

Наноэлектроника

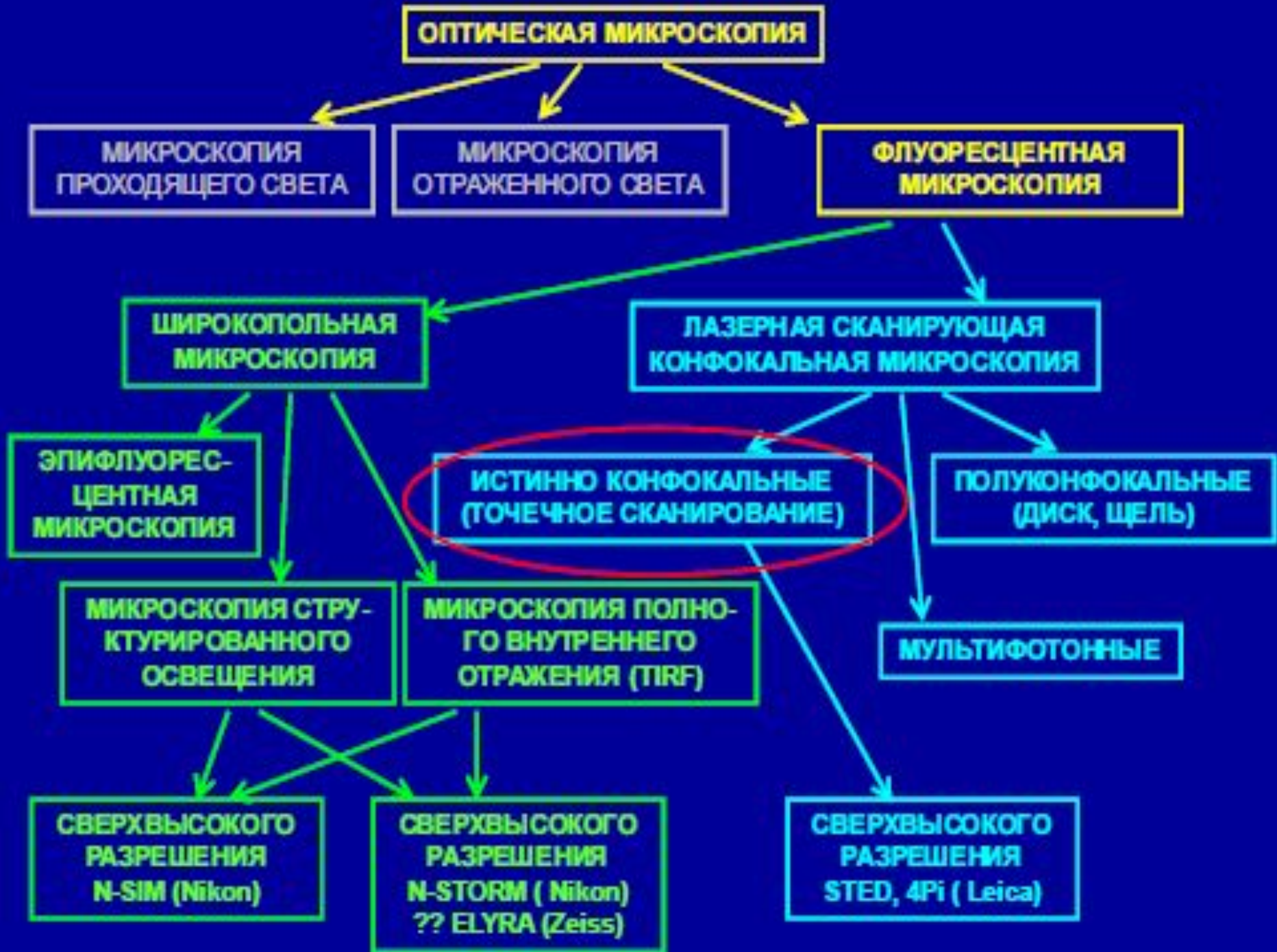
Практическое занятие 9

к.т.н., доц. Марончук И.И.

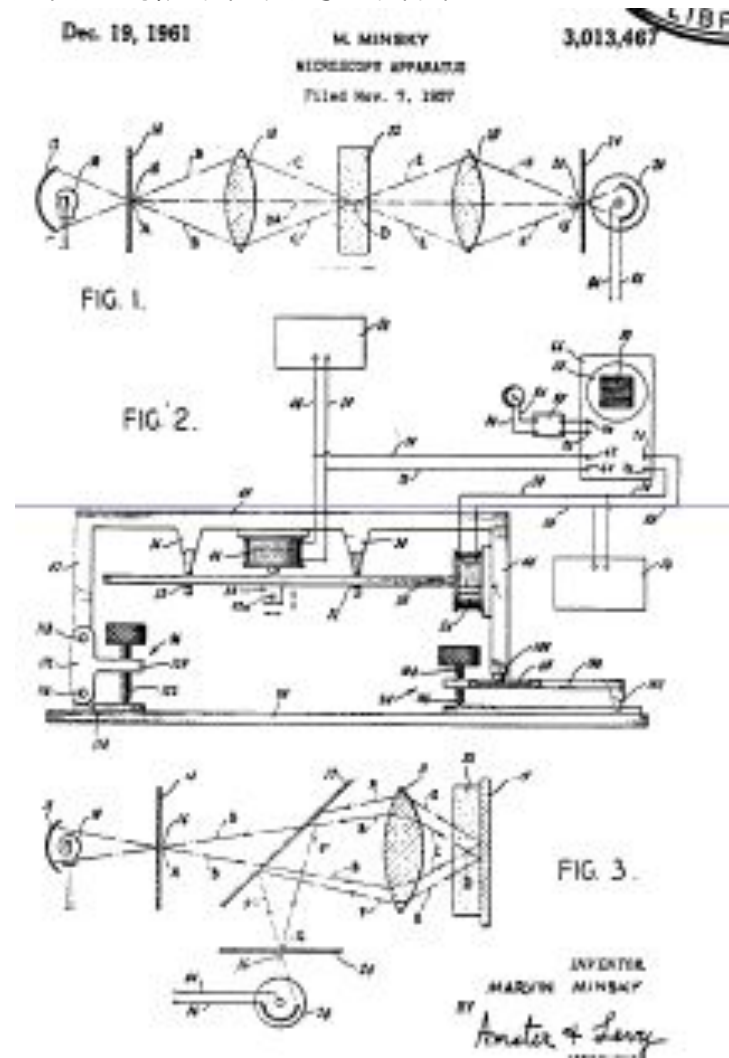
ТЕХНИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА НАНОТЕХНОЛОГИЙ

Диагностика и методы
исследования
нанообъектов и наносистем

Конфокальная микроскопия



Впервые концепция построения конфокального микроскопа была разработана в середине 1950-х гг. аспирантом Гарвардского университета Марвином Мински (Marvin Minsky). Запатентовано Minsky в 1961 году. Через 10 лет Eggar & Petráň создали первый механический конфокальный микроскоп.



В патенте и статье были отмечены основные преимущества конфокального микроскопа:

- повышение качества сигнала за счет снижения уровня рассеянного света;
- увеличение эффективного разрешения;
- улучшение соотношения сигнал/шум;
- возможность исследовать объемные препараты и объекты, рассеивающие свет;
- возможность сканирования в плоскости XY больших объектов;
- возможность сканирования по оси Z;
- выбор увеличения электронным способом;
- возможность количественного исследования оптических свойств препаратов;
- возможность применения различных способов микроскопирования: темное поле, фазовый контраст, интерференционный контраст;
- возможность использования простых объективов из-за фокусировки луча в точку.

1969 г. — П. Давидович использовал лазер в конфокальном сканирующем микроскопе .

1979 г. — Г. Бракенгоф с сотрудниками создал первую конструкцию конфокального сканирующего светового микроскопа для биологических целей.

1980 г. — начало промышленного выпуска лазерных сканирующих микроскопов (фирмы Biorad, Leica, Nikon) с использованием унифицированного сканирующего модуля, допускающего сопряжение с современными световыми микроскопами.

1984 г. — реконструкция истинного трехмерного изображения. Бертеро и Гродтешом применительно к проблемам конфокальной микроскопии решена задача реконструкции истинного изображения на основе методов регуляризации Тихонова и Арсенина. Кратко результат этой работы может быть сформулирован следующим образом: трехмерной структуры объекта со структурой реконструированного изображения (3-D—реконструкция).

1985-1988 гг. — создание конфокального микроскопа, работающего в реальном времени и позволяющего получить видимое изображение с использованием принципа растрового сканирования. В 90-е годы в конфокальных микроскопах начато использование волоконной оптики

Широкий интерес к этой области проявился лишь в 1980-х гг., благодаря бурному развитию компьютерной и лазерной технологий. Сегодня конфокальные микроскопы являются незаменимым инструментом для широкого спектра исследований как в научном поиске так и при контроле производственного процесса.

Термин "конфокальный" означает "софокусный" – в плоскости, оптически сопряженной с фокальной плоскостью объектива, находится конфокальная диафрагма.

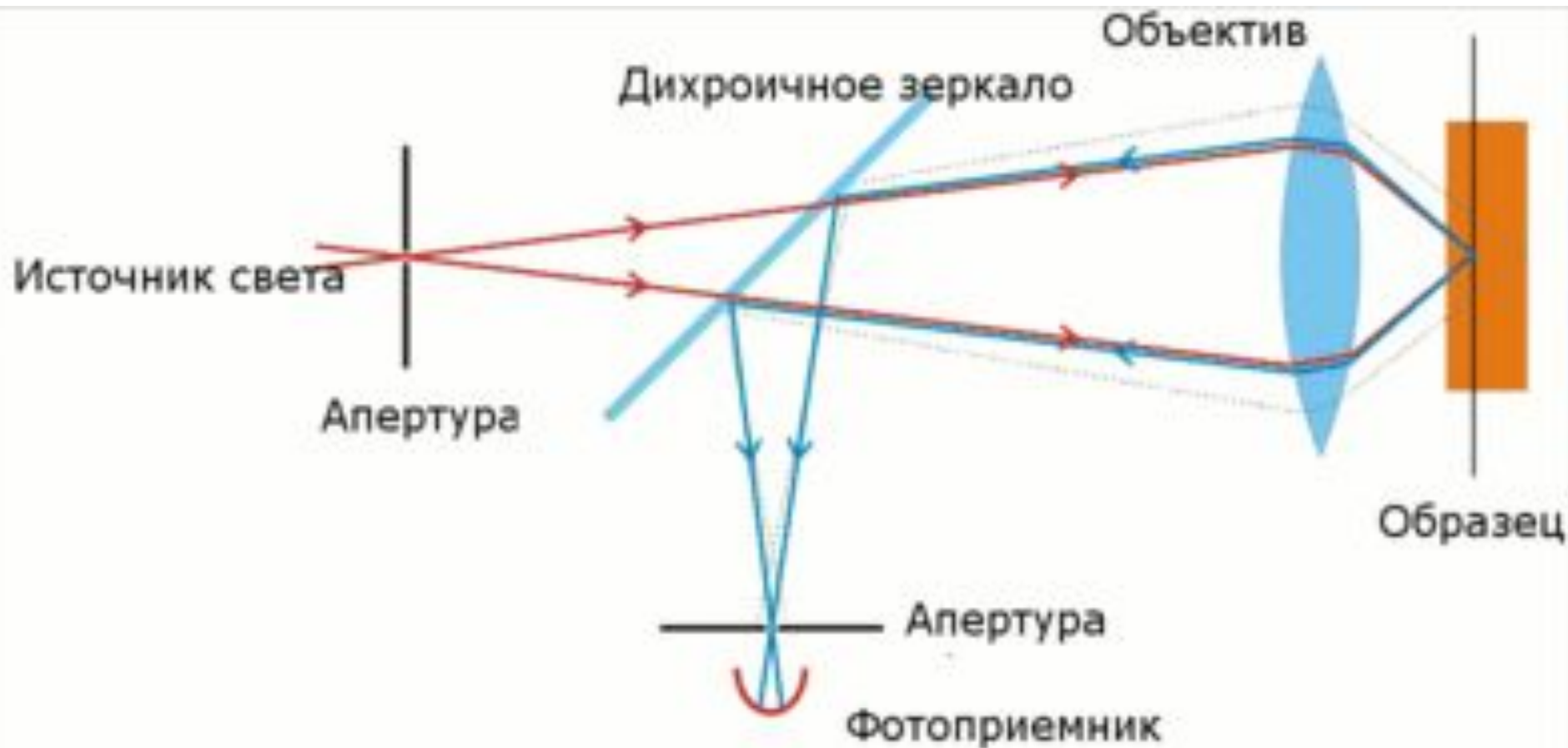


Схема конфокального микроскопа

Рассеянный свет, идущий из глубины образца, отсекаются апертурами, что обеспечивает высокий контраст изображения

Конфокальный микроскоп отличается от "классического" оптического микроскопа тем, что в каждый момент времени регистрируется изображение одной точки объекта, а полноценное изображение строится путем сканирования (движения образца или перестройки оптической системы). Для того, чтобы регистрировать свет только от одной точки после объективной линзы располагается диафрагма малого размера таким образом, что свет, испускаемый анализируемой точкой (красные лучи на рис.а), проходит через диафрагму и будет зарегистрирован, а свет от остальных точек (например, синие лучи на рис.б) в основном задерживается диафрагмой.

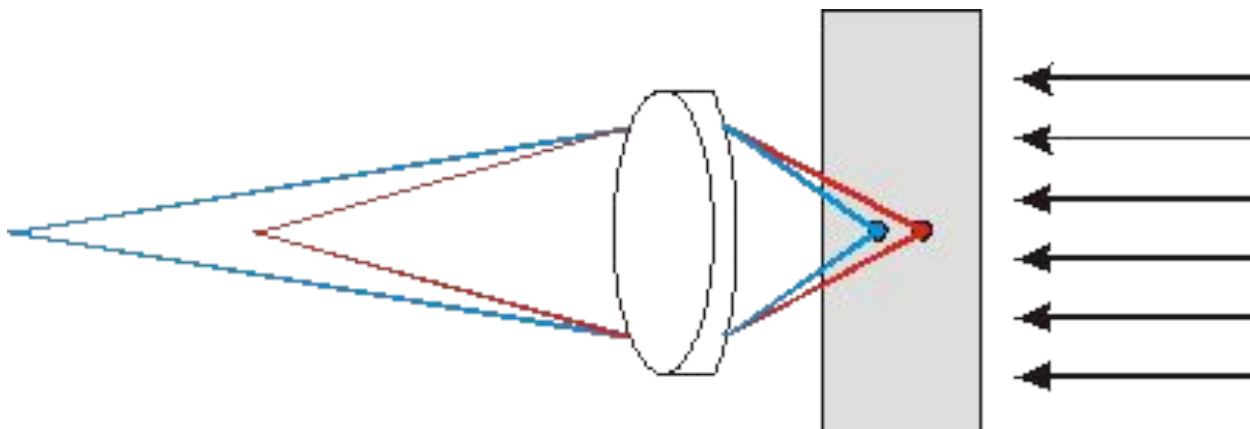


Рис. а. Ход лучей в обычном оптическом микроскопе, когда в фотоприемное устройство попадает свет из различных точек образца.

