

Was macht das Pinhole im konfokalen Mikroskop?

Rolf T. Borlinghaus

Leica Microsystems

Wer ein konfokales Mikroskop benutzt und über die Eigenschaften und Parameter eines solchen Gerätes diskutiert, wird notwendigerweise über das Pinhole reden – und wie dessen Größe sich auf das Ergebnis auswirkt. Diese kurze einführende Schrift soll die Bedeutung des Pinholes erläutern und ist für Leser gedacht, die nicht allzu viel Zeit mit der Theorie und den Details der konfokalen Mikroskopie verbringen aber dennoch eine Vorstellung über die Wirkungsweise und die Grenzen solcher Instrumente bekommen möchten.

Was ist ein Pinhole?

Optische Linsen sind im Wesentlichen durch zwei Parameter gekennzeichnet: die Krümmung der Linsenoberflächen und den Durchmesser. Der Krümmungsradius entscheidet, in welche Richtung die Strahlen gebrochen werden und der Durchmesser bestimmt, wieviel Strahlen zum Ergebnisbild beitragen. Der Durchmesser kann im einfachsten Fall durch den Linsenrand gegeben sein, in vielen Fällen wird der Strahldurchmesser aber durch eine separate Blende eingestellt. Oft setzt man Blenden ein, die aus einer größeren Zahl von Lamellen zusammengesetzt sind und deren Durchlass sich durch mechanische Verstellung dieser Lamellen stufenlos einstellen lässt. So eine Vorrichtung heißt Irisblende, nach der im Durchmesser veränderlichen bunten Regenbogenhaut im Auge, die wiederum nach der griechischen Göttin des Regenbogens Iris benannt ist. Sehr kleine Blenden lassen sich mit dieser Lamellentechnik aber nur sehr schwer oder gar nicht fertigen. Die einfachste Methode, mit der sich sehr kleine Blenden herstellen lassen, ist recht trivial: man nehme ein Stück Karton oder Aluminiumfolie und steche mit einer dünnen Nadel ein kleines Loch hinein. So erhält man ein Pinhole (engl. Nadel-Loch). Mit solch einem Pinhole kann man sich eine *Camera obscura* basteln – ganz ohne Linsen. [1]

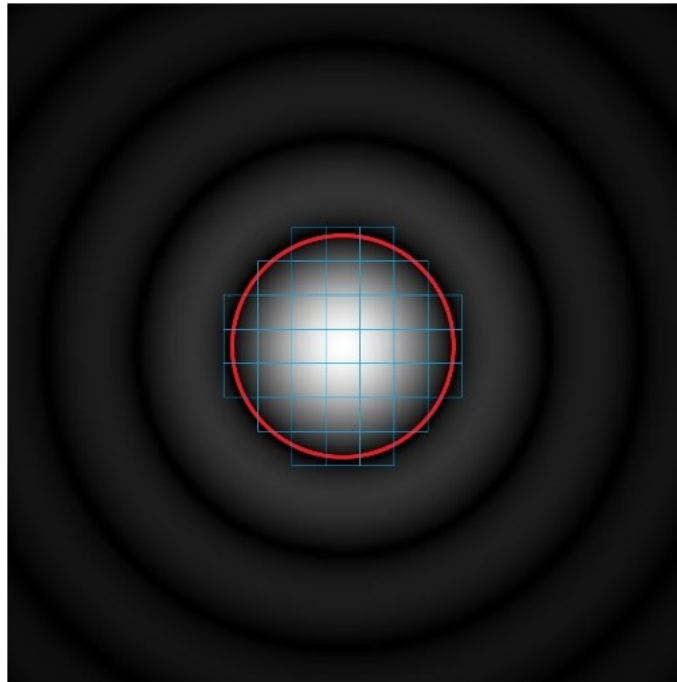


Abb. 1 Airy-Muster in der Fokusebene

Wie wirkt ein Pinhole in einem konfokalen Mikroskop?

