

Untersuchungen zur Punktbildverwaschungsfunktion in der Bildinversionsmikroskopie



D. Weigel*, A. Kiessling, R. Kowarschik
Institut für Angewandte Optik, Friedrich-Schiller-Universität Jena

* Daniel.Weigel@uni-jena.de

institute
iao
of applied optics

Bei der Bildinversionsmikroskopie handelt es sich um ein Verfahren, bei dem das laterale Auflösungsvermögen optischer Rastermikroskope gesteigert werden kann [1,2,3]. Das Bild der Probe wird dazu durch ein bildinvertierendes Interferometer auf die Detektoren an den beiden Ausgängen des Interferometers abgebildet. Dabei wird das Bild der Probe mit ihrer räumlich invertierten Kopie überlagert. Emittiert die Probe räumlich inkohärentes Licht, oder wird sie räumlich inkohärent beleuchtet, können nur in einem kleinen Bereich um die optische Achse Interferenzstrukturen beobachtet werden.

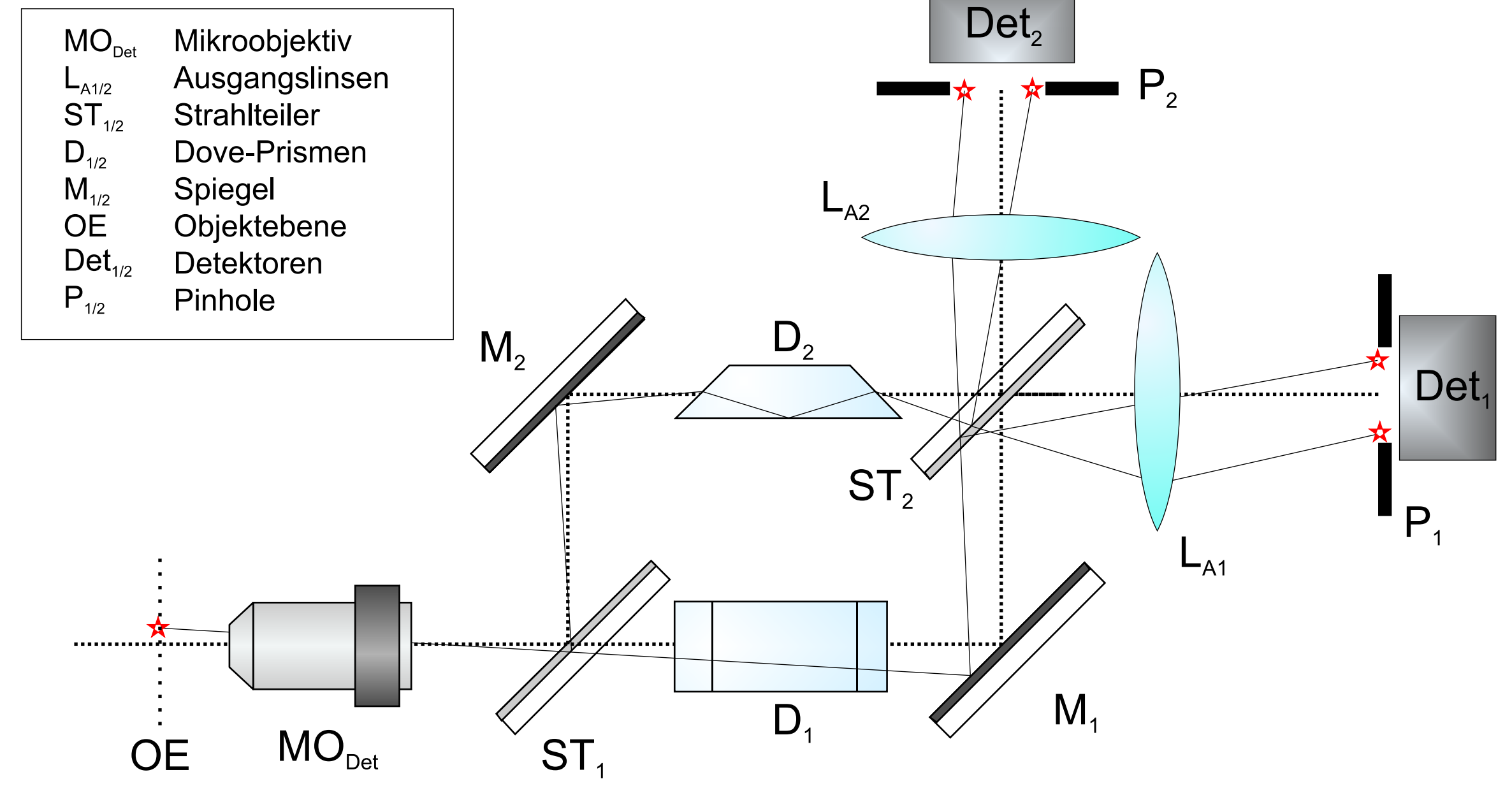
Durch Subtraktion des Bildes am destruktiven Ausgang von dem des konstruktiven, wird der Gleichlichtanteil unterdrückt. Das verbleibende Interferenzmuster engt den Bereich ein, aus welchem Licht von der Probe detektiert werden kann. Die interferometrische Punktbildverwaschungsfunktion (IPSF) ergibt sich dann aus der aufsummierten Intensität des Interferenzmusters.