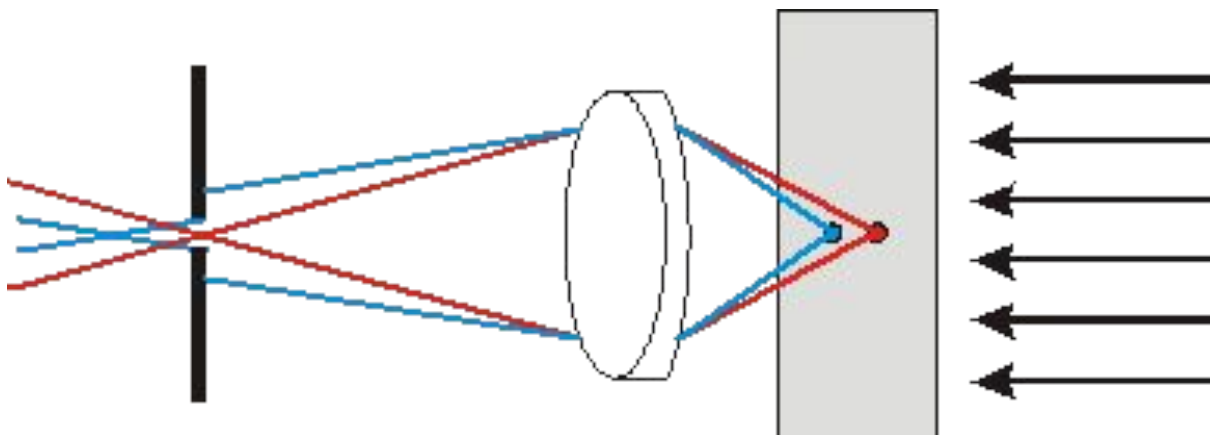


Рис. б. Применение диафрагмы позволяет существенно снизить фоновую подсветку от точек образца вне анализируемой области.

Вторая особенность состоит в том, что осветитель создает не равномерную освещенность поля зрения, а фокусирует свет в анализируемую точку (рис. в). Это может достигаться расположением второй фокусирующей системы за образцом, при этом образец должен быть прозрачным. Кроме того, объективные линзы обычно сравнительно дорогие, поэтому использование второй фокусирующей системы для подсветки мало предпочтительно.

Альтернативой является использование светоделительной пластинки, так чтобы и падающий и отраженный свет фокусировались одним объективом (рис. г). Такая схема к тому же облегчает юстировку.

Применение конфокальной приводит к увеличению контрастности изображения, за счет того, что "паразитный" свет от точек соседних с анализируемой перестает попадать в детектор. Платой за увеличение контрастности будет необходимость применения достаточно сложных схем сканирования либо образцом, либо световым пучком.

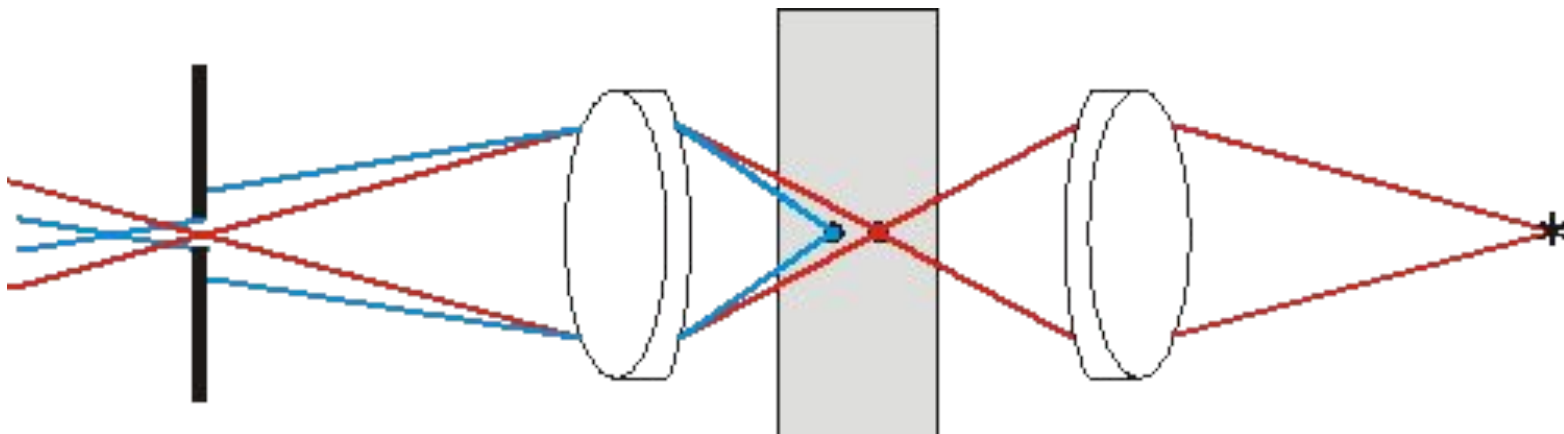


Рис. в. Дополнительное повышение контраста достигается применением подсветки, фокусирующей свет в анализируемую точку.

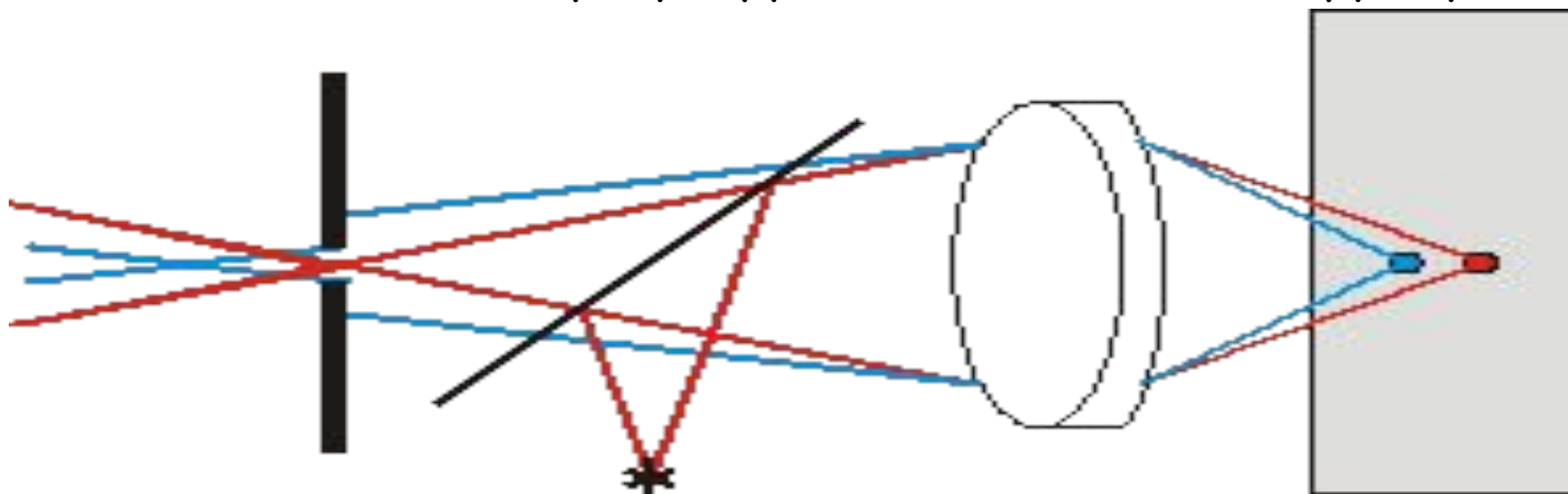
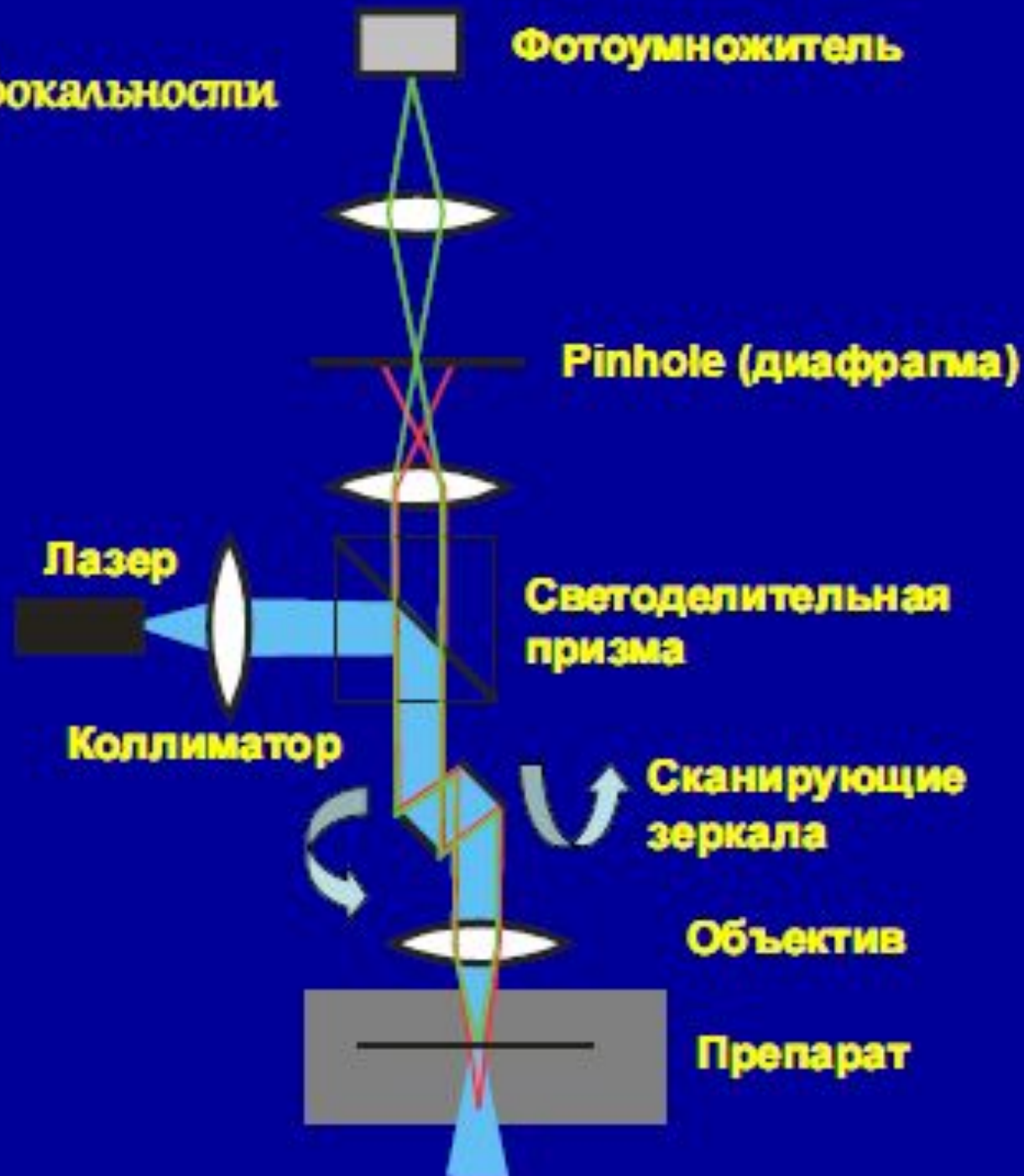


Рис. г. Схема со светоделительной пластинкой упрощает конструкцию микроскопа и процесс юстировки за счет двойного использования объектива (для подсветки и сбора отраженного сигнала).

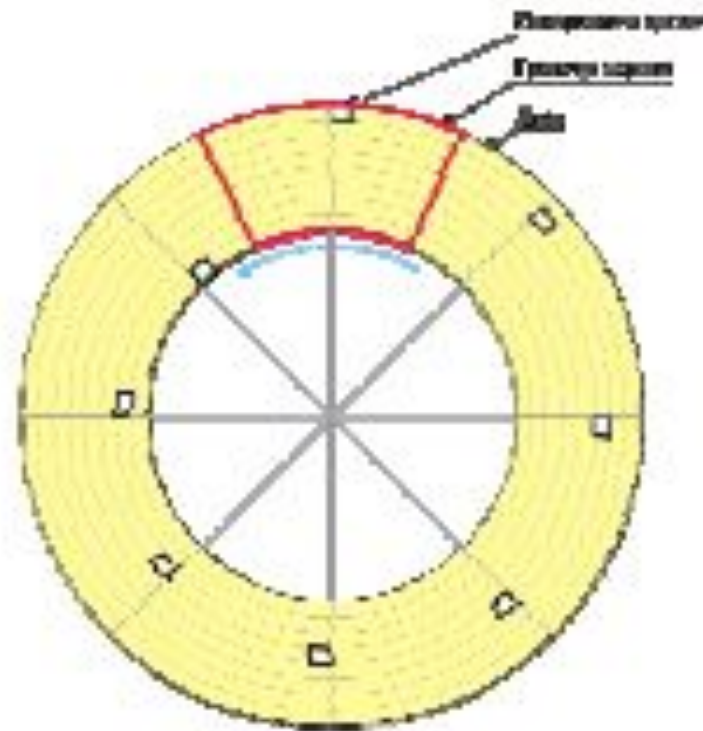
Принцип конфокальности



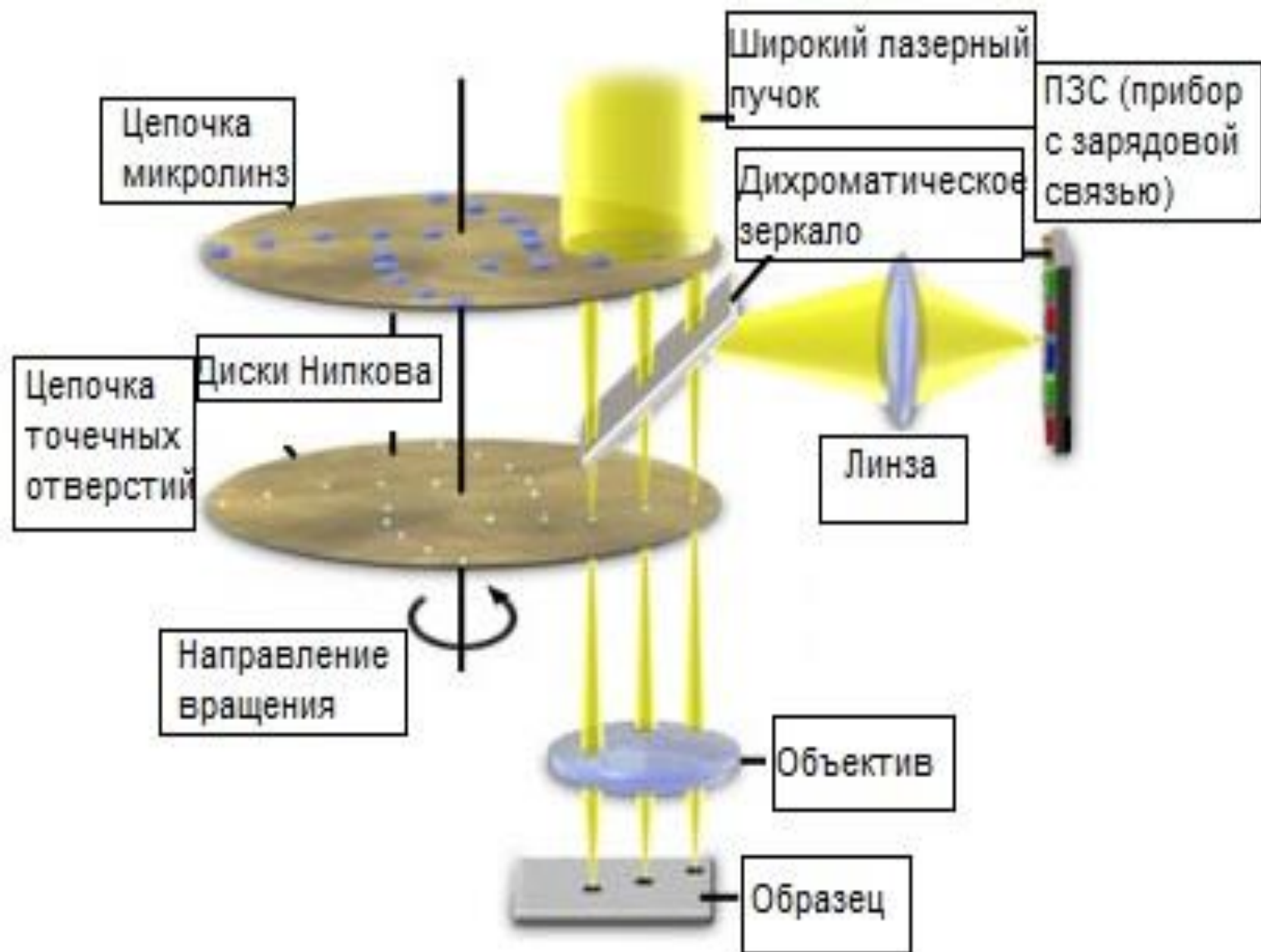
Конфокальная микроскопия обеспечивает увеличение контраста изображения за счет применения подсветки сфокусированной объективной линзой в область анализа и размещения диафрагмы в плоскости наблюдения перед фотодетектором. Такое увеличение контрастности приводит к возможности разрешения объектов, имеющих разницу в интенсивности до 200:1.

