

- 6. Moderne Mikroskopie-Methoden**
 - 6.1 Polarisierung und Polarisationsmikroskopie**
 - 6.2 Konfokale Methoden**
 - 6.3 Auflösungssteigerung (ohne Fluoreszenz)**

Kontrastierungs-Technik	Objekt / Anwendung
Hellfeld	Amplitudenobjekte im Auflicht oder Durchlicht
Dunkelfeld	Kontrastschwache Licht-streuende Objekte
Phasenkontrast	Phasenobjekte, Licht-brechende Objekte
DIC	Phasenobjekte
Polarisationsmikroskopie	Doppelbrechende Objekte
Konfokale Mikroskopie	3D-Objekte, streuende Objekte
Fluoreszenz Mikroskopie	Fluoreszierende Objekte

Auflösungssteigerung	Technik
PSF-Design (4Pi, I⁵M)	Auflösungssteigerung durch Bildverarbeitung
Strukturierte Beleuchtung (SIM)	Beleuchtungsinformation wird mitbenutzt
Nahfeld-Mikroskopie (SNOM)	Nutzung des evaneszenten Feldes
Fluoreszenzverfahren (STED, PALM)	Objekteigenschaften (Fluoreszenz) werden als Teil der Bildgebung mitbenutzt

6. Moderne Mikroskopiemethoden

6.1 Polarisierung und Polarisationsmikroskopie

6.2 Konfokale Methoden

6.3 Auflösungssteigerung (ohne Fluoreszenz)

Wiederholung: Transversal Elektromagnetische Wellen

Erinnerung: Licht ist transversal elektromagnetische Welle

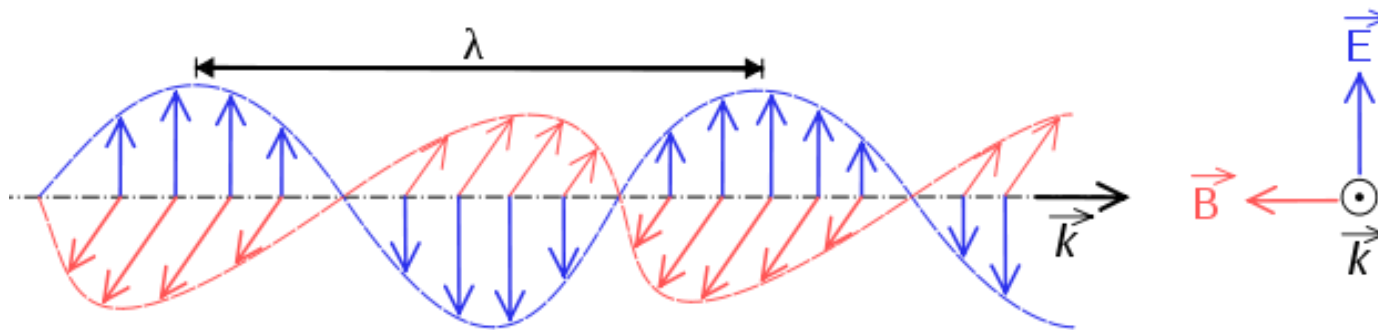
$$\vec{E}(\vec{r}) = \vec{E}_0 \cdot e^{-i\vec{k}\vec{r}}$$

Transversal heißt:

$$\vec{k} \cdot \vec{E} = 0$$

→ **E** und **B** stehen senkrecht zur Ausbreitungsrichtung **k**

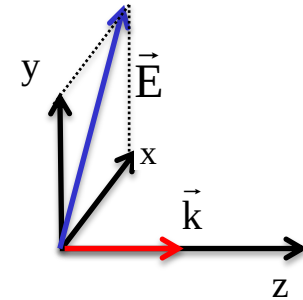
→ Transversale Elektromagnetische Wellen (TEM)



Quelle: Wikipedia

Polarisation beschreibt Richtung und Ausbreitungsverhalten des E-Vektors

Betrachte Welle in z-Richtung: $\vec{k} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ k \end{pmatrix}$



Wegen Transversalität ist der E-Vektor gegeben durch: $\vec{E} = \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ 0 \end{pmatrix} \cdot e^{i(\omega t - kz)}$

→ Ein 2-dimensionale Vektor reicht zur allgemeinen Beschreibung aus

Jones-Vektor

$$\mathbf{E} = \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \end{pmatrix} \begin{matrix} \text{---} \\ \text{---} \end{matrix} \begin{pmatrix} A_x \cdot e^{-i\delta_x} \\ A_y \cdot e^{-i\delta_y} \end{pmatrix}$$

komplexe skalare Größen
(Amplitude und Phase)

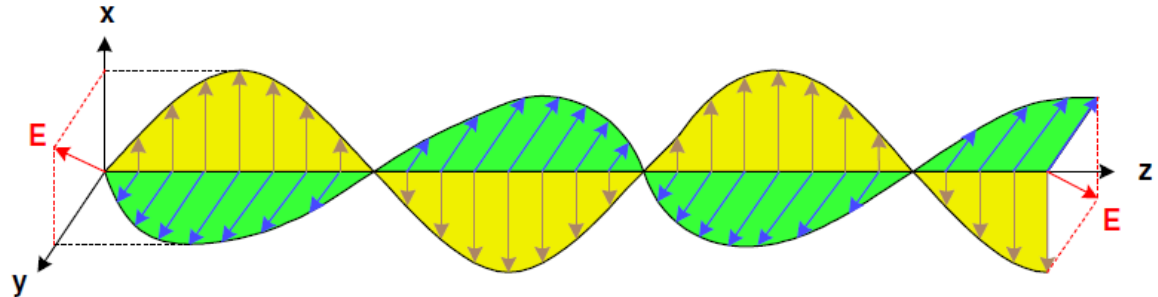
(6.1)

Entscheidend für das Schwingungsverhalten ist der Phasen- und Amplitudenunterschied zwischen E_x und E_y

$$\vec{E} = \begin{pmatrix} A_x \cdot e^{-i\delta_x} \\ A_y \cdot e^{-i\delta_y} \end{pmatrix} \cdot e^{i(\omega t - k \cdot z)}$$

1. Linear

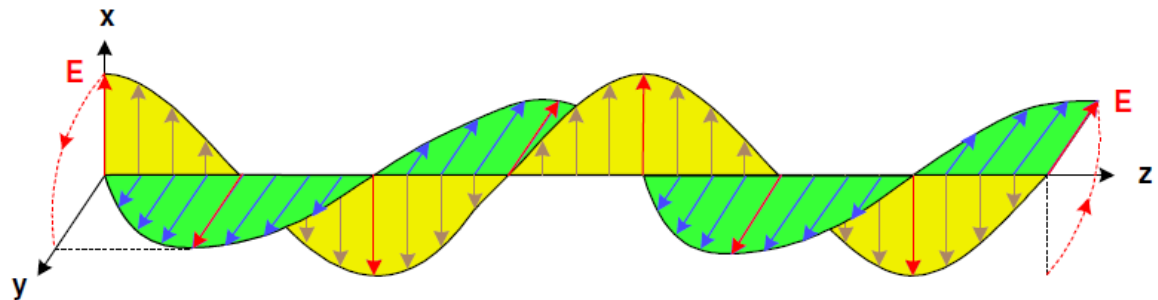
$$\phi_x = \phi_y$$



2. zirkular

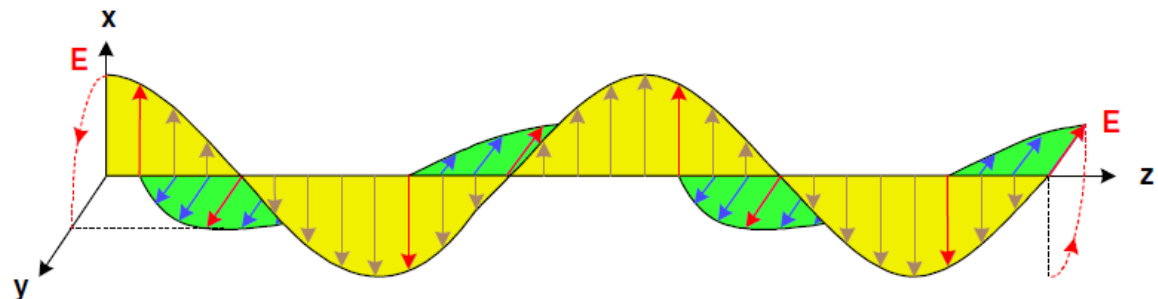
$$\phi_x = \phi_y \pm \frac{\pi}{2}$$

$$A_x = A_y$$



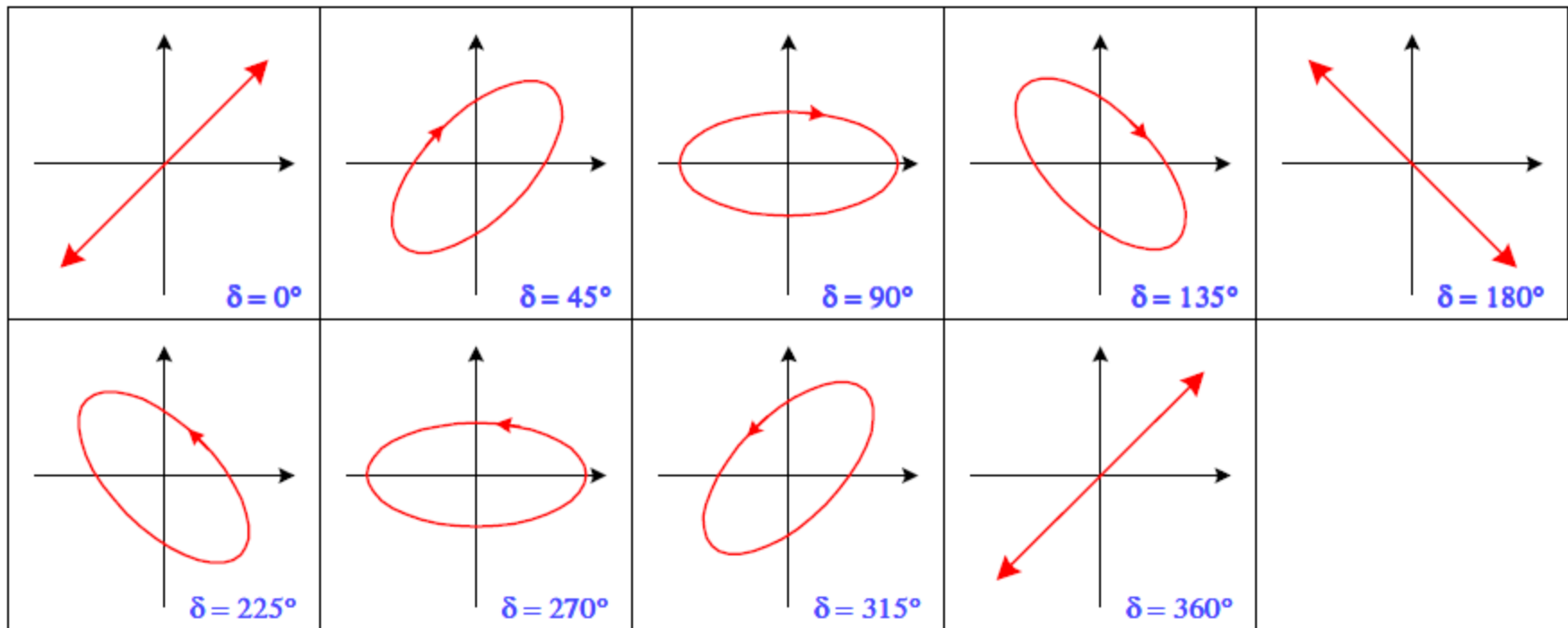
3. elliptisch

sonst



- Eliminieren der Zeitabhängigkeit :
Ellipse für den Vektor E
- Verschiedene Polarisationszustände :
Drehsinn und Form der Ellipse

$$\frac{E_x^2}{A_x^2} + \frac{E_y^2}{A_y^2} - \frac{2E_xE_y\cos\delta}{A_xA_y} = \sin^2\delta$$



Jones-Vektor

Vorteil: anschaulich / Nachteil: nur pol. Licht

- Zerlegung der Feldstärke in zwei **Komponenten** x und y bzw. p und s :
Matrixdarstellung mit **Jonesvektor**

$$\vec{E}_0 = \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A_x e^{-i\delta_x} \\ A_y e^{-i\delta_y} \end{pmatrix}$$

- Relativer Phasenwinkel

$$\delta = \delta_y - \delta_x$$

- Polarisationsellipse

$$\left(\frac{E_x}{A_x} \right)^2 + \left(\frac{E_y}{A_y} \right)^2 - 2 \frac{E_x E_y}{A_x A_y} \cos \delta = \sin^2 \delta$$

- Linear polarisiertes Licht

$$\vec{E}_0 = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} \quad \vec{E}_0 = \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \end{pmatrix} \quad \vec{E}_0 = \begin{pmatrix} \cos \alpha \\ \sin \alpha \end{pmatrix}$$

- Zirkular polarisiertes Licht

$$\vec{E}_{rz} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} 1 \\ i \end{pmatrix} \quad \vec{E}_{lz} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} 1 \\ -i \end{pmatrix}$$

$$\mathbf{E} = \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \end{pmatrix} \quad \text{keine Korrelation} \Rightarrow \text{keine Polarisation}$$

Unpolarisiertes Licht = unkorrelierte Überlagerung orthogonaler Polarisationen

Beschreibung:
Stokes-Vektor

$$\mathbf{S} = \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix}$$

- Beschreibung von **energetischem** Standpunkt aus :

- S_0 Gesamtintensität

$$S_0 = I(0,0) + I(90,0)$$

$$S_0 = E_x^2 + E_y^2$$

- S_1 Differenz der Intensität linear-x / linear-y

$$S_1 = I(0,0) - I(90,0)$$

$$S_1 = E_x^2 - E_y^2$$

- S_2 Differenz der Intensität linear 45° / 135°

$$S_2 = I(45,0) - I(135,0)$$

$$S_2 = 2E_x E_y \cdot \cos \delta$$

- S_3 Differenz links- / rechtszirkularer Anteil

$$S_3 = I(45,90) - I(45,-90)$$

$$S_3 = 2E_x E_y \cdot \sin \delta$$

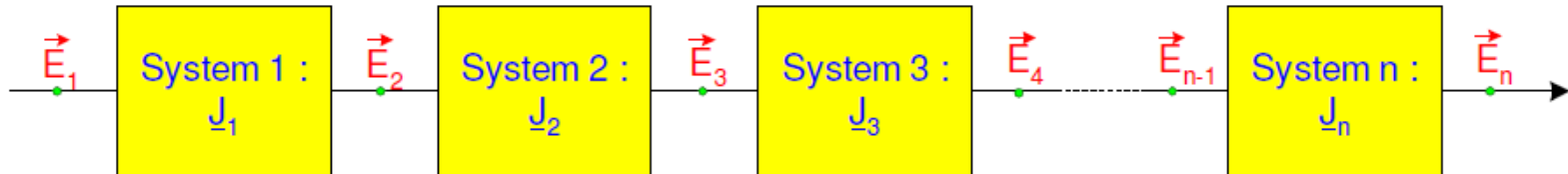
Beschreibung von Polarisationskomponenten durch Transformation des Jones-Vektors → **Jones-Matrizen $\underline{J}$**

