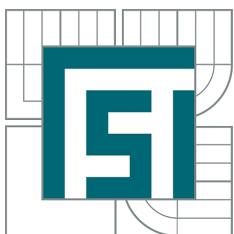


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



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

OPTICKÁ PINZETA PRO KOHERENCÍ ŘÍZENÝ
HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP
OPTICAL TWEEZERS FOR COHERENCE-CONTROLLED HOLOGRAPHIC MICROSCOPE

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. BRANISLAV STRAKA

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. Zbyněk Dostál

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství

Ústav fyzikálního inženýrství

Akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

student(ka): Bc. Branislav Straka

který/která studuje v **magisterském navazujícím studijním programu**

obor: **Fyzikální inženýrství a nanotechnologie (3901T043)**

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním rádem VUT v Brně určuje následující téma diplomové práce:

Optická pinzeta pro koherencí řízený holografický mikroskop

v anglickém jazyce:

Optical tweezers for coherence-controlled holographic microscope

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Koherencí řízený holografický mikroskop se jeví jako vhodný nástroj pro pozorování živých buněk. V některých případech je nutné s pozorovanými objekty provádět mechanickou manipulaci. Vhodným řešením je doplnit koherencí řízený holografický mikroskop laserovým mikromanipulačním zařízením (optickou pinzetou).

Cíle diplomové práce:

Optický a mechanický návrh sestavy optické pinzety pro vyvíjený holografický mikroskop. Sestava musí být navrhnuta jako přídavný modul pro mikroskop, který lze dle potřeby odpojovat od mikroskopu. Cílem práce je také výroba a experimentální ověření modulu.

Seznam odborné literatury:

- [1] BORN, M.; Wolf, E.: Principles of Optics, 7th Exp.Ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge 2002.
- [2] KOLMAN, P.; CHMELÍK, R.: Coherence-controlled holographic microscope, OPTICS EXPRESS, Vol.18, (2010), No.21, pp.21990-22003.
- [3] NEUMAN, Keir C.; BLOCK, Steven M.: Optical trapping, REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS, Vol.75, (2004), No.9, s. 2787-2809.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Zbyněk Dostál

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2012/2013.

V Brně, dne 21.11.2012

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Šikola, CSc.
Ředitel ústavu

prof. RNDr. Miroslav Doušovec, CSc., dr. h. c.
Děkan fakulty

Abstrakt

V diplomovej práci bol popísaný a vysvetlený princíp fungovania koherenciou riadeného holografického mikroskopu druhej generácie (CCHM2) skonštruovaného na VUT v Brne. Taktiež bol uvedený teoretický popis fungovania optickej pasce spolu s výpočtom síl v nej pôsobiacich, spôsoby merania tuhosti optickej pasce a princíp vytvorenia časovo zdielaných optických pascí. Bola navrhnutá optická pinzeta tvoriaca samostatný modul pripojiteľný k CCHM2. Bola vytvorená simulácia a optimalizácia parametrov optického systému, mechanický návrh, výrobná dokumentácia, justážny postup a prúdový zdroj na napájanie laserovej diódy umožňujúci kontrolovanie výstupného výkonu, ktorý je možné ovládať, rovnako ako uhol natočenia GO, riadiacou kartou pripojenou k PC. Navrhnutá a vyrobenná optická pinzeta bola otestovaná v spojení s CCHM2.

Summary

In the master's thesis, there has been described and explained the principle of operation of the second generation coherence controlled holographic microscope (CCHM2) designed at the Brno University of Technology. There has also been listed theoretical description of the operation of the optical trap, together with the calculation of the forces acting on it, ways of measuring the stiffness of the optical trap and the principle of creating a time-shared optical traps. The optical tweezers forming a separate module connectable to CCHM2 was designed. Simulation and optimization of parameters of the optical system, mechanical design, manufacturing documentation, current source to power the laser diode which allows to control the diode output power by the controller card connected to the PC was designed. The galvano-optics mirror angle is controlled by the PC card too. The optical tweezer has been designed, manufactured and tested in conjunction with the CCHM2.

Klíčová slova

Optická pinzeta, mikromanipulačné techniky, koherenciou riadený holografický mikroskop, prúdový zdroj, návrh.

Keywords

Optical tweezer, micromanipulation techniques, coherence-controlled holographic microscope, current source, design

STRAKA, B. *Optická pinzeta pro koherencí řízený holografický mikroskop*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2013. 55 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Zbyněk Dostál.

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

Bc. Branislav Straka

Ďakujem Ing. Zbyňkovi Dostálovi za odborné vedenie práce, cenné pripomienky, časté konzultácie a rady. Taktiež ďakujem Ing. Lukášovi Kvasnicovi za pomoc pri návrhu prúdového zdroja, Ing. Mojmírovi Šerému, Ph.D. za zapožičanie experimentálneho vybavenia.

Bc. Branislav Straka

Obsah

1	Úvod	8
2	Holografická mikroskopia	10
2.1	História interferenčnej a holografickej mikroskopie	10
2.2	Koherenciou riadený holografický mikroskop druhej generácie	11
3	Optická pinzeta	15
3.1	História optickej pasce a optickej pinzety	15
3.2	Princíp fungovania a sily pôsobiace v optickej pasci	16
3.2.1	Aproximácie sín v optickej pasci pomocou Rayleighho rozptylu	16
3.2.2	Aproximácie sín v optickej pasci pomocou geometrickej optiky	18
3.2.3	Obecné vyjadrenie sín v optickej pasci	19
3.2.4	Experimentálne meranie sín v optickej pasci	22
3.3	Metódy záchytenia viacerých častíc do optickej pasci	23
4	Návrh laserovej pinzety pre CCHM2	25
4.1	Laserová pinzeta polohovaná GO zrkadlami	26
4.2	Výpočet parametrov laserovej pinzety pre CCHM2	27
4.3	Optický návrh laserovej pinzety pre CCHM2	30
4.4	Mechanický návrh laserovej pinzety pre CCHM2	35
4.4.1	Manipulátor optického vlákna a kolimátor laserového zväzku	36
4.4.2	Držiak galvano-optických zrkadiel	36
4.4.3	Expandér laserového zväzku	37
4.5	Návrh napájania laserovej diódy	40
4.6	Postup justáže laserovej pinzety pre CCHM2	44
5	Experimenty	47
5.1	Rýchlosť pohybu GO zrkadiel	48
5.2	Sledovanie silových účinkov laserovej pasce	49
6	Záver	51
Literatúra		53

Kapitola 1

Úvod

Väčšina živých buniek a obecne biologických preparátov neabsorbuje alebo nerozptyluje svetlo výrazne, t.j. sú v podstate priehľadné. Objekty s takýmito vlastnosťami sú nazývané fázové a pri použití klasického svetelného mikroskopu sú len ľahko pozorovateľné. Pre pozorovanie fázových objektov bola vymyslená interferenčná mikroskopia, ktorá predstavuje významný pokrok v kontrastnom zobrazení detailov vnútornej štruktúry fázových objektov bez použitia farbív.

Jedným z druhov interferenčných mikroskopov je aj holografický mikroskop, ktorý umožňuje rekonštrukciu komplexnej obrazovej vlny z jedného zaznamenaného hologramu, a preto je možné sledovať rýchlo sa meniace fázové objekty. Klasické holografické mikroskopy využívajú koherentné zdroje svetla, čím je degradovaný obraz kvôli vzniku koherentného šumu. Na VUT v Brne je tradícia vo vývoji koherenciou riadených holografických mikroskopov (CCHM¹), ktoré umožňujú použitie časovo a priestorovo nekoherentné osvetlenie, a tým zvýšiť kvalitu obrazu pozorovanej vzorky. Najnovšia, druhá, generácia CCHM prináša viacero výhod oproti predchádzajúcim generáciám. Hlavnou zmenou je možnosť použitia mikroskopových objektívov korigovaných na nekonečnú vzdialenosť, čím vzniká priestor na pripojenie ďalších pozorovacích a mikromanipulačných techník.

Spojenie holografickej mikroskopie s mikromanipulačnými technikami by mohlo priniesť nové možnosti v oblasti skúmania medzibunkových interakcií štruktúr živých buniek, zostavených pomocou optickej pinzety z rôznych bunkových línii. Taktiež by takéto spojenie mohlo kvantitatívne fázovo zobrazovať, zachytávať a triediť bunky alebo baktérie rôznych tvarov, ktorých charakteristický rozmer je výrazne väčší ako rozmer optickej pasce.

Cieľom diplomovej práce je návrh, realizácia a otestovanie optickej pinzety pre koherenciou riadený holografický mikroskop druhej generácie (CCHM2). Požadované je, aby optická pinzeta tvorila samostatný modul pripojiteľný k CCHM2.

Prvá časť diplomovej práce je venovaná holografickej mikroskopii, kde je uvedená optická schéma a vysvetlený princíp fungovania CCHM2. V ďalšej časti je teoretický popis fungovania optickej pasce spolu s výpočtom síl v nej pôsobiacich, spôsoby merania tuhosti optickej pasce a princíp vytvorenia časovo zdielaných optických pascí. Celá kapitola 4 je venovaná návrhu optickej pinzety pre CCHM2. Súčasťou návrhu je simulácia a optimalizácia parametrov optického systému (časť 4.3), mechanický návrh a tvorba

¹Coherence-controlled holographic microscope.

1. ÚVOD

výrobnej dokumentácie (časť 4.4 a príloha), návrh prúdového zdroja na napájanie laserovej diódy (časť 4.5) umožňujúci kontrolovanie výstupného výkonu, ktorý je možné ovládať, rovnako ako uhol natočenia galvano-optických zrkadiel, riadiacou kartou pripojenou k PC, návrh justážného postupu (časť 4.6). Výsledky testovania optickej pinzety pre CCHM2 sú uvedené v časti 5.

Kapitola 2

Holografická mikroskopia

2.1. História interferenčnej a holografickej mikroskopie

V biologickej praxi sú vo veľkej mieri používané preparáty pripravené zo živých organizmov. Ide buď o celé organizmy, ich časti, orgány alebo v neposlednej rade o ich bunky. Klasická svetelná mikroskopia nie je schopná bunku, ak nie je prírodne alebo umelo nafarbená, kontrastne zobraziť. Väčšina častí bunky je tvorená vodnými roztokmi proteínov, tukov, cukrov, iontov a ďalších látok. Takéto roztoky sa vyznačujú vyšším indexom lomu ako voda, a preto sa bunka v klasickom mikroskope javí ako priečladná. Takéto objekty sa nazývajú fázové. Kvôli vyššiemu indexu lomu svetlo prechádzajúce fázovým objektom je fázovo oneskorené voči svetlu prechádzajúcemu okolo objektu. Preto boli vymyslené mikroskopové metódy ako využiť tohto javu, a tak získať obraz s fázovým kontrastom.

Medzi najznámejšie a najrozšírenejšie metódy kvalitatívneho merania OPD patrí Zernikov fázový kontrast, ktorý využíva fázovú doštičku vloženú v zadnej ohniskovej rovine objektívu, ktorá posunie fázu svetla rozptýleného vzorkou o $\pi/2$ oproti svetlu nerozptýlenému. Ďalšou rozšírenou metódou je Nomarského diferenciálny interferenčný kontrast (DIC), ktorý využíva rozdiel optických dráh, ktorý vzniká pri prechode dvoch priečne posunutých svetelných zväzkov vzorkou. Obe metódy umožňujú len kvalitatívne meranie OPD.

Interferenčná mikroskopia umožňuje pozorovanie fázových objektov tak, aby v pozorovanom obraze vznikal dostatočný kontrast a taktiež umožnila kavantitatívne meranie OPD. Zobrazenie fázových objektov je možné aj napriek tomu, že sú v nej používané rovnaké detektory ako v klasickej mikroskopii, teda citlivé na intenzitu - kvadrát amplitúdy svetla. Prvý krok k interferenčnej mikroskopii spravil Robert Hook v 17. storočí, keď pozorované farebné prúžky identifikoval ako interferenciu. Interferencia je jav, ktorý vyplýva z vlnovej podstaty svetla a je závislý na fázovom posune interferujúcich vĺn. Ako prvý využil interferenciu na zobrazovanie fázových objektov Sirk v roku 1893, keď popísal interferenčný mikroskop s oddeleným objektovým a referenčným ramenom¹. Krug, Lau a Horn vytvorili prvý komerčne vyrábaný interferenčný mikroskop v 50. rokoch

¹V roku 1898 Pringsheim publikoval veľmi podobný koncept bez toho aby vedel o Sirksovej práci, a preto je občas prvý interferenčný mikroskop označovaný ako Sirksov-Pringsheimov.

2. HOLOGRAFICKÁ MIKROSKOPIA

20. storočia. Išlo vlastne o dva vedľa seba stojace mikroskopy s rovnobežnými osami. Takéto usporiadanie umožňovalo kvantitatívne meranie zmeny optickej dráhy (OPD). Cena jednotlivých optických elementov, ktorá bola vysoká z dôvodu nutnosti vysokej presnosti pri ich výrobe, ako aj náročnosť spracovania obrazu a zložitosť usporiadania spôsobili, že rozšírenejšími sa stali iné metódy, ktoré umožňovali len kvalitatívne meranie OPD.

Skutočný potenciál interferenčnej mikroskopie sa ukázal po objavení laseru v roku 1960 a rozvoji výpočtovej techniky na konci 20. storočia. Interferenčné mikroskopy je možné rozdeliť do dvoch kategórii podľa uhlu, pod ktorým interferujú objektový a referenčný zväzok, na in-line a off-axis mikroskopy.

Pri in-line mikroskopoch, ktoré sú označované ako interferenčné mikroskopy, referenčný a objektový lúč spolu vo výstupnej rovine zvierajú nulový alebo takmer nulový uhol. Takéto usporiadanie umožňuje využitie nekoherentného zdroja svetla, čím je odstránená koherentná zrnotosť, a taktiež umožňuje vytváranie optických rezov. Nevýhodou takého usporiadania je nutnosť zaznamenať aspoň tri snímky s rôznym fázovým posunom na zrekonštruovanie objektovej vlny - amplitúdy a fázy. To znemožňuje použiť tieto mikroskopy na pozorovanie rýchlo sa meniacich objektov a aj fluktuácie a vibrácie prostredia medzi jednotlivými snímkami vnášajú do zobrazenia šum.

V off-axis mikroskopoch, ktoré sa označujú ako holografické², objektový a referenčný lúč spolu interferujú pod nenulovým uhlom, ktorý je volený tak, aby zaznamenaný interferogram bol hologramom. To znamená, že objektovú vlnu je možné rekonštruovať z jedného snímku. Väčšina holografických mikroskopov nevyužíva achromatický interferometer, čo vedie k nutnosti použitia koherentného zdroja svetla a tým k vzniku koherentného šumu.

V holografických mikroskopoch je možné využiť aj také usporiadanie, kde interferometer je achromatický, a tak dosiahnuť spojenie výhod in-line a off-axis mikroskopov.

Prínos in-line a off-axis mikroskopov v biológií je možnosť z ich fázového kontrastu, získať informácie o rozložení hmoty v bunke ([1]), čo prináša nové možnosti pri pozorovaní buniek, napr. interakcia živej bunky s okolím (reakcia na toxické látky, interakcia medzi bunkami) v súvislosti s rozložením ich hmoty.

2.2. Koherenciou riadený holografický mikroskop druhéj generácie

Vývoj off-axis holografických mikroskopov na VUT v Brne sa odvíja od práce pánov Chmelíka a Harny, ktorá bola publikovaná v roku 1999 v článku [2]. V roku 2010 bola publikovaná prvá generácia koherenciou riadeného holografického mikroskopu (CCHM1³) v článku [3]. Od roku 2009 prebieha vývoj druhej generácie koherenciou riadeného holografického mikroskopu, ktorá bola popísaná v článku [4]. CCHM2 oproti predchádzajúcej generácii prináša viacero zlepšení, ako možnosť pripojenia ďalších pozorovacích a manipulačných techník, zjednodušená procedúra pri výmene objektívov, zväčšenie priestoru

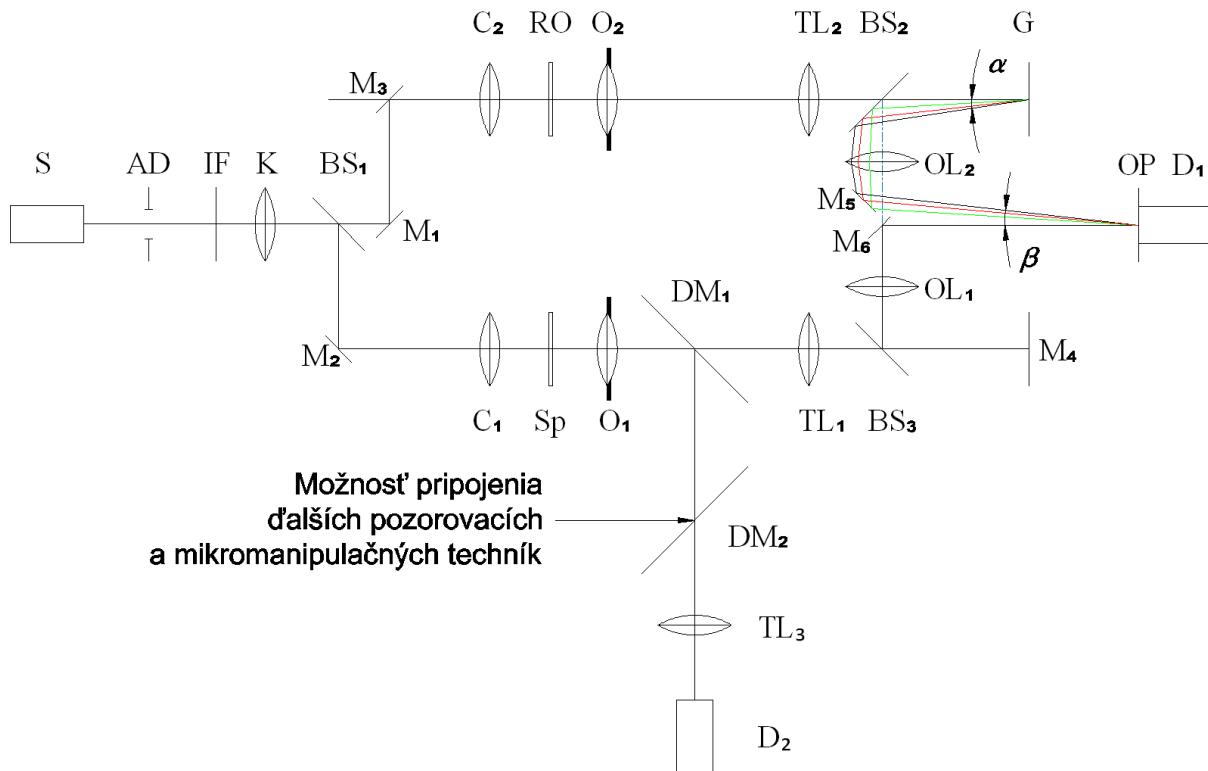
²Holografia bola objavená v roku 1947 a jej názov vznikol z gréckych slov holos = celý a grafó = kreslím.

³Coherence-controlled holographic microscope first generation.

2.2. KOHERENCIOU RIADENÝ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP DRUHEJ GENERÁCIE

medzi kondenzormi a objektívmi, ako aj medzi ramenami interferometra, čo uľahčuje manipuláciu so vzorkami, a justáž sa zjednodušila do takej miery, že sa pracuje na jej automatizácií.

Základom CCHM2 je off-axis interferometer využívajúci difrakčnú mriežku. Interferometer je navrhnutý tak, aby časť s difrakčnou mriežkou bola oddelená od ostatných častí mikroskopu. Výhodou off-axis usporiadania oproti in-line usporiadaniu je, že priestorová frekvencia interferenčných prúzkov je dostatočne vysoká na to, aby mohla byť objektová vlna zrekonštruovaná z jedného snímku, t.j. vzniká hologram. Z toho vyplýva, že rýchlosť zobrazovania je limitovaná iba záznamovou technikou (CCD kamera) a rýchlosťou spracovania hologramu (softvér). Vďaka achromatickému interferometru je možné použiť svetlo s rôznym stupňom časovej a priestorovej koherencie, a tak meniť charakteristické vlastnosti zobrazovania tak, aby čo najviac vyhovovali požiadavkám pri pozorovaní. To taktiež znamená odstránenie koherentného šumu a náhodných interferencií vzniknutých pri prechode optickou sústavou, ktorým trpí zobrazenie v klasických digitálnych holografických mikroskopoch. Optická schéma CCHM2 je zobrazená na obrázku 2.1.



Obr. 2.1: Schéma druhej generácie koherenciou riadeného holografického mikroskopu. S - zdroj svetla, AD - apertúrna clona, IF - interferenčný filter, K - kolektor, BS - deliče, M - zrkadlá, C - kondenzory, O - objektívy, Sp - pozorovaný objekt, RO - referenčný objekt, TL - tubusové šošovky, OL - výstupné šošovky, OP - výstupná rovina, D - detektory, α - uhol odrazu difraktovaného lúča vzhľadom k ose interferometru, β - uhol, pod ktorým difraktovaný lúč vstupuje do výstupnej roviny OP. Prevzaté a upravené z [5].

2. HOLOGRAFICKÁ MIKROSKOPIA

Osvetľovacia časť CCHM2 je tvorená zdrojom svetla (S), ktorým môže byť halogénová lampa alebo vysokotlaková výbojka, apertúrnou clonou (AD), pomocou ktorej je kontrolovaná priestorová koherencia svetla, vymeniteľným interferenčným filtrom (IF), ktorým je kontrolovaná časová koherencia svetla. Rovnomerné osvetlenie pozorovanej vzorky (SP) v objektovom ramene a referenčného objektu (RO) v referenčnom ramene je zaistené tzv. Köhlerovým osvetlením. To znamená, že zdroj svetla je zobrazený kolektorom (K) do predmetovej ohniskovej roviny kondenzoru (C). Rozdelenie svetla na objektový resp. referenčný lúč je realizované pomocou deliča zväzkov (BS₁) a systémom zrkadiel (M₁-M₃) je svetlo zavedené do objektového a referenčného ramena.

