

Grundlagen der konfokalen Laserscanning Mikroskopie

Die konfokale Laserscanning Mikroskopie hat in der Biologie und Medizin eine zentrale Bedeutung erlangt. Gegenüber der konventionellen Mikroskopie erhält man einen wesentlich besseren Kontrast und eine höhere Nachweisempfindlichkeit. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, Schichtaufnahmen aus verschiedenen Probentiefen zu machen und so ein dreidimensionales Bild zu konstruieren. Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie wurde erstmals in einem amerikanischen Patent aus dem Jahre 1957, das an M. Minsky vergeben wurde, beschrieben.¹

Prof. Dr. Axel Donges/Isny im Allgäu

■ Damals – der Laser war noch nicht erfunden – fehlte es allerdings an den notwendigen starken Lichtquellen, sodass es noch zehn Jahre dauerte, bis Aufnahmen ausreichender Bildqualität veröffentlicht wurden.² In den 70er-Jahren wurde die Entwicklung des konfokalen Mikroskops stark vorangetrieben, sodass seit Mitte der 80er-Jahre ausgereifte Systeme zur Verfügung stehen. Die Anwendungen der konfokalen Mikroskopie sind sehr vielfältig. Die konfokale Mikroskopie hat sich vornehmlich in der Biologie und der medizinischen Forschung durchgesetzt. Aber auch im industriellen Anwendungsbereich – z.B. Rauigkeitsmessung, Vermessung dreidimensionaler Mikrohärteeindrücke, Schichtdickenmessung – hat die konfokale Mikroskopie große Bedeutung gewonnen. Die zahlenmäßig größte Anwendung hat das Prinzip der konfokalen Mikroskopie bei den CD-Playern bzw. CD-ROM-Laufwerken erfahren.³

Geometrisch-optische Betrachtung

Das Grundprinzip der konfokalen Mikroskopie zeigt Abbildung 1: Eine Punktlichtquelle P wird mit einem Objektiv abgebildet. Die Punktlichtquelle wird durch eine kleine Lochblende, auf die ein Laserstrahl fokussiert wird, realisiert. Meist wird ein Argon-Ionen- oder HeNe-Laser eingesetzt. Liegt der Bildpunkt Q – wie in Abbildung 1 links dargestellt – auf dem zunächst unendlich dünn angenommenen Objekt, so wird der Punkt Q umgekehrt wieder in P bzw. wegen des Strahlteilers in P' abgebildet. Im Punkt P' befindet sich ein Punktdetektor, der das vom Objekt diffus reflektierte Licht oder das vom Objekt emittierte Fluoreszenzlicht nachweist. Der Punktdetektor wird praktisch durch eine kleine Lochblende realisiert, die die aktive Fläche des Detektors verringert. Durch Verschieben des Objekts senkrecht zur optischen Achse kann die Oberfläche Punkt für Punkt abgetastet werden. Auf diese Weise lässt sich ein zweidimensionales Bild gewinnen. Betrachten wir nun den Fall, dass das Objekt in Richtung der optischen Achse verschoben wurde, das Objekt sich also in Abbildung 1 in Position b) oder c) befindet. Die

Punktlichtquelle P wird nun unscharf auf das Objekt „abgebildet“. Anschließend wird der Beleuchtungsfleck Q nochmals unscharf in die Ebene des Punktdetektors „abgebildet“. Als Folge sinkt die vom Punktdetektor nachgewiesene Lichtleistung drastisch ab. Licht, das von außerhalb der Bildebene der Lichtquelle stammt, wird somit praktisch nicht registriert. Von dreidimensionalen Objekten lassen sich mit einem konfokalen Mikroskop optische Schnitte anfertigen. Objektteile, die außerhalb der Bildebene der Lichtquelle liegen, werden ausgeblendet und nicht – wie bei der konventionellen Mikroskopie – unscharf abgebildet. Es können optische Schnitte in verschiedenen Tiefen durchgeführt und so dreidimensionale Datensätze des Objekts gewonnen werden.