- Ausbreitung der Jonesvektoren :
2 x 2 - **Jonesmatrix**, die das System beschreibt

$$\vec{E}'_0 = \underline{J} \cdot \vec{E}_0 = \begin{pmatrix} j_{ss} & j_{sp} \\ j_{ps} & j_{pp} \end{pmatrix} \vec{E}_0$$

- **Verkettung** einzelner Teilsysteme

$$\vec{E}_n = \underline{J}_n \cdot \underline{J}_{n-1} \cdots \underline{J}_2 \cdot \underline{J}_1 \cdot \vec{E}_1$$



- **Energieerhaltung**
Unitäre Jonesmatrix
(nicht bei allen Komponenten)

$$\det \underline{J} = \pm 1$$

- **Freiraumausbreitung**

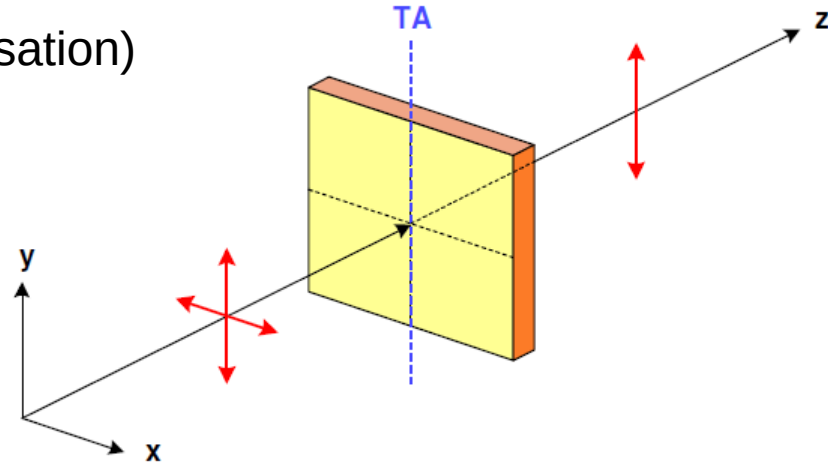
$$J_{PRO} = e^{-i \frac{2\pi}{\lambda} \Delta_{OPL}} \cdot \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Polarisator (Filterung einer Polarisation)

- Polarisator in y-Richtung

$$\underline{J}_P(0) = \begin{pmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$$

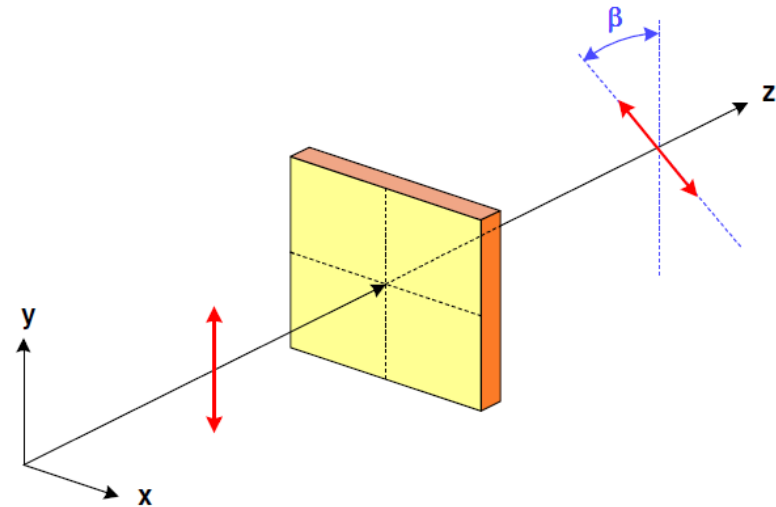
(6.2)



Rotator (Drehung der Polarisation)

$$J_{ROT} = \begin{pmatrix} \cos \beta & -\sin \beta \\ \sin \beta & \cos \beta \end{pmatrix}$$

(6.3)



Satz von Malus

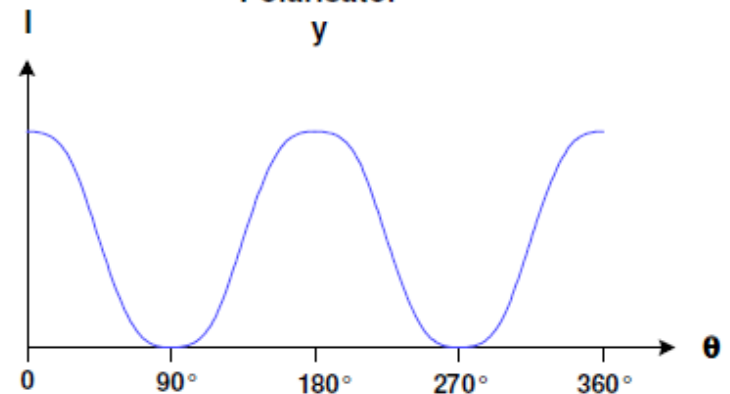
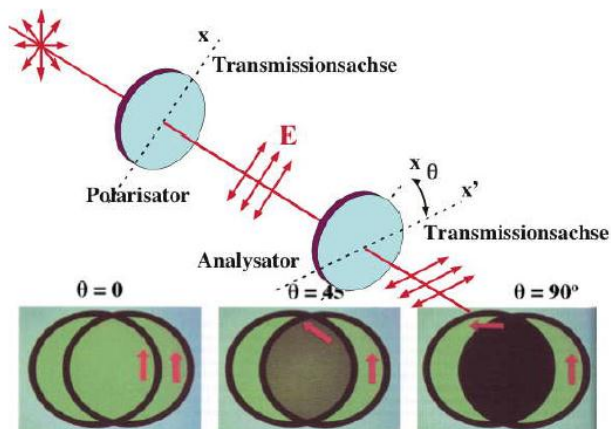
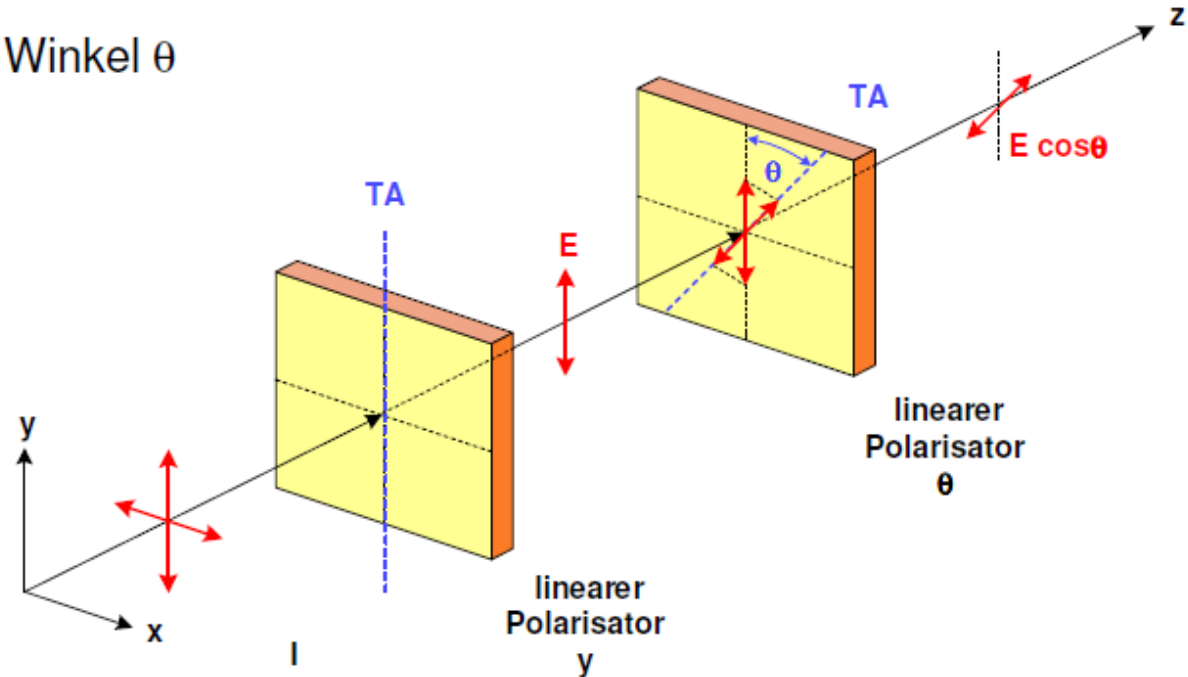


Polarisator und Analysator (verdrehter Polarisator)

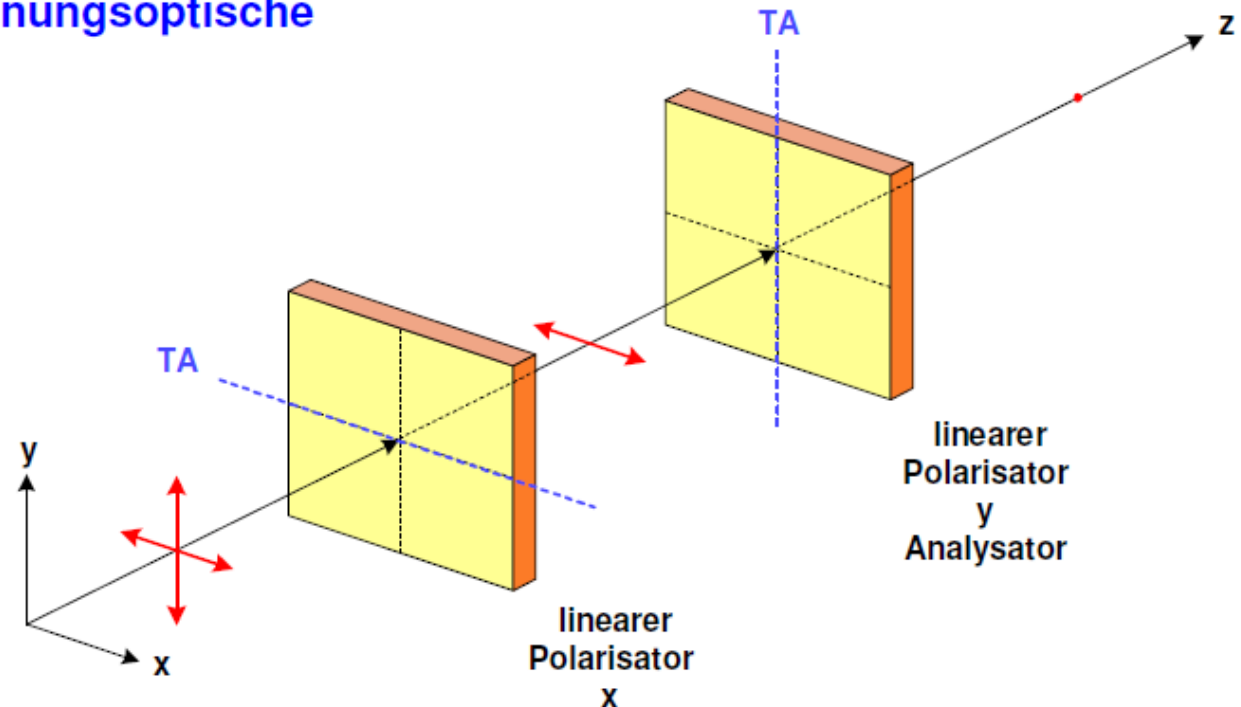
- Relative Drehung um den Winkel θ
- **Energietransmission :**
Gesetz von Malus

$$I(\theta) = I_o \cdot \cos^2 \theta$$

(6.4)



- **Gekreuztes** Polarisator - Analysator-Paar
Keine Energietransmission
- Komponente zwischen gekreuzten Polarisatoren :
Bestimmung der internen Drehung
Anwendung : **Spannungsoptische Analyse**

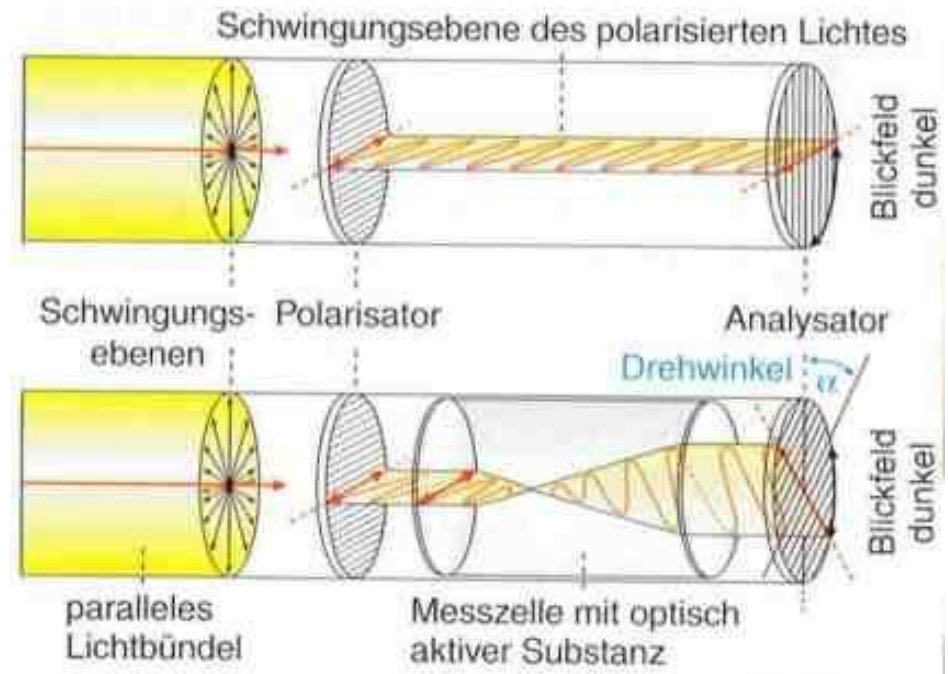
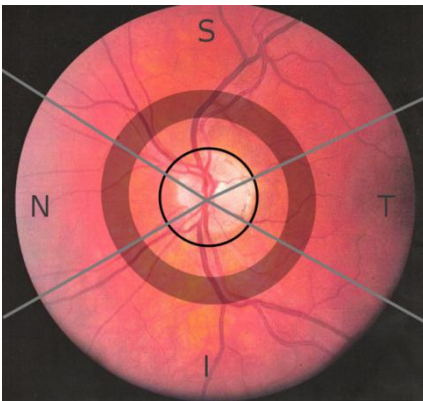


