej generácie. Laserová pinzeta umožní mechanickú manipuláciu s pozorovanými objektami - bunkami.

V kapitole 2 je uvedená história, vysvetlený princíp a sily pôsobiace v optickej pasci. V závere kapitoly sú popísané najbežnejšie metódy pri vytváraní optických pinziat.

Kapitola 3 je venovaná interferenčnej mikroskopii a hlavne koherenciou riadeným holografickým mikroskopom. V časti 3.2 je popísaným princíp fungovania prvej generácie a naznačený spôsob spracovania obrazu, ktorý je rovnaký aj pre druhú generáciu. Časť 3.3 pojednáva o koherenciou riadenom holografickom mikroskope druhej generácie, pre ktorý je v bakalárskej práci navrhovaná laserová pinzeta.

Celá kapitola 4 je venovaná samotnému návrhu laserovej pinzety. V prvej časti sú podrobne popísané a teoreticky napočítané dva návrhy. V ďalšej časti je optický návrh oboch zostáv s vybranými komponentami v programe ZEMAX[®]. V závere kapitoly je uvedený mechanický návrh vybranej laserovej pinzety a zobrazený jej 3D model vytvorený v programe Autodesk[®] Inventor[®] PROFESSIONAL 2010.

2. Optická pinzeta

2.1. História optickej pasce a pinzety

Optická pinzeta je nástroj, ktorý využíva energiu svetla na zachytenie a manipuláciu s veľmi malými objektami, ktorých rozmery sa môžu pohybovať od desiatok nm až po desiatky μm . Optické sily sú vyvolané zmenou priestorového rozloženia elektromagnetického poľa, ktorá je spôsobená zachyteným objektom.

Mechanické účinky žiarenia sú tak slabé, že prvý experimentálny dôkaz bol podaný až na prelome 19. a 20. storočia. Vedci E. F. Nicholson, G. F. Hull a P. N. Lebedev ako prví úspešne pozorovali radiačný tlak na makroskopické objekty¹. Skúmanie a praktické využitie síl vyvolaných žiarením začalo až po objavení laseru v roku 1960.

V roku 1970 Arthur Ashkin ako prvý uskutočnil experiment, v ktorom preukázal značný efekt fokusovaného laserového zväzku na hybnosť malej transparentnej neutrálnej častice. Až po viac ako 15 rokoch bola zkonštruovaná prvá jednozväzková optická pasca, v ktorej sa podarilo zachytiť časticu v silno fokusovanom laserovom zväzku [1].

Optická pinzeta našla uplatnenie vo veľkom množstve vedných odborov. Napríklad v chémii je používaná na meranie mechanických vlastností molekúl [2], v biológii na štúdium živých buniek [3], biologických motorov [4], vlastností DNA. V medicíne je optická pinzeta používaná pri umelom oplodnení. Vo fyzike patrí k najznámejším experimentom, ktoré využívajú optickú pascu, chladenie atómov na veľmi nízke teploty, za čo bola v roku 1997 udelená Nobelova cena S. Chuovi, C. Cohen-Tannoudjiovi a W. D. Phillipsovi.

2.2. Princíp fungovania a veľkosť sily pôsobiacej na časticu v optickej pasci

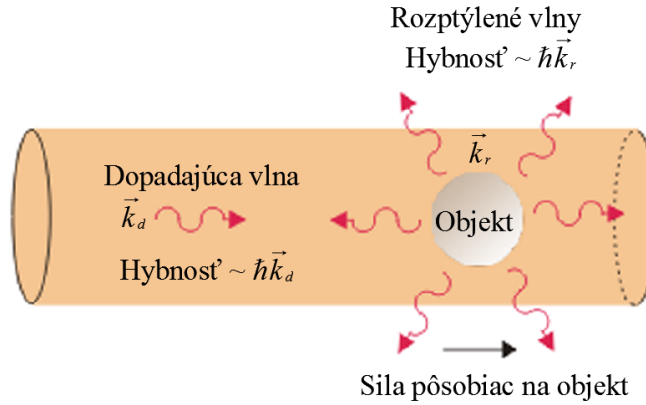
Jednoduchým výpočtom je možné aspoň rádovo odhadnúť sily vyvolané radiačným tlakom žiarenia. Hybnosť jedného fotónu je daná Planckovým výrazom $h\nu/c$, kde h je Planckova konštanta, ν je frekvencia žiarenia a c je rýchlosť svetla. Ak použijeme zdroj svetla s výkonom P_s , tak počet fotónov vyžiarených za jednu sekundu je $P/h\nu$. Pri použití modelu, kde sa všetky fotóny dopadajúce na objekt odrazia priamo naspäť, je zmena ich hybnosti za sekundu rovná $2(h\nu/c)(P/h\nu) = 2P/c$. Tento výraz zároveň určuje silu F , ktorá pôsobí na objekt. Pri použití zdroja svetla s výkonom 1 wat sa F približne rovná 10 nN (výpočet bol prevzatý z [5]).

Na vytvorenie optickej pasce je nutné, aby optické sily pôsobiace na uväznenú časticu boli väčšie ako sily, ktoré nútia časticu k zmene polohy. Aby bola vytvorená stabilná pasca v troch rozmeroch je nutné vytvoriť značný gradient intenzity žiarenia, napríklad pomocou objektívu s veľkou numerickou apertúrou.

Z teoretických dôvodov, ale aj praktických sa sily svetelného tlaku delia na gradientné a rozptylové. Gradientná sila pôsobí v smere gradientu intenzity zväzku, ak index lomu okolia častice je väčší ako index lomu zachyteného objektu a naopak. Jej veľkosť je úmerná veľkosti gradientu intenzity. Rozptylová sila je úmerná intenzite žiarenia a má jeho smer. Výslednú silu získame ako vektorový súčet rozptylovej a gradientnej sily.

¹Experiment je známy ako svetelný mlyn (light-mill)

Rozptylovú silu vyvoláva svetlo dopadajúce na časticu z jedného smeru, ktoré je následne rozptýlené všetkými smermi, tým fotóny menia hybnosť dielektrickej častice. V izotropnom prostredí sa po vektorovom sčítaní hybností rozptýlených fotónov ostane nenulová len hybnosť v smere dopadajúceho žiarenia (viz obr. 2.1). V blízkosti miesta, kde je laser fokusovaný sa objavuje aj gradientná sila. Laser indukuje dipóly v dielektrickej častici a pretože sú indukované dipóly umiestnené v nehomogénnom elektrickom poli pôsobí na ne sila v smere gradientu poľa².



Obr. 2.1: Častica pohlcuje fotóny v jednom smere a rozptyluje ich do všetkých smerov, čím je častica tlačaná v smere dopadajúceho svetla. $\hbar$ - redukovaná Planckova konštanta, $\vec{k}_d$ - vlnový vektor dopadajúcej vlny, $\vec{k}_r$ - vlnový vektor rozptýlenej vlny. Prevzaté a preložené z [6].

V závislosti na veľkosti častice, ktorá je chytená do opticej pasce, existujú dve priame a jedna obecná metóda pre výpočet rozptylovej a gradientnej sily. Všetky metódy považujú zachytenú časticu za guľovú.

Ak uväznená dielektrická častica splňuje podmienku $a \gg \lambda$, kde a je charakteristický rozmer častice (napr. charakteristickým rozmerom guľovej častice je polomer) a λ je vlnová dĺžka laseru vytvárajúceho optickú pascu, je možné optické sily vypočítať pomocou geometrickej optiky (viz obr. 2.2). Laserový lúč dopadajúci na časticu sa sčasti láme na rozhraní³ a sčasti sa odráža. Pomer energií odrazeného a lomeného lúča určujú Fresnelovy koeficienty. Pri prechode fotónu dopadajúceho žiarenia sa mení jeho hybnosť, čím je budená sila, ktorá smeruje do ohniska zväzku.

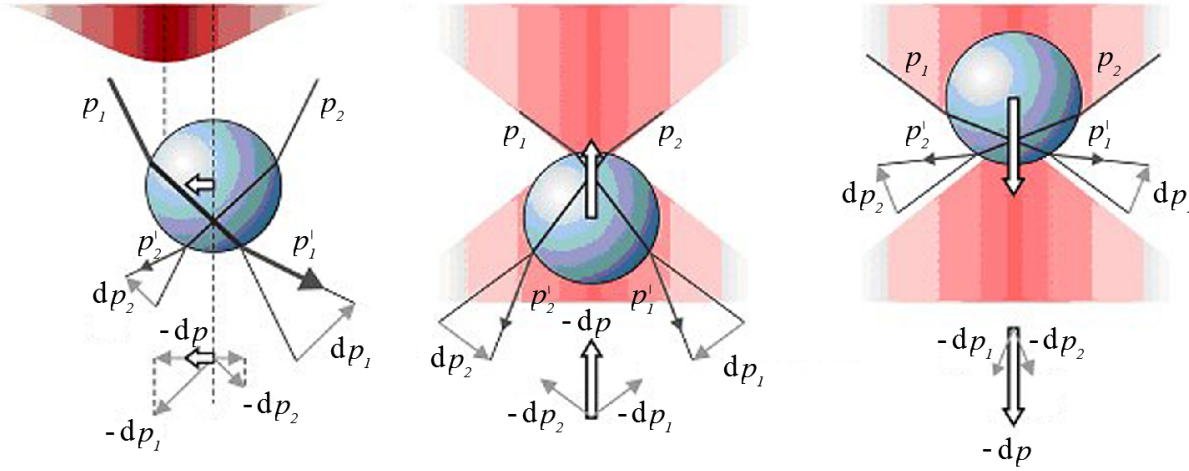
Pri časticiach, ktorých charakteristický rozmer je menší ako vlnová dĺžka dopadajúceho žiarenia už nie je možné používať aproximáciu geometrickej optiky. Aby bola splnená podmienka pre Raleighov rozptyl musí platiť: $a \ll \lambda$. V takomto prípade je možné považovať zachytenú časticu za bodový dipól. Pre rozptylovú silu F_{scatt} pôsobiacu na časticu tvaru gule s polomerom a podľa [7] platí:

$$F_{scatt} = \frac{I_0 \sigma n_m}{c}, \quad (2.1)$$

²V nehomogénnom elektrickom poli sa potenciálna energia dipólu mení v priestore v závislosti na zmene poľa. Sila je daná vzťahom $\vec{F} = -\nabla W_p$, kde W_p je potenciálna energia dipólu pre ktorú platí: $W_p = -\vec{p}\vec{E}$

³Lomený lúč leží v rovine dopadu a uhol lomu je daný Snellovým zákonom

2.2. PRINCÍP FUNGOVANIA A VELKOSŤ SILY PÔSOBIACEJ NA ČASTICU V OPTICKEJ PASCI



Obr. 2.2: Sily pôsobiace na transparentnú dielektrickú časticu umiestnenú v blízkosti fokusovaného laserového zväzku. p - hybnosť dopadajúceho fotónu, p' - hybnosť fotónu po prechode časticou, dp - zmena hybnosti fotónu vzniknutá pri prechode časticou. Zo zákona zachovania hybnosti častica získa hybnosť rovnakej veľkosti, ale opačného smeru, ktorá je na obrázku vyznačená ako biela šípka. Prevzaté a upravené z [8].

$$\sigma = \frac{128\pi^5 a^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2, \quad (2.2)$$

kde I_0 je intenzita dopadajúceho svetla, σ je rozptylový prierez častice, c je rýchlosť svetla vo vákuu, m je pomer indexov lomov častice n_p a média n_m ($m = n_p/n_m$) a λ je vlnová dĺžka laseru vytvárajúceho optickú pascu. Pre časovo stredovanú hodnotu gradientnej sily vznikajúcej pri interakcii indukovaného dipólu s nehomogénnym poľom platí podľa [7] vzťah:

$$F_{grad} = \frac{2\pi\alpha}{cn_m^2} \nabla I_0, \quad (2.3)$$

$$\alpha = n_m^2 a^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right), \quad (2.4)$$

kde α je polarizovateľnosť častice.

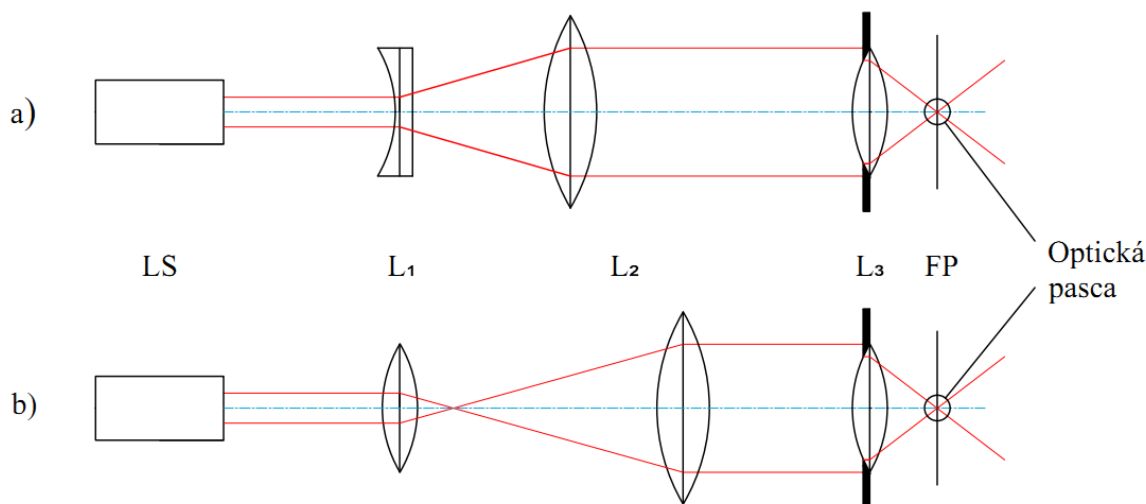
Na popis síl pôsobiacich na zachytenú časticu, ktorej charakteristický rozmer je porovnateľný s vlnovou dĺžkou laseru ($a \simeq \lambda$), je nutné použiť Mieovu teóriu, ktorá sa zaoberá rozptylom elektromagnetického žiarenia na guľových časticách.

2.3. Základná optická schéma optickej pasce

Základným predpokladom pre vytvorenie optickej pasce, ktorá by bola schopná udržať časticu na jednom mieste je vytvorenie svetelného zväzku s dostatočne veľkým gradientom intenzity. Možností ako vytvoriť gradient intenzity je niekoľko, napríklad:

- fokusovaním laserového zväzku pomocou šošoviek,
- vytvorením stojatej vlny využitím priamej a odrazenej svetelnej vlny,
- využitím laserového lúča, ktorého radiálny profil intenzity je daný Besselovou funkciou.

Optická schéma zariadenia, ktoré vytvára gradient intenzity svetla pomocou šošoviek je znázornená na obr. 2.3. Takto navrhnutá optická pasca je základom optickej pinzety. Optická pasca sa zkladá z laseru LS, expanzného systému L_1 , L_2 a mikroskopového objektívu L_3 s vysokou numerickou apertúrou⁴, aby bol dosiahnutý čo najväčší gradient intenzity. V ohnisku mikroskopového objektívu vzniká optická pasca.



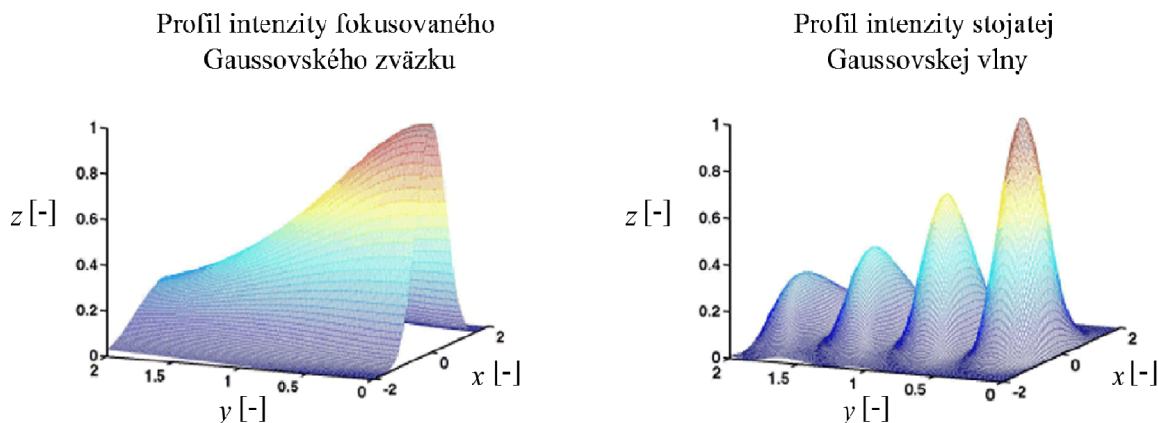
Obr. 2.3: Základná optická schéma optickej pasce vytvorenej pomocou šošoviek. LS - laser, L_1 , L_2 - šošovky expandéru a) Galileov typ, b) Keplerov typ, L_3 - mikroskopový objektív s clonou, FP - ohnisková rovina mikroskopového objektívu.

Na obr. 2.3 sú zakreslené dva typy expanzných systémov, a) Galileov typ, b) Keplerov typ. Expanzný systém slúži na rozšírenie laserového lúča tak, aby prekryl celú zadnú apertúru objektívu⁵. Väčšina laserových expandérov je Galileiho typu pretože pri rovnakých veľkostiach optickej mohutnosti šošoviek L_1 , L_2 je potrebná menšia vzdialenosť medzi nimi. Druhou nevýhodou Keplerovho typu je fokusovanie laserového zväzku do oblatti medzi šošovkami čo vedie k zahrievaniu vzduchu a tým k možnosti vzniku väd vlnoplochy. Napriek týmto nevýhodám sa takmer výhradne pri navrhovaní optických pinzií použí-

⁴Pre zvýšenie numerickej apertúry sa používajú imerzné objektívy

⁵Aby bol výsledný gradient intenzity čo najväčší je priemer laserového zväzku pred vstupom do objektívu väčší ako zadná apertúra objektívu L_3 , v ďalšom texte budeme označovať takýto objektív ako „prepĺňaný“

2.4. MANIPULÁCIA S OBJEKTOM V OPTICKEJ PASCI - OPTICKÁ PINZETA



Obr. 2.4: Na obrázku vľavo je zobrazený priebeh intenzity v optickej pasci vytvorenej pomocou šošoviek a vpravo je priebeh intenzity stojatej vlny. Os x určuje šírku zväzku v pomere k polomeru pásu zväzku, os y určuje polohu v násobkoch vlnovej dĺžky vzhľadom k ohnisku a os z udáva relatívnu intenzitu. Prevzaté a preložené z [6].

vajú expandéry Keplerovho typu, pretože umožňujú vytvorenie konjugovaných rovín, ako bude popísané v časti 4.1.1.

Vytvorenie veľkého gradientu intenzity bez použitia mikroskopového objektívu je možné vytvorením stojatej vlny, ktorá vznikne interferenciou priameho a odrazeného Gaussovho lúča⁶ viz obr. 2.4. V takto vzniknutej interferenčnej štruktúre dochádza k nárastu intenzity z nulovej na maximálnu vo vzdialenosti $\lambda/4$.

Ďalším spôsobom ako vytvoriť gradient intenzity bez použitia mikroskopového objektívu je použitie laserového lúča, ktorý má radiálny profil intenzity daný Besselovou funkciou⁷ prvého druhu $J_0(x)$. Pomocou takýchto zväzkov je možné vytvoriť interferenčnú štruktúru, v ktorej je dostatočný gradient intenzity.