Konfokale Mikroskope sollen optisch Scheibchen aus dem Präparat separieren und als Bild aufzeichnen. Im günstigsten Fall sind diese Scheibchen etwa gerade so dick wie die Schärfentiefe im Mikroskop. Um dies zu erreichen, wird das Präparat mit einem kleinen Lichtfleck abgerastert – vergleichbar mit dem Rasterprinzip einer altmodischen Fernsehöhre. Der kleinste Fleck, den man durch gewöhnliche optische Linsen erzeugen kann, hat einen „beugungsbegrenzten“ Durchmesser, der Durchmesser wird nur von der Farbe des Lichtes und vom Öffnungswinkel der Linse bestimmt. Es ist das Bild eines unendlich kleinen Lichtpunktes. Die Intensitätsverteilung in der Bildebene nennt man „Punktverwaschungsfunktion“ (engl. point spread function, psf). Tatsächlich ist die Punktverwaschungsfunktion ein dreidimensionales Gebilde; es definiert die Auflösung in allen drei Raumrichtungen. Wie diese Intensitätsverteilung (Airy-Muster) in der Fokusebene aussieht ist in

Abbildung 1 zu sehen. In der Mitte findet sich ein heller Fleck (das Airy-Scheibchen) und drum herum konzentrische Ringe. Da gewöhnliche Lichtquellen keine unendlich kleinen Punkte sind, sondern endliche Ausdehnung haben, wird das Licht der Lichtquelle auf eine sehr kleine Blende fokussiert, eben auf ein Pinhole, das hier als näherungsweise punktartige Quelle fungiert. Über dieses Pinhole auf der Beleuchtungsseite wird in der Regel nicht gesprochen: Laserlicht lässt sich direkt beugungsbegrenzt fokussieren – ohne Pinhole.

Um ein optisches Scheibchen zu erhalten, muss der Sensor in gleicher Weise das Präparat abrastern – synchron zur Beleuchtung. Und auch die Detektionsfunktion soll einem beugungsbegrenzten Fleck entsprechen,

die beim Rastervorgang stets mit dem Anregungsfleck überlagert ist. So eine beugungsbegrenzte Wahrnehmungsfunktion erhält man, wenn man das vom Präparat ausgesandte Licht durch eine sehr kleine Blende fädelt: das Detektions-Pinhole. Dieses Pinhole ist normalerweise gemeint, wenn man über das Pinhole und seinen Durchmesser in einem konfokalen Mikroskop spricht.

Der Begriff „konfokal“ bezieht sich auf das Arrangement der Beleuchtungs- und Wahrnehmungsflecken. Beide sind auf den gleichen Punkt fokussiert [2]. Die Brennpunkte sind überlagert. Das Bild wird dann dadurch erzeugt, dass das ganze Sehfeld punktwise aufgenommen wird. Der Rastervorgang wird üblicherweise durch eine Anordnung mit mehreren schwenkbaren Spiegeln (engl. scanning mirrors) verwirklicht. Solche „Scanner“ kennt man auch von der Supermarktkasse oder aus der Disco.

In Abbildung 2 [3] sieht man, wie das Detektions-Pinhole alle Emission abschneidet, die nicht aus der Fokusebene kommt. Es wird daher auch als „Raumfilter“ bezeichnet, der die scharf abgebildeten Anteile herausfiltert und das extrafokale Signal unterdrückt. Da so ein Gerät optische Schnitte aus dem Präparat herausschneidet, nennt man es auch „Optisches Messer“.

Wozu ein variabler Durchmesser des Pinholes?

Ebenso wie auf der Beleuchtungsseite ist die Intensitätsverteilung in der Zwischenbildenebene ein Airy-Muster (Abbildung 1). Das Pinhole kann also – je nachdem wie groß es ist – unterschiedlich große Anteile aus diesem Muster an den Detektor übertragen. Für gewöhnlich wird für die Aufnahme von konfokalen Bildern empfohlen, die Blende gerade so groß zu machen, dass gerade das Airy-Scheibchen übertragen wird (Abbildung 3, links). Dieser Durchmesser wird als Airy-Einheit (engl.: Airy-Unit, AU) bezeichnet. Der Durchmesser dieses Airy-Scheibchens im Zwischenbild hängt ab von der Farbe des Lichtes (seiner Wellenlänge), vom Öffnungswinkel des Objektivs (der numerischen Apertur NA), der Vergrößerung des Objektivs und von internen Vergrößerungsfaktoren des Mikroskopes. Die NA und die Objektivvergrößerung sind auf dem Objektivgehäuse eingraviert und ändern sich natürlich, wenn man das Objektiv wechselt. Folglich ist auch der vorgeschriebene Pinhole-Durchmesser von 1 AU unterschiedlich, wenn die Objektive verschiedene Vergrößerungen und verschiedene Aperturen haben. Ebenso sollte sich der Durchmesser ändern, wenn man blaue, grüne oder rote Emission aufzeichnet.