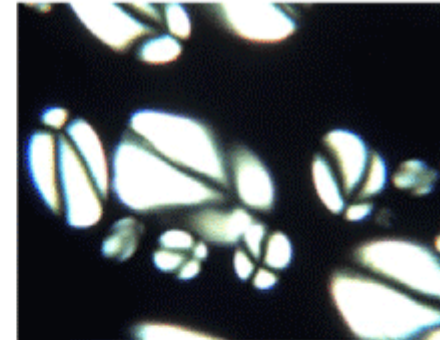
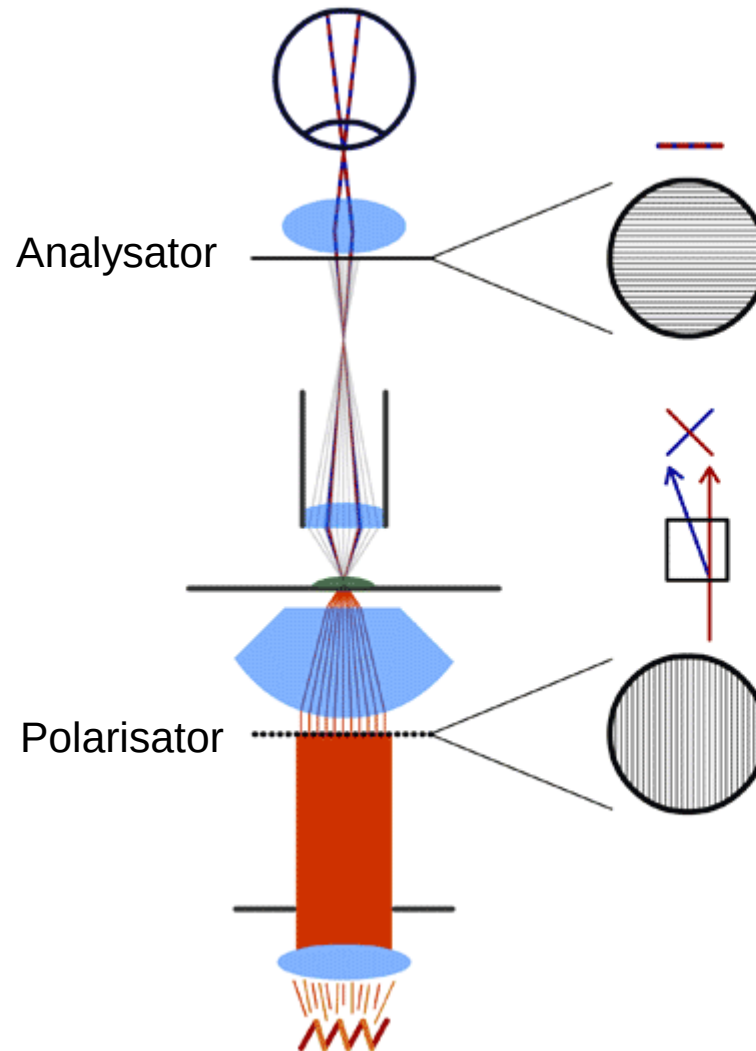
Einige Stoffe (z.B. Zuckerlösung) drehen die Polarisationsrichtung (Rotator).
Der Drehwinkel hängt von der Konzentration und dem Lichtweg ab.

Polarimeter: Quantitative Messung des Drehwinkels

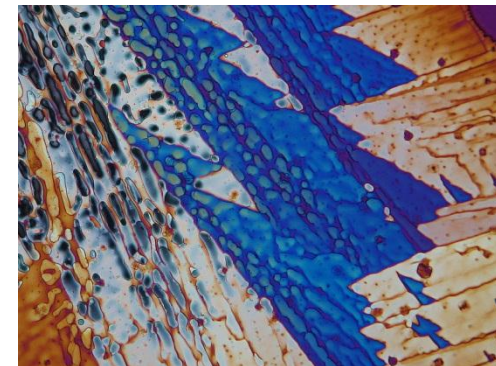
Polarimetrie zur Bioanalytik (Konzentrationsbestimmung)

Polarimetrie zur Bestimmung
Der Dicke der Netzhaut





Durch konstruktive Interferenz der beiden Wellenzüge kommt es zum Aufleuchten der doppelbrechenden Strukturen.



Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

**Medizintechnik: Neue Möglichkeiten zur Beurteilung
menschlicher Eizellen durch das**

Polarisationsmikroskopische System OCTAX ICSI GUARD™

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2006; 3 (5), 356-358

Abbildung 1: Menschliche Eizelle mit erstem Polkörper. A: Im Hellfeldbild erscheint die Eizelle als Metaphase II. B: Dieselbe Eizelle im ICSI Guard™-Bild. Spindelmorphologie und -lage zeigen, daß es sich um Telophase I handelt.

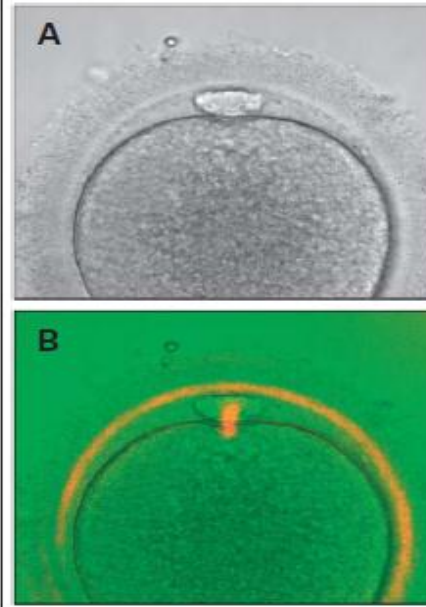
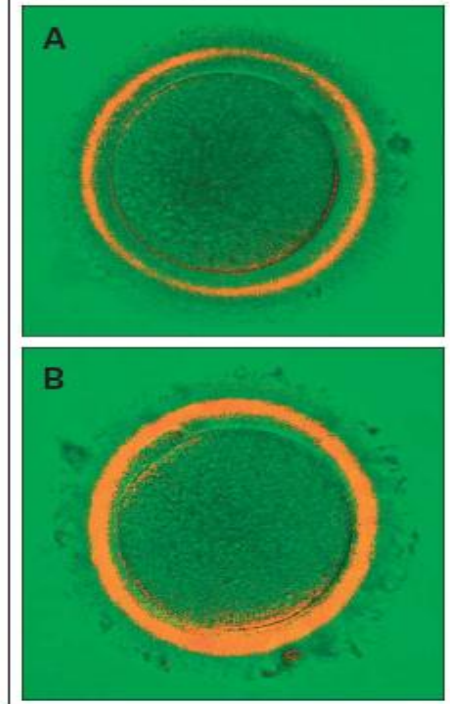
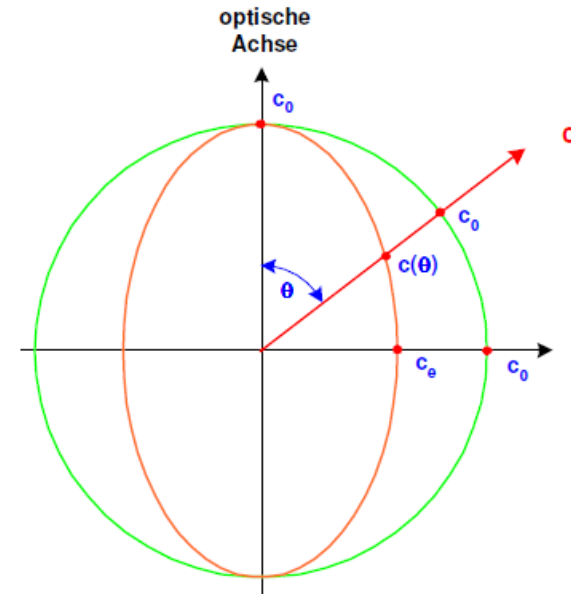


Abbildung 2: Doppelbrechung der Zona pellucida im ICSI Guard™-Bild. A: Eizelle mit niedriger Intensität. B: Eizelle mit hoher Intensität.



Doppelbrechende Materialien:
Brechungsindex (Lichtgeschwindigkeit)
hängt ab vom Polarisierung und
Einfallsrichtung zum Material
(schnelle Achse / langsame Achse)
Beschreibung = Indexellipsoid



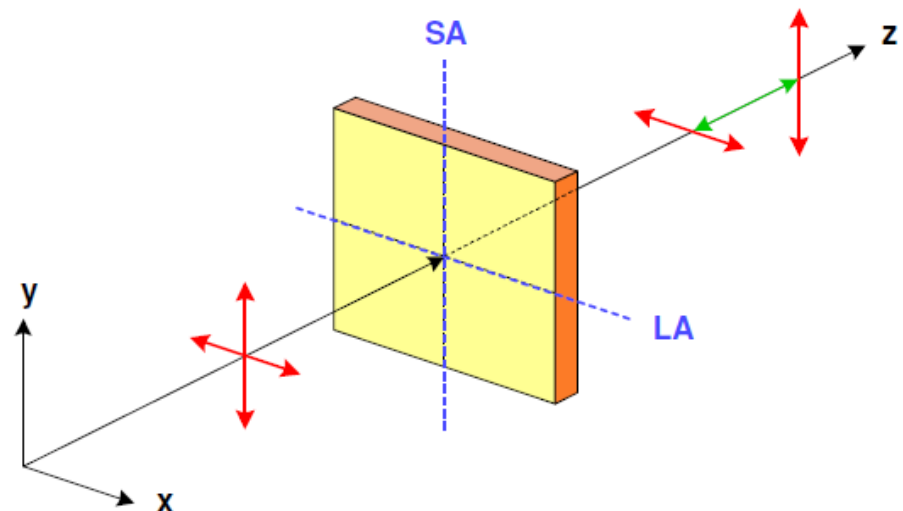
Anwendung:

Retarder (relative Verzögerung)

$$J_{RET} = \begin{pmatrix} e^{-i\frac{\delta}{2}} & 0 \\ 0 & e^{i\frac{\delta}{2}} \end{pmatrix}$$

$\lambda/4$ -Plättchen ($\pi/2$ -Verzögerung)

$$\underline{J}_V(0, \pi/2) = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -i \end{pmatrix} \quad (6.5)$$

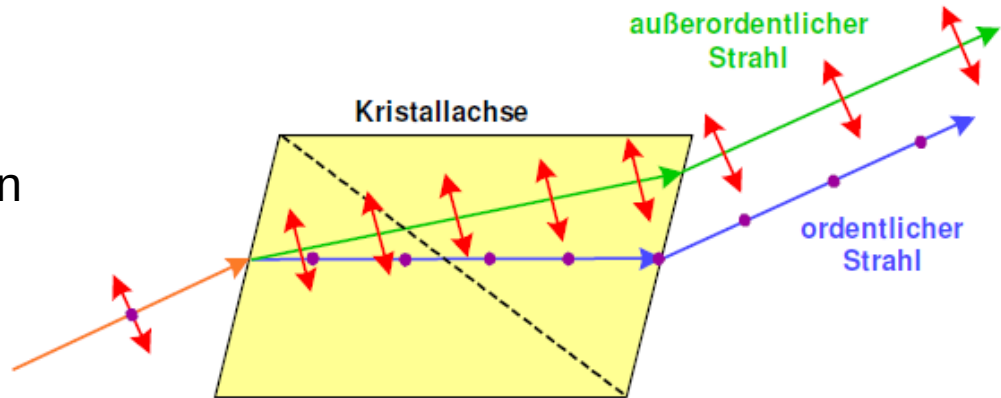


Strahlaufspaltung mit Doppelbrechung



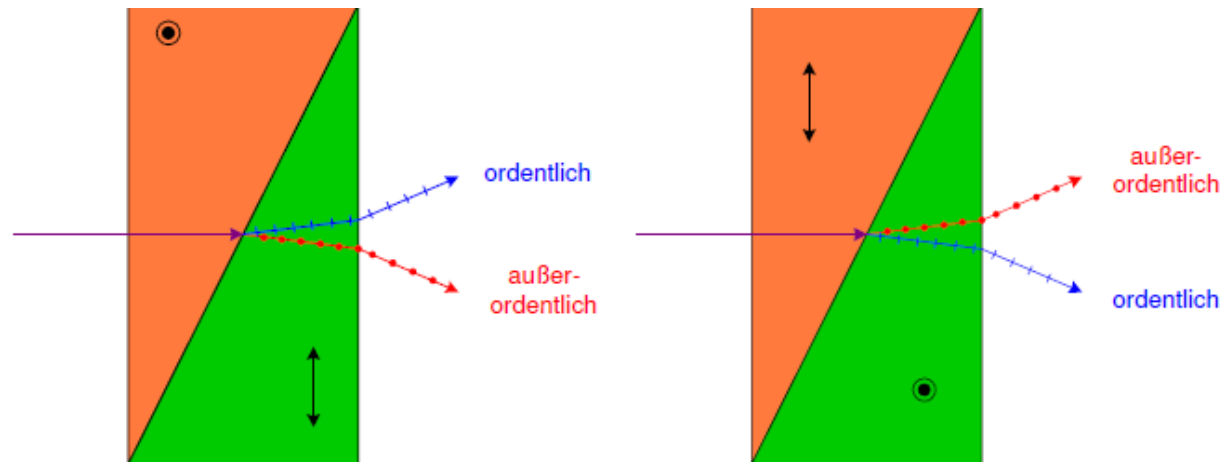
Brechungsindex ist
Polarisationsabhängig

- Es treten 2 Ablenkwinkel
für die untersch. Polarisationen
auf
- Strahlaufspaltung
(abh. von Kristallorientierung)



Anwendung z.B. Wollaston Prisma (siehe DIC-Kontrast)

