



# Einsatz des Bildinversionsverfahrens in der konfokalen Mikroskopie

D. Weigel\*, A. Kießling, R. Kowarschik  
 Institut für Angewandte Optik, Abbe Center of Photonics,  
 Zentrum für Medizinische Optik und Photonik,  
 Friedrich-Schiller-Universität Jena

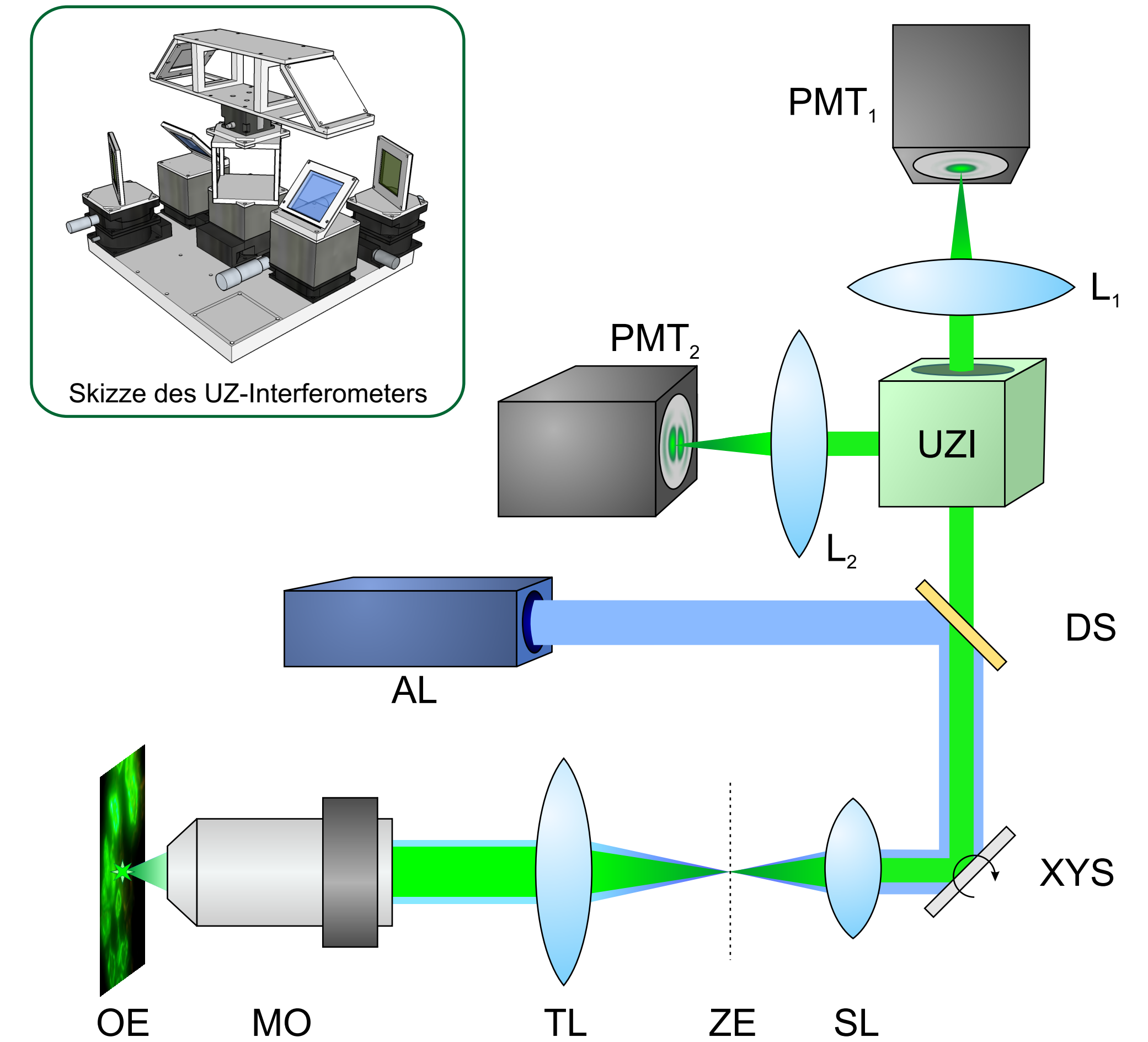


## Hintergrund

Mit Hilfe der Bildinversionsmikroskopie ist es möglich, das laterale Auflösungsvermögen konfokaler Fluoreszenzmikroskope deutlich zu steigern [1,2,3]. Hierfür wird die Probe durch ein bildinvertierendes Interferometer auf zwei Detektoren (z.B. PMTs) abgebildet. Aufgrund der räumlichen Inkohärenz des Fluoreszenzlichtes können nur Bereiche nahe der Interferenzachse miteinander interferieren. Am konstruktiven Ausgang kommt es dort daher zu einem Interferenzpeak und am destruktiven Ausgang zu einem Minimum. In größeren Abständen hingegen überlagert sich das Bild der Probe inkohärent mit seiner räumlich invertierten Kopie. Durch die Subtraktion des Signals vom destruktiven Ausgang von dem des konstruktiven wird der Gleichlichtanteil unterdrückt, und es wird ausschließlich das Interferenzsignal detektiert. Die Interferenzstruktur ist schmäler als das Punktbild des abbildenden Systems, was zu einer Auflösungs- und Kontraststeigerung führt. Durch die Kombination eines bildinvertierenden Interferometers mit einem konventionellen Lichtmikroskop konnte in der Vergangenheit bei niedrigen numerischen Aperturen (NA) bereits eine Auflösungssteigerung von ca. 28 % erzielt werden [3]. Im Folgenden wird nun ein konfokales System mit einer NA von 1,2 vorgestellt.