Auflösungsvermögen

Wie beim konventionellen Mikroskop wird auch beim konfokalen Mikroskop das Auflösungsvermögen durch die Beugung begrenzt. Unter dem Auflösungsvermögen Δr wird der kleinstmögliche Abstand zweier Objektpunkte verstanden, bei dem die beiden Punkte gerade

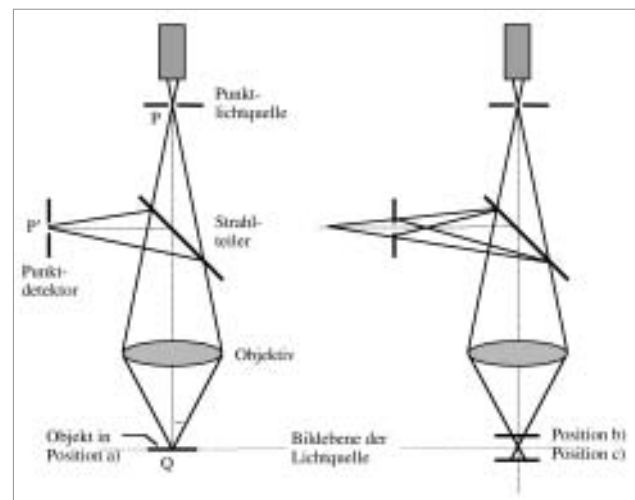


Abb.1: Prinzip der konfokalen Mikroskopie.

noch getrennt wahrgenommen werden. Wir betrachten zunächst zwei Objektpunkte, die in einer Ebene senkrecht zur optischen Achse liegen. Aufgrund unvermeidbarer Beugung wird die punktförmige Lichtquelle P nicht – wie zuvor angenommen – in den Bildpunkt Q , sondern in ein beugungsbegrenztes Scheibchen mit endlichem Durchmesser abgebildet. Zwei Objektpunkte können nur dann als getrennte Punkte wahrgenommen werden, wenn ihr Abstand größer als der Durchmesser des Beugungsscheibchens ist. Üblicherweise wird die Halbwertsbreite der Intensität des Beugungsscheibchens als Durchmesser angesehen. Mit dieser Definition folgt in guter Näherung für die laterale Auflösung:⁴

$$\Delta r_{\text{transversal}} = \frac{0,4 \cdot \lambda}{n \sin \alpha}$$

Hierbei bedeuten λ die Wellenlänge der Punktlichtquelle, n die Brechzahl des Immersionsmediums zwischen Objektiv und Objekt und α der Öffnungswinkel des Strahlkegels des Objektivs. Die Größe $n \sin \alpha$ wird auch als numerische Apertur bezeichnet. Die Gleichung gilt auch für die konventionelle Mikroskopie, allerdings – wegen der dort vorliegenden inkohärenten Beleuchtung – mit einem etwas größeren Zahlenwert.

Betrachten wir nochmals die in Abbildung 1 links dargestellte Situation. Wegen der Beugung entsteht am Ort des Detektors kein Bildpunkt P' , sondern ein beugungsbegrenztes Scheibchen, dessen Intensität in der Mitte am größten ist. Wird nun das unendlich dünn angenommene Objekt aus der Bildebene der Punktlichtquelle herausgeschoben (Abb. 1: Position b oder c), so wächst der Fleckdurchmesser in der Detektorebene an und folglich nimmt die Maximalintensität ab. Als axiale Auflösung wird nun diejenige Objektverschiebung (zum Objektiv hin oder vom Objektiv weg) definiert, bei der die zentrale Intensität gerade auf die Hälfte absinkt. Die axiale Auflösung berechnet sich näherungsweise zu:⁴

$$\Delta r_{\text{axial}} = \frac{0,45 \cdot \lambda}{n(1 - \cos \alpha)} = \frac{0,45 \cdot \lambda}{n \left[1 - \cos \left(\arcsin \frac{n \sin \alpha}{n} \right) \right]}$$

Scanverfahren

Um einen dreidimensionalen Datensatz eines Objekts zu erhalten, muss der Bildpunkt Q in geeigneter Weise durch das Objekt geführt werden, d. h. es müssen alle drei Raumrichtungen – x, y, z – der Reihe nach abgetastet werden. Dies lässt sich auf verschiedene Weisen realisieren. Es wird zwischen

- Objektscannern
- Objektivscannern und
- Strahlscannern

(und deren Kombinationen) unterschieden, wobei sich die Strahlscanner nochmals in Einpunkt-, Mehrpunkt- und Spaltscannern untergliedern.