Конфокальная микроскопия отличается от обычной микроскопии, в первую очередь, улучшенным разрешением вдоль оптической оси объектива (ось Z), которое достигается за счет использования принципа конфокальной фильтрации отраженных от образца лучей. Только свет, отраженный от образца в фокусной плоскости линзы объектива может пройти обратно сквозь линзу и отверстие, и влиять на построение изображения поверхности. В качестве специального фильтра в конфокальных микроскопах фирмы Nanafocus AG используется вращающийся диск с тысячами отверстий. Его прототипом стало датированное ещё 1884 годом изобретение германского учёного Paul Nipkow, обеспечивающее передачу изображений на расстояние. Диск Нипкова имеет множество отверстий, которые формируют множество точек света для создания конфокального изображения. Диск вращается и получается конфокальное изображение поверхности над полем зрения. Любая ошибка волнового фронта корректируется измерением оптически плоской поверхности.

Если наблюдать объект через вращающийся диск Нипкова, через относительно небольшой сектор (не более 90°), можно заметить, что видимый объект сканируется построчно сверху вниз. Обычно диск почти полностью закрывается непрозрачным материалом, оставляя для обзора только отверстие в форме сектора диска или же прямоугольное. При очень быстром вращении диска наблюдаемый объект можно увидеть полностью.



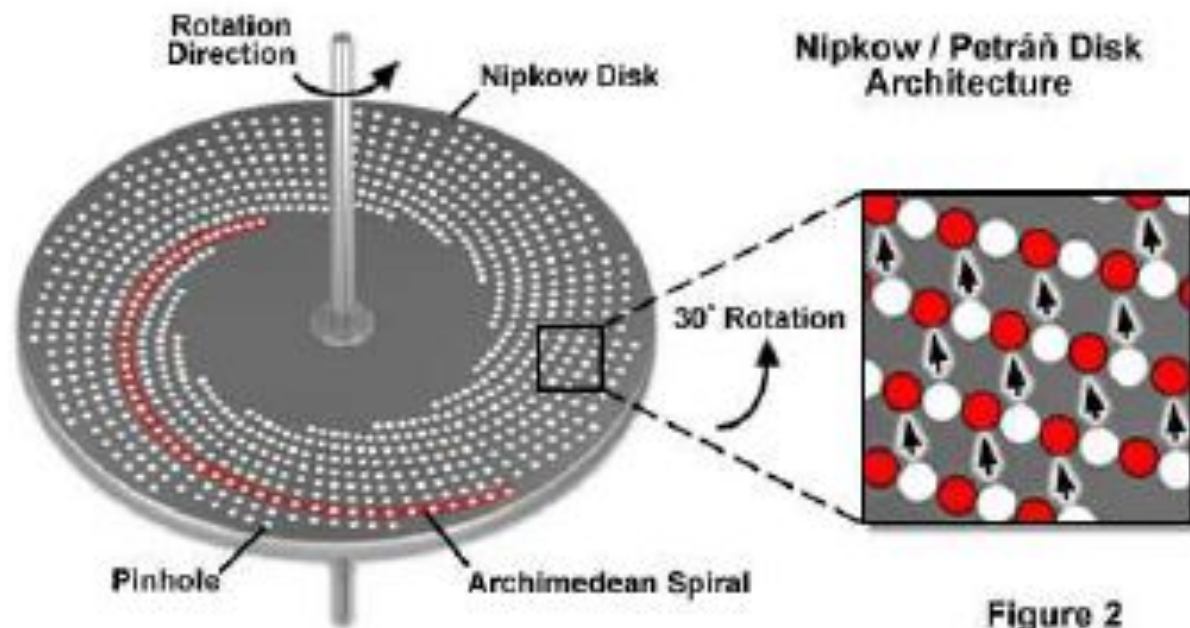
Диск Нипкова



Оптическая схема на основе дисков Нипкова

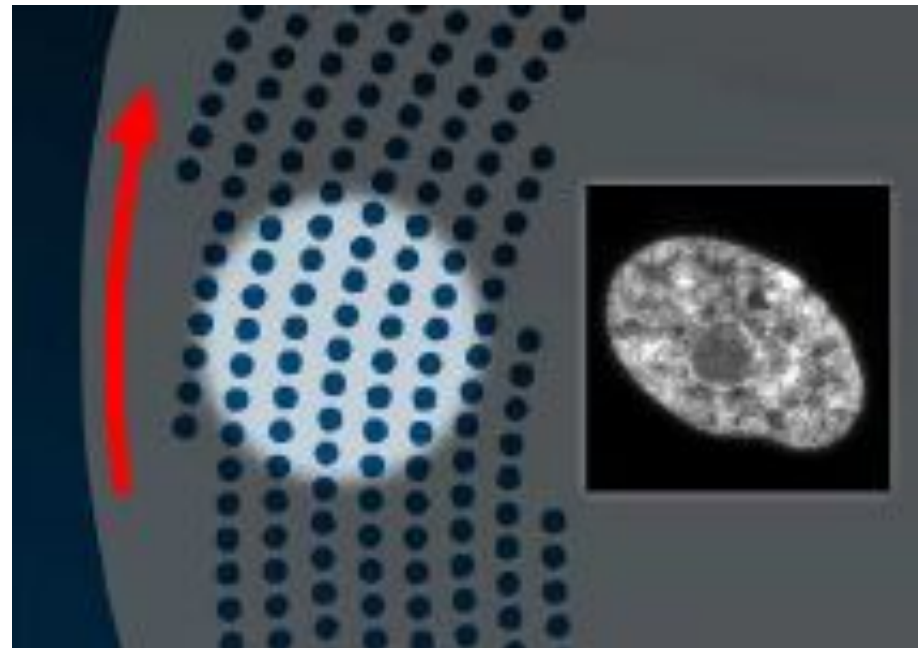
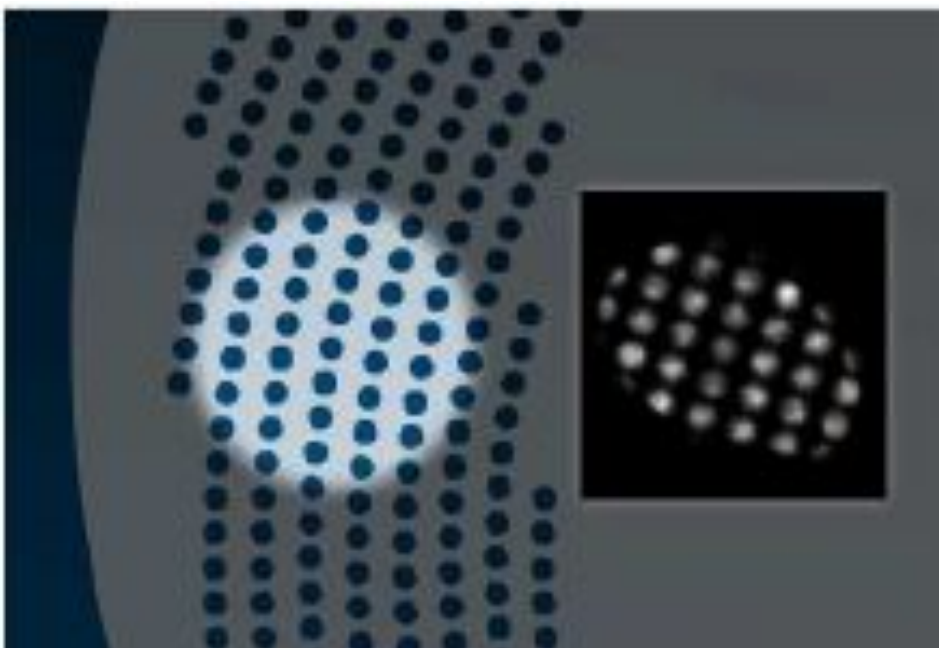
Улучшенный диск Нипкова получил второе рождение в исполнении ЛКСМ с вращающимся диском (рис.) в 1967 году благодаря Дэвиду Эггеру и Моймиру Петрану . В отличии от оригинального диска Нипкова, который был создан для разбиения изображения с последующей передачей его электромеханическим способом, данный диск (диск Петрана) предназначался для многоточечного освещения объекта. Через диск Петрана проходит в сотни раз больше света чем через диск Нипкова.

В каждый момент времени освещенными оказываются порядка 1000 отверстий (пинхолов) и следовательно, собирается информация с более чем 1000 точек исследуемого образца. На рисунке показано как пинхолы переходят в новые позиции при вращении (красный цвет). Впервые конфокальный микроскоп с вращающимся диском (или микроскоп, работающий в реальном времени) был сконструирован в 80-х годах XX века Гордоном Кино и Джефом Личманом.



Диск Петрана

Figure 2



Применение принципа конфокальности приводит к значительному увеличению контрастности изображения. Именно высокая контрастность изображений, полученных на конфокальном микроскопе, позволила значительно расширить круг задач, изучаемых оптическими методами. Несмотря на то, что увеличение разрешения в смысле критерия Релея, а следовательно и максимальное эффективное увеличение в конфокальном микроскопе возрастает менее чем в 1,5 раза по сравнению с аналогичным по качеству широкопольным микроскопом, возможности в разрешении мелких структур возрастают многократно.

Кроме того, если в обычных микроскопах в качестве источника света, используется ртутная или ксеноновая лампа, то в современных конфокальных микроскопах – это лазер (или светодиод). Преимущество светодиодных источников света по сравнению с ламповыми – это монохроматичность генерируемого света (ширина линии генерации значительно меньше 1нм) и малая расходимость (т.е. высокая параллельность) пучка света. Малая расходимость пучка света способствует более эффективной работе оптической системы микроскопа, уменьшает число бликов, связанных с отклонением света от расчета.

Как выглядит изображение в конфокальном микроскопе? Если Вы в объектив обычного микроскопа смотрите и видите его просто глазом, то в конфокальном микроскопе Вы не сможете видеть изображение просто глазом. На конфокальном микроскопе изображение Вы увидите на экране компьютера. Результаты сканирования поверхности передаются в компьютер, который формирует изображение и выводит его на экран монитора. Мощное программное обеспечение позволяет не только оцифровать объект в системе $x-y-z$ координат, но сразу же визуализировать его как 3D-объект. При этом цифровая модель объекта может быть сохранена и сохранена на компьютере и в дальнейшем вызвана для обработки или сравнения. Скорость получения информации об объекте составляет несколько секунд.

Разрешение и контрастность в конфокальном микроскопе
Рассмотрим теперь математически, каким образом и насколько количественно изменяется контрастность при применении конфокальной микроскопии. Во-первых, так как в конфокальном микроскопе свет дважды проходит через объектив, то функция размытия точки (далее обозначаемая PSF) , имеет вид:

$$p_{\text{conf}}(\xi, \rho) = p(\xi, \rho) \times p(\xi, \rho)$$

Для качественного понимания удобно рассматривать каждую PSF как вероятность того, что фотон попадет в точку с координатами (ξ, ρ) , либо что фотон будет зарегистрирован из точки с координатами (ξ, ρ) тогда конфокальная PSF есть произведение независимых вероятностей. На рис. ниже приведено изображение обычной PSF и конфокальной PSF .