$$(1) \quad IPSF(x, y) = \iint P(\vec{r}) APSF(\vec{r} - \vec{r}') \cdot APSF(\vec{r} + \vec{r}') dx' dy'$$

Die Größe des Pinholes hat einen entscheidenden Einfluss auf die Gestalt der IPSF und damit auch den möglichen Anwendungsbereich.

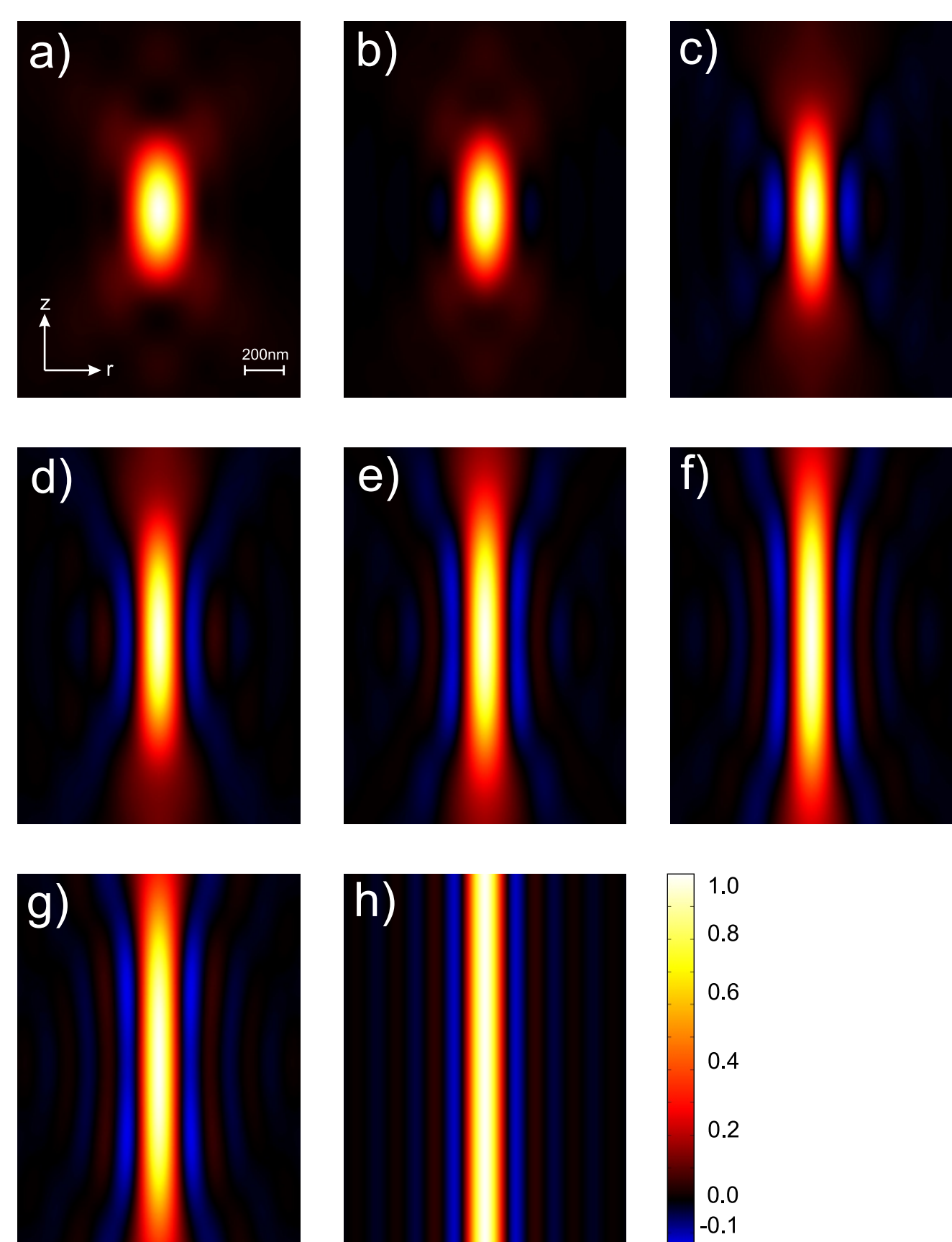
Mögliche Umsetzung eines bildinvertierenden Interferometers