2.4. Manipulácia s objektom v optickej pasci - optická pinzeta

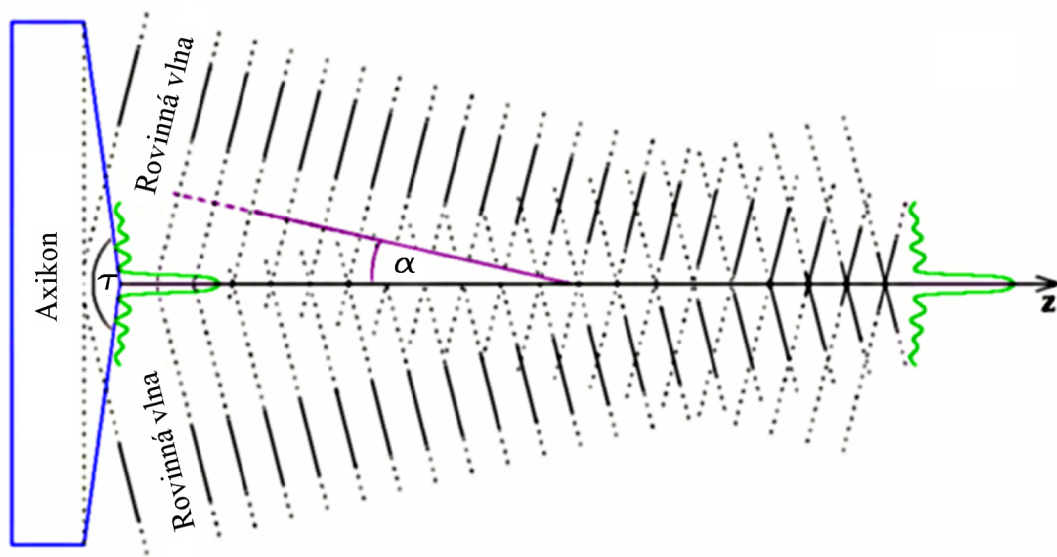
2.4.1. Laserová pinzeta vytvorená pohyblivými šošovkami

Nižšie popísaná optická pasca, ktorej polohovanie je zabezpečené pomocou pohybu šošoviek, bola navrhnutá v [9].

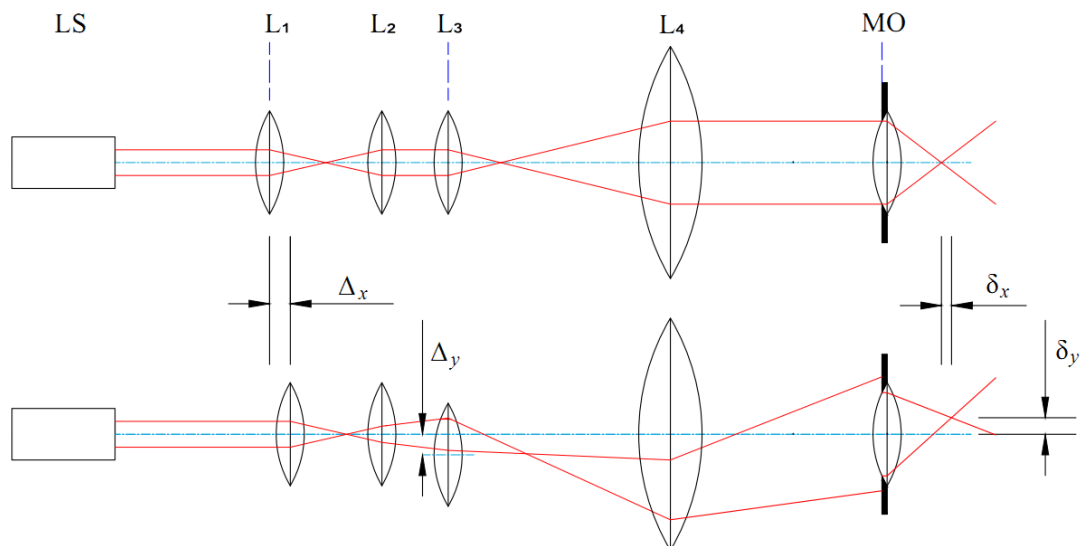
Na vytvorenie laserovej pinzety, ktorá by umožňovala priestorovú manipuláciu so zachyteným objektom, je možné využiť systém šošoviek, ktorého schéma je znázornená na obr. 2.6. Sústava je navrhnutá tak, aby laserový zväzok presne prekryl zadnú apertúru mikroskopového objektívu MO. Šošovky L_1 , L_2 a L_3 , L_4 tvoria afokálne systémy.

⁶Gaussov lúč má radiálny priebeh intenzity daný Gaussovou krivkou

⁷Takýto profil zväzku je možné dosiahnuť interferenciou rovinných svetelných vln (obr. 2.5)



Obr. 2.5: Vznik Besselovského zväzku pomocou interferencie rovinných vln. τ - vrcholový uhol axikonu, α - uhol, ktorý zvierá rovinná vlna s osou axikonu. Prevzaté a preložené z [6].



Obr. 2.6: Laserová pinzeta vytvorená pomocou šošoviek. LS - laser, L - šošovky, MO - mikroskopový objektív s clonou, Δ_x - posun šošovky L_1 , Δ_y - posun šošovky L_3 , δ_x - posun optickej pasce pozdĺž osy, δ_y - priečny posun optickej pasce.

Vychýlenie optickej pasce pozdĺž osi je realizované pomocou šošovky L_1 , ktorú je možné posúvať po ose. Posuv šošovky L_1 vytvorí rozbiehavý laserový zväzok, ktorý je následne orezaný apertúrou MO, čím dochádza ku strate energie. Pri vytvorení kolimovaného

2.4. MANIPULÁCIA S OBJEKTOM V OPTICKEJ PASCI - OPTICKÁ PINZETA

zväzku dochádza k neúplnému zaplneniu apertúry MO, čoho následkom je nižší gradient intenzity v optickej pasci. Posunutie optickej pasce pozdĺž osi je daná vzťahom:

$$\Delta_x = \left(\frac{f_{MO} f_{L_3}}{f_{L_2} f_{L_4}} \right)^2 \delta_x, \quad (2.5)$$

kde f_{MO} je ohnisková vzdialenosť mikroskopového objektívu, f_{L_i} je ohnisková vzdialenosť šošovky L_i a Δ_x je posun šošovky L_1 .

Priečného vychýlenia optickej pasce je možné dosiahnuť posunom šošovky L_3 v smere kolmom na optickú os. Aby aj po pohybe šošovkou zväzok úplne zaplnil apertúru MO je nutné, aby šošovka L_4 zobrazila zadnú apertúru mikroskopového objektívu do roviny L_3 . Posunutie optickej pasce v smere kolmom k ose je daná vzťahom:

$$\Delta_y = -\frac{f_{MO}}{f_{L_4} + f_{L_3}} \delta_y, \quad (2.6)$$

kde Δ_y je posun šošovky L_3 a význam ostatných symbolov bol vysvetlený vyššie.

2.4.2. Laserová pinzeta vytvorená naklápacími zrkadlami

Na vychýlenie laserového zväzku z osovej polohy je možné použiť aj galvanooptické alebo piezoelektrické zrkadlá. Tým je nahradený priečny posun šošovky a sústava šošoviek môže byť stabilná. Ide o naklápacie zrkadlá, pričom uhol náklonu je možné meniť veľmi jemne a presne (≈ 1 mrad). Ich výhodou je vysoká rýchlosť zmeny polohy a malé straty výkonu laseru, ktoré sú dané len kvalitou zrkadiel.

Optickú pinzetu pracujúcu v dvoch smeroch v rovine vzorky je možné zostaviť z dvoch galvanooptických zrkadiel, ktorých osi otáčania spolu zvierajú pravý uhol alebo jedného piezoelektrického zrkadla, ktoré je pomocou dvoch piezo kryštálov naklápané v dvoch smeroch.

Rovina zadnej apertúry mikroskopového objektívu MO je opticky združená s rovinami prechádzajúcimi zrkadlami, tak ako je naznačené na obr. 2.7 čiarkovanou čiarou. To zaisťuje, že aj pri natočení zrkadiel laserový lúč nezmení svoju polohu v zadnej apertúre MO.

Laserová pinzeta polohovaná galvanooptickými zrkadlami bude popísaná a prepočítaná v časti 4.1.1.

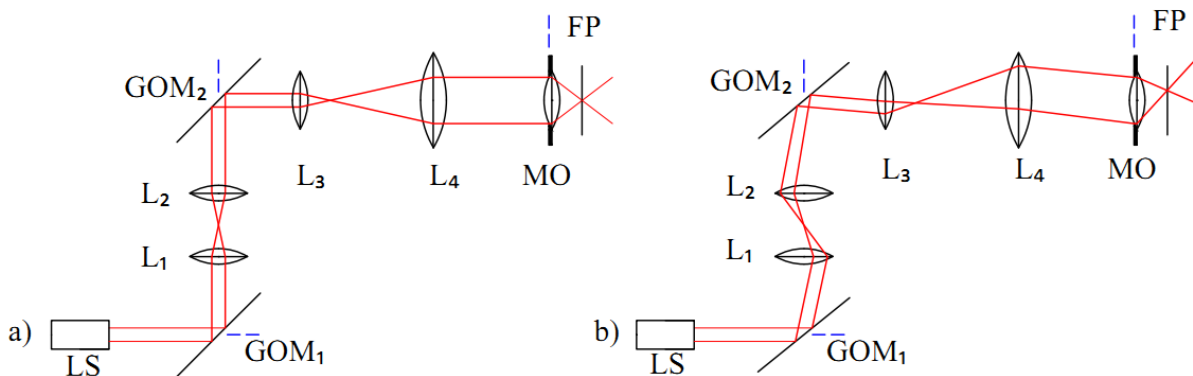
2.4.3. Priestorové modulátory svetla a holografická laserová pinzeta

Medzi priestorové modulátory svetla (SLM⁸) patria akustooptické a elektrooptické modulátory. Sú to zariadenia, pomocou ktorých je možné meniť smer šírenia, intenzitu, fázu a frekvenciu laserového lúča. Akustooptické modulátory (AOM⁹) využívajú materiály, ktorých index lomu môže byť modifikovaný pôsobením mechanického vlnenia. Elektrooptické modulátory (EOM¹⁰) pracujú na podobnom princípe, ale využívajú materiály, ktorých index lomu závisí na pôsobení elektrického poľa.

⁸Spatial light modulator

⁹Acousto-optic modulator

¹⁰Electro-optic modulator

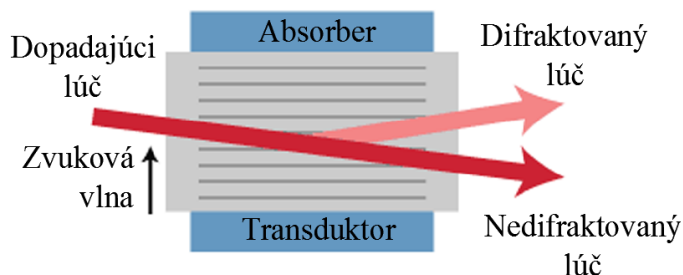


Obr. 2.7: Laserová pinzeta vytvorená pomocou galvanooptických zrkadiel. LS - laser, GOM₁, GOM₂ - galvanooptické zrkadlá, L₁–L₄ - šošovky, MO - mikroskopový objektív s clonou, FP - ohnisková rovina MO. a) Nevychýlená optická pasca. b) Vychýlená optická pasca, nenulový uhol náklonu GOM₁ a GOM₂.

Základom akustooptických modulátorov je priesvitný materiál (ToO₂, kryštalický kremník, kremenné sklo), ku ktorému je pripevnený piezoelektrický transduktor (PET). Na protiľahlej strane je materiál pohlcujúci zvukové vlny. Ak je na PET privedený signál, je možné vytvoriť v materiáli mechanické vlnenie, ktoré spôsobuje lokálne zmeny hustoty a tým aj zmeny indexu lomu materiálu. Následkom čoho je vytvorená periodická štruktúra rovín s rôznym indexom lomu a svetlo prechádzajúce materiálom sa správa ako pri Braggovej difrakcii. Difraktovaný lúč vystupuje z akustooptického modulátora pod uhlom φ , ktorý je daný vzťahom:

$$\varphi = \arcsin \frac{n\lambda}{2\Lambda}, \quad n = 0, \pm 1, \pm 2, \dots, \quad (2.7)$$

kde n je difrakčný rád, λ je vlnová dĺžka laseru a Λ je vlnová dĺžka mechanického vlnenia budeného v AOM. Odchýlka laserového lúča φ sa pohybuje rádovo v desiatkach miliradiánov.



Obr. 2.8: Schématické znázronenie AOM SLM. Prevzaté a preložené z [10].

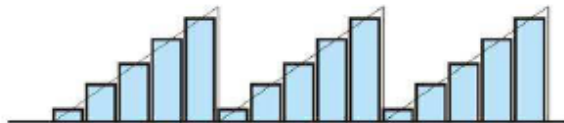
Elektrooptické modulátory využívajú nelineárne optické materiály, ktorých index lomu závisí na veľkosti elektrického poľa, napríklad LiNbO₃. Reflexné EOM SLM sú tvorené

2.4. MANIPULÁCIA S OBJEKTOM V OPTICKEJ PASCÍ - OPTICKÁ PINZETA

transparentnými bunkami kvapalných kryštálov, ktoré sú oddelené pre svetlo nepriepustnými oblasťami. Tým je možné vytvoriť schodovitú blejzovanú difrakčnú mriežku. Vplyvom difrakcie svetla na mriežke je svetlo odklonené od pôvodného smeru o uhol φ , pre ktorý platí:

$$\varphi = \arcsin \frac{n\lambda}{d}, \quad n = 0, \pm 1, \pm 2, \dots, \quad (2.8)$$

kde n je difrakčný rád, λ je vlnová dĺžka laseru a d je rozstup buniek.



Obr. 2.9: Schodovitá blejzovaná difrakčná mriežka vytvorená reflexným EOM SLM. Prevzaté z [11].

Laserové pinzety využívajúce SLM pre pohyb so zachytenou vzorkou v optickej pasci umožňujú najväčšiu variabilitu pri manipulácii. Rýchlosť zmeny polohy je limitovaná iba opakovacou frekvenciou SLM. Taktiež umožňujú vytvorenie viacerých optických pascí rozložením dopadajúceho lúča. Ich hlavnou nevýhodou je vysoká finančná náročnosť a veľké energetické straty laseru na SLM.

3. Koherenciou riadená holografická mikroskopia

3.1. História interferenčnej a holografickej mikroskopie

Základom všetkých svetelných mikroskopov je interferencia primárneho a difraktovaného svetla. V klasických svetelných mikroskopoch sa stráca časť informácie, zaznamenáva sa iba amplitúda svetelnej vlny a fáza nie je zaznamenávaná. Prvým krokom k odstráneniu tohoto nedostatku bol objav a rozvoj interferenčnej mikroskopie, ktorá kombinuje funkciu interferometru a mikroskopu do jedného zariadenia. V roku 1893 Sirks položil jej základy, keď ako prvý popísal mikroskop s oddeleným referenčným a objektovým lúčom [12]. V literatúre označovaný názvom Sirks-Pringsheimov¹ interferenčný mikroskop.

Odvtedy bolo vymyslených a popísaných veľa spôsobov usporiadania interferenčných mikroskopov. V päťdesiatych rokoch minulého storočia Krug a Lau, Horn navrhli interferenčné mikroskopy používajúci svetlo prechádzajúce cez vzorku. Tým umožnili kvantitatívne meranie rozdielu optických dráh (OPD - Optical path difference) medzi objektovou a referenčnou vetvou spôsobený skúmanou vzorkou. Značne komplikované a časovo náročné spracovanie obrazu spolu s vysokou cenou zariadenia spôsobili, že nebolo masovo rozšírené a iné techniky, ako Zernikov fázový kontrast alebo Nomarského diferenciálny interferenčný kontrast, boli uprednostňované aj keď neumožňovali meranie OPD, ale ponúkali iba informáciu o tom, že nastala fázová zmena pri prechode vzorkou.

Skutočné možnosti interferenčnej mikroskopie sa ukázali vďaka objaveniu holografie roku 1947 a laseru roku 1960. S rozvojom výpočetnej techniky a digitálnych záznamových zariadení bolo možné naplno využívať meranie OPD a aj ďalších možností, ktoré interferenčná mikroskopia ponúka, ako sú napríklad numerické preostrovanie² alebo optické rezy.

V súčasnej dobe môžu byť holografické mikroskopy rozdelené do dvoch skupín podľa uhla, ktorý zvierá referenčný a objektový lúč vo výstupnej rovine interferometra na tzv. in-line a off-axis.

In-line interferometrické mikroskopy sú konštruované tak, aby referenčný a objektový lúč vo výstupnej rovine interferometra zvierali nulový alebo skoro nulový uhol. Umožňujú použitie nekoherentného svetla (žiarovka, výbojka), čo potláča vznik koherenčného šumu a umožňuje vytváranie optických rezov. Je nutné zaznamenať viac ako jeden obraz (obvyčajne 3-7) s rôznymi fázovými posunmi, aby bola získaná úplná informácia o objektovej vlne. Preto nie je možné pozorovať rýchlo sa meniace objekty.

V off-axis mikroskopoch je nenulový uhol medzi referenčným a objektovým lúčom vo výstupnej rovine interferometra. Uhol je volený tak, aby vznikol interferogram s priestorovou frekvenciou interferenčných prúžkov takou, aby bolo možné rekonštruovať objektovú vlnu (stačí na to jeden obraz), t.j. vzniká hologram³. Doteraz publikované holografické mikroskopy v zásade používajú rovnaký interferometer ako in-line systémy a nenulový

¹Pringsheim zverejnil, nezávisle na Sirksovi, podrobnosti o interferenčnom mikroskope

²Vďaka tomu, že poznáme kompletnú svetelnú vlnu (amplitúdu aj fázu) môžeme ju rekonštruovať v ľubovoľnom bode

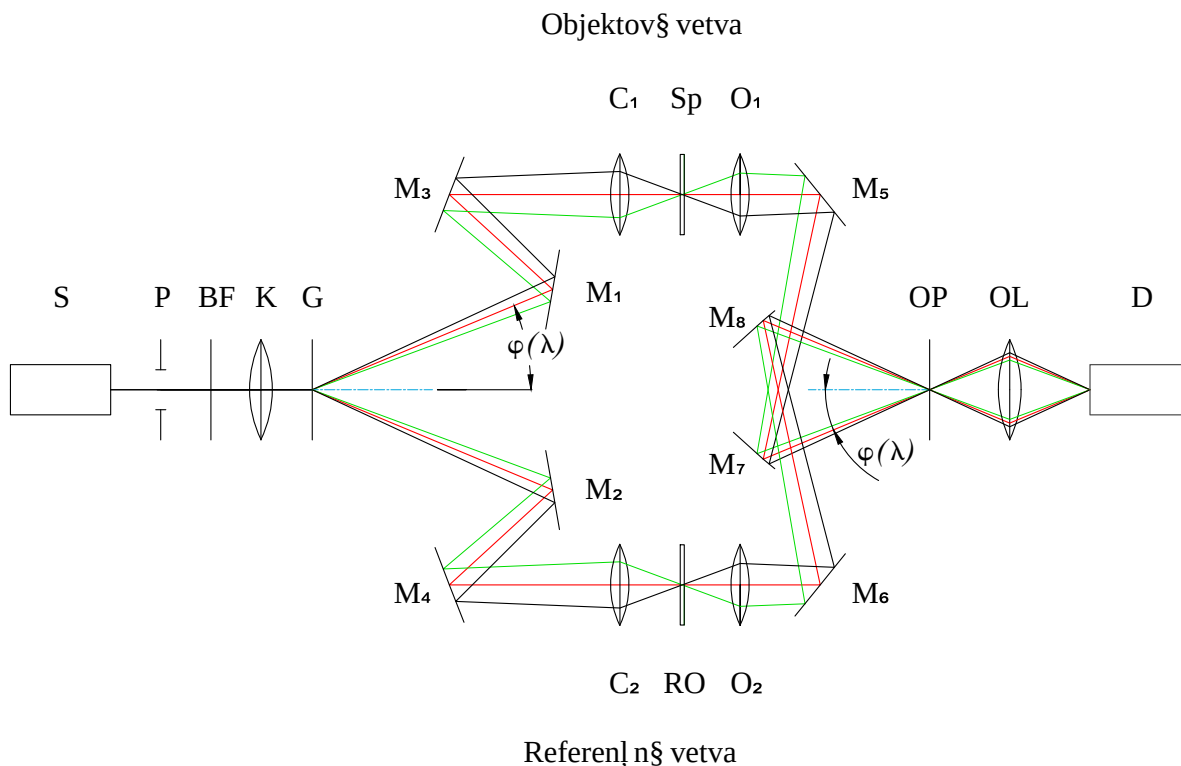
³Z gréckych slov holos= celý a grafó= kreslím

3.2. KOHERENCIU RIADENÝ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP PRVEJ GENERÁCIE

uhol medzi referenčným a objektovým lúčom je dosiahnutý odklonením vetví. Po takejto modifikácii je možné použiť iba laserové svetlo, aby vznikol hologram v celom zornom poli. To má za následok vznik koherenčného šumu, čím sa degraduje kvalita signálu.

