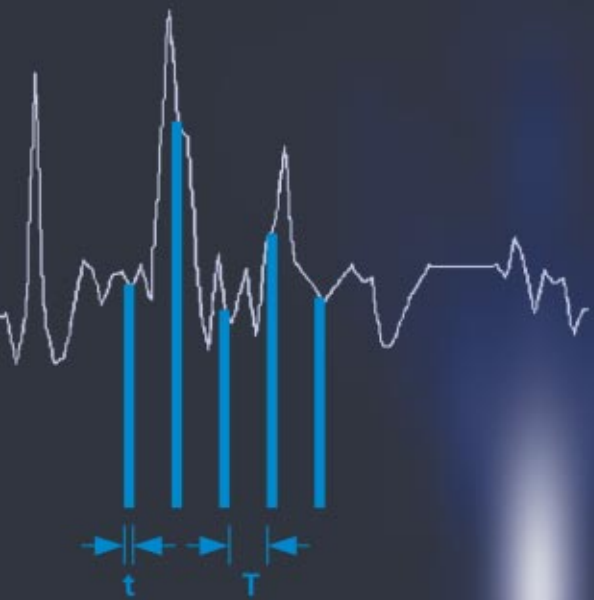


## Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie



**Optische Abbildung**  
**Elektronische Signalverarbeitung**



## Highlights der Laser Scanning Mikroskopie

### 1982

Das erste Laser Scanning Mikroskop von Carl Zeiss.  
Der Prototyp der Baureihe LSM 44 steht heute im Deutschen  
Museum in München.



### 1988

Das LSM 10 – ein konfokales System  
mit zwei Fluoreszenzkanälen.

### 1991

Das LSM 310 vereinigt die konfokale  
Laser Scanning Mikroskopie  
mit modernster PC-Technologie.



### 1992

Das LSM 410 bezieht auch inverse  
Mikroskope in das LSM-Konzept ein.

### 1997

Erstes System der Reihe LSM 510.



### 1998

Modell LSM 510 NLO, ausgestattet  
für die Multiphotonen-Mikroskopie.

### 1999

LSM 5 PASCAL – das persönliche  
Laser Scanning Mikroskop.

### 2000

Das LSM 510 wird mit dem  
Fluoreszenz Korrelations Spektro-  
skop ConfoCor 2 kombiniert.



### 2001

LSM 510 META.

## **Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie**

Das konfokale Laser Scanning Mikroskop (LSM) hat sich in den letzten Jahren zu einem etablierten und weit verbreiteten Forschungsinstrument entwickelt.

Das Ziel dieser Broschüre ist es, einen theoretisch fundierten Überblick über die Besonderheiten der Bilderzeugung in einem konfokalen LSM zu vermitteln.

In Biologie und Medizin sind fluoreszenzmikroskopische Aufgabenstellungen des LSM vorherrschend. Im Transmissionsmodus können jedoch auch herkömmliche Kontrastverfahren wie z.B. der differentielle Interferenzkontrast (DIC) realisiert werden. Die Überlagerung mit einem konfokalen Fluoreszenzbild der gleichen Probenstelle ist ebenfalls möglich.

Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet ist die Materialkunde. Hierbei ist insbesondere der Reflexionsmodus des LSM einschließlich solcher Verfahren wie Polarisationskontrast gefragt.

Verwendung finden konfokale Mikroskope jedoch auch in Routineanwendungen im Rahmen der industriellen Qualitätssicherung. Die konfokale Abbildung ermöglicht hier z.B. die effektive Suche nach Fehlstellen in Halbleiterschaltkreisen.

# Inhalt

<b>Einführung</b>	<b>2</b>
-------------------	----------

## Teil 1 **Optische Abbildung**

<b>Punktbildverwaschungsfunktion</b>	<b>6</b>
<b>Auflösung und Konfokalität</b>	<b>8</b>
Auflösung	9
Geometrisch-optische Konfokalität	10
Wellenoptische Konfokalität	12
Überblick	15

## Teil 2 **Signalverarbeitung**

<b>Punktabtastung und Digitalisierung</b>	<b>16</b>
Arten der A/D-Wandlung	17
Nyquist-Theorem	18
Pixelgröße	19
<b>Rauschen</b>	<b>20</b>
Auflösung und Schrotrauschen – Auflösungswahrscheinlichkeit	21
Verbesserung des SNR	23
<b>Zusammenfassung</b>	<b>25</b>
<b>Glossar</b>	<b>26</b>

## **Details**

<b>Pupillenausleuchtung</b>	<b>I</b>
<b>Optische Koordinaten</b>	<b>II</b>
<b>Fluoreszenz</b>	<b>III</b>
<b>Rauschquellen</b>	<b>V</b>

## Literatur

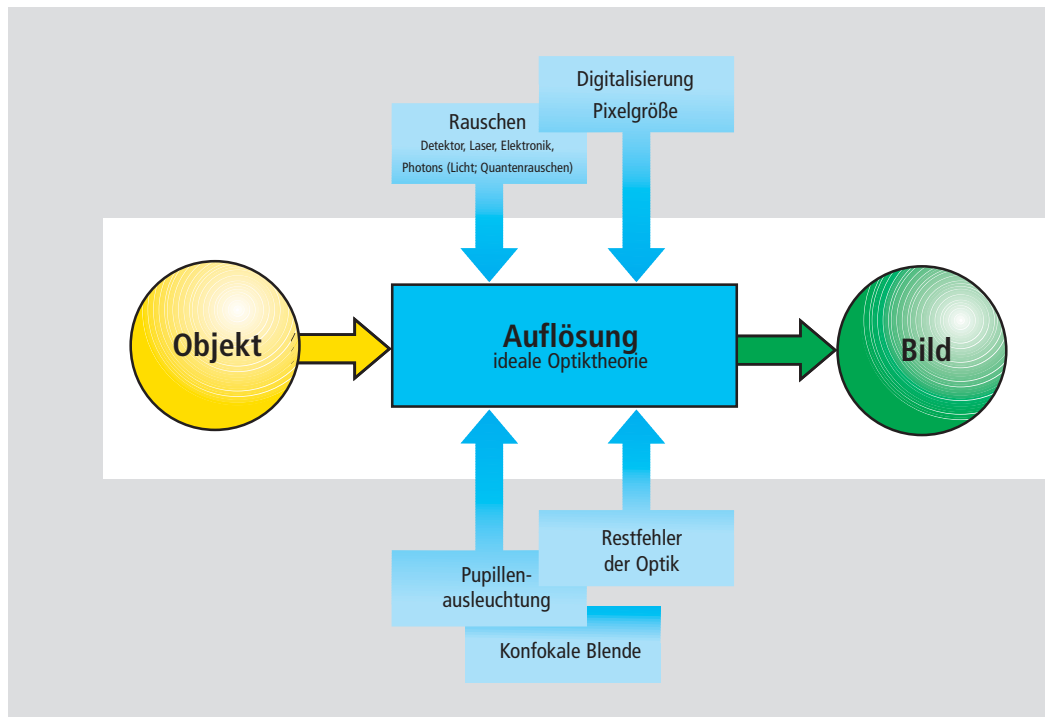
Zunächst soll auf die grundlegenden Unterschiede zwischen dem konventionellen und dem konfokalen Mikroskop eingegangen werden. Daran anschließend werden die Besonderheiten eines konfokalen LSM und die sich daraus ergebenden Möglichkeiten herausgestellt. Die Verhältnisse in Fluoreszenzanwendungen werden insgesamt vorrangig behandelt.

*Abb. 1 Anders als in einem konventionellen Mikroskop wird die Abbildungsqualität in einem konfokalen LSM nicht ausschließlich durch die Optik beeinflusst, sondern z.B. auch durch die konfokale Blende (Pinhole) und die Digitalisierung der Objektinformation (Pixelgröße). Das Rauschen des Lichts (Laserrauschen bzw. Schrotrauschen des Fluoreszenzlichts) spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. Im Hinblick auf niedriges Rauschen müssen auch signalverarbeitende optoelektronische und elektronische Komponenten optimiert werden.*

### Bilderzeugung

Die vollständige Generierung der zweidimensionalen Objektinformation aus der Fokusebene (Objektebene) eines konfokalen LSM umfasst im wesentlichen drei Verarbeitungsschritte:

1. Zeilenweises Abrastern der Probe mit einem fokussierten Laserstrahl, der mittels zweier galvanometrisch betriebener Scanner in x- und y-Richtung abgelenkt wird.
2. Pixelweise Detektion der vom jeweils abgetasteten Probenort emittierten Fluoreszenzstrahlung über einen Sekundärelektronenvervielfacher (PMT).
3. Digitalisierung der nach dem PMT als elektrisches Signal vorliegenden Objektinformation. (Die Darstellung auf dem Bildschirm erfolgt durch pixelweises Ausgeben der Bilddaten aus einem digitalen Bildspeicher).



## Der Scanprozess

Im konventionellen Lichtmikroskop erfolgt die Transformation vom Objekt zum Bild für alle Objektpunkte gleichzeitig, also parallel. Dagegen wird in einem konfokalen LSM die Probe punktweise, d.h. seriell bestrahlt, und die physikalische Wechselwirkung, die das Laserlicht in der gerade bestrahlten Objektstelle hervorruft (z.B. die Fluoreszenz) wird entsprechend punktweise gemessen. Informationen über die gesamte Probe erhält man nur dann, wenn der Laserstrahl über die Probe, oder die Probe relativ zum feststehenden Laserstrahl bewegt wird. Man bezeichnet konfokale Systeme aufgrund dieser Zusammenhänge als Punktscanner.

Im Folgenden wird ausschließlich das Prinzip des Punktscanners behandelt, wie es u.a. in den Laser Scanning Mikroskopen von Carl Zeiss realisiert ist. Gerätetechnische Lösungen, in denen mehrere Objektpunkte gleichzeitig bestrahlt werden, werden nicht berücksichtigt.

## Der konfokale Strahlengang

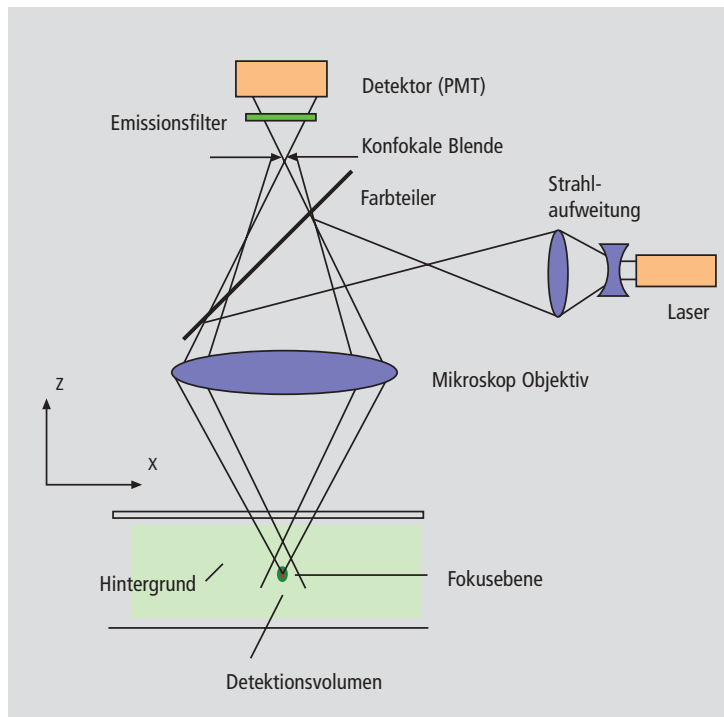
Die entscheidende Besonderheit eines konfokalen LSM gegenüber einem konventionellen Lichtmikroskop ist eine konfokale Blende (Pinhole (PH)), die in einer zur Zwischenbildebene und damit auch zur Objektebene des Mikroskops konjugierten Ebene angeordnet ist. Daraus ergibt sich, dass durch den Detektor (PMT) nur Licht detektiert werden kann, welches diese Blende passiert hat. Der Durchmesser der Blende ist variabel und im Idealfall unendlich klein (punktförmige Detektion).

Da der beugungsbegrenzt fokussierte Laserstrahl einer punktförmigen Beleuchtung des Objekts entspricht und des Weiteren Beleuchtungs- und Beobachtungspunkt ineinander abgebildet werden (konjugierte Ebenen), spricht man von einem konfokalen Strahlengang (siehe Abbildung 2).

## Die konfokale Blende (Pinhole)

Der Durchmesser der konfokalen Blende legt fest, in welchem Maß Licht von Objektpunkten außerhalb der Fokusebene ausgeblendet wird. Die ausgeblendeten Bereiche des Objekts sind im Bild unsichtbar. Das konfokale Mikroskop als optisches System ist somit inhärent tiefendiskriminierend. Über den variablen Blendendurchmesser ist es möglich, den Grad der Konfokalität zu variieren und den praktischen Erfordernissen anzupassen. Bei voll geöffneter Blende spricht man von nicht-konfokaler Abbildung. Ein zusätzlich vorteilhafter Effekt der konfokalen Blende ist ihre streulichtunterdrückende und damit kontraststeigernde Wirkung.

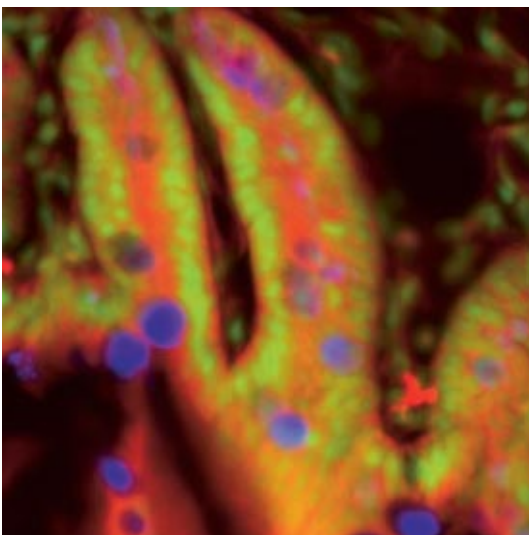
Abb. 2 Strahlengang in einem konfokalen LSM. Ein Laserstrahl wird über ein Mikroskopobjektiv in die Probe fokussiert und dient dort z.B. zur Erzeugung von Fluoreszenzstrahlung. Diese wird über das Objektiv gesammelt und über einen Farbteiler effizient zum Detektor weitergeleitet. Über ein Emissionsfilter wird der interessierende Wellenlängenbereich des Fluoreszenzspektrums selektiert und zusätzlich die zur Anregung verwendete Laserlinie abgeblockt. Vor dem Detektor befindet sich die konfokale Blende. Licht aus Ebenen über oder unter der Fokusebene trifft defokussiert auf die Blende und trägt nicht zur Bildentstehung bei.



### Optische Schnitte

Mit einem konfokalen LSM ist es somit möglich, aus einer dicken Probe (typisch bis 100 µm) ausschließlich eine dünne Präparatschicht, einen sogenannten optischen Schnitt, abzubilden, der bei entsprechenden Aufnahmebedingungen eine z-Ausdehnung von weniger als 500 nm aufweisen kann.

Der grundsätzliche Vorteil des konfokalen LSM gegenüber einem konventionellen Lichtmikroskop ist offensichtlich. Zum Beispiel können in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie dicke biologische Präparate nur dann scharf abgebildet werden, wenn ihre z-Ausdehnung nicht größer ist als die wellenoptische Tiefenschärfe des verwendeten Objektivs. Wird diese Bedingung nicht erfüllt, wird die scharfe Bildinformation aus der interessierenden Objektebene mit unscharfer Bildinformation aus außerfokalen Ebenen überlagert. Dadurch erhöht sich der detektierte Streulichtanteil und der Kontrast des Bildes nimmt ab. Des Weiteren kommt es bei simultaner Beobachtung von Mehrfachfärbungen zur farblichen Vermischung der Bildinformationen aus den beteiligten Kanälen (siehe Abbildung 3, links).

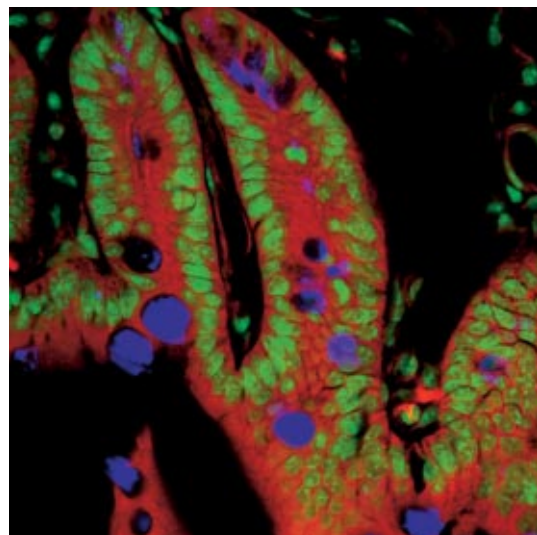


Ein konfokales LSM kann somit bei Fluoreszenzapplikationen gerade dann vorteilhaft eingesetzt werden, wenn dicke Präparate (wie z.B. biologische Zellen in ihrem Gewebeverbund) untersucht werden. Durch die Möglichkeit des optischen Schneidens entfallen die in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie mit solchen Präparaten verbundenen Nachteile. Bei Mehrfachfärbungen gelingt zudem die simultane Aufnahme und Darstellung der einzelnen Kanäle bei hinreichender Kanaltrennung.