Abb. 1



Die Probe aus der Objektebene wird durch das bildinvertierende Interferometer auf die Detektoren an den beiden Ausgängen abgebildet. Dort überlagert sich das Bild der Probe mit dessen räumlich invertierter Kopie. Die Bildinversion wird in diesem Beispiel über zwei Dove-Prismen realisiert. Umsetzungen mit Linsen [1], Hohlspiegeln [2] oder Planspiegeln sind ebenfalls möglich. Die Pinholes vor den Detektoren begrenzen den Bereich um die Inversionsachse, aus dem das Licht aufintegriert werden kann.

Abb. 2



Veränderung der interferometrischen PSF mit wachsenden Pinholedurchmesser (aufsteigend in 0.5 AE). Während die laterale Ausdehnung der IPSF ab einem Durchmesser von 1.5 AE kaum mehr abnimmt, verbreitert sie sich axial zunehmend. Im Grenzfall eines offenen Pinholes ist sie axial unendlich ausgedehnt.

Um den Einfluss des Pinholes auf die IPSF zu untersuchen wurden Simulationen mit Matlab durchgeführt. Die Grundlage dieser Simulationen war eine Vektortheorie des Lichts für Abbildungen mit hoher numerischer Apertur (NA) [4].

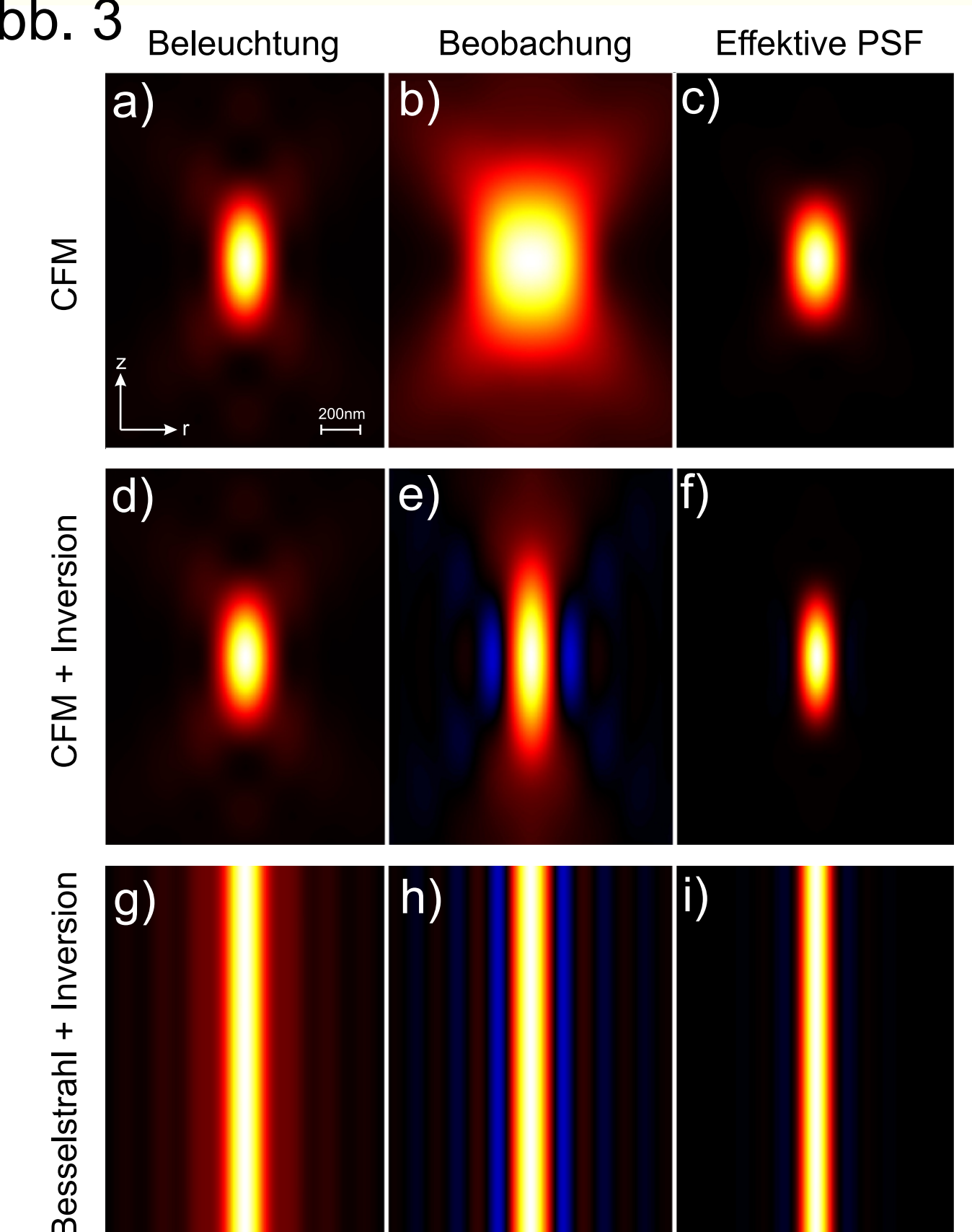
Als Parameter wurden eine Beobachtungswellenlänge von 525 nm sowie eine NA von 1.20 verwendet. Die Ergebnisse dieser Simulationen sind in Abbildung 2 dargestellt. Beginnend bei einem unendlich kleinem Pinhole wird der Durchmesser von 2.a-g um jeweils 0.5 Airy-Einheiten vergrößert. Abbildung 2.h zeigt die IPSF für ein unendlich großes Pinhole.

Während sich die axiale Ausdehnung zunehmend vergrößert, verringert sich die laterale Größe der IPSF ab einem Pinhole-durchmesser von 1.5 AE kaum noch.

Dadurch eignet sich die Bildinversionsmikroskopie bei Pinholedurchmessern von ca. 1-2 AE besonders für die Erweiterung konfokaler Fluoreszenzmikroskope (CFM).