Pozorovaná vzorka a referenčný objekt sú pozorované dvomi mikroskopovými systémami využívajúcimi mikroskopové objektívy korigované na nekonečnú vzdialenosť (O) spolu s tubusovými šošovkami (TL). Do priestoru medzi mikroskopovým objektívom O₁ a tubusovou šošovkou TL₁ je zavedená kamera D₂, na ktorú je zobrazený obraz vzorky v svetle poli tubusovou šošovkou TL₃. Pomocou dichroického zrkadla DM₂ je možné pripojenie ďalších pozorovacích a manipulačných techník, ako epifluorescencia, Ramanovská spektroskopia alebo optická pinzeta. Taktiež je možné CCHM2 zmeniť z transmisného na reflexný mikroskop, zavedením osvetľovača medzi mikroskopovými objektívmi a tubusovými šošovkami.

Zostatok zobrazovacej časti CCHM2 je zložený z difrakčnej mriežky (DG), deličov zväzkov (BS₂ a BS₃), výstupných šošoviek (OL₁ a OL₂) a systému zrkadiel (M₄ a M₆), ktorý zaručuje správne prekrytie interferujúcich zväzkov vo výstupnej rovine mikroskopu. Výsledný hologram vzniká vo výstupnej rovine mikroskopu interferenciou svetla z prvého difrakčného rádu vytvoreného v referenčnom ramene a nultého difrakčného rádu vytvoreného v objektovom ramene. Pre dosiahnutie maximálne možnej hodnoty kontrastu interferenčných prúžkov vo výstupnej rovine sú všetky ostatné difrakčné rády z referenčného ramena odstranené, a aby bolo zachované čo možno najviac z dopadajúceho svetla, je použitá blejzovaná difrakčná mriežka. Pri použití polychromatického zdroja svetla je nutné zabezpečiť, aby všetky vlnové dĺžky vytvárali interferenčnú štruktúru s rovnakou priestorovou frekvenciou, inak by sa interferenčné prúžky vytvorené rôznymi frekvenciami prekrývali a nevytvorili by hologram, ale šedé pole. Preto je v CCHM2 použitý princíp achromatického interferometra, ktorý bol popísaný v [6]. Pomocou difrakčnej mriežky je možné docieliť, aby všetky frekvencie svetla vytvárali interferenčné prúžky s rovnakou priestorovou frekvenciou, a tým vytvorili hologram. Interferenčné prúžky sú rovnobežné so štruktúrou difrakčnej mriežky. Difrakčná mriežka je umiestnená v obrazovej rovine referenčného ramena, takže je zobrazená do výstupnej roviny (OP).

Rozloženie intenzity hologramu vo výstupnej rovine je dané vzťahom:

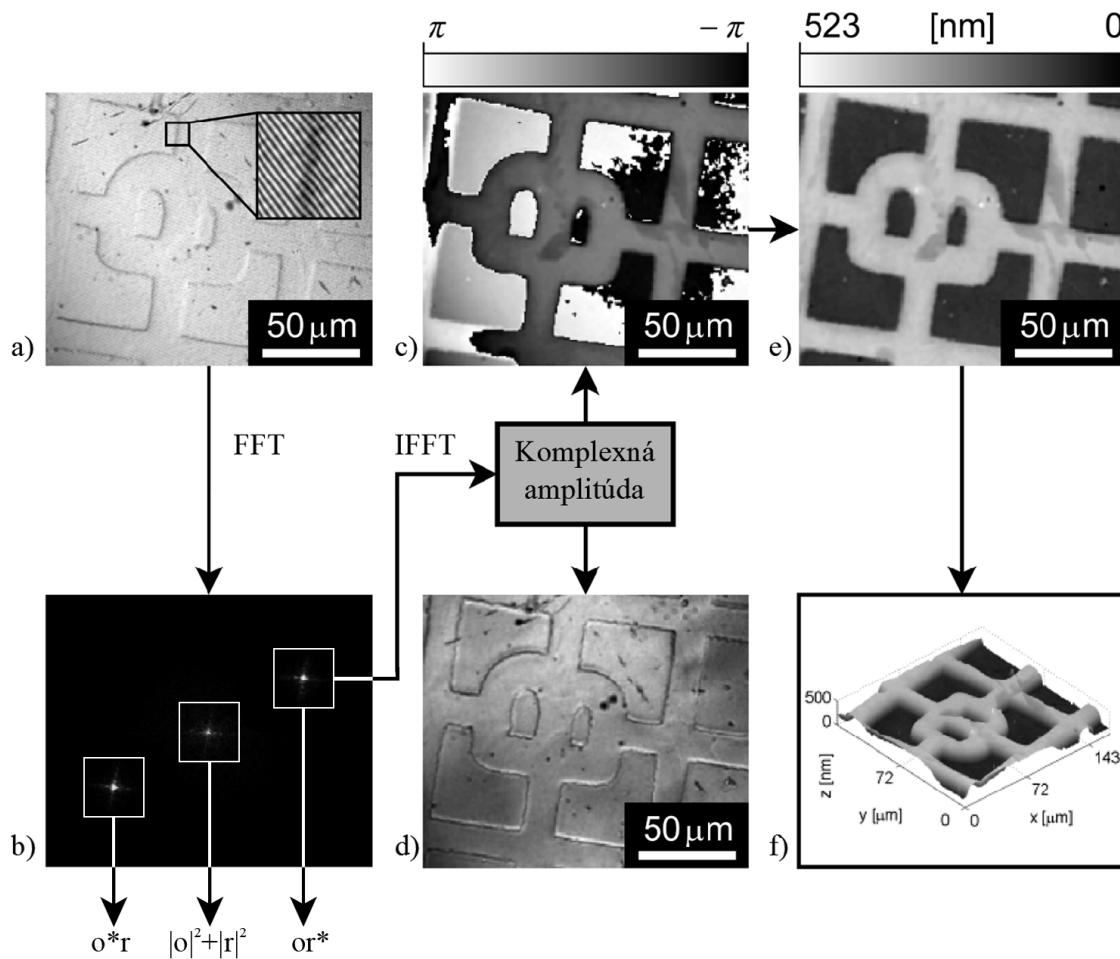
$$\begin{aligned} i_{x,y} &= |o_{x,y} + r_{x,y}|^2 = \\ &= |o|^2 + |r|^2 + or^* + o^*r, \end{aligned} \quad (2.1)$$

kde $o_{x,y}$ je komplexná amplitúda objektovej vlny vo výstupnej rovine, $r_{x,y}$ je komplexná amplitúda referenčnej vlny vo výstupnej rovine, $*$ označuje komplexne združené členy a x, y tvoria ortogonálny systém súradníc vo výstupnej rovine. Prvé dva členy v druhom riadku odpovedajú intenzite objektovej a referenčnej vlny. V spektri priestorových

2.2. KOHERENCIOU RIADENÝ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP DRUHEJ GENERÁCIE

frekvencií hologramu vytvárajú tzv. autokorelačné spektrum. Každý z členov or^* -obrazový člen a o^*r -komplexne združený obrazový člen, je možné využiť pre rekonštrukciu amplitúdy a fáze.

Schematické znázornenie spracovania obrazu je uvedené na obrázku 2.2. Zo zaznamenaného hologramu (2.2a) je pomocou 2D Fourierovej transformácie získané spektrum priestorových frekvencií (2.2b). Na výrez okolo obrazového člena je aplikovaná spätná Fourierova transformácia, a tým je získaná komplexná amplitúda, z ktorej je možné dosať fázový obraz (2.2c), ktorý odpovedá imaginárnej časti komplexnej amplitúdy a intenzitný (2.2d) obraz, ktorý odpovedá reálnej časti komplexnej amplitúdy. Vzhľadom k tomu, že hodnoty vo fázovom obraze odpovedajú hodnotám zmeny fáze v rozsahu $\langle -\pi; \pi \rangle$ je nutné obraz upraviť a fázu tzv. „naviazať“. Z obrazu s „naviazanou“ fázou je možné vytvoriť 3D obraz pozorovanej vzorky.



Obr. 2.2: Grafické znázornenie rekonštrukcie obrazovej vlny. a) Zaznamenaný hologram s detailom interferenčnej štruktúry. b) Spektrum priestorových frekvencií odpovedajúce rovnici 2.1. c) Fázový obraz. d) Amplitúdový obraz. e) Fázový obraz s naviazanou fázou. f) 3D rekonštrukcia obrazu. FFT-rýchla Fourierova transformácia, IFFT-spätná rýchla Fourierova transformácia. Prevzaté a upravené z [4].

Kapitola 3

Optická pinzeta

3.1. História optickej pasce a optickej pinzety

Na presnú manipuláciu s objektmi, ktorých rozmery sú v rozsahu od desiatok nanometrov až po desiatky mikrometrov, je možné použiť svetlo. Nástroj, ktorý využíva mechanické účinky svetla na manipuláciu s objektmi, sa nazýva optická pinzeta. Ako prvý na mechanické účinky svetla poukázal nemecký astronóm Johannes Kepler v prvej polovici 17. storočia, keď navrhol, že dôvod prečo chvost kométy smeruje od slnka je radiačný tlak žiarenia zo slnka. V roku 1873 James Clerk Maxwell v teórií elektromagnetizmu odvodil, že svetlo samo môže vyvolať radiačný tlak. Prvé experimenty, ktoré preukazovali radiačný tlak žiarenia, zostavili v roku 1901 páni E. F. Nichols, G. F. Hull¹ a P.N. Lebedev ([7]).

Skutočný potenciál mechanických účinkov žiarenia sa ukázal až v druhej polovici 20. storočia po objavení laseru. Priekopníkom v tejto oblasti sa stal Arthur Ashkin z AT&T Bellových laboratórií. Ako prvý experimentálne ukázal, že optické sily môžu pohnúť poprípade levitovať častice s mikrometrovými rozmermi ([8], [9], [10]). Taktiež ako prvý prišiel s myšlienkou vytvorenia optickej pasce pomocou silne fokusovaného laserového zväzku, ktorú publikoval v roku 1978 ([11]). Optická pasca bola navrhnutá na zachytenie atómov. V článku [12] ukázal, že v optickej pasci je možné zachytiť aj Rayleighgo² a Mieho³ častice.

Využitie optickej pinzety sa rozšírilo do mnohých vedných odborov. Častou aplikáciou v biológií je štúdium molekulárnych motorov ([13]), enzýmov nukleových kyselín, mechanických vlastností mikrotubulov, aktinových vláken, DNA, manipulácia so subbunečnými štruktúrami ([14], [15]). Optická pinzeta našla svoje uplatnenie aj pri štúdiu koloidných roztokov ([16]), mezoskopických systémov a mechanických vlastností polymérov ([17]) a biopolymérov ([18]). Pánom S. Chuovi, C. Cohen-Tannoudjiovi and W. D. Phillipsovi bola udelená v roku 1997 Nobelova cena za fyziku za vytvorenie metódy na chladenie a zachytenie atómov pomocou laseru⁴.

¹Experiment je známy ako svetelný mlyn (z angl. light mill).

²Častica, ktorej rozmer je výrazne menší ako vlnová dĺžka použitého žiarenia.

³Častica, ktorej rozmer je porovnateľný s vlnovou dĺžkou dopadajúceho žiarenia.

⁴Podarilo sa im dosiahnuť teplotu $0,18 \mu\text{K}$.

3.2. PRINCÍP FUNGOVANIA A SILY PÔSOBIACE V OPTICKEJ PASCI

3.2. Princíp fungovania a sily pôsobiace v optickej pasci

Veľkosť radiačného tlaku žiarenia je možné odhadnúť jednoduchou úvahou. Hybnosť fotónu je daná vzťahom $h\nu/c$, kde h je Planckova konšanta, ν je frekvencia fotónu a c je rýchlosť svetla. Zdroj žiarenia s výkonom P vyprodukuje $P/h\nu$ fotónov za jednu sekundu. V situácii keď všetky fotóny zo zdroja dopadajú na objekt a odrážajú sa od neho priamo naspäť je zmena hybnosti fotónov daná výrazom $(2P/h\nu)(h\nu/c) = 2P/c$. Podľa druhého Newtonovho zákona je zmena hybnosti spojená so silou, a preto pri použití zdroja s výkonom 1 W je na objekt v dôsledku tretieho Newtonovho zákona vyvíjaná na objekt sila približne 10 nN, čo sa môže javiť ako malá sila, ktorá však dokáže značne ovplyvniť mikročastice. Závislosť zrýchlenia udeleného guľovej časticie s hustotou 1 g/cm³ pôsobením zdroja s výkonom 1 W na polomere častice je uvedená v tabuľke 3.1. Pri výpočte bol uvažovaný model kedy sa všetky fotóny odrazia od častice priamo naspäť. Úvaha bola prevzatá z [19].

Tabuľka 3.1: Závislosť zrýchlenia udeleného guľovej časticie s hustotou 1 g/cm³ pôsobením zdroja s výkonom 1 W na polomere častice. $g = 9,81 \text{ m/s}^{-2}$.

Polomer častice [mm]	100	10	1	0,1	0,01	0,001
Zrýchlenie častice [m/s ⁻²]	$10^{-4} \times g$	$10^{-1} \times g$	$10^2 \times g$	$10^5 \times g$	$10^8 \times g$	$10^{11} \times g$

Na vytvorenie stabilnej optickej pasce v troch rozmeroch je nutné aby optické sily, ktoré udržiavajú zachytenú časticu v optickej pasci, boli väčšie ako sily, ktoré ju nútia ju opustiť. To je možné dosiahnuť vytvorením značného gradientu intenzity žiarenia, ktorý je možné vytvoriť viacerými spôsobmi, napríklad fokusovaním laserového zväzku pomocou šošoviek ([20]), vytvorením stojatej vlny využitím priamej a odrazenej svetelnej vlny ([21], [22], [23], [24], [25]) alebo využitím laserového lúča, ktorého radiálny profil intenzity je daný Besselovou funkciou ([26], [27]).

Najrozšírenejšou variantou vytvárania optických pascí je fokusovanie laserového žiarenia pomocou mikroskopového objektívov do difrakčne limitovanej veľkosti stopy. Pre dosiahnutie čo najväčšieho gradientu intenzity sa využívajú imerzné objektívy, ktorých numerická apertúra (NA) presahuje hodnotu 1.

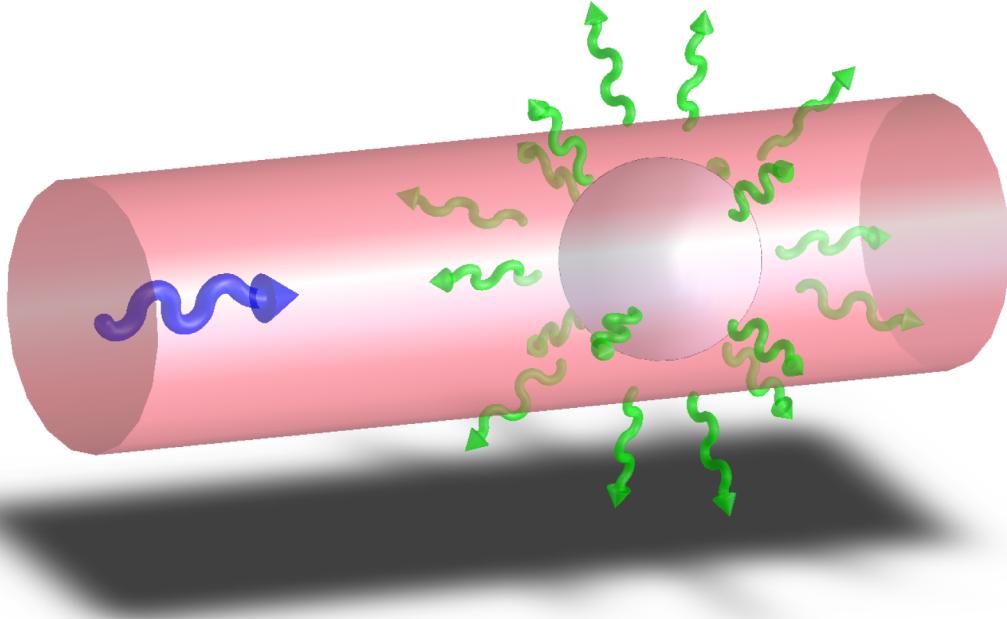
Častou aplikáciou laserových pinziat je meranie síl v rádoch 10^{-12}N . Pre dosiahnutie správnych výsledkov merania je nutné optickú pinzetu kalibrovať. Na kalibráciu sa využíva Stokesov zákon so zložitými okrajovými podmienkami, čo vedie k značným odchýlkam vo výsledkoch. Tento problém je možné odstrániť výpočtom síl pôsobiacich v optickej pasci.

3.2.1. Aproximácie síl v optickej pasci pomocou Rayleighovo rozptylu

Ak rozmer zachyteného dielektrického objektu splňuje podmienky Rayleigh rozptylu - charakteristický rozmer je oveľa menší ako vlnová dĺžka dopadajúceho žiarenia, je možné považovať elektromagnetické pole v mieste objektu za uniformné a zachytený objekt nahradí indukovaným bodovým dipólom.

3. OPTICKÁ PINZETA

Bodový dipól umiestnený v oscilujúcim elektromagnetickom poli žiari. Absorciou a následným vyžiareniom svetla dipólovom na neho pôsobí sila v smere dopadajúceho žiarenia, ktorá je označovaná ako rozptylová sila. Táto sila je úmerná intenzite dopadajúceho žiarenia. Schematické znázornenie rozptylovej sily je zobrazené na obrázku 3.1.



Obr. 3.1: Schematické znázornenie rozptylovej sily. Svetlo dopadajúce na časticu z jedného smeru je následne rozptýlené všetkými smermi, tým fotóny menia hybnosť dielektrickej častice. V izotropnom prostredí po vektorovom sčítaní hybností rozptýlených fotónov ostane nenulová len hybnosť v smere dopadajúceho žiarenia.

Veľkosť rozptylovej sily je daná vzťahom:

$$F_{\text{rozp}} = \frac{I_0 \sigma n_m}{c}, \quad (3.1)$$

kde I_0 je intenzita dopadajúceho svetla, σ je rozptylový prierez objektu, n_m je index lomu okolitého prostredia a c je rýchlosť svetla vo vákuu.

Rozptylový prierez pre guľový objekt je daný vzťahom:

$$\sigma = \frac{128\pi^5 a^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2, \quad (3.2)$$

kde a je polomer častice, λ je vlnová dĺžka dopadajúceho žiarenia a m je pomer indexov lomu objektu a okolitého prostredia ($m = n_{\text{obj}}/n_{\text{okolie}}$).

V nehomogénnom elektromagnetickom poli sa potenciálna energia dipólu mení v priestore v závislosti na gradiente pola. Sila vyvolaná nehomogénym polom je označovaná ako gradientná, je úmerná gradiéntu intenzity žiarenia a má jeho smer, ak $m > 1$. Na dipól v nehomogénnom poli pôsobí sila, ktorá je daná vzťahom $\mathbf{F} = -\nabla W_p$, kde W_p je potenciálna energia dipólu, pre ktorú platí: $W_p = -\mathbf{p}\mathbf{E}$, kde \mathbf{p} je dipólový moment

3.2. PRINCÍP FUNGOVANIA A SILY PÔSOBIACE V OPTICKEJ PASCI

a \mathbf{E} je vektor elektrickej intenzity. Časovo-stredovaná veľkosť gradientnej sily je daná vzťahom:

$$F_{\text{grad}} = \frac{2\pi\alpha}{cn_m^2} \nabla I_0, \quad (3.3)$$

kde α je polarizovatelnosť.

Polarizovatelnosť pre guľový objekt je daná vzťahom:

$$\alpha = n_m^2 a^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right). \quad (3.4)$$

Ak je objekt umiestnený v kolimovanom alebo mierne konvergentnom zväzku, prevažuje rozptylová sila, čo má za následok pohyb častice v smere žiarenia. Pri žiarenií, ktoré je silne konvergentné, dominuje gradientná sila, čo má za následok vytvorenie optickej pasce.

3.2.2. Aproximácie síl v optickej pasci pomocou geometrickej optiky

Pre výpočet síl pôsobiacich na časticu umiestnenú v jednozväzkovej gradientnej optickej pasci je možné použiť aproximačiu geometrickej optiky, ak je častica výrazne väčšia, ako vlnová dĺžka použitého laseru.

Dopadajúci laserový zväzok je možné, v rámci aproximačie, rozložiť na jednotlivé lúče, kde každý nesie hybnosť za jednu sekundu o veľkosti $n_m P/c$. Lúč sa pri dopade na časticu z časti láme a z časti odráža, čím sa mení jeho hybnosť a tým je budená sila. Celková sila pôsobiaca na časticu je daná ako suma odrazeného lúča s výkonom PR a nekonečného počtu lomených lúčov s výkonom $PT^2, PT^2R, \dots, PT^2R^n$, kde R a T sú Fresnelové koeficienty odrazu, resp. prechodu na rozhraní medzi časticou a okolím pri príslušnom uhle a polarizácii.

Presné vyjadrenie celkovej sily, ktorou pôsobí jeden lúč na guľovú dielektrickú časticu umiestnenú v optickej pasci popísal A. Ashkin v [28].

Pre rozptylovú silu odvodil vzťah:

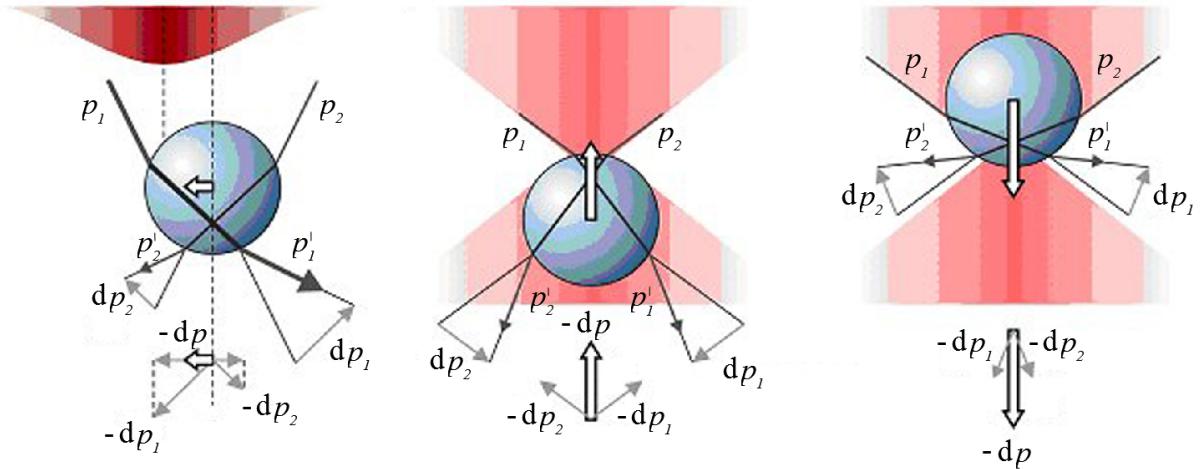
$$F_{\text{rozp}} = \frac{n_m P}{c} \left\{ 1 + R \cos 2\theta - \frac{T^2 [\cos(2\theta - 2\vartheta) + R \cos 2\theta]}{1 + R^2 + 2R \cos 2\vartheta} \right\}, \quad (3.5)$$

kde P je výkon laserového zväzku dopadajúceho na časticu, θ a ϑ sú uhly dopadu resp. lomu lúča na časticu.