Hinzu kommt, dass ein variables Pinhole natürlich die Freiheit des Benutzers sicherstellt, die Schärfe des optischen Schnittes zu verbessern, indem er den Durchmesser kleiner macht. Oder eine dickere Schicht aufzuzeichnen, indem er den Durchmesser erweitert.

Was geschieht, wenn das Pinhole größer wird?

Wie oben angedeutet, sollte ein Pinhole für gewöhnliche konfokale Aufnahmen gerade das Airy-Scheibchen übertragen. Das ist ein guter praktischer Kompromiss, kein Naturgesetz. Wird der Durchmesser vergrößert, dann werden nach und nach mehr Beiträge von außerhalb der Fokusebene den Sensor erreichen und das scharfe Bild nach und nach „vernebeln“ [4]. Die Helligkeit des Bildes nimmt also zu und man könnte den Eindruck gewinnen, dass dadurch das Signal-Rausch-

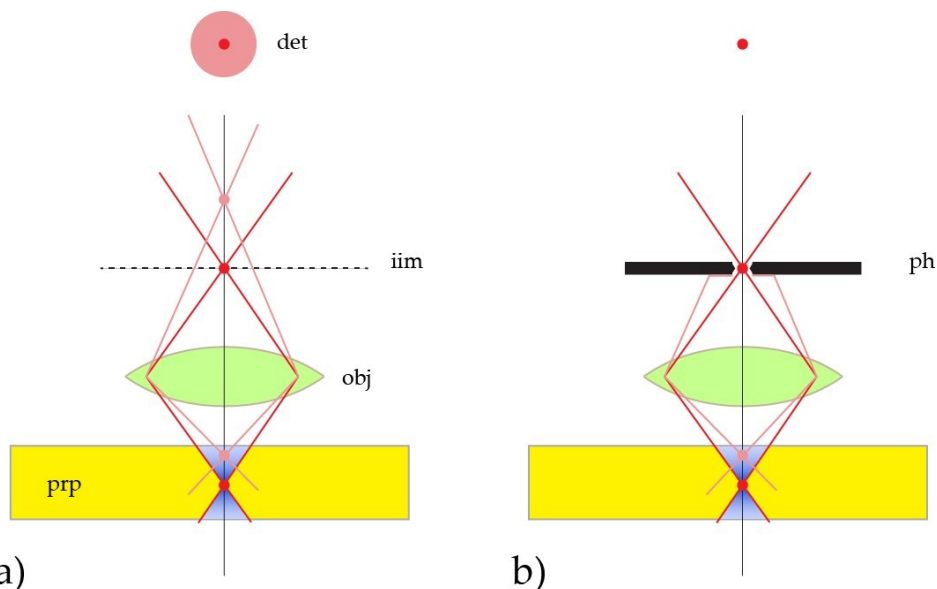


Abb 2: Das optische Messer

a) ein zusammengesetztes Mikroskop erzeugt ein Zwischenbild (iim) mittels eines Objektivs (obj), das Signale enthält, die sowohl aus der Fokusebene (rot) und von außerhalb dieser Ebene (rosa), vom Präparat (prp) ausgesendet wurden. Wenn ein einzelner Punkt betrachtet wird, dann wird der Detektor (det) sowohl ein punktförmiges Objekt aus der Fokusebene, als auch ausgedehnte unscharfe Scheibchen aus anderen Regionen wahrnehmen.

b) wird in die Zwischenbildenebene eine Pinhole-Blende (ph) eingebracht, dann werden fast alle Signale von Ebenen außerhalb der Fokusebene abgeschnitten und nur Emissionen aus der scharfen Ebene werden den Detektor erreichen können: das Raumfilter erzeugt einen optischen Schnitt.