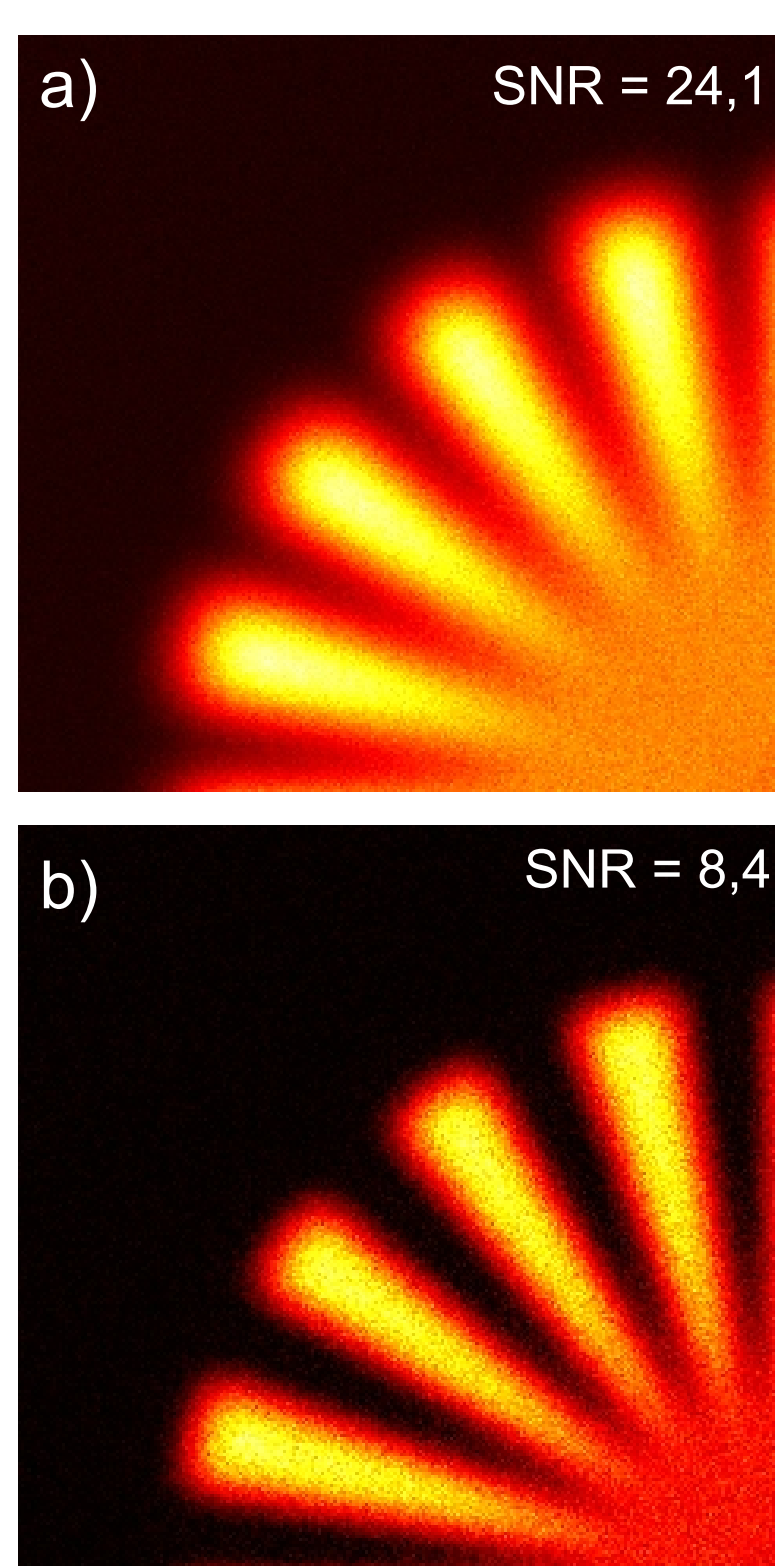
Durch den Einsatz großer Pinholes könnte das Verfahren in Kombination mit einem Besselbeleuchtungsstrahl für die Extended-Focus Mikroskopie interessant sein.