- Wollastonprisma
normal



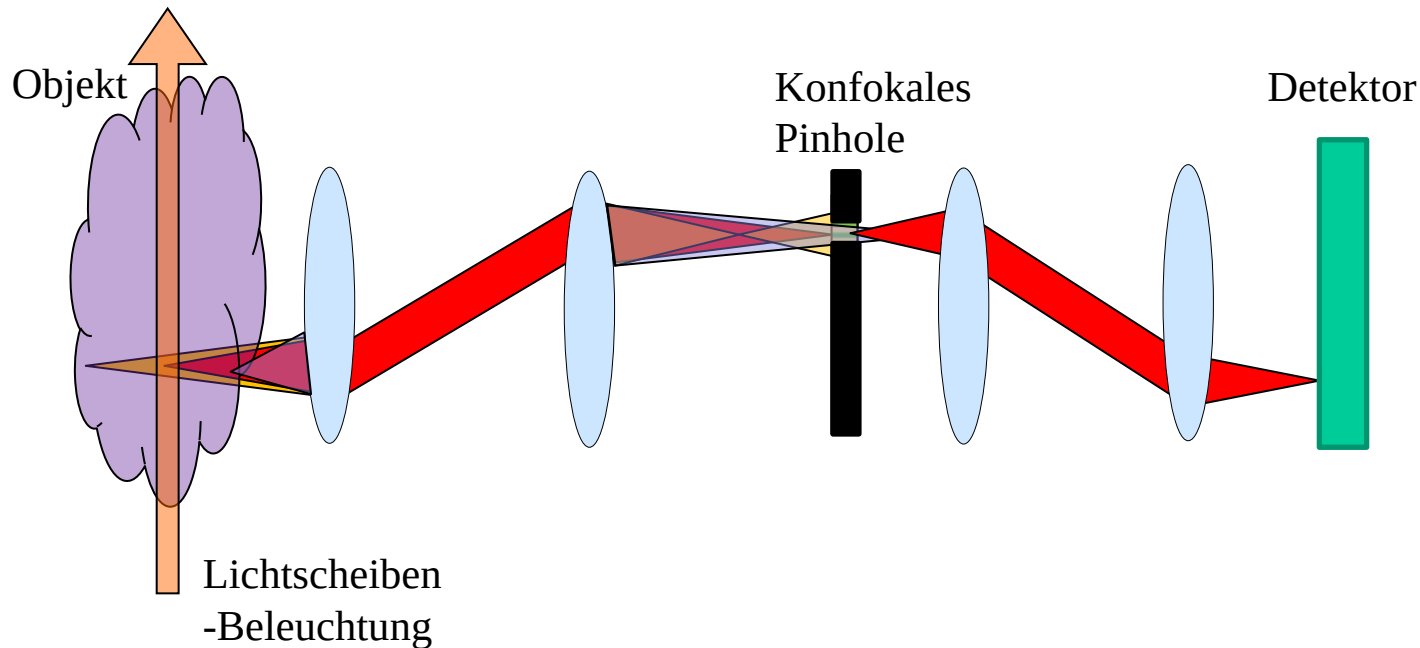
6. Moderne Mikroskopiemethoden

6.1 Polarisation und Polarisationsmikroskopie

6.2 Konfokale Methoden

6.3 Auflösungssteigerung (ohne Fluoreszenz)

Problem: In 3D-Objekten überlagern die vor/hinter der Fokusebene liegende Objektschichten das Bild

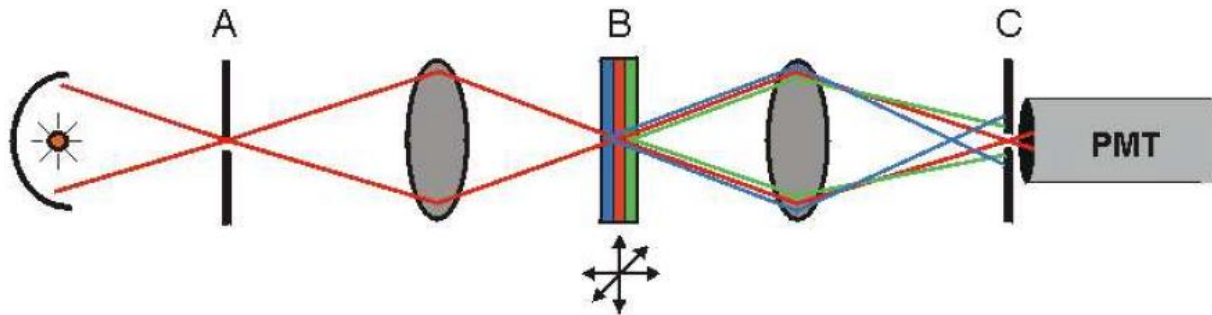


Lösungen:

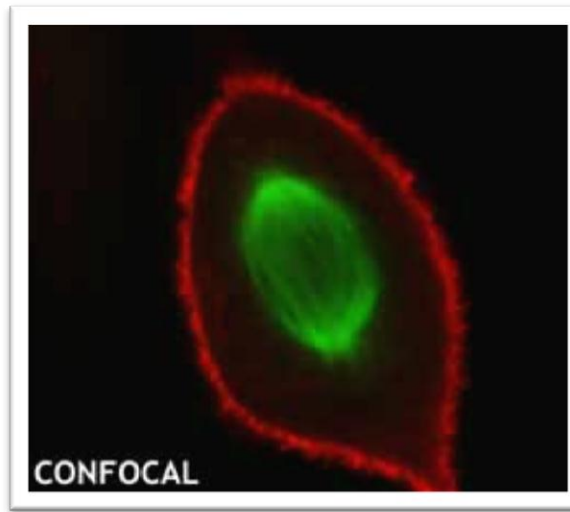
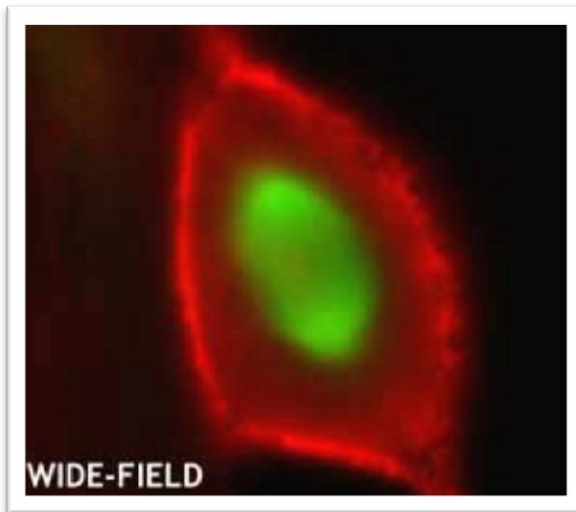
Konfokale Mikroskopie – Pinhole als z-Filter

Lichtscheiben Mikroskopie – Beleuchtung nur einer z-Ebene

Konfokales System in Transmission



Quelle: Universität Osnabrück



Grundprinzip:

Räumliche Filterung des Bildes über eine sehr kleine Blende (Pinhole)

→ Selektion einer Fokusschicht in z-Richtung

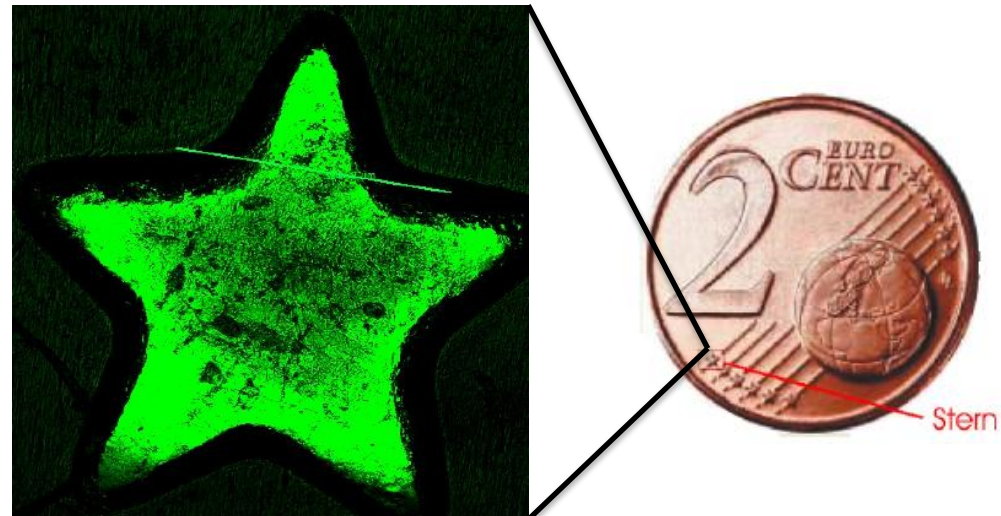
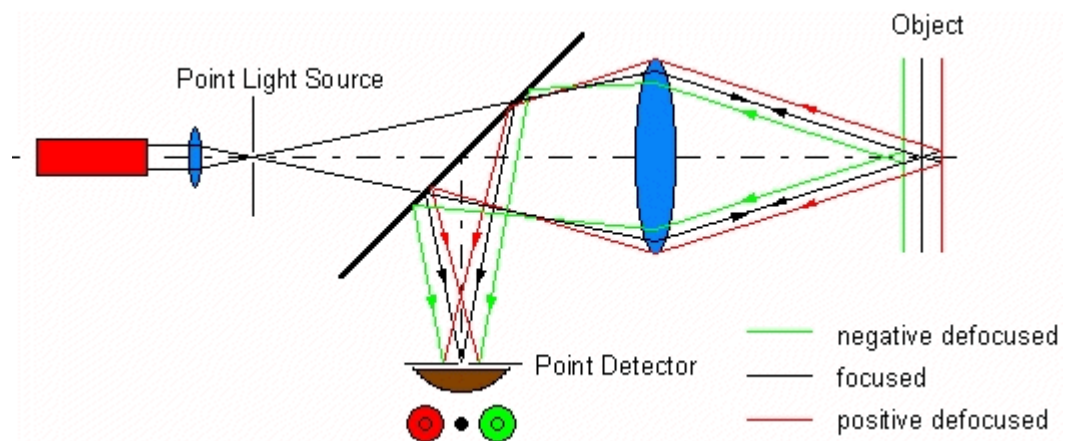
Diesen Vorgang nennt man auch „**optical sectioning**“

Nachteil

Punktdetektion

→ Abrastern des Bildes (**Scannen**) ist notwendig

Konfokales System in Reflexion



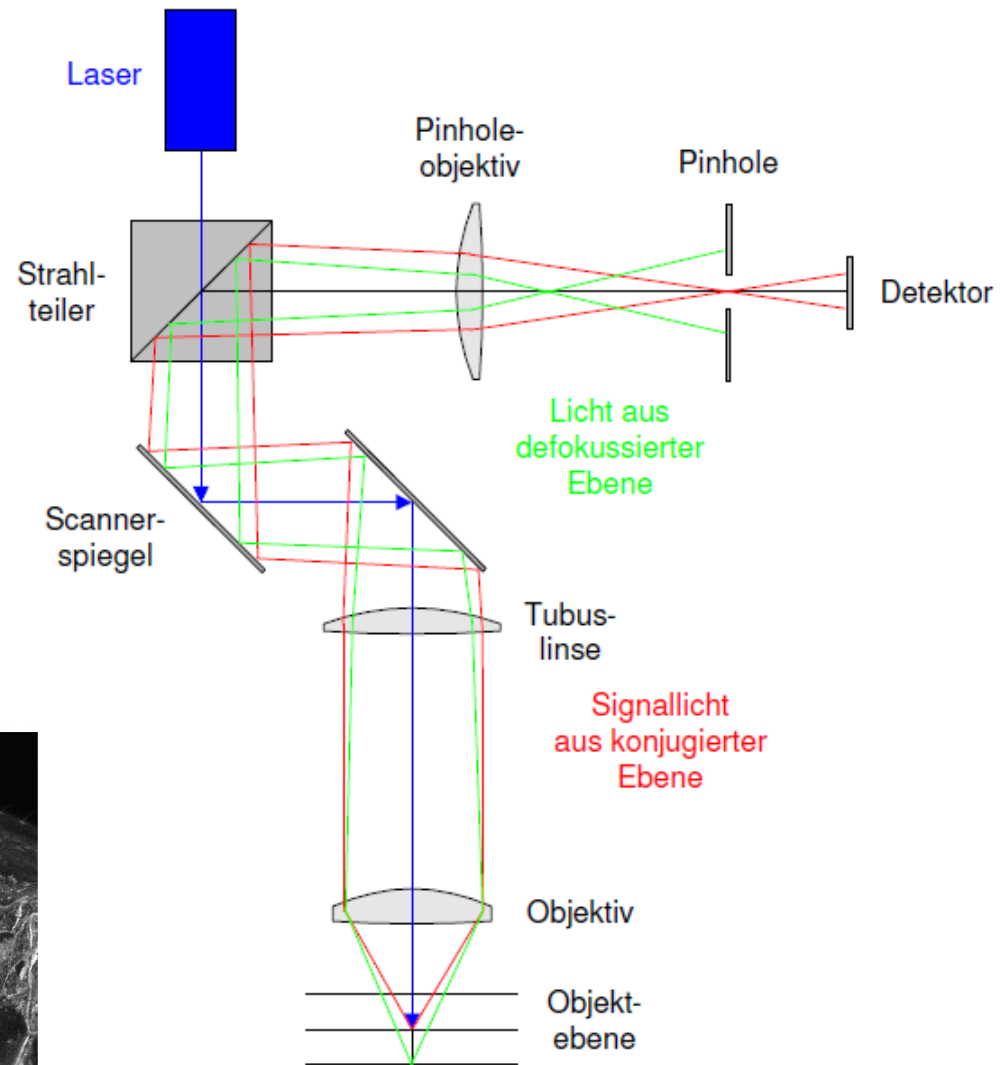
Konfokales Laser Scanning Mikroskop

Zur Abbildung eines ausgedehnten Objektes wird das Bild des Pinholes über das Objekt gescannt

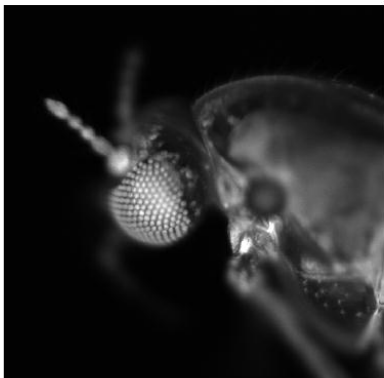
Lichtquelle = Laser,
(da gut fokussierbar)