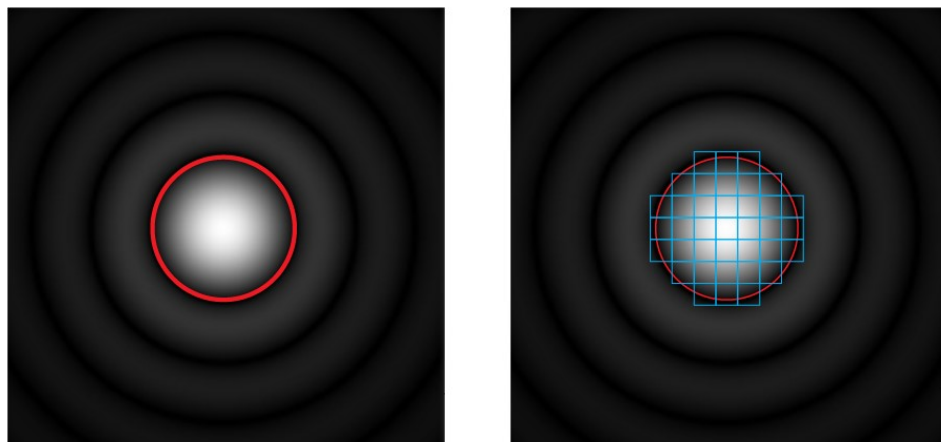


Abb 3: Pinholedurchmesser und Beugungsmuster

Links: der rote Kreis entspricht einem runden Pinhole, das auf 1 AU eingestellt ist. Dieses Pinhole schneidet die innere Scheibe des Beugungsmusters aus und erzeugt einen optischen Schnitt der Größe dz.

Rechts: Beim Bild-Rescanning Verfahren (s.u.) wird eine Serie von Unterteilungen des Beugungsmusters (blaue Kästchen) separat aufgezeichnet. Anschließend wird diese Information durch Computer-Algorithmen so in ein neues Bild verrechnet, dass die laterale Auflösung im Vergleich zur gewöhnlichen Mikroskopie verbessert ist. Die Dicke des optischen Schnittes ist dabei aber immer so groß wie sie einem Pinholedurchmesser entspricht, der die gesamte Fläche aller Unterteilungen umfasst und entspricht demnach einem Pinhole der Größe des rot eingezeichneten Ringes.

Verhältnis verbessert würde. Tatsächlich kommt die Zunahme der Helligkeit nur durch die Wahrnehmung der eigentlich unerwünschten unscharfen Anteile. Wird das Pinhole unendlich groß (= aus dem Strahlengang entfernt), dann verhält sich das Mikroskop wie ein gewöhnliches nicht-konfokales Weißfeld-Mikroskop (vgl. Abbildung 4). Deshalb ist es

grundsätzlich nicht empfehlenswert, das Pinhole größer als 1 AU einzustellen, nur um das Schrotrauschen, d.h. das statistische Rauschen, das jedem Lichtstrahl eigen ist, im Bild etwas zu unterdrücken. Das Schrotrauschen ist eine Folge der Teilchen-Natur des Lichtes. Je heller das Licht, desto geringer das statistische Schrotrauschen.

Die laterale Auflösung wird für größere Pinholedurchmesser nicht beeinflusst und bleibt stets ungefähr bei einem Wert, der auch in der normalen Weitfeld-Mikroskopie erreicht wird und etwa der Abbe'schen Auflösungsgrenze $d = \lambda/2NA$ entspricht (Abbildung 5).

... und wenn es kleiner wird?

Die dünnsten optischen Schnitte erhält man an der Beugungsgrenze in axialer Richtung, wenn das Pinhole den Durchmesser 0 annimmt. Das ist freilich nicht praktisch, weil dann gar kein Signal mehr das Pinhole passieren kann. Tatsächlich ist die Schichtdicke bei Pinhole 0 etwa 25% besser [4] als bei 1 AU.