Abb. 3



Die effektive PSF ergibt sich aus dem Produkt der Beleuchtungsfunktion mit der Beobachtungsfunktion. Die Abbildungen (a-c) zeigen den Fall des CFMs. Im Vergleich dazu das CFM + Bildinversionsinterferometer (d-f). Während die axiale Ausdehnung der PSF konstant bleibt, reduziert sich die laterale Halbwertsbreite um ca. 34%. Die Abbildungen (g-i) zeigen die Möglichkeit der Extended-Focus Mikroskopie mit Hilfe eines Besselstrahls und dem bildinvertierenden Interferometer ohne Pinhole.

Abb. 4

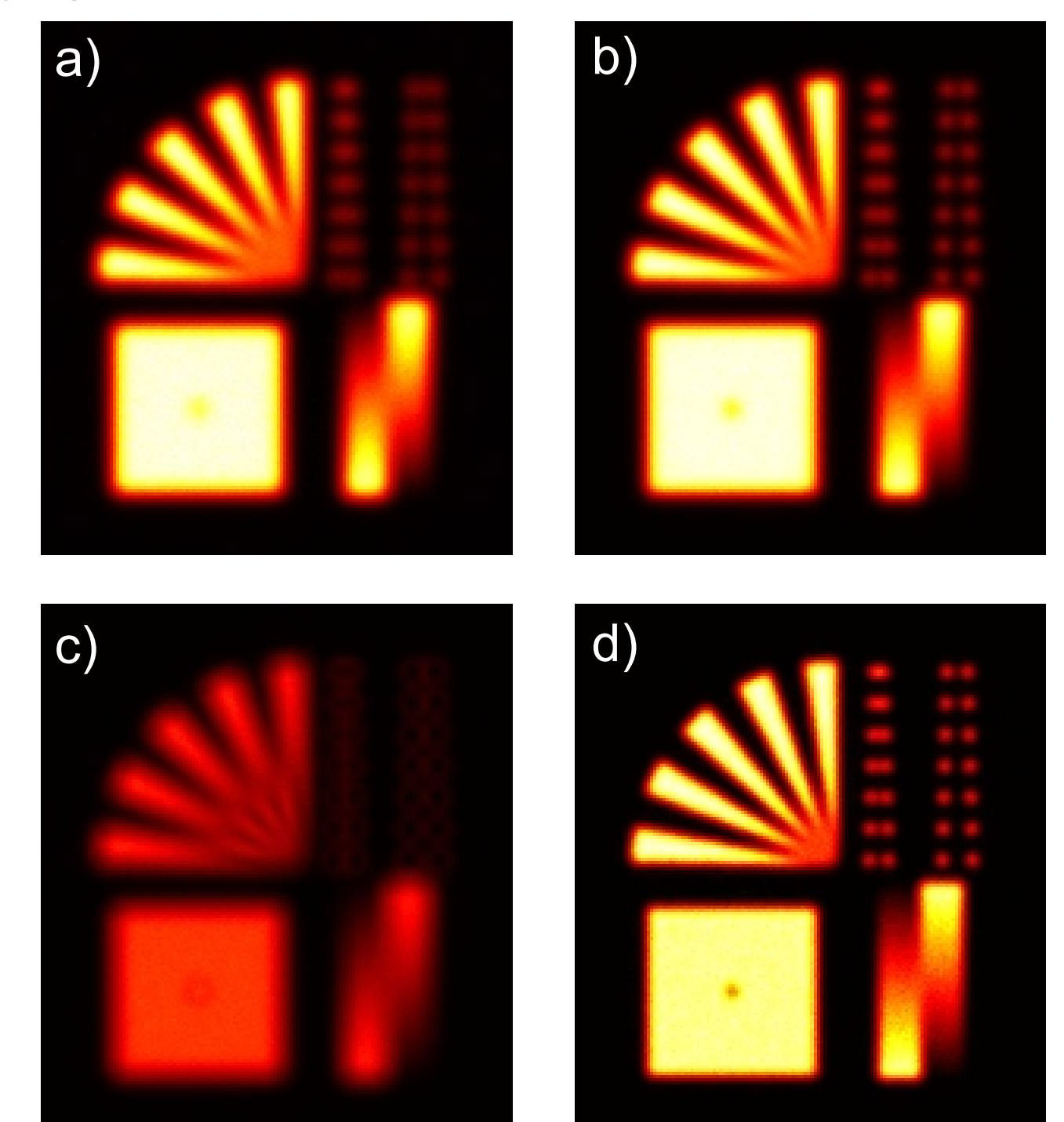


Ausschnitt eines Siemenssterns dargestellt für ein konfokales Fluoreszenzmikroskop (a) und für den interferometrisch verbesserten Fall (b). Für die Simulation des Rauschverhaltens wurden maximal 1000 Photonen pro Detektor angenommen und ein Dunkelstromrauschen von 50 Elektronen. Zwar sinkt das SNR von ca. 24,1 auf 8,4, die Auflösungssteigerung ist dennoch offensichtlich.

Um einen Eindruck vom praktischen Nutzen des Verfahrens zu vermitteln wurde die Abbildung eines Testcharts simuliert. Verglichen werden ein konfokales Fluoreszenzmikroskop mit einem Pinholedurchmesser von 1AE, mit dem selben System, welches durch das bildinvertierende Interferometer erweitert wurde. Als Anregungswellenlänge wurden 488 nm angenommen und als Beobachtungswellenlänge 525 nm. Desweiteren wurde von einer maximalen Anzahl von 10.000 Photonen pro Detektor (Photomultiplier) und einem Dunkelstromrauschen von 50 Elektronen ausgegangen.

