

HyVolution – Superauflösung mit einem konfokalen Mikroskop

Rolf T. Borlinghaus, Constantin Kappel

Leica Microsystems Mannheim

Mit der Erfindung des Mikroskopes stellte sich auch die Frage, ob es möglich sei, in einem mikroskopischen Bild mehr Details zu sehen, anstatt die Objekte einfach nur zu vergrößern. Ernst Abbe war der erste, der dieser Frage auf den Grund ging und herausfand, dass es tatsächlich eine Grenze für die Feinheit der Details gibt, die in gewöhnlichen Lichtmikroskopen sichtbar werden können^[1].

Ernst Abbe setzte den Standard

Diese "Abbe-Grenze" hängt von der Wellenlänge des Lichtes (also seiner Farbe) und der numerischen Apertur NA des verwendeten Objektivs ab:

$$d_{\text{Abbe}} \geq \frac{\lambda}{2 \cdot NA}$$

Ernst Abbe im Original: „... so folgt, dass, wie auch das Mikroskop in Bezug auf die förderliche Vergrößerung noch weiter vervollkommnet werden möchte, die Unterscheidungsgrenze für zentrale Beleuchtung doch niemals über den Betrag der ganzen, und für äusserste schiefe Beleuchtung niemals über den halben Wellenlänge des blauen Lichts um ein Nennenswerthes hinausgehen wird“. Diese „äusserste schiefe Beleuchtung“ wird mit dem Einsatz eines Kondensors erreicht, der wenigstens dieselbe numerische Apertur hat, wie das Objektiv^[2]. Dabei darf man nicht vergessen: um 1850 n.Chr. war ein Mikroskop zumeist ein Gerät für Durchlichtanwendung im Bereich des sichtbaren Lichtes; die Fluoreszenzmikroskopie wurde erst 50 Jahre später entwickelt.

Freilich löste so ein Statement einen Wettstreit darüber aus, ob es nicht doch möglich wäre, besser als diese Grenze auflösen zu können. Ultraviolett-Beleuchtung und neue Immersionssysteme für höhere Aperturen wurden entwickelt, wobei damit aber nur die Parameter λ und NA verändert werden – es wird die Abbe-Grenze also verschoben, aber nicht überschritten. Als Extremfall könnte man hier das Elektronenmikroskop anführen, bei dem die de-Broglie-Wellenlänge von der

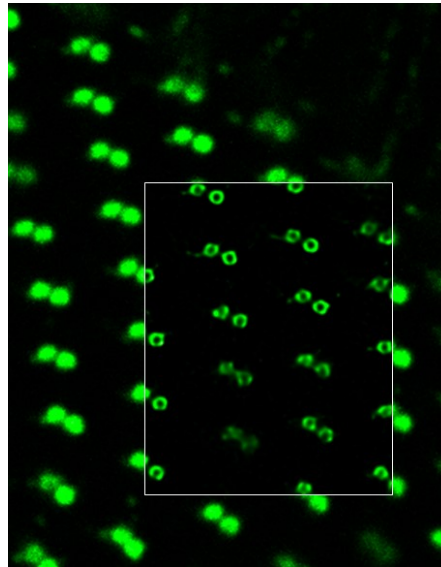


Abb 1. Optischer Schnitt durch die Oberflächenstrukturen eines Pantoffeltierchens. Die grünen Objekte sind Basalkörperchen der Zilien, mit denen sich diese Lebewesen im Wasser fortbewegen. Da die Oberfläche nicht glatt ist, sind nicht alle diese Körperchen im Schärfebereich. Die ringförmigen Strukturen haben einen Durchmesser von etwa 200 nm. Sie werden mit einem gewöhnlichen Mikroskop nicht aufgelöst, wie an den geschlossenen Kreisen des konfokalen Bildes im Hintergrund zu sehen ist.

Wendet man HyVolution auf diese Objekte an, kann man die Ringe hervorragend auflösen, sichtbar im eingesetzten Bild. Das Präparat wurde freundlicherweise von Anne Aubusson-Fleury, CNRS Gif-sur-Yvette in Frankreich zur Verfügung gestellt.