## Laboraufbau

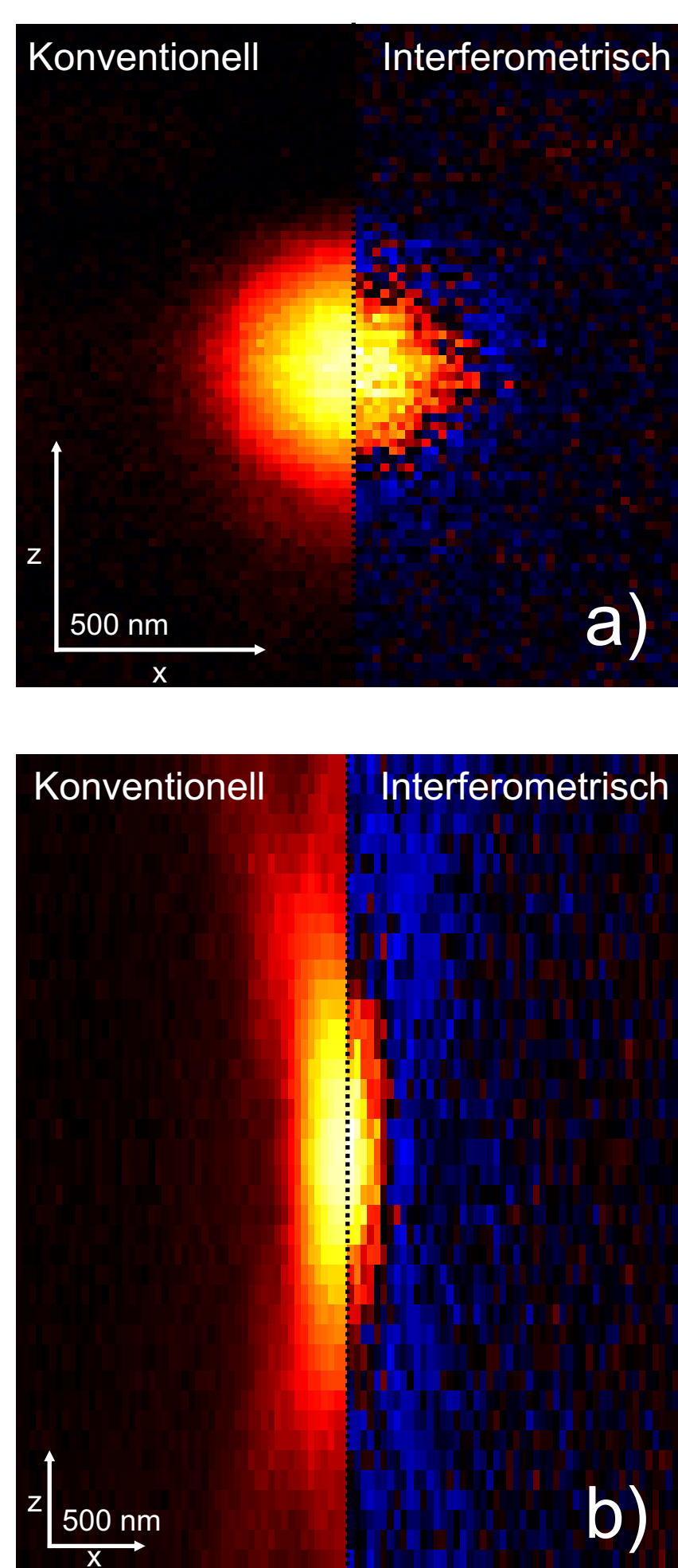
Abb. 1



Schematische Darstellung des Laboraufbaus

Zur Anregung der fluoreszierenden Probe wird der kollimierte Strahl des Argon-Lasers (AL,  $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) über den dichroitischen Strahlteiler (DS) und den XY-Scannerspiegel (XYS) zum Mikroskopobjektiv (MO) geführt und in die Objektebene (OE) fokussiert. Das Fluoreszenzlicht (grün,  $\lambda \approx 525 \text{ nm}$ ) wird über die Tubuslinse vergrößert (40x) in die Zwischenebene (ZE) abgebildet und von dort mit der Scannerlinse (SL) und den Linsen ( $L_{1,2}$ ) durch das UZ-Interferometer (UZI) hindurch auf die Photomultiplier (PMT<sub>1,2</sub>) abgebildet. Vor diesen ist jeweils ein Pinhole mit einem Durchmesser von ca. 4 Airy-Scheibchen angebracht.