Die Hauptanwendung bei reflektierenden Präparaten liegt in der Untersuchung dreidimensionaler Oberflächenstrukturen (Topographie).

Abbildung 3 verdeutlicht die Leistungsfähigkeit eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops.

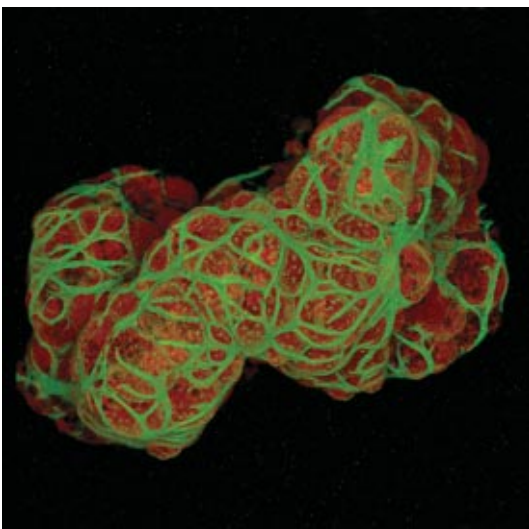
*Abb. 3 Nichtkonfokale (links) und konfokale (rechts) Abbildung eines dreifach gefärbten Zellverbandes (Schnitt durch einen Mäusedarm). Im nichtkonfokalen Bild werden die interessierenden Informationen aus der Fokalebene durch außerfokale Präparatebenen überlagert; unterschiedlich gefärbte Präparatstellen erscheinen farblich gemischt. In der konfokalen Darstellung (rechts) werden Objekteinzelheiten deutlich sichtbar, die im nichtkonfokalen Bild nur verschwommen zu sehen sind. Die Abbildung ist insgesamt kontrastreicher.*



## Die 3. Dimension

Das optische Schneiden eröffnet jedoch nicht nur die Möglichkeit, eine einzige Ebene eines dicken Präparates kontrastreich zu beobachten, sondern erlaubt es zusätzlich, über eine kontrollierte Bewegung des Präparates in Richtung der optischen Achse (z) eine Vielzahl optischer Schnitte aus verschiedenen Präparatebenen aufzunehmen. Das Ergebnis ist ein dreidimensionaler Datensatz, mit dem Erkenntnisse über die räumliche Struktur des Objekts gewonnen werden können. Genauigkeit und Qualität der Information sind u.a. abhängig von der Dicke des optischen Schnitts und dem Abstand zwischen zwei Schnitten (optimale Abtastrate in z-Richtung = 0,5x optische Schnittdicke). Aus einem solchen Datensatz lassen sich rechenstechnisch verschiedene Ansichten des Objekts (3D-Rekonstruktion, beliebig orientierte Schnitte im Raum, Stereo-Bildpaare usw.) erzeugen. Ein Beispiel für eine aus einem 3D-Datensatz errechnete 3D-Rekonstruktion zeigt Abbildung 4.

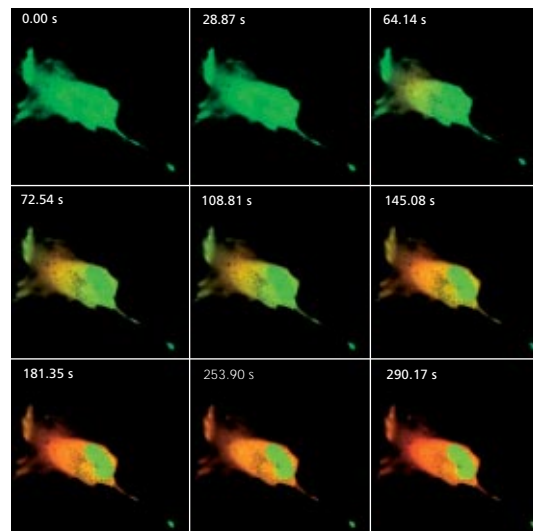
Abb. 4 3D-Projektion, rekonstruiert aus 108 Einzelbildern eines dreidimensionalen Datensatzes von Epithelzellen aus der Tränendrüse. Aktin-Filamente der Myoepithelzellen markiert mit BODIPY-FL Phalloidin (grün), Zytoplasma und Kerne der Azinuszellen mit Ethidium Homodimer-1 (rot).



## Zeitreihen

An Bedeutung gewinnt auch die Untersuchung lebender Proben, die dynamische Veränderungen bis in den Mikrosekunden-Bereich zeigen. Hier bietet die Aufnahme zeitaufgelöster konfokaler Bildserien (Zeitreihen) eine Möglichkeit, die entsprechenden Vorgänge sichtbar zu machen und die Veränderungen quantitativ zu erfassen (s. Abb. 5). Im Teil 1 (Seite 6 ff) werden zunächst die rein optischen Gegebenheiten in einem konfokalen LSM und der Einfluss der konfokalen Blende auf die Bildentstehung behandelt. Daraus ergeben sich ideale Werte für die Auflösung und die optische Schnittdicke. Im Teil 2 (Seite 16 ff) wird die Begrenzung der idealisierten Betrachtung durch den Digitalisierungsprozess und das Rauschen des Lichts bzw. optoelektronischer Systemkomponenten aufgezeigt. Die Tabelle auf Seite 15 liefert eine Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse aus Teil 1. Eine schematische Übersicht über den gesamten Inhalt und seinen Praxisbezug ist auf dem beiliegenden Poster dargestellt.

Abb. 5 Darstellung eines Zeitserienexperimentes in Kaedetransfizierten Zellen. Durch wiederholte Aktivierung des Kaede-Markers (Farbumschlag grün/rot) in einem kleinen Bereich der Zelle wird die gesamte grüne Fluoreszenz schrittweise in die rote Form überführt.





# Punktbild-Verwaschungsfunktion

Um die optischen Leistungsmerkmale eines konfokalen LSM im Detail zu verstehen, ist es notwendig, die grundsätzlichen optischen Phänomene, die sich aus der Geometrie des konfokalen Strahlengangs ergeben, genauer zu betrachten. Das wesentlichste Merkmal eines konfokalen LSM ist die bereits erwähnte punktförmige Beleuchtung und Beobachtung.

Selbst ein beugungsbegrenzt korrigiertes optisches System kann ein exakt punktförmiges Objekt nicht als Punkt abbilden. Das Bild eines idealen Punktobjekts ist entsprechend den Abbildungseigenschaften des optischen Systems immer etwas verwaschen. Quantitativ ist das Punktbild über die Punktbildverwaschungsfunktion (PSF, vom englischen Terminus „point spread function“) beschreibbar, die die zugehörige Intensitätsverteilung im Bildraum widerspiegelt.

Geht es um die dreidimensionalen Abbildungseigenschaften eines konfokalen LSM, so ist das 3D-Punktbild bzw. die 3D-PSF zu betrachten.

Im beugungsbegrenzten Idealfall (keine optischen Aberrationen, homogene Pupillenausleuchtung – siehe Details „Pupillenausleuchtung“) ist die 3D-PSF ein kometenähnliches, rotationssymmetrisches Gebilde.

Abbildung 6 zeigt zur Veranschaulichung einen zweidimensionalen xz- bzw. xy-Schnitt durch eine ideale 3D-PSF. Es wird deutlich, dass der Kern der PSF, in welchem sich 86,5 % der gesamten in der Pupille vorliegenden Energie konzentrieren, als Rotationsellipsoid beschreibbar ist. Für Betrachtungen zu Auflösung und optischer Schnittdicke ist es nützlich, die sogenannte Halbwertsfläche des Rotationsellipsoids zu definieren, d. h. die geschlossene Fläche, auf der die Intensität des 3D-Punktbildes in axialer und lateraler Richtung auf die Hälfte des zentralen Maximums abgefallen ist.

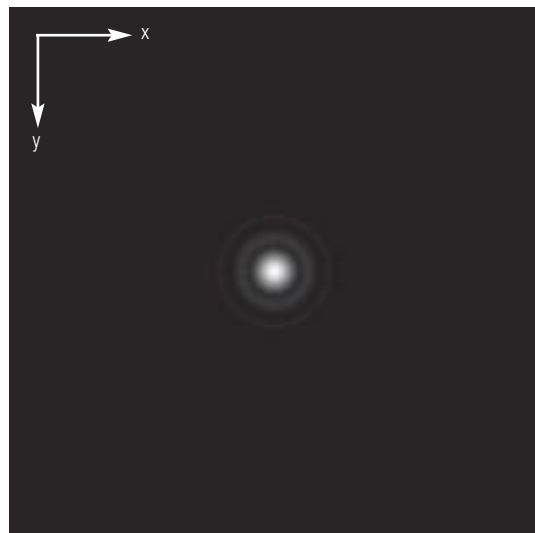
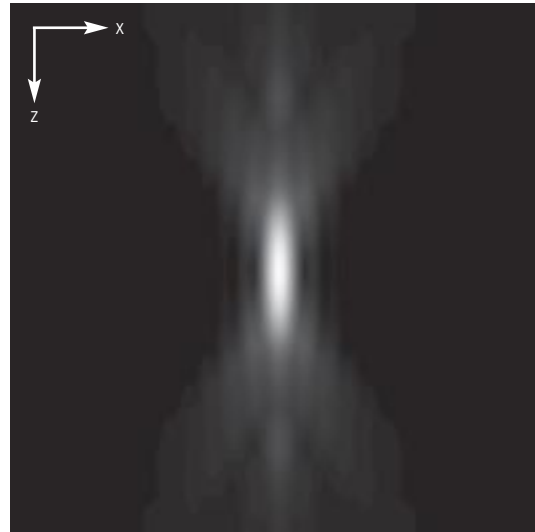


Abb. 6 Schnitt durch die 3D-PSF in z-Richtung (oben) und in xy-Richtung (unten) in gerechneter, dimensionsloser Darstellung; deutlich erkennbar ist das zentrale, ellipsenförmige Maximum. Das zentrale Maximum im unteren Bild (Airy-Scheibchen) ist in der 3D-PSF als der größte Kerndurchmesser in lateraler Richtung enthalten.

Im Folgenden ist ausschließlich diese Halbwertsfläche gemeint, wenn von der PSF gesprochen wird. Die quantitative Beschreibung der Halbwertsfläche erfolgt über die sog. Halbwertsbreite (full width at half maximum, FWHM), also über die einem 50%igen Intensitätsabfall entsprechende Strecke in lateraler bzw. axialer Richtung.

Die hinter der konfokalen Blende vorliegende Gesamt-PSF ( $PSF_{ges}$ ) eines konfokalen Mikroskops setzt sich aus den PSF des Beleuchtungsstrahlengangs ( $PSF_{Bel}$ ; punktförmige Beleuchtung) und des Beobachtungs- (Detektions-)strahlengangs ( $PSF_{Nachw}$ ; punktförmige Detektion) zusammen. Das konfokale LSM als Gesamtsystem erzeugt somit zwei Punktbilder, eines durch die Abbildung einer punktförmigen Lichtquelle in den Objektraum und das andere durch die Abbildung eines punktförmigen Objektdetails in den Bildraum. Mathematisch kann dieser Zusammenhang wie folgt beschrieben werden:

$$PSF_{ges}(x,y,z) = PSF_{Bel}(x,y,z) \cdot PSF_{Nachw}(x,y,z) \quad (1)$$

$PSF_{Bel}$  entspricht der Lichtverteilung des Laserspots, mit dem das Objekt abgetastet wird. Ihre Ausdehnung ist in erster Linie abhängig von der Wellenlänge des Laserlichts und der numerischen Apertur des Mikroskopobjektivs. Sie wird ferner beeinflusst durch Beugungserscheinungen an der Objektivpupille (als Funktion der Pupillenausleuchtung) und den Aberrationen aller in das System integrierten optischen Komponenten. [Anmerkung: Die Aberrationen werden in der Designphase des Systems minimiert und sind im allgemeinen gering.] Aber auch durch das Eintauchen des Laserfokus in dicke und streuende Präparate, bei nicht angepassten Brechungsindizes von Immersions- und Eintauchmedium und/oder bei großen Eintauchtiefen, kann es zu Verformungen der  $PSF_{Bel}$  kommen (siehe Hell, S., et al., [9]).

Die  $PSF_{Nachw}$  wird neben den genannten Einflussfaktoren zusätzlich durch die Größe der konfokalen Blende beeinflusst. Da diese aus Gründen der Effizienz des Strahlengangs (siehe Teil 2) nie punktförmig (d.h. unendlich klein) ist, ist die Ausdehnung der  $PSF_{Nachw}$  nie kleiner als die der  $PSF_{Bel}$ . Die Abbildungseigenschaften eines konfokalen LSM werden durch die Wechselwirkung zwischen  $PSF_{Bel}$  und  $PSF_{Nachw}$  bestimmt. Als Konsequenz der Wechselwirkung ergibt sich für die gesamte PSF:  $PSF_{ges} \leq PSF_{Bel}$ . Da der Durchmesser der konfokalen Blende variabel ist, sind unterschiedliche Effekte für große und kleine Blendendurchmesser zu erwarten.

In den folgenden Abschnitten werden verschiedenen Systemzustände quantitativ behandelt.

Aus dem bisher Gesagten kann zusätzlich abgeleitet werden, dass der optische Schnitt kein scharf begrenztes Gebilde ist, das bei einer bestimmten z-Position abrupt beginnt und an einer zweiten ebenso abrupt endet. Auf Grund des Intensitätsverlaufes in axialer Richtung besteht ein fließender Übergang von unterdrückter zu sichtbarer Objektinformation. Entsprechend ist die durch die konfokale Blende tatsächlich unterdrückte außerfokale Objektinformation auch abhängig von einer korrekten Einstellung der Parameter der Bildverarbeitung (PMT-Hochspannung, Kontrasteinstellung). Über- oder Untersteuerungen des Signals sollten vermieden werden.

# Auflösung und Konfokalität

Bei allen quantitativen Angaben zum Auflösungsvermögen und zur Tiefendiskriminierung eines konfokalen LSM ist sorgfältig zu unterscheiden, ob es sich um punktförmige oder flächenhafte, reflektierende oder fluoreszierende Objekte handelt, da sich deren Abbildungseigenschaften deutlich unterscheiden. In realen biologischen Objekten kommen vor allem faden- oder punktförmige fluoreszierende Feinstrukturen vor, so dass sich die folgenden Betrachtungen auf punktförmige Fluoreszenzobjekte beschränken. Die getroffenen Aussagen sind somit gut auf die Praxis übertragbar. Wie bereits erwähnt, spielt der Durchmesser der konfokalen Blende in Bezug auf Auflösung und Tiefendiskriminierung eine entscheidende Rolle. Bei einem Durchmesser der Blende größer als 1 AE (AE = Airy-Einheit – siehe Details „Optische Koordinaten“) beruhen die zu beobachtenden tiefendiskriminierenden Eigenschaften im wesentlichen auf den Gesetzen der geometrischen Optik (sog. geometrisch-optische Konfokalität). Je kleiner der

Durchmesser der konfokalen Blende wird, desto mehr nähert sich die  $PSF_{Nachw}$  der Größenordnung der  $PSF_{Bel}$ . Im Grenzfall (Blende  $< 0,25$  AE) sind beide PSF annähernd gleich groß, und wellenoptische Abbildungsgesetze sind eindeutig dominant (sog. wellenoptische Konfokalität).

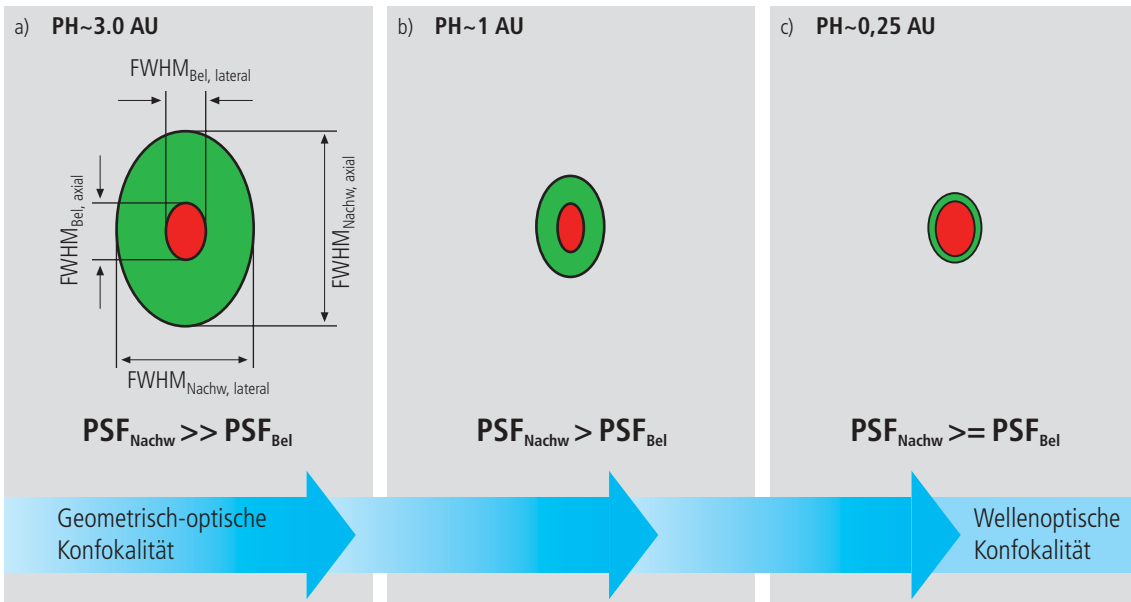
Zur Veranschaulichung dieser Zusammenhänge zeigt Abbildung 7 eine schematische Darstellung der Halbwertsflächen der  $PSF_{Bel}$  und der  $PSF_{Nachw}$  bei verschiedenen Durchmessern der konfokalen Blende.