Im Gegensatz zu Pinholedurchmessern über 1 AU, wird bei kleineren Durchmessern auch die laterale Auflösung günstig beeinflusst. Bei Pinhole = 0 kann man eine Verbesserung [4] von etwa 30% erwarten. Diese Verbesserung lässt sich zumindest teilweise ausschöpfen, indem das Pinhole etwas unter 1 AU eingestellt wird. Beispielsweise können wir schon fast 60% des möglichen Auflösungsgewinnes ernten, wenn wir das Pinhole auf 0,6 AU reduzieren. Um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis auch bei kleineren Durchmessern zu gewährleisten, verwenden wir am besten ein Gerät mit sehr hoher Effizienz für die emittierte Fluoreszenz und fast rauschfreie Sensoren, wie es das TCS SP8 von Leica Microsystems mit Hybrid-Detektoren anbietet.

Wie vergleicht sich das zu den kleinen psf-Unterteilungen beim Bild-Rescanning Verfahren?

Eine Alternative zur Verkleinerung des Pinholes um die laterale Auflösung zu verbessern, ist eine „Bild-Rescanning“ genannte Methode [5]. Hier wird sinngemäß das Beugungsmuster selbst nochmals abgerastert und die Signale werden auf die zugehörigen Bildelemente verteilt (Abbildung 3, rechts). Durch Berechnung eines neuen synthetischen Bildes lässt sich die laterale Auflösung, verglichen zur Weitfeld-Mikroskopie, etwa um das 1,4-fache verbessern, was etwa der Auflösung beim geschlossenen Pinhole in der konfokalen Mikroskopie entspricht. Hier ist die laterale Auflösung ungefähr unabhängig von der Größe der Fläche, die im Beugungsmuster nochmals abgerastert wird. Man kann also etwas hellere Bilder erwarten. Dabei sind in 1 AU aber bereits über 80% der Helligkeit enthalten.

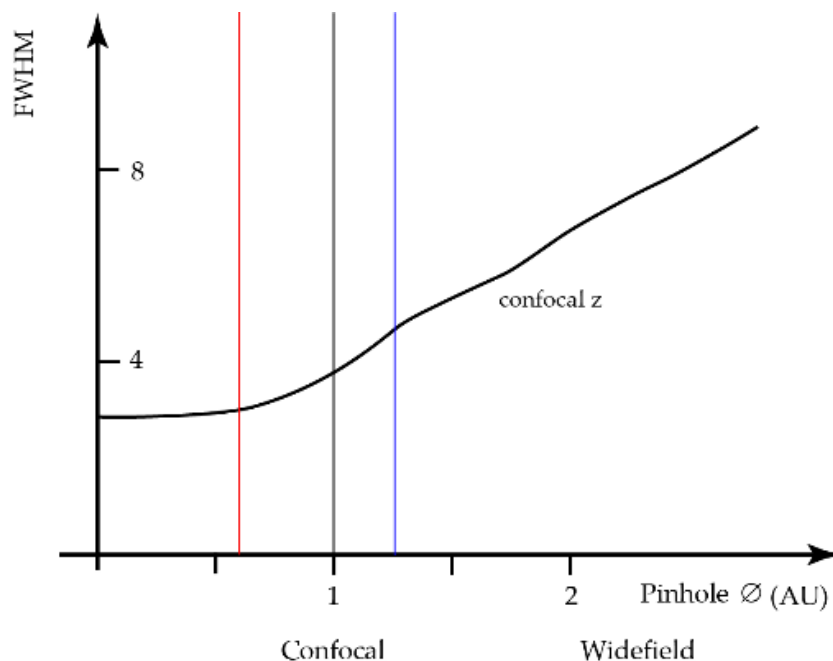


Abb 4: Dicke des optischen Schnittes als Funktion des Pinholedurchmessers
Eine praktisch für viele Fälle gute Einstellung ist ein Durchmesser von 1 AU (graue Vertikale). Wenn der Durchmesser größer wird, wird der Detektor ein Signal wahrnehmen, das nicht mehr aus der Fokusebene stammt. Die Leistung des optischen Schneidens verschlechtert sich, obwohl die Helligkeit zunimmt. Für Durchmesser unter 1 AU wird der optische Schnitt dünner, aber er wird eine endliche, beugungsbegrenzte Schwelle bei einem Durchmesser von 0 nicht unterschreiten. Da ein optischer Schnitt nicht so abrupt endet wie beispielsweise eine Scheibe Brot, gibt man die Dicke in Halbwertsbreiten an (engl: full width half maximum, fwhm).

