

## dCAM – Dreidimensionale konfokale Laser-Absorptionsmikroskopie zur räumlichen Strukturaufklärung

Rainer Bornemann, Universität Karlsruhe (TH)  
Erwin Thiel, ZEISS, Universität Siegen

**Die dreidimensionale Strukturaufklärung mikroskopischer Objekte mittels konfokaler Mikroskopie hat sich in den letzten Jahren als praktikables Verfahren weit verbreitet. Dabei muss normalerweise aber die zu untersuchende Probe mit fluoreszierenden Farbstoffen angefärbt werden, was in der Praxis von großem Nachteil sein kann. Ein neuartiges Verfahren bietet hier Alternativen.**

Im vorliegenden Artikel wird das 3D-Messprinzip "dCAM" vorgestellt (direct Confocal Absorption Microscopy), das die gleiche räumliche Auflösung wie die klassische konfokale Mikroskopie erzielt [1]. Auf das Anfärben mit unter Umständen toxischen Fluoreszenzmarkern kann dabei verzichtet werden. Als Messgröße wird primär die native Eigenabsorption bestimmter Bestandteile innerhalb der Probe genutzt.

### 1 Motivation

Viele Fragestellungen in der Medizin und der modernen Materialentwicklung lassen sich in Kenntnis des mikroskopischen Aufbaus von Testobjekten sehr einfach und elegant beantworten: Wie liegt das Objekt im Raum in Bezug zu anderen Objekten? Wie sind die Objekte untereinander verbunden? Wie ist der innere Aufbau der Objekte? Wie gleichmäßig ist die räumliche Verteilung verschiedener Materialkomponenten oder Zusatzstoffe? Dies sind nur ein paar wenige und sehr allgemein gehaltene Fragestellungen. Die Antworten auf solche Fragen sind aber in der Praxis wesentlich für die Erforschung umfassenderer Fragestellungen.

In den Lebenswissenschaften hat sich für die Aufklärung des inneren Aufbaus mikroskopischer Präparate die konfokale Laserscanning-Mikroskopie als adäquates Werkzeug etabliert. Dieses Verfahren beruht darauf, dass die Probe möglichst punktförmig beleuchtet bzw. mit Licht angeregt wird. Das als Antwort der Probe ausgesandte Licht wird mit einem Detektor aufgezeichnet, der sich hinter einer möglichst kleinen Lochblende befindet. Diese Lochblende wirkt dabei als effektiver Diskriminator für Licht, das nicht aus der unmittelbaren Umgebung

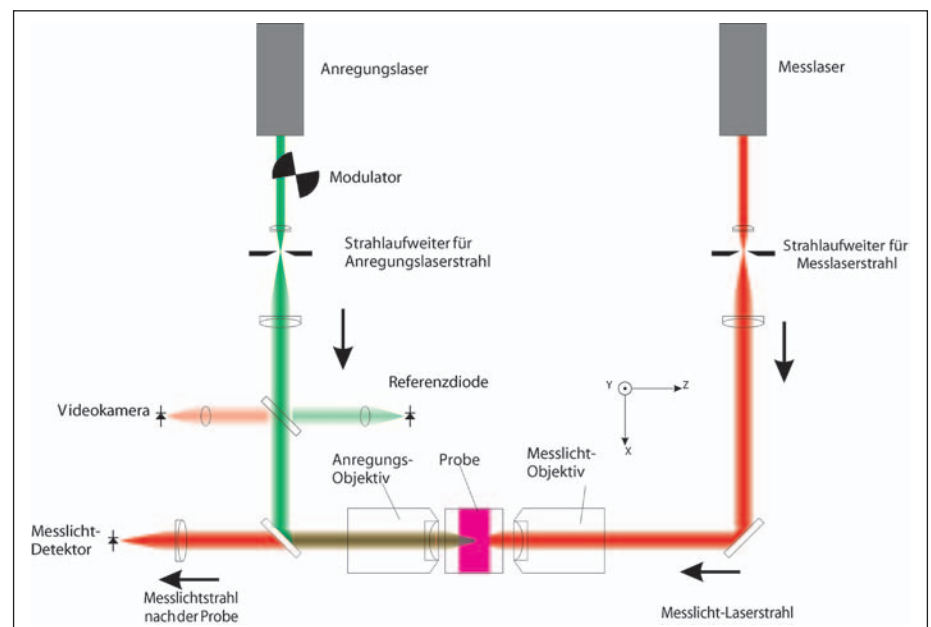
des angeregten Volumenelements in der Probe kommt. Auch Licht aus anderen Tiefenschichten der Probe wird sehr effektiv abgeschwächt und trägt somit zum Messsignal nur in geringem Maße bei.