S revolučným usporiadaním mimoosového holografického mikroskopu zobrazujúceho v odrazenom svetle, ktorý namiesto klasického interferometra používa achromatický, ako prví publikovali Chmelík a Harna [13]. Tým dosiahli spojenie výhod in-line a off-axis mikroskopov, čiže možnosť použitia časovo a priestorovo nekoherentného zdroja svetla, tým potlačenie koherentnej zrnitosti, možnosť vytvárania optických rezov vzorkou a zároveň rekonštruovať objektovú vlnu z jedného snímku.

3.2. Koherenciou riadený holografický mikroskop prvej generácie



Obr. 3.1: Schéma CCHM. S - zdroj svetla, P - clona, BF - interferenčný filter, K - kolektor, G - difrakčná mriežka, M₁–M₈ - zrkadlá, C₁, C₂ - kondenzory, O₁, O₂ - objektívy, Sp - pozorovaný objekt, RO - referenčný objekt, OP - výstupná rovina, OL - výstupná šošovka, D - detektor.

3. KOHERENCIOU RIADENÁ HOLOGRAFICKÁ MIKROSKOPIA

Koherenciou riadený transmisný holografický mikroskop, označovaný ako CCHM⁴ bol skonštruovaný na VUT v Brne [14]. V podstate ide o dva totožné mikroskopy tvoriace interferometer Mach-Zehnderovho typu.

Optická schéma (obr. 3.1) je navrhnutá tak, že umožňuje použitie nekoherentného zdroju svetla. To znamená, že tvorí achromatický interferometer. Výhody off-axis achromatických holografických mikroskopov sú:

- úplná rekonštrukcia obrazovej vlny z jedného zaznamenaného obrazu, takže zobrazovacia rýchlosť zariadenia je limitovaná iba zariadeniami slúžiacimi na zaznamenanie (CCD kamera) a spracovanie obrazu (počítač),
- možnosť využitia priestorovo a časovo nekoherentných zdrojov svetla, čím je potlačená koherentná zrnitosť,
- vytváranie optických rezov vzorkou,
- numerické ex-post preostrovanie.

Aby vznikol achromatický holografický obrazec (interferogram) vo výstupnej rovine OP, musí byť zaistené, aby svetelné zväzky lúčov s rôznou vlnovou dĺžkou vytvárali interferenčné prúžky rovnakej hustoty - priestorovej frekvencie. V CCHM je svetelný zväzok vychádzajúci zo zdroja S po prechode difrakčnou mriežkou odklonený o uhol φ vzhľadom k ose interferometra. Pre veľkosť uhla φ platí:

$$\sin \varphi = n\lambda f_G, \quad n = 0, \pm 1, \pm 2, \dots, \quad (3.1)$$

kde n je difrakčný rád, λ je vlnová dĺžka svetla a f_G je priestorová frekvencia (hustota čiar) difrakčnej mriežky⁵.

Vplyvom disperzie svetla na mriežke je odklonený lúč aj farebne rozložený. Čím je väčšia vlnová dĺžka λ , tým je väčší aj uhol odklonu od osi interferometra φ . Interferometer je navrhnutý pre centrálnu vlnovú dĺžku $\lambda_0 = 650$ nm tak, aby svetlo tejto vlnovej dĺžky vytváralo obraz zdroja v zadných ohniskových rovinách kondenzorov C so stredom na optickej ose kondenzoru. Pre $\lambda \neq \lambda_0$ sú obrazy priečne posunuté, viz obr. 3.2.

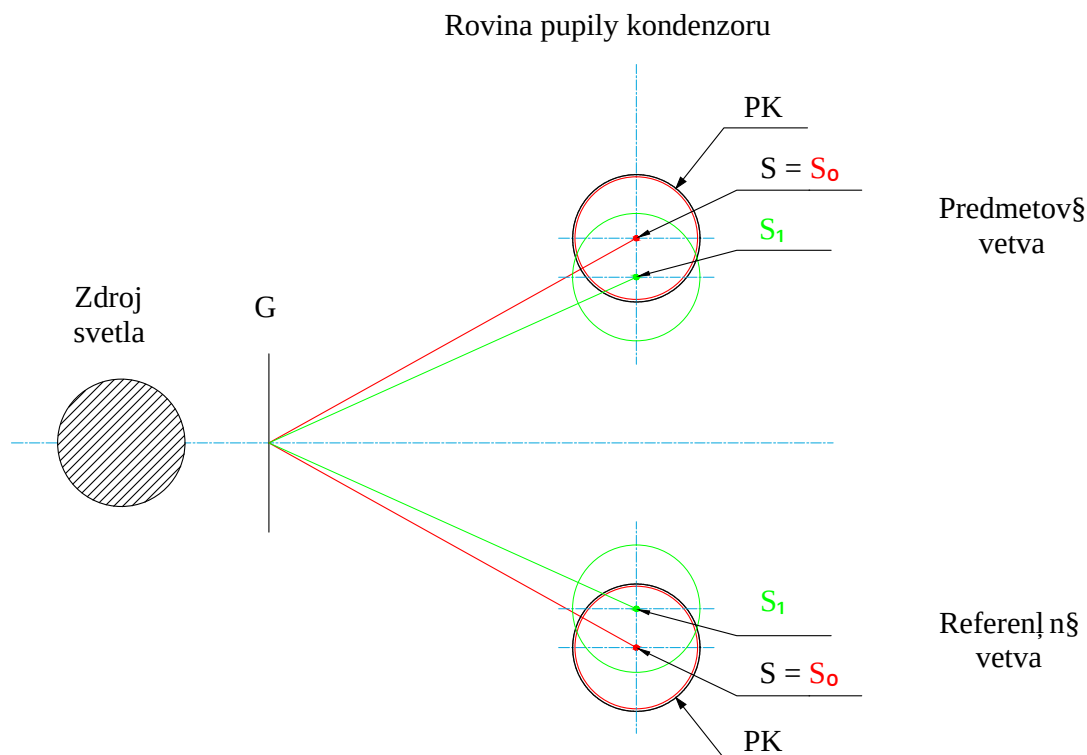
Obraz zdroja vzniká aj v ohniskových rovinách objektívov (sekundárne zobrazenie zdroja). Tieto obrazy sú posunuté o tú istú vzdialenosť, ale sú stranovo prevrátené oproti obrazom, ktoré boli vytvorené kondenzormi.

Ak by lúče z predmetovej a referenčnej vetvy priamo interferovali vo výstupnej rovine, menšie vlnové dĺžky by interferovali pod väčším uhlom a naopak, dochádzalo by k vzniku interferenčných prúžkov rozdielnej priestorovej frekvencie. Aby všetky vlnové dĺžky vytvárali interferogram s rovnakou hustotou prúžkov musí byť zaistené, aby uhlová vzdialenosť sekundárnych obrazov zdroja vzhľadom k výstupnej rovine bola rovná uhlovej vzdialenosti obrazov zdroja vytvorených v predmetových rovinách kondenzorov vzhľadom k difrakčnej mriežke. To je zaistené prekrižením predmetovej a referenčnej vetvy, tým dosiahneme prevrátenie poradia farieb. Pretože hologram vzniká interferenciou prvého a mínus prvého difrakčného rádu je priestorová frekvencia hologramu f_{OP} rovná dvojnásobku priestorovej frekvencie difrakčnej mriežky f_G . Pre všetky vlnové dĺžky λ je frekvencia interferogramu konštantná, teda interferometer je achromatický.

⁴Coherence-controlled holographic microscope

⁵ $f_G = \frac{1}{a}$, kde a je mriežková konštanta

3.2. KOHERENCIU RIADENÝ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP PRVEJ GENERÁCIE



Obr. 3.2: Pričné posunutie obrazov v predmetových rovinách kondenzorov. G - difrakčná mriežka, PK - pupila kondenzoru, S - stred pupily kondenzoru, S₀ - zobrazenie zdroja pre centrálnu vlnovú dĺžku λ_0 , S₁ - zobrazenie zdroja pre vlnovú dĺžku $\lambda < \lambda_0$.

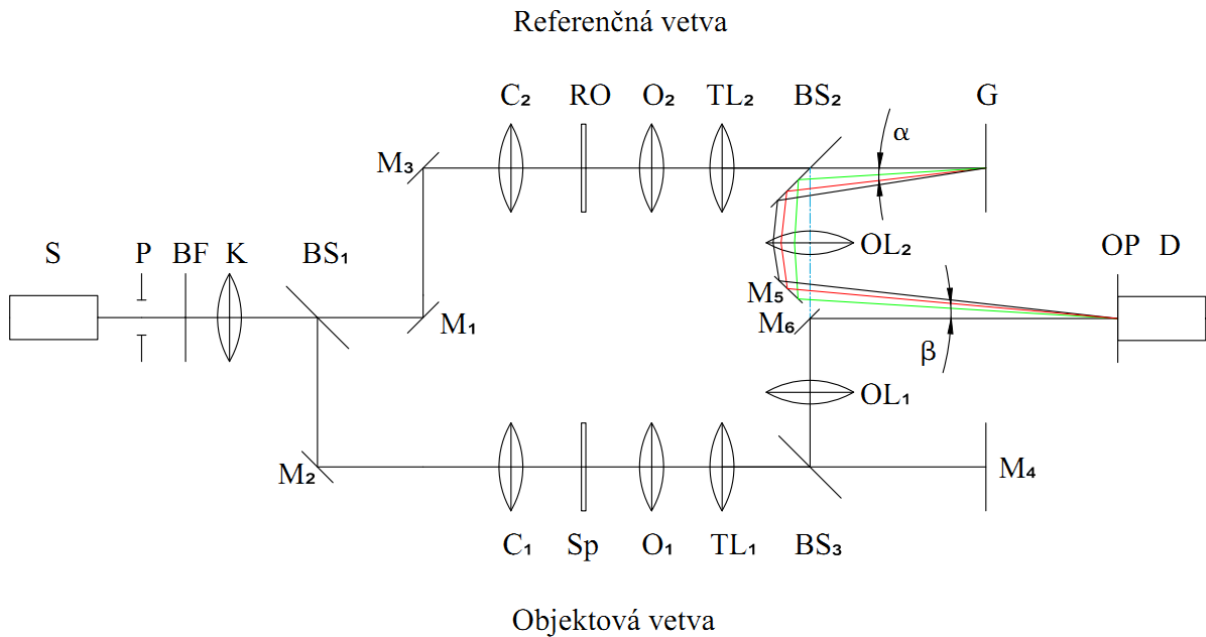
Svetlo zo zdroja S, ktorým môže byť halogénová lampá alebo vysokotlaková výbojka, prechádza clonou P a interferenčným filtrom BF, to umožňuje meniť stupeň jak priestorovej, tak časovej koherentnosti. Následne lúč dopadá na lineárnu transmisnú fázovú difrakčnú mriežku G, ktorá slúži ako delič. Výberom prvého a mínus prvého difrakčného rádu dosiahneme rozdelenie pôvodného svetelného zväzku na dva, ktoré tvoria predmetovú a referenčnú vetvu interferometra. Vetvy sú opticky zhodné a symetrické podľa osy interferometra. Každá obsahuje zhodné mikroskopové objektívy O a C s konečnou tubusovou dĺžkou. Rovnomerné osvetlenia referenčného objektu a pozorovaného predmetu je realizované na princípe Köhlerovho ovetlenia. To znamená, že kolektor K zobrazuje zdroj svetla do predmetovej ohniskovej roviny kondenzorovej šošovky C. Difrakčná mriežka je zobrazená kondenzorom C do roviny vzorky a následne je zobrazená mikroobjektívom O do výstupnej roviny OP. Preto je difrakčná mriežka a výstupná rovina interferometra OP v oboch vetvách združená. Vo výslednom holograme nie je porovnateľná štruktúra difrakčnej mriežky kvôli tomu, že kondenzory nemajú dostatočnou apertúru na to, aby štruktúru mriežky vôbec rozlíšili. Vo výstupnej rovine spolu interferujú lúče z predmetovej a referenčnej vetvy a vytvárajú interferenčnú štruktúru - hologram, ktorý je pomocou

3. KOHERENCIU RIADENÁ HOLOGRAFICKÁ MIKROSKOPIA

výstupného objektívu OL zväčšovaný⁶ a zobrazovaný na detektor D (zväčša je používaná CCD kamera).

Zo zaznamenaného hologramu je následne rekonštruovaná obrazová fáza a amplitúda pomocou metódy navrhutej Kreisem [15]. Zosnímaný interferogram je prevedený na spektrum priestorových frekvencií pomocou rýchlej diskkrétnej Furierovej transformácie. Následne je aplikovaná rýchla inverzná Fourierova transformácia na výrez spektra⁷ okolo nosnej frekvencie f_{OP} . Tým dostaneme komplexnú amplitúdu svetelnej vlny zobrazovaného predmetu. Rozdiel fází predmetovej a referenčnej vlny je určený argumentami komplexných čísel a kvadrát modulu komplexnej amplitúdy určuje intenzitu.

3.3. Druhá generácia CCHM



Obr. 3.3: Schéma druhej generácie CCHM. S - zdroj svetla, P - clona, BF - pásmový filter, K - kolektor, BS - deliče, M₁–M₆ - zrkadlá, C₁, C₂ - kondenzory, O₁, O₂ - objektívy, Sp - pozorovaný objekt, RO - referenčný objekt, TL₁, TL₂ - tubusové šošovky, OL₁, OL₂ - výstupné šošovky, OP - výstupná rovina, D - detektor, α - uhol odrazu difraktovaného lúča vzhľadom k ose interferometra, β - uhol, pod ktorým difraktovaný lúč vstupuje do výstupnej roviny OP.

Vývoj druhej generácie koherenciou riadeného holografického mikroskopu začal v roku 2009. Rovnako ako v predchádzajúcich generáciach ide o digitálny holografický mikroskop, ktorého základom je achromatický off-axis interferometer.

Druhá generácia CCHM bola popísaná v článku [16].

⁶Priestorová hustota interferenčných prúžkov vo výstupnej rovine je vyššia ako rozlišovacia schopnosť detektoru, preto je nutné zväčšenie

⁷Spektrum priestorových frekvencií je tvorené tromi oblasťami, autokorelačným obrazcom a dvoma vedľajšími obrazcami (obr. 3.4)

3.3. DRUHÁ GENERÁCIA CCHM

Základná optická schéma CCHM druhej generácie využívajúca zobrazovanie v prechádzajúcom svetle je zobrazená na obr. 3.3. Osvetľovacia časť zariadenia je tvorená zdrojom svetla S, clonou P, pásmovým filtrom BF, ktoré umožňujú meniť stupeň priestorovej a časovej koherentnosti svetla, kolektorom K a kondenzormi C_1 , C_2 . Aby pozorovaná vzorka v obrazovej vetve a referenčný objekt v referenčnej vetve boli osvetlené rovnomerne je osvetľovacia časť navrhnutá na princípe Köhlerovho osvetlenia. Rozdelenie svetelného zväzku na objektový a referenčný lúč je realizované pomocou štandardného deliča zväzkov.

Jednou zo zásadných zmien oproti predchádzajúcej generácii CCHM je použitie objektívov O korigovaných na nekonečnú vzdialenosť a tubusových šošoviek TL pre pozorovanie vzorky a referenčného objektu. Priestor medzi objektívom a tubusovou šošovkou je „nekonečný“, čo umožňuje pripojenie ďalších pozorovacích a manipulačných techník, ako napríklad Ramanova spektroskopia, epifluorescencia, konfokálna mikroskopia, optická pinzeta. Jednoduchou modifikáciou usporiadania prvkov v optickej schéme zobrazenej na obr. 3.3 je možné pozorovanie v odrazenom svetle. To je možné, ak osvetľovací systém zavedieme do priestoru nekonečných lúčov medzi objektívom a tubusovou šošovkou.

Ďalšou veľkou zmenou v druhej generácii CCHM je použitie odraznej difrakčnej mriežky v interferometrickej časti zariadenia. Interferometer sa skladá zo zväzkových deličov BS_1 a BS_2 , odraznej difrakčnej mriežky G, zrkadiel $M_4 - M_6$ a výstupných šošoviek OL_1 a OL_2 . Rovnako ako v prvej generácii CCHM sú difrakčná mriežka a výstupná rovina interferometra OP združené. To znamená, že difrakčná mriežka je umiestnená v obrazovej rovine referenčnej vetvy.

Lúč prechádzajúci referenčnou vetvou dopadá na odraznú difrakčnú mriežku a odráža sa pod uhlom α vzhľadom k ose interferometra. Podobne ako v kapitole 3.2 je veľkosť uhla α pre prvý difrakčný rád daná vzťahom:

$$\sin \alpha = \lambda f_G, \quad (3.2)$$

kde λ je vlnová dĺžka a f_G je priestorová frekvencia difrakčnej mriežky. Všetky ostatné difrakčné rády sú odtienené v snahe získať čo možno najkontrasnejší obraz interferenčných prúžkov vo výstupnej rovine. Aby sa čo najviac svetla podieľalo na vytváraní hologramu je použitá blejzovaná difrakčná mriežka. Vzhľadom k tomu, že difrakčná mriežka je pomocou výstupnej šošovky OL_2 zobrazená do výstupnej roviny, difraktovaný lúč vstupuje do výstupnej roviny OP pod uhlom β . Pre veľkosť uhla β platí:

$$\sin \beta = \frac{\sin \alpha}{m_{OL}}, \quad (3.3)$$

kde m_{OL} je zväčšenie výstupnej šošovky OL_2 . Pomocou zrkadiel M_5 a M_6 je možné nastaviť, aby sa obrazy z predmetovej a referenčnej vetvy presne prekrývali vo výstupnej rovine a tým dosiahnuť vysoký kontrast interferenčných prúžkov.

Vo výstupnej rovine spolu interferujú lúče z objektovej (nultý difrakčný rád) a referenčnej (prvý difrakčný rád) vetvy. Kvôli disperzii svetla na mriežke je difraktované svetlo aj farebne rozložené a vstupuje do výstupnej roviny pod uhlom β , charakteristickým pre každú vlnovú dĺžku. Preto všetky vlnové dĺžky vytvárajú hologram s rovnakou priestorovou frekvenciou f_{OP} , tiež nazývanou nosná frekvencia. To zaisťuje achromatickosť interferometra.