In Abhängigkeit von der Größe der konfokalen Blende sollte zwischen geometrisch-optischer und wellenoptischer Konfokalität unterschieden werden. Je nachdem, welche Art der Konfokalität dominiert, ergeben sich unterschiedliche Werte bzw. Berechnungsverfahren für Auflösung und Tiefendiskriminierung. Interessant ist ebenfalls ein Vergleich mit der konventionellen mikroskopischen Abbildung. Die folgenden Abschnitte behandeln diese Unterschiede im Detail.

Abb. 7 Geometrisch-optische (a) und wellenoptische Konfokalität (c) [xz-Ansicht].

Der Durchmesser der konfokalen Blende nimmt von (a) nach (c) ab.

Entsprechend wird die Ausdehnung der  $PSF_{Nachw}$  geringer, bis sie in die Größenordnung der  $PSF_{Bel}$  kommt (c).



## Auflösung

Unter Auflösung soll bei großem Durchmesser der konfokalen Blende ( $PH > 1AE$ ) die laterale und axiale Trennbarkeit von Punkten während des Abtastvorgangs verstanden werden. Stellt man sich ein aus einzelnen Punkten aufgebautes Objekt vor, so werden alle Punkte, die dichter beieinander liegen als die Ausdehnung der  $PSF_{Bel}$  angibt, verwaschen und damit nicht aufgelöst.

Quantitativ ergibt sich die Auflösung durch die axiale und laterale Ausdehnung des abtastenden Laserspots bzw. der elliptischen Halbwertsfläche der  $PSF_{Bel}$ . Unter der Annahme einer homogenen Pupillenausleuchtung gilt:

axial:

$$FWHM_{Bel,axial} = \frac{0,88 \cdot \lambda_{exc}}{(n - \sqrt{n^2 - NA^2})} \quad (2)$$

$n$  = Brechungsindex des Immersionsmediums  
 $NA$  = numerische Apertur des Mikroskopobjektivs  
 $\lambda_{exc}$  = Wellenlänge des Anregungslichts

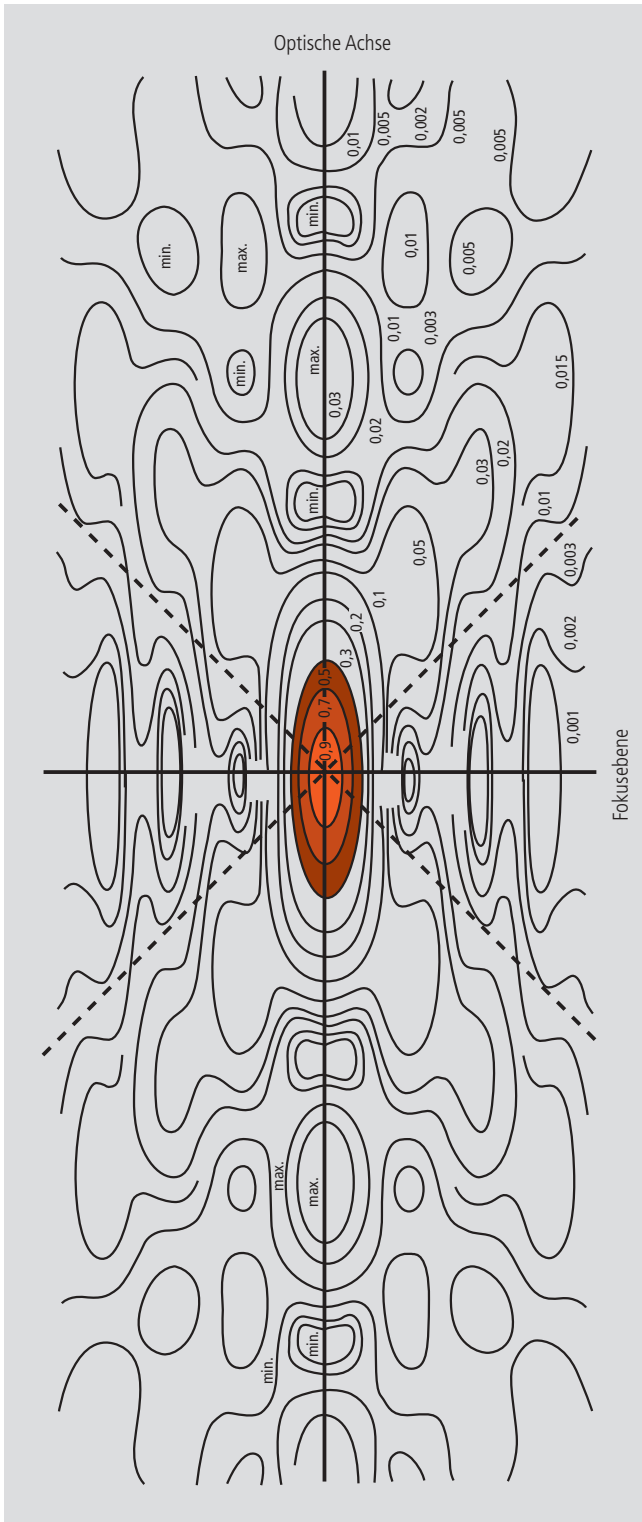
Ist  $NA < 0,5$ , kann für Gleichung (2) näherungsweise auch geschrieben werden:

$$\approx \frac{1,77 \cdot n \cdot \lambda_{exc}}{NA^2} \quad (2a)$$

lateral:

$$FWHM_{Bel,lateral} = 0,51 \frac{\lambda_{exc}}{NA} \quad (3)$$

Die Gleichungen (2a) und (3) unterscheiden sich zunächst nicht von denjenigen, die für den konventionellen Abbildungsfall bekannt sind (siehe Beyer, H., [3]). Es fällt jedoch auf, dass im konfokalen Mikroskop das Auflösungsvermögen nur von der Beleuchtungswellenlänge abhängig ist und nicht, wie im konventionellen Fall, ausschließlich von der Emissionswellenlänge. Gegenüber dem konventionellen Fluoreszenzmikroskop erzielt man somit bei konfokaler Fluoreszenz und großen Durchmessern der konfokalen Blende über den Stokes-Shift einen Auflösungsgewinn um den Faktor  $(\lambda_{em}/\lambda_{exc})$ .



Zur weiteren Veranschaulichung der bisher getroffenen Aussagen zur PSF zeigt die nebenstehende Abbildung einen Schnitt durch die resultierende 3D-Beugungsfigur in der Umgebung des beleuchtungsseitigen Fokus ( $PSF_{bel}$ ). Die Linien umfassen Bereiche gleicher Helligkeit (Isophotendarstellung). Die Intensität im Zentrum ist auf 1 normiert. Die realen Verhältnisse ergeben sich durch Rotation des Schnittbildes um die vertikale Achse (z-Achse). Es liegt Symmetrie sowohl zur Brennebene als auch zur optischen Achse vor. Auffällig sind die lokalen Intensitätsmaxima und -minima. Die gestrichelten Linien zeigen den Bereich, der in den Öffnungswinkel des verwendeten Mikroskopobjektivs fällt.

Für die Betrachtungen in diesem Kapitel ist lediglich der rot umrandete Bereich von Interesse, die sogenannte Halbwertsfläche im Zentrum der 3D-Beugungsfigur.

Abb. 8 Isophotendarstellung der Intensitätsverteilung in der Umgebung des beleuchtungsseitigen Fokus ( $PSF_{bel}$ ). Die Intensität des Fokus ist auf 1 normiert. (Born & Wolf, Principles of Optics, 6th edition 1988, Pergamon Press)

Bildunterschrift zu Abb. 9  
 Optische Schmitticke in Abhängigkeit vom Durchmesser der konfokalen Blende (rote Linie).  
 Parameter:  $NA = 0,6$ ;  $n = 1$ ;  $l = 520 \text{ nm}$ .  
 Die Dimensionierung der x-Achse wurde in Airy-Einheiten und die der y-Achse (Schmitticke) in Rayleigh-Einheiten vorgenommen (siehe auch: Details „Optische Koordinaten“).  
 Zusätzlich ist der geometrisch-optische Term in Gleichung 4 einzeln dargestellt (blaue Linie).

## Geometrisch-optische Konfokalität

Optische Schnittdicke (Tiefendiskriminierung) und Streulichtunterdrückung (Kontrasterhöhung) sind feste Eigenschaften eines konfokalen LSM, auch wenn der Durchmesser der konfokalen Blende nicht unendlich klein (ideal punktförmig) ist. Sowohl die Tiefendiskriminierung als auch die Streulichtunterdrückung werden in diesem Fall ausschließlich durch die  $PSF_{Nachw}$  festgelegt. Gegenüber dem konventionellen Mikroskop wird allein dadurch eine Verbesserung in der Erkennbarkeit von Objektdetails erzielt.

Für den Durchmesser der betreffenden Halbwertsfläche und damit für die optische Schnittdicke ergibt sich:

$$FWHM_{Nachw, axial} = \sqrt{\left(\frac{0,88 \cdot \lambda_{em}}{n \cdot \sqrt{n^2 - NA^2}}\right)^2 + \left(\frac{\sqrt{2} \cdot n \cdot PH}{NA}\right)^2} \quad (4)$$

$\lambda_{em}$  = Emissionswellenlänge  
 $PH$  = objektseitiger Durchmesser der konfokalen Blende [ $\mu\text{m}$ ]  
 $n$  = Brechungsindex des Immersionsmediums  
 $NA$  = numerische Apertur des Objektivs

Gleichung (4) zeigt, dass sich die optische Schnittdicke aus einem geometrisch-optischen und einem wellenoptischen Term zusammensetzt. Der wellenoptische Term (erster Term unter der Wurzel) ist bei gegebenem Objektiv und gegebener Emissionswellenlänge konstant. Der geometrisch-optische Term (zweiter Term unter der Wurzel) ist dominant und wird bei gegebenem Objektiv allein vom Durchmesser der konfokalen Blende beeinflusst.

Entsprechend besteht im Fall geometrisch-optischer Konfokalität ein linearer Zusammenhang zwischen Tiefendiskriminierung und Blendendurchmesser. Die Tiefendiskriminierung wird um so besser (d.h., die optische Schnittdicke um so geringer), je kleiner der Durchmesser der konfokalen Blende ist.

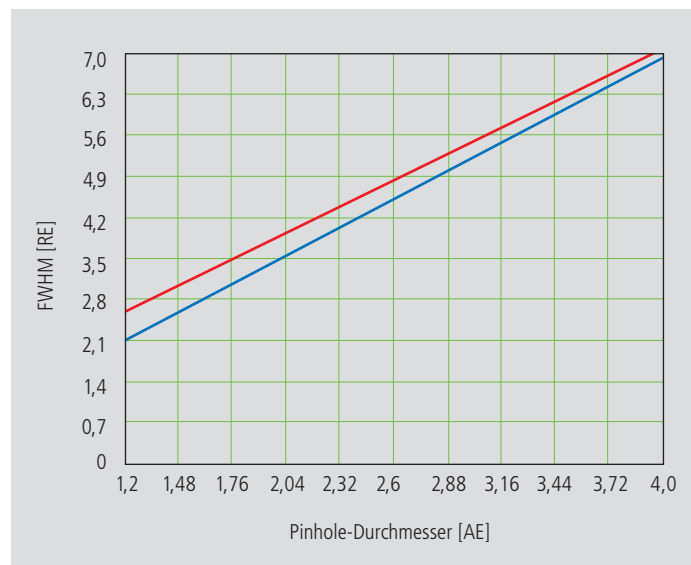
Die graphische Darstellung von Gleichung (4) in Abbildung 9 verdeutlicht diese Kausalität. Dargestellt sind der geometrisch-optische Term allein (blaue Linie) und der Kurvenverlauf, wie er sich aus Gleichung (4) ergibt (rote Linie). Die Differenz zwischen beiden Kurven ist eine Folge des wellenoptischen Terms.

Oberhalb eines Blendendurchmessers von 1 AE haben Beugungseffekte einen nahezu konstanten Einfluss, so dass die Tiefendiskriminierung in guter Näherung durch Gleichung (4) beschreibbar ist. Die Wechselwirkung der  $PSF_{Bel}$  mit der  $PSF_{Nachw}$  macht sich erst bei Blendendurchmessern kleiner 1 AE deutlich bemerkbar.

Es soll betont werden, dass im Fall geometrisch optischer Konfokalität die Durchmesser der Halbwertsfläche der  $PSF_{Nachw}$  keine Aussage über die axiale und laterale Trennbarkeit (Auflösung) von Objektdetails erlauben.

Im Bereich des optischen Schnitts ( $FWHM_{Nachw, axial}$ ) werden nur die Objektinformationen aufgelöst, die nicht enger zusammenliegen, als durch die Gleichungen (2) / (2a) / (3) beschrieben.

Abb. 9 (Bildunterschrift Seite 10)



## Wellenoptische Konfokalität

Verringert man den Durchmesser der konfokalen Blende auf einen Wert von  $< 0,25$  AE (praktisch „unendlich klein“), so ergibt sich ein veränderter Abbildungscharakter. Es müssen zusätzlich Beugungserscheinungen an der Blendenöffnung berücksichtigt werden, und die  $PSF_{Nachw}$  (optische Schnittdicke) schrumpft bis auf die Größenordnung der  $PSF_{Bel}$  (z-Auflösung) (siehe auch Abbildung 7c).

Um einfache Formeln für den Bereich kleinster Blendendurchmesser angeben zu können, ist es zweckmäßig, zunächst den praktisch nicht nutzbaren Grenzfall mit  $PH = 0$  heranzuziehen. In diesem Fall sind  $PSF_{Nachw}$  und  $PSF_{Bel}$  identisch. Es gilt für die Gesamt-PSF:

$$PSF_{ges}(x,y,z) = (PSF_{Bel}(x,y,z))^2 \quad (5)$$

Auch müssen jetzt bei Fluoreszenzanwendungen sowohl die Anregungswellenlänge  $\lambda_{exc}$  als auch die Emissionswellenlänge  $\lambda_{em}$  berücksichtigt werden. Dies geschieht über die Festlegung einer mittleren Wellenlänge<sup>1</sup>:

$$\bar{\lambda} \approx \sqrt{2} \frac{\lambda_{em} \cdot \lambda_{exc}}{\sqrt{\lambda_{exc}^2 + \lambda_{em}^2}} \quad (6)$$

Damit gehen die Gleichungen (2) und (3) auf Seite 9 für die Breite der axialen und lateralen Halbwertsfläche über in:

axial:

$$FWHM_{ges,axial} = \frac{0,64 \cdot \bar{\lambda}}{(n \cdot \sqrt{n^2 - NA^2})} \quad (7)$$

Ist  $NA < 0,5$ , kann für Gleichung (7) wiederum näherungsweise geschrieben werden:

$$\approx \frac{1,28 \cdot n \cdot \bar{\lambda}}{NA^2} \quad (7a)$$

lateral:

$$FWHM_{ges,lateral} = 0,37 \frac{\bar{\lambda}}{NA} \quad (8)$$

**Anmerkung:** Bei einem Spiegel als Objekt, ergibt sich ein Faktor von 0,45 (anstelle von 0,64) in Gleichung 7 und ein Faktor von 0,88 (anstelle von 1,28) in Gleichung 7a. Für eine fluoreszierende Ebene endlicher Dicke kann in Gleichung 7 ein Faktor von 0,7 angegeben werden. Dies verdeutlicht, dass neben den dargestellten Einflussfaktoren auf die optische Schnittdicke auch der Einfluss des untersuchten Präparats auf das Messergebnis zu beachten ist.

<sup>1</sup> Für einfache Übersichtsrechnungen genügt auch der Ausdruck  $\bar{\lambda} \approx \sqrt{\lambda_{em} \cdot \lambda_{exc}}$ .