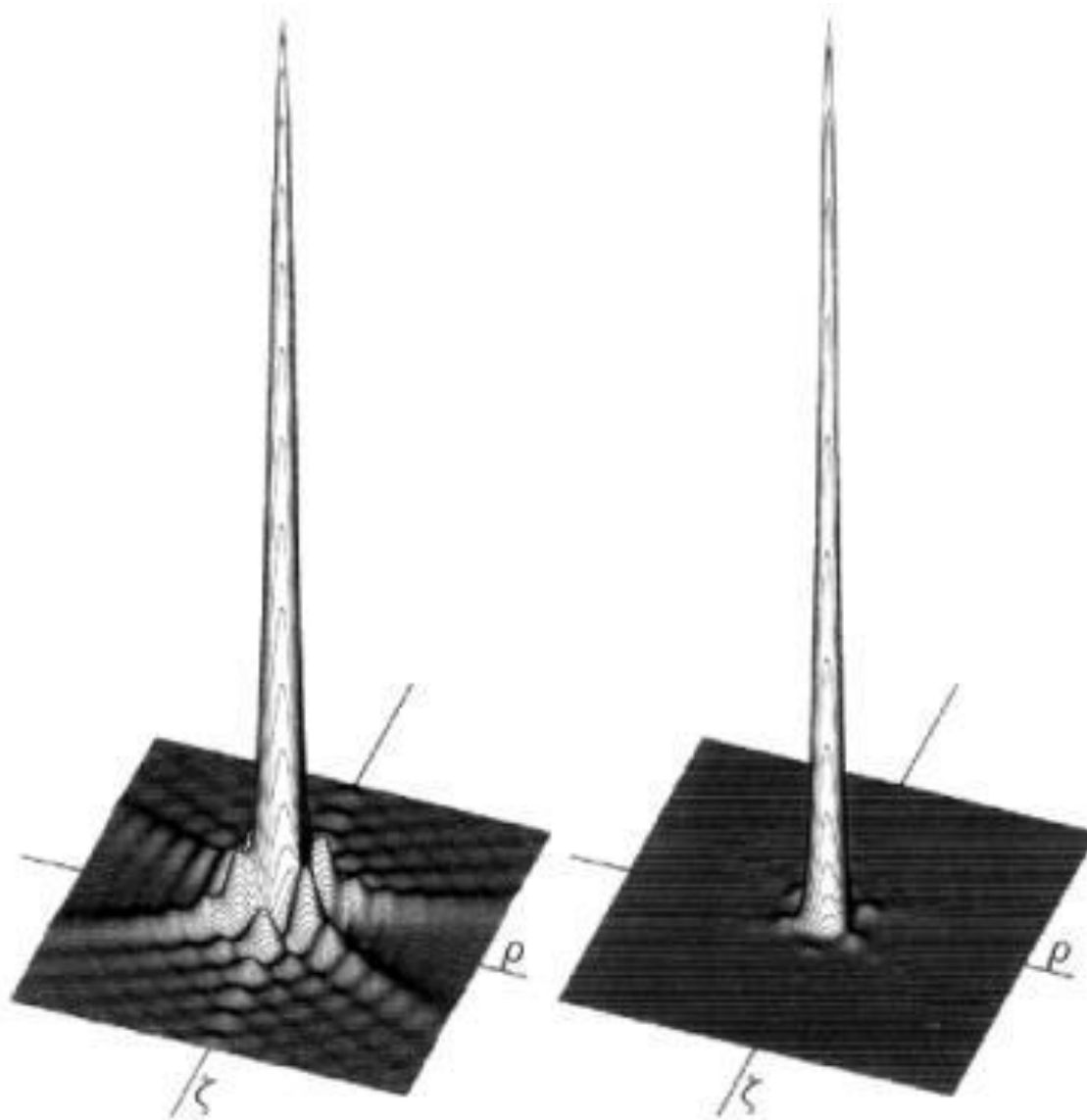
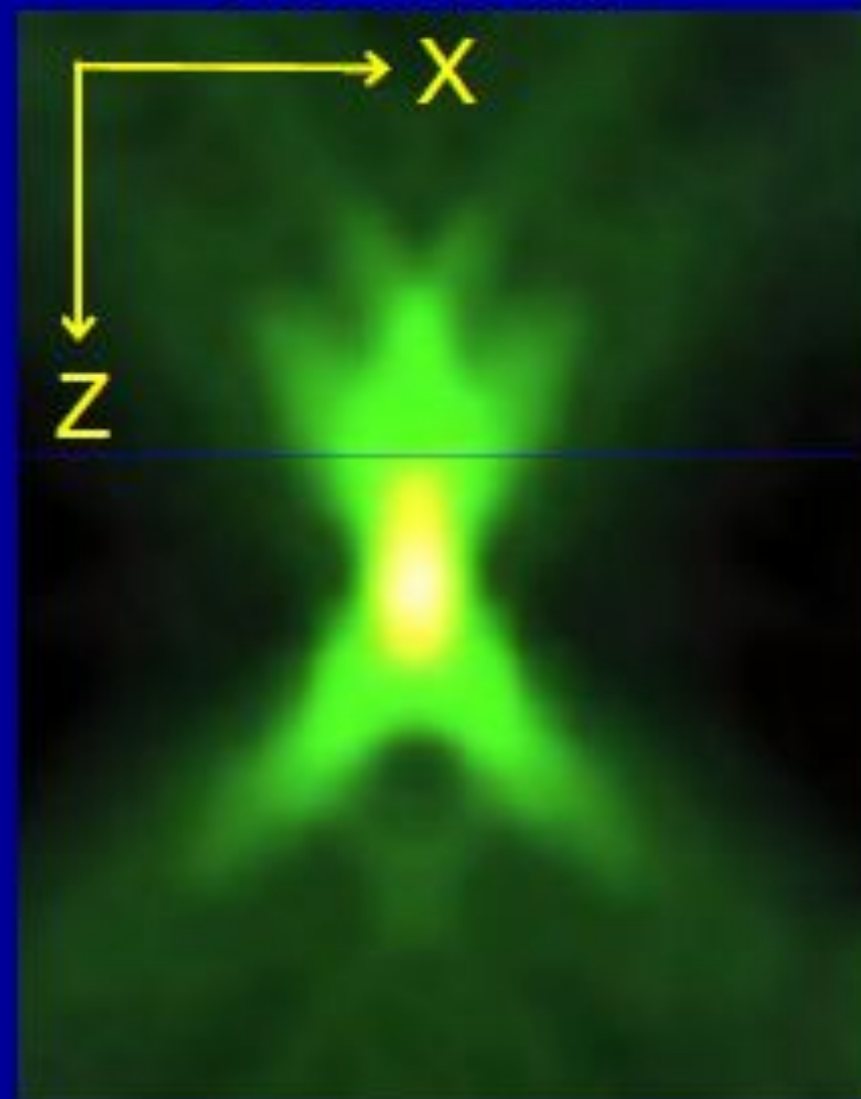


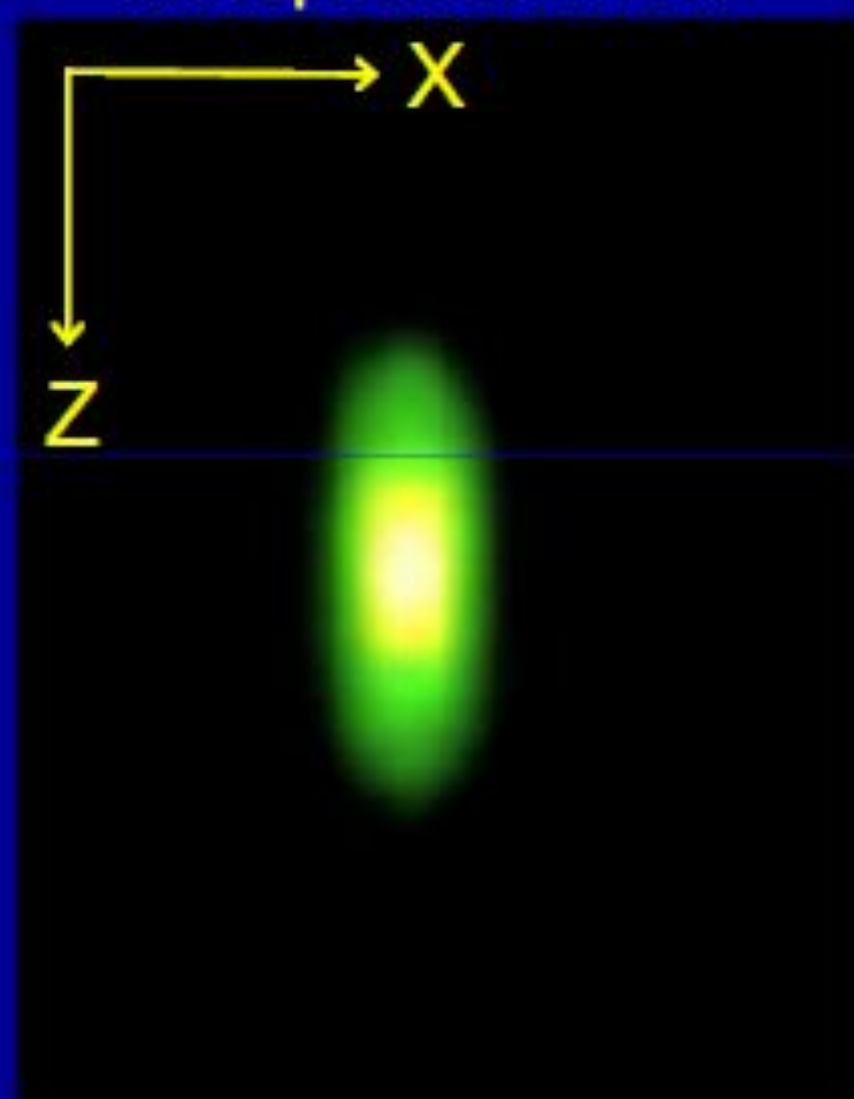
Рис. Конфокальная PSF показана справа, а обычная PSF - слева

Функция рассеяния точки

Обычный



Конфокальный



Если использовать критерий Релея для разрешения (провал 26% от максимума распределения), то мы получим, что разрешение в конфокальном микроскопе увеличивается, но не существенно. Для конфокального микроскопа

$$r_{\text{conf}} = 0.44 \frac{\lambda}{n \sin \theta} = 0.88 \frac{\lambda'}{D} F$$

в то время как для обычного микроскопа

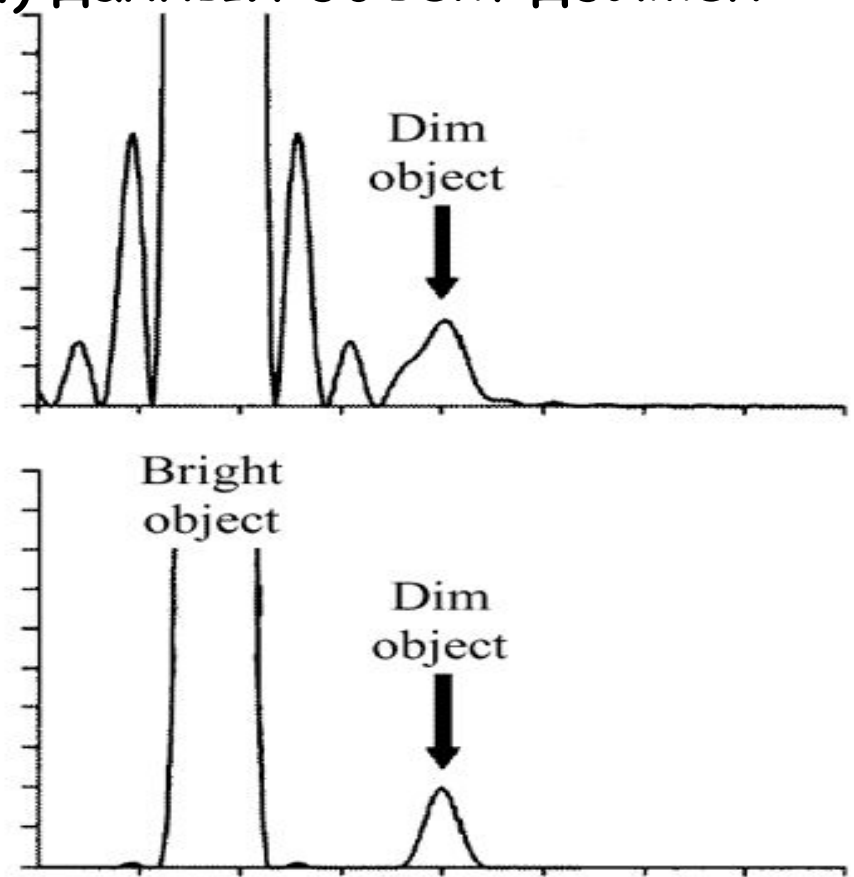
$$r_{\text{resel}} = 0.61 \frac{\lambda}{n \sin \theta} = 1.22 \frac{\lambda'}{D} F$$

где $\lambda' = \lambda/n$

Однако основным достоинством конфокального микроскопа является не увеличение разрешения в смысле критерия Релея, а существенное увеличение контрастности. В частности для обычной PSF в фокальной плоскости отношение амплитуды в первом боковом максимуме к амплитуде в центре составляет 2%, для случая конфокального микроскопа это отношение будет 0.04%.

На рис. приведен практический пример, когда это важно. На верхней части рисунка мы видим, что тусклый объект (интенсивность в 200 раз меньше, чем у яркого) невозможно обнаружить в обычный микроскоп, хотя расстояние между объектами существенно больше того, что предписано критерием Релея. В то же самое время, в конфокальный микроскоп (нижняя часть рис.) данный объект должен хорошо регистрироваться.

Рис. Распределение интенсивности для случая обычного микроскопа (верхний рисунок) и конфокального микроскопа (нижний рисунок). Максимум интенсивности тусклого объекта в 200 раз меньше, чем интенсивность яркого.



Распределение интенсивности вдоль оптической оси для конфокального микроскопа определяется выражением

$$P_{\text{conf}}(\xi, 0) \approx \left(\frac{\sin(\xi/4)}{\xi/4} \right)^4$$

Тогда пользуясь критерием Релея получим разрешение вдоль оптической оси

$$\Delta z_{\text{conf}} = 1.5 \frac{\lambda}{n \sin^2 \theta} = 1.5 \frac{n\lambda}{NA^2} = 6\lambda' \left(\frac{F}{D} \right)^2$$

Здесь важно отметить, что не следует путать разрешение вдоль оптической оси и глубину фокуса в обычном микроскопе. Обычно глубина фокуса в сотни раз превышает разрешение вдоль оптической оси.

Влияние диафрагмы в фокальной плоскости

Один из параметров, который никак не фигурировал в данном выше описании - это размер диафрагм в фокальной плоскости облучающей и собирающей линз. Отметим, что при анализе мы молчаливо предполагали источник точечным и именно в этом предположении получили функцию размытия точки (PSF) для обычного и конфокального микроскопа. Полученные PSF описывают свойства объективной линзы, а изображение диафрагмы в плоскости объекта определяет, свет из каких областей регистрируется фотодетектором. Очевидно, однако, что уменьшение размера диафрагмы приводит к уменьшению количества проходящего света, увеличивает уровень шума и, в конечном итоге, может свести на нет все достигнутые преимущества по контрастности. Таким образом, стоит вопрос об оптимальном выборе размера диафрагмы и разумном компромиссе.

Диафрагма с отверстием меньше размера пятна Эйри просто приводит к потере интенсивности и никак не влияет на разрешение. Диафрагма размером в одно пятно Эйри позволяет по максимуму использовать разрешающую способность объективной линзы. Однако размер диафрагмы примерно в 3-5 раза больше пятна Эйри представляется наиболее подходящим компромиссом. Следует понимать, что обсуждаемый здесь размер имеет смысл размера изображения в плоскости объекта, а поэтому реальный размер отверстия в диафрагме зависит от увеличения линзы. В частности, при использовании 100-кратной линзы диафрагма с отверстием 1 мм будет спроецирована в плоскость объекта в круг радиусом 10 мкм.