3. KOHERENCIU RIADENÁ HOLOGRAFICKÁ MIKROSKOPIA

Nosná frekvencia hologramu súvisí s priestorovou frekvenciou difrakčnej mriežky f_G a zväčšenia výstupnej šošovky m_{OL} vzťahom:

$$f_{OP} = \frac{f_G}{m_{OL}} \quad (3.4)$$

Rekonštrukcia obrazovej vlny, rovnako ako v predchádzajúcej generácii CCHM, prebieha pomocou Furierovej transformácie, viz obr. 3.4. Na zaznamenaný hologram je aplikovaná rýchla diskretná Furierova transformácia, čím je získané spektrum priestorových frekvencií. Aby bolo možné aplikovať rýchlu inverznú Furierovu transformáciu je nutné, aby sa spektrum okolo nosnej frekvencie f_{OP} a autokorelačné spektrum neprekrývali, viz obr. 3.4b). To je splnené za podmienky:

$$f_{OP} \geq \frac{2f_{OM}}{m_{OL}}, \quad (3.5)$$

kde m_{OL} je zväčšenie výstupnej šošovky OL_2 a f_{OM} je maximálna priestorová frekvencia komplexnej amplitúdy objektivej vlny v obrazovej rovine mikroskopu, ktorá je daná vzťahom:

$$f_{OM} = \frac{2NA}{m\lambda}, \quad (3.6)$$

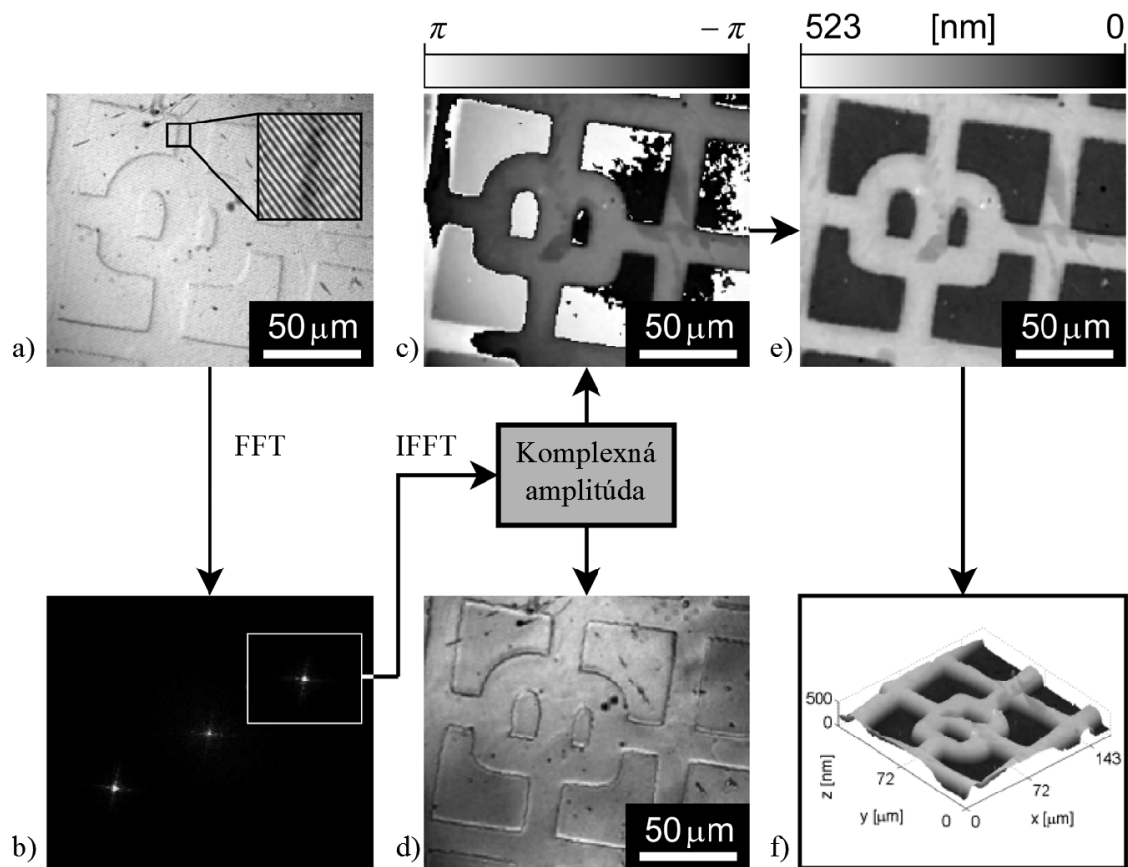
kde NA je numerická apertúra objektívov O , m je zväčšenie objektívov O a λ je vlnová dĺžka svetla. Ak dosadíme do 3.5 za f_G výraz z 3.4 a za f_{OM} dosadíme výraz z 3.6 dostaneme:

$$f_G \geq \frac{4NA}{m\lambda}, \quad (3.7)$$

čo predstavuje spodnú limitu pre priestorovú frekvenciu difrakčnej mriežky. Je žiadúce, aby bola použitá difrakčná mriežka s najnižšou možnou priestorovou frekvenciou. Pri vyšších frekvenciách je nutné použiť výstupnú šošovku s väčším zväčšením, aby bol hologram rozlíšiteľný CCD kamerou. Takáto úprava vedie k zmenšeniu zorného poľa.

Druhá generácia koherenciou riadeného holografického mikroskopu prináša viacero významných výhod oproti predchádzajúcim generáciám. Umiestnenie difrakčnej mriežky v obrazovej rovine objektívu v referenčnej vetve umožnilo použitie objektívov s nekonečnou tubusovou dĺžkou (obraz vzniká v nekonečne), čím bol vytvorený priestor pre implementáciu ďalších optických a manipulačných modulov. CCHM druhej generácie, ktorého optická schéma je zobrazená na obr. 3.3 je navrhnutý tak, aby mohli byť použité konvenčné mikroskopové kondenzory. Tým je dosiahnuté značné zväčšenie pracovného priestoru medzi kondenzorovou šošovkou a objektívom, čo umožňuje prácu s objemnejšími pozorovacími komôrkami. Zároveň je to aj ekonomická výhoda, už nie je nutné použitie štyroch zhodných objektívov. Zväčšenie priestoru medzi referenčným a objektovým ramenom zabezpečuje pohodlnú manipuláciu so vzorkami. Justícia druhej generácie CCHM sa zjednodušila do takej miery, že sa uvažuje o jej automatizácii.

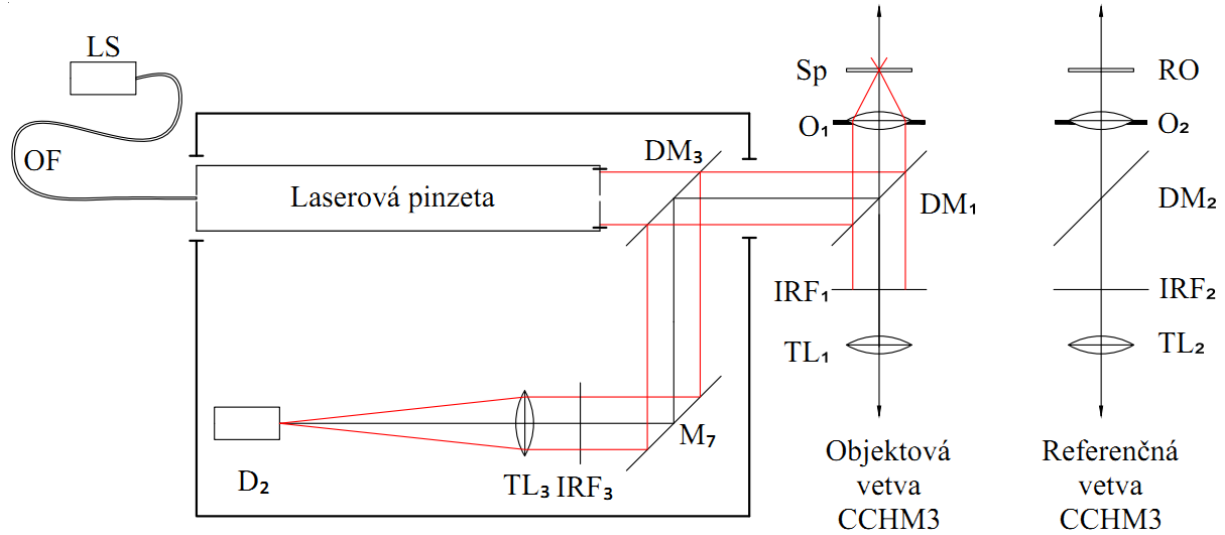
3.3. DRUHÁ GENERÁCIA CCHM



Obr. 3.4: Grafické znázornenie rekonštrukcie obrazovej vlny. a) Zaznamenaný hologram s detailom interferenčnej štruktúry. b) Spektrum priestorových frekvencií, uprostred je autokorelačné spektrum, na krajoch sú spektrá okolo nosnej frekvencie f_{OP} . c) Fázový obraz. d) Intenzitný obraz. e) Fázový obraz s naviazanou fázou. f) 3D rekonštrukcia obrazu. Prevzaté a preložené z [16].

4. Návrh laserovej pinzety pre CCHM druhej generácie

Laserová pinzeta je navrhnutá tak, aby mohla tvoriť samostatný modul pripojiteľný ku koherenciou riadenému holografickému mikroskopu druhej generácie (CCHM2¹).



Obr. 4.1: Schématické znázornenie pripojenia modulu laserovej pinzety k CCHM2. Sp - pozorovaný objekt, RO - referenčný objekt, O_1 , O_2 - objektívy, DM_1 – DM_3 - dichroické zrkadlá, IRF_1 – IRF_3 - infračervené filtre, TL_1 – TL_3 - tubusové šošovky, M_7 - zrkadlo, D_1 - detektor, LS - laser, OF - optické vlákno.

Na zavedenie laserovej pinzety do objektovej vetvy CCHM2 by malo byť použité dichroidné zrkadlo DM_1 , ktorého odrazivosť na vlnovej dĺžke laseru by mala byť blízka 100%, aby nedochádzalo k strate výkonu laseru. Pre viditeľné svetlo by odrazivosť mala byť približne 50%, aby prepustené svetlo mohlo vytvoriť obraz vzorky v kamere D_1 a odrazené svetlo mohlo vytvoriť obraz vzorky v kamere D_2 .

V referenčnej vetve je umiestnené taktiež dichroidné zrkadlo DM_2 , aby zmena fázy vzniknutá na DM_1 neovplyvňovala výsledný hologram. Vlnová dĺžka laseru je odtienená infračerveným filtrom IRF_1 , aby nedochádzalo k zníženiu kontrastu interferenčných prúžkov vo výstupnej rovine. Kvôli zachovaniu fázového rozdielu, ktorý vznikol na vzorke je do referenčnej vetvy umiestnený rovnaký filter IRF_2 . IRF_2 má taktiež za úlohu odstrániť laserové svetlo, ktoré by sa mohlo dostať do referenčnej vetvy cez osvetlovaciu sústavu.

Vzhľadom k tomu, že v CCHM2 je odfiltrovaná vlnová dĺžka laseru, aby bol dosiahnutý čo možno najvyšší kontrast interferenčných prúžkov, je do modulu laserovej pinzety navyše pridaný detektor polohy zväzku. Tubusová šošovka TL_3 zobrazuje rovinu vzorky na CCD kameru. Aby svetlo z laseru nepresvietilo obraz tvorený svetlom zo zdroja S je nutné pred kameru umiestniť infračervený filter IRF_3 , ktorého priepustnosť je závislá na výkone

¹Coherence-controlled holographic microscope second generation

4.1. LASEROVÁ PINZETA POLOHOVANÁ GALVANOOPTICKÝMI ZRKADLAMI

použitého laseru. Pri vhodne zvolených parametroch² dichroidného zrkadla DM_3 je možné vynechať filter IRF_3 .

Implementácia detektoru polohy zväzku umožní nielen pozorovanie reálnej polohy optickej pinzety, ale navyše poskytne aj obraz väčšej časti vzorky. Tým vzniká priestor pre užívateľa, aby pomocou laserovej pinzety posunul objekt svojho záujmu do zorného poľa CCHM2.

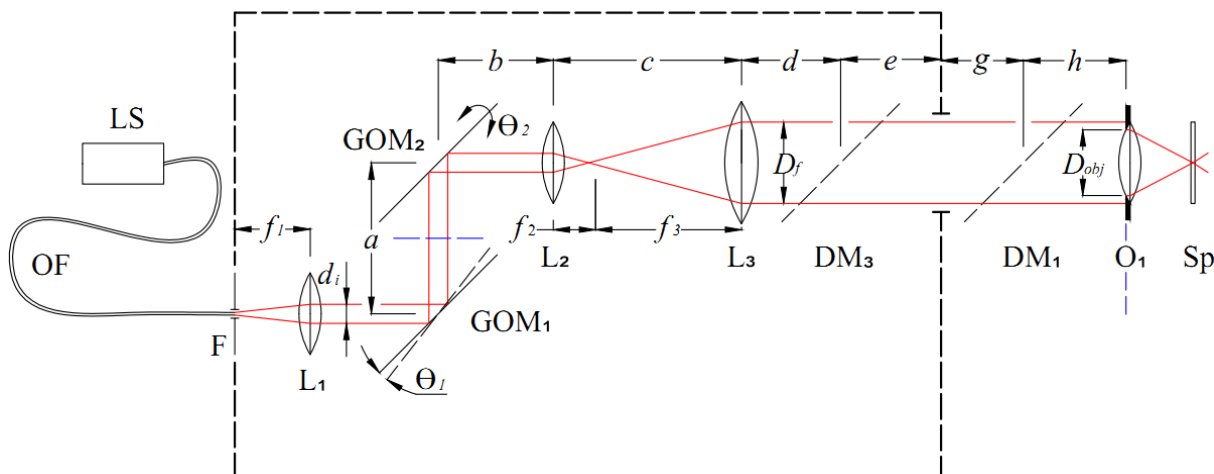
Ako zdroj laserového svetla je v návrhoch použitý pevnolátkový laser Nd:YAG³ s vlnovou dĺžkou 1064 nm. Vlnová dĺžka nachádzajúca sa v blízkej infračervenke oblasti bola zvolená kvôli jej nízkej absorpcii pri prechode živými organizmami⁴, čím je zabránené ich poškodeniu.

Všetky vzťahy uvedené v nasledujúcich kapitolách boli odvodené pre paraxiálne šošovky. Odvodenia vychádzajú z geometrickej optiky a trigonometrie.

4.1. Laserová pinzeta polohovaná galvanooptickými zrkadlami

Na obr. 4.6 na strane 39 je znázornená optická schéma koherenciou riadeného holografického mikroskopu druhej generácie (CCHM2) spolu s laserovou pinzetou.

Modul laserovej pinzety tvorí konektor na uchytenie optického vlákna F, kolimačná šošovka L_1 , galvanooptické zrkadlá GOM_1 , GOM_2 , expanzný systém Keplerovho typu tvorený šošovkami L_2 , L_3 , dichroické zrkadlo DM_3 , zrkadlo M_7 a detektor polohy zväzku tvorený IRF_3 , LT_3 , D_2 .



Obr. 4.2: Schématické znázornenie vzdialeností optickej pinzety pripojenej k CCHM2. LS - laser, OF - optické vlákno, L_1 – L_3 - šošovky, GOM_1 , GOM_2 - galvanooptické zrkadlá, DM_1 , DM_3 - dichroické zrkadlá, O_1 - objektív, Sp - pozorovaný objekt.

²Odrazivost' na vlnových dĺžkach viditeľného svetla sa blíži k 100% a pre vlnové dĺžky laseru závisí na jeho výkone.

³Neodymium-doped yttrium aluminium garnet

⁴Vhodné vlnové dĺžky pre biologické preparáty sú od 750 nm, kde začína absorpcia proteínov, do 1200 nm, kde sa zvyšuje absorpcia vody

4.1.1. Výpočet parametrov laserovej pinzety

Pre vychýlenie optickej pasce je nutné polohovanie GO zrkadiel. Pri zmene uhlu natočenia GO zrkadiel dochádza k zmene polohy laserového lúča voči zadnej apertúre objektívu, čo má za následok orezanie zväzku a znižovanie tuhosti optickej pasce pri posuve smerom k okraju zorného poľa. Riešenie problému bolo naznačené v časti 2.4.2.

V snahe doceliť čo možno najkompaktnejší modul bola vynechaná sústava šošoviek, ktorá mala za úlohu združovanie rovín prechádzajúcich GO zrkadlami. Po takejto úprave môže byť vytvorená iba jedna rovina, ktorá je konjugovaná so zadnou apertúrou mikroskopového objektívu. Táto rovina je umiestnená v strede medzi GO zrkadlami. Vzhľadom k tomu, že galvanooptické zrkadlá je možné umiestniť veľmi blízko pri sebe je orezanie laserového zväzku pred vstupom do objektívu malé. Potom posun stredu vychýleného zväzku oproti nevychýlenému zväzku v zadnej apertúre mikroskopového objektívu je daný vzťahmi:

$$\text{Posun pozdĺž osi x:} \quad \xi_x = \frac{a f_3}{2 f_2} \operatorname{tg}(2\theta_1), \quad (4.1)$$

$$\text{Posun pozdĺž osi y:} \quad \xi_y = \frac{a f_3}{2 f_2} \operatorname{tg}(2\theta_2), \quad (4.2)$$

$$\text{Celkový posun:} \quad \xi = \sqrt{\xi_x^2 + \xi_y^2}, \quad (4.3)$$

kde osi x, y tvoria ortogonálny systém súradníc, f_2 a f_3 sú ohniskové vzdialenosti šošoviek porade L_2 a L_3 , a je vzdialenosť medzi GO zrkadlami, θ_1 je uhol naklonenia GOM_1 a θ_2 je uhol naklonenia GOM_2 .

Zadná apertúra MO bude vždy zaplnená, ak bude aj pre maximálny uhol náklonu GO zrkadla platiť:

$$\xi < \frac{D_f - D_{obj}}{2}, \quad (4.4)$$

kde D_f je priemer laserového zväzku pred vstupom do MO a D_{obj} je priemer zadnej apertúry MO.

Ako je vidieť z rovnice 4.3 veľkosť posunu stredu zväzku v zadnej apertúre MO je možné zmenšiť použitím expandéra s malým priečnym zväčšením M_{ex} ($M_{ex} = \frac{f_3}{f_2}$). Použitie expandéra s menším priečnym zväčšením je možné, ak laserový zväzok bude aspoň čiastočne rozšírený na požadovanú veľkosť ešte pred vstupom do expandéra. Na to je možné použiť šošovku L_1 . Priemery jadier jednomódových optických vlákien sú do $100 \mu\text{m}$, preto je možné optické vlákno považovať za bodový zdroj svetla. Potom pre priemer laserového zväzku d_i za šošovkou L_1 platí:

$$d_i = 2f_1 \operatorname{tg}[\arcsin(NA)], \quad (4.5)$$

kde f_1 je ohnisková vzdialenosť šošovky L_1 a NA je numerická apertúra použitého optického vlákna.

Aby boli roviny konjugované musí šošovka L_2 zobrazovať zadnú apertúru objektívu do roviny medzi GO zrkadlami. To je dosiahnuté, ak platí:

$$\left(\frac{a}{2} + b\right) = \frac{f_2}{f_3} \left[f_2 + f_3 - \frac{f_2}{f_3}(d + e + g + h) \right], \quad (4.6)$$

kde f_2 a f_3 sú ohniskové vzdialenosti šošoviek porade L_2 a L_3 , význam ostatných symbolov je zrejmy z obr. 4.2.