Beim reinen Objektscanner wird das Objekt in alle drei Raumrichtungen verschoben. Sie haben den Vorteil einer einfachen Optik mit nur einem ruhenden, zentral-

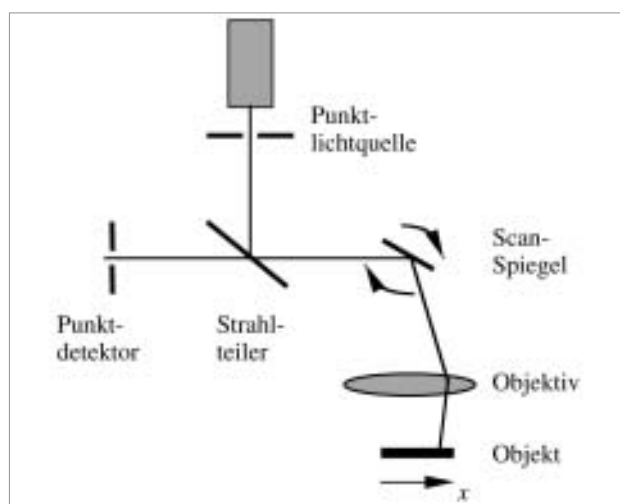


Abb. 2: Prinzip eines Strahlscanners.

symmetrischen Strahl. Die Scangeschwindigkeit wird jedoch durch die Massenträgheit und die Wechselwirkung des Objekts mit dem Immersionsöl begrenzt. Ähnlich ist der Sachverhalt bei reinen Objektivscannern, bei denen die gesamte Optik bewegt wird. Als Aktoren dienen bei Objekt- und Objektivscannern Galvanometer, Piezokristalle oder Motore mit Getriebe. Bei Strahlscannern wird der Beleuchtungspunkt Q mithilfe beweglicher Spiegel oder akustooptischer Deflektoren über das Objekt verschoben. Neben Einpunkt- werden auch Mehrpunkt- und Spaltscanner eingesetzt, bei denen simultan mehrere Objektpunkte (mit mehreren Punktdetektoren) vermessen werden können. Mehrpunkt- und Spaltscanner erlauben höhere Bildraten, liefern jedoch ein geringeres Signal/Rausch-Verhältnis. Dies beruht auf der Tatsache, dass die Detektoren auch in geringem Umfang Licht von unscharfen Objektbereichen benachbarter Punkte detektieren. Abbildung 2 zeigt als Beispiel das Prinzip eines Einpunktscanners, der die x -Richtung „schnell“ abscannt, während die beiden anderen Richtungen beispielsweise durch „langsame“ Objektverschiebung abgetastet werden. Lichtschnitte bei der Konfokalmikroskopie bestehen beispielsweise aus 1.024 mal 1.024 Bildpunkten mit einer Datentiefe von 8 Bit (= 256 Graustufen). Ein schneller x/y -Scanner benötigt dazu etwa 1 Sek. Abhängig von der Schichtdicke werden meist zwischen 16 bis einige 100 Schnitte aufgenommen. Dementsprechend groß sind die Anforderungen an das Speichervermögen des Systemcomputers, der auch für die Steuerung der Scaneinrichtung und für die grafische Darstellung zuständig ist. Die Entwicklung der konfokalen Mikroskopie war daher eng an die Entwicklung leistungsfähiger Computer gekoppelt. ■

Die Literaturliste kann in der Redaktion angefordert werden.

■ KONTAKT

Prof. Dr. Axel Donges

Naturwiss.-techn. Akademie Prof. Dr. Grübler gGmbH
Seidenstraße 12–35, 88316 Isny im Allgäu