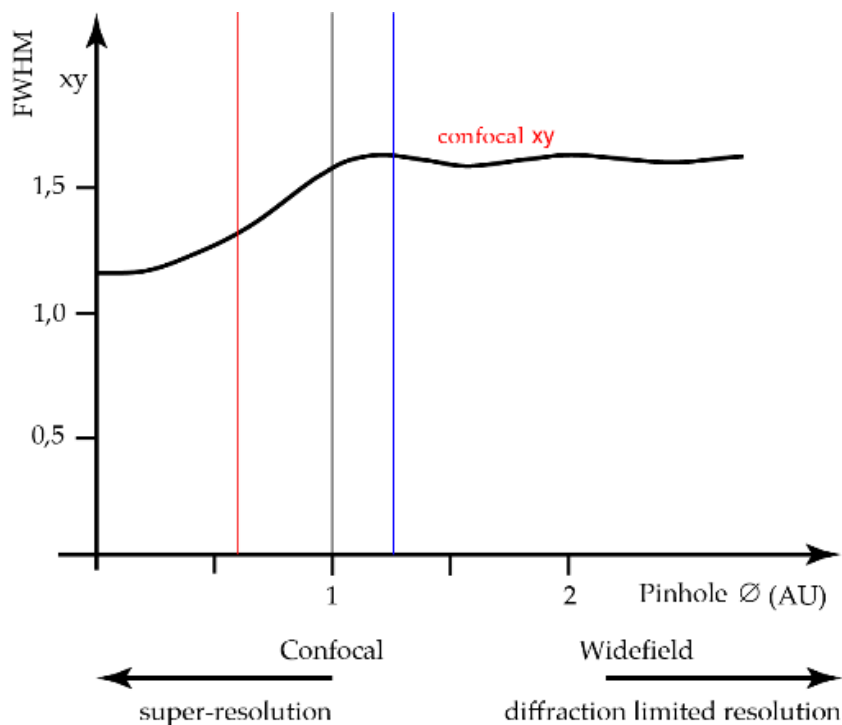


Abb 5: Laterale Auflösung als Funktion des Pinholedurchmessers.
Für Durchmesser ab 1 AU und darüber ist die laterale Auflösung mehr oder weniger konstant und entspricht der gewöhnlichen Weitfeld-Mikroskopie (beugungsbegrenzte Auflösung). Für Pinholes kleiner als 1 AU wird die laterale Auflösung verbessert. Maximal ist diese Verbesserung bei Pinhole 0 und beträgt dort etwa 30%. Schon bei Durchmessern von 0,6 AU werden etwa 60% der möglichen Verbesserung ausgeschöpft (rote Vertikale).

Die Leistung bezüglich des optischen Schneidens wird allerdings mit zunehmender Fläche schlechter, ebenso wie bei einer vergleichbaren Öffnung des Pinholes (siehe blaue Vertikalen in Abbildung 4 und 5). Mit einer größeren Fläche aus dem Beugungsmuster würde aber der eigentliche Vorteil der Verfahren wieder zunichte gemacht, nämlich dünne optische Schnitte zu erzeugen. Die doch erhebliche Investition für ein solches Rastermikroskop würde man damit in Frage stellen.

- [1] *Pinhole Camera* (aufgerufen: 21.02.2017)
- [2] *C.J.R. Sheppard, A. Choudhury: Image Formation in the Scanning Microscope. Optica Acta: International Journal of Optics. 24, 1977, S. 1051–1073,*
- [3] *Konfokale Mikroskopie in Weiß: Optische Schnitte in allen Farben*
R.T. Borlinghaus – Springer Spektrum 2016
- [4] *Wilson T: Resolution and optical sectioning in the confocal microscope. Journal of Microscopy, Vol. 244, Pt 2 2011, pp. 113–121*
- [5] *de Luca GMR et al.: Re-scan confocal microscopy scanning twice for better resolution. Optics Express 4: 2644–56 (2013).*