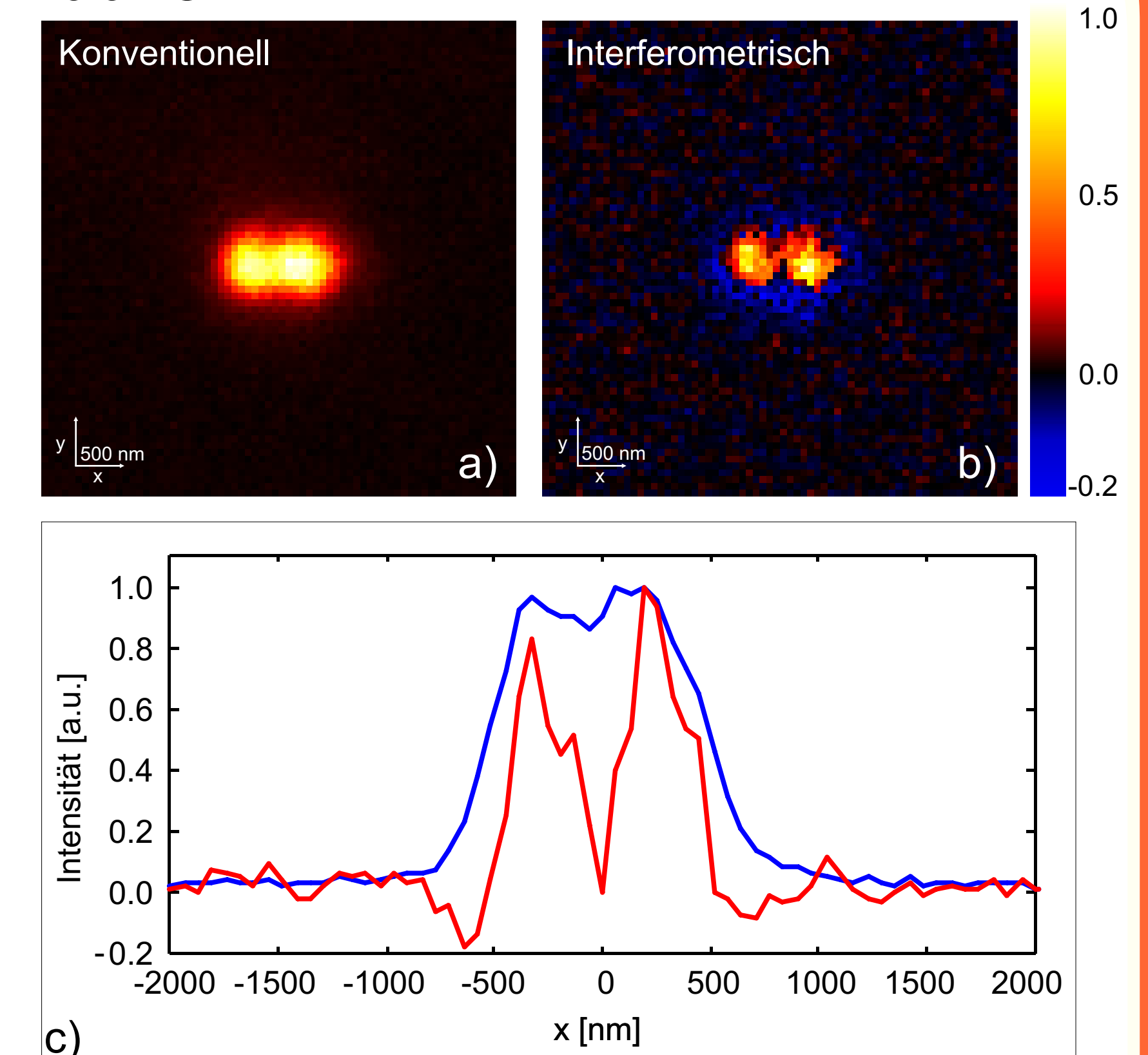
Abb. 2



## Punktbild und Zweipunktauflösung

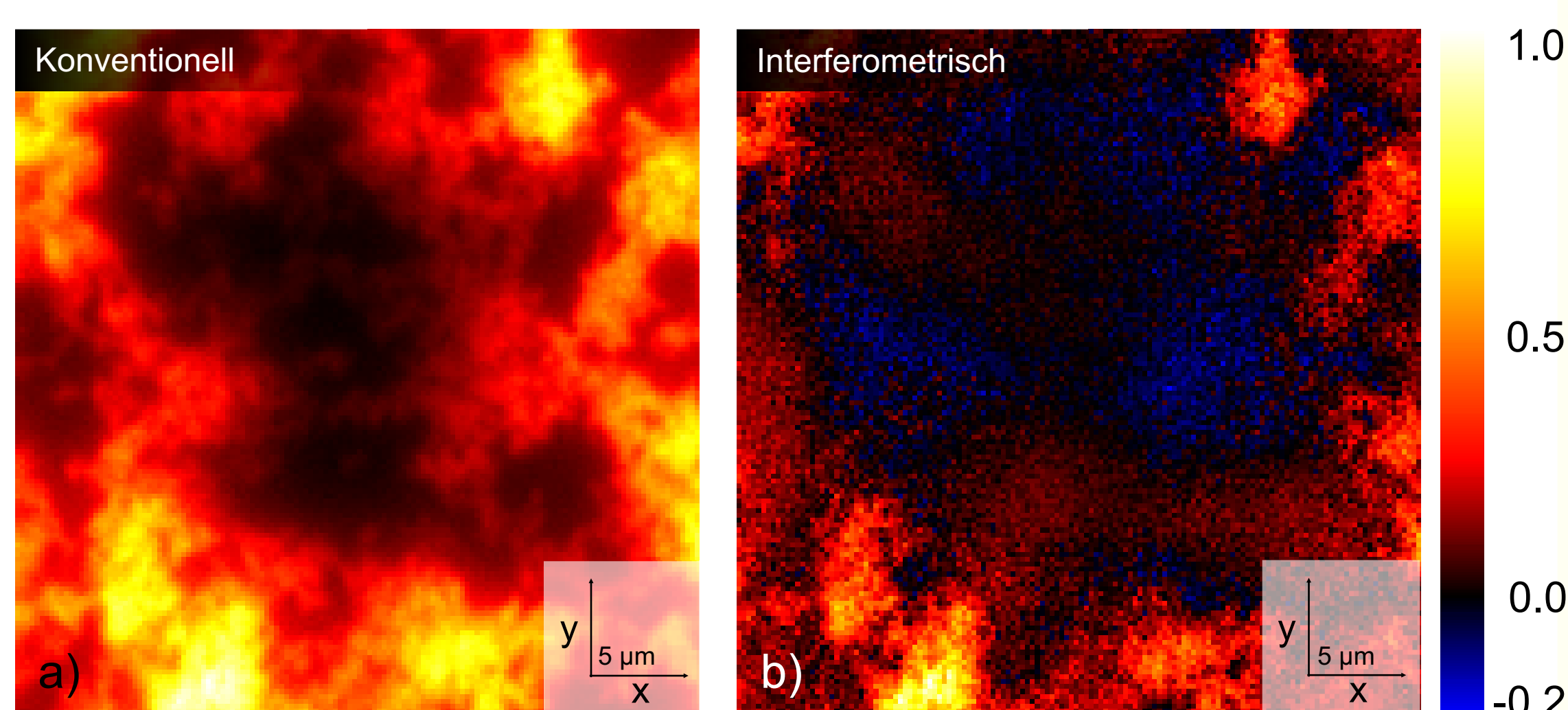
Um das Auflösungsvermögen des konventionellen konfokalen Fluoreszenzmikroskops mit dem interferometrisch verbesserten System vergleichen zu können, wurden Nano-Beads ( $\varnothing \approx 20 \text{ nm}$ ) aufgenommen. Abbildung 2 zeigt die XY- bzw. XZ-Schnitte durch eine Struktur, mit welcher die Punktbildfunktion (PSF) des Systems bestimmt werden konnte. Neben der Verringerung der Halbwertsbreite um ca. 33% in lateraler Richtung können erwartungsgemäß auch negative Bildwerte beobachtet werden. In Abbildung 2.b) kann ein weiterer Effekt nachgewiesen werden, welcher aus Simulationen bereits bekannt ist [2]: Die Nebenmaxima der PSF werden auch außerhalb der Fokusebene unterdrückt. Negativ fällt allerdings das deutlich schlechtere Signal-Rausch-Verhältnis auf, welches durch die Subtraktion der beiden PMT-Signale zu erklären ist.