Pre gradientnú silu odvodil vzťah:

$$F_{\text{grad}} = \frac{n_m P}{c} \left\{ R \sin 2\theta - \frac{T^2 [\sin(2\theta - 2\vartheta) + R \sin 2\theta]}{1 + R^2 + 2R \cos 2\vartheta} \right\}, \quad (3.6)$$

Celkovú silu je možné vypočítať ako vektorovú sumu rozptylovej a gradientnej sily od jednotlivých lúčov zväzku. Schematické znázornenie síl pôsobiacich na transparentnú časticu od dvojice lúčov je zobrazené na obrázku 3.2.



Obr. 3.2: Schematické znázornenie sôl pôsobiacich na transparentnú časticu od dvojice lúčov. p je hybnosť dopadajúceho lúča, p' je hybnosť lúča po prechode časticou, dp je zmena hybnosti lúča, ktorá vznikla prechodom časticou. Biela šípka znázorňuje smer výslednej sily pôsobiacej na časticu. Prevzaté a upravené z [29].

3.2.3. Obecné vyjadrenie sôl v optickej pasci

Pri popise sôl pôsobiacich na zachytenú časticu, ktorej charakteristický rozmer je porovnateľný s vlnovou dĺžkou laseru ($a \simeq \lambda$), nie je možné zanedbať javy spôsobené difrakciou. Takéto rozmery majú typické biologické vzorky, ich rozmery sa pohybujú približne medzi $0,2 \mu\text{m}$ a $5 \mu\text{m}$. Pre silne fokusované zväzky je nutné uvažovať aj vektorový tvar elektromagnetického pola. Tieto skutočnosti robia výpočet sôl v optickej pasci pre častice s $a \simeq \lambda$ veľmi komplikovaný.

Pre výpočet sôl pôsobiacich v optickej pasci v článkoch [30] a [31] je použitá near-paraxial approximácia. Táto approximácia vyžaduje malé uhly zbiehania zväzku, čo pri optickej pasciach nie je splnené, a preto výsledky plynúce z výpočtov nie sú v zhode s experimentom. Na túto nezrovnalosť upozornil Block a Svoboda v článku [32]. Riešenie platné pre laserový zväzok fokusovaný pomocou mikroskopového objektívu s vysokou numerickou apertúrou bolo popísané v článku [33].

Silu vyvolanú elektromagnetickým žiareniom je možné vyjadriť pomocou Maxwellovho tenzoru napäcia v tvare:

$$\mathbf{F} = \lim_{r \rightarrow \infty} \left[-\frac{1}{2} r \int_{S(r)} d\Omega \mathbf{r} (\epsilon E^2 + \mu_0 H^2) \right], \quad (3.7)$$

kde povrch $S(r)$ obopína časticu a kvôli zákonu zachovania hybnosti je možné tento povrch brať v nekonečne, \mathbf{r} je jednotkový vektor v smere normály k povrchu S , s orientáciou smerom von z plochy. Vektor intenzity elektrického pola \mathbf{E} je daný súčtom dopadajúceho elektrického pola \mathbf{E}_{in} a vektoru intenzity rozptýleného elektrického pola \mathbf{E}_s ($\mathbf{E} = \mathbf{E}_{\text{in}} + \mathbf{E}_s$). Obdobne pre vektor intenzity magnetického pola.

3.2. PRINCÍP FUNGOVANIA A SILY PÔSOBIACE V OPTICKEJ PASCI

Odvodenie popísané v [33] vychádza z integrálu Debyeovho typu reprezentujúceho laserový zväzok ako superpozíciu rovinných vln, ako navrhli Richards & Wolf (1959). Pri použití ľavotočivej orientácie polarizácie je možné silne fokusovaný zväzok vyjadriť ako:

$$\begin{aligned} \mathbf{E}_{\text{in}}(\mathbf{r}) = E_0 \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\theta_0} d\theta \sin \theta \sqrt{\cos \theta} \exp(-\gamma^2 \sin^2 \theta) \\ \times \exp[i\mathbf{k}(\mathbf{r} + \mathbf{R})]\hat{\epsilon}(\theta, \phi) \exp(-i\omega t), \quad (3.8) \end{aligned}$$

kde uhol θ udáva smer danej rovinnej vlny, k je vlnové číslo dané ako $k = |\mathbf{k}(\theta, \phi)| = n_m \omega / c$, n_m je index lomu obklopujúceho prostredia, $\omega = 2\pi/\lambda_0$, λ_0 je vlnová dĺžka použitého laseru vo vákuu, c je rýchlosť svetla, $\hat{\epsilon}(\theta, \phi) = \hat{\mathbf{x}}' + i\hat{\mathbf{y}}'$, $\hat{\mathbf{x}}'$, $\hat{\mathbf{y}}'$ sú jednotkové vektori získané z $\hat{\mathbf{x}}$ resp. $\hat{\mathbf{y}}$, $\gamma = f/w$, f je ohnisková vzdialenosť použitého mikroskopového objektív a w stred laserového zväzku. Ohnisko mikroskopového objektív sa nachádza v $\mathbf{r} = -\mathbf{R}$.

Rozptýlené elektrické a magnetické pole \mathbf{E}_s a \mathbf{H}_s odpovedá Mieho rade parciálnych vln a výsledné rozptýlené pole je lineárna kombinácia Mieho komponentov. Mieho komponenty sú dané Mieho koeficientmi a_j a b_j , ktoré sú úmerné amplitúdam rozptýlených elektrických a magnetických multipólových vln.

Po zavedení bezrozmernej sily \mathbf{Q} , ktorá vyjadruje ako efektívne je prenášaná dostupná hybnosť na časticu, ktorú definoval Ashkin (1992) ako:

$$\mathbf{Q} = \frac{\mathbf{F}}{n_m P / c}, \quad (3.9)$$

kde P je výkon laseru v mieste vzorky. Je možné výslednú silu vyjadriť ako:

$$\mathbf{Q} = \mathbf{Q}_s + \mathbf{Q}_e, \quad (3.10)$$

kde \mathbf{Q}_e vyjadruje pomer, s ktorým je odoberaná hybnosť z dopadajúceho zväzku, je spojený s $\mathbf{E}_{\text{in}} \cdot \mathbf{E}_s$ resp. $\mathbf{H}_{\text{in}} \cdot \mathbf{H}_s$ a pomer, s ktorým rozptýleného žiarenia berie hybnosť udáva $-\mathbf{Q}_s$, spojený s E_s^2 a H_s^2 .

Osové komponenty bezrozmernej sily \mathbf{Q} sú podľa [33] dané vzťahmi:

$$\begin{aligned} Q_{sz} = -\frac{8\gamma^2}{A} \Re \left[\sum_{j=1}^{\infty} \sum_{m=-j}^j \frac{\sqrt{j(j+2)(j-m+1)(j+m+1)}}{j+1} \right. \\ \left. \times (a_j a_{j+1}^* + b_j b_{j+1}^*) G_{j,m} G_{j+1,m}^* + \frac{2j+1}{j(j+1)} m a_j b_j^* |G_{j,m}|^2 \right], \quad (3.11) \end{aligned}$$

$$Q_{ez} = \frac{4\gamma^2}{A} \Re \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{m=-j}^j (2j+1)(a_j + b_j) G_{j,m} (G'_{j,m})^*, \quad (3.12)$$

3. OPTICKÁ PINZETA

kde j súvisí s vlastnými hodnotami momentu hybnosti J^2 (vlastné hodnoty sú $j(j+1)$) a $G_{j,m}$ a $G'_{j,m}$ sú multipólové koeficienty fokusovaného dopadajúceho laserového zväzku, ktoré sú dané vzťahmi:

$$G_{j,m}(\rho_R, z_R) = \int_0^{\theta_0} d\theta \sin \theta \sqrt{\cos \theta} \exp(-\gamma^2 \sin^2 \theta) d_{m,1}^j(\theta) J_{m-1}(k\rho_R \sin \theta) \exp(ikz_R \cos \theta), \quad (3.13)$$

$$G'_{j,m}(\rho_R, z_R) = -i \frac{\partial G_{j,m}}{\partial (kz_R)}, \quad (3.14)$$

kde $d_{m,m'}^j(\theta)$ sú elementy matice konečnej rotácie (Edmonds 1957) a J_m sú Besselové funkcie.

Priečne komponenty bezrozmernej sily \mathbf{Q} sú podľa [33] dané vzťahmi:

$$\begin{aligned} Q_{s\rho} &= 4 \frac{\gamma^2}{A} \Im \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{m=-j}^j \left\{ \frac{\sqrt{j(j+2)(j+m+1)(j+m+2)}}{j+1} \right. \\ &\quad \times \left[(a_j a_{j+1}^* + b_j b_{j+1}^*) (G_{j,m} G_{j+1,m+1}^* + G_{j,-m} (G_{j+1,-m-1})^*) \right] \\ &\quad \left. - 2 \frac{2j+1}{j(j+1)} \sqrt{(j-m)(j+m+1)} \Re(a_j b_j^*) G_{j,m} G_{j,m+1}^* \right\}, \quad (3.15) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Q_{s\varphi} &= 4 \frac{\gamma^2}{A} \Re \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{m=-j}^j \left\{ \frac{\sqrt{j(j+2)(j+m+1)(j+m+2)}}{j+1} \right. \\ &\quad \times \left[(a_j a_{j+1}^* + b_j b_{j+1}^*) (G_{j,m} G_{j+1,m+1}^* + G_{j,-m} (G_{j+1,-m-1})^*) \right] \\ &\quad \left. - 2 \frac{2j+1}{j(j+1)} \sqrt{(j-m)(j+m+1)} \Re(a_j b_j^*) G_{j,m} G_{j,m+1}^* \right\} \quad (3.16) \end{aligned}$$

a

$$Q_{e\rho} = 2 \frac{\gamma^2}{A} \Im \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{m=-j}^j (2j+1) [(a_j + b_j) G_{j,m} (G_{j,m+1}^- - G_{j,m-1}^+)^*], \quad (3.17)$$

$$Q_{e\varphi} = 2 \frac{\gamma^2}{A} \Re \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{m=-j}^j (2j+1) [(a_j + b_j) G_{j,m} (G_{j,m+1}^- - G_{j,m-1}^+)^*], \quad (3.18)$$

kde

$$\begin{aligned} G_{j,m}^{\pm}(\rho_R, z_R) &= \int_0^{\theta_0} d\theta \sin^2 \theta \sqrt{\cos \theta} \exp(-\gamma^2 \sin^2 \theta) \\ &\quad d_{m\pm 1,1}^j(\theta) J_{m-1}(k\rho_R \sin \theta) \exp(ikz_R \cos \theta). \quad (3.19) \end{aligned}$$

Ako kontrolu správnosti odvodnených rovníc autori v článku [33] uvádzajú ich limitu pre prípad $a \gg \lambda$, kde sa výsledky zhodujú s výsledkami danými geometrickou optikou.

3.2. PRINCÍP FUNGOVANIA A SILY PÔSOBIACE V OPTICKEJ PASCI

3.2.4. Experimentálne meranie sín v optickej pasci

Aby mohla byť optická pasca použitá na meranie sín, je nutné ju nakalibrovať - určiť tuhost' optickej pasce. Jedni z metód kalibrácie optických pascí sú metódy viskózneho ľahu a ekipartičného teorému. Obe metódy boli popísané v [34].

Metóda viskózneho ľahu: Sily v optickej pasci je možné approximovať závislošťou, kde sila pôsobiaca na uväznenú časticu je priamo úmerná vzdialenosť stredu danej častice od ohniska laserového zväzku. Závislosť je možné vyjadriť v tvare:

$$\mathbf{F} = -k\mathbf{x}, \quad (3.20)$$

kde k je označovaná ako tuhost' optickej pasce a \mathbf{x} je vzdialenosť stredu častice od ohniska laserového zväzku. Pri známej hodnote k je možné silu pôsobiacu na časticu určiť priamo meraním pozicie častice vzhľadom k ohnisku zväzku.

Metóda viskózneho ľahu využíva známu silu, ktorú budí prúdiaca kvapalina na objekt. Pre časticu tvaru gule je viskózna sila daná vzťahom:

$$\mathbf{F}_{\text{vis}} = 6\pi\eta r\mathbf{v}, \quad (3.21)$$

kde η je viskozita kvapaliny, r je polomer častice a \mathbf{v} je rýchlosť prúdenia kvapaliny vzhľadom k častici.

Okolo častice so známym rozmerom necháme prúdiť kvapalinu s konštantnou rýchlosťou. Z pozorovania určíme výchylku častice v optickej pasci (\mathbf{x}), ktorú spôsobí viskózna sila. Optickú pascu vypneme a zo záznamu pohybu častice určíme rýchlosť prúdenia kvapaliny. Pri známej hodnote viskozity kvapaliny je z nameraných údajov možné určiť tuhost' optickej pasce k .

Druhým variantom určovania veľkosti \mathbf{F}_{vis} je nechať prostredie stále a pomocou optickej pinzety oscilovať s časticou, takže jej poloha sa periodicky mení v čase a je ju možné vyjadriť ako:

$$x = x_0 \sin(\omega t). \quad (3.22)$$

Derivovaním vzťahu 3.22 určíme rýchlosť prúdenia kvapaliny vzhľadom k častici, takže viskózna sila je daná vzťahom:

$$F_{\text{vis}} = 6\pi\eta r\omega x_0 \cos(\omega t), \quad (3.23)$$

kde všetky hodnoty sú známe.

Metóda ekipartičného teorému: Na časticu uväznenú v optickej pasci pôsobia sily náhodného smeru a veľkosti kvôli termálnym fluktuáciám v obklopujúcim médiu známym ako Brownov pohyb. Pomocou ekipartičného teorému je možné určiť tuhost' optickej pasce bez toho, aby bolo nutné poznať tvar častice a viskozitu obklopujúceho média, pretože metóda priamo nezávisí na viskóznom koeficiente (γ).

Pre objekt v harmonickom potenciáli s tuhostou k je možné písat' :

$$\frac{1}{2}k_B T = \frac{1}{2}k\langle x^2 \rangle, \quad (3.24)$$

kde k_B je Boltzmannova konštanta, T je termodynamická teplota a $\langle \dots \rangle$ označuje strednú hodnotu.

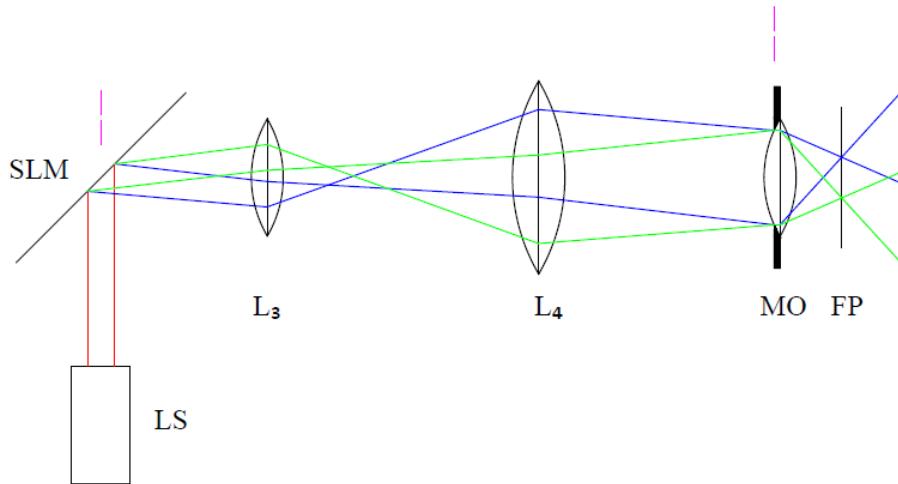
Takže meraním výchylky častice z rovnovážnej polohy je možné priamo určiť tuhosť optickej pasce.

3.3. Metódy zachytenia viacerých častíc do optickej pasci

Optická pinzeta v podobe ako ju navrhol A. Ashkin umožňuje zachytenie len jednej častice, čo značne limituje jej možnosti využitia. S rozvojom mikromanipulačných techník sa objavili možnosti ako zachytiť viacero častíc v rovnakom čase.

Jedným zo spôsobov, ako vytvoriť viacero optických pascí, je použitie viacerých laserov s rôznymi vlnovými dĺžkami, ktoré spolu neinterferujú. Do mikroskopového objektívu sú laserové zväzky zavedené pomocou dichroických zrkadiel. Tento spôsob nie je veľmi využívaný vzhľadom k jeho finančnej náročnosti.

Ďalším spôsobom, ako vytvoriť viacero optických pascí je rozdelenie laserového zväzku pomocou polarizačných deličov alebo difrakčnej optiky. Použitie priestorového modulátoru svetla (SLM), ako difrakčného elementu, poskytuje najväčšiu variabilitu. Schematické znázornenie optickej pinzety využívajúcej SLM na polohovanie optickej pasce je na obrázku 3.3. Ďalšie spôsoby vytvorenia viacerých optických pascí sú uvedené v [35].



Obr. 3.3: Schematické znázornenie optickej pinzety využívajúcej SLM na polohovanie optickej pasce. LS - laserový zdroj, LS - laser, SLM - priestorový modulátor svetla, MO - mikroskopový objektív, FP - ohnisková rovina MO. Čiarkovanou čiarou sú naznačené opticky združené roviny.

Vytvoriť viacero optických pascí je možné aj bez rozdelenia pôvodného zväzku, ide o tzv. časové zdielanie pascí⁵, ktoré bolo popísané v článku [36]. Základom tejto metódy je skenovanie laserového zväzku medzi danými pozíciami - miestami kde majú vzniknúť

⁵Time-sharing optical trapping.

3.3. METÓDY ZACHYTENIA VIACERÝCH ČASTÍC DO OPTICKÉJ PASCI

optické pasce. Častice, na ktoré nepôsobí laserový zväzok, v dôsledku Brownovho pohybu menia svoju polohu a preto frekvencia, s ktorou je optická pasca navrátená do pôvodnej polohy, musí byť dostatočne vysoká, aby zabránila tomuto pohybu. Na skenovanie optickej pasce sa využívajú galvano-optické zrkadlá, piezo-elektrické zrkadlá, akusto-optické alebo elektro-optické deflektory.

Minimálna opakovacia frekvencia pozície optickej pasce tak, aby častica nedifundovala do prostredia, je podľa [37] daná vzťahom:

$$\nu = \frac{2k_B T \left(\operatorname{erf}^{-1}(\gamma) \right)^2}{3\pi\eta r^3 n^2}, \quad (3.25)$$

kde erf^{-1} je inverzná funkcia k chybovej funkcií erf , γ je pravdepodobnosť, že častica ostane v oblasti s rozmerom $n \cdot a$ počas jedného cyklu, η je viskozita okolitého prostredia, r je polomer častice a n je násobok polomeru častice, o ktorý sa môže častica vychýliť z rovnovážnej polohy pasce.

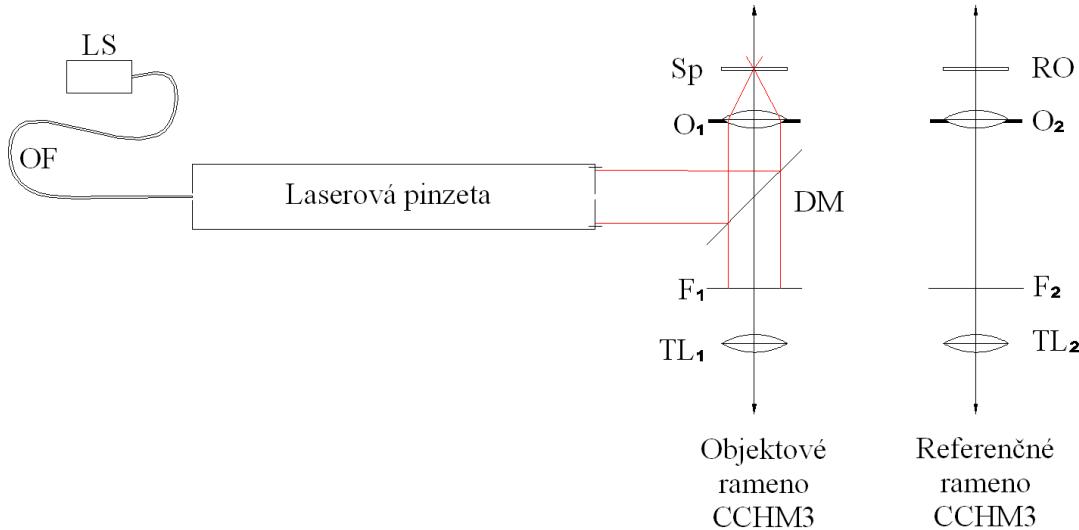
Pre časticu s rozmerom $r = 1 \mu\text{m}$ umiestnenú vo vode a pre parametre $\gamma = 0,9$, $n = 0,1$ je minimálna skenovacia frekvencia 100 Hz.

Kapitola 4

Návrh laserovej pinzety pre koherenciou riadený holografický mikroskop druhej generácie

V rámci práce [5] bola, ako vhodné riešenie pre CCHM2, vybraná laserová pinzeta polo-hovaná galvano-optickými (GO) zrkadlami.

Schematické znázornenie pripojenia samostatného modulu laserovej pinzety ku koherenciou riadenému holografickému mikroskopu druhej generácie je zobrazené na obrázku 4.1.