4.1. LASEROVÁ PINZETA POLOHOVANÁ GALVANOOPTICKÝMI ZRKADLAMI

Expanzný systém Keplerovho typu je tvorený spojnými šošovkami L_2 a L_3 . Ak požadujeme, aby šošovky tvorili afokálny systém, tak vzdialenosť c medzi nimi je daná vzťahom:

$$c = f_3 + f_2, \quad (4.7)$$

význam použitých symbolov bol vysvetlený vyššie. Priemer zväzku vystupujúceho z expandéra by mal byť minimálne rovný priemeru zadnej apertúry objektívu, ideálne by jeho priemer mal byť rovný $D_{obj} + 2\xi$, aby bola splnená podmienka 4.4. Priemer zväzku vystupujúceho z expanzného systému je daný vzťahom:

$$D_f = d_i \frac{f_3}{f_2}, \quad (4.8)$$

kde d_i je priemer zväzku vstupujúceho do expandéra a D_f je priemer výstupného zväzku.

Dôležité je, aby sa optická pinzeta mohla pohybovať v celom rozsahu zorného pola a to nie len CCHM2, ale aj v celom zornom poli, ktoré poskytne kamera D_2 . Pre posunutie optickej pasce v rovine vzorku platí:

$$\text{Posun pozdĺž osi x:} \quad \Delta_x = 2 \frac{f_2}{f_3} f_{obj} \theta_1, \quad (4.9)$$

$$\text{Posun pozdĺž osi y:} \quad \Delta_y = 2 \frac{f_2}{f_3} f_{obj} \theta_2, \quad (4.10)$$

$$\text{Celkový posun:} \quad \Delta = \sqrt{\Delta_x^2 + \Delta_y^2}, \quad (4.11)$$

význam použitých symbolov bol vysvetlený vyššie.

Maximálna výchylka optickej pasce je daná vzťahom:

$$\Delta_{max} = \frac{\sqrt{(N_{pxx}|px_x|)^2 + (N_{pxy}|px_y|)^2}}{2} \frac{1}{M_{obj}}, \quad (4.12)$$

kde N_{pxx} je počet pixelov v smere osi x, N_{pxy} je počet pixelov v smere osi y, $|px_x|$ je veľkosť pixelu v smere osi x, $|px_y|$ je veľkosť pixelu v smere osi y a M_{obj} je zväčšenie použitého mikroskopového objektívu. Os x a y sú orientované pozdĺž hrán čipu tak, aby tvorili ortogonálny systém súradníc.

4.1.2. Návrh komponentov pre laserovu pinzetu

Funkčnosť laserovej pasce bola overená⁵ s mikroskopovým objektívom OLYMPUS UPLSAPO 60XW (60x/1,2, vodná imerzia), ktorý je možné použiť aj pre CCHM2⁶.

V návrhu je ako detektor polohy zväzku D_2 použitá CCD kamera MR274MU-SH (2.01M, 8.5x6.8 mm, B/W, CCD, IEEE1394A) od firmy SOFTHARD Technology. Ako tubusová šošovka je použitá Nikon 200 mm Tube Lens. Optické vlákno je použité NT59-302 (VIS/NIR vlákno, NA = 0,12, 100 μ m priemer, 5 m dĺžka) od spoločnosti EDMUND OPTICS.

Návrh laserovej pinzety bol nasimulovaný a optimalizovaný pomocou softvéru ZEMAX®. V návrhu bol mikroskopový objektív nahradený paraxiálnou šošovkou, pretože výrobca

⁵Overil Ing. Mojmír Šerý, Ph.D., na FSI VUT v Brne.

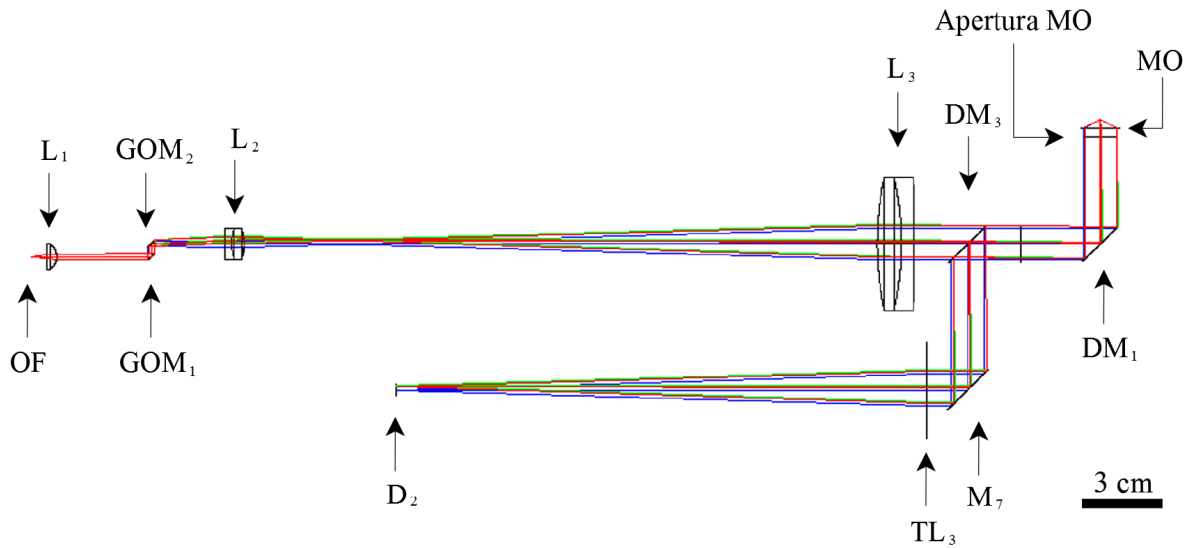
⁶Overil Ing. Tomáš Slabý, na FSI VUT v Brne.

4. NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM DRUHEJ GENERÁCIE

neuvádza dostatočne presné parametre a usporiadanie optických členov. Pre ohniskovú vzdialenosť podľa [17] platí:

$$f_{obj} = \frac{\text{ohnisková vzdialenosť tubusovej šošovky použitého mikroskopového objektívu}}{\text{zväčšenie použitého mikroskopového objektívu}} \quad (4.13)$$

Pri simuláciach boli dosiahnuté najlepšie výsledky pri použití asférickej šošovky od firmy THORLABS na kolimáciu a šošoviek TECHSPEC® Near IR doublets od firmy EDMUND OPTICS v expandéry. Ako kolimačná šošovka L_1 je použitá A240-B s ohniskovou vzdialenosťou 8 mm a priemerom 9,94 mm. V expandéry je ako šošovka L_2 použitá NT45-795 s ohniskovou vzdialenosťou 35 mm a priemerom 12 mm a ako šošovka L_3 je použitá NT47-319 s ohniskovou vzdialenosťou 200 mm a priemerom 50 mm. Šošovky sú pokryté anti-reflexnou vrstvou, ktorá má na vlnovej dĺžke 1064 nm odrazivosť menšiu ako 1%. Model laserovej pinzety polohovanej GO zrkadlami v programe ZEMAX® je na obr. 4.3.



Obr. 4.3: Modul laserovej pinzety polohovanej GO zrkadlami v programe Zemax®. Červená - nevychýlená optická pasca, Zelená - vychýlená optická pasca (uhol náklonu $GOM_1 = 2^\circ$), Modrá - vychýlená optická pasca (uhol náklonu $GOM_1 = -2^\circ$).

Pre takto zvolený systém boli podľa vzťahov z časti 4.1.1 a konštrukčných požiadaviek určené hodnoty parametrov optickej pinzety polohovanej GO zrkadlami. Parametre optickej pinzety polohovanej GO zrkadlami sú uvedené v tabuľke 4.1. Pri návrhu v programe Zemax® bolo cieľom optimalizovať parametre optickej pinzety tak, aby veľkosť stopy v mieste ohniska MO bola menšia ako je difrakčný limit sústavy. V difrakčne limitovanej sústave sú do značnej miery vykorigované optické vady a gradient svetla sa blíži k maximálnej možnej hodnote.

Na obr. 4.4 je SPOT DIAGRAM⁷ a THROUGH FOCUS SPOT DIAGRAM⁸ v mieste ohniska mikroskopového objektívu s krokom 250 nm. Kružnica v strede SPOT DIAGRAM predstavuje Airyho disk⁹ sústavy.

⁷Diagram znázorňuje veľkosť stopy zväzku v danom mieste.

⁸Diagram znázorňuje veľkosť stopy zväzku v definovaných osových vzdialenostiach od určeného miesta.

⁹Difrakčný limit optickej sústavy

4.1. LASEROVÁ PINZETA POLOHOVANÁ GALVANOOPTICKÝMI ZRKADLAMI

Na obr. 4.5 je graf závislosti posunutia optickej pasce na uhle natočenia GOM₁¹⁰. Teoretická hodnota bola vypočítaná zo vzťahu 4.11. Hodnota získaná zo ZEMAX® by mala zodpovedať realite. Hodnoty sa mierne líšia, čo môže byť spôsobené nahradením paraxiálnych šošoviek reálnymi.

Povrch	Komentár	R [mm]	T [mm]	Sklo	D [mm]
OBJ	OF, L_1	∞	5,6649		
1	L_1	632,73	3,6900	S-LAL13	5,00
2*	L_1	-5,48			5,00
STO	L_1 , GOM ₁	∞	35,5390		
4	GOM ₁	∞		Zrkadlo	1,50
5	a	∞	5,0000		
6	GOM ₂	∞		Zrkadlo	
7	b	∞	27,7285		
8	L_2	193,84	2,5000	N-SF6	6,00
9	L_2	19,17	4,5000	N-LAK22	6,00
10	L_2	-20,23			6,00
11	c	∞	238,2963		
12	L_3	114,74	9,0000	N-LAK22	25,00
13	L_3	-114,74	5,0000	N-SF6	25,00
14	L_3	-1258,40			25,00
15	d	∞	20,0000		
16	DM ₃	∞		Zrkadlo	
17	e	∞	20,0000		
18	g	∞	30,0000		
19	DM ₁	∞		Zrkadlo	
20	h	∞	40,0000		
21	Apertúra MO	∞	3,3000		6,00
Paraxial	MO, $f_{obj}=3,3$ mm		3,3000		6,00

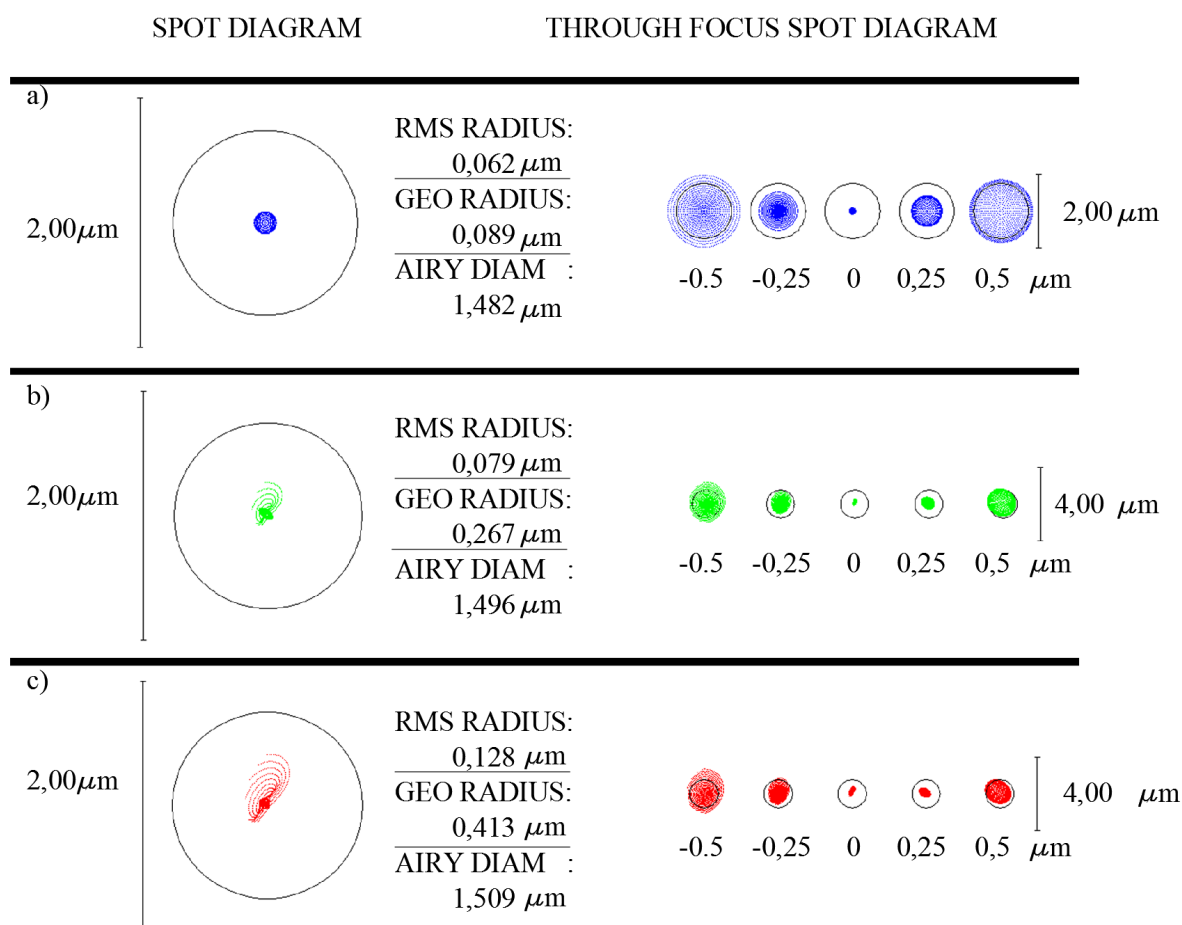
2*			
k [-]	A_4 [mm ⁻³]	A_6 [mm ⁻⁵]	A_8 [mm ⁻⁷]
0,0000	-50,9290.10 ⁻⁵	-0,1286.10 ⁻⁵	-0,0870.10 ⁻⁵

Tabuľka 4.1: Parametre optickej pinzety polohovanej GO zrkadlami. R -polomer krivosti, T -osová šírka, D -priemer, $|X, Y|$ - vzdialenosť medzi X a Y , k - je „conic constant“, A_4 (A_6 , A_8) - asferický koeficient štvrtého (šiesteho, ôsmeho) rádu. Vzdialenosti týkajúce sa šošoviek sú merané od vrcholov. Rovnica asferickej plochy je:

$$z = \frac{Y^2}{R \left[1 + \sqrt{1 - (1+k)Y^2/R^2} \right]} + A_2 Y^2 + A_4 Y^4 + A_6 Y^6 + A_8 Y^8.$$

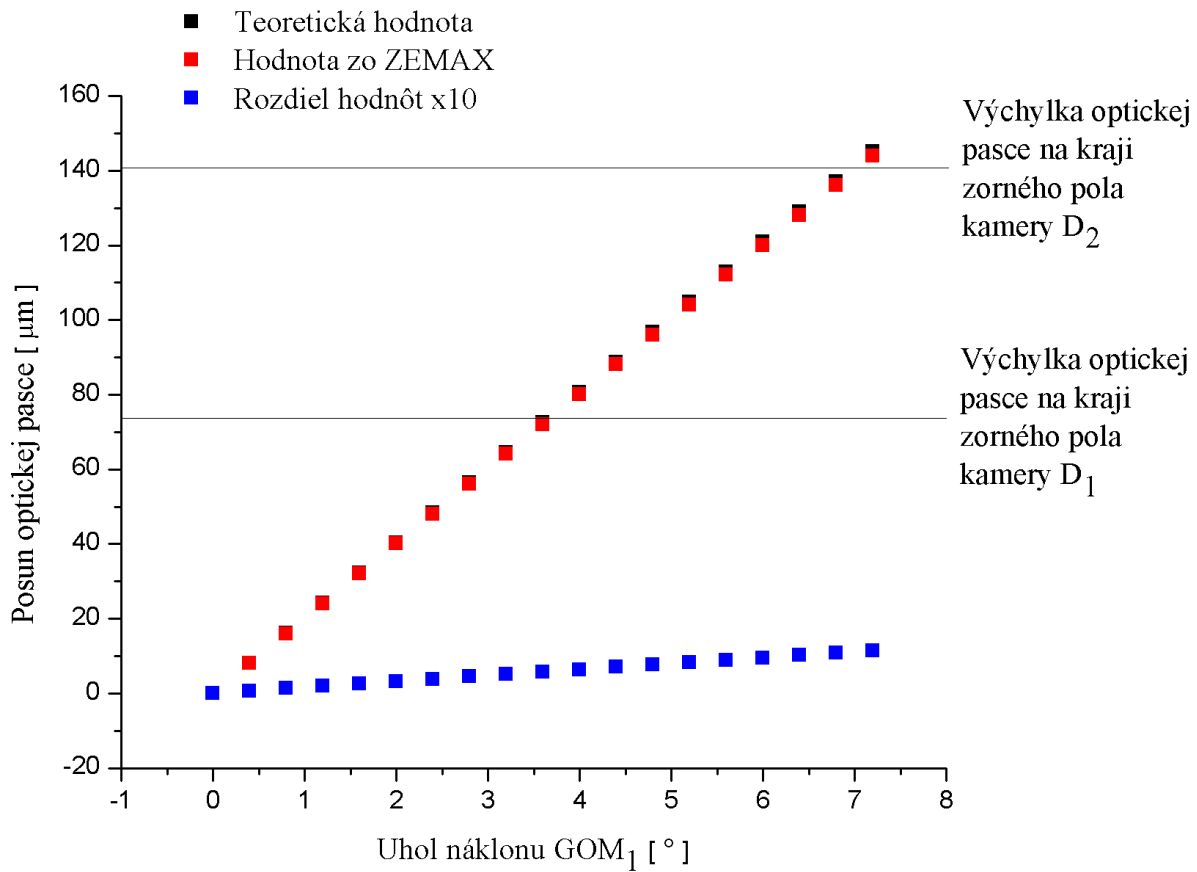
¹⁰Vzhľadom k symetrii je graf závislosti posunutia optickej pasce na uhle natočenia GOM₂ rovnaký

4. NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM DRUHEJ GENERÁCIE



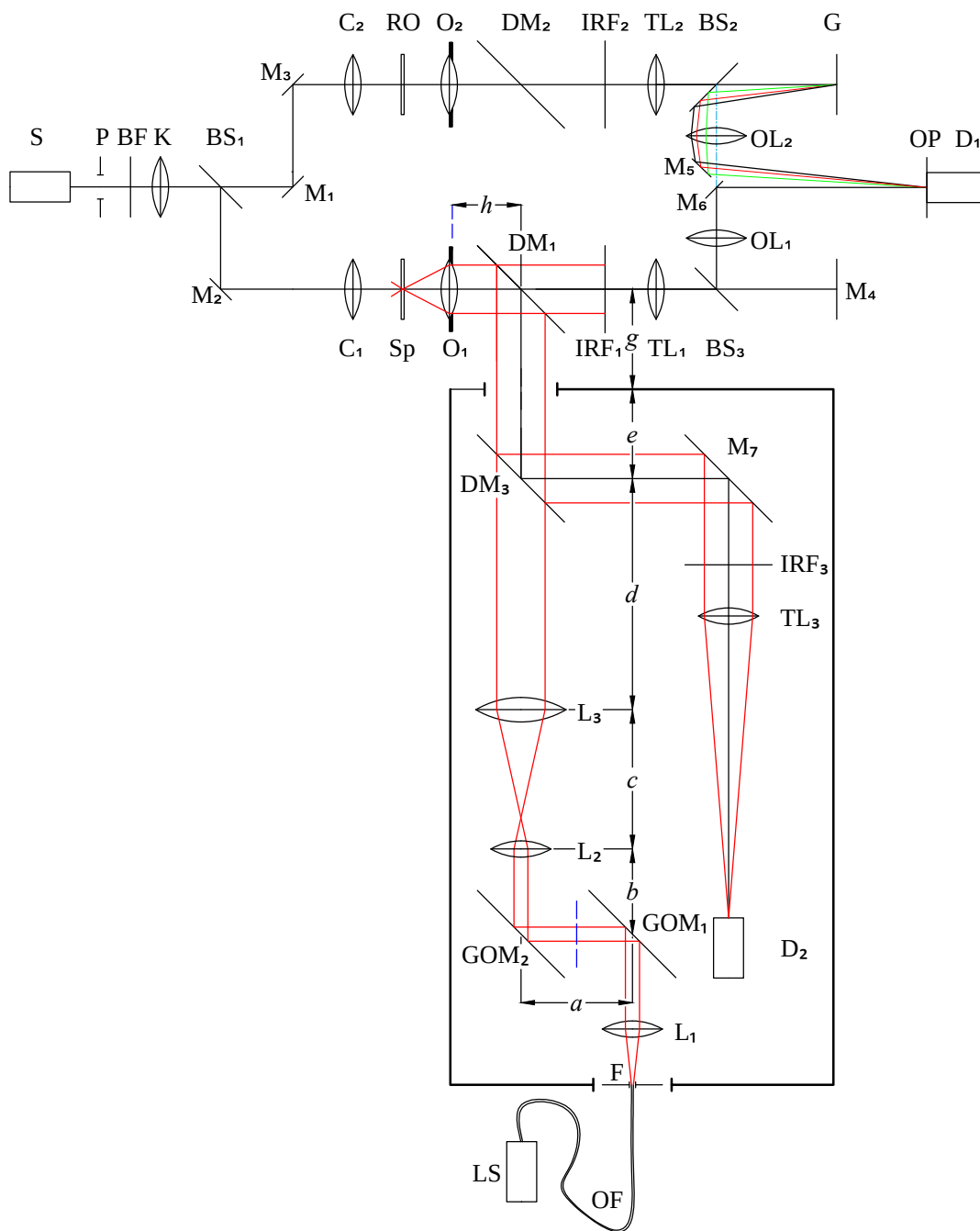
Obr. 4.4: *SPOT DIAGRAM* a *THROUGH FOCUS SPOT DIAGRAM* v mieste ohniska.
a) Nevychýlený zväzok. b) Vychýlený zväzok, uhol náklonu $GOM_1=1,4^\circ$ a $GOM_2=1,4^\circ$.
c) Vychýlený zväzok, uhol náklonu $GOM_1=2,0^\circ$ a $GOM_2=2,0^\circ$.