Beschleunigungsspannung abhängt. Das ermöglicht in der Praxis Auflösungen kleiner als 0,1 nm.

Um die Abbe-Grenze wirklich zu überschreiten, kann man zwei unterschiedliche Ansätze verfolgen. Ein Weg ist, optische Geräte und Methoden zu entwickeln, die inhärent eine höhere Auflösung ermöglichen, der andere Weg führt über die Anwendung mathematischer Modelle auf die gemessenen Daten zum Ziel. Dabei wird versucht, die in den

Rohbildern noch versteckte Information herauszukristallisieren. Jedes System, das in der Lage ist, besser als die Abbe-Grenze aufzulösen, wird „super-auflösend“ genannt^[3]. Dabei muss klar sein, dass Abbe damit nicht widerlegt wird: seine Überlegungen und seine Schlüsse über die Sichtbarkeit von linienförmigen Objekten in klassischen Mikroskopen sind nach wie vor gültig. Dasselbe gilt auch für die Analyse über die Trennbarkeit von punktförmigen Emittoren durch verschiedene Autoren^{[4][5][6]}, die zu einer Serie von Auflösungsgrenzen führte, die alle nahe bei der Abbe-Grenze liegen. Eine ausführliche Erläuterung findet sich in [2].

Optische Super-Auflösung

Ein optisches Gerät, das besser als die Abbe-Grenze auflösen kann, ist das konfokale Mikroskop^[7]. Üblicherweise wird die konfokale Mikroskopie als Gold-Standard für die Aufnahme optischer Schnitte betrachtet.

Das ist auch richtig, und wie es scheint, wird dieses Verfahren auch seine Rolle als unverzichtbares Arbeitspferd für Fluoreszenzmikroskopie in der modernen Forschung in Biologie und Medizin beibehalten. Daneben bietet es auch eine ganze Serie verschiedener Anwendungen in der Materialwissenschaft, in der Halbleiterforschung, in der Qualitätssicherung und in weiteren Gebieten.

Neben der Fähigkeit damit optische Schnitte zu erzeugen – hier wird der Kontrast in der Tiefe ausgenutzt –, kann ein konfokales Mikroskop auch eine höhere laterale Auflösung bieten. Ebenso, wie die Dicke des optischen Schnittes, hängt auch die laterale Auflösung hier vom Durchmesser der Lochblende (Pinhole) im Detektionspfad ab^[8]. Das konfokale Mikroskop erzeugt im Zwischenbild ein Beugungsmuster des leuchtenden Punktes im Präparat. Dieses Muster zeichnet sich durch einen hellen zentralen Kreis („Airy-Scheibchen“) aus, der von hellen und dunklen Ringen umgeben ist. Normalerweise soll die Lochblende gerade so groß wie dieses Airy-Scheibchen sein (1 Airy-Unit, AU).

Für diesen Fall, und alle größeren Durchmesser ist die laterale Auflösung mehr oder weniger konstant und entspricht der lateralen Auflösung eines gewöhnlichen Mikroskopes, eben der Abbe-Grenze. Das ist die gestrichelte Kurve in Abbildung 2. Der Lochblendendurchmesser 1 AU wird durch die graue senkrechte Linie angegeben.

Wird die Lochblende kleiner als 1 AU, dann wird die laterale Auflösung besser, bis sie bei einem Durchmesser von 0 einen beugungsbegrenzten Wert einnimmt, der etwa 30% kleiner ist als die Abbe-Grenze. Natürlich bleibt dieser Wert theoretisch, da nun gar kein Licht mehr auf den Detektor fällt.