Aus den Gleichungen (7) und (7a) wird deutlich, dass die Tiefenauflösung linear vom Brechungsindex  $n$  des Immersionsmediums und quadratisch vom Kehrwert der numerischen Apertur des Objektivs abhängt  $\{NA = n \cdot \sin(\alpha)\}$ .

Für eine hohe Tiefendiskriminierung ist es daher vor allem wichtig, Objektive mit möglichst großem Öffnungswinkel (d.h. mit hoher numerischer Apertur (NA)) zu verwenden.

Da sich eine  $NA > 1$  nur durch den Einsatz eines Immersionsmediums erreichen lässt, finden in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie in der Regel Immersionsobjektive Verwendung (siehe auch Abbildung 11).

Ein Vergleich mit den auf Seite 9 bzw. 11 erzielten Ergebnissen zeigt, dass im Grenzfall mit  $PH = 0$  eine Verbesserung der axialen und lateralen Auflösung um einen Faktor 1,4 möglich ist.

Weiterhin soll festgehalten werden, dass auf Grund der diskutierten wellenoptischen Zusammenhänge die optische Leitungsfähigkeit eines konfokalen LSM nicht beliebig steigerbar ist. Die Gleichungen (7) und (8) liefern die kleinste erreichbare Schnittdicke bzw. die bestmögliche Auflösung.

Unter applikativen Gesichtspunkten ist der streng wellenoptisch konfokale Fall ( $PH = 0$ ) nicht relevant (siehe auch Teil 2). Allerdings können die für  $PH = 0$  hergeleiteten Gleichungen in guter Näherung auf den Bereich bis zu Blendendurchmessern von 1 AE übertragen werden. Verändert werden dabei nur die entsprechenden Faktoren in den Gleichungen (7) und (8). Die je nach Blendendurchmesser gültigen Faktoren können der Abbildung 10 entnommen werden.

Ebenfalls sei hier festgehalten, dass bei  $PH < 1$  AE keine Unterscheidung zwischen optischer Schnittdicke und Auflösung mehr möglich ist. Die Dicke des optischen Schnitts legt gleichzeitig die Auflösungseigenschaften des Systems fest. In der Literatur wird der Begriff der Tiefenauflösung daher oft als Synonym für Tiefendiskriminierung bzw. optische Schnittdicke verwendet. Korrekt ist dies jedoch nur für Blendendurchmesser kleiner als 1 AE.

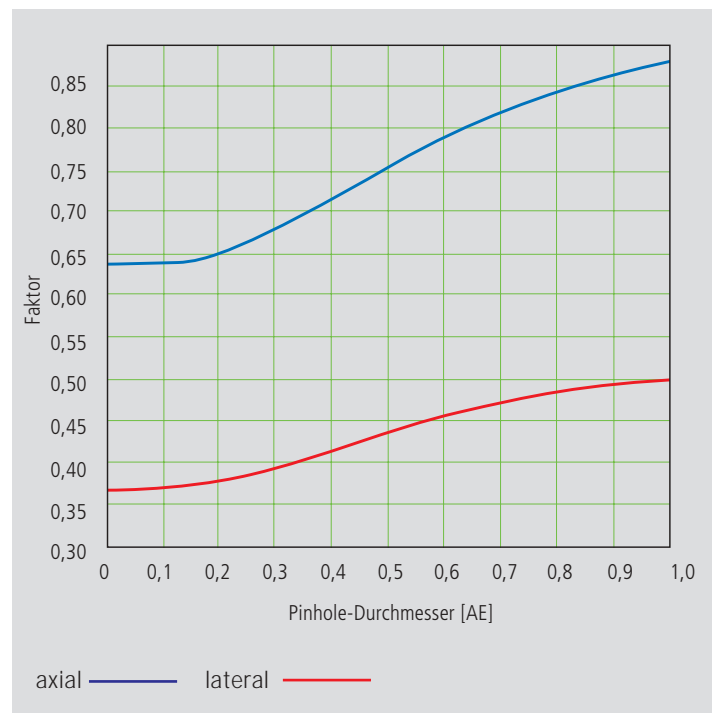


Abb. 10 Theoretische Faktoren für Gleichungen (7) und (8) bei Durchmessern der konfokalen Blende zwischen 0 AE und 1 AE.

Die Tabelle auf Seite 15 gibt abschließend einen Überblick über die in Teil 1 erarbeiteten formelmäßigen Zusammenhänge. Zusätzlich zeigt Abbildung 11a den Gesamtverlauf der optischen Schnittdicke für ein Mikroskopobjektiv mit  $NA=1,3$  und  $n=1,52$  ( $\bar{\lambda}=496\text{nm}$ ).

In den Abbildungen 11 b–d ist Gleichung (7) bei Variation der einzelnen Parameter ( $NA$ ,  $\bar{\lambda}$ ,  $n$ ) sowie für unterschiedliche Objekte graphisch dargestellt.



Optische Schnittdicke  
 (NA = 1.3; n = 1.52;  
 $\bar{\lambda}$  = 496 nm)

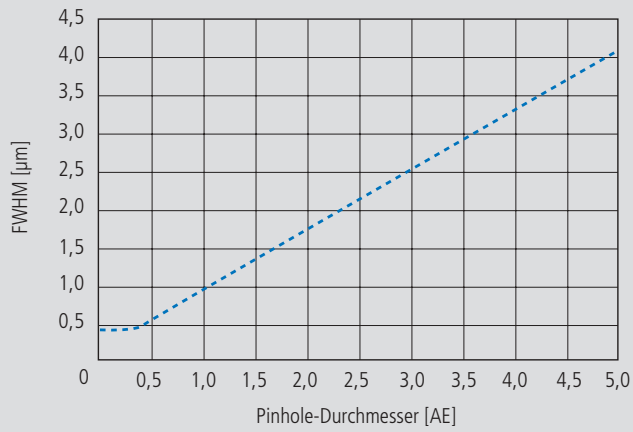
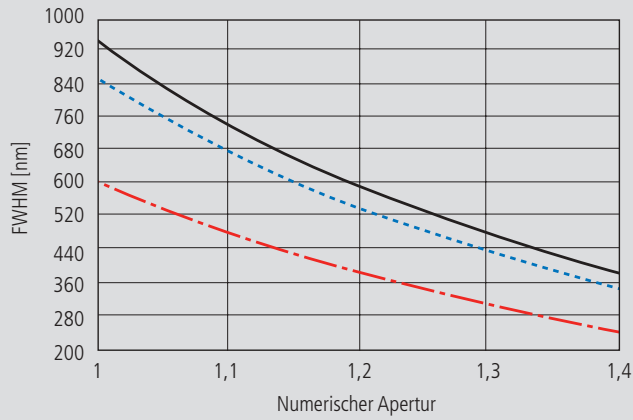


Abb. 11

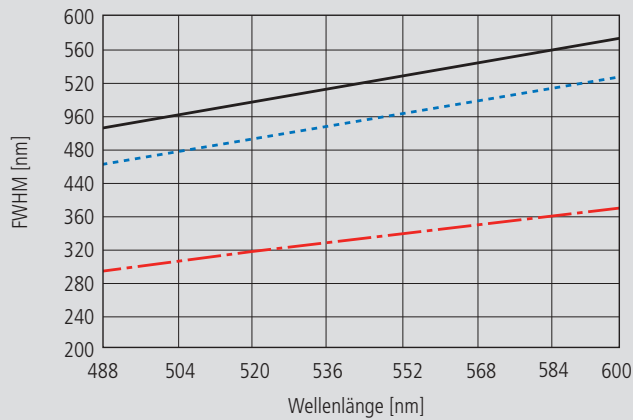
a) Variation des  
 Blendendurchmessers

Tiefenauflösung  
 (PH = 0; n = 1.52;  
 $\bar{\lambda}$  = 496 nm)



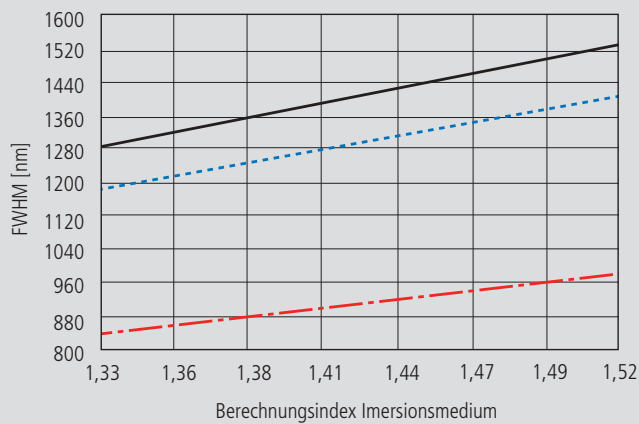
b) Variation der  
 numerischen Apertur

Tiefenauflösung  
 (PH = 0; NA = 1.3; n = 1.52)



c) Variation der  
 Wellenlänge ( $\bar{\lambda}$ )

Tiefenauflösung  
 (PH = 0; NA = 0.9;  
 $\bar{\lambda}$  = 496 nm)



d) Variation des  
 Brechungsindex

- fluoreszierende Ebene
- ..... fluoreszierender Punkt
- · - reflektierende Ebene (Spiegel)

## Überblick

Konventionelle Mikroskopie	Konfokale Mikroskopie 1 AE < PH < ∞	Konfokale Mikroskopie PH < 0,25 AE
<p>1. Optische Schnittdicke <b>nicht definierbar</b>. Mit einem konventionellen Mikroskop können „dicke“ biologische Präparate nur dann scharf abgebildet werden, wenn ihre z-Ausdehnung nicht größer ist als die wellenoptische Tiefenschärfe des verwendeten Objektivs. In Abhängigkeit von der Dicke des Präparates wird die Objektinformation im Fokus von unscharfen Objektinformationen aus Objektbereichen außerhalb des Fokus überlagert. Die Möglichkeit des optischen Schneidens besteht nicht, so dass auch kein formelmäßiger Zusammenhang für die optische Schnittdicke angegeben werden kann.</p>	<p>1. Optische Schnittdicke<sup>1)</sup></p> $\sqrt{\left(\frac{0,88 \cdot \lambda_{em}}{(n-\sqrt{n^2-NA^2})}\right)^2 + \left(\frac{\sqrt{2} \cdot n \cdot PH}{NA}\right)^2}$ <p>Entspricht dem FWHM der hinter der konfokalen Blende vorliegenden Intensitätsverteilung (PSF<sub>Nachw</sub>). Das FWHM ergibt sich aus der emissionsseitigen Beugungsfigur und der geometrisch-optischen Wirkung der konfokalen Blende. PH ist hier der variable objektseitige Durchmesser der konfokalen Blende in µm.</p>	<p>1. Optische Schnittdicke</p> $\frac{0,64 \cdot \bar{\lambda}}{(n-\sqrt{n^2-NA^2})}$ <p><math>\bar{\lambda}</math> bezeichnet hier eine mittlere Wellenlänge – für die genaue Definition siehe vorstehenden Text. Der Faktor 0,64 gilt nur für einen fluoreszierenden Punkt als Objekt.</p>
<p>2. Axiale Auflösung (wellenoptische Tiefenschärfe)</p> $\frac{n \cdot \lambda_{em}}{NA^2}$ <p>Entspricht der Breite der emissionsseitigen Beugungsfigur bei 80 % der maximalen Intensität, zurückgerechnet ins Objekt; In einigen Literaturstellen wird die wellenoptische Tiefenschärfe eines konventionellen Mikroskops auch als Tiefenauflösung bezeichnet. Es sollte jedoch eindeutig zwischen den Begriffen Auflösung und Tiefenauflösung unterschieden werden.</p>	<p>2. Axiale Auflösung</p> $\frac{0,88 \cdot \lambda_{exc}}{(n-\sqrt{n^2-NA^2})}$ <p>FWHM der PSF<sub>Bel</sub> (Intensitätsverteilung im Fokus des Mikroskopobjektivs) in z-Richtung.</p> <p>Keine Beeinflussung durch die konfokale Blende.</p>	<p>2. Axiale Auflösung</p> $\frac{0,64 \cdot \bar{\lambda}}{(n-\sqrt{n^2-NA^2})}$ <p>FWHM der Gesamt-PSF in z-Richtung.</p> <p>Da optische Schnittdicke und Auflösung in diesem Fall identisch sind, wird der Begriff der Tiefenauflösung oft synonym verwendet.</p>
<p>3. Zum Vergleich: FWHM der PSF im Zwischenbild (z-Richtung), zurückgerechnet ins Objekt</p> $\frac{1,77 \cdot n \cdot \lambda_{em}}{NA^2}$	<p>3. Näherung von 2. für NA &lt; 0,5</p> $\frac{1,77 \cdot n \cdot \lambda_{em}}{NA^2}$	<p>3. Näherung von 2. für NA &lt; 0,5</p> $\frac{1,28 \cdot n \cdot \bar{\lambda}}{NA^2}$
<p>4. Laterale Auflösung</p> $\frac{0,51 \cdot \lambda_{em}}{NA}$ <p>FWHM der Beugungsfigur im Zwischenbild (x/y-Richtung), zurückgerechnet ins Objekt</p>	<p>4. Laterale Auflösung</p> $\frac{0,51 \cdot \lambda_{em}}{NA}$ <p>FWHM der PSF<sub>Bel</sub> (Intensitätsverteilung im Fokus des Mikroskopobjektivs) in x/y-Richtung plus kontraststeigernde Wirkung der konfokalen Blende durch Streulichunterdrückung.</p>	<p>4. Laterale Auflösung</p> $\frac{0,37 \cdot \bar{\lambda}}{NA}$ <p>FWHM der Gesamt-PSF in x/y-Richtung plus kontraststeigernde Wirkung der konfokalen Blende durch Streulichunterdrückung.</p>

Alle Angaben in der Tabelle sind objektseitige Größen und gelten für einen fluoreszierenden Punkt als Objekt.

1) Unter PH < ∞ soll ein Blendendurchmesser < 4–5 AE verstanden werden.

# Punktabtastung und Digitalisierung

Zusätzlich zu den in Teil 1 diskutierten optischen Phänomenen soll in Teil 2 genauer betrachtet werden, wie die aufgezeigte Leistungsfähigkeit des konfokalen LSM durch den Digitalisierungsprozess und systemeigene Rauschquellen begrenzt wird. Wie in Teil 1 erwähnt, tastet ein konfokales LSM die Objektoberfläche punktweise ab. Das heißt, das Bild entsteht nicht für alle Objektorte gleichzeitig (parallel), wie z.B. in einer CCD-Kamera, sondern nacheinander (seriell). Die erreichbare Auflösung wird entsprechend durch die Zahl der Abtastpunkte pro aufzulösende Struktur beeinflusst.

Das Rauschen des Lichts ist vor allem in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie von Bedeutung. Die Zahl der Lichtquanten (Photonen), die zur Bildentstehung beitragen, ist in vielen Anwendungsfällen äußerst gering. Dies erklärt sich aus der Effizienz des Gesamtsystems und den damit verbundenen Einflussfaktoren wie Quantenausbeute, Bleichen und Sättigen von Farbstoffen, Transmission der optischen Komponenten usw. (*siehe Details „Fluoreszenz“*). Als zusätzlicher Einflussfaktor muss der Energieverlust bei Verringerung des Durchmessers der konfokalen Blende genannt werden.

Zur Veranschaulichung der Einflüsse von Abtastung und Rauschen auf die Auflösung dient im Folgenden neben praktischen Beispielen ein Zweipunktobjekt. Darunter soll ein Objekt aus zwei punktförmigen Selbstleuchtern verstanden werden, die einen Abstand von 0,5 AE haben (*siehe Details „Optische Koordinaten“*). Die von den beiden Punkten erzeugten Beugungsfiguren überlagern sich im Bildraum, wobei das Maximum der einen Beugungsfigur auf dem ersten Minimum der anderen zu liegen kommt. Entscheidend für die Trennbarkeit (Auflösung) ist die Existenz einer Einsattelung zwischen den beiden Maxima (*siehe Abbildung 12*).

Die Objektinformation wird in der Regel über einen Sekundärelektronenvervielfacher (PMT) detektiert. Der PMT registriert die örtlichen Änderungen der Objekteigenschaften  $I(x)$  als zeitliche Intensitätsschwankung  $I(t)$ . Ort- und Zeitkoordinate sind durch die Geschwindigkeit des Scanvorgangs miteinander verknüpft ( $x = t \cdot v_{\text{scan}}$ ). Es erfolgt eine Umwandlung von optischer Information in elektrische Information. Ein nachgeschalteter Analog/Digital-(A/D-)Wandler transformiert das kontinuierliche elektrische Signal durch periodisches Abtasten in eine diskrete, äquidistante Folge von Messwerten (Pixel) (Abbildung 12).