Abb. 3



Dargestellt ist eine Anordnung von Nano-Beads, welche einer Doppelpunkt-Struktur ähnelt. Während diese Struktur konventionell kaum noch aufgelöst werden kann (a), ist in der interferometrischen Aufnahme deutlich zu erkennen, dass es sich um zwei Objekte handelt (b). Im Schnitt durch die Struktur (c) ist zu erkennen, dass die Intensität zwischen den Punkten interferometrisch fast auf 0 abfällt, während sie konventionell nur auf ca. 0,86 absinkt.

Abb. 4



Dargestellt ist eine tiefenausgedehnte Struktur, welche sich aus fluoreszierenden Nano-Beads zusammensetzt. Mit dem konventionellen konfokalen Fluoreszenzmikroskop sind tiefer gelegene Strukturen deutlich, wenn auch unscharf zu erkennen. Durch die Unterdrückung der Nebenmaxima außerhalb der Fokusebene wird der Einfluss tiefer liegender Strukturen durch das interferometrische Verfahren minimiert.

## Ausgedehnte Strukturen

Abbildung 4 zeigt die Aufnahme von dicht gepackten Nano-Beads, welche auch tiefenausgedehnte Strukturen ausbilden. Dadurch wird deutlich, dass die Steigerung des lateralen Auflösungsvermögens nicht der einzige Vorteil der Bildinversionsmikroskopie ist. Die Unterdrückung der Nebenmaxima, auch außerhalb der Fokusebene, führt zu einer starken Verminderung von Streulicht. Licht von Strukturen unter- oder oberhalb der Fokusebene wird somit effektiv unterdrückt. Die Bildinversionstechnik eignet sich daher auch dafür, die Qualität von optischen Schnitten durch dreidimensionale Strukturen deutlich zu verbessern.

[1] N. Sandeau, and H. Giovannini, "Increasing the lateral resolution of 4pi fluorescence microscopes," J. Opt. Soc. Am. A23, 1089–1095 (2006)

[2] K. Wicker, R. Heintzmann, "Interferometric resolution improvement for confocal microscopes," Opt. Express 15, 12206 - 12216, (2007)

[3] D. Weigel, R. Foerster, H. Babovsky, A. Kiessling, and R. Kowarschik, "Enhanced resolution of microscopic objects by image inversion interferometry," Opt. Express 19, 26451–26462 (2011)