4.1. LASEROVÁ PINZETA POLOHOVANÁ GALVANOOPTICKÝMI ZRKADLAMI



Obr. 4.5: Graf závislosti posunutia optickej pasce na uhle natočenia GOM_1 . Kraju zorného pola kamery D_1 zodpovedá uhol natočenia GOM_1 $\theta = 3,67^\circ$. Kraju zorného pola kamery D_2 zodpovedá uhol natočenia GOM_1 $\theta = 7,03^\circ$.

4. NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM DRUHEJ GENERÁCIE



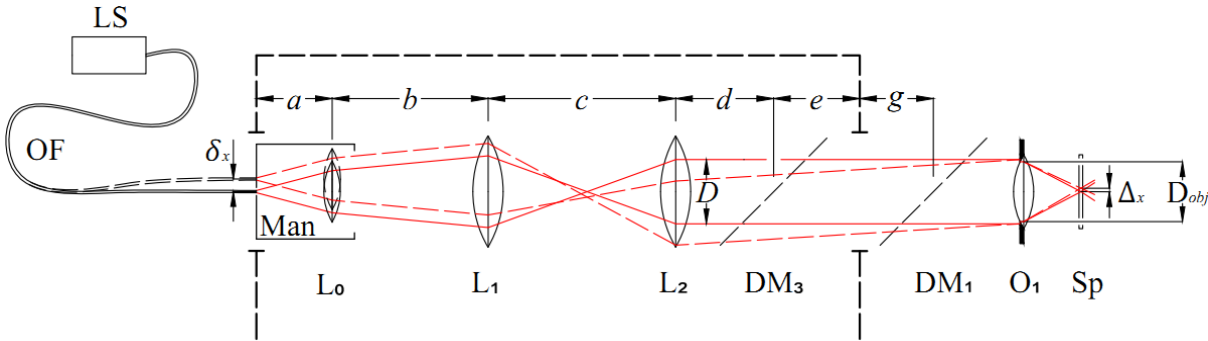
Obr. 4.6: Optická schéma CCHM druhej generácie s laserovou pinzetou polohovanej GO zrkadlami. S - zdroj svetla, P - clona, BF - interferenčný filter, K - kolektor, BS₁–BS₃ - deliče, M₁–M₇ - zrkadlá, C₁, C₂ - kondenzory, O₁, O₂ - objektívy, Sp - pozorovaný objekt, RO - referenčný objekt, IRF₁–IRF₃ - infračervené filtre, TL₁–TL₃ - tubusové šošovky, OL₁, OL₂ - výstupné šošovky, OP - výstupná rovina, D₁, D₂ - detektory, LS - laser, G - blejzovaná reflexná difrakčná mriežka, GOM₁, GOM₂ - galvanooptické zrkadlá, L₁–L₃ - šošovky, DM₁–DM₃ - dichroické zrkadlá, opticky združené roviny sú naznačené modrou čiarkovanou čiarou.

4.2. Laserová pinzeta polohovaná pohybom optického vlákna

Laserová pinzeta polohovaná pohybom optického vlákna je založená na princípe Köhlerovho osvetlenia. V Köhlerovom osvetľovači kolektor vytvára obraz zdroja v prednej ohniskovej rovine kondenzoru. Takže každý bod zobrazeného zdroja osvetľuje vzorku rovinnou vlnou. Oproti klasickému Köhlerovmu osvetľovaču je v návrhu použitý bodový zdroj svetla OF, ktorého pohybom kolmo k ose sa volí uhol pod ktorým je osvetľovaná vzorka - zadná apertúra mikroskopového objektívu. V zjednodušenej optickej schéme laserovej pinzety navrhutej pre CCHM2 znázornenej na obr. 4.7 plní úlohu kolektora šošovka L_1 a šošovka L_2 slúži ako kondenzor.

Optická schéma modulu laserovej pinzety polohovanej pohybom optického vlákna pripojeného k CCHM2 je na obr. 4.11 na strane 46. Modul laserovej pinzety tvorí manipulátor Man, kolektorová šošovka L_1 , kondenzorová šošovka L_2 , dichroické zrkadlo DM_3 , zrkadlo M_7 a detektor polohy zväzku tvorený IRF_3 , TL_3 , D_2 .

4.2.1. Výpočet parametrov laserovej pinzety



Obr. 4.7: Schématické znázornenie vzdialeností optickej pinzety pripojenej k CCHM2. LS - laser, OF - optické vlákno, L_0 – L_2 - šošovky, DM_1 , DM_3 - dichroické zrkadlá, O_1 - objektív, Sp - pozorovaný objekt.

Laserová pinzeta je navrhnutá tak, aby posun optickej pasce v rovine vzorky bol závislý na posune optického vlákna OF. Posun laserovej pasce v rovine vzorky je daný vzťahmi:

$$\text{Posun pozdĺž osi x:} \quad \Delta_x = \frac{2f_{obj}\text{tg}[\arcsin(NA)]}{D}\delta_x, \quad (4.14)$$

$$\text{Posun pozdĺž osi y:} \quad \Delta_y = \frac{2f_{obj}\text{tg}[\arcsin(NA)]}{D}\delta_y, \quad (4.15)$$

$$\text{Celkový posun:} \quad \Delta = \sqrt{\Delta_x^2 + \Delta_y^2}, \quad (4.16)$$

kde osi x, y tvoria ortogonálny systém súradníc, f_{obj} je ohnisková vzdialenosť mikroskopového objektívu, NA je numerická apertúra optického vlákna, D je požadovaný priemer laserového zväzku, δ_x je výchylka optického vlákna pozdĺž osi x, δ_y je výchylka optického vlákna pozdĺž osi y. Priemer laserového zväzku D pred vstupom do MO by mal

4. NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM DRUHEJ GENERÁCIE

byť rovný priemeru zadnej apertúry MO D_{obj} . Z praktických dôvodov sa zadná apertúra mikroskopového objektívu preplňuje.

Jednou z požiadaviek pri navrhovaní laserovej pinzety polohovanej posunom optického vlákna bolo, aby maximálna výchylka optického vlákna, ktorá je limitovaná manipulátorom Man, v ktorom je OF uchytené, bola rovná požadovanej maximálnej výchylke optickej pasce, ktorá je daná vzťahom 4.12. Ako je vidieť zo vzťahu 4.16 splnenie tejto podmienky je možné jedine zmenením NA , pretože f_{obj} a D sú vlastnosti MO, ktorý je súčasťou CCHM2. Zmenu NA je možné realizovať vložением šošovky L_0 medzi optické vlákno a kolektorovú šošovku. Šošovka L_0 vytvára virtuálny obraz zdroja s požadovanou numerickou apertúrou, ak je umiestnená vo vzdialenosti a od OF. Šošovka musí byť taktiež uchytená v manipulátore, aby sa virtuálny obraz OF pohyboval rovnako ako skutočné OF. Vzdialenosť a je daná vzťahom:

$$a = f_0 - \frac{D}{2\text{tg}[\arcsin(NA)]} \frac{f_0}{f_{obj}} \frac{\Delta_{max}}{\delta_{max}}, \quad (4.17)$$

kde f_0 je ohnisková vzdialenosť šošovky L_0 , Δ_{max} je maximálna výchylka optickej pasce a δ_{max} je maximálna výchylka optického vlákna - rozsah pohybu manipulátoru Man. Ostatné symboly boli vysvetlené vyššie.

Aby šošovky L_1 a L_2 tvorili Köhlerov osvetlovač s požadovanými parametrami musí byť ohnisková vzdialenosť kondenzorovej šošovky rovná:

$$f_2 = \frac{Dk}{2\text{tg}[\arcsin(NA_{virt})]}, \quad (4.18)$$

$$k = \frac{f_1}{a_0 - f_1}, \quad (4.19)$$

$$a_0 = \frac{af_0}{a - f_0} + b, \quad (4.20)$$

$$NA_{virt} = \sin \left[\arctg \left(\frac{D\Delta_{max}}{2f_{obj}\delta_{max}} \right) \right], \quad (4.21)$$

kde k je zväčšenie šošovky L_1 , a_0 je vzdialenosť virtuálneho OF od šošovky L_1 a NA_{virt} je numerická apertúra virtuálneho OF. A pre vzdialenosť medzi šošovky L_1 a L_2 musí platiť:

$$c = ka_0 + f_2, \quad (4.22)$$

význam symbolov bol vysvetlený vyššie.

Po pridaní šošovky L_0 je nutné v rovniciach pre posun optickej pasce nahradiť hodnotu numerickej apertúry optického vlákna NA hodnotou numerickej apertúry virtuálneho optického vlákna NA_{virt}

Aby bola zadná apertúra mikroskopového objektívu vždy zaplnená musí, byť umiestnená v mieste krížiska laserových zväzkov, čiže musí platiť:

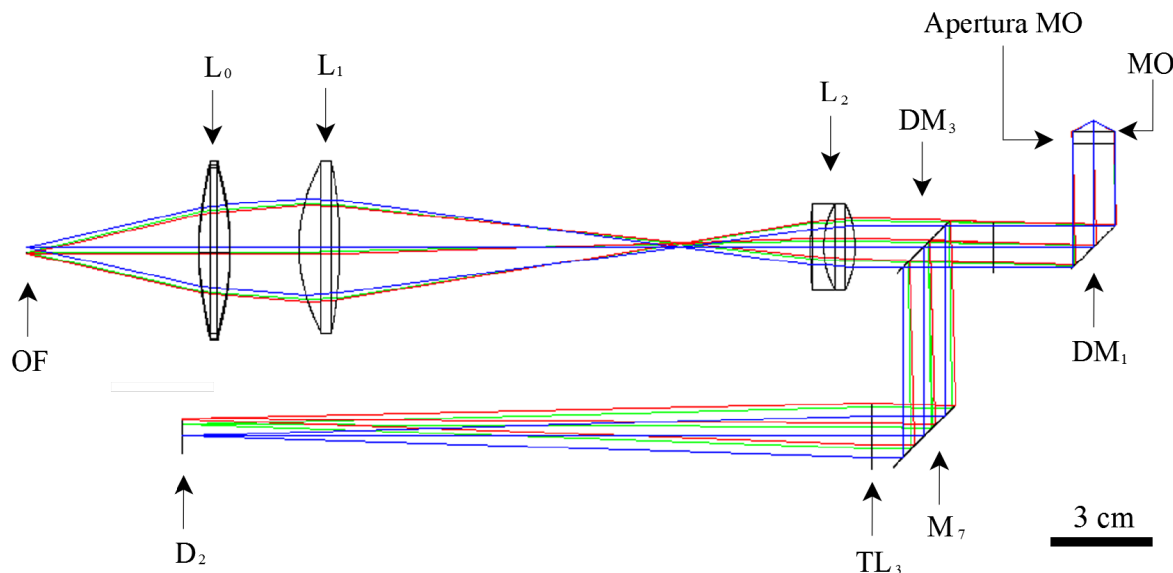
$$(d + e + g + h) = \frac{D}{2\text{tg}[\arcsin(NA_{virt})]} \left\{ k + \frac{D(k+1)}{2a_0\text{tg}[\arcsin(NA_{virt})]} \right\}, \quad (4.23)$$

význam symbolov bol vysvetlený vyššie alebo je zrejmý z obr. 4.7.

4.2. LASEROVÁ PINZETA POLOHOVANÁ POHYBOM OPTICKÉHO VLÁKNA

4.2.2. Návrh komponentov pre laserovu pinzetu

Pri návrhu komponentov pre laserovú pinzetu polohovanú pohybom optického vlákna bol použitý rovnaký objektív, CCD kamera a tubusová šošovka ako pri návrhu laserovej pinzety polohovanej GO zrkadlami. Optické vlákno je použité NT57-078 (VIS/NIR vlákno, $NA = 0,22$, $50\mu\text{m}$ priemer, 5m dĺžka) od spoločnosti EDMUND OPTICS. Mikroskopový objektív bol z rovnakých dôvodov ako v časti 4.1.1 nahradený paraxiálnou šošovkou s ohniskovou vzdialenosťou danou vzťahom 4.13. Návrh bol nasimulovaný a optimalizovaný pomocou softvéru ZEMAX[®]. Model laserovej pinzety polohovanej pohybom optického vlákna v programe ZEMAX[®] je na obr. 4.8.



Obr. 4.8: Modul laserovej pinzety polohovanej pohybom optického vlákna v programe Zemax[®]. *Modrá* - nevychýlená optická pasca, *Zelená* - vychýlená optická pasca ($\delta=1,4\text{ mm}$), *Červená* - vychýlená optická pasca ($\delta=2,0\text{ mm}$).

Pri simuláciach sa nepodarilo dosiahnuť difrakčne limitovanú sústavu iba pomocou šošoviek uvádzaných v katalógoch firiem¹¹. Aby bol v návrhu dosiahnutý difrakčný limit, bolo nutné šošovky L_0 a L_1 vymodelovať pomocou softvéru ZEMAX[®]. Parametre šošoviek sú uvedené v tabuľke 4.2.

Ako šošovku L_2 je možné použiť NT45-802 zo série TECHSPEC[®] Near IR doublets od firmy EDMUND OPTICS s ohniskovou vzdialenosťou 45 mm a priemerom 25 mm.

Pre takto zvolený systém boli podľa vzťahov z kapitoly 4.2.1 a konštrukčných požiadaviek určené hodnoty parametrov optickej pinzety polohovanej pohybom optického vlákna. Parametre optickej pinzety sú uvedené v tabuľke 4.2.

Na obr. 4.9 je *SPOT DIAGRAM* a *THROUGH FOCUS SPOT DIAGRAM* v mieste ohniska mikroskopového objektívu s krokom 250nm. Kružnica v strede *SPOT DIAGRAM* predstavuje Airyho disk sústavy.

¹¹EDMUND OPTICS, THORLABS

4. NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM DRUHEJ GENERÁCIE

Na obr. 4.5 je graf závislosti posunutia optickej pasce na posunutí optického vlákna pozdĺž osi x ¹². Teoretická hodnota bola vypočítaná zo vzťahu 4.16. Hodnota získaná zo ZEMAX®-u by mala zodpovedať realite. Hodnoty sa mierne líšia, čo môže byť spôsobené nahradením paraxiálnych šošoviek reálnymi.

Povrch	Komentár	R [mm]	T [mm]	Sklo	D [mm]
1	a	∞	49,80		
2*	L_0	72,2796	9,00	BK7	25,0
3	L_0	-87,7581			25,0
4	b	∞	20,00		
5*	L_1	45,9608	12,00	BK7	25,0
6	L_1	-112,0076			25,0
7	c	∞	136,31		
8	L_2	132,9200	4,00	N-SF6	12,5
9	L_2	25,5300	9,00	N-LAK22	12,5
10	L_2	-29,0100			12,5
11	d	∞	20,00		
12	DM_3	∞		Zrkadlo	
13	e	∞	20,00		
14	g	∞	29,25		
15	DM_1	∞		Zrkadlo	
14	h	∞	30,00		
15	Apertúra MO	∞	3,30		6,0
Paraxial	MO, $f_{obj}=3,3$ mm		3,30		6,0

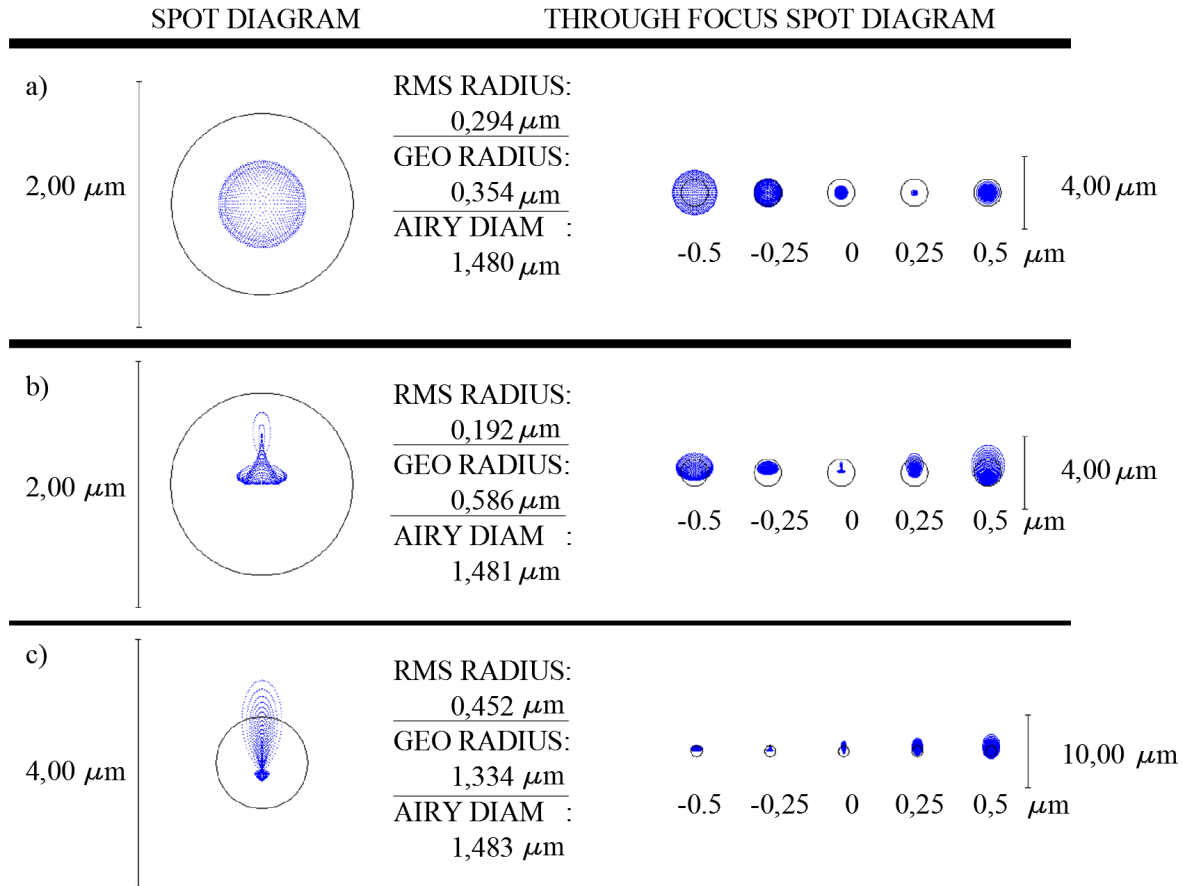
2*		
k [-]	A_4 [mm ⁻³]	A_6 [mm ⁻⁵]
-27,5527.10 ⁻²	-0,0004.10 ⁻²	20,8322.10 ⁻¹⁰

5*		
k [-]	A_4 [mm ⁻³]	A_6 [mm ⁻⁵]
-98,2125.10 ⁻²	-94,7357.10 ⁻⁸	-33,7364.10 ⁻¹²

Tabuľka 4.2: Parametre optickej pinzety polohovanej pohybom optického vlákna. R - polomer krivosti, T - osová šírka, D - priemer, k - „conic constant“, A_4 (A_6) - asferický koeficient čtvrtého (šiesteho) rádu. Vzďialenosti týkajúce sa šošoviek sú merané od vrcholov. Rovnica asferickej plochy je: $z = \frac{Y^2}{R[1+\sqrt{1-(1+k)Y^2/R^2}]} + A_2Y^2 + A_4Y^4 + A_6Y^6 + A_8Y^8$.