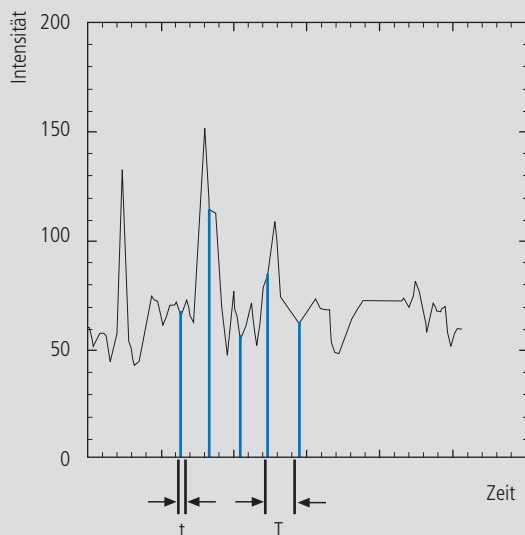
## Arten der A/D-Wandlung

Die Art der verwendeten A/D-Wandlung bestimmt die Qualität des abgetasteten Bildes. Man unterscheidet zwischen:

- Punktabtastung (Sampling): Die Dauer der Messwernerfassung ( $t$ ) ist klein gegenüber der Periodendauer ( $T$ ) der Abtastung (Pixelzeit) (siehe Abbildung 12).
- Integration: Die Dauer der Messwernerfassung liegt in der gleichen Größenordnung wie die Pixelzeit.

Die Integration entspricht einer Intensitäts-Mittelung über einen bestimmten Prozentsatz der Pixelzeit (Pixel Dwell Time). Um Verzerrungen des Signals zu vermeiden (und damit einem Auflösungsverlust vorzubeugen), muss die Integrationszeit kleiner als die Pixelzeit sein. Die höchste Auflösung erreicht man mit Punktabtastung; die Abtastzeit ist infinitesimal kurz, so dass eine maximale Dichte von Abtastpunkten realisiert werden kann. Durch Integration des Signals trägt ein größerer Teil des von der Probe emittierten Lichts zum Bildsignal bei. Bei lichtschwachen Signalen (z.B. bei Fluoreszenz) ist dies gegenüber der Punktabtastung ein entscheidender Vorteil bezüglich des Signal-Rausch-Verhältnisses. In der Regel arbeiten konfokale LSM-Systeme von Carl Zeiss daher im Integrationsmodus. Die absolute Integrationszeit kann durch Verändern der Scangeschwindigkeit variiert werden, was gleichzeitig einer Veränderung der Pixelzeit entspricht.

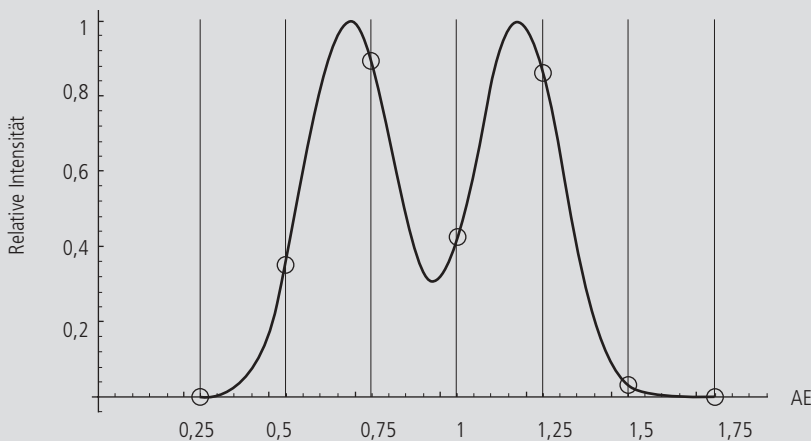
Abb. 12 Punktabtastung eines kontinuierlichen Signals  
 $T$  = Abstand zwischen zwei Abtastpunkten  
 $t$  = Dauer der Messwertaufnahme ( $t \ll T$ )



### Nyquist-Theorem

Aus Teil 1 ist bekannt, dass der Informationsgehalt des Signals grundsätzlich durch das Auflösungsvermögen der mikroskopischen Optik begrenzt wird. Die Halbwertsbreite eines Punktbildes ( $FWHM_{lat}$ ) liefert hier eine realistische Abschätzung (siehe Gleichung 3 auf Seite 9). Um beim Abtastvorgang einen Informationsverlust zu vermeiden, muss das Nyquistsche Abtasttheorem eingehalten werden. Daraus ergibt sich für die Abtastung eines periodischen Signals eine optimale Schrittweite von der halben Periodendauer des aufzulösenden Strukturabstandes, bzw. ein maximaler Pixelabstand von  $d_{pix} = 0,5 \times FWHM_{lat}$  (bzw. 0,25 AE). Ein Airy-Scheibchen beispielsweise muss daher mindestens mit einem Pixelraster von  $4 \times 4$  Pixeln abgerastert werden, um korrekt wiedergegeben werden zu können. Bezogen auf ein Zweipunktobjekt ergibt sich durch die Überlappung der beiden Airy-Scheibchen eine größere Zahl notwendiger Abtastpunkte (siehe Abbildung 13).

Abb. 13 Dargestellt ist die Abtastung eines Zweipunktobjektes mit der minimal notwendigen Zahl von Abtastpunkten zur Vermeidung eines Auflösungsverlustes (Abstand der Abtastpunkte 0,25 AE).

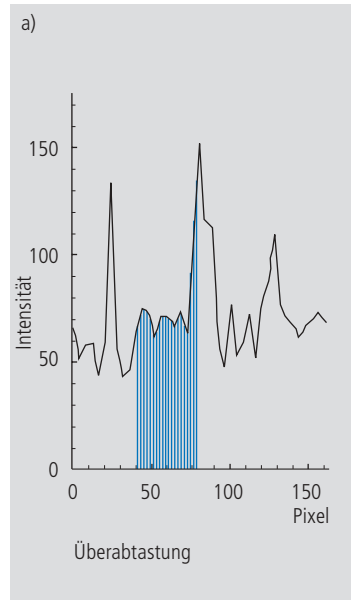


Ist die Zahl der Abtastpunkte pro Strukturgröße geringer als durch das Nyquist-Theorem vorgegeben, so geht ein Teil der Information verloren (Unterabtastung). Dies wird in Abbildung 14c vor allem an den nicht mehr aufgelösten feinen Strukturen deutlich.

Eine zu große Zahl von Abtastpunkten pro Strukturgröße bedeutet eine größere Zahl an Messwerten ohne zusätzlichen Informationsgewinn (Überabtastung); gleichzeitig verringert sich die Zeit pro Pixel. Die zu verarbeitende Datenmenge wird unnötig erhöht, und das Rauschen des Messsignals nimmt zu (siehe Abschnitt „Rauschen“, Seite 20).

In ungünstigen Fällen kann es sogar zur Bildung von Artefakten kommen (Aliasing). Dies ist in der Regel dann der Fall, wenn der Strukturabstand im Objekt dem Pixelabstand entspricht oder diesem nahekommt.

Abb. 14 Überabtastung, korrekte Abtastung und Unterabtastung eines kontinuierlichen Signals.



## Pixelgröße

Von entscheidender Bedeutung ist in diesem Zusammenhang der über den Scanzoom festgelegte maximale Scanwinkel. Der Scanwinkel bestimmt die Kantenlänge des Scanfeldes in der Zwischenbildebene (bzw. Objektebene) und beeinflusst damit bei gegebener Pixelzahl pro Zeile die Pixelgröße; je kleiner der Scanwinkel (d.h. je größer der Scanzoom), desto geringer die Kantenlänge des gescannten Feldes und desto kleiner das Pixel (siehe Beispiel rechts).

Der Benutzer eines konfokalen LSM von Carl Zeiss ist somit in der Lage, direkt auf die Abtastrate (Pixelgröße) einzuwirken. Um das für eine korrekte Abtastung richtige Scanzoom einzustellen (gemäß Nyquist'schem Abtasttheorem), ist die Pixelgröße  $d_{pix}$  in der Objektebene von Bedeutung.

Für die konfokalen LSM von Carl Zeiss ergibt sich, ausgehend von der Kantenlänge des Scanfeldes im Zwischenbild, ein einfacher formelmäßiger Zusammenhang:

$$d_{pix} = \frac{\text{System Konstante}}{\text{Pixelzahl} \cdot \text{Zoomfaktor} \cdot \text{Vergrößerung}_{obj}}$$

**Pixelzahl** = Anzahl der Pixel pro Zeile

**Zoomfaktor (Z)** = in der Software eingestellter Wert des Scanzooms (Beispiel: Zoomfaktor 2 verringert die Kantenlänge des gescannten Feldes um den Faktor 2)

**Vergrößerung<sub>obj</sub>** = Abbildungsmaßstab des Objektivs

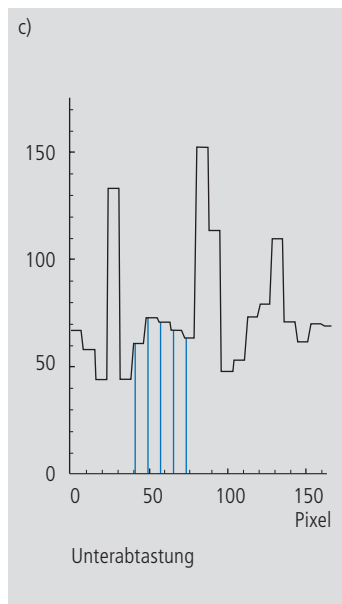
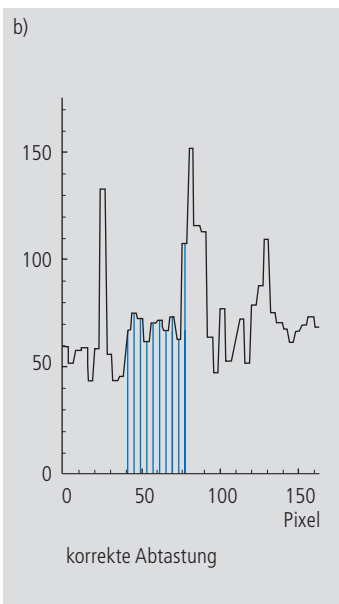
**Systemkonstante** = 8,94 mm bei LSM 510, LSM 5 Pascal (minimaler Zoomfaktor = 0,7); 12,77 mm bei LSM 310, LSM 410 (minimaler Zoomfaktor = 1)

Das zur Erfüllung des Nyquist-Theorems erforderliche Minimum des Scanzooms kann daher wie folgt berechnet werden:

$$Z \geq \frac{3.92 \cdot NA \cdot \text{System Konstante}}{\text{Pixelzahl} \cdot \text{Vergrößerung}_{obj} \cdot \lambda_{exc}}$$

$NA$  = numerische Apertur des Objektivs

$\lambda_{exc}$  = Anregungswellenlänge



So wird z.B. bei einem 40-fach vergrößernden Objektiv mit  $NA = 1,3$ , bei 512 Pixeln pro gescannter Zeile und einer Wellenlänge von 488 nm das volle Auflösungsvermögen (d.h. die korrekte Abtastung) erst bei einem Scanzoomfaktor von mindestens 4,56 erreicht; die entsprechende Pixelgröße beträgt 95,8 nm. Bei kleineren Zoomfaktoren ist die Pixelgröße selbst auflösungsbegrenzend (Pixelauflösung). Höhere Zoomfaktoren führen dagegen zu Oversampling. Der Zoomfaktor beeinflusst somit neben der Gesamtvergrößerung auch die Auflösungseigenschaften des Systems.

Bei den neueren LSM-Systemen von Carl Zeiss kann die Zahl der Abtastpunkte auch durch eine Erhöhung der Pixelzahl pro Scanzeile beeinflusst werden; die Pixelzahl (x/y) pro Bild ist frei wählbar zwischen 4 x 2 und 2048 x 2048.

# Rauschen

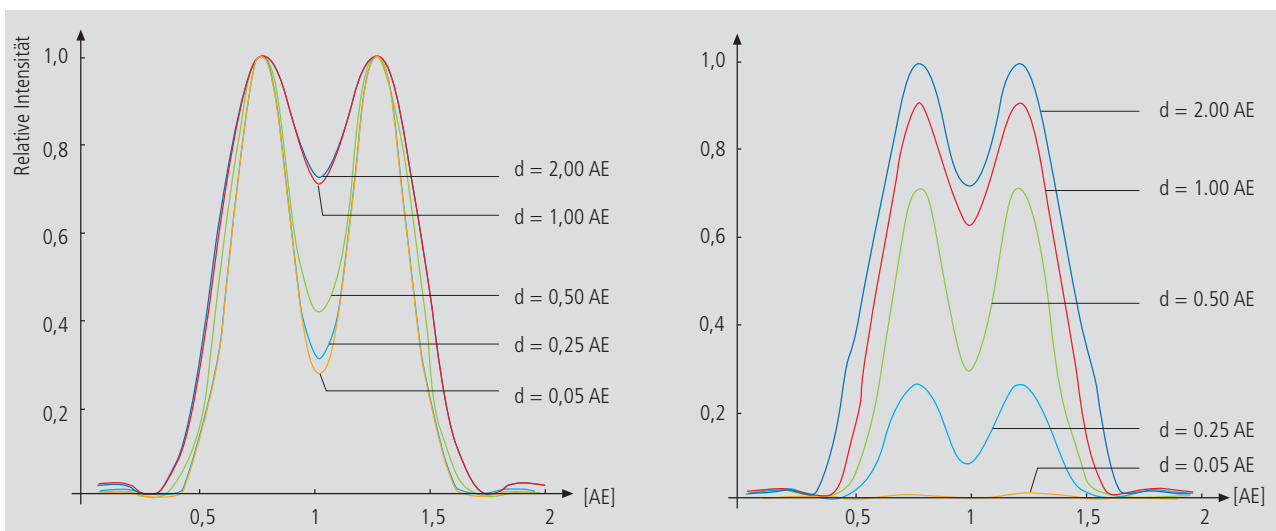
In einem konfokalen LSM-System sind vor allem das Detektorrauschen (Dunkelrauschen, Sekundäremissionsrauschen), das Laserrauschen und das Schrotrauschen des Lichts von Bedeutung (*siehe Details „Rauschquellen“*). Diese Rauschquellen sind in der Regel statistischer Natur. Periodisches Rauschen ist selten zu beobachten und korreliert in der Regel mit defekten Bauteilen oder mechanischen Schwingungen des Aufbaus; es wird daher hier nicht berücksichtigt.

Wie die folgende Abbildung 15 zeigt, ist die Zahl der Photonen, die den PMT erreicht, nicht nur von der Intensität der Fluoreszenz (*siehe Details „Fluoreszenz“*), sondern auch vom Durchmesser der konfokalen Blende abhängig. Dargestellt ist die hinter der konfokalen Blende resultierende Intensitätsverteilung eines Zweipunktobjekts in normierter (links) und nicht normierter Form (rechts). Der Durchmesser der konfokalen Blende wurde variiert zwischen 2 AE und 0,05 AE. Bei einem Durchmesser von 1 AE erreicht die Blende gerade die Größe des Airy-Scheibchens, so dass lediglich ein geringer Intensitätsverlust vorliegt. Der Auflösungsgewinn ist in diesem Fall minimal. .

Ist der Durchmesser der Blende  $< 1$  AE, kommt es zu einer Auflösungssteigerung (bessere Trennbarkeit durch tiefere Einsattelung) bei gleichzeitigem drastischem Energieverlust.

Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die dominierende Rauschquelle von der Signalhöhe abhängt. Bei hohen Signalen (Zahl der detektierten Photonen  $> 10000$ ) dominiert das Laserrauschen, während die Qualität kleiner Signale (Zahl der detektierten Photonen  $< 1000$ ) durch das Schrotrauschen des Lichts limitiert wird. In der Regel ist das Laserrauschen daher bei Beobachtung in Reflexion der bestimmende Rauschfaktor und das Schrotrauschen bei Beobachtung in Fluoreszenz. Das Dunkelrauschen des Detektors ist bei den neueren PMT-Typen (z.B. von Hamamatsu) ebenso wie das Sekundäremissionsrauschen äußerst gering und wie dieses in den meisten praxisrelevanten Fällen vernachlässigbar (*siehe Details „Rauschquellen“*). Dementsprechend wird im Weiteren nur der Einfluss des Schrotrauschens und zwar ausschließlich auf die laterale Auflösung behandelt.

Abb. 15 Bei kleinen Blendendurchmessern kommt es, wie in Teil 1 gezeigt, zu einer Verbesserung der Auflösung (geringere Halbwertsbreite, tiefere Einsattelung – siehe das normalisierte Diagramm links). Das rechte Diagramm zeigt jedoch, dass mit kleiner werdendem Blendendurchmesser auch ein drastischer Signalabfall zu verzeichnen ist. Signifikant ist der Intensitätsabfall ab  $PH < 1$  AE.