Для того, чтобы учесть наличие диафрагмы математически и построить новую функцию распределения интенсивности, следует выполнить свертку

$$P(\rho, \xi) = p \otimes S = \int p(\rho - \rho_s, \xi) S(\rho_s, \varphi_s) \rho_s d\varphi_s d\rho_s$$

а для конфокального микроскопа уже полученную функцию

$P(\rho, \xi)$ умножать на $p(\rho, \xi)$

Результирующее распределение интенсивности для случая диафрагмы с размером 5 пятен Эйри приведено на рис.

$$p5(\zeta, \rho) = \text{psf}(\zeta, \rho) \otimes \text{Circ}(5)$$

where $\text{Circ}(5) = 5$ resel pinhole

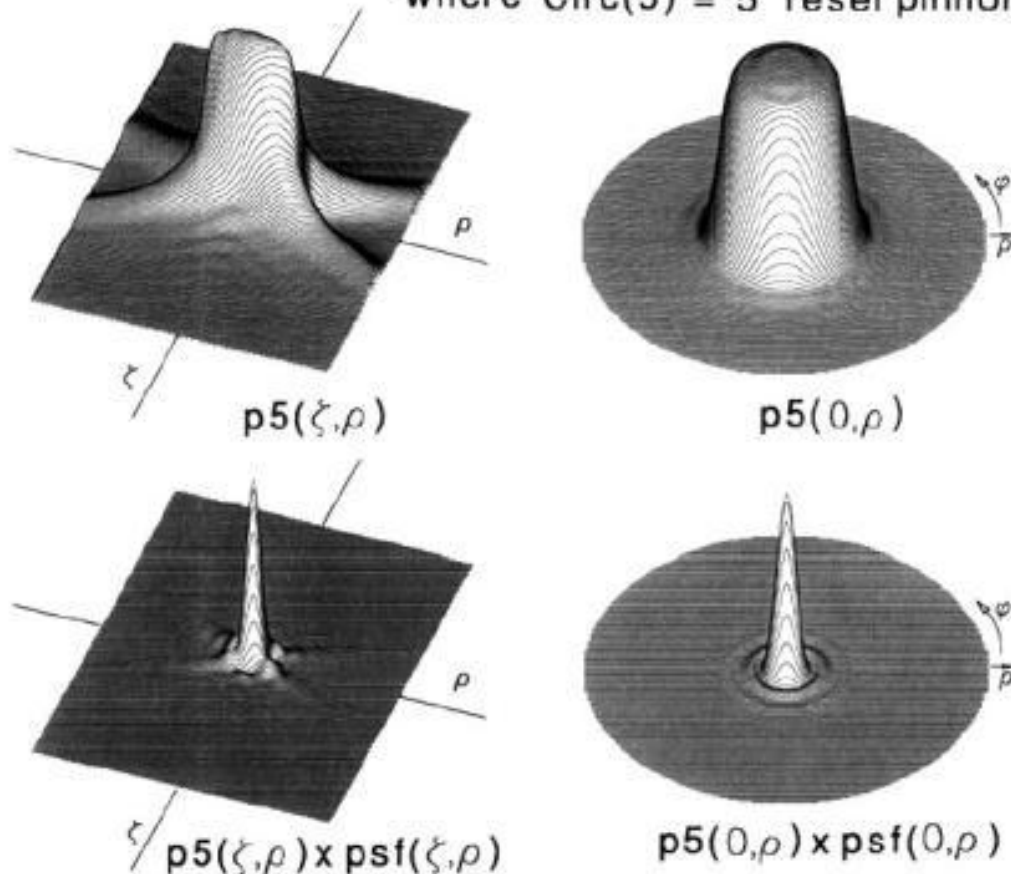


Рис. Функции размытия точки для обычного микроскопа с диафрагмой размером 5 пятен Эйри (верхние рисунки) и для конфокального микроскопа (нижние рисунки)

Конфокальный лазерный сканирующий микроскоп

История создания и принцип работ. В 90-х годах достижения в оптике и электронике позволили создать более мощные и надежные лазеры, сканирующие зеркальные элементы с высоким коэффициентом полезного действия, высокопроизводительную волоконную оптику, более тонкий слой диэлектрического покрытия и детекторы, уменьшившие шумовые характеристики. Благодаря появившимся в конце 90-х годов высокоскоростным компьютерным системам, увеличенным мониторам и технологиям, позволяющим запоминать большой объем информации, наступил новый взрывной этап в развитии КЛСМ по количеству применений, на которые она могла быть нацелена. Первые сообщения о применении конфокального лазерного сканирующего микроскопа для получения изображений кожи человека *in vivo* были опубликованы в 1995 г. В 90-х годах группы исследователей занимались изучением различных патологических состояний кожи с помощью отражательной конфокальной микроскопии и показали большую значимость данного метода как полезного диагностического инструмента.

В зависимости от применяемого источника света существуют разные виды конфокальной микроскопии. Конфокальная микроскопия может выполняться с использованием лазера в качестве источника света или без него. В тандемном сканирующем конфокальном микроскопе обычно используется ртутная лампа. По сравнению с тандемным сканирующим конфокальным микроскопом при КЛСМ используется лазерный луч определенной длины волны и высокой мощности освещения. Кроме того, различают флюоресцентную и отражательную КЛСМ. Благодаря своей безопасности и неинвазивности прижизненная отражательная КЛСМ является более предпочтительной в использовании.

Основной принцип отражательной КЛСМ основан на использовании точечного источника света (лазерный луч), освещающего маленькое пятно внутри ткани, с последующим улавливанием отраженного света через оптически соединенную апертуру (вкрапление) (рис.).

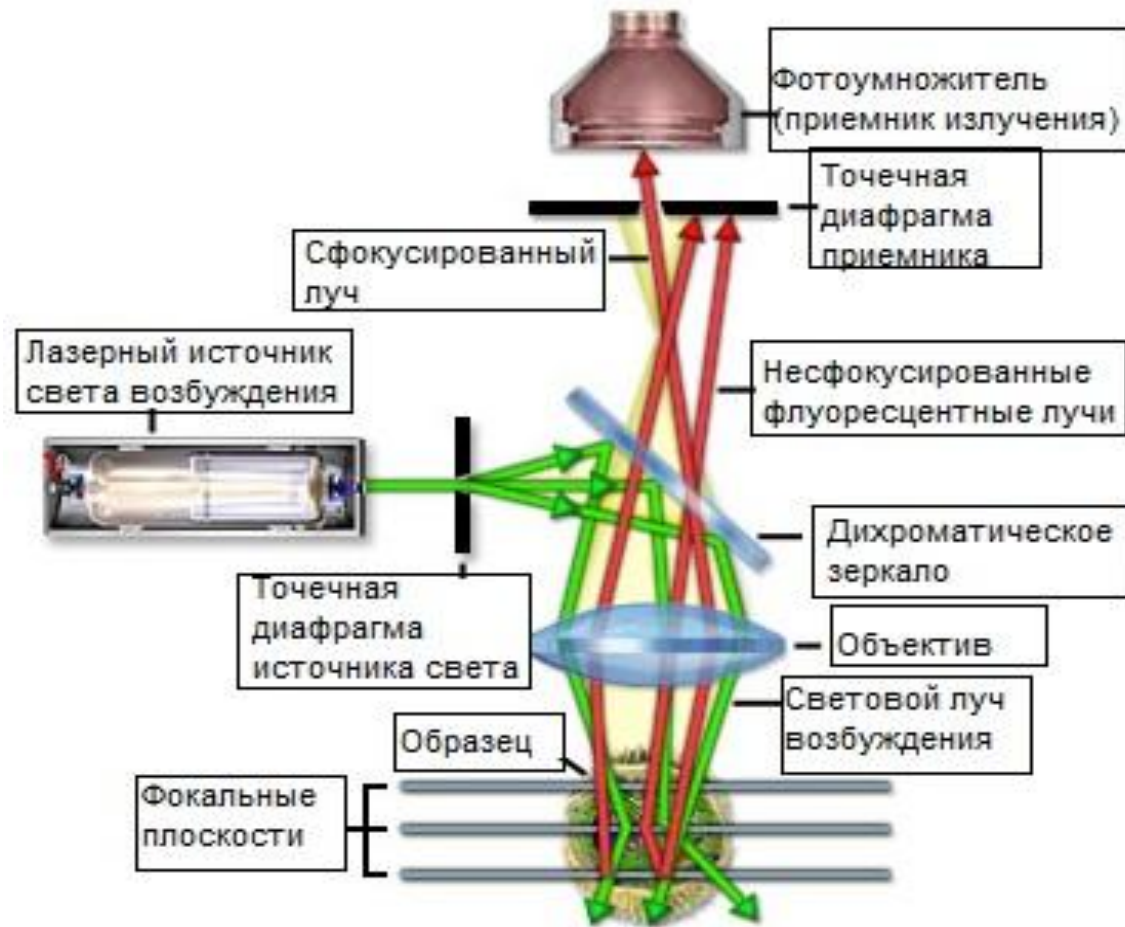
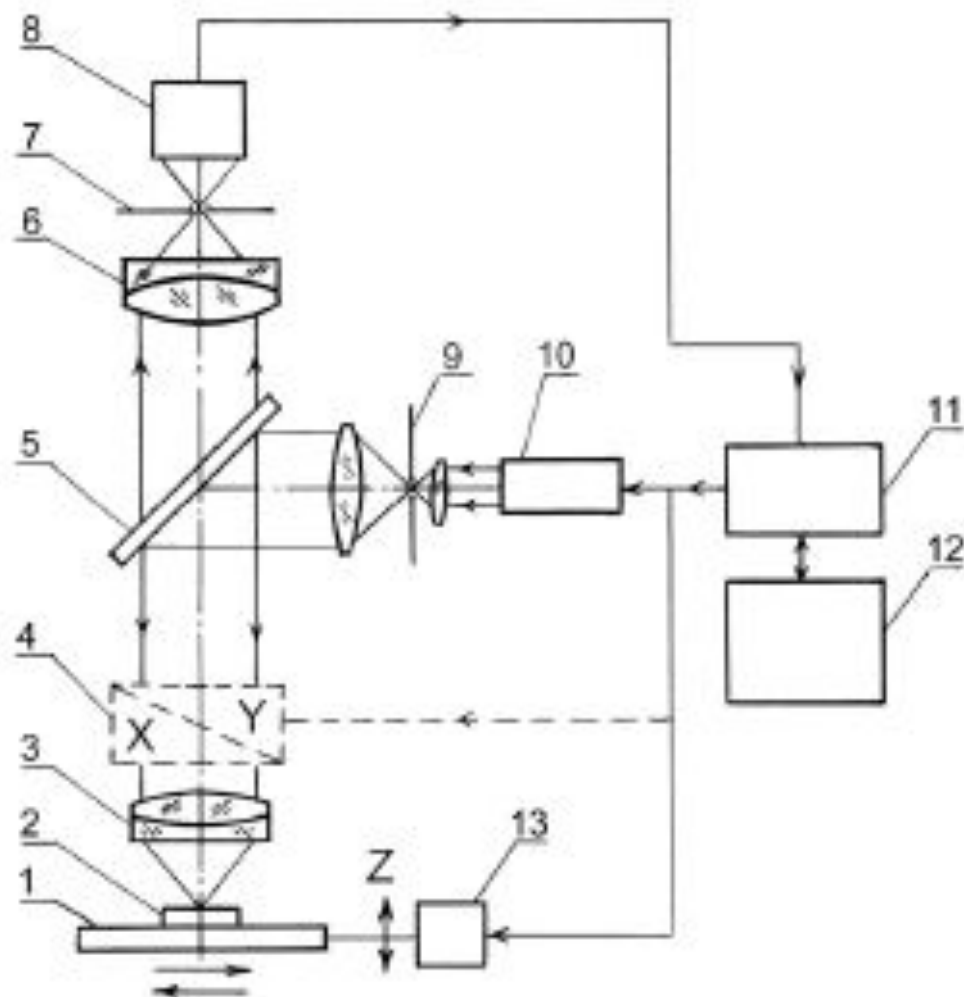


Рис. Схема конфокального лазерного сканирующего микроскопа

Отраженный свет проходит через вкрапление, в результате чего только находящийся в фокусе свет достигает детектора, в то время как свет вне фокуса отклоняется. Таким образом, определяется единственный план внутри образца, который расположен в фокусе. Числовая апертура линзы объектива, длина волны и размер открытой апертуры (вкрапления) определяют разрешение изображения, получаемого с помощью отражательной КЛСМ. Лазеры различных длин волн могут быть использованы в качестве источника света для отражающей конфокальной микроскопии. Более длинные, близкие к инфракрасным, длины волн проникают глубже в образец, но дают более низкое разрешение по сравнению с короткими длинами волн видимого спектра. Отражение света возникает в результате местных различий в коэффициенте преломления внутри образца.

Конфокальная микроскопия объединяет обширную группу приборов, отличающихся методами микроскопирования, конструктивными элементами, функциональными схемами и программным обеспечением. Схема ЛКСМ с основными функциональными связями показана на рис. В этой схеме могут быть выделены следующие блоки и системы:

- базовый микроскоп со сканирующим столиком и автофокусировкой;
- конфокальный блок;
- система освещения;
- система управления, визуализации, реконструкции объемного изображения и документирования.



Структурная схема ЛКСМ с основными функциональными связями. 1 — сканирующий столик; 2 — исследуемый образец; 3, 6 — объективы; 4 — сканирующее устройство; 5 — светоделительная пластина; 7, 9 — игольчатые диафрагмы; 8 — приемник излучения; 10 — лазер; 11 — блок управления; 12 — компьютер; 13 — привод для сканирования столика по оси Z