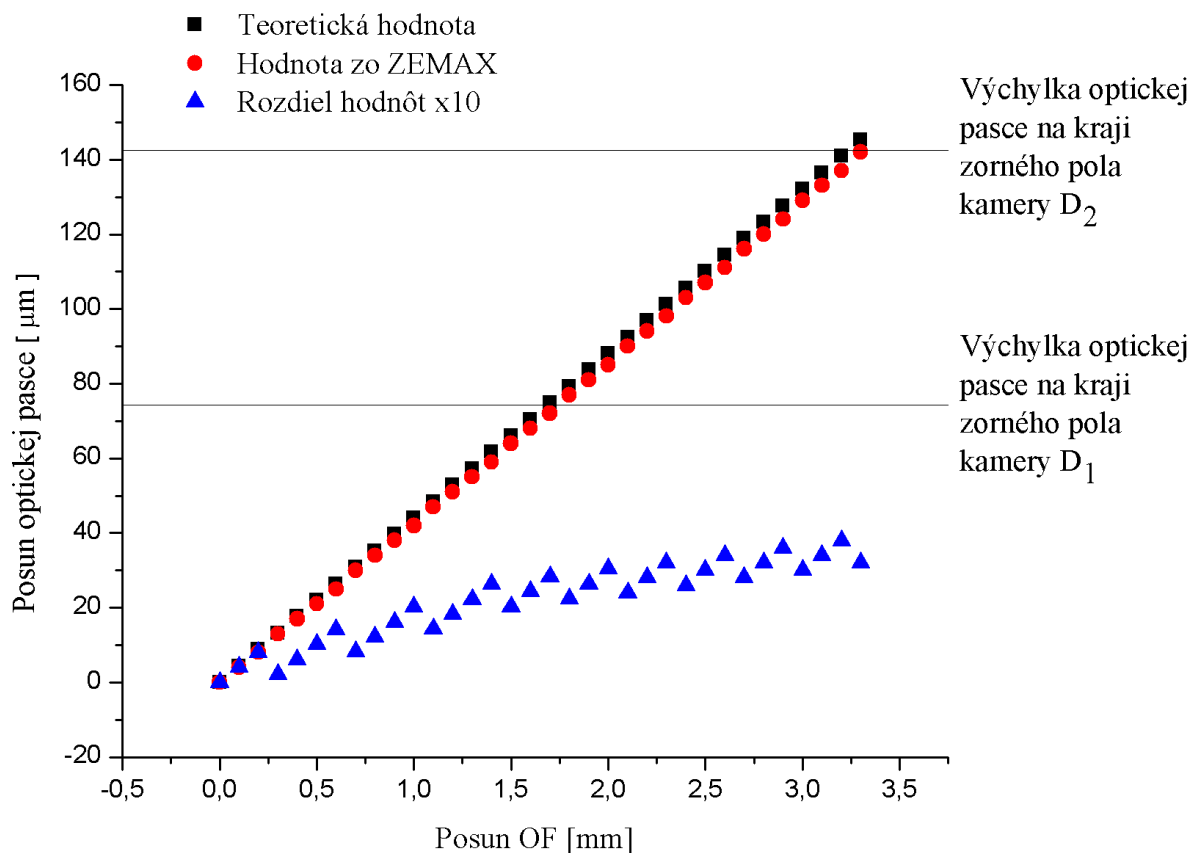
¹²Vzhľadom k symetrii je graf závislosti posunutia optickej pasce na posunutí optického vlákna pozdĺž osi y rovnaký

4.2. LASEROVÁ PINZETA POLOHOVANÁ POHYBOM OPTICKÉHO VLÁKNA



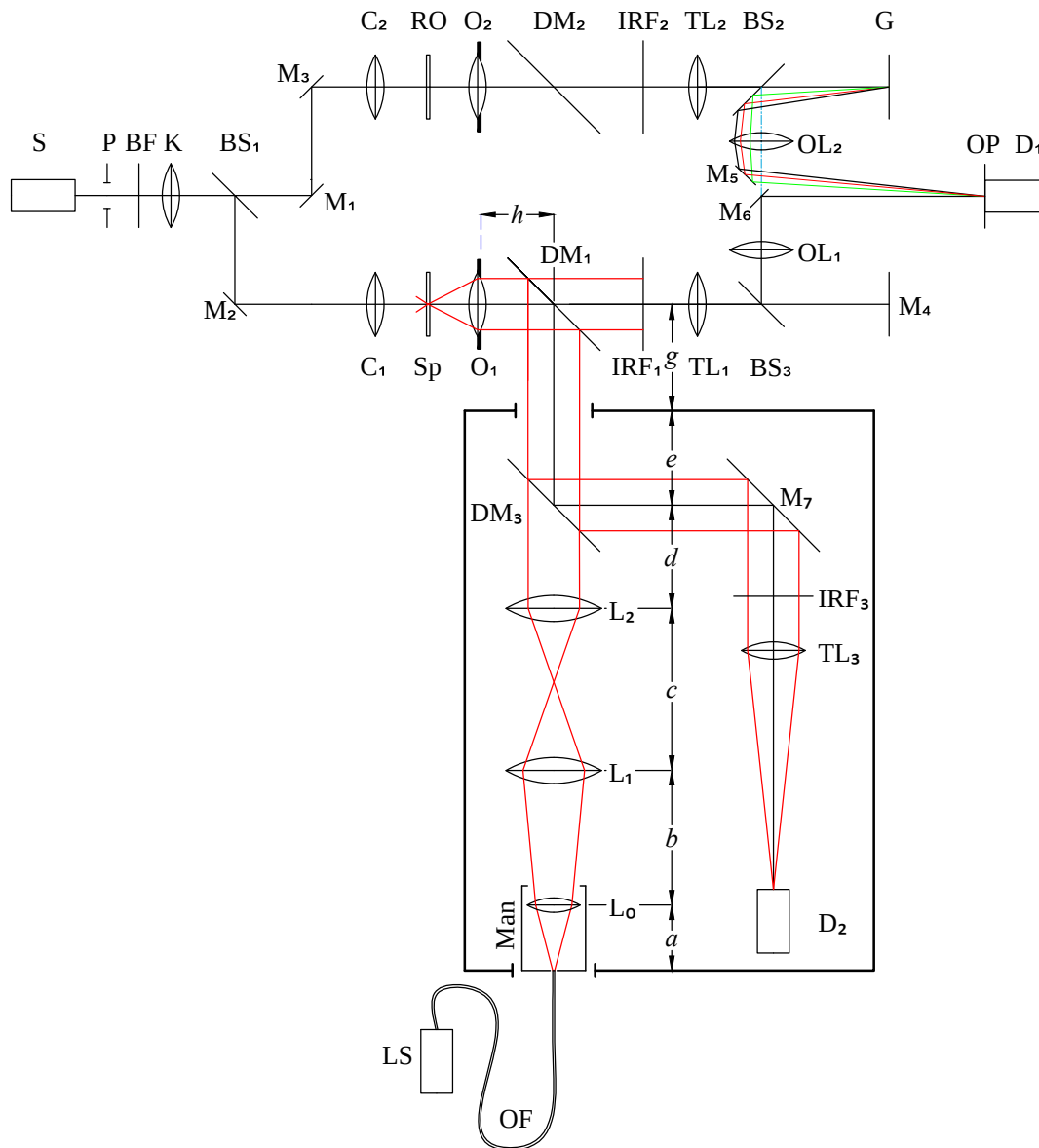
Obr. 4.9: *SPOT DIAGRAM* a *THROUGH FOCUS SPOT DIAGRAM* v mieste ohniska.
 a) Nevychýleného optického vlákna. b) Posunutého optického vlákna $\delta_x = 1,4 \text{ mm}$. c)
 Posunutého optického vlákna $\delta_x = 2,0 \text{ mm}$.

4. NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM DRUHEJ GENERÁCIE



Obr. 4.10: Graf závislosti posunutia optickej pasce na posunutí optického vlákna. Kraju zorného pola kamery D_1 zodpovedá výchylka OF $\delta = 1,66$ mm. Kraju zorného pola kamery D_2 zodpovedá výchylka OF $\delta = 3,19$ mm.

4.2. LASEROVÁ PINZETA POLOHOVANÁ POHYBOM OPTICKÉHO VLÁKNA



Obr. 4.11: Optická schéma CCHM druhej generácie s laserovou pinzetou polohovanou pohybom optického vlákna. S - zdroj svetla, P - clona, BF - interferenčný filter, K - kolektor, BS₁–BS₃ - deliče, M₁–M₇ - zrkadlá, C₁, C₂ - kondenzory, O₁, O₂ - objektívy, Sp - pozorovaný objekt, RO - referenčný objekt, IRF₁–IRF₃ - infračervené filtre, TL₁–TL₃ - tubusové šošovky, OL₁, OL₂ - výstupné šošovky, OP - výstupná rovina, D₁, D₂ - detektory, LS - laser, G - blejzovaná reflexná difrakčná mriežka, LS - laser, OF - optické vlákno, Man - manipulátor, L₀–L₂ - šošovky, DM₁–DM₃ - dichroické zrkadlá.

4.3. Porovnanie návrhov laserovej pinzety pre CCHM druhej generácie

Oba návrhy optickej pinzety pre CCHM2 spĺňajú zadané požiadavky t.j. pinzeta tvorí samostatný modul pripojiteľný k CCHM2, laserová pasca sa môže pohybovať v celom zornom poli CCHM2. Navyše je do modulov pridaný detektor polohy zväzku, ktorého funkcia bola popísaná v časti 4.

Pri navrhovaní laserovej pinzety polohovanej galvanooptickými zrkadlami bolo možné dosiahnuť difrakčne limitovanú sústavu s použitím katalógových šošoviek, čo je podstatné z finančného hľadiska. Tento variant taktiež umožňuje tzv. časovo zdieľané pasce (TST¹³). TST je spôsob, ako vytvoriť viacero optických pascí jedným laserom [9]. Hlavnou nevýhodou laserovej pinzety polohovanej GO zrkadlami je posun stredu vychýleného zväzku oproti nevychýlenému zväzku v zadnej apertúre mikroskopového objektívu a finančná náročnosť GO zrkadiel.

Laserovú pinzetu polohovanú pohybom optického vlákna sa nepodarilo zostaviť do modelu s požadovanými parametrami iba so šošovkami z katalógov. Aby bola dosiahnutá difrakčne limitovaná sústava museli byť pomocou programu ZEMAX[®] dve šošovky vymodelované ako asférické, čo by pri zostavovaní tohoto variantu predstavovalo veľkú finančnú nevýhodu. Ďalšou nevýhodou oproti laserovej pinzety polohovanej GO zrkadlami je nižšia rýchlosť pohybu optickej pasce, aj keby bol pohyb mechanizovaný.

Z hodnôt získaných zo simulácií v programe ZEMAX[®] a vyššie uvedených argumentov jasne vyplýva, že laserová pinzeta polohovaná GO zrkadlami bude vhodnejším variantom. Pre tento variant bude vytvorený mechanický návrh uloženia optických prvkov.

4.4. Mechanický návrh laserovej pinzety polohovanej GO zrkadlami

Mechanický návrh laboratórneho riešenia laserovej pinzety polohovanej galvanooptickými zrkadlami (obr. 4.12, 4.13) bol vytvorený v programe Autodesk[®] Inventor[®] PROFESSIONAL 2010 z dielov zo sady Cage Systems od firmy THORLABS. Základ mechanického návrhu je vytvorený z 30 mm Cage Components. Na obr. 4.14 je zobrazený modul laserovej pinzety polohovanej GO zrkadlami pripojený k CCHM2¹⁴. Obrázky boli vyrendrované v programe SolidWorks.

V mechanickom návrhu sa môže optické vlákno OF, šošovky L_1 , L_2 , L_3 , TL_3 , dichroické zrkadlá DM_1 , DM_2 , DM_3 a kamera voľne pohybovať pozdĺž optických osí.

Optické vlákno je uchytené pomocou Fiber Adapter (S1FCA). Na upevnenie OF ku Cage System je použité Z-Axis Translation Mount (SM1Z), pomocou ktorého je možné presne pohybovať OF pozdĺž osi. To umožní vytvorenie dobre kolimovaného zväzku.

Šošovka L_1 je uchytená v $\varnothing 1/2"$ Lens Tube (SM05L05). Prichytenie ku konštrukcii je realizované pomocou SM05 Threaded Cage Plate (SP02) a Cage Adapter 16 mm to 30 mm (SP05).

Galvanooptické zrkadlá (GVS002) sú umiestnené v 2D Galvo 30 mm Cage System Mount (GCM002).

¹³Time-sharing traps

¹⁴3D model CCHM2 poskytol vedúci bakalárskej práce Ing. Zbyněk Dostál

4.4. MECHANICKÝ NÁVRH LASEROVEJ PINZETY POLOHOVANEJ GO ZRKADLAMI

Krok č.1:	Vytvorenie kolimovaného zväzku pohybom OF a šošovky L_1 ,
Krok č.2:	nastavenie GO zrkadiel tak, aby vystupujúci zväzok smeroval do stredu šošovky L_1 ,
Krok č.3:	vytvorenie kolimovaného zväzku za expandérom pohybom šošoviek L_2 a L_3 ,
Krok č.4:	nastavenie zrkadla DM_1 tak, aby laserový zväzok prekryl zadnú apertúru mikroskopového objektívu O_1 ,
Krok č.5:	nastavenie uhlu natočenia zrkadiel DM_3 a M_7 tak, aby svetlo z mikroskopu a laserový zväzok smerovali do TL_3 ,
Krok č.6:	doostrenie obrazu vzniknutého na D_2 pomocou šošovky TL_3 ,
Krok č.7:	upravenie uhlu natočenia GO zrkadiel tak, aby nulový uhol náklonu zodpovedal stredu zorného pola,
Krok č.8:	nastavenie polohy optickej pasce do ohniskovej roviny MO pohybom šošovky L_2 ,
Krok č.9:	nastavenie uhlu natočenia DM_2 tak, aby kompenzovalo fázový a priečny posun vyzniknutý na DM_1 .

Tabuľka 4.3: Postup justáže.

Šošovka L_2 je uchytená podobne ako šošovka L_1 , s využitím rovnakých komponentov.

Aby bolo možné osadiť šošovku L_3 do zostavy vytvorenej z 30 mm Cage Components, je nutné, vzhľadom k jej priemeru, použiť Cage Plate Adapter 30 mm to 60 mm, a tým vytvoriť časť, kde by bolo možné s L_3 pohybovať. Šošovka L_3 je uchytená v $\varnothing 2''$ Lens Tubes (SM2M20) a prichytená ku konštrukcii pomocou 60 mm Threaded Cage Plate, 0.5" Thick (LCP01).

Zrkadlo DM_3 je uchytené ku konštrukcii pomocou dielu Gimbal Mount (KC45D), ktorý umožňuje nastavenie uhlu medzi optickou osou a DM_3 .

Zrkadlá DM_1 a DM_2 je možné nastaviť aj výškovo a je možné s nimi otáčať okolo osi prechádzajúcej stredom „kocky“, v ktorej sú uchytené a kolmej k rovine optickej pinzety. Zrkadlá DM_1 a DM_2 spolu s infračervenými filtermi IRF_1 , IRF_2 sú uchytené v CM1 Prism/Mirror Cage Cube Mounts (CM1-4ER). Prichytenie ku konštrukcii je realizované pomocou dielu Rotatable Cage Mount, V-Groove (ARV1).

Zrkadlo M_7 je uchytené ku konštrukcii pomocou dielu Right Angle Kinematic Cage Mount (KCB1), ktorý umožňuje nastavenie uhlu odrazu v dvoch nezávislých rovinách.

Šošovka TL_3 je uchytená v $\varnothing 1''$ Lens Tube (SM1M05). Prichytenie ku konštrukcii je realizované dielom Z-Axis Translation Mount (SM1Z), pomocou ktorého je možné doostriť obraz na kamere D_2 .

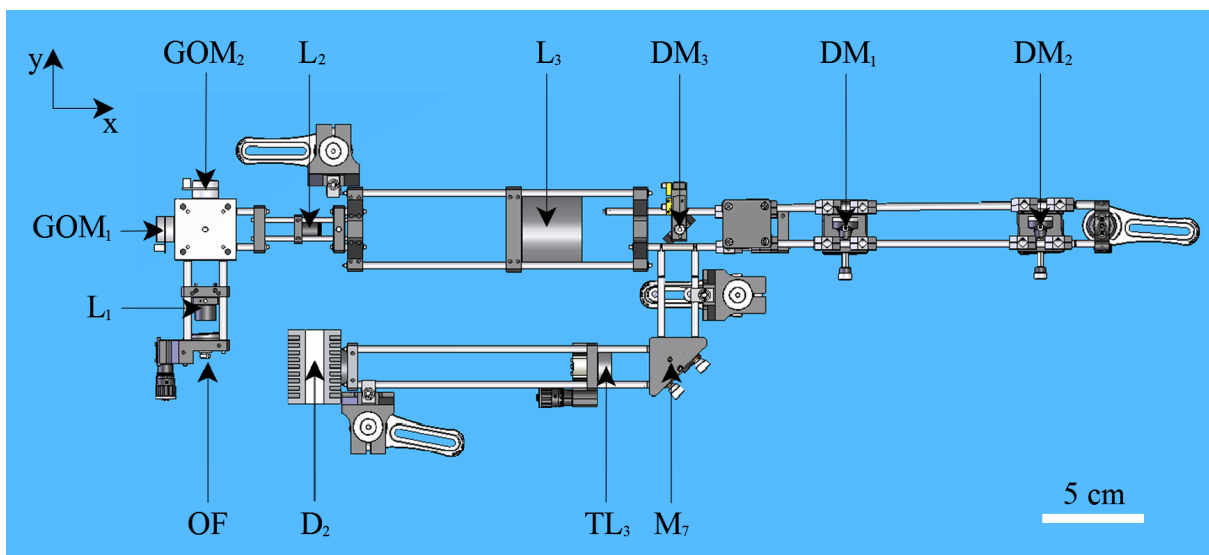
Na uchytenie kamery D_2 ku konštrukcii je použitý diel SM1-Threaded 30 mm Cage Plate, 0.35" Thick (CP02).