## Auflösung und Schrotrauschen - Auflösungswahrscheinlichkeit

Erreicht die Zahl der detektierten Photonen ( $N$ ) eine Größe  $N < 1000$ , so ist die Fluoreszenzemission nicht mehr als kontinuierlicher, sondern als stochastischer Prozess zu behandeln; über das Schrotrauschen muss die Quantennatur des Lichtes berücksichtigt werden (der Lichtfluss wird als Photonenfluss verstanden, wobei ein Photon die Energie  $E = h \cdot \nu$  hat). Die Auflösung wird von zufälligen Ereignissen abhängig (dem zufälligen Eintreffen von Photonen am Detektor), und der durch Verkleinerung der konfokalen Blende erreichbare Auflösungsgewinn wird durch den gegebenen Rauschpegel bestimmt. Abbildung 16 soll dem Verständnis der Quantennatur des Lichts dienen. Eine mögliche Konsequenz des Schrotrauschens des Messlichts ist z.B., dass Objektdetails, die normalerweise optisch noch auflösbar wären, durch wechselnde Rauschmuster (Photonenstatistik) so verfälscht werden, dass sie bei wiederholter Messung nicht jedesmal aufgelöst werden. Andererseits können optisch gerade nicht mehr aufgelöste Objekte durch aufgeprägte Rauschmuster wieder aufgelöst erscheinen. Die Auflösung der „richtigen“ Objektstruktur wird um so wahrscheinlicher, je geringer das Rauschen ist, bzw. je mehr Photonen am Bildaufbau beteiligt sind.

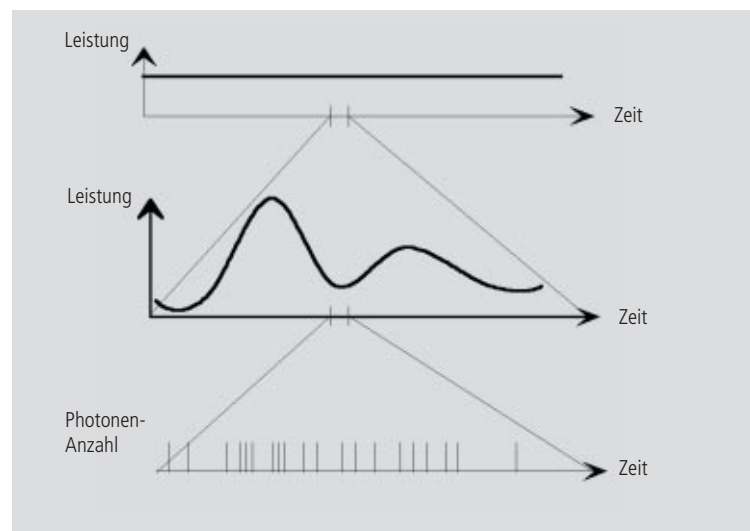
Es ist daher sinnvoll, anstelle von Auflösung von Auflösungswahrscheinlichkeit zu sprechen. Diesem Konzept liegt ein Modell zugrunde, welches die rein optische Betrachtung der Bildentstehung im konfokalen Mikroskop (PSF) mit den Einflussfaktoren Schrotrauschen des Messlichts und Abtastung des Objekts (Scanning Prozess, Digitalisierung) kombiniert. Das wesentliche Kriterium ist dabei die Erkennbarkeit von Objektdetails. Die Abhängigkeit der Auflösungswahrscheinlichkeit von der Signalhöhe und vom Durchmesser der konfokalen Blende ist in Abbildung 17 am Beispiel

des Zweipunktobjekts und für eine unterschiedliche Zahl von Photoelektronen je Punktobjekt dargestellt. [Da das Bild eines Punktobjekts von einem Pixelraster bedeckt ist, erscheint eine Normierung auf Pixelbasis nicht sinnvoll.]

Eine Zahl von 100 Photoelektronen je Punktobjekt bedeutet somit, dass das Punktobjekt über die Abtastzeit so viele Photonen aussendet, dass 100 Photoelektronen hinter der lichtempfindlichen Fläche des Empfängers (Kathode des PMT) resultieren. Die Zahl der von einem Punktobjekt erzeugten Photoelektronen ist dabei ca. doppelt so hoch wie die Zahl der im Maximumpixel (Pixel im Zentrum des Airy-Scheibchens) vorliegenden Photoelektronen. Durch die Angabe in Photoelektronen ist das Modell unabhängig von der Empfindlichkeit bzw. dem Rauschen des Detektors und von Detektionstechniken (absolute Integrationszeit/Punktabtastung/Signalmittelung). Es wird auf diese Weise allein die Zahl der detektierten Photonen betrachtet.

Abb. 16 Die Quantennatur des Lichts kann auf zweierlei Weise sichtbar gemacht werden:

- durch Verringern der Intensität bis in die Größenordnung einzelner Photonen
- durch Verkürzen der Beobachtungszeit bei konstanter Intensität (siehe Grafik); einzelne Photonen des Lichtstroms können in ihrer unregelmäßigen (statistischen) Folge aufgelöst werden.





Eine Auflösungswahrscheinlichkeit von 90 % wird als notwendig angenommen, um die beiden Punktbilder aufzulösen. Entsprechend kann das eingangs definierte Zweipunktobjekt nur dann aufgelöst werden, wenn jedes der beiden Punktobjekte mindestens ca. 25 Photoelektronen erzeugt. Bei Durchmessern der konfokalen Blende kleiner als 0,25 AE kommt es durch die drastische Zunahme des Schrotrauschens (abnehmende Messlichtintensität) in allen Fällen zu einer deutlichen Abnahme der Auflösungswahrscheinlichkeit bis hin zur Unbestimmtheit ( $\leq 50$  % Wahrscheinlichkeit) bei PH = 0.

Ebenfalls als Folge des Schrotrauschens verschiebt sich mit abnehmender Zahl an Photoelektronen das Maximum der Kurven zu größeren Blendendurchmessern. Die generell zu beobachtende leichte Abnahme der Auflösungswahrscheinlichkeit zu größeren Blendendurchmessern beruht auf der geringer werdenden Wirkung der konfokalen Blende hinsichtlich der Unterdrückung der außerfokalen Objektbereiche (siehe Teil 1).

Der in der Praxis gewählte Durchmesser der konfokalen Blende ergibt sich daher immer als Kompromiss zwischen den Qualitätsparametern Rauschen (SNR als Funktion der Intensität des Messlichtes) und Auflösung bzw. Tiefendiskriminierung. Die konfokale Blende muss stets eine gewisse Mindestöffnung haben, damit je nach Intensität der Fluoreszenz ein Mindestmaß an Strahlung zum Detektor gelangen kann.

Bei niedrigen Fluoreszenzintensitäten kann z.B. ein Verzicht auf Tiefendiskriminierung zugunsten von Signalhöhe (höhere Messlichtintensität = geringeres Rauschen) durchaus sinnvoll sein.

Für die meisten Fluoreszenzapplikationen ist ein Pinhole-Durchmesser von ca. 1 AE der beste Kompromiss.

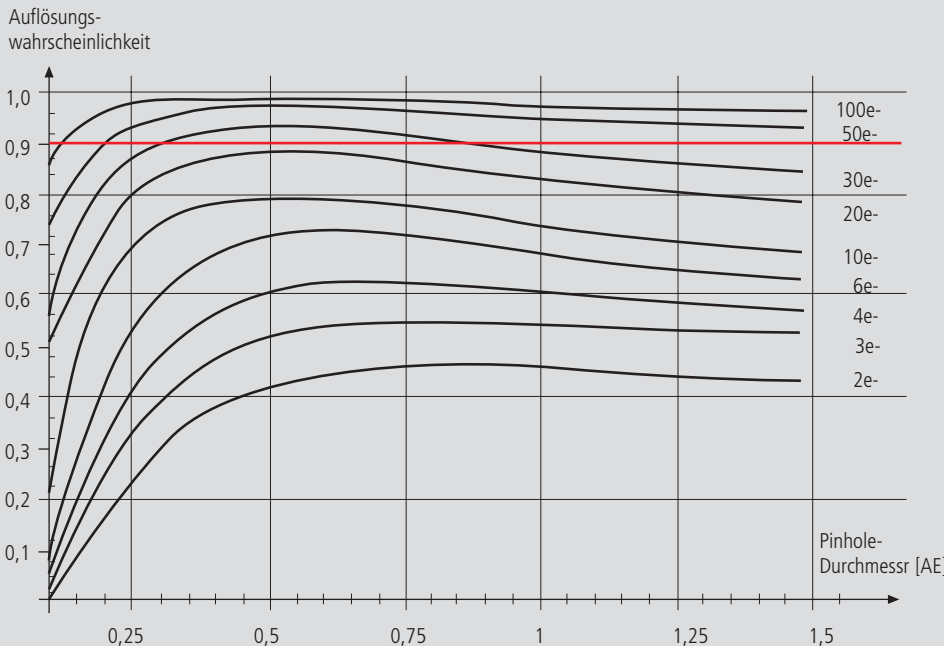


Abb. 17 Dargestellt ist die gerechnete Auflösungswahrscheinlichkeit zweier punktförmiger Selbstleuchter (Fluoreszenzobjekte) mit dem Abstand  $1/2$  AE in Abhängigkeit der Größe der konfokalen Blende für verschiedene Photoelektronenzahlen je Punktobjekt ( $e^-$ ). Die Bildraasterung erfolgt entsprechend dem Nyquist-Theorem (kritischer Rasterpunktabstand =  $0,25$  AE); das gerasterte Bild wird interpoliert. Die Photoelektronenzahl je Punktobjekt entspricht etwa dem doppelten Wert der Photoelektronenzahl je Pixel (bezogen auf das Pixel im Zentrum des Airy-Scheibchens). Jede Kurve entspricht einem Fit an eine feste Zahl diskreter Werte. Jeder Wert berechnet sich aus 200 Versuchen.

Die Auflösungswahrscheinlichkeit ist der Quotient zwischen den erfolgreichen Versuchen (aufgelöst) und der Zahl aller Versuche. Eine Auflösungswahrscheinlichkeit von 70% bedeutet entsprechend, dass 7 von 10 Versuchen zu aufgelösten Strukturen führen.

Eine Wahrscheinlichkeit  $> 90$  % ist zwingend, um mit Sicherheit davon ausgehen zu können, dass die Strukturen aufgelöst sind. Geht man von einem Fluoreszenzobjekt als Punktobjekt aus, das 8 FITC-Fluoreszenzmoleküle enthält (Farbstoffkonzentration von ca.  $1$  nMol), dann ergeben sich detektionsseitig bei einer Laserleistung von  $100 \mu\text{W}$  in der Pupille und einer NA des Objektivs von  $1,2$  ( $n = 1,33$ ) ca. 45 Photoelektronen je Punktobjekt.

## Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses

Durchmesser der konfokalen Blende, bei denen die Auflösungswahrscheinlichkeit zunächst unter 90 % liegt, lassen sich unter Umständen durch Verlängerung der Pixelzeit oder durch Einsatz der Average Funktion (Signalmitteilung) noch sinnvoll zur Bildaufnahme verwenden. Im ersteren Fall werden bei jedem Pixel zusätzliche Photonen gesammelt; im letzteren wird jede Zeile des Bildes oder das ganze Bild mehrmals abgetastet und die Intensitätswerte entsprechend aufsummiert oder gemittelt. Der Einfluss des Schrotrauschens auf die Bildqualität nimmt jeweils durch eine höhere Zahl detektierter Photonen ab. Da die Fluoreszenzbilder in einem konfokalen LSM in der Regel schrotrauschlimitiert sind, ist die Steigerung der Bildqualität durch die genannten Methoden offensichtlich.

Bei diesen Methoden wird außerdem das Detektorrauschen verringert, so wie das Laserrauschen bei hohen Signalstärken. Die folgenden Diagramme zeigen den Einfluss der Pixelzeit (Abbildung 18) und der Anzahl von Signalmittelungen (Abbildung 19) auf das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) in [dB]. Die vorliegende Linearität in der halblogarithmischen Darstellung gilt nur für schrotrauschlimitierte Signale. (Diese liegen in der Regel dann vor, wenn die zur Signalverstärkung notwendige PMT-Hochspannung größer als 500 V ist).

Eine Verdoppelung der Pixelzeit führt genauso wie eine Verdoppelung der Anzahl der Signalmittelungen zu einer Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses um den Faktor 2 (3 dB). Der Vorteil

der Average Methode ist die geringere Belastung der Probe, da die Expositionszeit pro Pixel konstant gehalten wird. Die Photonenstatistik wird durch Addition von Photonen aus mehreren Scansvorgängen verbessert ( $SNR = \sqrt{n \cdot N}$ ;  $N = \text{konstant}$ ,  $n = \text{Anzahl Mittelungen}$ ). Dagegen erzielt man bei Verlängerung der Pixelzeit eine direkte Verbesserung der Photonenstatistik durch eine größere Zahl detektierter Photonen  $N$  pro Pixel ( $SNR = \sqrt{N}$ ,  $N = \text{variabel}$ ); allerdings müssen dabei eher Bleicheffekte oder Sättigungserscheinungen der Fluorophore in Kauf genommen werden.

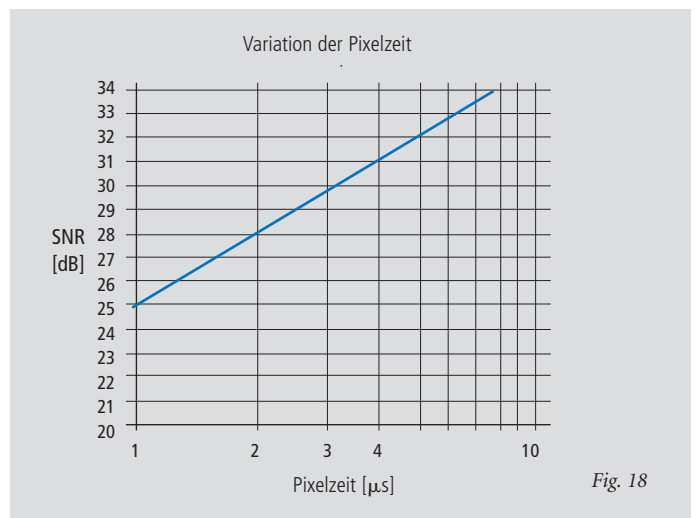


Fig. 18

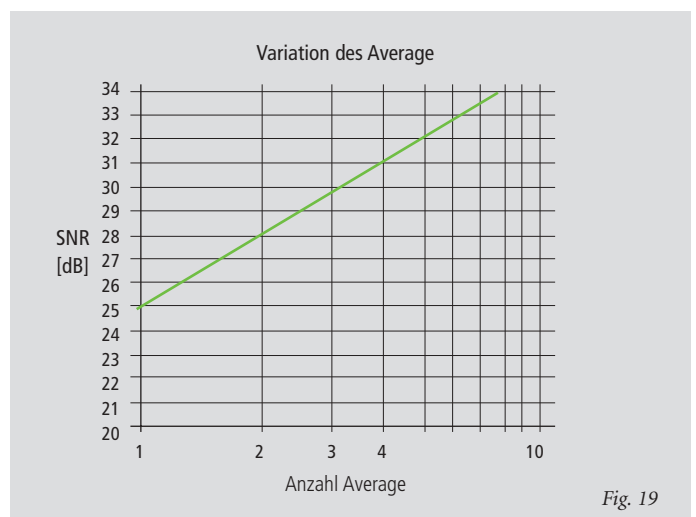
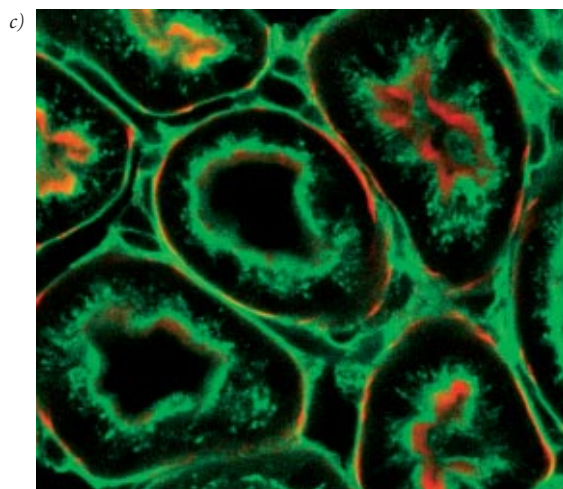
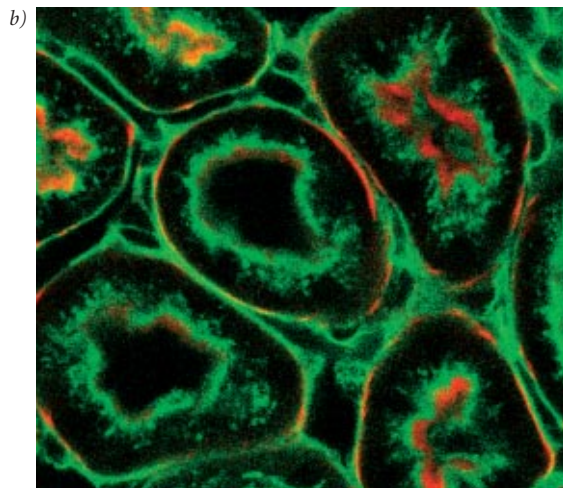
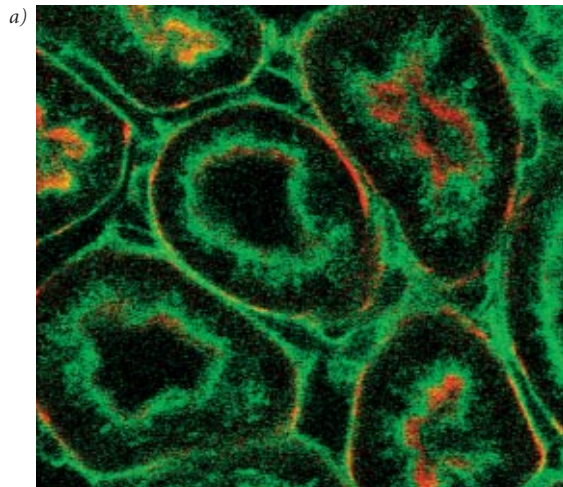


Fig. 19

Abb. 18 und 19 Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses. In Abb. 18 (oben) wurde die Pixelzeit variiert und die Zahl der Signalmittelungen konstant gehalten. In Abb. 19 (unten), wurde bei konstanter Pixelzeit die Zahl der Signalmittelungen variiert. Die Ordinate zeigt jeweils das SNR in [dB] und die Abszisse den freien Parameter (Pixelzeit, Anzahl der Mittelungen).