Die Abbildungen 4 und 5 veranschaulichen, dass der Einsatz des Bildinversionsverfahrens unter den selben Bedingungen zwar zu einem stärkeren Rauschverhalten führt, die Bildqualität aber dennoch deutlich gesteigert werden kann. Neben der Zweipunktauflösung und dem Kontrast, kann auch das Überstrahlen von leuchtschwachen Bildelementen durch dicht daneben liegende helle Objekte reduziert werden (vgl. Abbildung 5, Aussparung im Quadrat).

Abb. 5



Simulation eines Testcharts für das konfokale Fluoreszenzmikroskop (a), den konstruktiven (b) und destruktiven (c) Arm eines CFMs + bildinvertierendes Interferometer und des Differenzbildes (d). Es fällt auf, dass schon am konstruktiven Arm eine geringe Kontrast- und Auflösungssteigerung beobachtet werden kann. Im Differenzbild kann der Auflösungsgewinn vor allem an den Zweipunktobjekten und dem Siemensstern erkannt werden. Die Aussparung in der quadratischen Fläche lässt erkennen, dass im interferometrischen Fall Überstrahlungseffekte deutlich unterdrückt werden können.

- [1] N. Sandeau, H. Giovannini, "Increasing the lateral resolution of 4Pi fluorescence microscopes," J. Opt. Soc. Am. A, 23, 1089–1095 (2006)
- [2] K. Wicker, R. Heintzmann, "Interferometric resolution improvement for confocal microscopes", Optics 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", Optics Express, 19, 26451–26462 (2011)
- [4] B. Richards, E. Wolf, "Electromagnetic diffraction in optical systems – II. Structure of the image field in an aplanatic system", Proc. Roy. Soc. 253 A, 358–379 (1959)