Obr. 4.1: Schematické znázornenie pripojenia modulu laserovej pinzety k CCHM2. LS - laserový zdroj, OF - optické vlákno, DM - dichroické zrkadlo, F - filtre, TL - tubusové šošovky, O - objektívy, Sp - pozorovaný objekt, RO - referenčný objekt.

Na zavedenie pinzety do CCHM2 je použité dichroické zrkadlo DM, ktoré je umiestnené v objektovom ramene medzi mikroskopovým objektívom a tubusovou šošovkou. Na-vrhované je, aby do objektového ramena mikroskopu bol pridaný filter F_1 , aby žiarenie z laseru optickej pinzety neznižoval kontrast obrazu vo výstupnej rovine CCHM2. Cez

4.1. LASEROVÁ PINZETA POLOHOVANÁ GO ZRKADLAMI

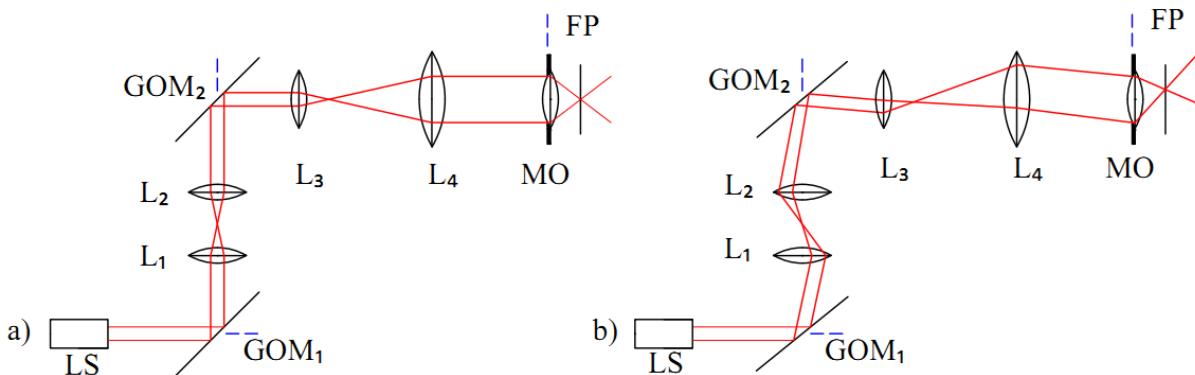
osvetľovaciu sústavu sa taktiež môže laserové žiarenie dostať do výstupnej roviny a preto je navrhované umiestnenie druhého filtra F_1 do referenčného ramena.

4.1. Laserová pinzeta polohovaná GO zrkadlami

Na pohyb optickej pasce v rovine vzorky je možné využiť dvojicu galvano-optických zrkadiel, ktorých osi otáčania spolu zvierajú uhol 90° . Takéto usporiadanie má výhodu, že uhol náklonu každého zo zrkadiel odpovedá posunu optickej pasce pozdĺž príslušnej osi a osi tvoria ortogonálny systém. Medzi ďalšie výhody patrí malá strata výkonu, ktorá je daná len kvalitou použitých zrkadiel.

Pri zmene uhlu natočenia GO zrkadiel by dochádzalo k orezaniu laserového zväzku zadnou apertúrou mikroskopového objektívu. Riešením je optické združenie rovín prechádzajúcich GO zrkadlami a zadnej apertúry mikroskopového objektívu.

Schematické znázornenie optickej pinzety polohovanej GO zrkadlami je zobrazené na obrázku 4.2

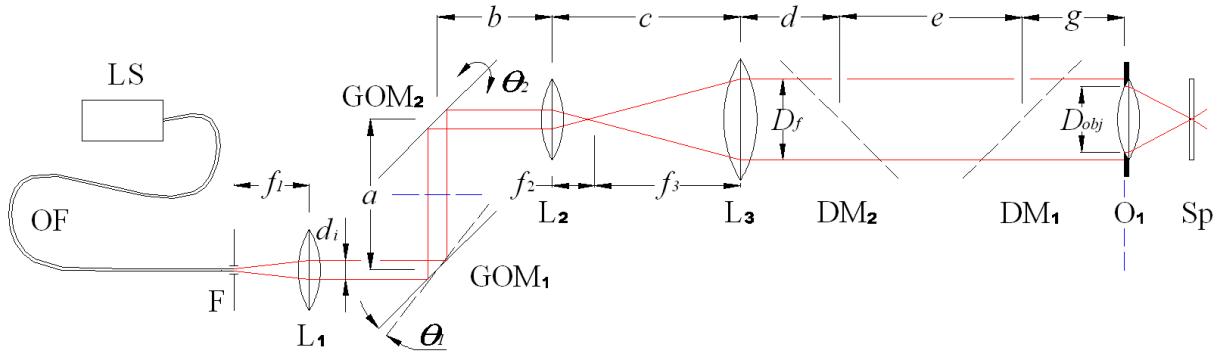


Obr. 4.2: Schematické znázornenie optickej pinzety polohovanej GO zrkadlami. LS - laser, GOM - galvano-optické zrkadlá, L - šošovky, MO - mikroskopový objektív, FP - ohnisková rovina MO, čiarkovanou čiarou sú vyznačené opticky združené roviny. a) Nevychýlená opticá pasca. b) Vychýlená opticá pasca. Prevzaté a upravené z [5].

Optická schéma modulu laserovej pinzety pre CCHM2 je znázornená na obrázku 4.3. Modul je tvorený konektorom na uchytenie optického vlákna F, kolimačnou šošovkou L_1 , galvano-optickými zrkadlami GOM, expandérom laserového zväzku Keplerovho typu, ktorý pozostáva zo šošoviek L_2 , L_3 .

Na rozdiel od optickej schémy uvedenej v časti 4.1 na obrázku 4.2, kde rovina zadnej apertúry mikroskopového objektívu je opticky združená s rovinami prechádzajúcimi oboma galvano-optickými zrkadlami, je v návrhu laserovej pinzety pre CCHM2 združená zadná apertúra MO s rovinou v strede medzi GO zrkadlami. Takéto usporiadanie redukuje množstvo použitej optiky, čím sa zmenšujú optické vady a zároveň sa aj zmenšuje samotný modul laserovej pinzety. Nevýhodou navrhovaného usporiadania je posun laserového zväzku v zadnej apertúre MO, čo spôsobuje mierne zníženie tuhosti optickej pasce. Umiestnením GO zrkadiel čo najbližšie k sebe redukuje orezanie laserového zväzku. Aby bol dosiahnutý čo možno najväčší gradient intenzity v optickej pasci, je mikroskopový

4. NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM2



Obr. 4.3: Schematické znázornenie modulu laserovej pinzety pre CCHM2. LS - laserový zdroj, OF - optické vlákno, F - konektor na uchytenie OF, L - šošovky, GOM - galvano-optické zrkadlá, DM - dichroické zrkadlo, O₁ - objektív, Sp - pozorovaný objekt, modrou čiarkovanou čiarou sú vyznačené opticky združené roviny. Prevzaté a upravené z [5].

objektív "preplňaný", čo znamená, že priemer laserového zväzku je pred vstupom do objektívu väčší ako priemer zadnej apertúry MO.

Optická schéma laserovej pinzety pripojenej ku koherenciou riadenému holografickému mikroskopu je zobrazená na obrázku 4.4 na strane 28.

4.2. Výpočet parametrov laserovej pinzety polohovej GO zrkadlami pre CCHM2

Dĺžkové rozmery a uhly natočenia GO zrkadiel vystupujúce vo vzťahoch sú graficky znázornené na obrázku 4.3, resp. 4.4.

Aby laserový zväzok vždy zapĺňal zadnú apertúru MO, musí platiť vzťah:

$$\xi < \frac{D_f - D_{\text{obj}}}{2}, \quad (4.1)$$

kde ξ je posun stredu laserového zväzku voči stredu zadnej apertúry MO, D_f je priemer laserového zväzku pred vstupom do MO a D_{obj} je priemer zadnej apertúry MO.

Pre posun stredu laserového zväzku voči stredu zadnej apertúry MO platí:

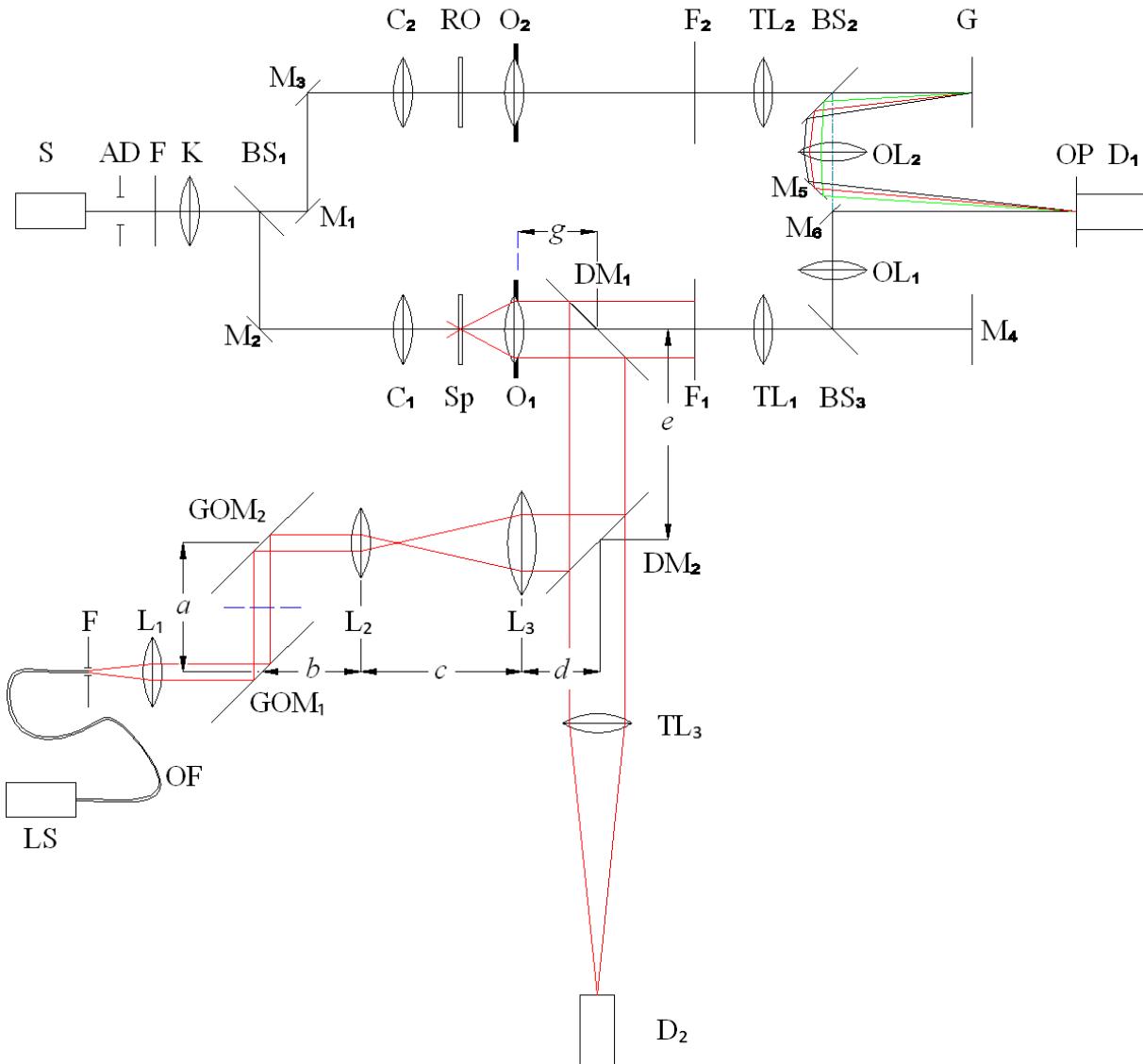
$$\text{Celkový posun: } \xi = \sqrt{\xi_x^2 + \xi_y^2}, \quad (4.2)$$

$$\text{Posun pozdĺž osi x: } \xi_x = \frac{a}{2} \frac{f_3}{f_2} \tan 2\theta_1, \quad (4.3)$$

$$\text{Posun pozdĺž osi y: } \xi_y = \frac{a}{2} \frac{f_3}{f_2} \tan 2\theta_2, \quad (4.4)$$

kde x, y sú osi tvoriace ortogonálny systém súradníc, f_2 (f_3) je ohnisková vzdialenosť šošovky L₂ (L₃), a je vzdialenosť medzi GO zrkadlami a θ_1 (θ_2) je uhol náklonu GOM₁ (GOM₂).

4.2. VÝPOČET PARAMETROV LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM2



Obr. 4.4: Optická schéma laserovej pinzety pripojenej ku koherenciou riadenému holografickému mikroskopu. S - zdroj svetla, AD - apertúrna clona, F - interferenčný filter, K - kolektor, BS - deliče, M - zrkadlá, C - kondenzory, O - objektív, Sp - pozorovaný objekt, RO - referencový objekt, F - filter, TL - tubusové šošovky, G - blejzovaná difrakčná mriežka, OL - výstupné šošovky, OP - výstupná rovina, D - detektory, LS - laser, OF - optické vlákno, F - konektor na uchytenie OF, GOM - galvanooptické zrkadlá, L - šošovky, DM - dichroické zrkadlo, modrou čiarou sú vyznačené opticky združené roviny. Prevzaté a upravené z [5].

4. NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM2

Ako je vidieť z rovníc 4.2 - 4.4 je pre minimalizovanie straty energie laseru v dôsledku orezania zväzku zadnou apertúrou MO vhodné voliť expandér s malým priečným zväčšením M_{ex} ($M_{\text{ex}} = f_3/f_2$). Toho je možné dosiahnuť čiastočným rozšírením zväzku pred vstupom do expandéru.

Afokálny systém tvorený šošovkami L_2 a L_3 , ktorý slúži ako expandér laserového zväzku Keplerovho typu, musí splňať podmienku:

$$c = f_2 + f_3, \quad (4.5)$$

Priemer laserového zväzku vstupujúceho do expandéru je daný vzťahom:

$$d_i = 2f_1 \tan [\arcsin (NA)], \quad (4.6)$$

kde f_1 je ohnisková vzdialenosť šošovky L_1 a NA je numerická apertúra použitého optického vlákna. Pri výpočte bolo nahradené optické vlákno bodovým zdrojom, čo pri typických jednomódových optických vláknach, ktorých priemer je do $100 \mu\text{m}$, je vhodná aproximácia.

Priemer laserového zväzku vystupujúceho z expandéra musí splňať podmienku 4.1, čiže by mal byť rovný $D_{\text{obj}} + 2\xi$. Priemer laserového zväzku vystupujúceho z expandéra je daný vzťahom:

$$D_f = d_i \frac{f_3}{f_2}, \quad (4.7)$$

Zadná apertúra mikroskopového objektívu je konjugovaná s rovinou medzi GO zrkadlami, ak je splnená podmienka:

$$\left(\frac{a}{2} + b \right) = \frac{f_2}{f_3} \left[f_2 + f_3 - \frac{f_2}{f_3} (d + e + g) \right], \quad (4.8)$$

Posunutie stredu optickej pasce v rovine vzorky je dané vzťahom:

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

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

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

kde f_{obj} je ohnisková vzdialenosť mikroskopového objektívu.

Aby optická pinzeta bola schopná pracovať v celom zornom poli, ktoré CCHM2 poskytuje, musí umožňovať výchylku optickej pasce, ktorá je daná vzťahom:

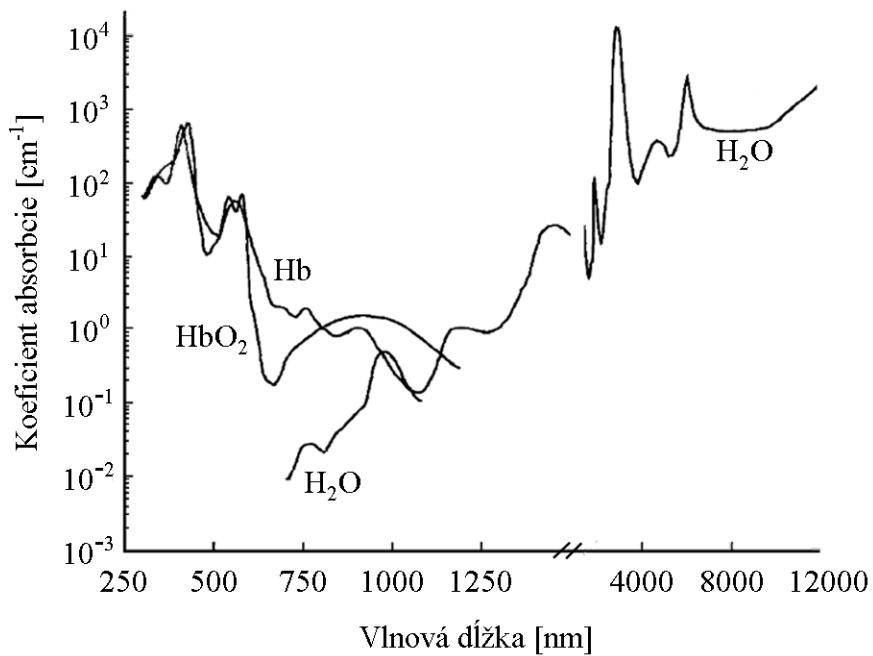
$$\Delta_{\text{max}} = \frac{\sqrt{(N_{px_x}|px_x|)^2 + (N_{px_y}|px_y|)^2}}{2} \frac{1}{M_{\text{OL}}} \frac{1}{M_{\text{obj}}}, \quad (4.12)$$

kde N_{px_x} (N_{px_y}) je počet pixlov v smere osi x (y), $|px_x|$ ($|px_y|$) je veľkosť pixlu v smere osi x (y), M_{OL} je zväčšenie výstupnej šošovky v CCHM2 a M_{obj} je zväčšenie použitého mikroskopového objektívu. Osi x, y sú orientované pozdĺž hrán snímacieho čipu.

4.3. OPTICKÝ NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM2

4.3. Optický návrh laserovej pinzety polohovanej GO zrkadlami pre CCHM2

Jednou z hlavných častí laserovej pinzety je zdroj laserového žiarenia. Pri výbere vhodného laserového zdroja je nutné bráť do úvahy viacero faktorov. Nestabilita smeru výstupného zväzku vedie k náhodným a nechceným pohybom laserovej pasce a nestabilita výstupného optického výkonu spôsobuje zmenu tuhosti optickej pasce. Pri zachytávaní biologických vzoriek patrí medzi dôležité parametre vlnová dĺžka laserového zdroja. Ak by zachytený biologický objekt mal vysokú mieru absorpcie na vlnovej dĺžke chytacieho laseru mohlo by dojsť k jeho tepelnému poškodeniu. Vhodné vlnové dĺžky sa nachádzajú v blízkej infračervenej oblasti, ktorá je na pomedzí medzi absorpciou biologických chromofórov, ako hemoglobín alebo cytochrómy, vo viditeľnom spektre a zvyšujúcou sa absorpciou vody v infračervenej oblasti. Na obrázku 4.5 je graf závislosti absorpcie hemoglobínu a vody na vlnovej dĺžke.



Obr. 4.5: Graf závislosti absorpcie hemoglobínu (Hb, HbO₂) a vody na vlnovej dĺžke. Prevzaté a upravené z [32].

Optický návrh laserovej pinzety polohovanej GO zrkadlami pre CCHM2 a jeho následná optimalizácia bola realizovaná v programe ZEMAX, verzia 2005. V návrhu bolo optické vlákno nahradené bodovým zdrojom s príslušnou numerickou apertúrou ($NA = 0,14$) a mikroskopový objektív CFI Plan Apo VC 60x Oil. ($NA = 1,40$, W.D. = 0,13 mm) od spoločnosti Nikon Instruments Inc. bol nahradený paraxiálnou šošovkou pretože výrobca ne-

4. NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM2

poskytuje dostatok informácií, aby objektív mohol byť vložený do simulácie. Ohnisková vzdialenosť paraxiálnej šošovky je daná vzťahom:

$$f = \frac{f_{TL}}{M_{obj}}, \quad (4.13)$$

kde f_{TL} je ohnisková vzdialenosť tubusovej šošovky použitého mikroskopového objektívu a M_{obj} je jeho zväčšenie.

V návrhu bola, ako detektor D, uvažovaná CCD kamera MR285MC-BH (1,45 M, $9,0 \times 6,7$ mm, CCD B/W, IEEE1394A) od spoločnosti Ximea GmbH.

Pre polohovanie laserového zväzku boli vybrané galvano-optické zrkadlá SG20 (20 kpps) od 6thD - Veselý Jaroslav f.o., ktorých parametre sú uvedené v tabuľke 4.1.

Tabuľka 4.1: Parametre galvano-optických zrkadiel SG20 (20 kpps) od 6thD - Veselý Jaroslav f.o. *pps - bod za jednu sekundu, stanovené pre výchylku zväzku 8° .

Napájanie	100/250 V AC 50 - 60 Hz
Riadiaci signál	± 5 V
Veľkosť zrkadiel	$6,5 \times 11$ mm
Maximálny uhol náklonu	$\pm 20^\circ$
Maximálna skenovacia rýchlosť	20 kpps*

Kvôli zvýšeniu odrazivosti bola na odraznú plochu zrkadiel nadeponovaná vrstva zlata¹. Graf závislosti odrazivosti GO zrkadiel na vlnovej dĺžke dopadajúceho žiarenia je na obrázku 4.6, odrazivosť pre vlnovú dĺžku 1064 nm je 49%. Pri meraní odrazivosti povrchu GO zrkadiel bola použitá halogen-deutériová lampa DH-2000 od spoločnosti Avantes Ltd. ako zdroj svetla, spektrometer bol použitý Shamrock SR-303i od spoločnosti Andor Technology PLC, ktorý má Czerny-Turner usporiadanie, kamera bola použitá iDUS 420BU so zozadu osvetleným CCD čipom, a ako referencia bolo použité zrkadlo PF10-03-G01 od spoločnosti THORLABS GmbH.

Najlepšie výsledky v simuláciach pri kolimácii laserového zväzku boli dosiahnuté s ašférickou šošovkou A240-B s ohniskovou vzdialenosťou 8 mm a priemerom 9,94 mm od spoločnosti THORLABS GmbH. Šošovka je pokrytá antireflexnou vrstvou, ktorej odrazivosť je menšia ako 1 % pri vlnových dĺžkach v intervale (625 – 1075) nm.