Ein systemimmanentes Problem dieses Verfahrens ist jedoch, dass man zur Bildzeugung auf „selbstleuchtende“ Proben angewiesen ist, die durch Einwirkung des Anregungslichtes quasi selbst zur Lichtquelle werden - und zwar bei einer abweichenden Wellenlänge. Dies bedeutet wiederum, dass man die Probe oder ihre interessierenden Bestandteile in der Regel mit Fluoreszenzmarkern anfärben muss. Das schränkt die Anwendbarkeit des Verfahrens naturgemäß auf relativ wenige und gut untersuchte Systeme ein.

Im Folgenden soll nun ein Verfahren vorgestellt werden, das zur Signalgewinnung eine andere grundlegende Eigenschaft der Materie ausnutzt: Die Absorption bzw. genauer die reversible Änderung der Transmission nach einer Anregung.

### 2 Prinzip des Messverfahrens

Während eine ausgeprägte Fluoreszenzfähigkeit eine eher selten vorkommende Eigenschaft weniger ausgesuchter Substanzklassen ist und diese Fähigkeit zudem durch die unterschiedlichsten Einflüsse sehr leicht gestört werden kann, ist die Fähigkeit zur Absorption eine der Materie generell anhaftende Grundeigenschaft. Diese ist dabei oftmals hoch spezifisch für



**Bild 1:** Schematischer Aufbau des dCAM-Verfahrens



**Bild 2:** Fallunterscheidung: Fall A (links) Probe im Ausgangszustand, homogene Absorberverteilung ohne Anregungslaser und Fall B (rechts) Probe mit eingeschaltetem Anregungslaser, inhomogene Absorberverteilung durch induziertes Ausbleichen des Grundzustandes

individuelle Substanzklassen. Die Autoren nutzen für ihr Messverfahren den Umstand aus, dass sich die Absorptionseigenschaften jeglicher Materie durch geeignete Anregung reversibel verändern lässt.

Die Änderungen sind in den meisten Fällen sehr klein. In den letzten Jahren wurde aber eine effektive Messtechnik entwickelt, die derart schwache Signale noch sehr gut detektierbar macht, bis hin zum Nachweis einiger weniger Moleküle [2].

Die Änderung der Absorptionseigenschaften wird durch die Besetzung angeregter Energiezustände der Materie hervorgerufen. Die Besetzung dieser auch als transient bezeichneten Zustände zeigt sich dann oftmals in einem vollständig veränderten Absorptionsverhalten der Probe oder einzelner Probenbestandteile.

Beleuchtet man mit einem fokussierten Laserstrahl eine Probe, so induziert man in ihr eine zusätzliche inhomogene Verteilung dieser angeregten Zustände und damit auch der Absorption bzw. Transmission innerhalb der Gesamtprobe. **Bild 1** skizziert vereinfacht den Messaufbau, während eine mögliche Wirkung des Anregungslasers (hier ein Ausbleichen) auf die Probe in **Bild 2** schematisch dargestellt ist.

Diese induzierte Inhomogenität lässt sich sehr empfindlich mit einem zweiten Laser nachweisen, der ebenfalls auf den gleichen Ort innerhalb der Probe fokussiert ist. Dazu wird der Anregungslaser periodisch mit einer Modulationsfrequenz  $\omega_a$  ein- und ausgeschaltet. Diese Modulation des Anregungslasers wird durch die Absorptionsänderung der Probe auf den Messlaserstrahl übertragen. Dessen induzierte Intensitätsschwankungen können nun sehr empfindlich mit einem Lock-In-Verstärker nachgewiesen werden.

Die Amplitude der induzierten Änderung ist dann am größten, wenn sich eine möglichst hohe Absorberkonzentration („viele Absorbersonden“) am Ort der größten Lichtintensität befindet. Die Amplitude der induzierten Intensitätsschwankungen des Messlaserstrahls ist somit abhängig von der

Position und der lokalen Konzentration der Absorber im gemeinsamen Laserfokus. Bewegt man die Probe relativ zu diesem Fokus und zeichnet die Amplitude der induzierten Messlichtänderung für jeden Raumpunkt auf, so lässt sich daraus ein räumliches Abbild der Verteilung der Analysenden gewinnen.