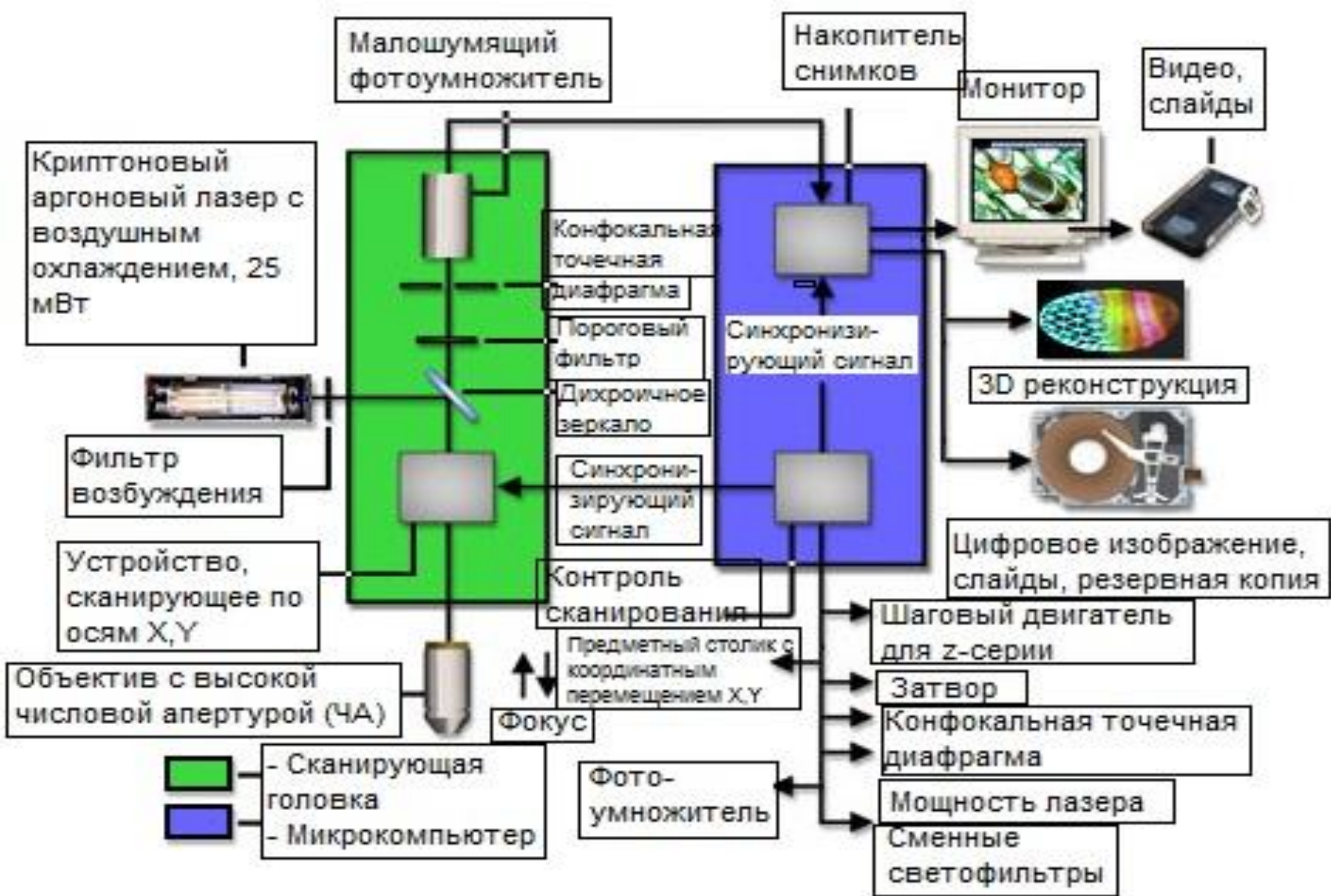
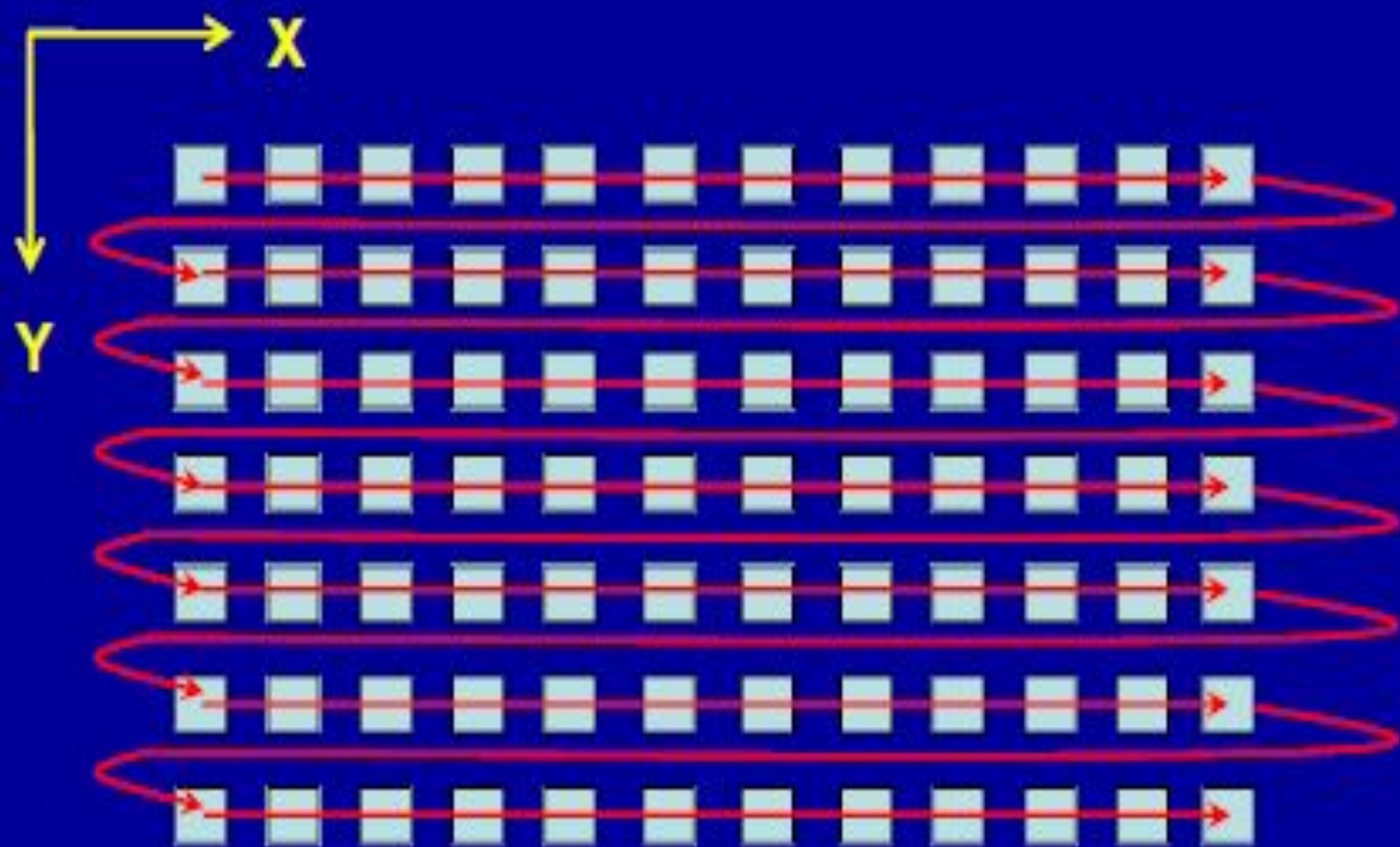


Схема современного лазерного сканирующего конфокального микроскопа



Конфигурация лазерного сканирующего конфокального микроскопа Nikon

Основная особенность ЛКСМ состоит в возможности получения послойного изображения исследуемого объекта (например, клетки или кристалла) с высоким разрешением и с низким уровнем шумов. Достигается это путем пошагового сканирования объекта сфокусированным пучком света от когерентного источника или столиком, использованием специфических флуоресцентных зондов и специальных методов ограничения световых потоков.