Die Bilder links verdeutlichen den Einfluss der Pixelzeit auf das Signal-Rausch-Verhältnis; die Erkennbarkeit von Objektdetails wird bei längerer Pixelzeit oder bei wiederholter Signalmittelung deutlich erhöht.

Einen großen Einfluss auf das Signal-Rausch-Verhältnis des Bildes hat auch die Effizienz des Detektionsstrahlengangs. Durch die richtige Wahl der Filter und Farbteiler hat der Benutzer direkten Einfluss auf diesen Parameter. So kann z.B. bei einer FITC-Fluoreszenz das SNR etwa um den Faktor 4 (6 dB) verbessert werden, wenn als separierendes Element zwischen Anregungs- und Emissionsstrahlengang statt eines Neutralteilers 80/20<sup>1</sup> ein für die vorliegende Fluoreszenz optimierter Farbteiler verwendet wird.

*Abb. 20 Drei konfokale Abbildungen desselben Fluoreszenzpräparats (Nierenschnitt einer Maus, Markierung der Glomerulen mit Alexa 488, grün, und des Aktins mit Alexa 564 Phalloidin, rot). Außer der Pixelzeit und der Anzahl der Mittelungen wurden alle Bilder mit den gleichen Parametern aufgenommen. Die Pixelzeiten betragen 0,8  $\mu$ s in Abb. a), 6,4  $\mu$ s (keine Signalmittelung) in Abb. b) und 6,4  $\mu$ s plus 4-malige zeilenweise Signalmittelung in Abb. c).*

<sup>1</sup> Ein Neutralteiler 80/20 reflektiert 20 % des Laserlichts zum Präparat und lässt 80 % der emittierten Fluoreszenz zum Detektor durch.

# Zusammenfassung

Die vorliegende Abhandlung enthält eine umfassende Darstellung der Qualitätsparameter Auflösung, Tiefendiskriminierung, Rauschen und Digitalisierung und ihrer Wechselwirkungen. Die vorliegenden Gleichungen ermöglichen tiefergehende theoretische Betrachtungen zu experimentellen Vorhaben und ihrer Realisierbarkeit mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop.

Über den Begriff der Auflösungswahrscheinlichkeit kann der bisher schwer quantifizierbare Wirkzusammenhang zwischen Auflösung und Rauschen in einem konfokalen LSM dargestellt werden. Dementsprechend sind die in Teil 1 gewonnenen Erkenntnisse nur dann gültig, wenn eine ausreichende Anzahl von Photonen den Detektor erreicht.

Tendenziell erfordern daher die meisten Anwendungen der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie einen Durchmesser der konfokalen Blende größer als 0,25 AE. Eine typische Einstellung ist ein Durchmesser von 1 AE.

# Glossar

<b><math>\alpha</math></b>	Öffnungswinkel eines Mikroskopobjektivs
<b>AE</b>	Airy-Einheit (Durchmesser des Airy-Scheibchens)
<b>dpix</b>	Pixelgröße in der Objektebene
<b>FWHM</b>	Halbwertsbreite ( <i>engl.</i> Full Width at Half Maximum) einer Intensitätsverteilung (z.B. optischer Schnitt)
<b>n</b>	Brechungsindex eines Mediums
<b>NA</b>	Numerische Apertur eines Mikroskopobjektivs
<b>PH</b>	Konfokale Blende ( <i>engl.</i> PinHole); im Strahlengang angeordnete Blende variabler Größe zur Herstellung optischer Schnitte
<b>PMT</b>	Sekundärelektronenvervielfacher ( <i>engl.</i> PhotoMultiplier Tube), im LSM als Detektor verwendet
<b>PSF</b>	Punktbildverwaschungsfunktion ( <i>engl.</i> Point Spread Function)
<b>SNR</b>	Signal-Rausch-Verhältnis ( <i>engl.</i> Signal-to-Noise Ratio)

Auf den folgenden Seiten werden einige Aspekte im Detail behandelt, die für die praktische Arbeit am Laser Scanning Mikroskop von besonderer Bedeutung sind.

**Pupillenausleuchtung**

**Optische Koordinaten**

**Fluoreszenz**

**Rauschquellen**

## LITERATUR

- 1. Barton, D.L., Tangyunyong, P.,**  
*Scanning Fluorescent Microthermal Imaging, Proceedings of 23<sup>rd</sup> Int Symposium for Testing and Failure Analysis (10/1997), Santa Clara, California*
- 2. Barton, D.L., Tangyunyong, P.,**  
*Infrared Light Emission from Semiconductor Devices, ISTFA, pp. 9-17 (1996)*
- 3. Beyer, H.,**  
*Handbuch der Mikroskopie, 2. Auflage, VEB Verlag Technik Berlin (1985)*
- 4. Born & Wolf,**  
*Principles of Optics, Pergamon Press, 6<sup>th</sup> Edition (1988)*
- 5. Brismar, H., Trepte, O., Ulfhake, B.:**  
*Spectra and Fluorescence Lifetimes of Lissamine, Rhodamine etc....: Influences of Some Environmental Factors Recorded with a Confocal Laser Scanning Microscope, The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Vol. 43, pp. 699-707 (7/1995)*
- 6. Keller, H.E.,**  
*Objective Lens for Confocal Microscopy, Handbook of Biological Confocal Microscopy, pp. 111-125, Plenum Press, 2<sup>nd</sup> Edition (1995)*
- 7. Lackmann, F., et al.,**  
*An Automated Latch-up Measurement System Using a Laser Scanning Mikroskope, SPIE Vol. 1028 Scanning Imaging (1988)*
- 8. Gröbler, B.,**  
*Untersuchungen zur Bildübertragung in abtastenden Mikroskopen unter besonderer Berücksichtigung der 3D-Abbildung, Dissertation, Universität Potsdam (1995)*
- 9. Hell, S., et al.,**  
*Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index, Journal of Microscopy, Vol. 169, pp. 391-405 (3/1993)*
- 10. Nitschke, R., Wilhelm, S., et al.,**  
*A modified confocal laser scanning microscope allows fast ultraviolet ratio imaging of intracellular Ca<sup>2+</sup> activity using Fura 2, Euro. J. Physiologie, Vol. 433: pp. 653-663 (1997)*
- 11. Oldenbourg, R. et al.,**  
*Image sharpness und contrast transfer in coherent confocal microscopy, Journal of Microscopy Vol. 172, pp. 31-39 (10/1993)*
- 12. Pawley, J.,**  
*Handbook of Biological Confocal Microscopy Plenum Press, 2<sup>nd</sup> Edition (1995)*
- 13. Stelzer, E.H.K.,**  
*The intermediate optical system of laser scanning confocal microscopes; Handbook of Biological Confocal Microscopy, pp. 139-154, Plenum Press, 2<sup>nd</sup> Edition (1995)*
- 14. Stelzer, E.H.K., et. al.,**  
*Nondestructive sectioning of fixed and living specimens using a confocal scanning laser fluorescence microscope: Microtomoscopy; SPIE, Vol. 809, pp. 130-136 (1987)*
- 15. Tanke, H.J., van Oostveldt, P., et al.,**  
*A parameter for the distribution of fluorophores in cells derived from measurements of inner filter effect and reabsorption phenomenon, Cytometry Vol. 2, pp. 359-369 (6/1982)*
- 16. Tsien, R.Y., Waggoner, A.,**  
*Fluorophores for Confocal Microscopy, Handbook of Biological Confocal Microscopy, pp. 267-277, Plenum Press, 2<sup>nd</sup> Edition (1995)*
- 17. Webb, R.H., Dorey, C.K.,**  
*The Pixelated Image, Handbook of Biological Confocal Microscopy, pp. 55-66, Plenum Press, 2<sup>nd</sup> Edition (1995)*
- 18. Wilhelm, S.,**  
*Über die 3-D Abbildungsqualität eines konfokalen Laser Scan Mikroskops, Dissertation, Fachhochschule Köln (1994)*
- 19. Wilson, T., Carlini, A.R.,**  
*Three dimensional imaging in confocal imaging systems with finite sized detectors; Journal of Microscopy, Vol. 149, pp. 51-66 (1/1988)*
- 20. Wilson, T., Carlini, A.R.,**  
*Size of detector in confocal imaging systems; Optical Letters Vol. 12, pp. 227-229 (4/1987)*
- 21. Wilson, T., Sheppard, C.J.R.,**  
*Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy, Academic Press, 2<sup>nd</sup> Edition (1985)*

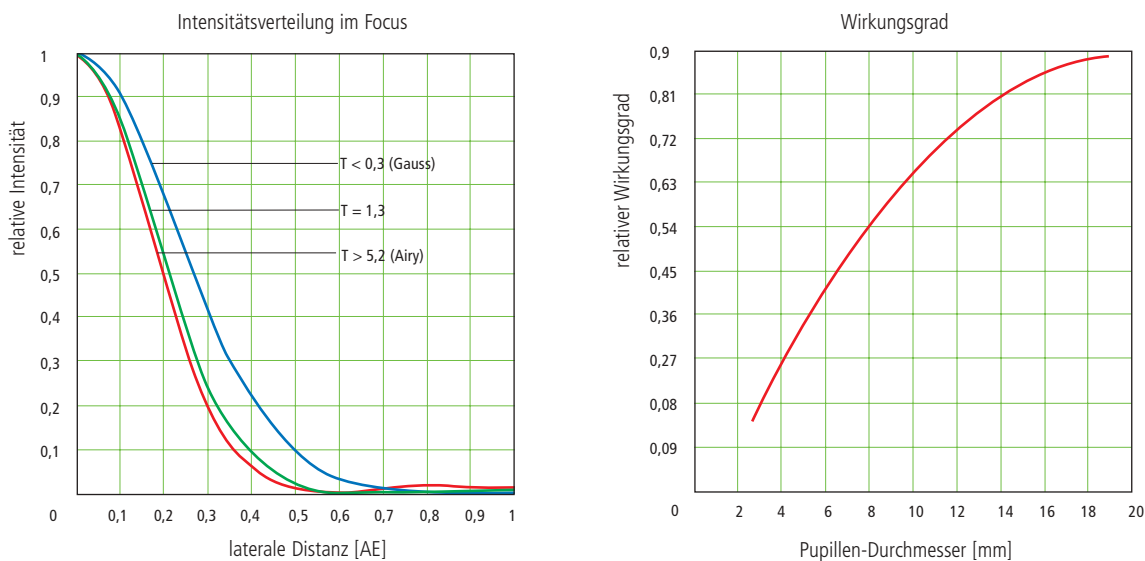
## Pupillenausleuchtung

Allen Betrachtungen in dieser Arbeit liegt eine Strahlenführung im konfokalen LSM zugrunde, bei der sämtliche Linsenquerschnitte homogen ausgeleuchtet sind. Im Objekt entsteht, als Fouriertransformierte der Intensitätsverteilung in der Pupillenebene des Objektivs, ein Fokus mit Airy-Verteilung. Die für eine Airy-Verteilung notwendige Überstrahlung der Objektivpupille zieht jedoch einen Energieverlust nach sich (geringerer Wirkungsgrad). [Bei Mikroskopobjektiven von Carl Zeiss entspricht dem Pupillendurchmesser eine körperliche Blende in der Nähe der Anschraubfläche.] Grundsätzlich hat die Airy-Verteilung eine geringere Halbwertsbreite bzw. ein höheres Auflösungsvermögen. Abbildung 21 links zeigt die Abhängigkeit der Intensitätsverteilung im Fokus vom Überstrahlungsfaktor T (dem Verhältnis aus Laserstrahldurchmesser ( $1/e^2$ ) und Pupillendurchmesser).

Dargestellt sind die relativen Intensitätsverteilungen im Fokus (jeweils normiert auf 1) für verschiedene Überstrahlungsfaktoren. Die rote Kurve resultiert bei einer homogenen Pupillenausleuchtung mit  $T > 5,2$ , die blaue bei einer gaußförmigen Pupillenausleuchtung mit  $T \leq 0,5$ ; die grüne

Kurve entspricht einem Überstrahlungsfaktor  $T = 1,3$ . Die laterale Koordinate ist in Airy-Einheiten (AE) normiert. Ab  $T = 3$  überwiegt der Airy-Charakter derart, dass bei weiter gesteigerter Überstrahlung kein Auflösungsgewinn mehr zu verzeichnen ist. (Auf Grund der Symmetrie des Punktbildes im Fall beugungsbegrenzter Abbildung ist nur der Intensitätsverlauf in positiver x-Richtung dargestellt.) Abbildung 21 rechts zeigt den prozentualen Wirkungsgrad in Abhängigkeit vom Pupillendurchmesser in Millimetern bei einer konstanten Laserstrahlaufweitung. Je kleiner der Pupillendurchmesser, desto höher die Überstrahlung, und desto höher der Energieverlust (d.h. um so geringer der Wirkungsgrad). Beispiel: Nutzt das Objektiv 50 % der angebotenen Beleuchtungsenergie, so bedeutet das ca. 8 % Auflösungsverlust gegenüber der reinen Airy-Verteilung. Will man den Auflösungsverlust auf 5 % senken, so gehen dafür 70 % der Beleuchtungsenergie verloren. Ziel in der Praxis ist eine möglichst optimale Annäherung an eine homogene Pupillenausleuchtung; dies ist einer der Gründe dafür, dass die Effizienz des Anregungsstrahlengangs in einem konfokalen LSM bei weniger als 10 % liegt.

Fig. 21



Der Überstrahlungsfaktor T ist definiert über das Verhältnis aus Durchmesser zu Pupillendurchmesser des verwendeten Objektivs:

$$T = \frac{d_{\text{laser}}}{d_{\text{pupille}}}; \quad \text{der Wirkungsgrad ergibt sich zu } \eta = 1 - e^{\left(\frac{-2}{T^2}\right)}$$

Das FWHM der Intensitätsverteilung in der Fokusebene ist definiert ab:

$$FWHM = 0.71 \cdot \frac{\lambda}{NA} \cdot \omega, \quad \text{für } \omega \text{ gilt: } \omega = \sqrt{0.51 + 0.14 \cdot \ln\left(\frac{1}{1-n}\right)}$$

Bei  $T < 0,6$  überwiegt der Gaußcharakter, bei  $T > 1$  der Airy-Charakter in der resultierenden Intensitätsverteilung.



## Optische Koordinaten

Um zu einer objektivunabhängigen Darstellung lateraler und axialer Größen zu gelangen, seien hier an der mikroskopischen Abbildung orientierte optische Koordinaten eingeführt.

Aufgrund der Abbildungsverhältnisse in einem konfokalen Mikroskop bietet es sich an, sämtliche Größen in lateraler Richtung in Vielfachen des Airy-Scheibchendurchmessers auszudrücken. Entsprechend ist die Airy-Einheit (AE) definiert als:

$$1AE = \frac{1,22 \cdot \bar{\lambda}}{NA}$$

*NA = Numerische Apertur des Objektivs*  
 *$\bar{\lambda}$  = Mittlere Wellenlänge (siehe Teil 1)*  
*mit  $NA = 1,3$  und  $\bar{\lambda} = 496 \text{ nm}$   $\rightarrow 1 \text{ AE} = 0,465 \mu\text{m}$*

Die Airy-Einheit wird vorrangig zur Normierung des Durchmessers der konfokalen Blende benutzt.

Um also einen gegebenen Blendendurchmesser in (AE) umzurechnen, muss die Gesamtvergrößerung des Systems berücksichtigt werden; d.h., das Airy-Scheibchen wird in die Ebene der konfokalen Blende projiziert (oder umgekehrt).