### 3 Theoretische Beschreibung des dCAM-Verfahrens

Zur mathematischen Berechnung des Auflösungsvermögens ist es analog zu anderen mikroskopischen Verfahren möglich, eine sogenannte Punktverteilungsfunktion (Point Spread Function, PSF) anzugeben:

$$\frac{\Delta I}{I} = f_a(x, y, z) * f_m(x, y, z) * I_a * \sigma_{a,0} * \tau_{trans} * \Delta\sigma_{det} \quad (\text{Gl. 1})$$

Dabei bestimmt man die induzierte Transmissionsänderung  $\Delta I / I$  bei der Wellenlänge des Messlasers (also eigentlich genauer:  $\Delta I_m / I_m$ ) für einen quasi punktförmigen Absorber in Abhängigkeit von seinen Ortskoordinaten  $(x, y, z)$ . Die induzierte Transmissionsänderung ist abhängig von den lokalen Intensitäten der beiden Laserstrahlen (gegeben durch die räumlichen Intensitäts-Verteilungsfunktionen  $f_a$  für den Anregungs- und  $f_m$  für den Messlaserstrahl), außerdem von der Leistung  $I_a$  des Anregungslasers sowie den spektralen Eigenschaften  $\sigma_{a,0}$ ,  $\tau_{trans}$  und  $\Delta\sigma_{det}$  des Absorbers.

Die Größe  $\sigma_{a,0}$  bezeichnet den Absorptionsquerschnitt des Absorbers bei der Wellenlänge des Anregungslasers,  $\tau_{trans}$  die charakteristische Verweilzeit in transienten Energiezuständen des Absorbers und  $\Delta\sigma_{det}$  die Änderung des Absorptionsquerschnittes bei der Wellenlänge des Messlasers, hervorgerufen durch den Anregungsprozess.

Experimentell leicht zugänglich ist die Größe des Absorptionsquerschnittes  $\sigma_{a,0}$ . Dieser lässt sich direkt aus einem Absorptionsspektrum ablesen. Die Größe  $\Delta\sigma_{det}$  lässt sich aus spektral aufgelösten

Pump-Probe-Experimenten bestimmen. Die Größe  $\tau_{trans}$  ist ebenfalls mit diesem Messverfahren direkt und unabhängig von den anderen Größen bestimmbar, indem man die Amplitude der Größe  $\Delta I / I$  bei verschiedenen Modulationsfrequenzen  $\omega_a$  bestimmt. Kommt der Kehrwert dieser Modulationsfrequenz in die Größenordnung der Lebensdauer  $\tau_{trans}$ , so lassen sich Dämpfungseffekte beobachten, aus denen die Lebensdauer bestimmt werden kann.

Das räumliche Auflösungsvermögen ist nun alleine über die Intensitätsverteilungsfunktionen der beiden Laserfoki gegeben. Als Auflösung wird ein minimaler Abstand  $\Delta d$  bezeichnet, bei dem zwei punktförmige Objekte noch als räumlich getrennt zu sehen sind.

Für den Fall einer beugungsbegrenzten Fokussierung beider Laser und Verwendung von Mikroskopobjektiven mit einer moderaten Numerischen Apertur (NA) ergeben sich nach dem Rayleigh-Kriterium zwei Auflösungen, nämlich

$$\Delta d_{x/y} = \frac{0,61}{\sqrt{2}} * \frac{\lambda}{NA} \approx 0,43 * \frac{\lambda}{NA} \quad (\text{Gl. 2})$$

b) in axialer Richtung entlang der optischen Achse:

$$\Delta d_z = \frac{2}{\sqrt{2}} * \frac{\lambda * n}{NA^2} \approx 1,4 * \frac{\lambda * n}{NA^2} \quad (\text{Gl. 3})$$