Scann-Spiegel zur Felldrasterung

- 3-Dimensionaler Scan möglich
- Bild über Bildverarbeitung



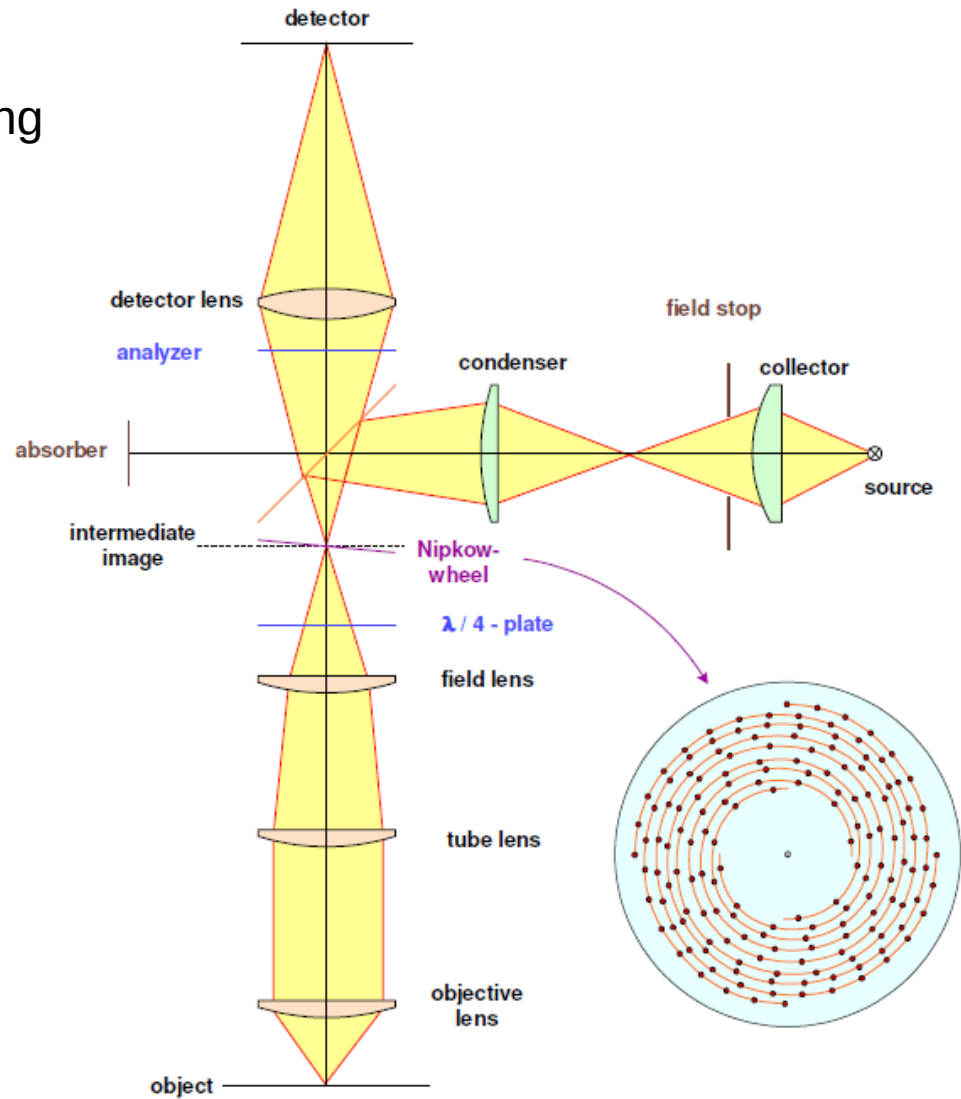
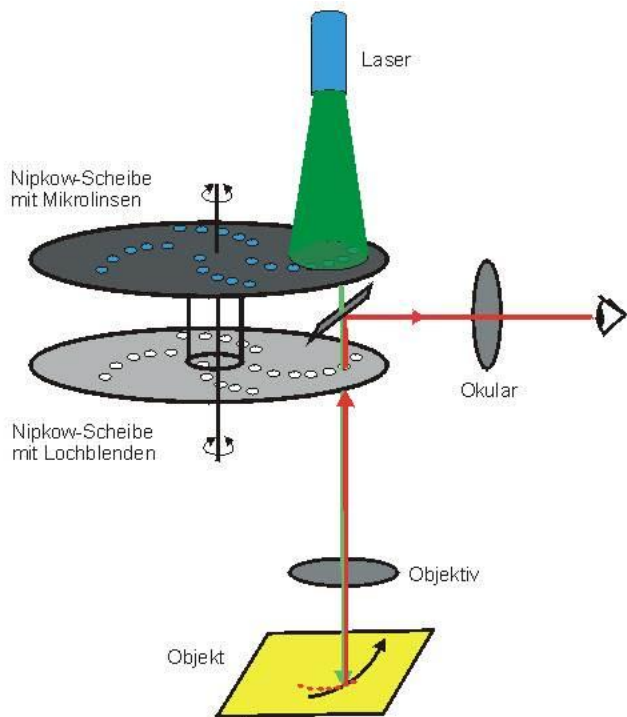
Klassische Mikroskopie
Objekttiefe : 300 μm



Konfokale Mikroskopie
mit 3-D-Rekonstruktion



Schnell rotierenden Blenden-Scheibe (Nipkow-Scheibe) erlaubt Beobachtung eines ausgedehnten Feldes



Auflösungsvermögen des konfokalen Mikroskops ist gegenüber dem klassischen Mikroskop leicht gesteigert, wenn Pinhole-Durchmesser im Bereich der Auflösungsgrenze verwendet werden.

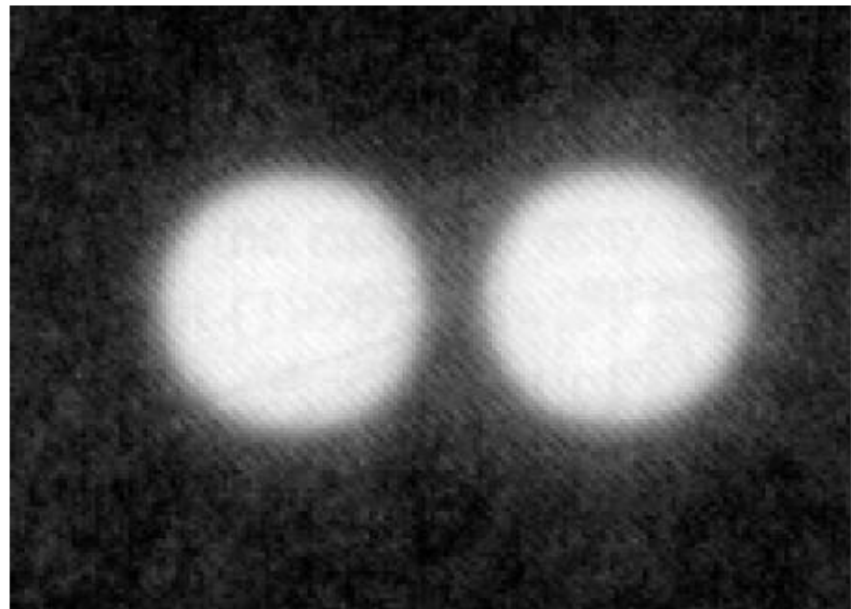
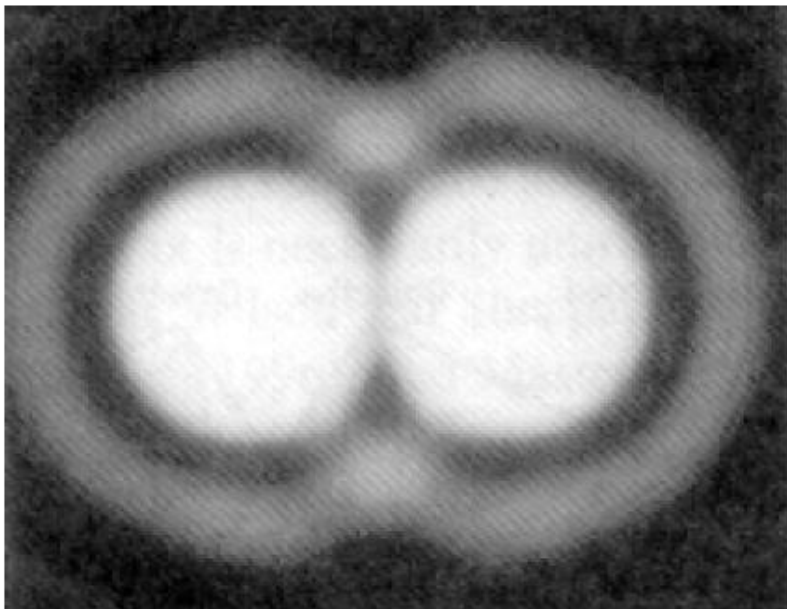
Es gilt als Daumenregel:

Konventionell:

$$\Delta x \approx 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$
$$\Delta z \approx 2 \frac{\lambda}{NA^2}$$

Konfokal

$$\Delta x \approx 0.4 \frac{\lambda}{NA}$$
$$\Delta z \approx 1.4 \frac{\lambda}{NA^2}$$



6. Moderne Mikroskopiemethoden

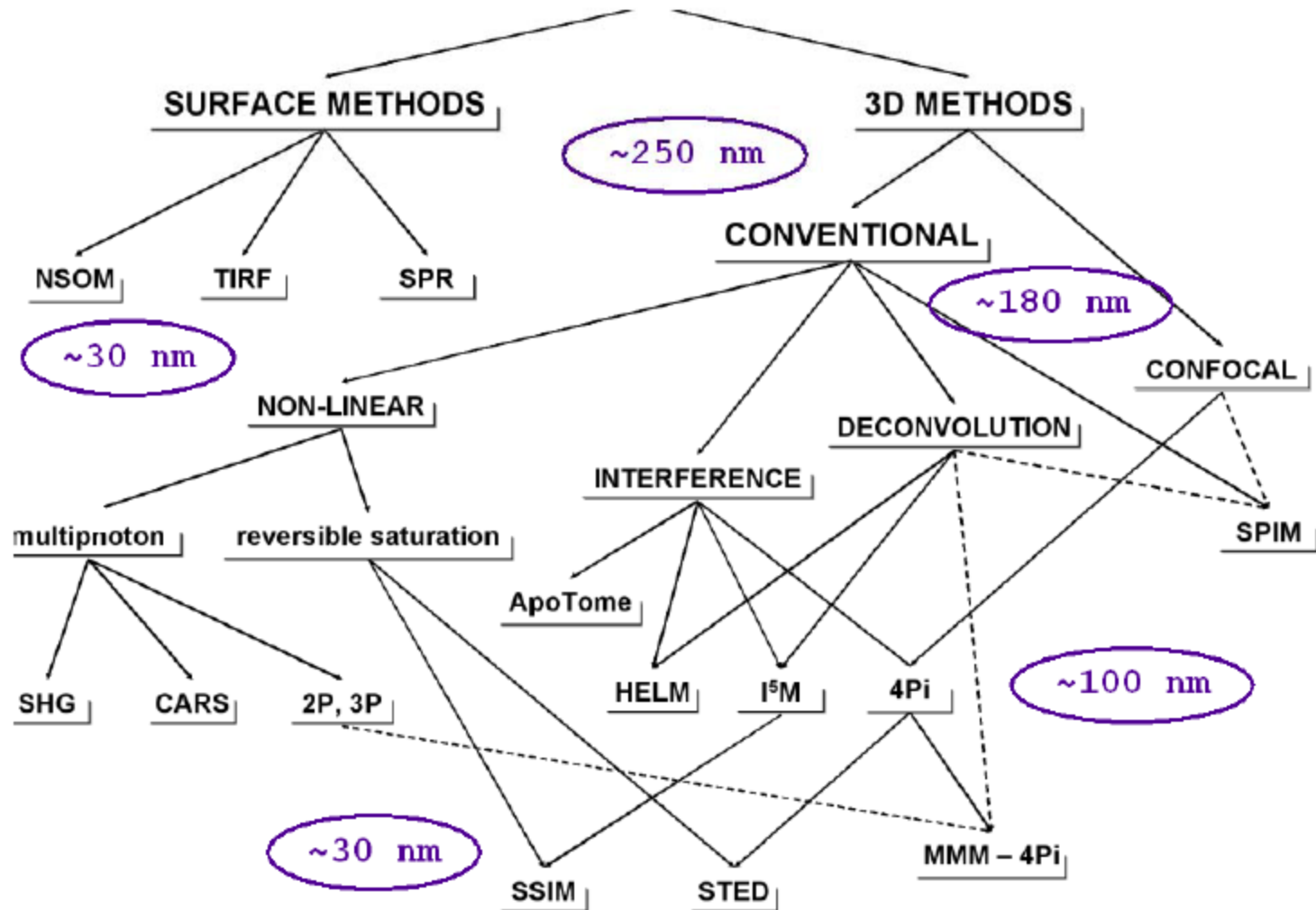
6.1 Polarisation und Polarisationsmikroskopie

6.2 Konfokale Methoden

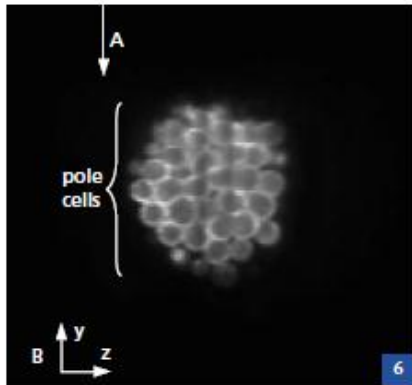
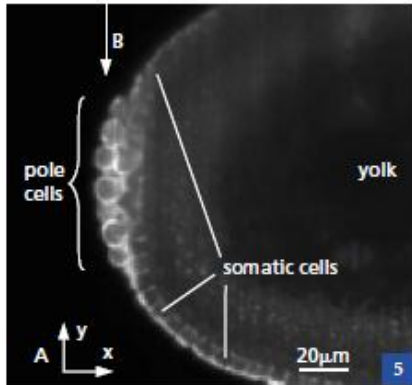
6.3 Auflösungssteigerung (ohne Fluoreszenz)

Auflösungssteigerung

Auflösungssteigerung = Verbesserung der **lateralen oder axialen** Auflösung

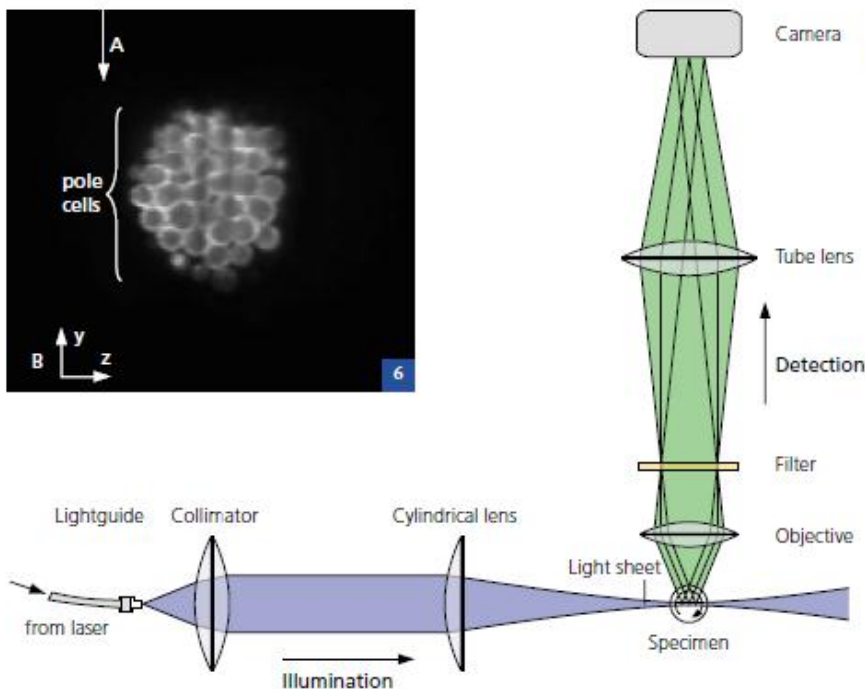


Lichtscheiben-Mikroskopie (SPIM)



SPIM = Selective Plane Illumination Microscopy
(oft auch in Kombination mit Fluoreszenz-Proben)