Analog dazu ist für die axiale Richtung eine Normierung in Vielfachen der wellenoptischen Tiefenschärfe sinnvoll. Ausgehend vom Rayleigh-Kriterium wird der folgende Ausdruck als Rayleigh-Einheit (RE) bezeichnet:

$$1RE = \frac{n \cdot \bar{\lambda}}{NA^2}$$

*n = Brechungsindex des Immersionsmediums*  
*mit  $NA = 1,3$ ,  $\bar{\lambda} = 496 \text{ nm}$  und  $n = 1,52$   $\rightarrow 1 \text{ RE} = 0,446 \mu\text{m}$*

Die Rayleigh-Einheit wird in erster Linie dazu verwendet, die optische Schnittdicke eines konfokalen LSM allgemeingültig darzustellen.

## Fluoreszenz

Die Fluoreszenz ist eines der wichtigsten Kontrastierungsverfahren in der biologischen konfokalen Mikroskopie. Zelluläre Strukturen können auf verschiedene Weise spezifisch mit fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorochrome oder Fluorophore genannt) markiert werden. Am Beispiel des Farbstoffes Fluorescein sollen die Wirkzusammenhänge bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie verdeutlicht werden. Fluorescein hat sein Absorptionsmaximum bei 490 nm. Üblicherweise wird ein konfokales LSM mit einem Argonlaser ausgerüstet, dessen Leistung auf der Linie 488 nm bei 15–20 mW liegt. Das System sei nun so eingestellt, dass in der Pupille des Mikroskopobjektivs eine Laserleistung von 500 µW vorliegt. Die Transmission des Mikroskopobjektivs sei idealisiert als 100 % angenommen.

Bei einem Objektiv C-Apochromat 63x/1,2W ergibt sich somit im Fokus, bezogen auf den Durchmesser des Airy-Scheibchens, eine Leistungsdichte von  $2,58 \cdot 10^5 \text{ W/cm}^2$ . Dies entspricht einem Anregungs-Photonenfluss von  $6,34 \cdot 10^{23} \text{ Photonen/cm}^2\text{sec}$ . Im Vergleich dazu ist der Anregungs-Photonenfluss in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie, bei gleichem Objektiv, vergleichbarer Lichtleistung (Xenonlampe mit 2 mW bei 488 nm) und einem Sehfelddurchmesser von 20 mm, mit  $2,48 \cdot 10^{18} \text{ Photonen/cm}^2\text{sec}$  um rund 5 Größenordnungen geringer. Dies wird auch dadurch verständlich, dass in einem konfokalen LSM der Laserstrahl in die Probe fokussiert wird, während im konventionellen Mikroskop die Beleuchtung mit parallelem Licht erfolgt.

Von eigentlichem Interesse ist jedoch die Fluoreszenz-emission (F). Die Emission eines einzigen Moleküls hängt ab vom molekularen Wirkungsquerschnitt ( $\sigma$ ), der Fluoreszenzquantenausbeute ( $Q_e$ ) und dem anregungsseitigen Photonfluss (I). Es gilt:

$$F = \sigma \cdot Q_e \cdot I \text{ [Photonen/sec]}$$

Grundsätzlich wird mit wachsender Anregungsintensität eine wachsende Zahl von Photonen emittiert. Tatsächlich ist jedoch die maximale Emissionsrate des Farbstoffmoleküls, d.h. die Zahl der pro Zeiteinheit emittierbaren Photonen, der begrenzende Parameter.

Die maximale Emissionsrate ist durch die Lebensdauer (= Strahlungsdauer) des angeregten Zustandes (Fluorescein: ca. 4,4 nsec) festgelegt (dieser Wert schwankt mit den Umgebungsbedingungen). Für Fluorescein liegt die maximale Emissionsrate im Mittel bei  $2,27 \cdot 10^8 \text{ Photonen/sec}$ . Dies entspricht einem anregungsseitigen Photonfluss von  $1,26 \cdot 10^{24} \text{ Photonen/cm}^2\text{sec}$ .

Erreicht man Werte größer als  $1,26 \cdot 10^{24} \text{ Photonen/cm}^2\text{sec}$ , so geht das Fluoresceinmolekül in Sättigung. Eine Erhöhung des anregungsseitigen Photonflusses führt dann zu keiner weiteren Steigerung der Emissionsrate; die Zahl der absorbierten Photonen bleibt konstant. Dieser Fall tritt im vorliegenden Beispiel ein, wenn die Laserleistung in der Pupille von 500 µW auf ca. 1mW erhöht wird. Abbildung 22 zeigt den Zusammenhang zwischen anregungsseitigem Photonfluss und der Laserleistung in der Pupille des o.g. Objektivs für eine Wellenlänge von 488 nm. In Abbildung 23 ist die Sättigung des molekularen Übergangs von Fluoresceinmolekülen dargestellt. Die Zahl der absorbierten Photonen ist der Zahl der emittierten Photonen in etwa proportional (logarithmische Skalierung).

Für einige wichtige Farbstoffe sind die charakteristischen Größen in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

	Absorpt. max. (nm)	$\sigma/10^{-16}$	$Q_e$	$\sigma^*Q/10^{-16}$
Rhodamine	554	3,25	0,78	0,91
Fluorescein	490	2,55	0,71	1,81
Texas Red	596	3,3	0,51	1,68
Cy 3,18	550	4,97	0,14	0,69
Cy 5,18	650	7,66	0,18	1,37

Quelle:

Handbook of Biological Confocal Microscopy, p. 268/Waggoner.

Im vorliegenden Beispiel ergibt sich  $F = 1,15 \cdot 10^8 \text{ Photonen/sec}$  oder 115 Photonen/µsec.

Das bisher Gesagte gilt natürlich nur, solange das Molekül nicht ausbleicht. In sauerstoffreicher Umgebung bleicht Fluorescein mit einer Quanteneffizienz ( $Q_b$ ) von ca.  $2,7 \cdot 10^{-5}$ . Ein Fluoresceinmolekül ist dann im Mittel  $n = 26000$  mal anregbar ( $n = Q/Q_b$ ), bevor es zerfällt. Bezogen auf die maximale Emissionsrate  $F_{\max}$  entspricht dies über

$t = \frac{n}{F_{\max}}$  einer Lebensdauer des Fluoreszenzmoleküls von ca.  $115 \mu\text{s}$ . Es wird deutlich, dass über eine Steigerung der Anregungsleistung nur in sehr begrenztem Umfang eine Erhöhung der Emissionsrate möglich ist. Die laserseitig zur Verfügung gestellte Leistung ist zwar für FRAP-Experimente (fluorescence recovery after photobleaching) sinnvoll, für normale Fluoreszenzanwendungen jedoch deutlich zu hoch. Einer möglichst fein abgestuften Einstellung der Anregungsleistung im Bereich niedriger Intensitäten kommt daher eine entsprechend große Bedeutung zu. Eine Steigerung der Emissionsrate über eine Erhöhung der Konzentration an Fluorochromen ist wiederum nur innerhalb gewisser Grenzen sinnvoll. Wird eine bestimmte Packungsdichte an Molekülen überschritten, müssen je nach Farbstoff andere Effekte, wie z.B. Quenching, beachtet werden, welche die Quantenausbeute trotz höherer Farbstoffkonzentration drastisch verringern.

Ein weiteres zu beachtendes Problem ist die Detektionsempfindlichkeit des Systems. Da das Fluoreszenzmolekül stochastisch in den gesamten Raumwinkel mit derselben Wahrscheinlichkeit abstrahlt, werden ca. 80 % der Photonen nicht von der Objektivapertur ( $NA = 1,2$ ) erfasst.

In Verbindung mit den Reflexions- und Transmissionseigenschaften der nachfolgenden optischen Komponenten sowie der Quanteneffizienz des PMT werden weniger als 10 % der emittierten Photonen detektiert bzw. in Photoelektronen umgewandelt (Photoelektron = detektiertes Photon). Im Fall von Fluorescein ( $NA = 1,2$ ,  $100 \mu\text{W}$  Anregungsleistung,  $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) führt ein Photonenfluss von  $F \sim 23$  Photonen/ $\mu\text{sec}$  bei einer Scanzeit von  $4 \mu\text{sec}/\text{Pixel}$  zu 3–4 Photoelektronen je Molekül und Pixel.

In der Praxis wird man jedoch stets eine mit Farbstoff markierte Zelle betrachten. Das Zellvolumen ist in der Regel deutlich größer als das Volumen des Abtastpunktes. Von eigentlichem Interesse ist daher die bei einer bestimmten Farbstoffkonzentration im Abtastvolumen vorliegende Zahl

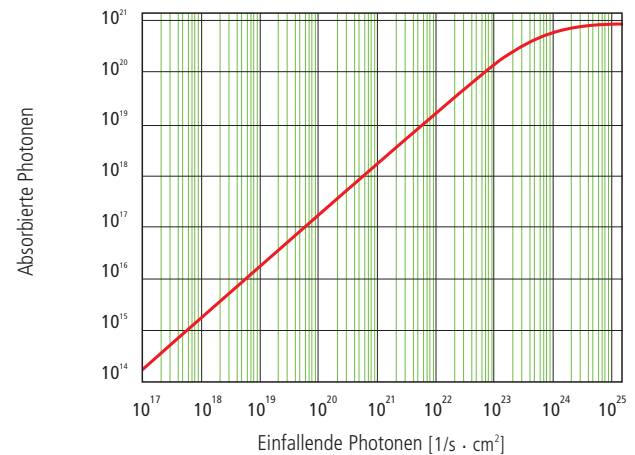
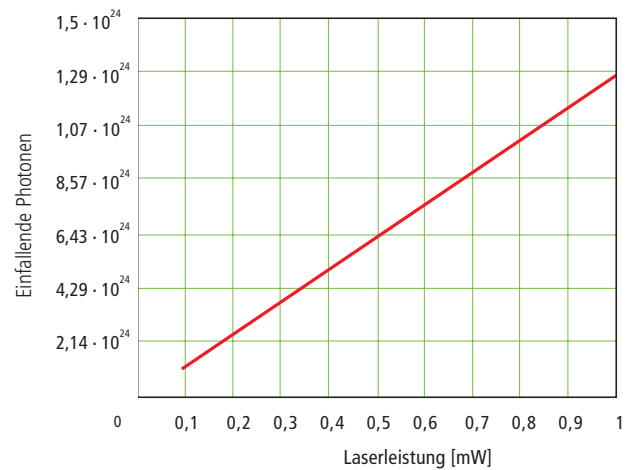


Abb. 22 Anregungsseitiger Photonenfluss bei unterschiedlicher Laserleistung (oben) und Sättigungsverhalten (absorbierte Photonen) des molekularen Übergangs von Fluorescein (unten)

an Farbstoffmolekülen. Für die folgenden Betrachtungen werden Diffusionsprozesse von Farbstoffmolekülen vernachlässigt. Die errechneten Zahlen an Photoelektronen basieren auf den oben angeführten Parametern.

Für  $\lambda = 488 \text{ nm}$  und  $NA=1,2$  errechnet sich ein Abtastvolumen von  $V=12,7 \cdot 10^{-18} \text{ l}$ . Unter Annahme einer Farbstoffkonzentration von  $0,01 \mu\text{Mol/l}$  liegt eine Zahl von ca. 80 Farbstoffmolekülen innerhalb des Abtastvolumens vor. Dies entspricht einer Zahl von ca. 260 Photoelektronen je Pixel. Verringert man die Konzentration auf  $1 \text{ nMol/l}$ , so sinkt die Zahl der Moleküle auf 8 und die der Photoelektronen auf 26 je Pixel.

Als Fazit kann festgehalten werden, dass in den meisten Anwendungen der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie mit einer sehr geringen Zahl an detektierten Photonen zu rechnen ist ( $<1000$ ). Werden Maßnahmen ergriffen, um die Photonenzahl zu erhöhen, müssen farbstoffspezifische Eigenschaften (wie z.B. Bleichen) berücksichtigt werden.

## Rauschquellen

Die im LSM wirksamen Rauschquellen erstrecken sich auf die gesamte Signalkette – vom Laser bis zur A/D-Wandlung. Man unterscheidet im wesentlichen vier verschiedene Rauschquellen:

### Laserrauschen $q$

Ursache für Laserrauschen sind zufällige Schwankungen der Besetzung angeregter Zustände im Lasermedium. Laserrauschen ist proportional zur Signalhöhe  $N$  und daher von Bedeutung bei einer hohen Zahl detektierter Photonen ( $N < 10\,000$ ).

### Schrotrauschen (Poissonrauschen)

Ursache ist die Quantennatur des Lichts. Photonen mit der Energie  $h \cdot \nu$  treffen in zufällig verteilten Zeitabständen am Sensor ein. Die wirksame Zufallsverteilung ist die Poisson-verteilung. Deshalb ist

$$SNR \approx \Delta N_{Poisson} = \sqrt{N}$$

mit  $N$  = Anzahl der pro Pixelzeit detektierten Photonen (= Photoelektronen = aus der Kathode des PMT durch auftreffende Photonen herausgelöste Elektronen). Bei geringen Photoelektronenzahlen ( $N < 1000$ ) kann die Zahl  $N$  der am Sensor eintreffenden Photonen nur noch mit einer Sicherheit von  $\pm \sqrt{N}$  bestimmt werden.

$N$  kann wie folgt berechnet werden:

$$N = \frac{\text{Photonen}}{QE_{(\lambda)} \cdot \text{Pixelzeit}}$$

Dabei ist:  
 $QE(\lambda)$  = Quantenausbeute des Sensors bei der Wellenlänge  $\lambda$ ;  
 $1 \text{ Photon} = h \cdot c / \lambda$ ; mit  $c$  = Lichtgeschwindigkeit  
 und  $h$  = Plancksches Wirkungsquantum

### Sekundäremissionsrauschen

Ursache ist die zufällige Schwankung der Vervielfachung der Photoelektronen an den Dynoden eines PMT. Die Höhe des Sekundäremissionsrauschens ist ein Faktor zwischen 1,1 und 1,25, je nach Dynodensystem und der angelegten Hochspannung (Verstärkung).

Allgemein gilt: je höher die PMT-Spannung, desto geringer ist das Sekundäremissionsrauschen, da sich durch die höhere Spannung zwischen den Dynoden die Sammeleffizienz verbessert und die Schwankung in der Vervielfachung abnimmt.

### Dunkelrauschen

Ursache ist die Generierung von thermischen Dunkelektronen  $N_d$  unabhängig von der Sensorbeleuchtung.  $N_d$  schwankt statistisch um  $\sqrt{N_d}$ . Das Dunkelrauschen ist spezifiziert für eine PMT-Spannung von 1000 V; bei niedrigeren Spannung verliert es zunehmend an Bedeutung.

Dunkelrauschen kann durch Sensorkühlung verringert werden. Es wird jedoch nur dann merklich reduziert, wenn  $N \leq N_d$ , z.B. in objektfreien Stellen eines Fluoreszenzpräparates. Zusätzlich muss das Dunkelrauschen die dominierende Rauschquelle sein, was in den meisten Anwendungen nicht der Fall ist, damit durch Kühlung eine Signalverbesserung sichtbar wird. Bei Sensordioden ist zusätzlich das Verstärkerrauschen und bei CCD-Sensoren das Ausleserauschen zu berücksichtigen. Diese Rauschfaktoren sollen hier nicht betrachtet werden. Für die mittlere quadratische Abweichung  $\Delta N$  vom Mittelwert ( $N + N_d$ ) der registrierten Photo- und Dunkelektronen erhält man dann

$$\Delta N = se \cdot \sqrt{(N + N_d) (1 + q^2)}$$

so dass für das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) insgesamt angegeben werden kann:

$$SNR = \sqrt{\frac{N^2}{se^2 (N + N_d) (1 + q^2)}}$$

Dabei ist

- $N$  = Photoelektronenzahl pro Pixelzeit (Messzeit)
- $se$  = Multiplikativer Rauschfaktor der Sekundäremission
- $q$  = Peak-to-Peak-Rauschfaktor des Lasers
- $N_d$  = Dunkelektronenzahl in der Mess- bzw. Pixelzeit

Beispiel:

Für  $N = 1000$ ,  $N_d = 100$ ,  $se = 1,2$ , und  $q = 0,05$  ergibt sich ein SNR von:

$$SNR = \sqrt{\frac{1000^2}{1,2^2 (1000 + 100) (1 + 0,05^2)}} = 25,1$$

#### **AUTOREN**

**Stefan Wilhelm, Bernhard Gröbler,  
Martin Gluch, Hartmut Heinz †**

(Carl Zeiss Jena GmbH)

All den anderen Mitarbeitern, die durch ihre Mithilfe das Zustandekommen vorliegender Broschüre ermöglicht haben, sei an dieser Stelle gedankt.

#### **Carl Zeiss**

Mikroskopsysteme

07740 Jena

Telefon: 0 36 41 64 34 00

Telefax: 0 36 41 64 31 44

E-Mail: mikro@zeiss.de

**[www.zeiss.de/lsm](http://www.zeiss.de/lsm)**

Änderungen im Interesse der technischen Weiterentwicklung vorbehalten.

Gedruckt auf umweltfreundlich,  
chlorfrei gebleichtem Papier.

45-0029 d/09.03