Bei einem Durchmesser von beispielsweise 0,6 AU, im Bild gekennzeichnet durch die rote senkrechte Linie, wird diese Verbesserung schon um mehr als die Hälfte ausgenutzt, wobei der Lichtverlust im Vergleich zu 1 AU nur etwa 10% beträgt. Die Helligkeit ist im Bild durch die grüne Kurve wiedergegeben. Hier wurde der gesamte Lichtfluss durch die Lochblende aufintegriert, der aus einem punktförmigen Objekt stammt. Diese Kurve enthält also keine Beträge von Objekten oberhalb oder unterhalb der Fokusebene, deshalb strebt sie einem festen Grenzwert zu, der hier zu 1 skaliert wurde. Man erkennt aus der Kurve auch, dass die Helligkeit um 1 AU herum recht konstant ist. Das liegt daran, dass das Beugungsmuster hier einen dunklen Ring, also eine Nullstelle, aufweist und deshalb die Intensität nicht zu- oder abnehmen kann. Bei diesem Blendendurchmesser werden aber ohnehin schon fast 90% des gesamten Lichtes aufgesammelt, und eine weitere Öffnung wirkt sich nur marginal auf die Helligkeit aus. Für eine Öffnung auf beispielsweise 1,25 AU, angezeigt durch die blaue senkrechte Linie, erhöht sich die Helligkeit um weniger als 2%. Wenn das Bild größerer Blenden deutlich heller wird, liegt das daran, dass man nun unscharfe Bildbeiträge mit aufnimmt. Das ist nun aber genau das, was man durch die vergleichsweise hohe Investition in ein konfokales Mikroskop vermeiden wollte – deshalb sollte die Blende nicht über 1 AU geöffnet werden.

Wie oben angemerkt, wird in der konfokalen Mikroskopie ein Durchmesser der Lochblende von 1 AU empfohlen. Weniger effizient arbeitende Geräte mögen es erforderlich machen, die Blende etwas weiter zu öffnen, damit man überhaupt ein brauchbares Bild aufnehmen kann. Für einen guten Betrieb des Gerätes muss ein konfokales Mikroskop eine hohe Transmission aufweisen. Das wird in der Leica SP-Serie durch die Verwendung eines spektrometrischen Detektors erreicht. Statt optischer Filter kommt hier ein über den ganzen Wellen-

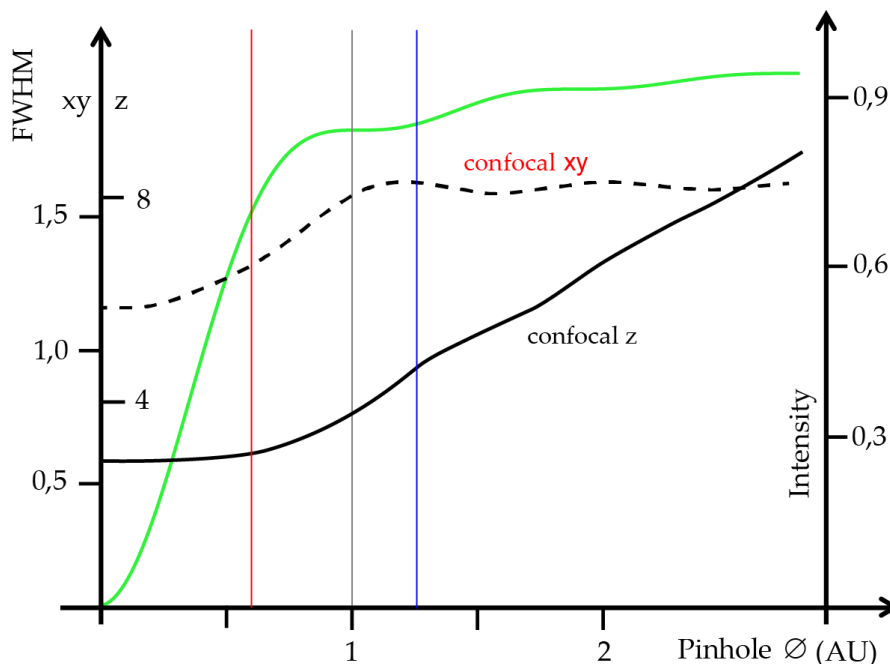


Abb. 2: Optisches Verhalten eines konfokalen Mikroskopes in Abhängigkeit vom Durchmesser der Lochblende.
 Grün: Lichtmenge aus der Fokusebene.
 Schwarz (gestrichelt): Auflösung in xy.
 Schwarz (durchgezogen): Schichtdicke.
 Die Intensität ist auf den maximalen Fluss normiert, die Halbwertsbreiten in optischen Einheiten.
 Die absoluten Werte sind für die Betrachtung hier nicht relevant. Einzelheiten im Text.
 Halbwertsbreiten nach [8].