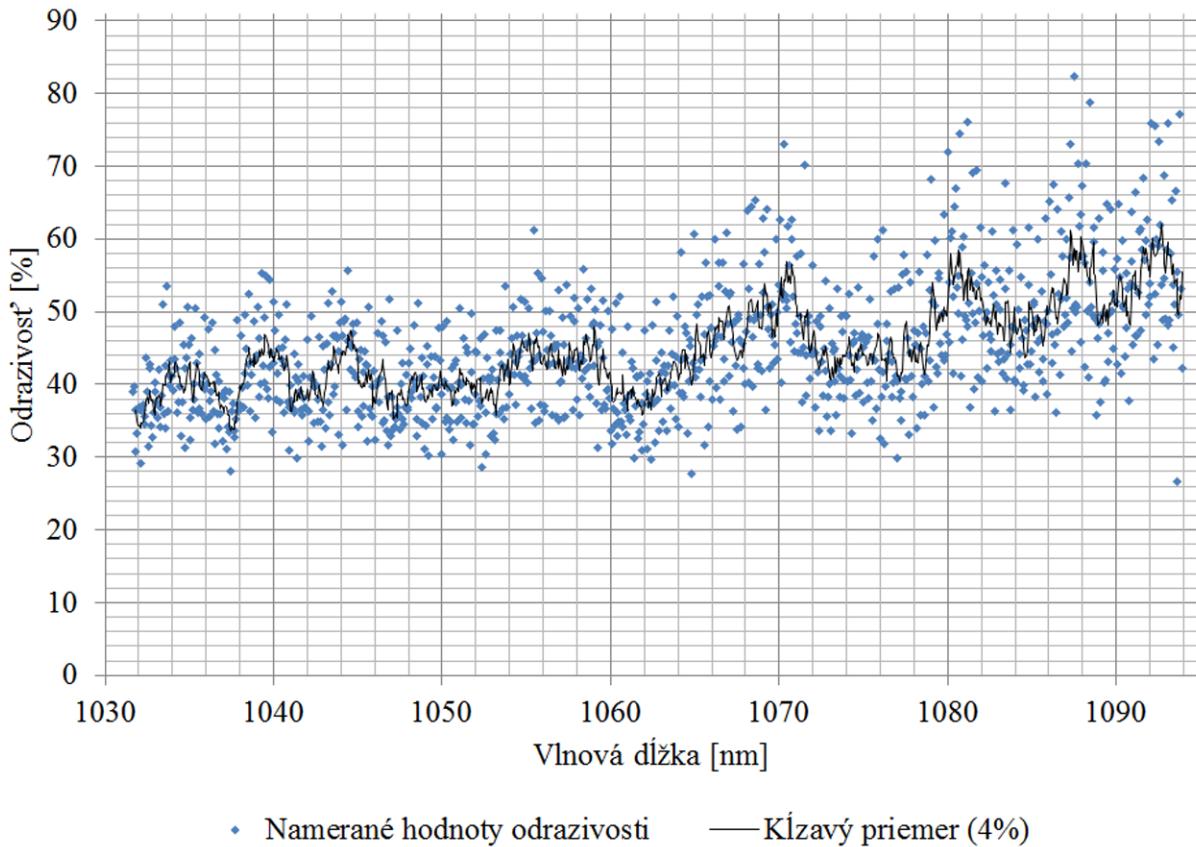
Pre expandér boli dosiahnuté najlepšie výsledky simulácií s použitím šošoviek TECHSPEC Near IR doublets od firmy EDMUND OPTICS Inc. Ako šošovka L2 bola použitá NT45-800 s ohniskovou vzdialenosťou 35 mm a priemerom 25 mm a ako šošovka L3 je použitá NT47-319 s ohniskovou vzdialenosťou 200 mm a priemerom 50 mm.

Počiatočné parametre pri optimalizácii boli vypočítané podľa vzťahov uvedených v časti 4.2. Optimalizovaná bola veľkosť stopy v troch miestach² v ohniskovej rovine mikroskopového objektívu. Cieľom bolo dosiahnuť simuláciu s výsledkom, kde by stopa zväzku bola výrazne menšia ako difrakčný limit sústavy, čo by znamenalo vykorigovanie optických vád

¹Vrstvu nadeponoval Ing. Petr Dvořák na VUT FSI UFI.

²Optická pasca v strede zorného pola, v 70% z maximálnej výchylky, čomu odpovedá uhol náklonu GO zrkadiel $0,98^\circ$ a $1,33^\circ$ a na kraji zorného pola, čomu odpovedá uhol náklonu GO zrkadiel $1,4^\circ$ a $1,9^\circ$.

4.3. OPTICKÝ NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM2



Obr. 4.6: Graf závislosti odrazivosti GO zrkadiel na vlnovej dĺžke dopadajúceho žiarenia.

a priblženie sa k maximálnej možnej veľkosti gradientu intenzity laserového zväzku v rovine vzorky. V tabuľke 4.2 sú uvedené optimalizované parametre optickej pinzety.

Na obrázku 4.7 sú zobrazené spot diagramy v mieste ohniska mikroskopového objektívu, ktoré zobrazujú umiestnenie trasovaných lúčov optickým systémom v zvolenej rovine, takže predstavuje veľkosť stopy zväzku po započítaní optických vád bez difrakcie. Kružnica v obrázku predstavuje Airyho disk sústavy - difrakčný limit sústavy, čiže veľkosť stopy, ak by optický systém nebol začažený geometrickými optickými vadami, ale len difrakciou. Je vidieť, že systém je takmer bez geometrických optických vád. Tomu zodpovedá aj graf na obrázku 4.8, ktorý udáva závislosť množstva energie v ohnisku mikroskopového objektívu, ktorá sa nachádza v oblasti uzavorennej kružnicou s daným polomerom. Stred kružnice je vztiahnutý k hlavnému lúču. Krivky označené ako „difrakčný limit“ predstavujú ideálny stav, t.j. maximálne možné množstvo energie v oblasti, ak by optický systém laserovej pinzety bol začažený len difrakciou. Krivky označené ako „simulácia“ predstavujú množstvo energie v danej oblasti pre optický systém laserovej pinzety začažený geometrickými optickými vadami. V grafe je vidieť, že krivky pre nevychýlenú optickú pascu sa líšia málo, čo odpovedá vykorigovaným geometrickým optickým vadám a krivky pre maximálne vychýlenú optickú pascu sa líšia mierne viac. Pre maximálne vychýlenú optickú pascu sa prejavujú geometrické optické vady. Na obrázku 4.9 je zobrazená simulácia rozloženia svetelného výkonu v ohniskovej rovine mikroskopového objektívu rovnobežne s optickou osou pre nevychýlenú (4.9a) a plne vychýlenú

4. NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM2

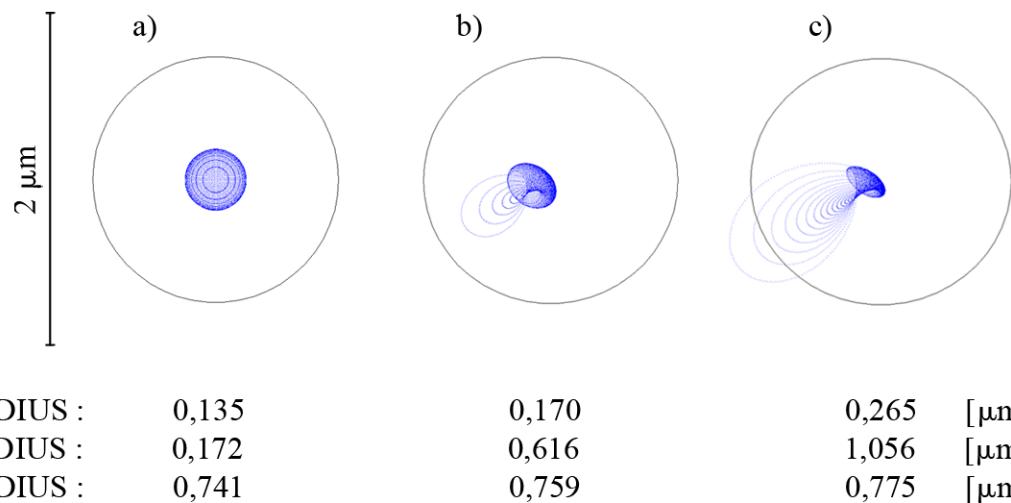
Tabuľka 4.2: Optimalizované parametre optickej pinzety polohovanej GO zrkadlami. R - polomer krivosti, T - osová šírka, D - priemer, k - „conic constant“, A₂ - A₈ - asférické koeficienty. Asférická plocha je daná rovnicou: $z = \frac{r^2}{R(1+\sqrt{1-(1+k)r^2/R^2})} + A_2r^2 + A_4r^4 + A_6r^6 + A_8r^8$, kde z je osová vzdialenosť meraná od vrcholu šošovky a r je vzdialenosť od osi. Vzdialenosťi týkajúce sa šošoviek sú merané od vrcholov.

Povrch	Komentár	R [mm]	T [mm]	Sklo	D[mm]
OBJ	OF, L1	∞	5,86		
1	L1	632,73	3,69	S-LAL13	10
2*	L1	-5,48			10
STO	L1, GOM1	∞	30		
4	GOM1	∞		Zrkadlo	3,3
5	a	∞	6,5		
6	GOM1	∞		Zrkadlo	4,3
7	b	∞	17,8		
8	L2	87,52	4	N-SF6	25
9	L2	20,11	11	N-LAK22	25
10	L2	-23,4			25
11	c	∞	233,29		
12	L3	112,88	9	N-LAK22	50
13	L3	-112,88	5,5	N-SF6	50
14	L3	-1415,62			50
15	d	∞	153		
16	DM	∞		Zrkadlo	28,8
17	e	∞	120		
18	Zadná Apertúra MO	∞	3,3		12
Paraxial	MO, $f_{obj} = 3,3\text{mm}$		3,3		12

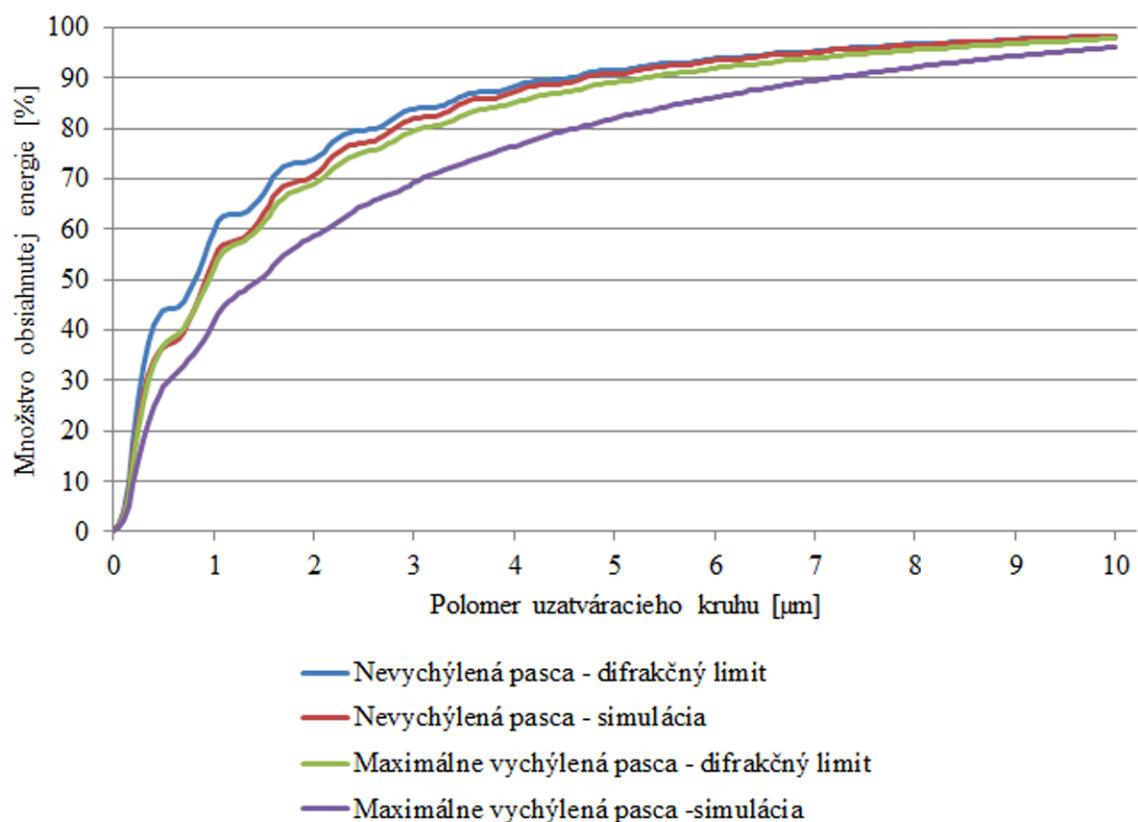
2*				
k [-]	A_2 [mm^{-1}]	A_4 [mm^{-3}]	A_6 [mm^{-5}]	A_8 [mm^{-7}]
0,0000	0,0000	$-50,9290 \times 10^{-5}$	$-0,1286 \times 10^{-5}$	$-0,0870 \times 10^{-5}$

optickú pascu (4.9b), je zahnutá interferencia a difrakcia laserového zväzku pri prechode jednotlivými elementmi optického systému laserovej pinzety.

4.3. OPTICKÝ NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM2

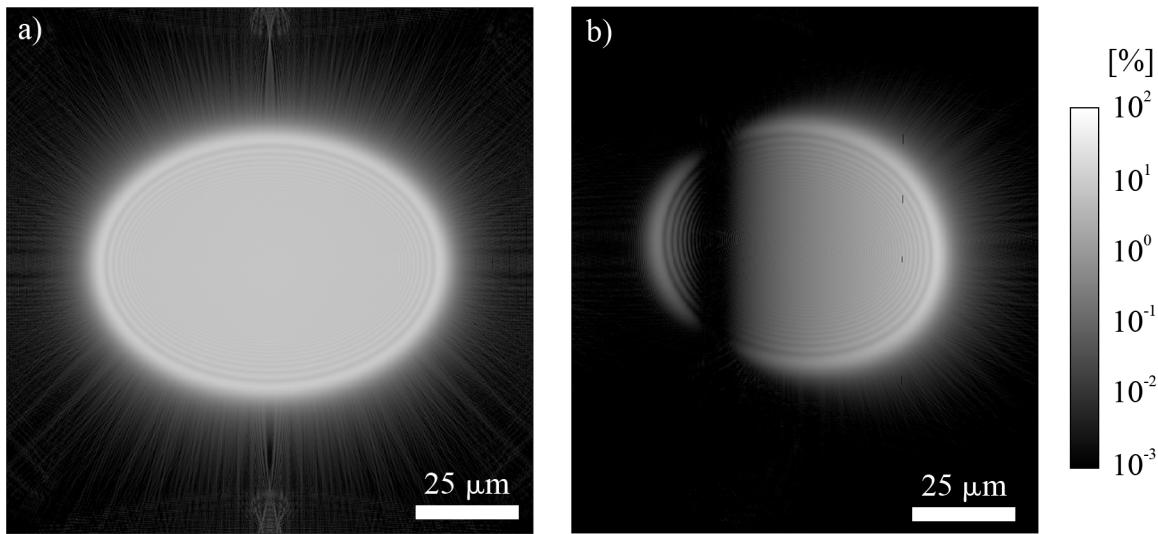


Obr. 4.7: Spot diagram v mieste ohniska mikroskopového objektívu. a) Nevychýlená optická pasca. b) Vychýlená optická pasca - 70 % z maximálnej výchylky. c) Optická pasca na kraji zorného pola. Kružnica predstavuje Airyho disk sústavy.



Obr. 4.8: Graf závislosti množstva energie, ktorá sa nachádza v oblasti uzavorenenej kružnicou s daným polomerom. Stred kružnice je vztiahnutý k hlavnému lúču.

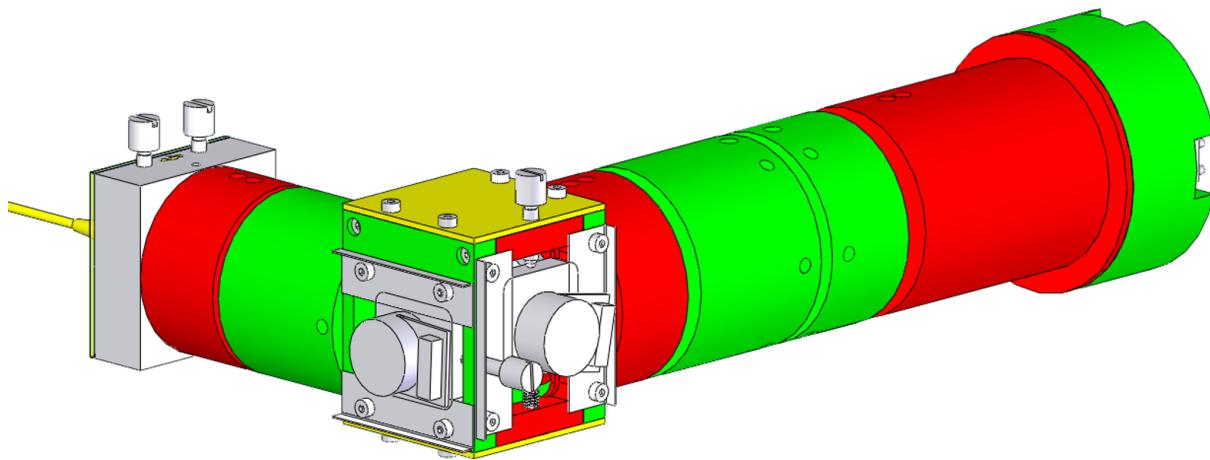
4. NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM2



Obr. 4.9: Normovaný svetelný výkon, ktorý prechádza jednotkou plochy v ohniskovej rovine objektívu. a) Nevyčýlená optická pasca. b) Maximálne vychýlená optická pasca.

4.4. Mechanický návrh laserovej pinzety polohovanej GO zrkadlami pre CCHM2

Návrh mechanického riešenia laserovej pinzety pre CCHM2 bol vytvorený ako 3D model, v programe SolidWORKS 2006, ktorý je na obrázku 4.10. Z modelu mechanického riešenia bola vytvorená výrobná dokumentácia, ktorá je priložená v prílohe. Mechanický model je možné rozdeliť do štyroch častí: manipulátor optického vlákna, kolimátor laserového zväzku, držiak galvano-optických zrkadiel a expandér laserového zväzku.



Obr. 4.10: 3D model laserovej pinzety pre CCHM2.

4.4. MECHANICKÝ NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM2

V ďalšom texte sa číselné popisy vzťahujú k obrázkom 4.11, 4.12, 4.13 a 4.14. Farby v obrázkoch sú vyrobené umelo, aby bolo možné jednotlivé diely lepšie od seba odlišiť. Diely sú vyrobené zo zlatiny hliníku, oceli a fosforového bronzu.

4.4.1. Manipulátor optického vlákna a kolimátor laserového zväzku

Na obrázkoch 4.11 a 4.12 je zobrazený 3D model konektoru a manipulátoru optického vlákna spolu s kolimátorom laserového zväzku.

Hlavnú časť manipulátoru optického vlákna tvorí pohyblivý kameň (16), ktorý je polohovaný v rovine kolmej k optickej ose pomocou dvojice nastavovacích skrutiek (10). Stály kontakt medzi kameňom a nastavovacími skrutkami je zaistený pomocou ľažnej pružiny (11). Správne vedenie kameňa v púzdre manipulátora (9) zaistuje krycia doska (13). Optické vlákno (14) ukončené APC ferulou je uchytené v FC/PC adaptéri (15), ktorý je naskrutkovaný v pohyblivom kameni (16). Konektor je fixovaný vo svojej polohe pomocou aretačného prstenca (12). Vzhľadom k neštandardnému závitu na FC/PC adaptéri³ (15) bol pohyblivý kameň vyrobený opracovaním komerčne dostupného dielu⁴ od firmy THORLABS GmbH. Spolu s týmto dielom je dodávaný aj aretačný prstenec (12).

Pomocou kolimátora laserového zväzku je možné nastavovať vzdialenosť pozdĺž osi medzi koncom optického vlákna (14) a kolimačnou šošovkou (7), ktorá je uložená v tubuse (4) a fixovaná prítlačnou maticou (8). Spojenie kolimátora laserového zväzku a manipulátoru optického vlákna je realizované ustanovacím šródom (6). Nastavovanie polohy kolimačnej šošovky voči optickému vláknu je realizované točením ustanovacej matice (2), ktorá sa môže voľne otáčať okolo tubusu a jej poloha je zaistená aretačným prstencom (1). Stály kontakt medzi tubusom a ustanovacou maticou je zaistený závitom s jemným stúpaním a vôle v ňom je vymedzená pomocou tlačnej pružiny (3⁵). Vedenie ustanovacieho šróbu je zaistené pomocou drážky s perom (5), toto vedenie taktiež zaistuje, aby sa kolimačná šošovka (7) nemohla otáčať okolo svojej osi.

4.4.2. Držiak galvano-optických zrkadiel

Na obrázku 4.13 je zobrazený 3D model držiaku galvano-optických zrkadiel. Hlavnou úlohou tejto podzostavy je nastavenie odrazných plôch GO zrkadiel tak, aby optická os sústavy prechádzala ich stredmi.