X

Z

1

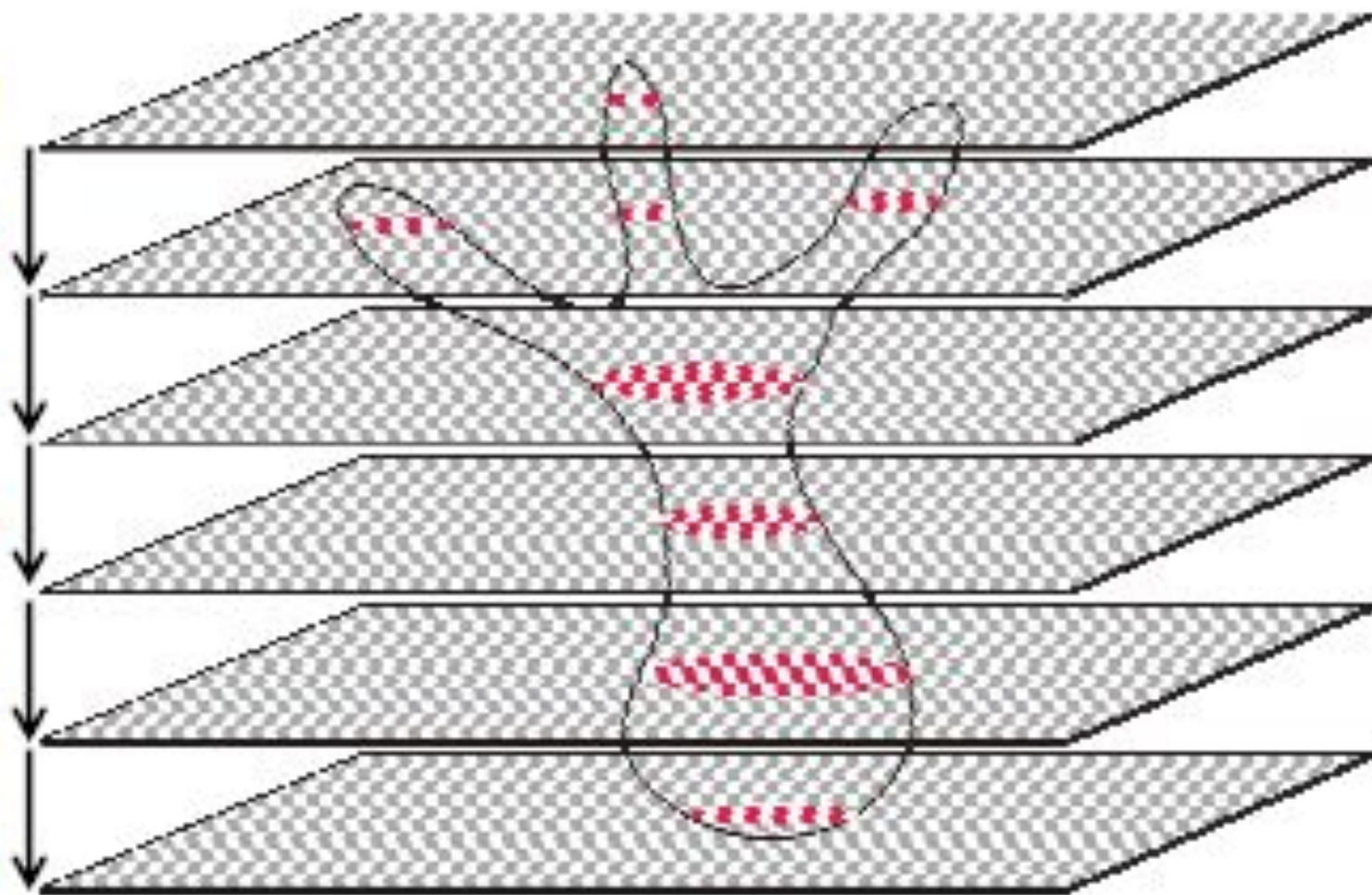
2

3

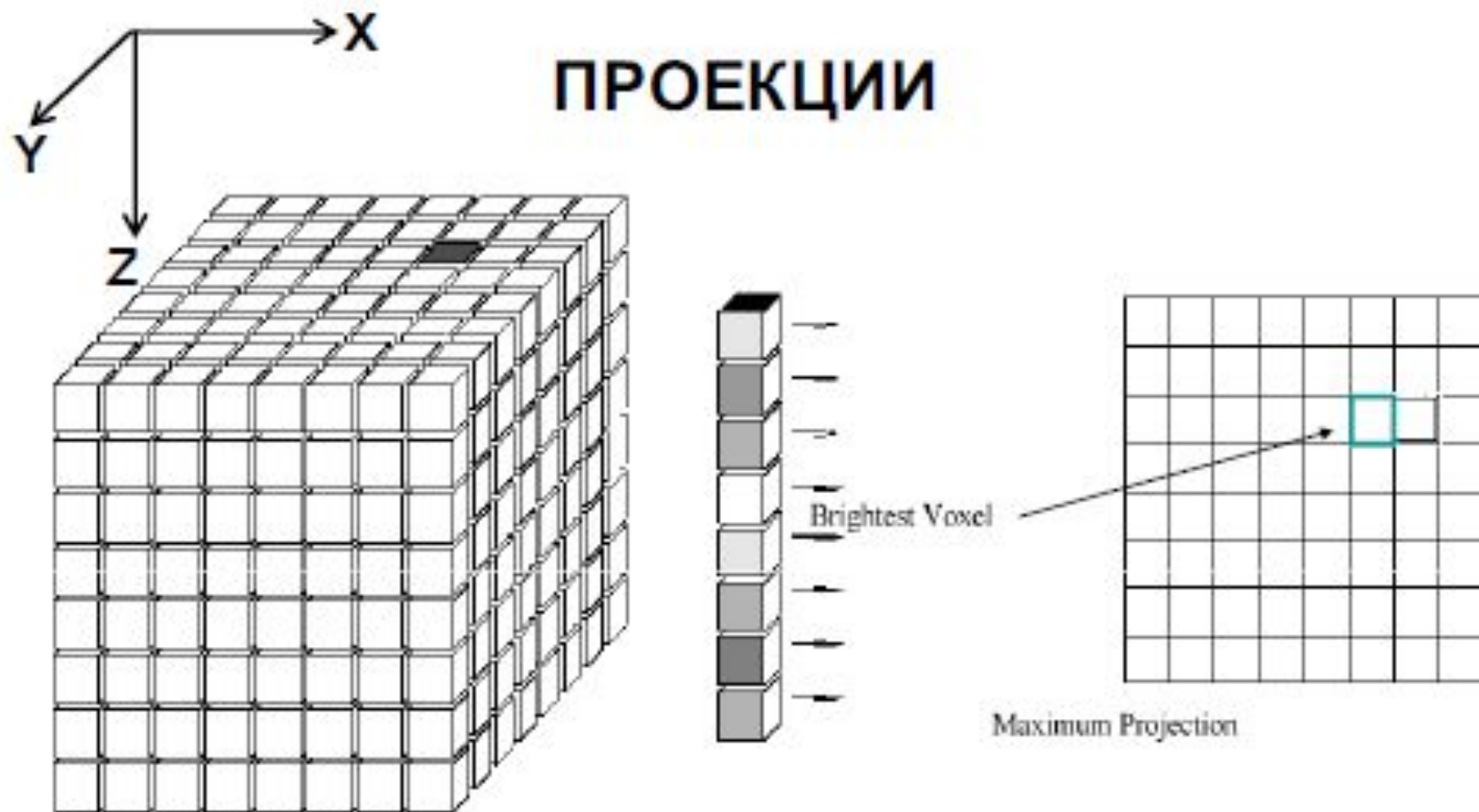
4

5

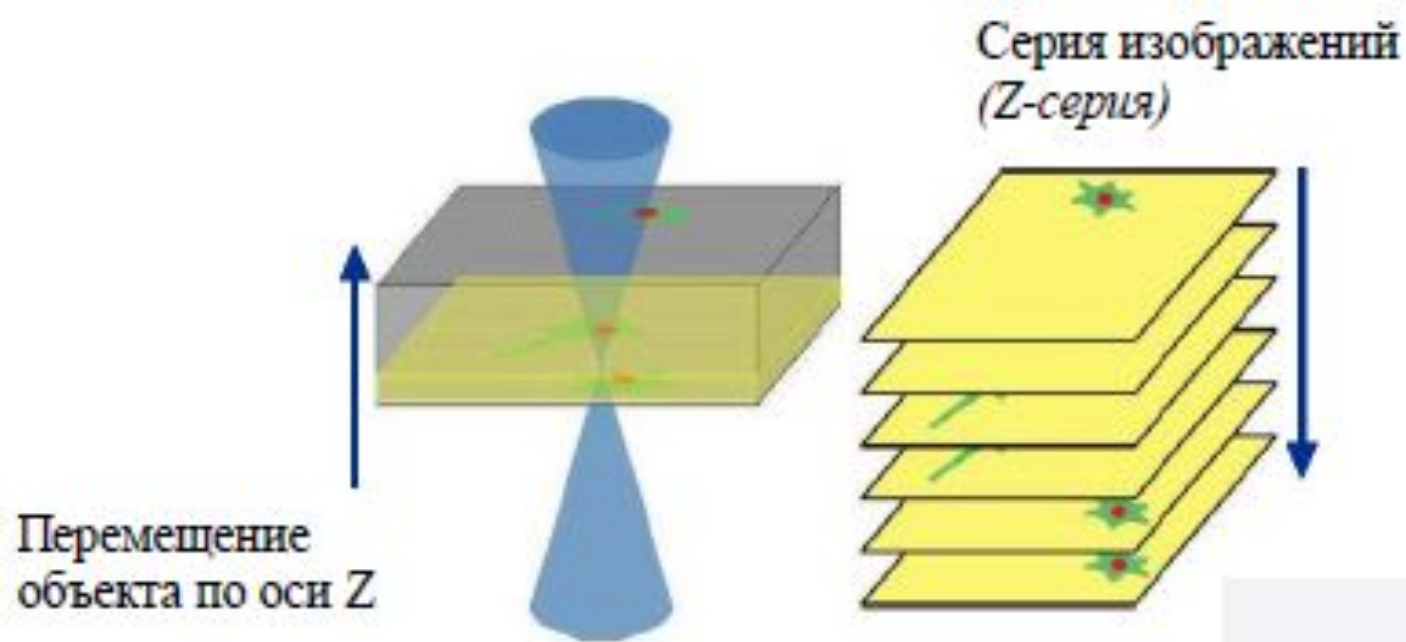
6



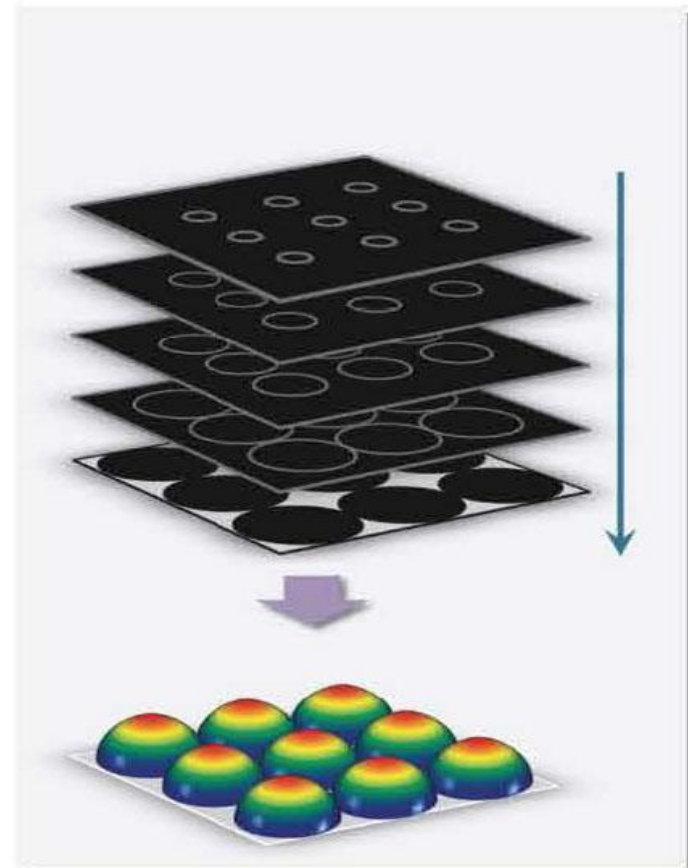
ПРОЕКЦИИ



- Maximum
- Average
- Transparent



Для получения 3D профиля поверхности объекта используется послойное (по отношению к оси Z) оптическое построение образца. Поскольку интенсивность света становится максимальной при попадании поверхности образца в фокальную плоскость объектива, координаты образца по осям могут быть найдены напрямую.



Разрешающая способность КЛСМ.

Разрешающая способность (resolution) определяет предел различимости деталей изображения (это минимальное расстояние между двумя точками объекта, при котором прибор может различать их как отдельные структуры) и поэтому является одной из главных характеристик микроскопа. В обычном микроскопе и ЛКСМ механизмы формирования изображения различны, и это различие косвенно находит выражение в значении разрешающей способности. Оценивается разрешающая способность по характеру дифракционных явлений, возникающих при микроскопировании близко расположенных точечных светящихся объектов. Критерии ее оценки основаны на анализе функции рассеяния точки.

Теоретически, разрешение конфокального микроскопа приблизительно в 1,4 раза лучше обычного. Оно зависит, в первую очередь, от длины волны источника излучения. А так как конфокальный и обычный микроскопы - оптические приборы, предназначенные для исследований в видимом диапазоне спектра, то существует предел, накладываемый волновыми свойствами света. Также, как говорилось выше, немалое значение при этом имеет апертура объектива. Конструктивно этот предел тоже достигнут.

Разрешающая способность конфокального микроскопа бывает латеральной (находится в плоскости, которая перпендикулярна оптической оси системы) и аксиальной (находится в вдоль оптической оси). Как правило, аксиальная составляющая разрешения, в 2-3 раза хуже латеральной. Также, важное значение при определении разрешения имеет диаметр конфокальной диафрагмы, т.к. от него зависит толщина слоя (чем меньше диаметр, тем меньше толщина слоя), с которого снимается оптический сигнал, т.е. аксиальное разрешение. Но здесь получается «палка о двух концах» - чем меньше диаметр диафрагмы, тем меньшее количества света будет достигать фотодетектора.

Поскольку в конфокальном микроскопе еще и присутствует электроника, преобразующая световой сигнал в аналоговый, а затем в цифровой, то его разрешение зависит не только от оптических узлов, но и от электронных систем. Однако все эти преобразования могут ухудшить разрешение ЛСКМ. Например, на его разрешающую способность влияют такие параметры как формат кадра (т.е. число пикселей - элементов изображения на кадр) и электронное увеличение (zoom) не к максимальному увеличению прибора, а к использованию высокоапертурных объективов. Параметры сканирующей системы должны соответствовать параметрам объектива. Для правильной настройки конфокального микроскопа существуют специальные таблицы и графики. В том случае, если необходимо исследовать (а не просто обнаружить) структуры размером менее 0.2 мкм, то для этого придется применять другие методы, например, электронную микроскопию.

Применение конфокального микроскопа.

К настоящему времени применение конфокальной микроскопии в значительной степени вышло за рамки первоначально предполагаемого М. Минским ее использования в качестве средства исследования микроструктур головного мозга. Для исследователей, чья работа связана с изучением биологии, биофизики, биохимии и физиологии клетки, ЛКСМ стал незаменимым инструментом как для наблюдения внутриклеточных структур, так и для количественной оценки процессов в клетках, клеточных мембранах, внеклеточном окружении.

1. Диагностика примесей в водном растворе. В настоящее время актуальными являются методы исследования структуры воды и примесей, а также эффективности различных способов ее фильтрации.

2. Оригинальные исследования, посвященные различным разделам биологии клетки: исследования в области нейробиологии (исследования центральной и периферической нервной системы, микроциркуляции в сосудах мозга, внутриклеточных структур, цитоскелета, рецепторов, мембран нейронов ; исследования клеточного ядра и его генетического аппарата; исследования митохондрий и проблем митохондриального транспорта; исследования транспорта кальция и его локализаций.

3. Оригинальные исследования, проводимые *in vivo*. Это перспективное направление применения конфокальной микроскопии в неинвазивной диагностике многих патологий активно развивается в офтальмологии, дерматологии и проктологии.

4. Исследования в области физики твердого тела

4.1 Изучение полупроводниковых пленок

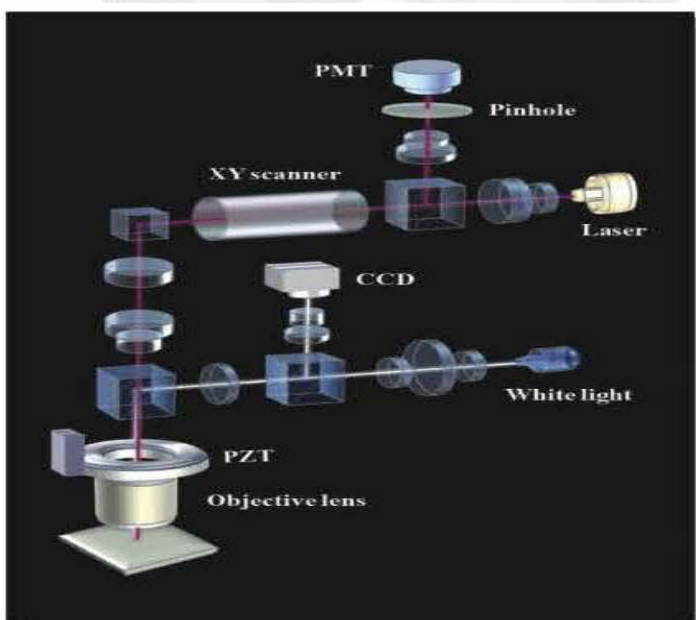
4.2 Изучение полупроводниковых нанокластеров

4.3 Анализ профилей механических напряжений облученных материалов.

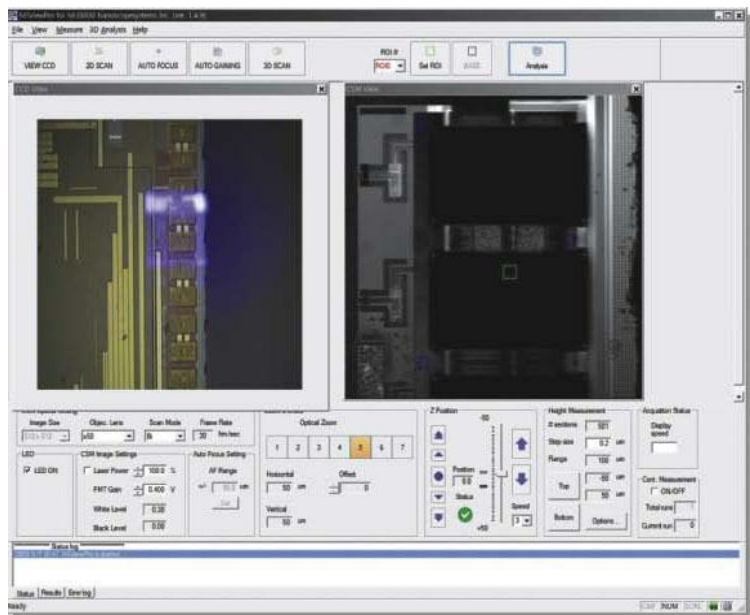


Модель NS-3000 представляет собой высокоскоростной лазерный конфокальный сканирующий 3D микроскоп, предназначенный для точных и достоверных измерений, а также для построения пространственных изображений.

Изображение в микроскопе формируется в масштабе реального времени за счет использования быстродействующего оптического сканирующего модуля, а также программных алгоритмов обработки сигналов. Данное решение является надежным и перспективным для осуществления различных задач при измерении и проверке микроскопических 3D-структур, таких как полупроводниковые пластины, различные плоские панели для дисплеев (технология PD), микроэлектромеханические системы (MEMS), стеклянные подложки и поверхности различных материалов.



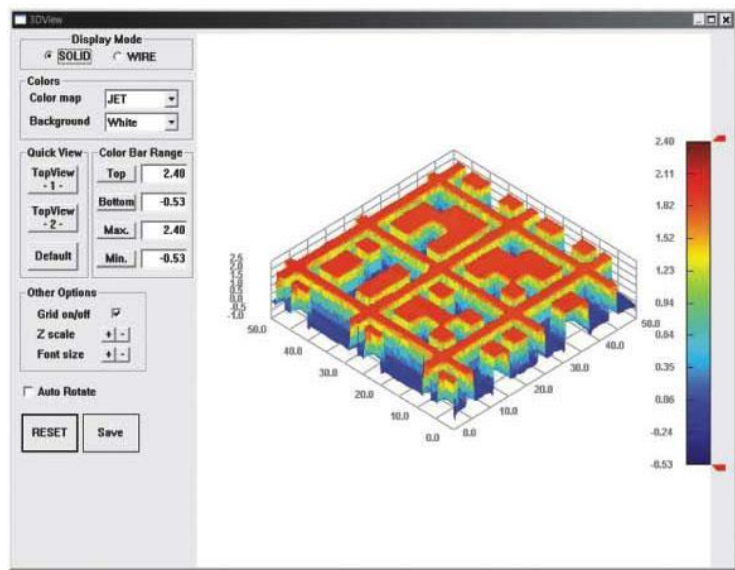
Источник	Лазер	Длина волны 405 нм (25 мВт, Класс IIIB)				
	Подсветка	Мощный белый светодиод				
Объективы* ¹		5x	10x	20x	50x	100x
Поле зрения (мкм ²)		2500 x 2500	1250 x 1250	625 x 625	250 x 250	125 x 125
Оптическое увеличение		1x . . . 10x				
Пространственное разрешение (XY)		140 нм* ²				
Диапазон измерений высоты		70 мм (крупный план) / 200 мкм (детальный)				
Разрешение перемещения по оси		10 нм				
Размер изображения (в пикселях)		512 x 512, 512 x 256, 512 x 128				
Частота кадров		15, 30, 60, 120* ³ Гц				
Воспроизводимость результатов по высоте		20 нм* ⁴				
Время 3D измерения		0.3 сек* ⁵				
Вес		12 кг* ⁶				
Размеры		328(Ш) x 499(В) x 595 (Г)				



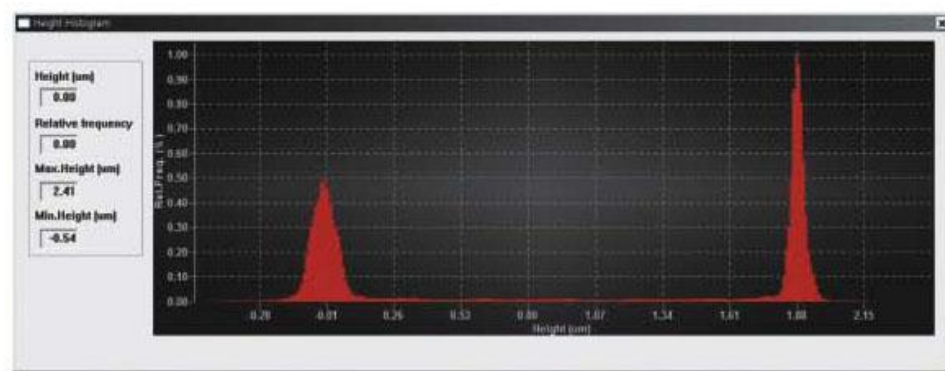
Окно Управления



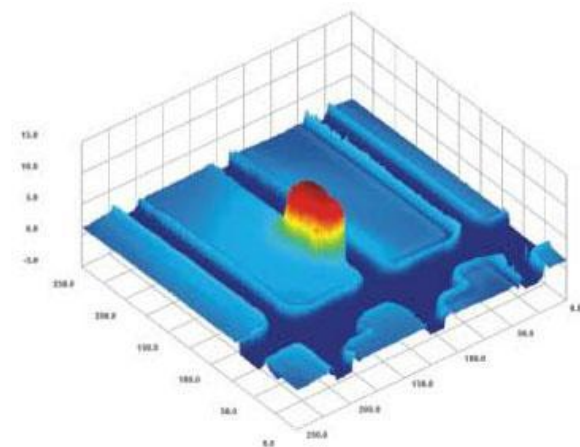
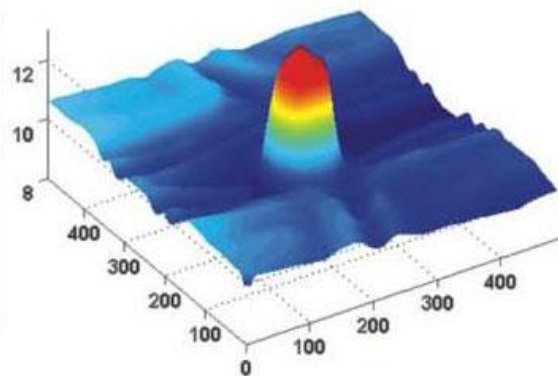
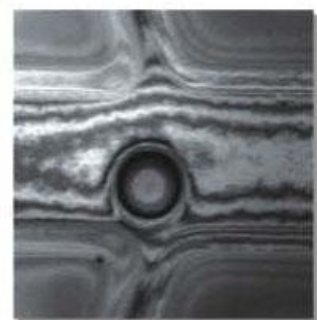
Окно Анализа