längenbereich gleichmäßig hochtransparentes und polarisationsunabhängiges Glasprisma zum Einsatz. Ein Spektrometerspalt hat tatsächlich 100% Transmission, da er ja nur aus „Rändern“ besteht und kein Glas enthält. Für simultane Aufnahme von mehreren Kanälen dienen Spiegelschichten, deren Reflexionsgüte bei 98% oder besser liegt. Auch der Hauptstrahlteiler kann in der Leica SP-Serie durch ein akustooptisches Element ersetzt werden, den akustooptischen Strahlteiler (AOBS)^[9]. Die für die Anregung ausgesparten Bändchen sind hier sehr schmal (2-4 nm) und können sehr schnell beliebig umgeschaltet werden. Die wertvollen Photonen aus der Fluoreszenzemission gehen deshalb nicht am Strahlteiler verloren. Dazu kommt die Verwendung von modernsten Hybrid-Detektoren (HyD)^[10], das sind Sensoren, die bezüglich der Kombination aus Photonen ausbeute, Rauscharmut und Geschwindigkeit allen klassischen Photoelektronenvervielfachern überlegen sind und das Photonen-zählverfahren auch bei gewöhnlich hellen Proben möglich machen. Das sorgt für brillante Bilder – auch bei Lochblendendurchmessern unterhalb 1 AU:

Rechnerischen Superauflösung

„Sehen heißt glauben“ (Seeing is believing^[11]) scheint ein selbstverständlicher Imperativ für wissenschaftliche Experimente zu sein. Allerdings ist das Gegenteil der Fall!

Wenn wir etwas sehen, endet die Objektivität hinter der Augenlinse. Die Retina, Teil des komplexen und unberechenbaren Computers namens „Gehirn“, macht schon räumliche und zeitliche Verrechnungen des eintreffenden Lichtsignals, bevor ein Impuls in den Sehnerv abgeschickt wird. Das „Bild“, das in unserem Bewusstsein entsteht ist demnach etwas, das wir allenfalls glauben können. Wenn wir etwas wirklich wissen wollen, müssen wir Messungen anstellen. Deshalb sind alte Stiche in antiken Mikroskopiebüchern zwar sehr schön und kunstvoll, aber der dargestellte Inhalt ist durch die Wahrnehmung des Mikroskopikers – und durch die Fertigkeit des Künstlers – stark entstellt. Realistischere Bilder konnte man nach der Erfindung der Photographie erzeugen. Aber auch in der „nassen Fototechnik“ wurden Verfahren ausgeklügelt, die es erlauben, bestimmte Details besser zu sehen und andere zu verdecken. Mit elektronischen Aufnahmeröhren und der diese ersetzenden Chip-Technologie, lassen sich erstmalig aufgenommene Bilder direkt manipulieren. Das sollte man wissen, wenn man seine digitale Kamera verwendet: so gut wie kein Gerät liefert heute noch Rohdaten – die „Retina“ hat auch hier schon Einzug gehalten. Solche Bildmanipulationen bieten nämlich auch neue Lösungen. Die elektronischen Verfahren erlauben Objekte sichtbar zu machen, die vorher unsichtbar waren. Dabei

wird dennoch nicht die Auflösung verbessert, sondern der Kontrast künstlich gesteigert. Wenn Objekte sehr klein sind, erzeugen sie in einem Durchlichtmikroskop nur eine winzige Störung in einem ansonsten sehr hellen Hintergrund. Durch Erhöhen der Verstärkung und gleichzeitigem Verschieben der Nulllinie können diese Störungen sichtbar gemacht werden. Was man dann sieht ist ein Beugungsmuster, dessen Form und Größe durch die Gesetze der Beugung bestimmt sind.