- Auflösungsverbesserung in z (optical sectioning)
- Keine Verbesserung lateral



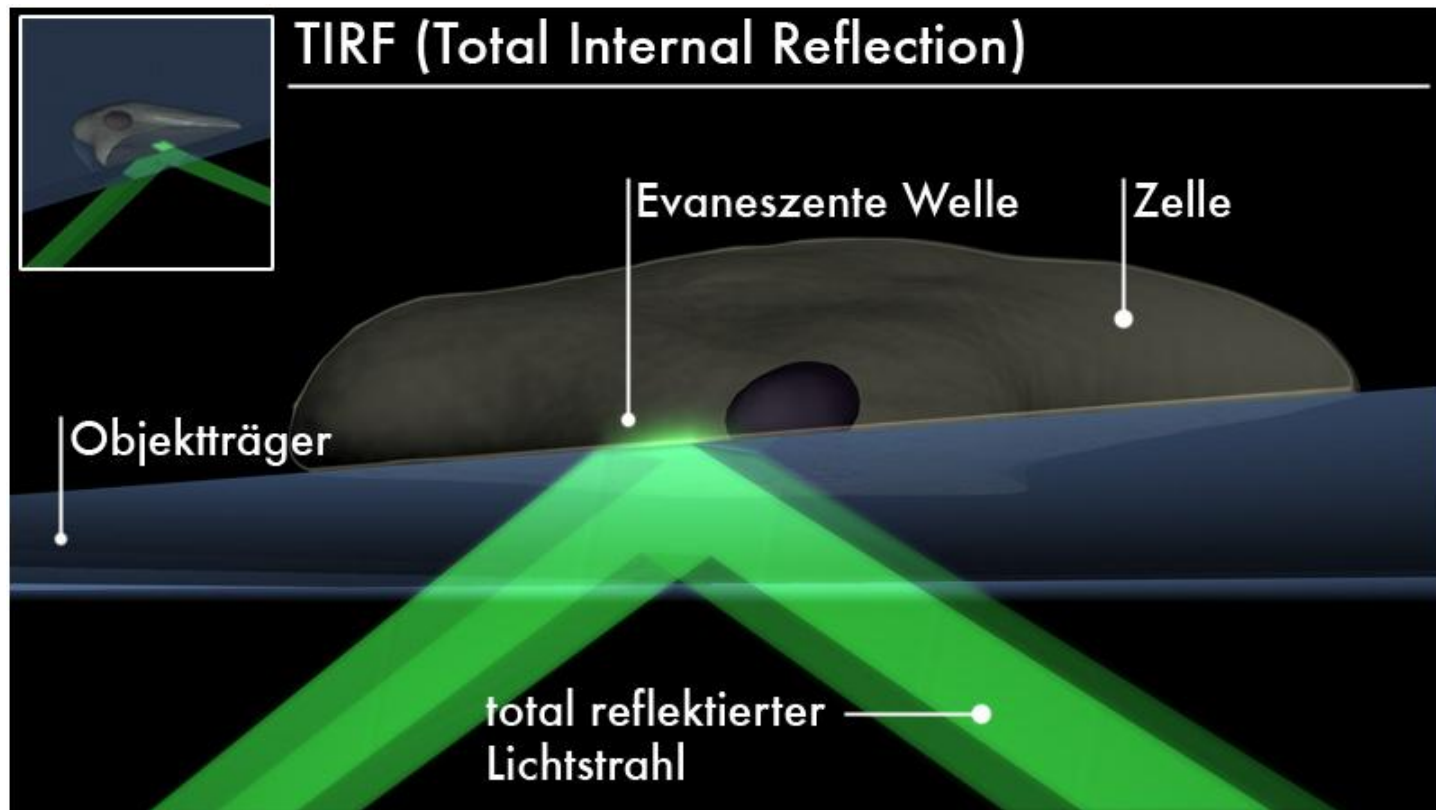
Totalreflexions-Mikroskopie

TIR(F) = Total Internal Reflection (Fluorescence) oder **Evaneszent Wave Microscopy**

→ Hohe Auflösungsverbesserung in z (optical sectioning durch evaneszentes Feld)

→ Keine Verbesserung lateral

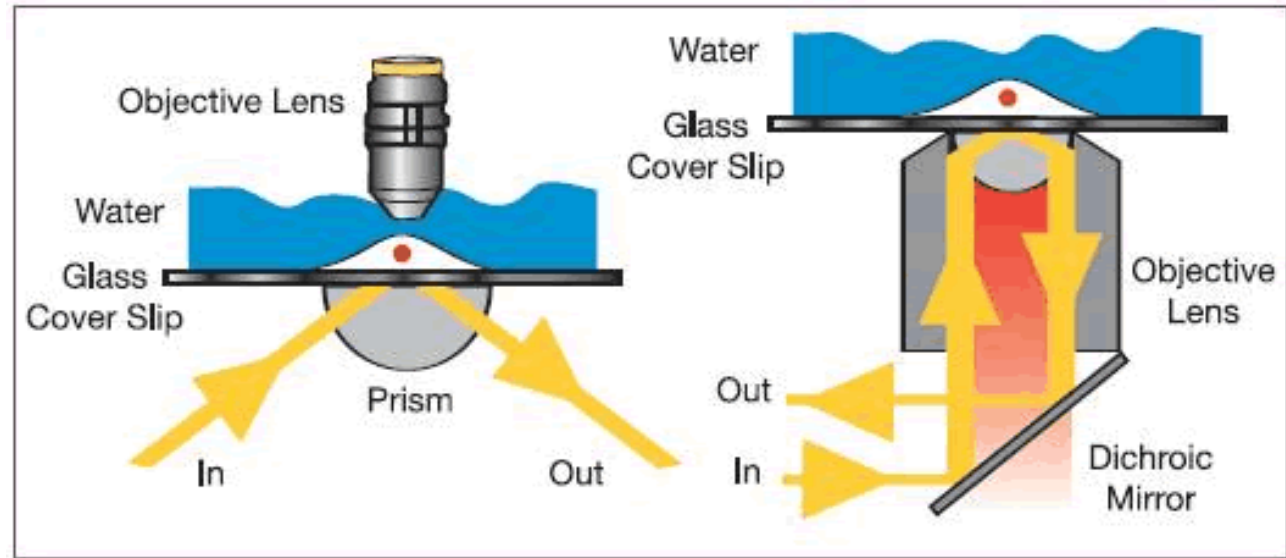
Prinzip Nutzung der unvollständigen Totalreflexion



TIRF-Mikroskopie

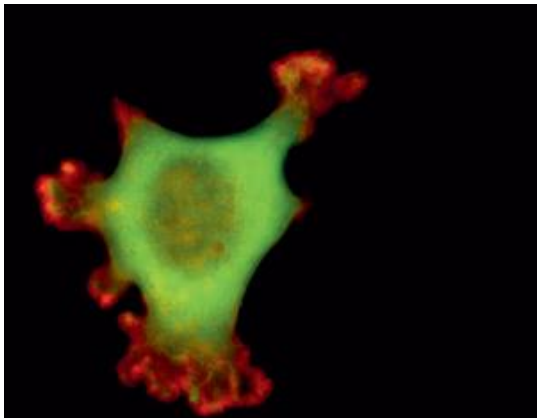
→ Nur Strukturen im evaneszenten Feld werden sichtbar, d.h. nur die z-Schicht nahe der Glasplatte

http://www.serviampt.com/index_files/Page721.htm

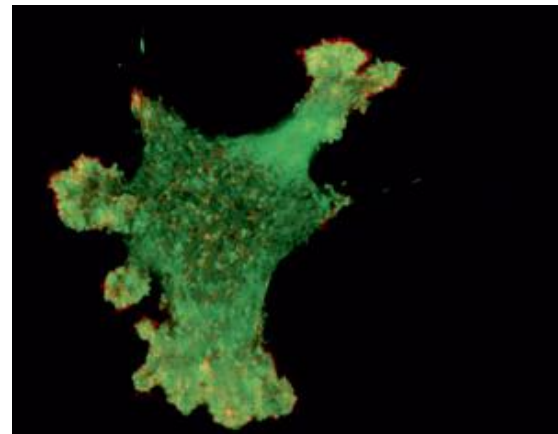


Prism-type TIRFM (LHS) and objective-type TIRFM (RHS)

Standard EPI-Mikroskopie



TIRF-Mikroskopie

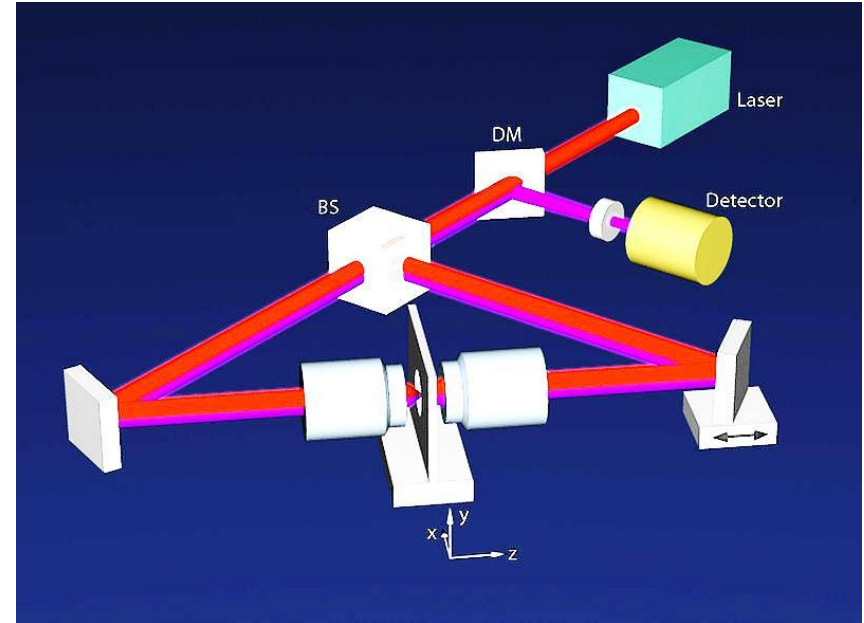


<http://www.zeiss.de>

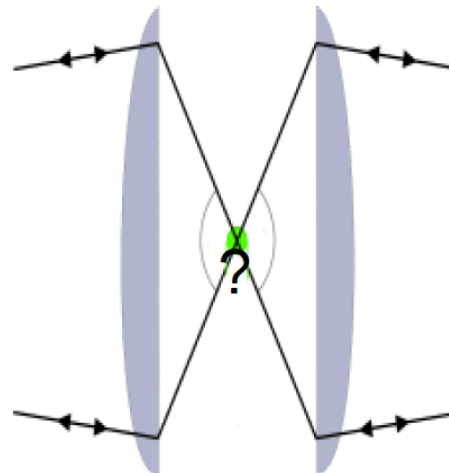
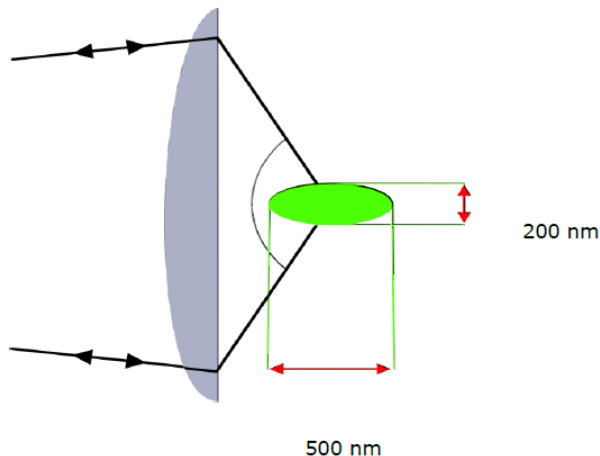
Grundidee:

Klassische Mikroskopie ist auf Beobachtung des Halbraums (2Pi entspr. $NA=1$ an Luft) begrenzt.

4Pi-Ansätze erweitern die Beobachtung auf den **Vollraum (4Pi)** z.B. mit Hilfe von 2 synchronen konfokale Objektiven aus 2 Richtungen



Quelle Wikipedia-Commons /
Hartmut Sebesse



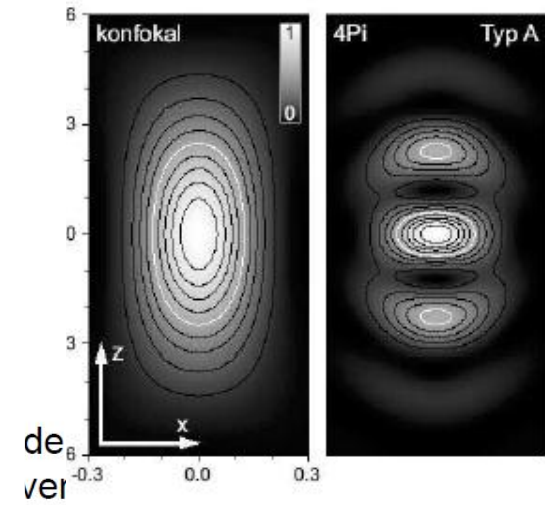
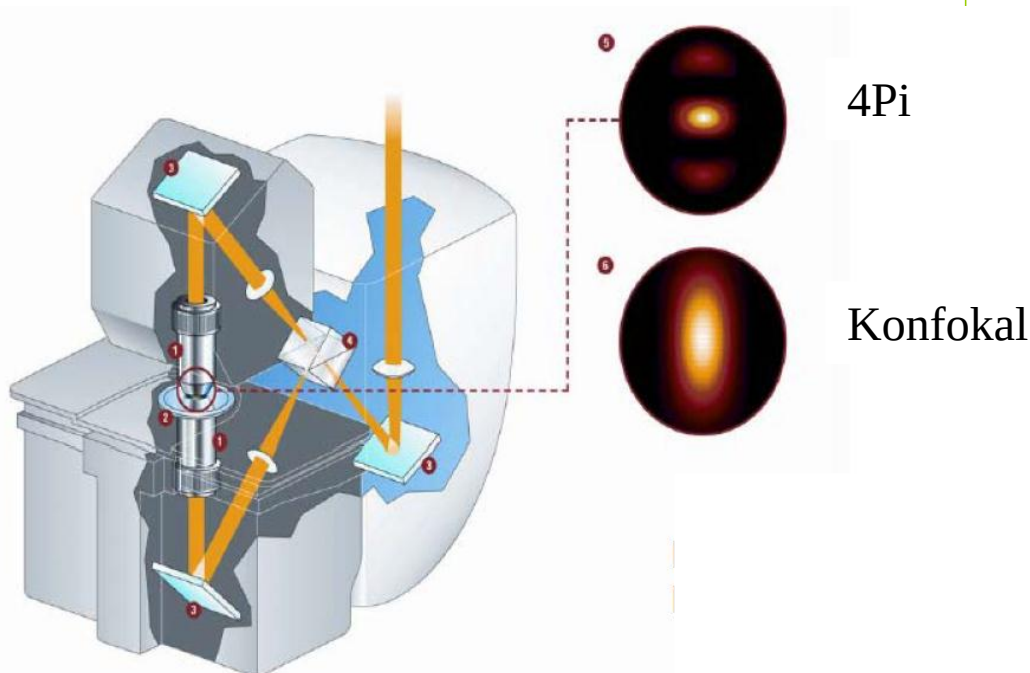
Varianten:

Je nach Beleuchtung und Beobachtung Anordnung unterscheidet man Typ A, B, C

Ergebnisse:

- Die PSF-Funktion verändert sich in z
- Auflösungssteigerung nur in z-Richtung (ca. 100nm)

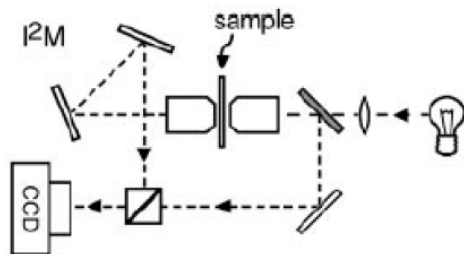
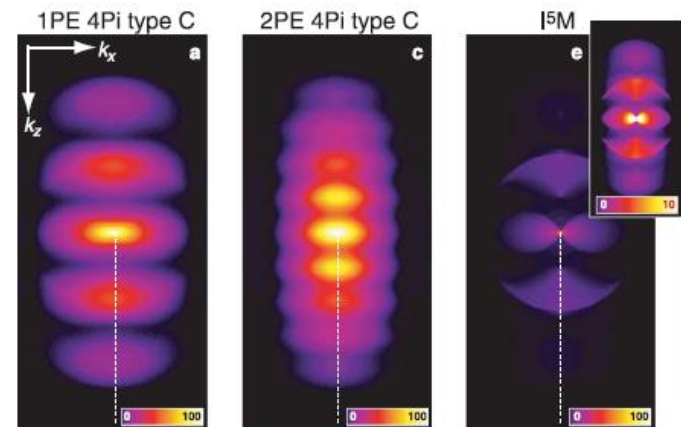
	Typ A	Typ B	Typ C
Beleuchtung	kohärent mit zwei Objektiven	mit einem Objektiv (oder nicht kohärent mit zwei Objektiven)	kohärent mit zwei Objektiven
Detektion	mit einem Objektiv (oder nicht kohärent mit zwei Objektiven)	kohärent mit zwei Objektiven	kohärent mit zwei Objektiven



Grundprinzip:

Ähnlich zur 4Pi-Mikroskopie.
Man nutzt allerdings ein ausgedehntes Feld und zusätzliche Interferenz-Effekte zwischen den beiden gegenläufigen Beleuchtungsrichtungen aus.

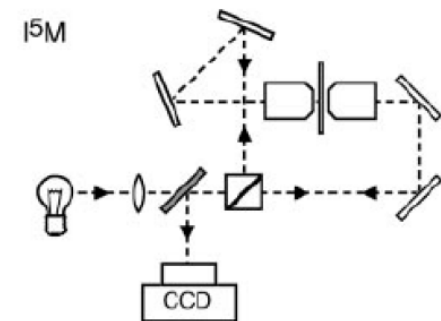
Das „I“ bedeutet also „Interferenz“



I²M : Interferenz am Detektor

I³M : Interferenz in der Anregungsebene

I⁵M : I²M + I³M



Journal of Microscopy, Vol. 222, Pt 2 May 2006, pp. 105–117

Received 3 December 2004; accepted 18 January 2006

Comparison of I⁵M and 4Pi-microscopy

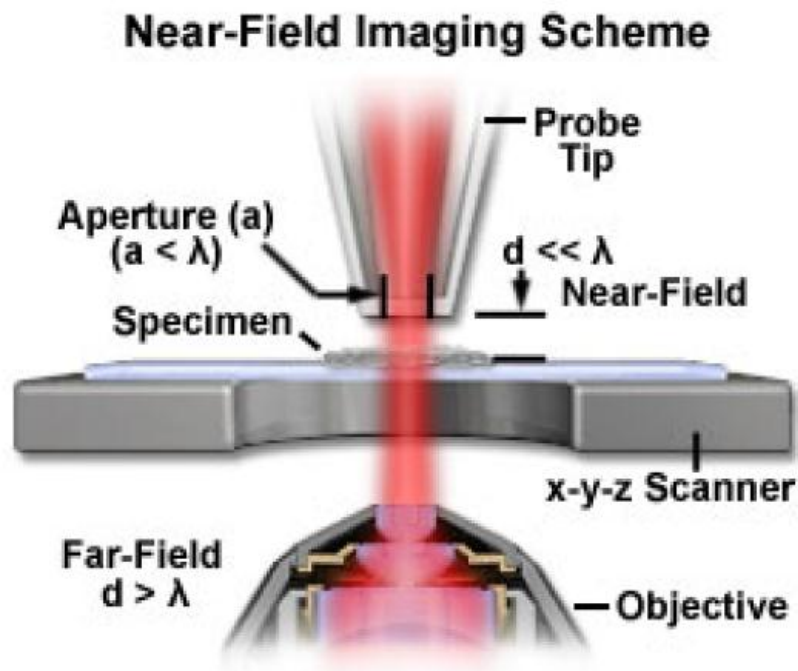
J. BEWERSDORF, R. SCHMIDT & S. W. HELL

Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry, Department of NanoBiophotonics, Göttingen, Germany

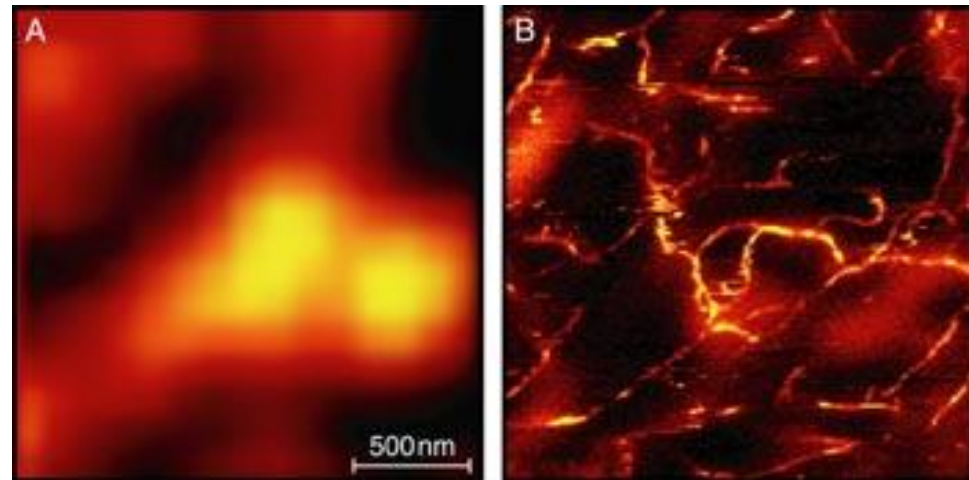
Nahfeld-Mikroskopie (SNOM)

SNOM = Scanning Near Field Microscopy
oder **NSOM** = Near Field Scanning Optical Microscope

Prinzip:
Abtastung des Nahfeldes
mit sehr kleiner Faser-Spitze

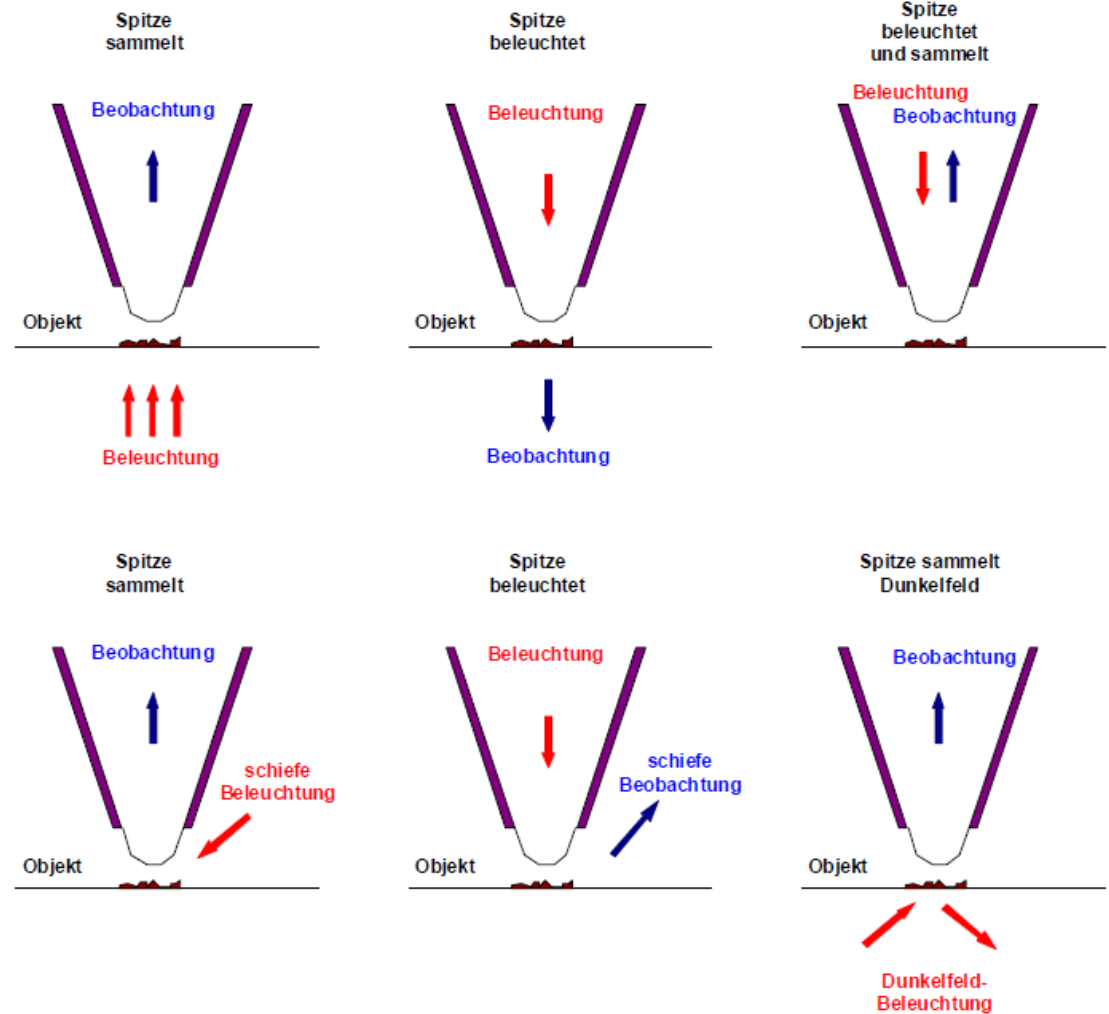


Prinzip der optischen Nahfeldmikroskopie



Bildern von Kohlenstoff-Nanoröhren.
(A) Aufnahme mit einem klassischen Mikroskop
(B) Aufnahme mit einem Nahfeldmikroskop

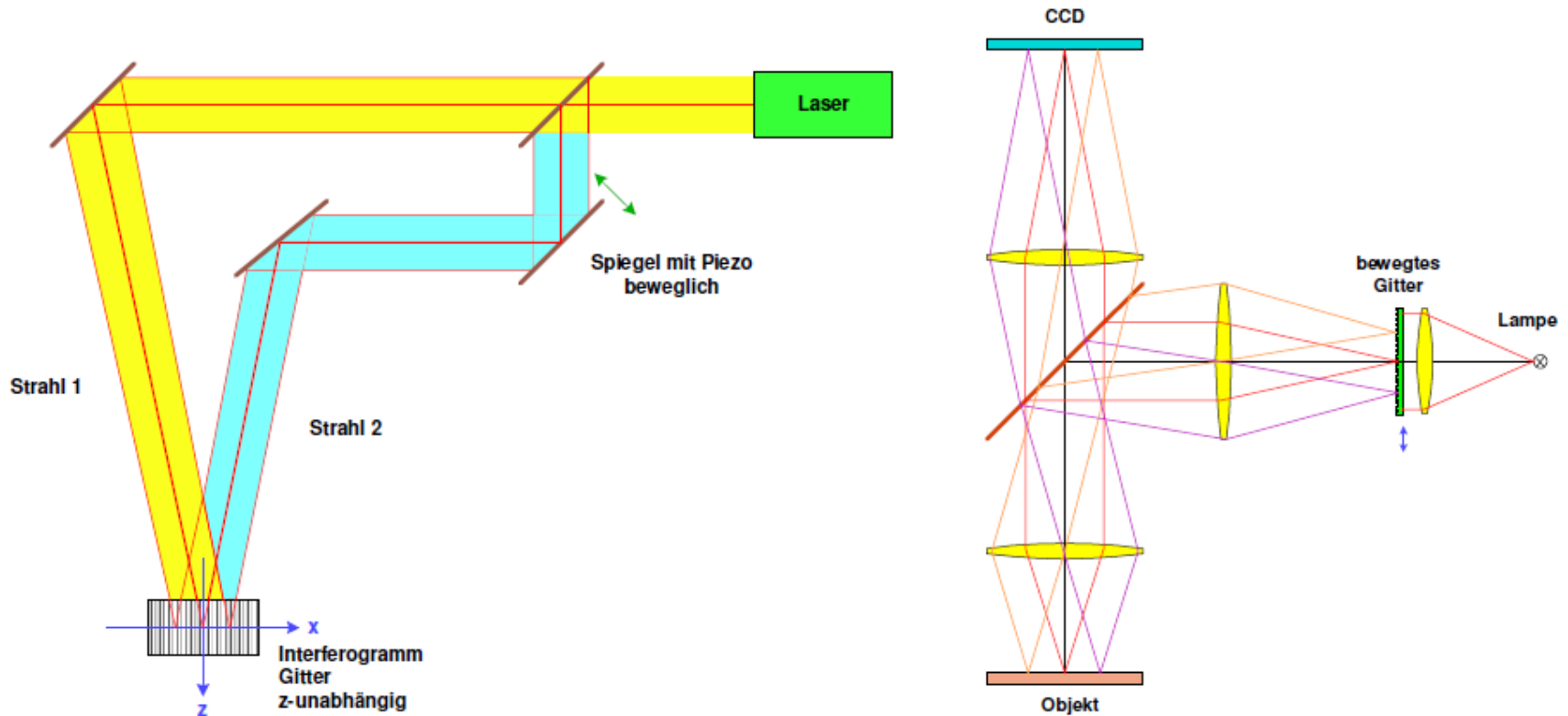
- SNOM :
Scannende Spitze über Probe
- Verschiedenste Anordnungen zwischen Beleuchtung und Beobachtung



SIM = Structured Illumination Microscopy

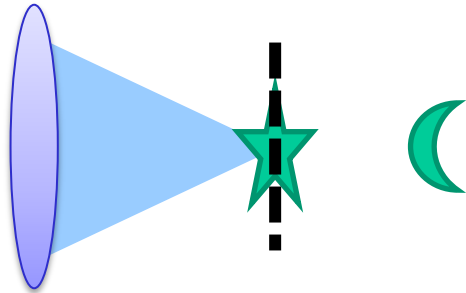
Grundprinzip: Projektion eines Gitters auf die Objektebene

- Variante 1 : Abbildung eines Gitters
- Variante 2 : Erzeugung eines Interferenzmusters im Objekt



SIM – Prinzip des Axial Sectioning

Bild **in der Fokusebene** des Gitters



Pos.1



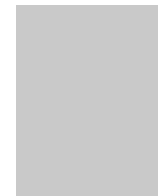
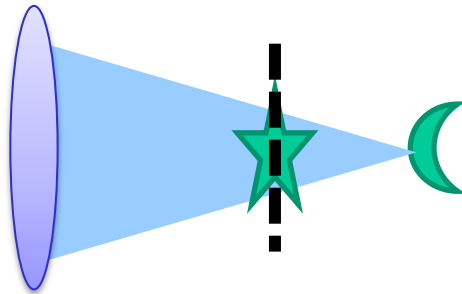
Pos.2



Differenz
+ Bildver.