Na prichytenie zostavy k základnej doske a jej výškové nastavenie sú použité diely $\varnothing 1''$ Post Cage Clamp Mount (C1026), $\varnothing 1.0''$ Pedestal Pillar Post, 4" Long (RS4P8E), 30 mm Cage Plate Adapter (CP02B), $\varnothing 1/2'' \times 6''$ Stainless Steel Optical Post (TR4), Pedestal Post Holder, L = 6.19" (PH6E) a Large Clamping Fork, 1.75" Counterbored Slot, Universal (CF175).

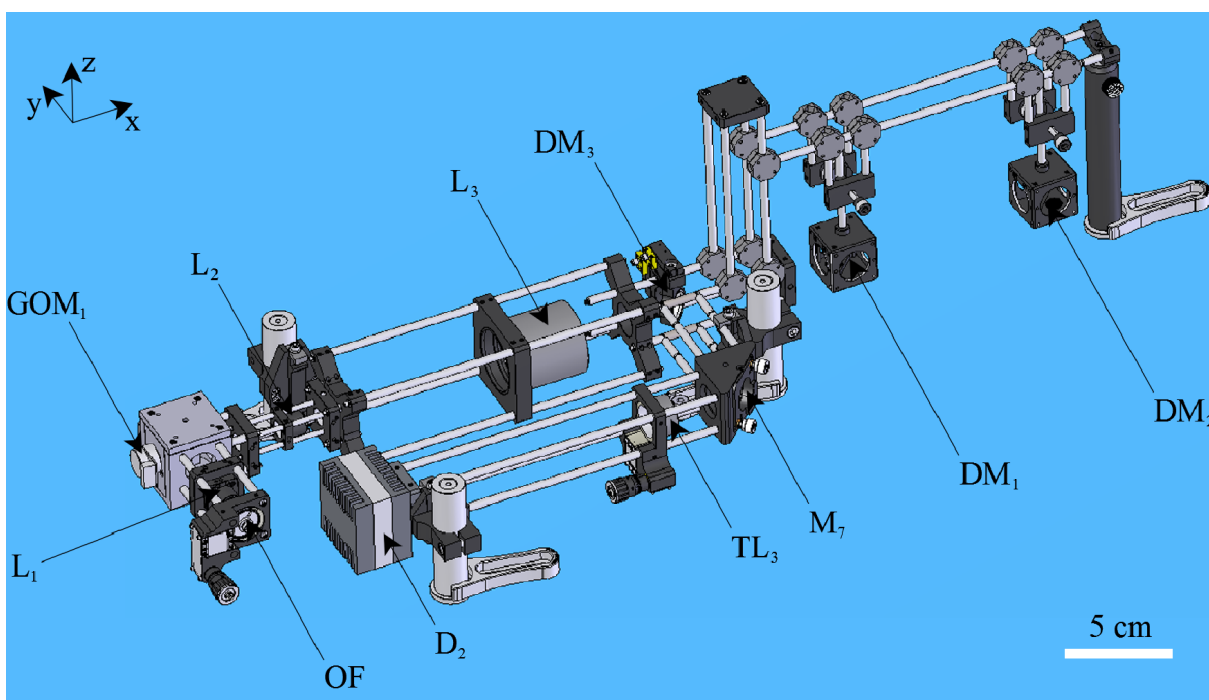
Postup justáže je uvedený v tabuľke 4.3.

4. NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM DRUHEJ GENERÁCIE

Takto variabilný mechanický návrh poskytuje dostatočne veľký priestor na správnu justáž laserovej pinzety. Pri justácii by mohli byť nápomocné aj Cage Alignment Plates. K variabilite návrhu prispieva aj fakt, že stačí dodržať iba súčty vzdialeností $\frac{a}{2}+b$ a $e+g+h$ a nie presne jednotlivé hodnoty.

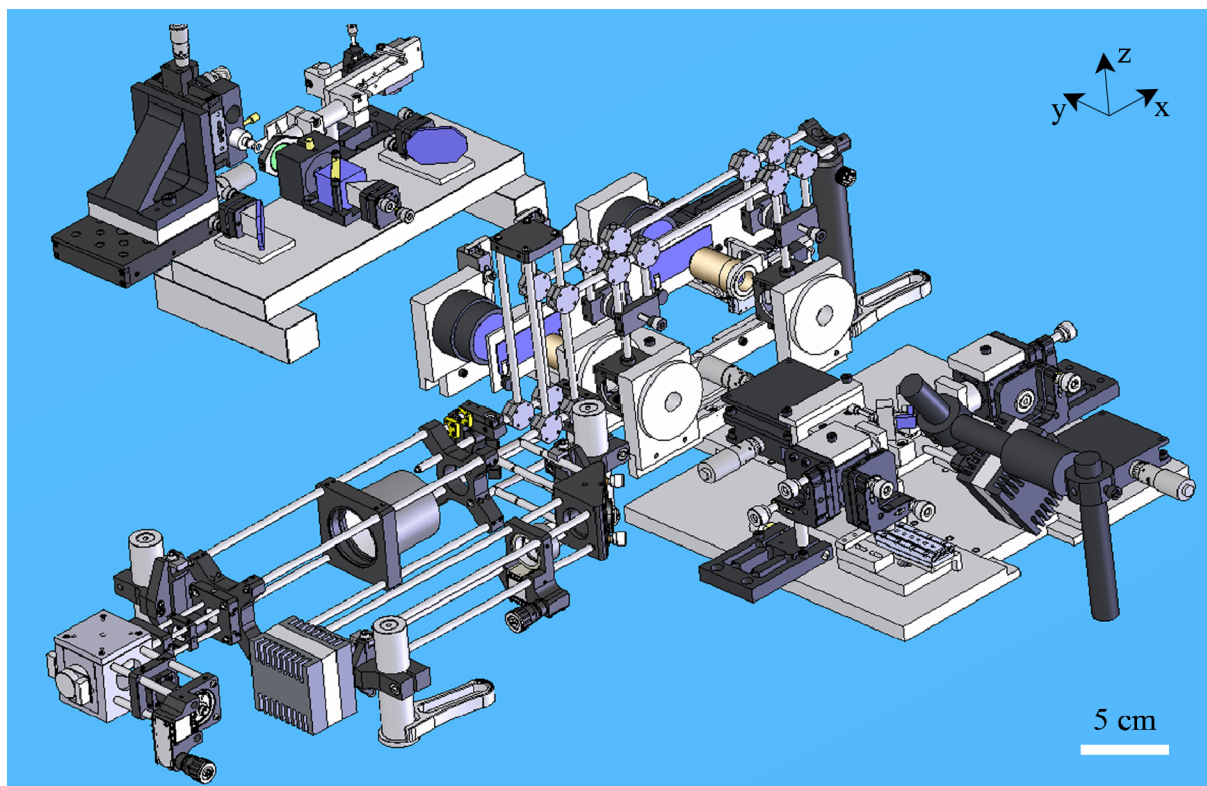


Obr. 4.12: 3D model modulu laserovej pinzety polohovanej galvanoptickými zrkadlami.



Obr. 4.13: 3D model modulu laserovej pinzety polohovanej galvanoptickými zrkadlami.

4.4. MECHANICKÝ NÁVRH LASEROVEJ PINZETY POLOHOVANEJ GO ZRKADLAMI



Obr. 4.14: 3D model modulu laserovej pinzety polohovanej galvanooptickými zrkadlami pripojeného k CCHM2.

5. Záver

V bakalárskej práci bol popísaný princíp fungovania laserovej pasce, pinzety a koherenciou riadených holografických mikroskopov. Boli navrhnuté dva moduly laserovej pinzety pripojiteľné ku koherenciou riadenému holografickému mikroskopu druhej generácie. Prvý návrh využíva galvanooptické zrkadlá, ako vychyľovací element optickej pasce. Druhý návrh je založený na princípe Köhlerovho osvetlenia, kde bodový zdroj osvetľuje vzorku rovinnou vlnou a pohybom optického vlákna je menená poloha optickej pasce.

Oba moduly boli podrobne popísané, boli uvedené optické ich schémy a boli uvedené podmienky, ktoré je nutné dodržať pri ich zostavení. Taktiež sú v práci uvedené hlavné komponenty, z ktorých by mala pozostávať laserová pinzeta a ich usporiadanie.

Návrhy s doporučenými optickými členmi boli nasimulované a optimalizované v programe ZEMAX[®], vďaka čomu bolo možné dosiahnuť difrakčne limitovanú sústavu a overenie teoretických vzťahov pre výpočet parametrov laserovej pinzety.

Bol vytvorený 3D model laserovej pinzety polohovanej galvanooptickými zrkadlami v programe Autodesk[®] Inventor[®] PROFESSIONAL 2010 z dielov zo sady Cage Systems od firmy THORLABS. Spojením 3D modelov laserovej pinzety a CCHM2¹ bola teoreticky overená prepojitelnosť navrhovaného modulu k CCHM2.

Ďalším cieľom je zostaviť laserovú pinzetu polohovanú GO zrkadlami pripojiteľnú k CCHM2 podľa uvedených nákresov, 3D modelov, vzorcov a doporučených komponentov. Následne experimentálne overiť jej pripojiteľnosť, justovateľnosť a funkčnosť, čo nebolo zatiaľ uskutočnené z dôvodu nedostatku času. Pre ďalší vývoj laserovej pinzety bude vhodné spraviť analýzu zmeny tuhosti optickej pasce pri zmene natočenia GO zrkadiel, určiť veľkosť oblasti v ktorej je optická pinzeta funkčná a overiť možnosť využitia TST.

¹3D model CCHM2 poskytol vedúci bakalárskej práce Ing. Zbyněk Dostál

Literatúra

- [1] ASHKIN, Arthur, et al. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *OPTICS LETTERS*. 1986, 11, 5, s. 288-290.
- [2] NIEMINEN, Timo; HECKENBERGA, Norman; RUBINSZTEIN-DUNLOP, Halina. Optical measurement of microscopic torques. *Journal of Modern Optics*. 2001, 48, 3, s. 405-413.
- [3] ASHKIN, Arthur, DZIEDZIC, J. M. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*. 1987, 235, 4795, s. 1517-1520.
- [4] BLOCK, Steven. Real engines of creation. *Nature*. 1997, 386, 6622, s. 217-219.
- [5] ASHKIN, Arthur. History of Optical Trapping and Manipulation of Small-Neutral Particle, Atoms, and Molecules. *IEEE JOURNAL ON SELECTED TOPICS IN QUANTUM ELECTRONICS*. 2000, 6, 6, s. 841-856.
- [6] [Http://www.isibrno.cz/omitec](http://www.isibrno.cz/omitec) [online]. 2001, 28. apríl 2011 [cit. 2011-05-06]. Group of Optical Micro-manipulation Techniques. Dostupné z WWW: <<http://www.isibrno.cz/omitec/>>.
- [7] NEUMAN, Keir C.; BLOCK, Steven M. Optical trapping. *REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS*. 2004, 75, 9, s. 2787-2809.
- [8] [Http://physicsworld.com/](http://physicsworld.com/) [online]. 2009 [cit. 2011-05-06]. Optical tweezers: where physics meets biology. Dostupné z WWW: <<http://physicsworld.com/cws/article/indepth/36652>>.
- [9] JEŽEK Jan. *Vícenásobná optická pinzeta a optický skalpel*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojíního inženýrství, 2004. 60 s. Dizertačná práca. Vedúci disertačnej práce RNDr. Pavel Zemánek, Ph. D.
- [10] PASCHOTTA, Rüdiger. *Encyclopedia of Laser Physics and Technology* [online]. 2004, 2011 [cit. 2011-05-22]. Dostupné z WWW: <http://www.rp-photonics.com/acousto-optic_modulators.html>.
- [11] PŘF UP V OLOMOUCI, Katedra optiky. Projekt MPO v programu TANDEM : ev. č. FT-TA2/059. *Systémy pro generaci nedifrakčních svazků a přenos mechanických účinků světla : Demonstrační jednotka laserové pinzety s prostorovým modulátorem světla*. Dostupný také z WWW: <www.opto.cz/tandem/publikace-pdf/%5B48%5D.pdf>.
- [12] KRUG, Wolfgang; RIENITZ, Joachim; GÜNTHER, Schulz. *Contributions to interference microscopy*. Londýn : Hilger & Watts, 1964. 394 s.
- [13] CHMELÍK, Radim; HARNA, Zdeněk. Parallel-mode confocal microscope. *Optical Engineering*. 1999, 38, 10, s. 1635-1639.
- [14] KOLMAN , Pavel; CHMELÍK, Radim. Coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*. 2010, 18, 21, s. 21990-22003.

- [15] KREIS, Thomas. Digital holographic interference-phase measurement using the Fourier-transform method. *J. Opt. Soc. Am. A*. 1986, 3, 6, s. 847-855.
- [16] SLABÝ, Tomáš, et al. Coherence-controlled holographic microscope. *Proceedings of SPIE*. 2010, 7746, s. 77461R-1-77461R-8. *Článok v zborníku akcie: 17th Slovak-Czech-Polish Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics, Lipt. Ján, 06.09.2010-10.09.2010*.
- [17] ŠERÝ, Mojmír. *Optická pinzeta kombinovaná se světelným mikroskopem*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2006. 86 s. Dizertačná práce. Vedúci disertačnej práce Doc. RNDr. Pavel Zemánek, Ph. D.
- [18] FÄLLMAN, Erik; AXNER, Ove. Design for fully steerable dual-trap optical tweezers. *APPLIED OPTICS*. 1997, 36, 10, s. 2107-2113.
- [19] KOLMAN, Pavel. *Koherenci řízený holografický mikroskop*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2010. 72 s. Dizertačná práce. Vedúci disertačnej práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [20] UHLÍŘOVÁ Hana. *Mikroskopie časově proměnných biologických objektů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2010. 72 s. Dizertačná práce. Vedúci disertačnej práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [21] JANEČKOVÁ Hana. *Interferenční mikroskopie biologických vzorků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2006. 51 s. Diplomová práce. Vedúci diplomovej práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [22] OETIKER, Tobias, et al. Nie príliš stručný úvod do systému L^AT_EX 2_ε: Alebo L^AT_EX 2_ε za 95 minút [online]. verzia 3.13. [s.l.] : [s.n.], 23. február 2000, 17. marca 2002 [cit. 2011-05-06]. Dostupné z WWW: <mirror.ctan.org/info/lshort/slovak/Slshorte.pdf>.

Zoznam použitých skratiek a symbolov

Symbol	Význam
AOM	akustooptický modulátor svetla
CCHM	koherenciou riadený holografický mikroskop
CCHM2	koherenciou riadený holografický mikroskop druhej generácie
EOM	elektrooptický modulátor svetla
FFT	rýchla Fourierova transformácie
IFFT	rýchla inverzná Fourierova transformácia
OPD	rozdiel optických dráh
PET	piezoelektrický transduktor
SLM	priestorový modulátor svetla
TST	časovo zdieľané pasce
c	rýchlosť svetla
d_i	priemer laserového zväzku za kolimačnou šošovkou
f_G	priestorová frekvencia difrakčnej mriežky
$f_i, i=0, 1, 2, \dots$	ohnisková vzdialenosť i-tej šošovky
f_{obj}	ohnisková vzdialenosť mikroskopového objektívu
f_{OM}	je maximálna priestorová frekvencia komplexnej amplitúdy objektovej vlny v obrazovej rovine mikroskopu
f_{OP}	priestorová frekvencia hologramu - nosná frekvencia
h	Planckova konštanta
$\hbar$	redukovaná Planckova konštanta ($\hbar = \frac{h}{2\pi}$)
k	„conic constant“
$\vec{k}_d$	vlnový vektor dopadajúcej vlny
$\vec{k}_r$	vlnový vektor rozptýlenej vlny
m	pomer indexov lomu častice a média ($m = \frac{n_p}{n_m}$)
m_{OL}	zväčšenie výstupnej šošovky
n	difrakčný rád
n_m	index lomu média
n_p	index lomu častice
$\vec{p}$	dipólový moment

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

Symbol	Význam
$A_i, i=0, 1, 2, \dots$	asférický koeficient i-tého rádu
D_f	priemer laserového zväzku pred vstupom do mikroskopového objektívu
D_{obj}	je priemer zadnej apertúry mikroskopového objektívu
$\vec{E}$	intenzita elektrického poľa
F	veľkosť sily
F_{grad}	veľkosť gradientnej sily
F_{scatt}	veľkosť rozptylovej sily
I_0	intenzita dopadajúceho svetla
M_{ex}	priečne zväčšenie expandéru
M_{obj}	zväčšenie mikroskopového objektívu
N_{px_x}	počet pixelov v smere osi x
N_{px_y}	počet pixelov v smere osi y
NA	numerická apertúra
NA_{virt}	numerická apertúra virtuálneho zdroja
P_s	výkon zdroja
R	polomer krivosti
W_p	potenciálna energia dipólu
α	polarizovateľnosť častice
δ_x	posun elementu vychylujúceho optickú pascu pozdĺž osi x
δ_y	posun elementu vychylujúceho optickú pascu pozdĺž osi y
ν	frekvencia žiarenia
λ	vlnová dĺžka svetla
θ	uhol naklonenia galvanooptického zrkadla
σ	rozptylový prierez častice
ξ	celkový posun stredu vychýleného zväzku oproti nevychýlenému zväzku v zadnej apertúre mikroskopového objektívu
ξ_x	posun stredu vychýleného zväzku oproti nevychýlenému zväzku v zadnej apertúre mikroskopového objektívu pozdĺž osi x
ξ_y	posun stredu vychýleného zväzku oproti nevychýlenému zväzku v zadnej apertúre mikroskopového objektívu pozdĺž osi y
Δ	celkový posun optickej pasce
Δ_{max}	maximálne posunutie optickej pasce
Δ_x	posun optickej pasce pozdĺž osi x
Δ_y	posun optickej pasce pozdĺž osi y
Λ	vlnová dĺžka mechanického vlnenia

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

Symbol	Význam
BF	interferenčný filter
C	kondenzor
D	detektor
DM	dichroické zrkadlo
F	konektor na uchytenie optického vlákna
FP	ohnisková rovina
G	difrakčná mriežka
GO	galvanooptické
GOM	galvanooptické zrkadlo
IRF	infračervený filter
$J_0(x)$	Besselova funkcia prvého druhu
K	kolektor
L	šošovky
LS	laser
M	zrkadlo
Man	manipulátor
MO	mikroskopový objektív
O	objektív
OF	optické vlákno
OL	výstupná šošovka
OP	výstupná rovina
P	clona
PK	pupila kondenzoru
RO	referenčný objekt
S	zdroj svetla
Sp	pozorovaný objekt
T	osová šírka
TL	tubusová šošovka
$ px_x $	veľkosť pixelu v smere osi x
$ px_y $	veľkosť pixelu v smere osi y
$ X, Y $	vzdialenosť medzi X a Y

Zoznam príloh

Príloha: CD: elektronická verzia bakalárskej práce, model laserovej pinzety polohovanej GO zrkadlami, model laserovej pinzety polohovanej GO zrkadlami bez detektoru polohy, model laserovej pinzety polohovanej pohybom optického vlákna, model laserovej pinzety polohovanej pohybom optického vlákna bez detektoru polohy, 3D model laboratórneho riešenia laserovej pinzety polohovanej galvanooptickými zrkadlami pre program Autodesk® Inventor® PROFESSIONAL 2010, 3D model laboratórneho riešenia laserovej pinzety polohovanej galvanooptickými zrkadlami pre program SolidWorks.