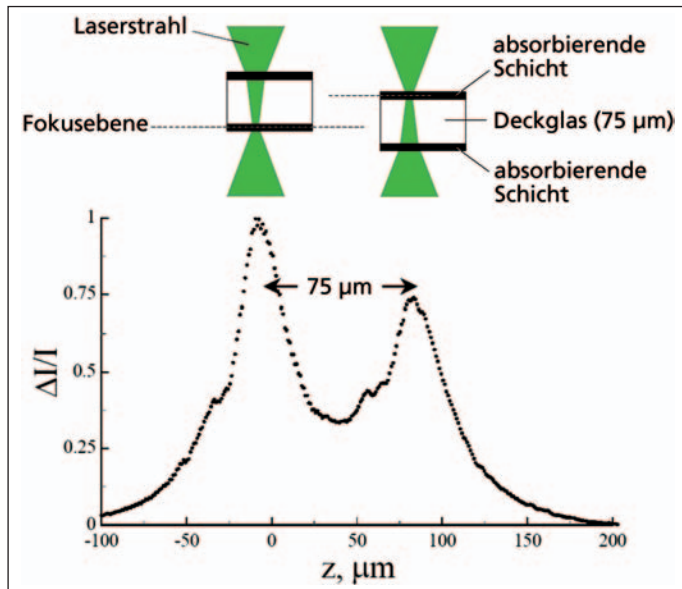
mit  $n$  = Brechungsindex am Ort des Fokus und  $\lambda$  = mittlere Wellenlänge der beiden Laser.

Folglich sind mit dem dCAM-Verfahren inhärent Auflösungen erzielbar, wie sie bei der klassischen konfokalen Mikroskopie nur als ideale Grenzaufösungen berechenbar sind. Dies rührt daher, dass vor dem Detektor keine intensitätsraubende Lochblende angebracht werden muss. Einzig die beugungsbegrenzte Fokussierung der Laser in der Probe und die konfokale Anordnung der beiden Laserfoki zueinander muss gewährleistet werden. Dies stellt aber in der modernen Optik kein grundlegendes Problem mehr dar.

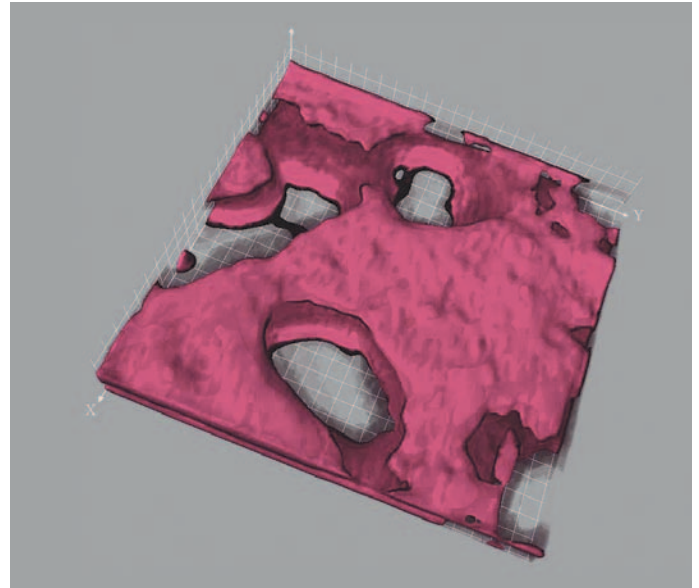
### 4 Aufbau und Signalverarbeitung

Da eine Absorptionsmessung immer auch eine Transmissionsmessung ist, muss das Licht, das durch die Probe hindurchgetreten ist, wieder aufgefangen werden. Hierfür wird eine zusätzliche Sammeloptik hinter der Probe angebracht – anders als bei konventionellen konfokalen Mikroskopen, die oft ähnlich wie Epifluoreszenzanordnungen aufgebaut sind.

Als Anregungslichtquelle dient ein Laser der Wellenlänge  $\lambda_a$ , der mit einer Frequenz  $\omega_a$



**Bild 3:** Test der axialen Auflösung mit Hilfe eines doppelseitig beschichteten Deckglases. Während diese „Probe“ axial durch den Laserfokus bewegt wird, registriert man die Intensitätsänderung