Heißt das nun, dass es gänzlich aussichtslos ist, die Auflösung in bereits aufgezeichneten Bilddaten zu verbessern? Einfache Kontrast- und Helligkeitsänderungen, oder etwa Mittelwertverfahren und Schönung können das nicht leisten. Aber es gibt ausgeklügelte Operationen, die genau dieses leisten. Die Idee hinter den „Bild-Rekonstruktionsverfahren“^[12] ist klar und im Prinzip einfach. Das Licht, das vom Objekt ausgeht, erfährt durch die optischen Elemente des Mikroskopes eine komplexe „Faltung“ (engl. convolution). Diese Faltung kann man durch eine mathematische Operation beschreiben. Wenn wir also die dazugehörige inverse Operation auf die Bilddaten anwenden, können wir hoffen, dass das Ergebnis näher an der ursprünglichen Helligkeitsverteilung im Objektraum liegt. Solche Verfahren der „Deconvolution“ bieten eine Erhöhung der Auflösung sowohl lateral als auch axial um etwa ein zweifaches^[13]. Dabei wird durch solche Entfaltung nicht nur die Auflösung verbessert, sondern auch das Rauschen vermindert, das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) also erhöht. Solche Rechenoperationen brauchen freilich etwas Zeit, aber man kann heute durch den Einsatz von vielen parallel arbeitenden Hochgeschwindigkeitsprozessoren diese Zeit auf einen Wimpernschlag reduzieren. Dazu wird entsprechende Software zur mathematischen Berechnung großer Datenmengen eingesetzt, etwa CUDA (Compute Unified Device Architecture).

Das Zusammenspiel

Beliebig hohe Super-Auflösung ist nur möglich, wenn Moleküle eingesetzt werden, die nichtlineares Verhalten zeigen. Beispielsweise solche, die zwischen zwei Zuständen umschalten können – im einfachsten Fall „dunkel“ und „hell“^[14]. Solche unbegrenzt superauflösende Verfahren sind STED (Stimulated Emission Depletion) und die Lokalisierungsmikroskopie^[15].

Während STED eine Methode ist, die primär keiner rechnerischen Verfahren bedarf, sind die Lokalisierungsmethoden in hohem Maße rechnerische Verfahren. Das Ergebnis bei letzteren ist auch keine Intensitätsverteilung

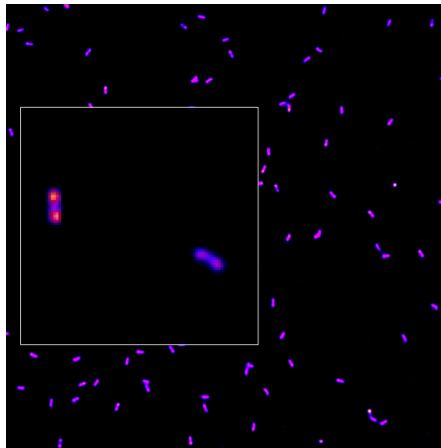


Abb. 3: Perfekt aufgelöste DNA-Origamis (Gattaquant DNA Technologies) mit Leica TCS SP8 HyVolution. Sogenannte „Nanorulers“ mit einem Abstand der Emitter von 140 nm. Im Hintergrund gewöhnliche konfokale Aufnahme, im vergrößerten Kästchen zwei solcher Origamis bei Einsatz von HyVolution.

mehr, wie man das von einem gewöhnlichen Bild erwartet, sondern eine räumliche Koordinatenkarte einzelner Emitter.

Techniken, die begrenzte Superauflösung bieten, beispielsweise strukturierte Beleuchtung oder optische Pixel-Neuordnung (image scanning), verwenden Serien von Bildern, die durch Berechnungen ein verbessertes Bild ergeben. Eine Kombination von optischen und rechnerischen Methoden ist also nicht die Ausnahme, sondern eher der Regelfall.