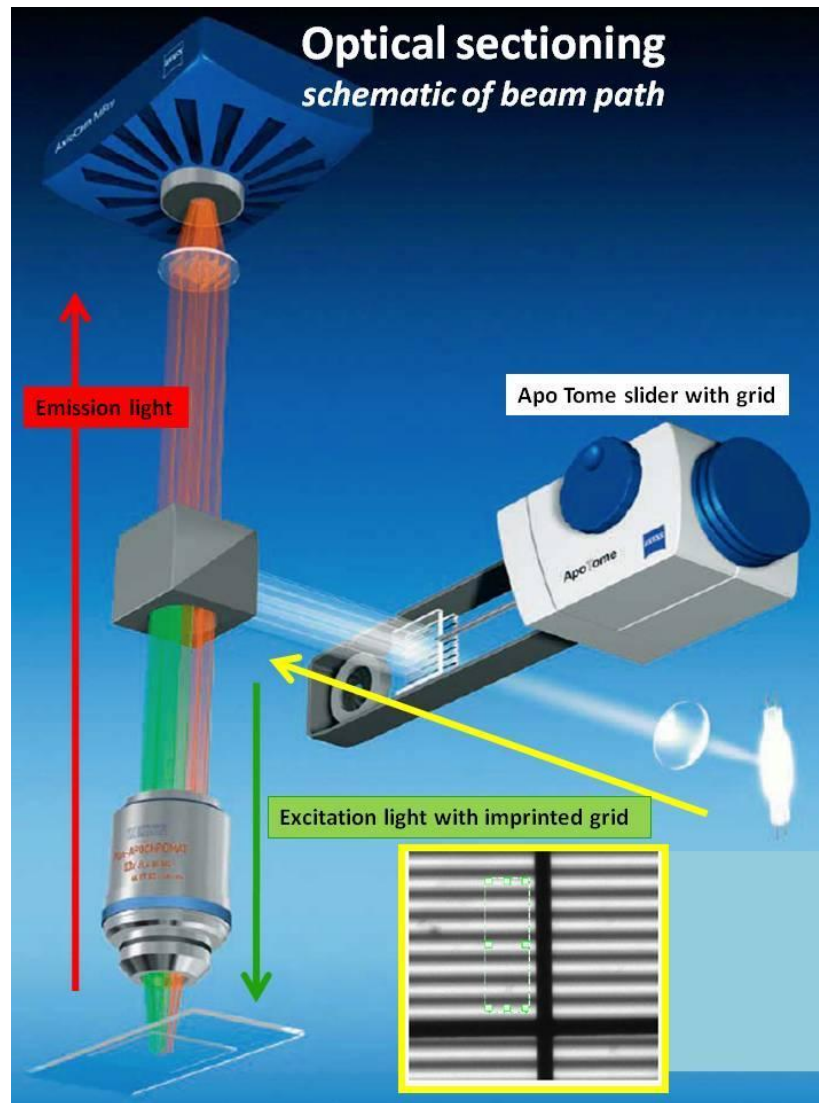


Defokussierte Ebene



- ➔ Durch Differenzbildung mehrerer Bilder bei Phasen-verschobenem Gitter bleibt nur das Bildsignal in der Fokusebene übrig ➔ „**synthetische Konfokalblende**“
- ➔ In der Praxis werden mindestens 3 Phasenlagen des Gitters verwendet

SIM – Axial Sectioning



Herstellerabhängig sind verschiedene Namen für SIM-System in Gebrauch:

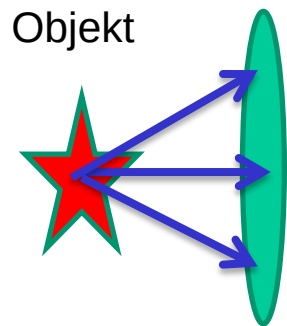
Hier:
Zeiss „Apo Tome“

Quelle: Zeiss

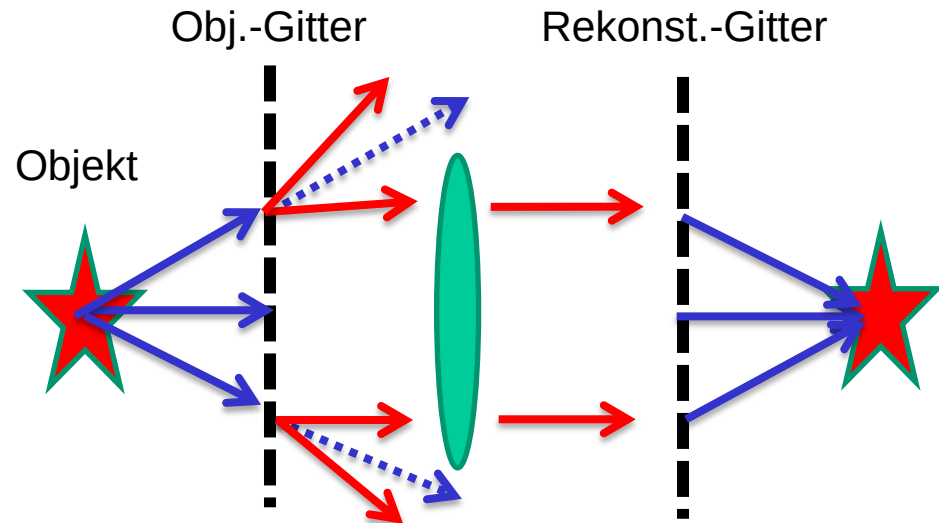
Die Projektion / Überlagerung von Gitterstrukturen mit dem Objekt kann auch zur Auflösungssteigerung benützt werden.

Prinzip = „Trägerbeugungsordnung“

→ Synthetische Apertur-Vergrößerung („Superresolution“)



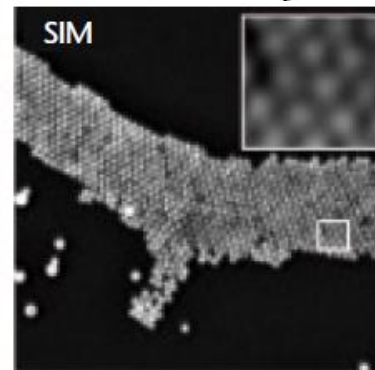
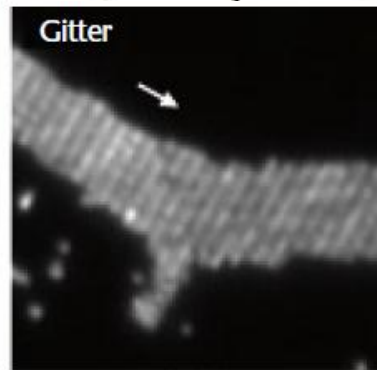
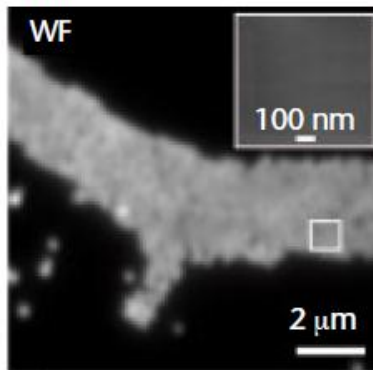
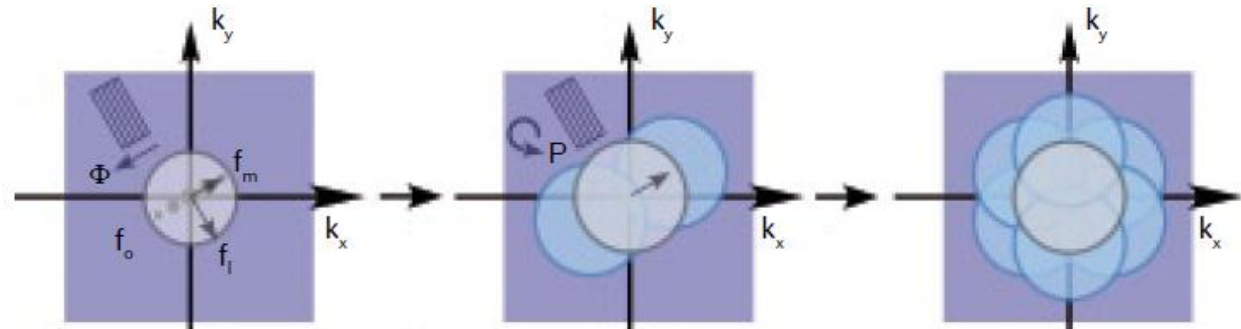
→ Beugungsordnungen
durch NA begrenzt



- Objekt-Beugungsordnungen werden durch Objekt-Gitter transformiert und deshalb durch das Objektiv transmittiert
- Verdopplung der NA
- Bild-Rekonstruktion mittels Gitter im Bild

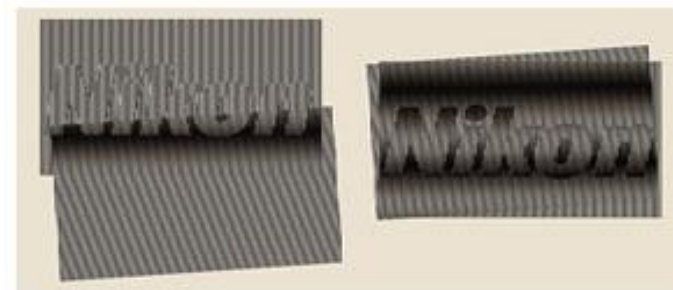
SIM – Auflösungssteigerung

→ Synthetische
Apertur-Vergrößerung
(„Superresolution“)



Weissart, et. al.
Photonik 45, 2010

→ Der Effekt ist verwandt zum **Moiré-Effekt**
(Überlagerung von hochfrequenten Gittern
zu niederfrequenten Differenzmodulation)

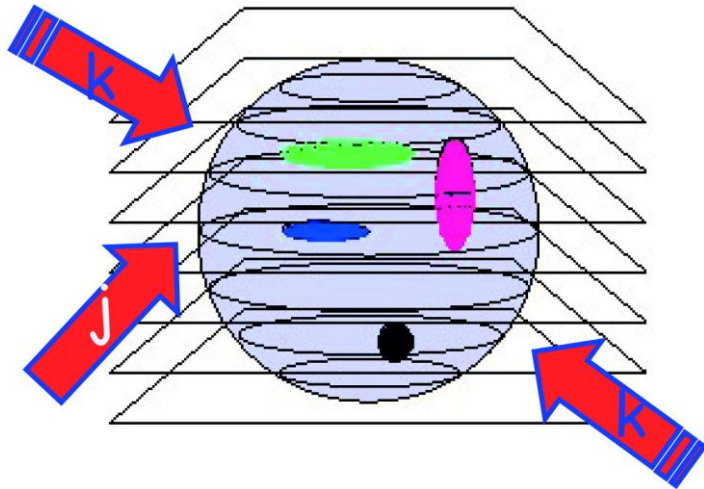


Irradiation of striped pattern illumination with known spatial frequency allows acquisition of information from a minute structure as moiré fringes.

Das Prinzip der Gitterprojektion kann auf 3-Dimensionen übertragen werden
D.h. Projektion eines Gitters aus verschiedenen Raumrichtungen

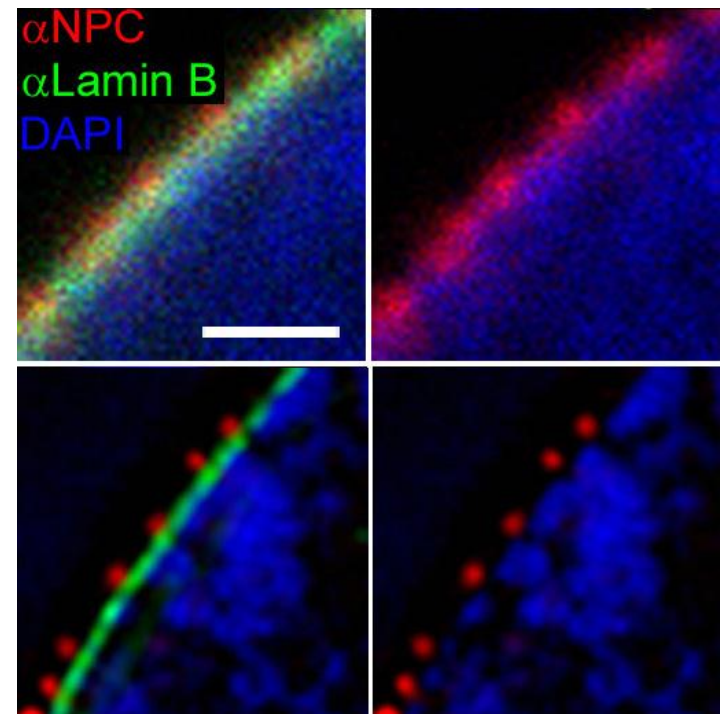
→ 3D-SIM

→ Auflösung im Bereich 50-100nm



<http://www.biomedical-engineering-online.com/content/5/1/36/figure/F2?highres=y>

Vergleich: Konfokal (oben) zu 3D-SIM (unten)



Wikimedia Commons: Lothar Schermelleh

Methode	Prinzip	Lat. Aufl.	Ax. Aufl.
Klassisch	Beugung	200nm	500nm
Konfokal	Beugung + Blende	160nm	400nm
SPIM	Beleuchtung	200nm	100nm
SNOM	Nahfeld + Scanning	30nm	30nm
TIR(F)	Beugung + Evanesz. Feld	200nm	<100nm
4Pi / I ⁵ M	Beugung + Interferenz	200nm	50-100nm
(3D)-SIM	Gitter + Bildverarbeitung	50nm	100nm