

Bachelorarbeit

Verfasser: Malte Gienow

Fachbereich: Angewandte Naturwissenschaften - Biomedizintechnik

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Dipl.-Phys. Mathias Beyerlein

Datum der Abgabe: 24.03.2017

Thema: *Entwicklung und Erprobung einer hochsensitiven Detektoroptik für die Multiphotonenmikroskopie*

Zusammenfassung

Die Multiphotonenmikroskopie ist eine geeignete Mikroskopiertechnik, wenn es um die hochaufgelöste Aufnahme vielschichtiger und dicker Proben geht. Jedoch wird dabei die Sammeleffizienz der Fluoreszenz durch die Numerische Apertur des Objektivs und Streuprozesse in der Probe begrenzt, wodurch nur ein geringer Anteil der Fluoreszenzstrahlung detektiert werden kann. Durch die Konstruktion einer neuen Detektoroptik mit Hyperboloid-Reflektor, welcher die Probe umgibt, konnte in Kombination mit einer neuen Sammeloptik gezeigt werden, dass die Sammeleffizienz der Fluoreszenz und gleichzeitig das Signal-Rausch-Verhältnis (SRV) erheblich verbessert werden konnten. Eine Optiks simulation mittels *OpticStudios* prognostizierte eine 6,1-fache Verbesserung in der Sammeleffizienz und damit eine 2,5-fache Verbesserung des SRV durch die neue *Vorwärtsdetektion*. Für die neue Detektoroptik bestehend aus Reflektor, 4-fach-Detektor und Sammeloptik wurde eine komplett neue Konstruktion entwickelt. Der Reflektor wurde aus Edelstahl gedreht, poliert und anschließend galvanisch versilbert. Zeitgleich wurde an der Entwicklung eines Schutzglases aus Borosilikatglas für die Silberschicht gegen aggressive Medien wie Dibenzylether gearbeitet. Der neue 4-fach-Detektor wurde für die Aufnahme von 2“-Optiken konstruiert. Nach Fertigstellung der neuen Detektoroptik wurde das *2-Photon Horizontal Microscope* der Firma LaVision BioTec um diese erweitert. Die Erprobung dieser neuen *Vorwärtsdetektion* zeigten für fluoreszierende Beads (Sicastar[®]-greenF) eine effektive Steigerung

der Sammeleffizienz gegenüber der konventionellen *Whole-Area Detection* um das 3,7-fache (61% des prognostizierten Werts). Weiterhin konnte mit einem Agarosegel aus Rhodamin B eine 1,8-fache (73% des prognostizierten Werts) Verbesserung des SRV gezeigt werden. Die Steigerung der Sammeleffizienz und die Verbesserung des SRV ermöglichen es die Laserleistung bei gleichbleibender Signalstärke und Kontrast zu reduzieren. Außerdem werden kontrastreiche Bilder starkstreuender Proben ermöglicht. Durch die reduzierte Laserleistung können Photoschäden und Photobleichen minimiert und dadurch längere Messstudien an lebenden Proben durchgeführt werden. Weiterhin kann eine gesteigerte Sammeleffizienz stark streuender Photonen eine erhöhte Eindringtiefe ermöglichen.

Abstract

Multiphoton microscopy is a particularly useful microscopy technique to obtain high-resolution optical images deep in biological tissue. However, fluorescence collection by conventional *Whole-Area Detection* are limited by the numerical aperture of the microscope objective and scattering processes of the specimen. The construction of a novel optical component allowing efficient collection of fluorescence light. A hyperbolic reflector, which surrounds the specimen, in combination with a collector optic was designed to increase fluorescence collection and signal-to-noise ratio (SNR) homogeneously during *forward detection*. Theoretical simulations in *OpticStudio* predicted a 6.1-fold improvement in collection efficiency and a 2.5-fold improvement in SNR. Reflector, 4-port-detector and collecting optic are the main parts of the new *forward detection*. The reflector made of stainless steel was lathed, polished and electrosilvered. A borosilicate glass in the shape of the reflector was developed to protect the silver layer from aggressive substances like dibenzyl ether. The 4-port-detector was designed for the new 2'' collector optic and added to *2-Photon Horizontal Microscope* from LaVision BioTec. Experiments of the new forward detection in this work have shown a 3.7-fold (61% of predicted) improvement in collection efficiency using green labeled fluorescence Beads (Sicastar[®]-greenF) and a 1.8-fold (73% of predicted) improvement in SNR using an agarose gel containing Rhodamin B compared to conventional WAD. Due to improved fluorescence collection efficiency, less laser power is needed to yield the same signal and contrast which leads to reduces Photodamage and Photobleaching. This might enable long-term studies on living specimens e.g. embryos and stem cells. The increase in collection efficiency of scattered fluorescence permits deeper Imaging.