3D - отображение

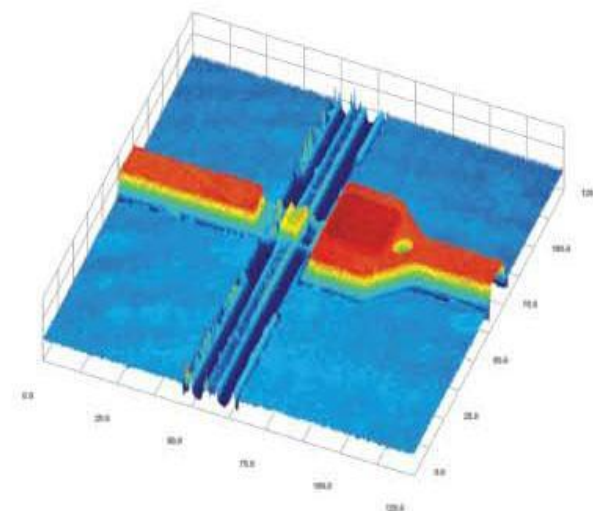
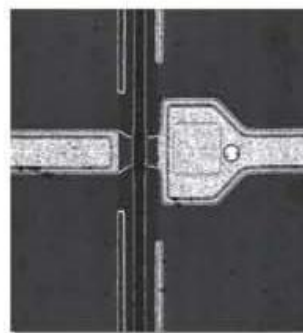
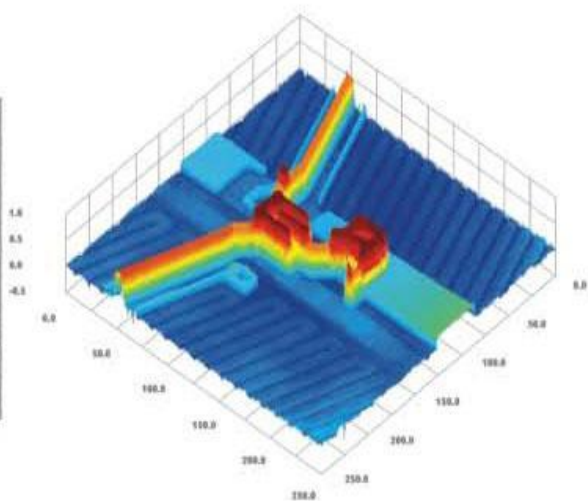


Гистограмма

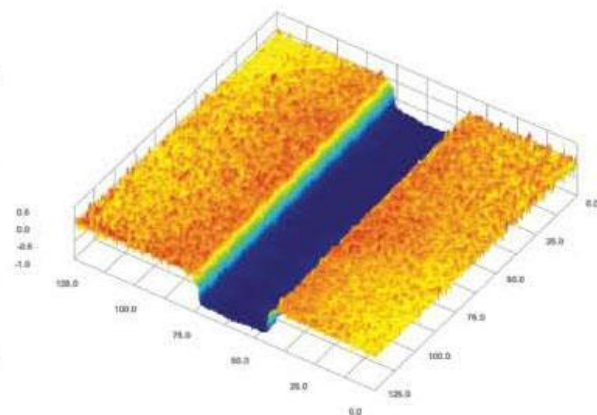
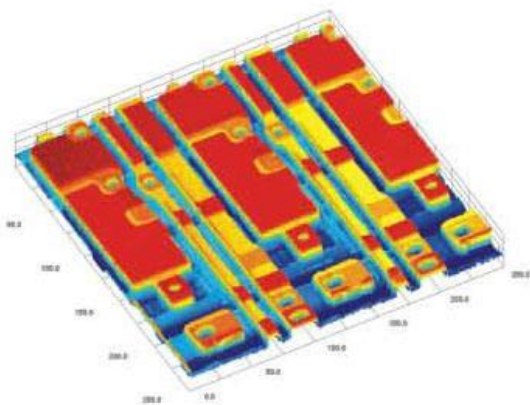
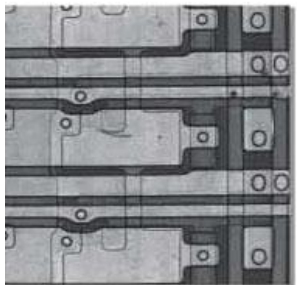


Пространственные разделители в LCD панели

Фрагменты и частицы в LCD панели

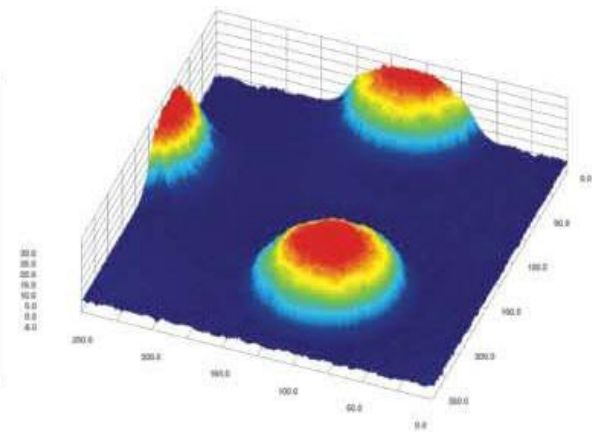
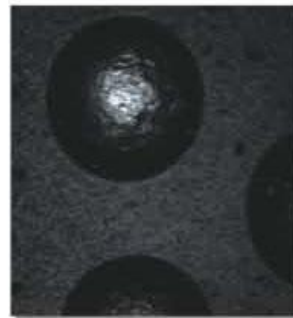
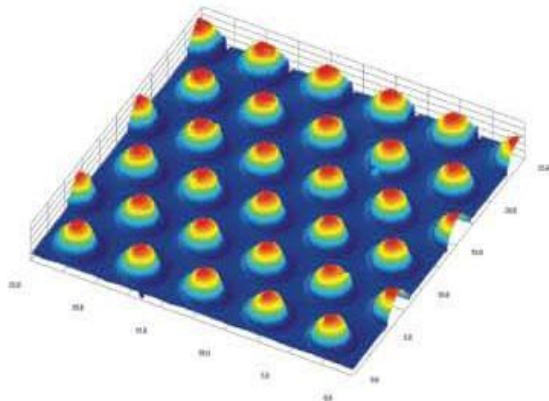


Изображение микрорельефов интегральных схем



Светодиодные пленки, OLED

Изображение фоточувствительного элемента



Сапфировая пластинка

Пузырьки и включения

3D Микроскоп NS-3000 разработан для измерения таких пространственных параметров, как ВЫСОТА, ШИРИНА, УГОЛ, ПЛОЩАДЬ и ОБЪЕМ структур микронного и субмикронного масштаба, например:

- Полупроводники: - Структуры полупроводниковых ИС, высота вкраплений и проверка дефектов на поверхности, процессы химико-механической планаризации.
- Производство плоских панелей - определение высоты пространственных столбцов в LCD устройствах, выступы в плазменных панелях, проверка качества покрытия.
- Микроэлектромеханические системы - 3D профиль и рисунок MEMS структуры, шероховатость поверхности.
- Стекланные подложки и поверхности - профиль и изображение структур фоточувствительных элементов на стекле, глубина профиля.
- Материаловедение - проверка опорных поверхностей на шероховатость и наличие трещин и дефектов.

Преимущества и недостатки конфокального микроскопа.

Основными преимуществами конфокальной микроскопии по сравнению с обычной световой микроскопией являются:

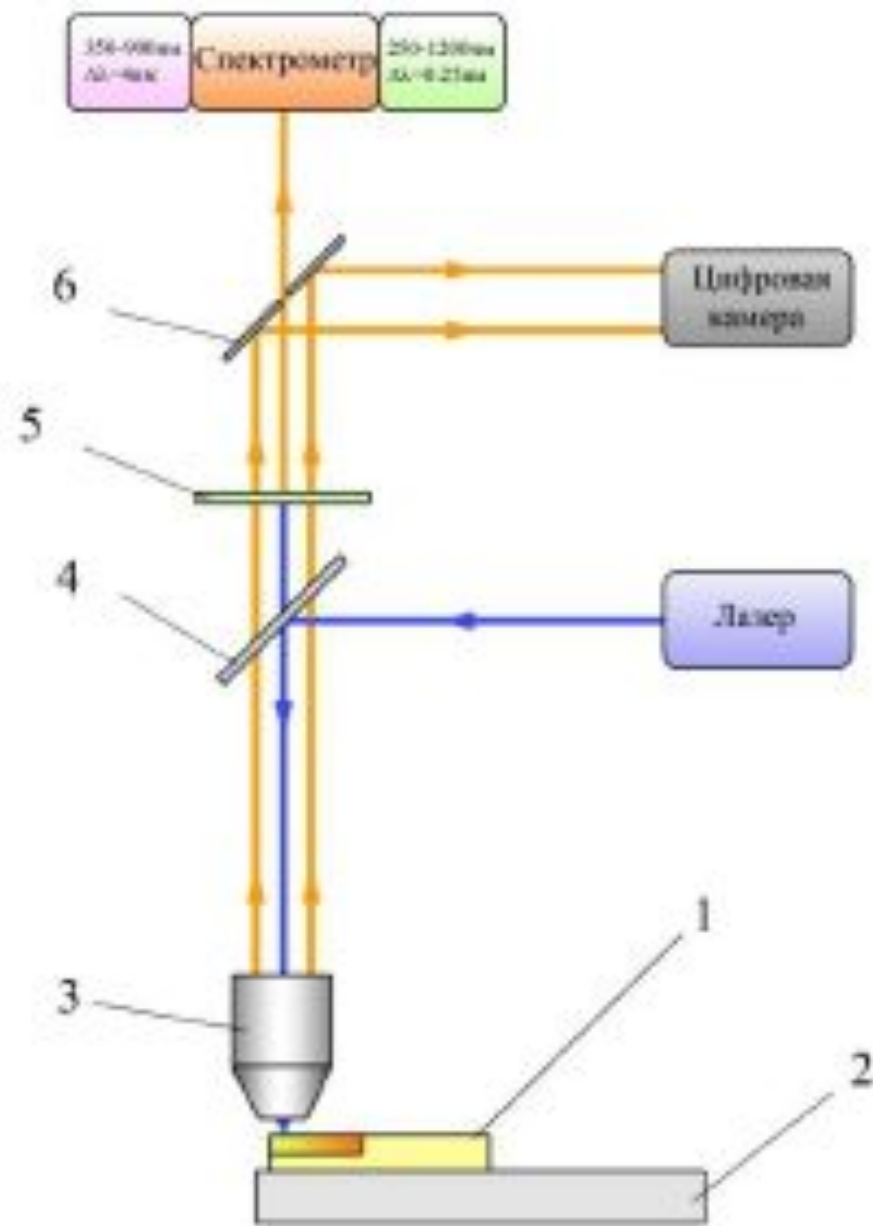
1. Выше контрастность изображения.
2. Разрешающая способность выше (латеральная в 1.4 раза, аксиальная – зависит от размера конфокальной диафрагмы).
3. Возможность получать «оптические срезы», трехмерная реконструкция.
4. Мультиспектральные исследования с высокой степенью разделения сигналов от разных флуорохромов.
5. Возможности применения методов цифровой обработки изображений.

К недостаткам конфокальной микроскопии можно отнести:

1. Сложность в настройке.
2. Отсутствие в ЛСКМ «оптического» изображения. Оно существует только в цифровой форме и отображается на экране монитора.
3. Высокая стоимость

Псевдо конфокальный микроскоп.

Большое распространение в настоящее время получила так называемая «псевдо конфокальная микроскопия». Она объединяет в себе различные методы эмуляции конфокальной микроскопии. Рассмотрим устройство и принцип работы системы микроскопического спектрального анализа QDI 302, включающей в себя микроскоп Leica DM 2500M.



Оптическая схема псевдо конфокального микроскопа

Световой поток от лазерного источника попадает на дихроичное зеркало 4 (зеркало отражает только свет с длиной волны, равной длине волны возбуждающего света), а затем на объектив 3 и фокусируется на поверхности исследуемого образца 1. Образец находится на пьезоэлектрическом столике 2, который позиционирует образец с точностью до десятых долей микрометров. Лазерный свет вызывает люминесценцию образца (на схеме показан оранжевым цветом). Этот свет собирается объективом, проходит через полупрозрачное зеркало 4, через фильтр 5, позволяющий отсекалть ту часть излучения лазера, которая прошла через зеркало 4, и попадает на зеркало 6. В этом зеркале имеется диафрагма, через которую сигнал попадает на спектрометр. Благодаря этой диафрагме появляется возможность снимать сигнал с ограниченной поверхности образца. В этом заключается «псевдо конфокальность» данной системы. Часть сигнала, отраженная от зеркала 6 попадает на цифровую камеру, а затем и в компьютер. Это позволяет получать оптическое изображение и видеть поверхность образца. Для данной системы размер диафрагмы, при использовании объектива 100х, составляет 2х2мкм.

Преимущества и недостатки псевдо конфокального микроскопа по сравнению с конфокальным:

1. Более низкая стоимость
2. Простота настройки
3. Возможность получать «оптическое изображение»
4. Мобильность системы
5. Меньший размер
6. Возможность подключать другие спектрометры

К недостаткам можно отнести:

1. Низкое оптическое разрешение
2. Низкий контраст изображения.

Заключение.

Созданием современных ЛКСМ не завершены работы по применению принципа конфокальности в исследованиях биологических микрообъектов. Дальнейшее развитие этого принципа осуществляется в рамках следующих направлений — создание так называемых "гибридных" систем. Гибридные системы позволяют расширить функциональные возможности конфокальной микроскопии за счет совместного использования различных микроскопических приборов: ближнепольного и сканирующего микроскопов, рамановского и обычного конфокального микроскопов. В этих микроскопах флуоресцентное изображение формируется двумя расположенными встречно конфокальными объективами, а его реконструкция является результатом интерференции совмещенных изображений.

Вместе с этим изготовители коммерческих конфокальных микроскопов непрерывно ведут работы по повышению эксплуатационных показателей существующих моделей ЛКСМ за счет применения совершенных источников света, фотодетекторов, красителей, программного обеспечения, повышения виброустойчивости.

В области физики твердого тела остается много нерешенных вопросов, в том числе и вопросы, связанные с исследованием перспективных реакторных материалов. Используя ускорительную технику, совместно с конфокальным микроскопом можно промоделировать процессы взаимодействия осколков деления с материалами, понять процесс развития дефектных структур.