GO zrkadlo (24, resp. 31) je uchytené vo vodiacom kameni (23, resp. 21). Na ustanovenie polohy GO zrkadla vo vodiacom kameni je použitá skrutka prechádzajúci vodiacim kameňom, ktorý cez gumový element tlačí na GO zrkadlo a to je ovládané pomocou nastavovacej skrutky (18, resp. 28). Stály kontakt medzi vodiacim kameňom a nastavovacou skrutkou je zaistený pomocou tlačných pružín⁶, ktoré sú vedené⁷, aby bola zaistená ich

³SM05FC - FC/PC Fiber Adapter Plate with External SM05 (0.53540) Thread

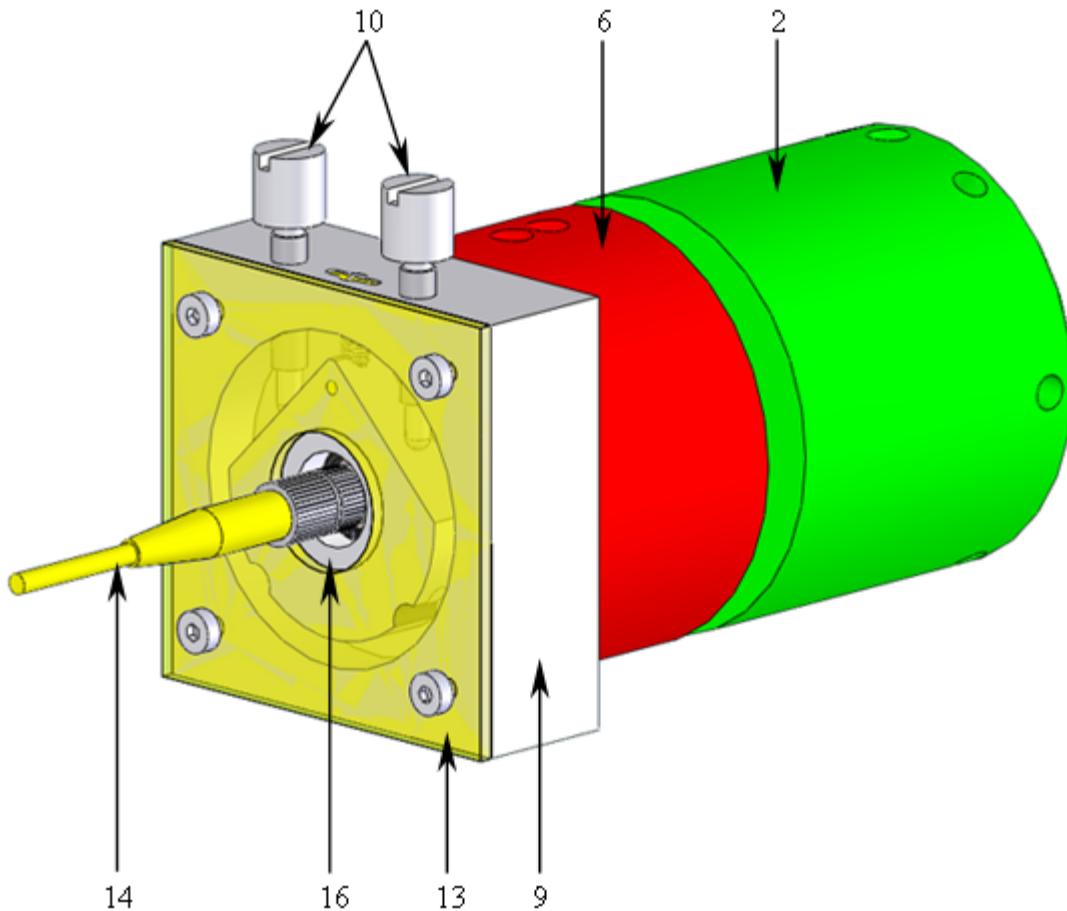
⁴CP11 - SM05-Threaded 30 mm Cage Plate, 0.35"

⁵VD-288Z-13 od spoločnosti Gutekunst + Co.KG.

⁶Na obrázku 4.13 je vidieť jednu z tlačných pružín 29.

⁷Na obrázku 4.13 je vidieť jedno z vedení pružín 34. Výrobná dokumentácia k druhému vedeniu je uvedená v prílohe pod označením 34b.

4. NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM2



Obr. 4.11: 3D model manipulátoru optického vlákna a kolimátou laserového zväzku. 2 - ustanovacia matica, 6 - ustanovací šrob, 9 - púzdro manipulátora, 10 - nastavovačskrutky, 13 - krycia doska, 14 - optické vlákno, 16 - pohyblivý kameň.

vzperná stabilita. Vodiaci kameň je suvne vložený vo vodiacich doskách (19, resp. 30). Správne vedenie vodiaceho kameňa, ktorého hrúbka je o 0,5 mm väčšia ako hrúbka dielu 19, resp. 30, je realizované pomocou prítlačných lamiel (22, 25, resp. 20, 27), ktorých konce sú vyhnuté kvôli zvýšeniu ich tuhosti.

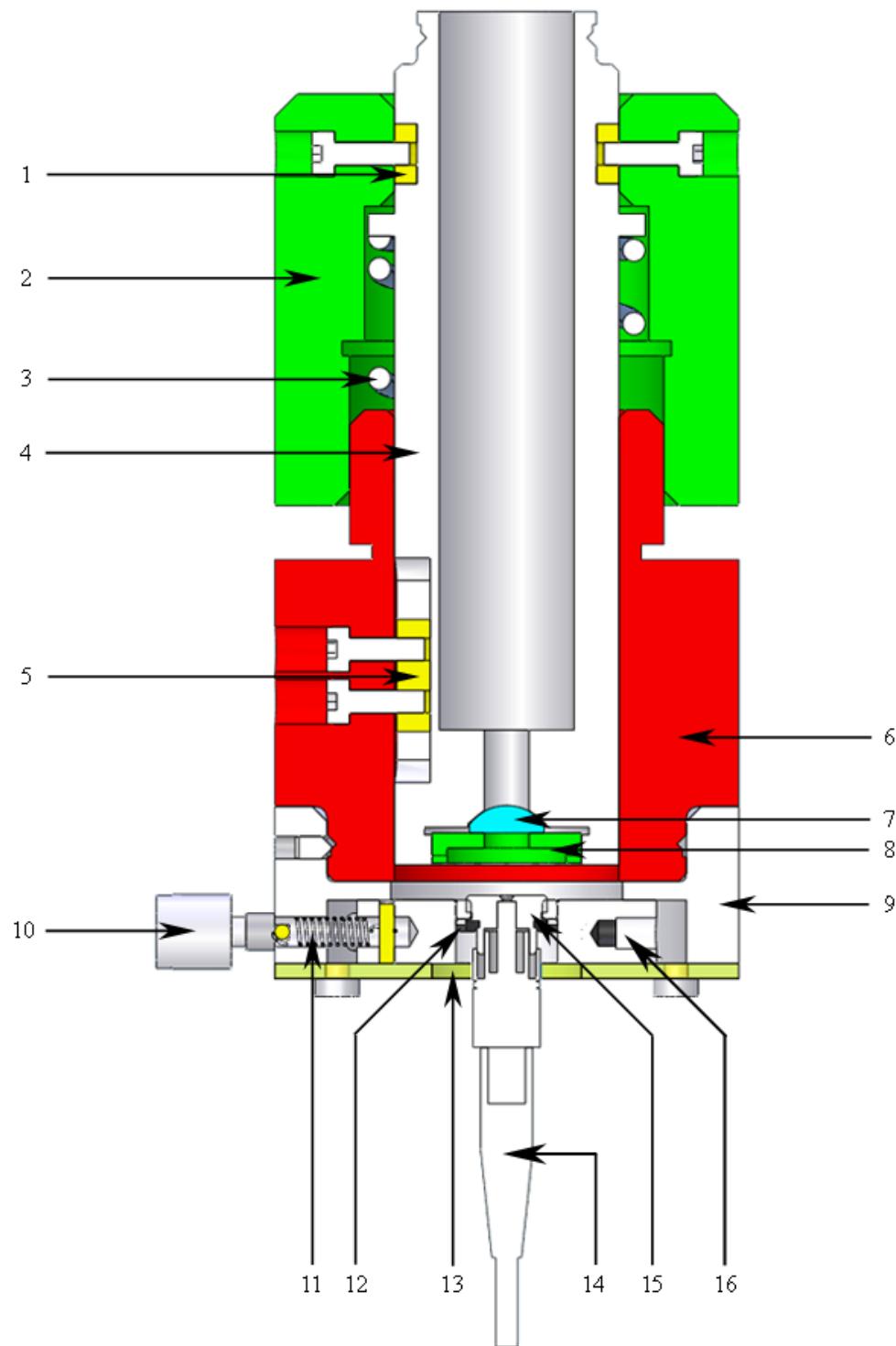
Spojenie držiaku GO zrkadiel s kolimátorom laserového zväzku a s expandérom laserového zväzku je realizované prechodovými doskami (33, resp. 32).

Kvôli zníženiu množstva svetla, ktoré preniká do sústavy a zvýšeniu tuhosti držiaku GO zrkadiel, sú pridané krycie dosky (17, 26).

4.4.3. Expandér laserového zväzku

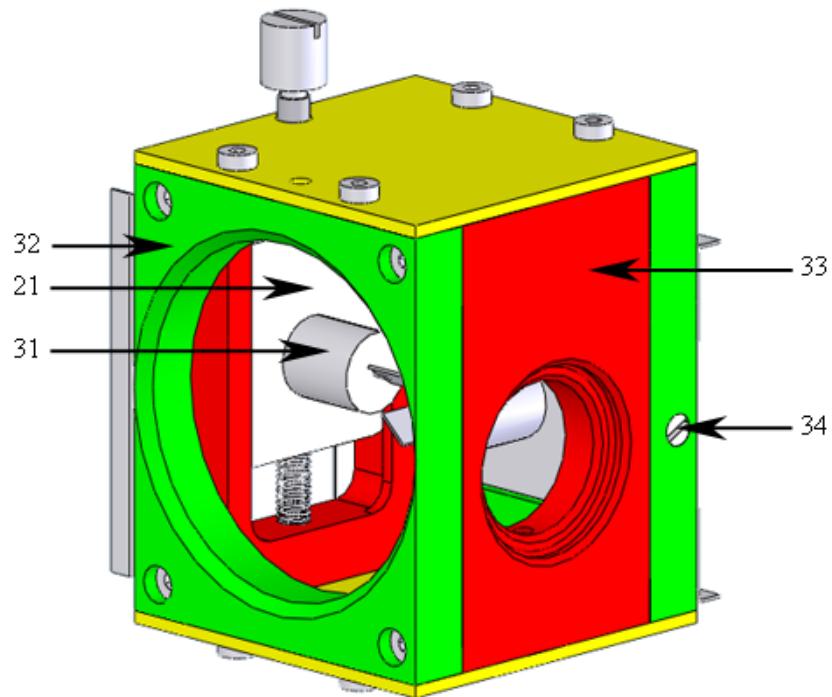
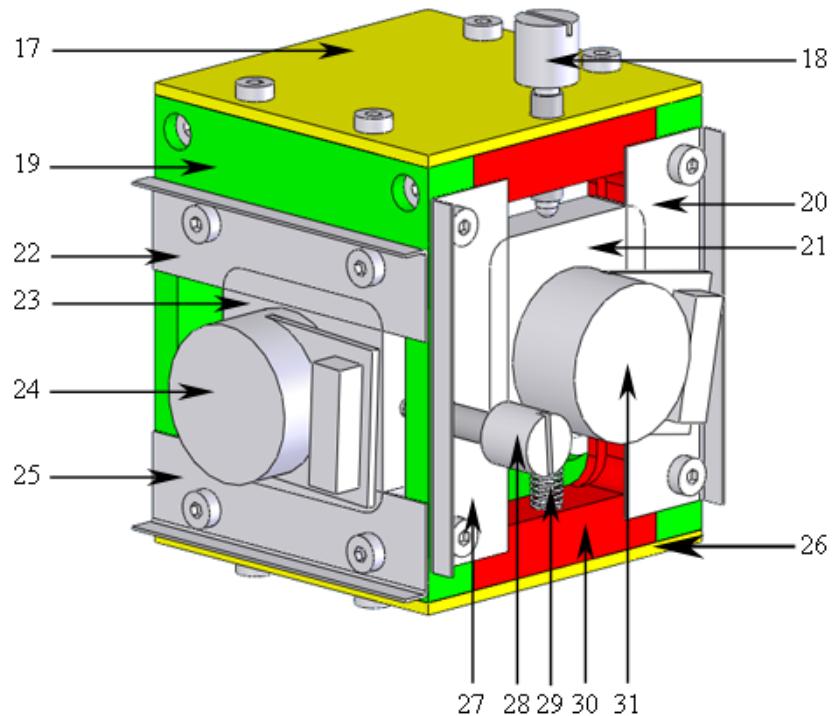
Expandér laserového zväzku, ktorého 3D model je zobrazený na obrázku 4.14, plní dve funkcie. Umožňuje vytvorenie afokálneho systému, slúžiaceho na rozšírenie laserového zväzku, pomocou nastavenia vzájomnej vzdialenosť medzi šošovkami L₂ (36) a L₃ (48) a taktiež umožňuje nastaviť vzdialosť roviny medzi GO zrkadlami a L₂ (bez toho, aby sa menila vzdialenosť medzi L₂ a L₃), čím umožňuje variabilitu požadovanej vzdialenosť medzi L₃ a zadnou apertúrou mikroskopového objektívū.

4.4. MECHANICKÝ NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM2



Obr. 4.12: Rez 3D modelom manipulátoru optického vlákna a kolimátoru laserového zväzku. 1 - aretačný prstenec, 2 - ustanovacia matica, 3 - tlačná pružina, 4 - tubus, 5 - pero, 6 - ustanovací šrob, 7 - kolimačná šošovka, 8 - prítlačná matica, 9 - púzdro manipulátora, 10 - nastavovacia skrutka, 11 - ďažná pružina, 12 - aretačný prstenec, 13 - krycia doska, 14 - optické vlákno, 15 - FC/PC adaptér, 16 - pohyblivý kameň.

4. NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM2



Obr. 4.13: 3D model držiaku galvano-optických zrkadiel. 17, 26 - krycie dosky, 18, 28 - nastavovacie skrutky, 19, 30 - vodiace dosky, 20, 22, 25, 27 - prítlačné lamely, 21, 23 - vodiace kamene, 24, 31 - GO zrkadlá, 29 - tlačná pružina, 32, 33 - prechodové dosky, 34 - vedenie pružiny.

4.5. NÁVRH NAPÁJANIA LASEROVEJ DIÓDY

Spojenie expandéru laserového zväzku a držiaku GO zrkadiel je realizované konjugáčnym šróbom (39). Otáčaním konjugáčnej matice (40), ktorej poloha je fixovaná pomocou aretačného prstenca (42), je možné nastaviť vzdialenosť L_2 a roviny medzi GO zrkadlami. Vzdialenosť je možné meniť v rozsahu, ktorému odpovedá interval vzdialenosťí medzi L_3 a zadnou apertúrou MO od 60 do 460 mm tak, aby bola splnená podmienka konjugovanosti. Vôľa v závite medzi konjugáčnym šróbom a konjugáčnou maticou je zaistená tlačnou pružinou (41)⁸.

Otáčaním expandérovej matice (44), ktorej poloha je fixovaná pomocou aretačného prstenca (43), je možné nastaviť vzdialenosť medzi šošovkami L_2 a L_3 . Vôľa v závite medzi expandérovou maticou a expandérovým šróbom (45) je zaistená pomocou tlačnej pružiny (47)⁹.

Expandérový šrob slúži taktiež ako držiak šošovky L_3 , ktorej poloha je fixovaná prítlačnou maticou (49). Expandérový tubus (37) slúži ako držiak šošovky L_2 , ktorej poloha je fixovaná prítlačnou maticou (35). Správne vedenie jednotlivých dielov je realizované pomocou pier (38, 46) s drážkami. Príruba (50) slúži na pripojenie laserovej pinzety k CCHM2 a taktiež zaistuje zosúladenie optickej osi CCHM2 a modulu laserovej pinzety.

4.5. Návrh napájania laserovej diódy

Ako zdroj žiarenia pre laserovú pinzetu je zvolená gálium-arsenidová laserová dióda Lumics LU1064M45 (vlnová dĺžka 1064 nm, maximálny výkon v kontinuálnom móde 450 mW, maximálny výkon v pulznom móde 1200 mW), ktorá v kontinuálnom móde pracuje pri napäti 1,75 V. Zmenou veľkosti napájacieho prúdu je možné meniť optický výkon diódy, ktorý je daný vzťahom¹⁰:

$$P_{\text{diod}}[\text{mW}] = \begin{cases} 0 & \dots & 0 < I < 64 & [\text{mA}] \\ 0,62I - 40 & \dots & 64 \leq I < 800 & [\text{mA}] \end{cases} \quad (4.14)$$

kde I je veľkosť prúdu pretekajúceho diódou.

Vzhľadom k strmosti voltampérovej charakteristiky polovodičových diód bol uprednostnený prúdový napájací zdroj pred napäťovým. Navrhovaný prúdový zdroj je možné rozdeliť na štyri časti: riadiaca karta pripojiteľná k PC, 8 bitový digitálno-analógový prevodník, exekučná časť, externý napájací zdroj. Schéma zapojenia navrhovaného prúdového zdroja je na obrázku 4.15.

Ako riadiaca karta bola zvolená NI USB-6008 obsahujúca dva analógové výstupy, tie sú použité na ovládanie GO zrkadiel. Z digitálnych výstupov bol zostavený 8 bitový digitálno-analógový prevodník, umožňujúci nastavenie 256 hodnôt, podľa toho ako sú usporiadane logické jednotky a nuly na digitálnych výstupoch karty.

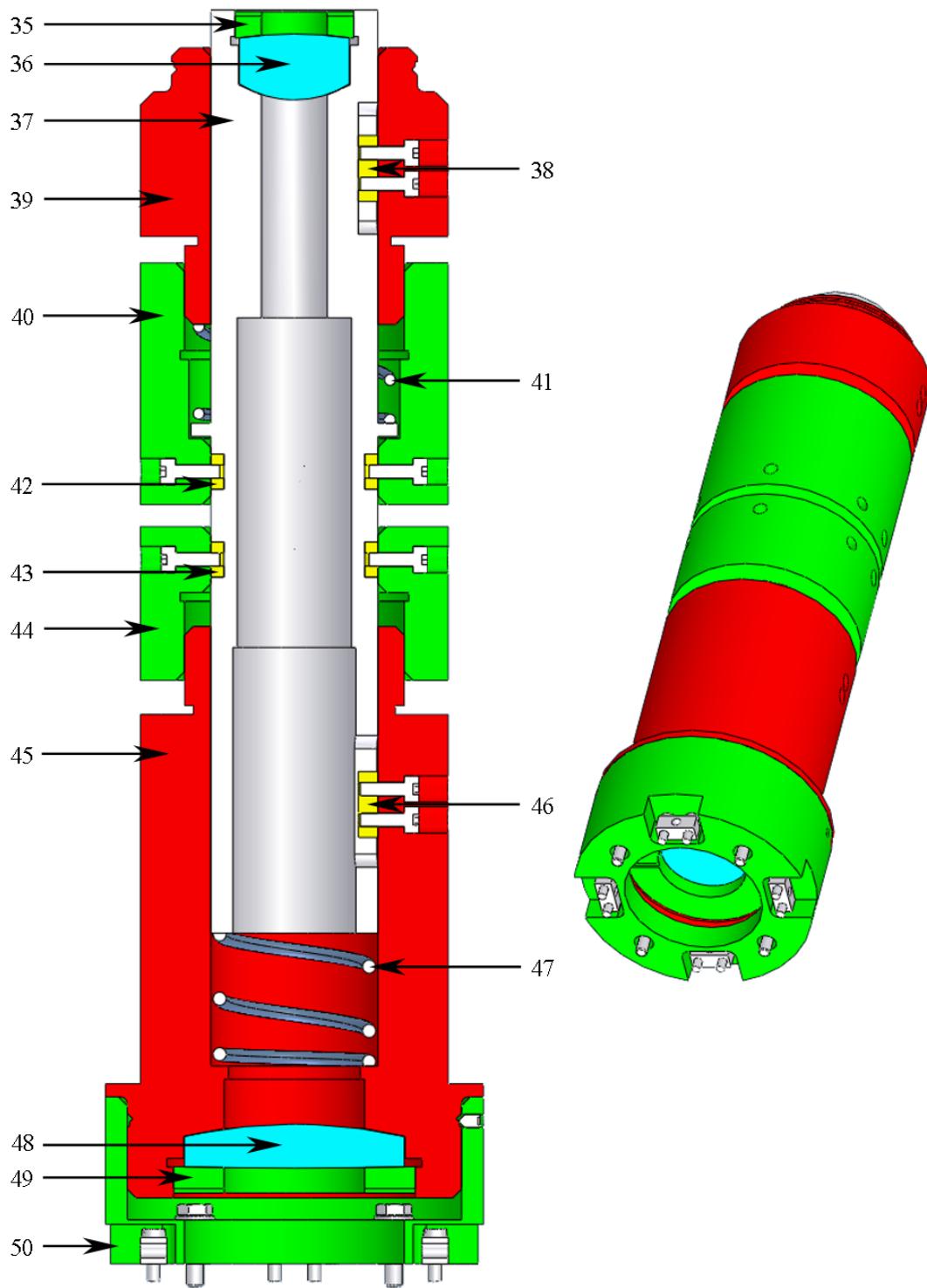
Zapojenie digitálno-analógového prevodníka je zobrazené v ľavej časti obrázku 4.15. Ak je maximálny optický výkon rozdelený na 256 hodnôt tak, aby hodnota označená ako 1 odpovedala nulovému optickému výkonu a hodnota 256 odpovedala maximálnemu

⁸VD-288Z-13 od spoločnosti Gutekunst + Co.KG.

⁹D-263VH od spoločnosti Gutekunst + Co.KG.

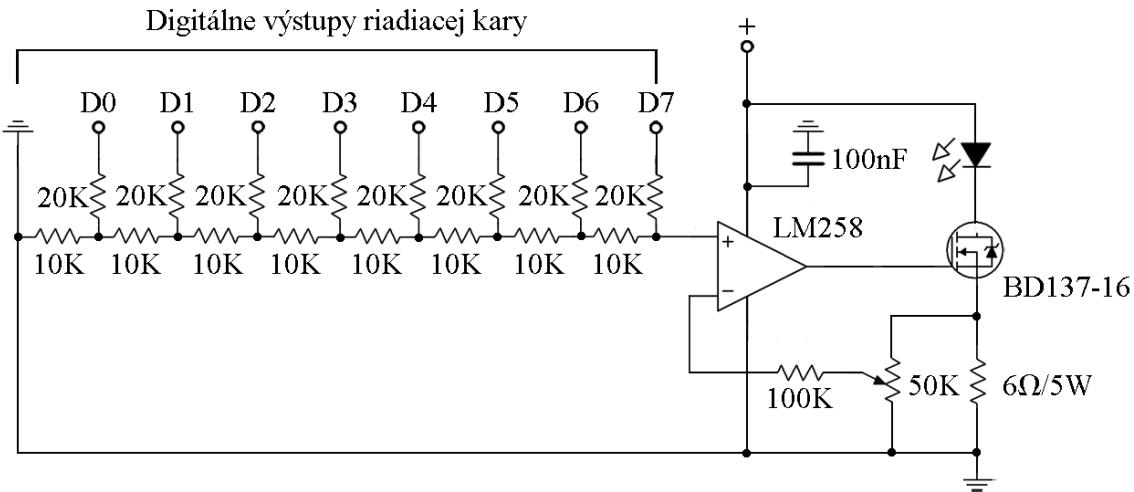
¹⁰Vzťah vznikol lineárnu regresiou výrobcom dodávaných dát.

4. NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM2



Obr. 4.14: 3D model expandér laserového zväzku. 35, 49 - prítlačné matice, 36 - L₂, 37 - expandérový tubus, 38, 46 - perá, 39 - konjugačný šrób, 40 - konjugačná matica, 41, 47 - tlačné pružiny, 42, 43 - aretačné prstence, 44 - expandérová matica, 45 - expandérový šrób, 48 - L₃, 50 - príruba.

4.5. NÁVRH NAPÁJANIA LASEROVEJ DIÓDY



Obr. 4.15: Schéma zapojenia prúdového zdroja.

optickému výkonu, potom o tom či na danom digitálnom výstupe je logická nula alebo jednota je možné rozhodnúť na základe vzťahu:

$$\left\lfloor \frac{NO - 1}{SV} \right\rfloor = \begin{cases} 0 & \dots \text{ párné číslo alebo } 0 \\ 1 & \dots \text{ nepárné číslo,} \end{cases} \quad (4.15)$$

kde NO je hodnota z intervalu $\langle 1; 256 \rangle$, ktorá je spojená s veľkosťou optického výkonu, SV je špecifická hodnota priradená ku každému digitálnemu výstupu a $\lfloor \dots \rfloor$ je označenie zaokrúhlenia smerom nadol. Špecifické hodnoty digitálnych výstupov sú uvedené v tabuľke 4.3. Charakteristika digitálno-analógového prevodníka je na obrázku 4.16.

Tabuľka 4.3: Špecifické hodnoty digitálnych výstupov riadiacej karty.

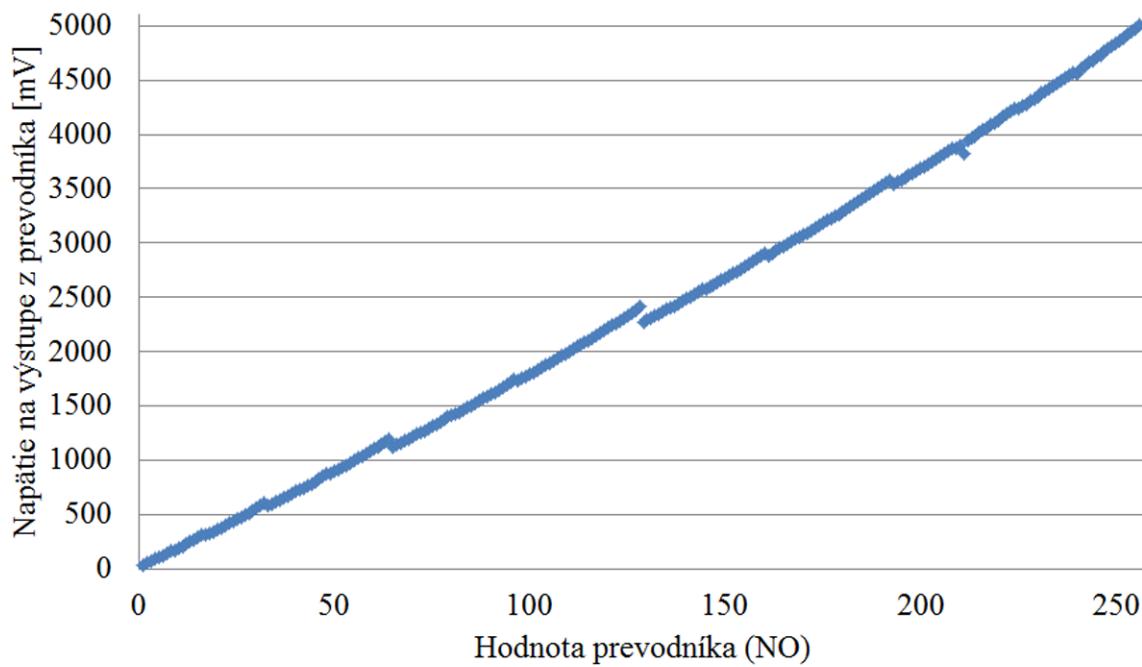
Digitálny výstup	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Špecifická hodnota	1	2	4	8	16	32	64	128

V pravej časti schémy zapojenia prúdového zdroja na obrázku 4.15 je zobrazená exekučná časť a pripojenie na externý napäťový zdroj MW9112GS od spoločnosti Minwa Electronics Co., Ltd.

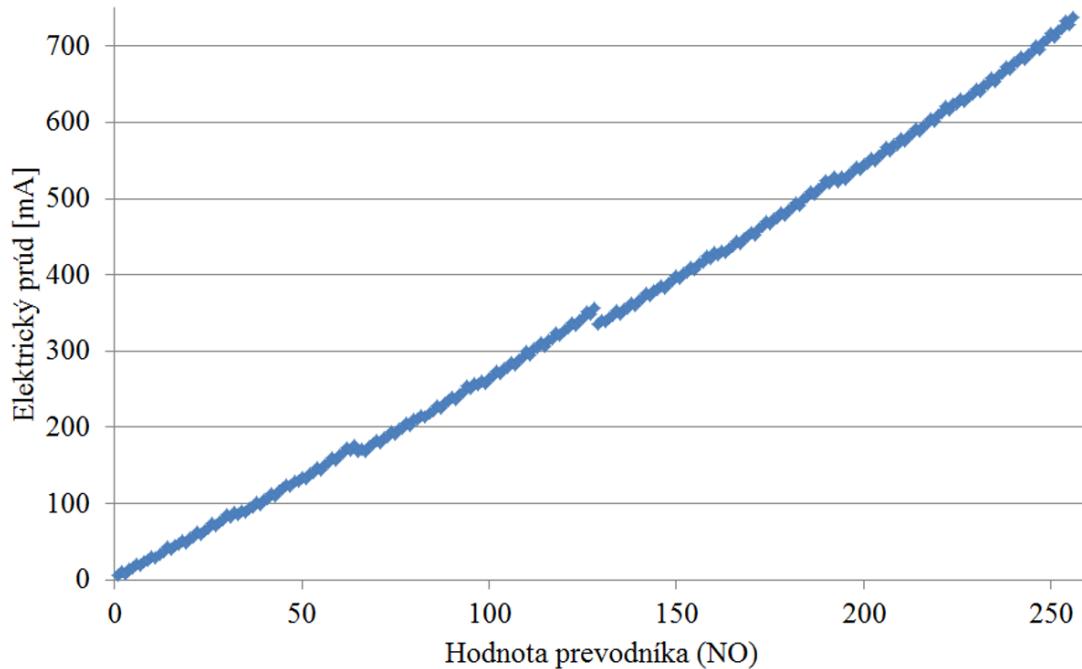
Operačný zosilňovač s asymetrickým napájaním LM258 zapojený so spätnou väzbou je pripojený k bráne poľom riadenému tranzistoru BD137-16. Výstupné napätie na operačnom zosilňovači „otvára“, resp. „zatvára“ tranzistor, čím je kontrolovaný prúd laserovou diódou. Kondenzátory umiestnené v obvode slúžia, ako vysokofrekvenčné filtre, aby odstránili náhle výkyvy napäcia z externého zdroja. Graf závislosti veľkosti prúdu pretekajúceho laserovou diódou na výstupnej hodnote z digitálno-analógového prevodníka je na obrázku 4.17.

Pri práci sa laserová dióda môže značne zahrievať, čo vedie k nestabilite optického výkonu a nestabilite výstupnej frekvencie žiarenia. Pri prehriati môže dôjsť aj k poškodeniu diódy a jej následnej nefunkčnosti. Laserová dióda Lumics LU1064M45 obsahuje zabu-

4. NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM2



Obr. 4.16: Charakteristika digitálno-analógového prevodníka.



Obr. 4.17: Závislosti veľkosti prúdu pretekajúceho laserovou diódou na výstupnej hodnote z digitálno-analógového prevodníka.

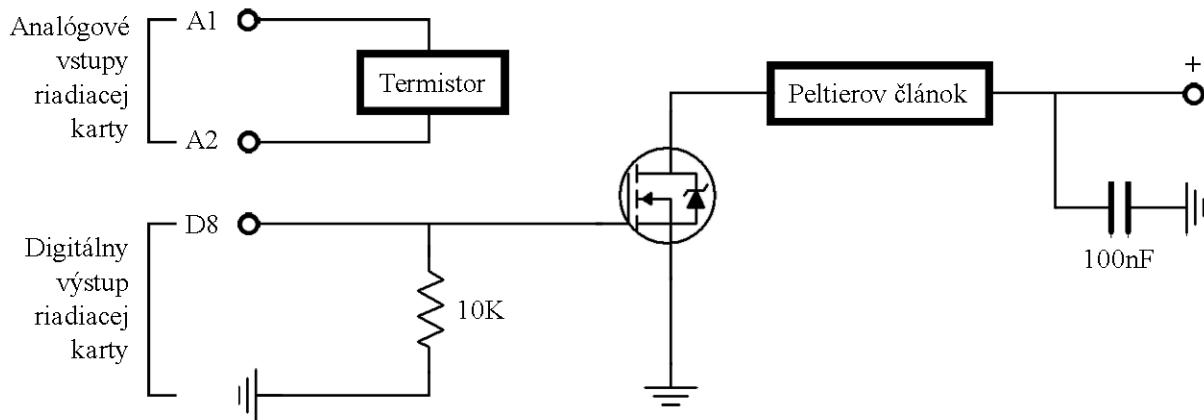
4.6. POSTUP JUSTÁŽE LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM2

dovaný Peltierov článok¹¹, pomocou ktorého je možné diódu chladiť. Taktiež obsahuje termistor, pomocou ktorého je možné určiť teplotu diódy a je popísaný Steinhartovou-Hartovou rovnicou, ktorá má tvar:

$$\frac{1}{T} = C_1 + C_2 \ln(R) + C_3 (\ln(R))^3, \quad (4.16)$$

kde T je termodynamická teplota, R je odpor na termistore a C_1-C_3 sú Steinhartove-Hartove koeficienty¹².

Napätie na termistore je možné merať pomocou analógových vstupov na riadiacej karte a pri prekročení optimálnej teploty diódy¹³ spustiť chladenie. Peltierov článok pri chladení spotrebováva značné množstvo energie (5,5 W), a preto ho nie je možné napájať priamo z riadiacej karty, ale musí byť použitý externý zdroj. Spínanie Peltierovho článku je zistené pomocou digitálneho výstupu riadiacej karty a poľom riadeného tranzistora. Schéma zapojenia kontroly teploty a spúšťania chladenia Peltierovým článkom je na obrázku 4.18. Kondenzátor v schéme zapojenia slúži ako vysokofrekvenčný filter, aby odstránil náhle výkyvy napäcia externého zdroja.



Obr. 4.18: Schéma zapojenia kontroly teploty a spúšťania chladenia Peltierovým článkom.

4.6. Postup justáže laserovej pinzety pre CCHM2

Vzhľadom k stavu prác na CCHM2, pre ktorý bola laserová pinzeta navrhnutá, bolo nutné prispôsobiť justážny postup laboratórnej verzií CCHM2, ktorá je zobrazená na obrázku 4.19. Oproti schéme uvedenej v časti 2.2 na obrázku 2.1 je detektor D_2 zavedený do CCHM2 cez priestor medzi tubusovú šošovku TL_1 a delič BS_3 a sú vynechaná filtre F_1 a F_2 . Táto úprava znižuje straty výkonu laseru a taktiež umožňuje vynechanie tubusovej šošovky

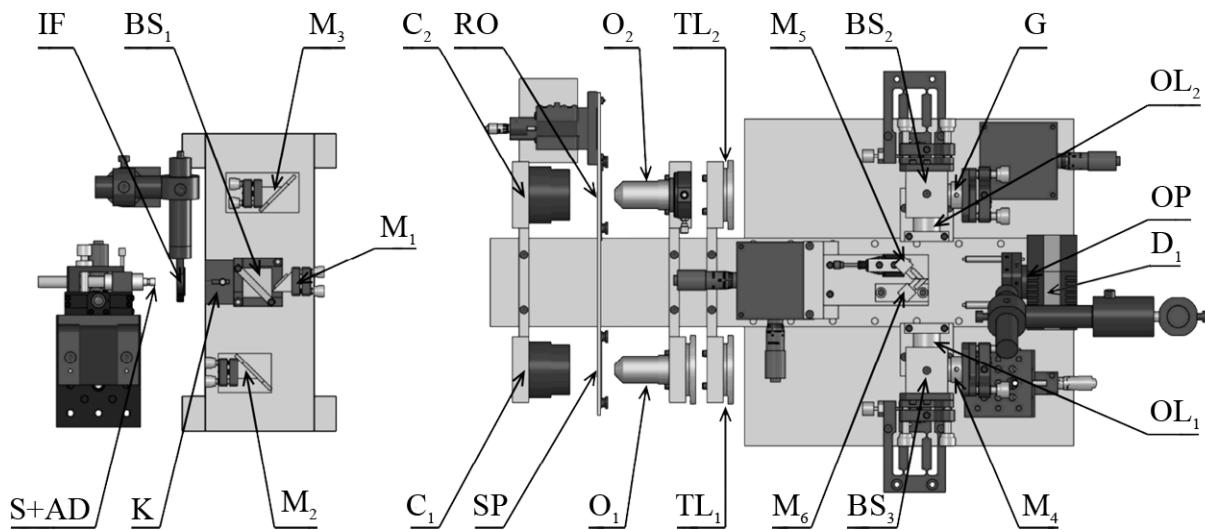
¹¹Peltierov článok využíva Peltierov jav na vytvorenie tepelného toku medzi spojmi dvoch rôznych druhov materiálov a v princípe ide o pevnolátkové aktívne tepelné čerpadlo, ktoré prenáša teplo z jednej strany zariadenia na druhú, pri spotrebe elektrickej energie. Smer prúdenia tepla závisí na smere elektrického prúdu.

¹² $C_1 = 1,1292 \times 10^{-3}$, $C_2 = 2,3411 \times 10^{-4}$ a $C_3 = 8,7755 \times 10^{-5}$

¹³Laserová dióda Lumics LU1064M45 pracuje optimálne pri teplote 25 °C.

4. NÁVRH LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM2

TL₃. Justáž je vykonávaná po častiach, ako prvý je zjustovaný manipulátor optického vlákna spolu s kolimátorom laserového zväzku, potom je pripojený držiak GO zrkadiel a na záver je pripojený expandér laserového zväzku.



Obr. 4.19: Laboratórna verzia CCHM2. S - zdroj svetla, AD - apertúrna clona, IF - interferenčný filter, K - kolektor, BS - deliče, M - zrkadlá, C - kondenzory, O - objektívy, Sp - pozorovaný objekt, RO - referenčný objekt, TL - tubusové šošovky, OL - výstupné šošovky, OP - výstupná rovina, D₁ - detektor. Prevzaté a upravené z [4].

I) Justáž na optickej lavici:

- 1) Nastavenie justážného He-Ne laseru tak, aby laserový zväzok bol rovnobežný s osou optickej lavice - pri pohybe tienidla pripevneného na stojane, ktorý sa môže pohybovať v osi optickej lavice, musí stopa justážného laseru ostať nehybná
- 2) Spojenie manipulátora optického vlákna s kolimátorom laserového zväzku
- 3) Nastavenie osi kolimátora laserového zväzku tak, aby bola rovnobežná s osou optickej lavice - odrazený zväzok justážného laseru od rovinného zrkadla pripevneného na krycej doske (13) musí vytvoriť stopu v rovnakom mieste odkiaľ z laseru vyšiel
- 4) Vystredenie polohy optického vlákna otáčaním nastavovacích skrutiek (10) - pri pohybe tienidla pripevneného na stojane, ktorý sa môže pohybovať v ose optickej lavice musí stred stopy laseru ostať nehybná
- 5) Kolimovanie laserového zväzku otáčaním ustanovacej matice (2) - pri pohybe tienidla pripevneného na stojane, ktorý sa môže pohybovať v osi optickej lavice musí ostať veľkosť stopy laseru rovnaká
- 6) Pripojenie držiaku GO zrkadiel
- 7) Nastavenie osi otvoru v prechodovej doske (32), ktorá slúži na pripojenie expandéru, tak, aby bola rovnobežná s osou optickej lavice - odrazený zväzok

4.6. POSTUP JUSTÁŽE LASEROVEJ PINZETY PRE CCHM2

justážného laseru od rovinného zrkadla pripojeného na vodiacej doske (19) musí vytvoriť stopu v rovnakom mieste odkiaľ z laseru vyšiel

- 8) Nastavenie tzv. nulovej polohy natočením GO zrkadiel¹⁴ - hrubé justovanie ručným natáčaním mechaniky GO zrkadiel vo vodiacom kameni (21, 23), jemné justovanie softvérovým naklápaním GO zrkadiel; stopa laseru vytvorená na tienidle, ktoré je pripojené na prechodovej doske (32), sa musí prekrývať so stredom otvoru vyznačenom na tienidle a zároveň pri pohybe tienidla pripojeného na stojane, ktorý sa môže pohybovať v osi optickej, lavice musí stopa laseru ostáť nehybná
 - 9) Aretácia polohy GO zrkadiel - dotiahnutím prítlačných lamiel (20, 22, 25, 27)
 - 10) Pripojenie expandéru laserového zväzku
 - 11) Kolimácia laserového zväzku otáčaním expandérovej matice (44)- pri pohybe tienidla pripojeného na stojane, ktorý sa môže pohybovať v osi optickej lavice, musí ostáť veľkosť stopy laseru rovnaká
- II) Justáž na optickom stole:
- 1) Nastavenie justážného He-Ne laseru tak, aby laserový zväzok bol kolmý k osi CCHM2 - pri pohybe tienidla pripojeného na stojane, ktorý sa môže pohybovať kolmo k osi CCHM2 musí stopa justážného laseru ostáť nehybná
 - 2) Nastavenie osi expandéra laserového zväzku tak, aby bola kolmá k osi CCHM2 - odrazený zväzok justážného laseru od rovinného zrkadla pripojeného na vodiacej doske (19) musí vytvoriť stopu v rovnakom mieste odkiaľ z laseru vyšiel
 - 3) Nastavenie polohy dichroického zrkadla DM₁ - laserový zväzok optickej pinzety a justážného laseru CCHM2¹⁵ musia dopadať do stredu dichroického zrkadla DM₁, do stredu mikroskopového objektívu¹⁶ a justážny laser CCHM2 musí dopadať do stredu šošovky L₃¹⁷
 - 4) Presná kolimácia laserového zväzku optickej pinzety otáčaním expandérovej matice (44) - stopa laseru sa musí ostro zobrazovať v rovine pozorovania
 - 5) Nastavenie konjugovanej vzdialenosť otáčaním konjugačnej matice - pri pohybe GO zrkadlami musí stopa laseru ostáť nehybná na tienidle pripojenom na držiaku mikroskopového objektívu.

¹⁴Nulová poloha odpovedá uhlu natočenia GO zrkadiel pri ktorom odrazený laserový zväzok mieri do stredu šošovky L₂ a zároveň je rovnobežný s osou expandéra.

¹⁵Justážny laser CCHM2 je zavedený namiesto zdroja svetla.

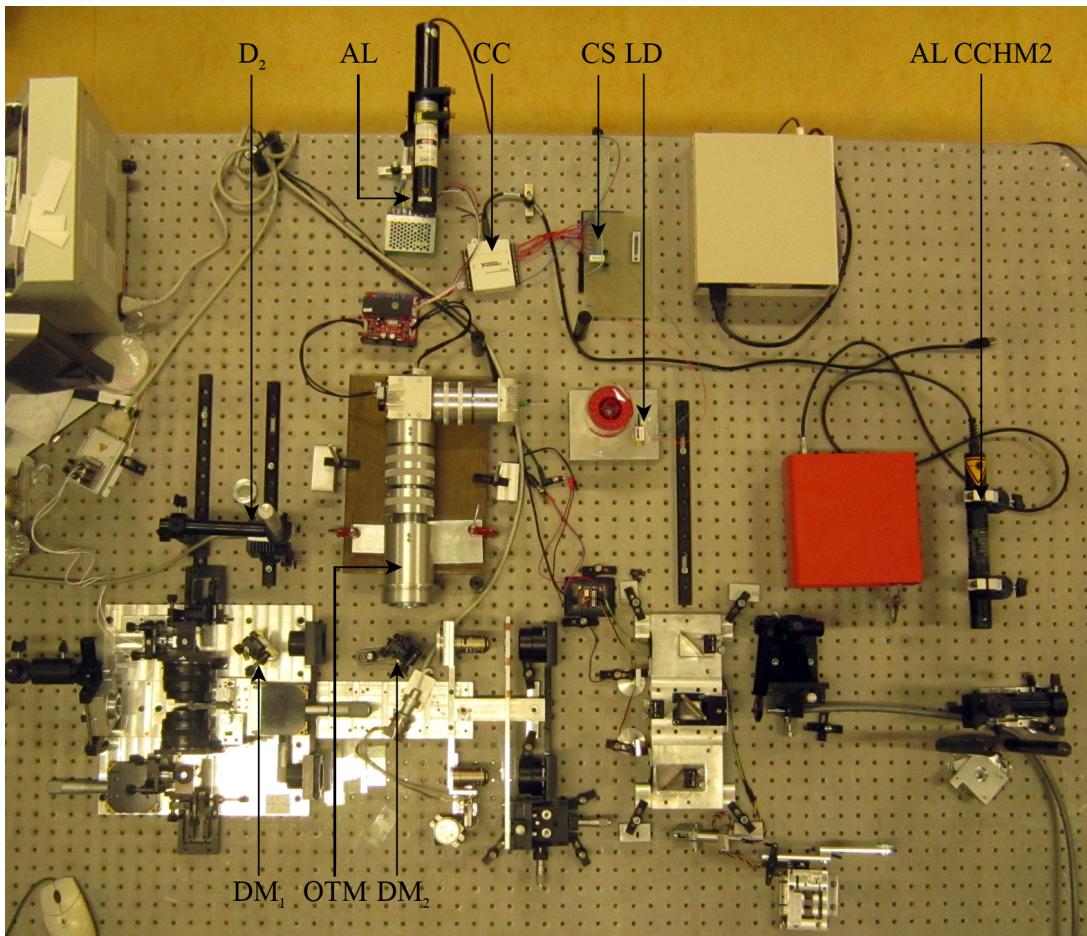
¹⁶Stopa laseru je sledovaná na tienidle pripojenom na držiaku mikroskopového objektívu.