Leica HyVolution verbindet diese Optionen in einem hocheffizienten konfokalen Mikroskop (Leica TCS SP) und einer professionellen und bewährten Dekonvolutions-Software SVI Huygens. Auflösungsverbesserung durch reduzierte Pinhole-Durchmesser mit anschließender Entfaltung wurde für streuende Objekte^[16] und für fluoreszierende Objekte^[17] beschrieben. Die HyVolution Lösung integriert nicht nur die verbesserte Auflösung durch sub-Airy konfokale Mikroskopie und rechnerische Entfaltung, sondern bietet zudem schnelle Berechnung durch CUDA programmierte grafische CPU-Arrays und eine bequeme und schnelle Übertragung der Daten in die verschiedenen Module. Das Leica TCS SP8 liefert durch die hohen Transmissionen und hochempfindlichen Sensoren dabei sehr rauscharme Bilder, so dass die Entfaltung mit großem Gewinn und sogar für simultan aufgenommene Mehrkanal-Bilder einfach und schnell möglich ist. Abbildung 1 zeigt hervorragend aufgelöste Basalkörperchen der Zilien von Pantoffeltierchen, die etwa 200 nm Durchmesser haben. In Abbildung 3 ist eine gute Trennung von Emittlern in 140 nm auf einem DNA-Origami nachgewiesen.

Literatur

- [1] Abbe EK: "Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung". *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 9 (1) 413–468, 1873
- [2] Borlinghaus RT: „*Konfokale Mikroskopie in Weiß – optische Schnitte in allen Farben*“ Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Softcover ISBN 978-3-662-49358-8, DOI 10.1007/978-3-662-49359-5 (2016)
- [3] Lauterbach MA: "Finding, defining and breaking the diffraction barrier in microscopy – a historical perspective". *Nanoscopy* 2012, 1:8
- [4] Rayleigh (Strutt JW): "On the theory of optical images, with special reference to the microscope". *Philos Mag Ser 5* 42(255): 167–195, 1879
- [5] Sparrow CM: "On spectroscopic resolving power." *Astrophysical Journal* 44:76, 1916.
- [6] Houston, WV: "A compound interferometer for fine structure work." *Physical Review*, 29 (3). pp. 478-484, 1927
- [7] Minsky M: "Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope" *Scanning* 10, pp128-138, 1988
- [8] Wilson T: "Optical Aspects of Confocal Microscopy", Chapter 3 in: *Confocal Microscopy*, Ed: Wilson T, Academic Press, London, 1990
- [9] Borlinghaus RT: "The white confocal", *The European Physical Journal Plus*. 127:131 (2012)
- [10] Borlinghaus RT, Birk H and Schreiber F: "Detectors for Sensitive Detection: HyD" in *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology* (A. Méndez-Vilas, Ed.) Formatex (2012)
- [11] *Paroemiologia Anglo-Latina*, Clarke J. (editor), London, 1639
- [12] *Scientific Volume Imaging: Image Restoration vs Image Enhancement* retrieved Jan. 19th 2016
- [13] *Scientific Volume Imaging: Expectet Resolution Improvement*: retrieved Nov. 16th, 2015.
- [14] Hell SW, Dyba M and Jakobs S: "Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy." *Curr Opin Neurobiol* 2004, 14:599-609
- [15] Borlinghaus RT: „*Unbegrenzte Lichtmikroskopie – über Auflösung und Super-Hochauflösung und die Frage, ob man Moleküle sehen kann*“. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, e-book ISBN 978-3-658-09874-2, DOI 10.1007/978-3-658-09874-2 (2015)
- [16] Schrader M, Hell SW & van der Voort HTM.: "Potential of confocal microscopes to resolve in the 50-100 nm range." *Appl. Phys. Lett.* 69 (24), pp. 3644-3646. (1996)
- [17] Diaspro A, Annunziata S & Robello M: "Single-Pinhole Confocal Imaging of Sub-Resolution Sparse Objects Using Experimental Point Spread Function and Image Restoration" *Micr. Res.and Tech*