¹⁷Stopa justážného laseru CCHM2 je sledovaná na tienidle pripojenom na prírube.

Kapitola 5

Experimenty

Laserová pinzeta pripojená k laboratórnej verzií CCHM2 je zobrazená na obrázku 5.1. Usporiadanie sa zhoduje so schémou na obrázku 2.1 v časti 2.2 so zmenami uvedenými v časti 4.6.



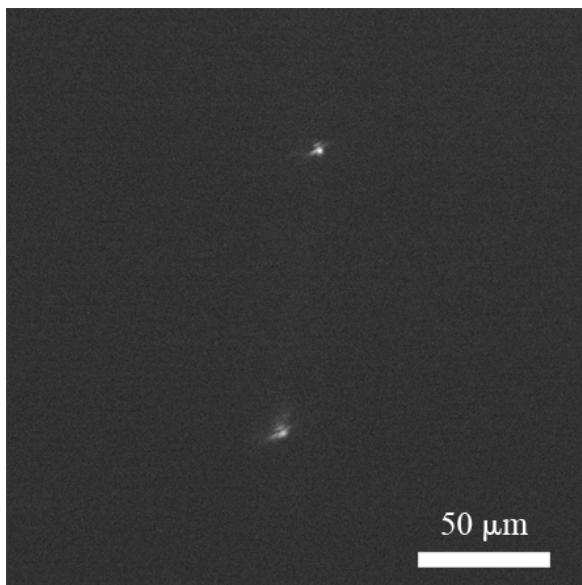
Obr. 5.1: Laserová pinzeta pripojená k laboratórnej verzií CCHM2. D_2 - detektor, AL - justovací laser, CC - riadiaca karta, CS - prúdový zdroj, LD - laserová dióda, AL CCHM2 - justovací laser pre CCHM2, DM - dichroické zrkadlá, OTM - modul laserovej pinzety.

5.1. RÝCHLOSTЬ POHYBU GO ZRKADIEL

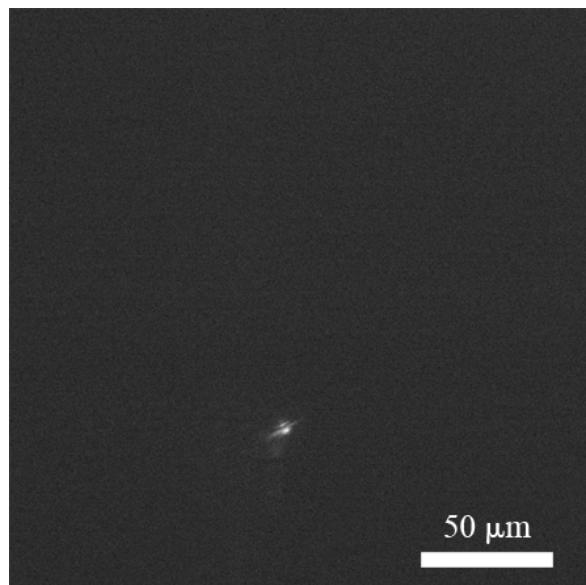
5.1. Rýchlosť pohybu GO zrkadiel

Kvôli testovaniu rýchlosťi pohybu GO zrkadiel bolo v experimentálnej zostave ako vzorka použité zrkadlo PF10-03-G01 od spoločnosti THORLABS GmbH. Stopa laserového zväzku vzniknutá na zrkadle bola objektívom (CFI Plan 10x, NA = 0,25, W.D. = 10,5 mm) zoobrazená na kameru D₂ (MR285MC BH, 1,45M, 9,0 × 6,7 mm, CCD B/W, IEEE1394A) od spoločnosti Ximea GmbH). GO zrkadlo bolo ovládané skokovým napäťím ±1 V, čomu odpovedá uhol náklon ±4°, s najvyššou opakovacou frekvenciou, ktorú softvér a ovládacia karta povoľujú. Na kamere D₂ bola sledovaná poloha stopy laseru a menený expozičný čas. Pri expozičiach nad 5 ms boli viditeľné na obrazovke dve stopy (obrázok 5.2), z čoho vyplýva, že laserová stopa sa stihla premiestniť medzi pozíciami. Pri expozičných časoch 5 ms a menej bola na obrazovke zreteľná len jedna stopa (obrázok 5.3). Na obrázku 5.2 nie je badateľná stopa medzi prepínanými polohami, z čoho je zrejmé, že čas potrebný na presun medzi polohami je výrazne menší ako čas, ktorý laserová stopa zotrvá v určenej polohe.

Z experimentu je možné určiť maximálnu skenovaciu rýchlosť GO zrkadiel na 200 pps pri náklone GO zrkadla ±4°. Taktiež je možné usúdiť, že aj pri takto veľkých výchylkách laserového zväzku je rýchlosť pohybu GO zrkadiel postačujúca na vytvorenie časovo zdieľaných optických pascí a nie je nutné vypínať laser pri presune medzi jednotlivými polohami.



Obr. 5.2: Obraz stopy laseru pri expozičnom čase viac ako 5 ms.



Obr. 5.3: Obraz stopy laseru pri expozičnom čase 5 ms a menej.

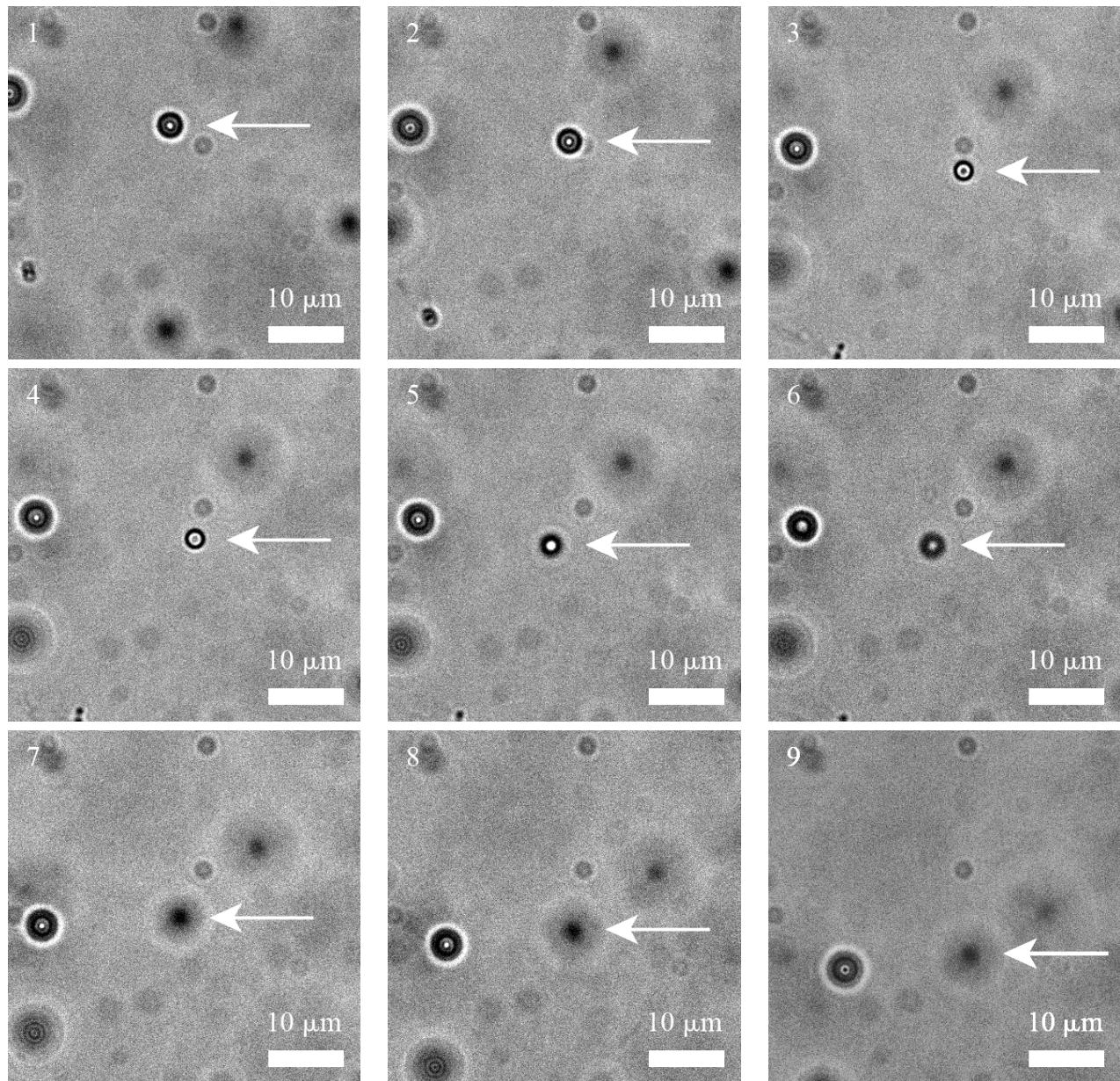
5.2. Sledovanie silových účinkov laserovej pasce

Počas justáže sa nepodarilo nastaviť polohu optickej pasce do roviny pozorovania, jej poloha sa nachádzala pod ohniskovou rovinou objektívu¹. Na overenie funkčnosti optickej pasce bol použitý laser Lumics LU1064M250² (vlnová dĺžka 1064 nm, maximálny výkon v kontinuálnom móde 250 mW). Ako testovacie objekty boli použité polystyrénové guľôčky s priemerom $2\text{ }\mu\text{m}$ umiestnené vo vode. Na sérií snímokou, ktoré sú usporiadane zľava doprava, zhora dole, na obrázku 5.4 je vidieť silové účinky laserovej pasce. Vplyvom gravitácie sa pri pozorovaní polystyrénové guľôčky pohybovali smerom nadol. Guličky, ktoré sa dostali do blízkosti optickej pasce boli posunuté do osi laserového zväzku a vplyvom radiačného tlaku posunuté pod ohniskovú rovinu objektívu do optickej pasce, v ktorej nezostali zachytené, ale pohybovali sa v smere nadol. Pravdepodobnou príčinou nezachytenia častice v optickej pasci bol nedostatočný výkon laseru, ktorý spôsobila nízka odrazivosť GO zrkadiel a straty vzniknuté na dichroickom zrkadle DM₁. Výkon laserového zväzku v optickej pasci je možné odhadnúť na základe odrazivosti GO zrkadiel, ktorá je počas merania uvedeného v časti 4.3 pre vlnovú dĺžku 1064 nm 49%, a odrazivosti dichroického zrkadla DM₁ na 12% z počiatočného výkonu. To znamená, že pri maximálnom výkone použitej laserovej diódy výkon laserového zväzku v mieste optickej pasce je 30 mW.

¹CFI Plan Apo VC 60x Oil.(NA=1,40, W.D.=0.13mm) od spoločnosti Nikon Instruments Inc.

²Zapožičal Ing. Mojmír Šerý, Ph.D. z Ústavu pribstrojové techniky AV ČR.

5.2. SLEDOVANIE SILOVÝCH ÚČINKOV LASEROVEJ PASCE



Obr. 5.4: Sekvencia snímkou zobrazujúca silové účinky optickej pasce.

Kapitola 6

Záver

Cieľom diplomovej práce bol návrh, realizácia a otestovanie optickej pinzety pre CCHM2 tak, aby optická pinzeta tvorila samostatný modul k CCHM2. Navrhnuté riešenie využíva galvano-optické zrkadlá na polohovanie optickej pasce v rovine mikroskopového objektívu. Optická pinzeta je zavedená do CCHM2 dichroickým zrkadlom umiestneným v priestore medzi tubusovou šošovkou a mikroskopovým objektívom. Variabilné nastavenie vzdialenosť medzi montážnou prírubou modulu optickej pinzety a zadnou apertúrou mikroskopového objektívu umožní vradenie ďalších prídavných modulov, ako napr. optického skalpela.

Súčasťou diplomovej práce je popis usporiadania CCHM2, teoretický popis fungovania optickej pasce spolu s výpočtom síl v nej pôsobiacich, spôsoby merania tuhosti optickej pasce a princíp vytvorenia časovo zdielaných optických pascí.

Navrhovaný modul optickej pinzety bol podrobne popísaný, prepočítaný a boli uvedené nutné podmienky pre zostavenie. Práca obsahuje optickú schému usporiadania jednotlivých prvkov spolu s ich názvami. Návrh bol teoreticky nasimulovaný v programe ZEMAX, verzia 2005 a bola spravená jeho optimalizácia s cieľom dosiahnutia minimálnej veľkosti stopy laserového zväzku v ohniskovej rovine mikroskopového objektívu. Geometrické optické vady boli vykompenzované do takej miery, že hlavnou aberáciou v systéme je difrakcia. Bolo spravené experimentálne meranie odrazivosti GO zrkadiel.

Bol vytvorený 3D model mechanického riešenia modulu laserovej pinzety v programe SolidWorks 2006, ktorý zaistoval možnosť presného nastavenia vzdialenosťí medzi jednotlivými prvkami systému. Súčasťou práce bolo taktiež vypracovanie výrobnej výkresovej dokumentácie optickej pinzety. Výkresová dokumentácia je uvedená v prílohe.

V práci bol navrhnutý, postavený a otestovaný prúdový zdroj napájania laserovej pinzety, ktorý umožňuje kontrolovanie výstupného výkonu laserovej diódy. Prúdový zdroj je možné ovládať, rovnako ako uhol natočenia GO, riadiacou kartou pripojenou k PC.

Podrobne bol popísaný spôsob nastavenie jednotlivých elementov modulu laserovej pinzety, zavádzacieho dichroickeho zrkadla DM_1 a dichroického zrkadla DM_2 odkláňajúceho obraz na detektor D_2 .

Experimentálne bola overená rýchlosť pohybu GO zrkadiel, z ktorej vyplynulo, že usporiadanie je teoreticky schopné vytvárať časovo zdielané optické pasce a pri presune medzi jednotlivými polohami nie je nutné vypínať laserovú diódu.

Bol uskutočnený experiment na zachytenie polystyrénových guľôčok umiestnených vo vode, ktoré sa vplyvom gravitácie pohybovali. Pri experimente sa poloha optickej pasce nachádzala pod rovinou pozorovania. Pri experimente boli viditeľné silové účinky optickej pasce - pohyb guľôčok z roviny pozorovania do roviny optickej pasce, aj keď sa nepodarilo žiaden z testovaných objektov zachytiť. Pravdepodobnou príčinou nezachytenia objektov je nízka tuhost' optickej pasce spôsobená nízkym výkonom laseru v optickej pasci. Tento nedostatok je možné odstrániť zvýšením odrazivosti GO zrkadiel, ideálne na hodnotu blízku 100% a zakúpením laseru s vyšším maximálnym výkonom.

Do budúcnosti je cieľom odstránenie nedostatkov návrhu, ktorými sú nízka odrazivosť GO zrkadiel a zlá nastaviteľnosť optickej pasce do roviny pozorovania. Po odstránení nedostatkov bude možné experimentálne otestovať zachytenie polystyrénových guľôčok, zmerať tuhost' optickej pasce, vytváranie časovo zdielaných optických pascí, zachytávanie živých buniek a baktérii.

Literatúra

- [1] DAVIES, H. G. a WILKINS, M. H. F. Interference Microscopy and Mass Determination. *Nature*. 1952-3-29, roč. 169, č 4300, s. 541-541.
- [2] CHMELÍK, R. a HARNA, Z. Parallel-mode confocal microscope. *Optical Engineering*. 1999, 38, 10, s. 1635-1639.
- [3] KOLMAN, P. a CHMELÍK, R. Coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*. 2010, 18, 21, s. 21990-22003.
- [4] SLABÝ, T. 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.
- [5] STRAKA, B. Komponenty pro laserovou mikromanipulaci v koherenci řízeném digitálním holografickém mikroskopu. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2011. 57 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Zbyněk Dostál.
- [6] CHANG, B. J., ALFERNESS, R. a LEITH, E. N. Space-invariant achromatic grating interferometers: theory. *Applied Optics*. 1975, roč. 14, č. 7, s. 1592-.
- [7] Lebedev, P. N. Experimental examination of light pressure. *Annalen der Physik*. 1901, č. 6, s. 433–458.
- [8] ASHKIN, A. Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Physical Review Letters*. 1970, roč. 24, č. 4, s. 156-159.
- [9] Ashkin A. a DZIEDZIC J. M. Optical Levitation by Radiation Pressure. *Applied Physics Letters*. 1971, roč. 19, č. 8, s. 283-285.
- [10] ASHKIN, A. a DZIEDZIC J. M. Optical Levitation of Liquid Drops by Radiation Pressure. *Science*. 1975, roč. 187, č. 4181, s. 1073-1075.
- [11] ASHKIN, A. Trapping of Atoms by Resonance Radiation Pressure. *Physical Review Letters*. 1978, roč. 40, č. 12, s. 729-732.
- [12] ASHKIN, A. et al. Observation of a Single-Beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles. *Optics Letters*. 1986, roč. 11, č. 5, s. 288-290.

LITERATÚRA

- [13] BLOCK, S. M. Real engines of creation. *Nature*. 1997-3-20, roč. 386, č. 6622, s. 217-219.
- [14] BUSTAMANTE, C., BRYANT, Z. a SMITH, S. B. Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics. *Nature*. 2003-1-23, roč. 421, č. 6921, s. 423-427.
- [15] MEHTA, A. D. et al. Single-Molecule Biomechanics with Optical Methods. *Science*. roč. 283, č. 5408, s. 1689-1695.
- [16] GRIER, D. G. Optical tweezers in colloid and interface science. *Current opinion in colloid & interface science*. 1997, roč. 2, č. 3, s. 264-270.
- [17] GRIER, D. G. A revolution in optical manipulation. *Nature*. 2003-8-14, roč. 424, č. 6950, s. 810-816.
- [18] WANG, K., FORBES, J. G. a JIN, A. J. Single molecule measurements of titin elasticity. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2001, roč. 77, č. 1, s. 1-44.
- [19] ASHKIN, A. 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.
- [20] ASHKIN, A. et al. Observation of a Single-Beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles. *Optics Letters*. 1986, roč. 11, č. 5, s. 288-290.
- [21] ZEMÁNEK, P. et al. Theoretical comparison of optical traps created by standing wave and single beam. *Optics Communications*. 2003, roč. 220, 4-6, s. 401-412.
- [22] ZEMÁNEK, P. et al. Simplified description of optical forces acting on a nanoparticle in the Gaussian standing wave. *Journal of the Optical Society of America A*. 2002, roč. 19, č. 5, s. 1025-.
- [23] JONÁŠ, A. et al. Single-beam trapping in front of reflective surfaces. *Optics Letters*. 2001, roč. 26, č. 19, s. 1466-.
- [24] ZEMÁNEK, P. et al. Optical trapping of nanoparticles and microparticles by a Gaussian standing wave. *Optics Letters*. 1999, roč. 24, č. 21, s. 1448-.
- [25] ZEMÁNEK, P. et al. Optical trapping of Rayleigh particles using a Gaussian standing wave. *Optics Communications*. 1998, roč. 151, 4-6, s. 273-285.
- [26] ČIŽMÁR, T. et al. Sub-micron particle organization by self-imaging of non-diffracting beams. *New Journal of Physics*. 2006-03-01, roč. 8, č. 3, s. 43-43.
- [27] ČIŽMÁR, T., ŠILER M., ZEMÁNEK P. An optical nanotrap array movable over a milimetre range. *Applied Physics B*. 2006, roč. 84, 1-2, s. 197-203.
- [28] ASHKIN, A. et al. Forces of a Single-Beam Gradient Laser Trap on a Dielectric Sphere in the Ray Optics Regime. *Biophysical Journal*. 1992, roč. 61, č. 2.

- [29] *Http://physicsworld.com/* [online]. 2009 [cit. 2013-29-4]. Optical tweezers: where physics meets biology. Dostupné z WWW: <<http://physicsworld.com/cws/article/indepth/36652>>.
- [30] BARTON, J. P., ALEXANDER, D. R. a SCHaub, S. A.. Theoretical determination of net radiation force and torque for a spherical particle illuminated by a focused laser beam. *Journal of Applied Physics*. 1989, roč. 66, č. 10, s. 4594-.
- [31] GUSSGARD, R., LINDMO, T. a BREVIK, I. Calculation of the trapping force in a strongly focused laser beam. *Journal of the Optical Society of America B*. 1992, roč. 9, č. 10, s. 1922-.
- [32] SVOBODA, K. a BLOCK S. M. Biological Applications of Optical Forces. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 1994, roč. 23, č. 1, s. 247-285.
- [33] MAZOLLI, A. et al. Theory of Trapping Forces in Optical Tweezers. *ACS Nano*. 2003, roč. 7, č. 2, s. 1725-1730.
- [34] NEUMAN, K. C. a BLOCK, S. M. Optical trapping. *Review of Scientific Instruments*. 2004, roč. 75, č. 9, s. 2787-.
- [35] JONÁŠ, A. a ZEMÁNEK, P. Light at work: The use of optical forces for particle manipulation, sorting, and analysis. *ELECTROPHORESIS*. 2008, roč. 29, č. 24, s. 4813-4851.
- [36] SASAKI, K. et al. Pattern formation and flow control of fine particles by laser-scanning micromanipulation. *Optics Letters*. 1991, roč. 16, č. 19, s. 1463-.
- [37] MIO, C. a MARR D. W. M. Tailored Surfaces Using Optically Manipulated Colloidal Particles. *Langmuir*. 1999, roč. 15, č. 25, s. 8565-8568.