**Bild 4:** Dieses aus dCAM-Daten rekonstruierte 3D-Volumenbild zeigt eine dünne Tintentropfen-Schicht, die sich auf einer Folie niedergeschlagen hat und kaum eigene Fluoreszenz aufweist [3]

in seiner Amplitude moduliert wird. Als Messlichtquelle dient ein zweiter Laser, der im einfachsten Fall ein unmodulierter Dauerstrichlaser mit der Wellenlänge  $\lambda_m$  ist. Die Wellenlängen  $\lambda_a$  und  $\lambda_m$  sind so gewählt, dass mit  $\lambda_a$  eine effektive Anregung der Moleküle bzw. Absorbensenden aus dem Grundzustand erfolgt und dass sich bei der Wellenlänge  $\lambda_m$  eine möglichst starke Änderung zur Ausgangsabsorption ergibt. Diese Auswahlkriterien sind leicht zu erfüllen, wenn die Probe eine oder mehrere stark ausgeprägte Absorptionsbanden zeigt und die als Messsonden dienenden Moleküle eine lange durchschnittliche Lebensdauer  $\tau_{trans}$  in den angeregten Zuständen besitzen. Dies hat zur Folge, dass ein deutlich messbares „Ausbleichsignal“ der Probe im Wellenlängenbereich der Absorptionsbande entsteht. Meist kann dann eine leicht zu bestimmende intensive Absorptionsbande als Auswahlkriterium für die Laserwellenlängen herangezogen werden. Die Laserwellenlängen können zudem spektral sehr dicht beieinander liegen: Bei den weiter unten beschriebenen Demonstrationsmessungen liegen die beiden Laserwellenlängen nur 11,5 nm auseinander ( $\lambda_a = 532$  nm und  $\lambda_m = 543,5$  nm).

Um Fremdlicht vom Detektor fernzuhalten wird vor dem Detektor ein schmalbandiger Interferenzfilter angebracht. Besonders das Anregungslicht würde die Messung stören. Die zu verwendenden Filter mit einer Halbwertsbreite  $<1$  nm und einem Kontrast  $>10^6$  sind für fast alle gängigen Lasertypen leicht erhältlich.

Das Signal des Detektors (hier haben sich Halbleiterdetektoren als vorteilhaft erwie-

sen) wird mit einem Lock-In-Verstärker vorverarbeitet und einem Rechner zur Aufzeichnung übergeben. Dieses Signal-Analyse-Werkzeug bildet das Herzstück der dCAM-Signalfilterung: Lock-In-Verstärker sind in der Lage, sehr kleine periodische Signale aus sehr großen Hintergrundsignalen herauszufiltern und dabei noch sehr empfindlich die Amplitude und die Phasenlage zu einem Referenzsignal zu bestimmen.

Als Referenzsignal dient dabei die Modulation des Anregungslasers. Normiert man die Amplitude des vom Lock-In-Verstärkers herausgefilterten Wechselanteils im Messlicht auf eine durchschnittliche Gesamtintensität des Messlichtes, so erhält man die durch den Anregungslaser induzierte transiente Transmissionsänderung  $\Delta I / I$  bei der Verschiebeposition  $(X, Y, Z)$ .

Als Test der axialen Auflösung dieses Messaufbaus wurde ein handelsübliches Deckglas auf beiden Oberflächen mit jeweils einer dünnen absorbierenden Schicht beschichtet und das Signal aufgezeichnet, dass man beim Verfahren der Probe durch den Fokus erhält (**Bild 3**). Man sieht deutlich zwei Intensitätsmaxima, deren Abstand genau der Dicke des Deckglases entspricht. Die relativ geringe Flankensteilheit des Messsignals ergibt sich aus der Verwendung von Mikroskopobjektiven mit einer sehr kleinen numerischen Apertur von  $NA = 0,1$ .

Das Abbild einer komplexeren Probe setzt sich aus entsprechend vielen räumlich zueinander angeordneten einzelnen Punktabsobern zusammen. Eine Beispielmessung ist in **Bild 4** gezeigt. Bei dieser

Demonstrationsmessung an einer nicht fluoreszierenden Probe wurden Tröpfchen eines handelsüblichen Tintenstrahl-Druckers auf einer saugfähigen Folie aufgenommen. Die verwendeten magentafarbenen Tintentröpfchen, die sich auf der Folie niedergeschlagen haben, zeigen nur sehr geringe Eigenfluoreszenz und lassen sich in einem klassischen konfokalen Experiment fast nicht abbilden. Dies ist jedoch mit dem hier vorgestellten dCAM-Messaufbau sehr leicht und effektiv möglich.

Ein weiterer Vorteil des Verfahrens ist die fast vollkommene Unabhängigkeit von Umgebungslicht, das Messungen in der konventionellen konfokalen Mikroskopie massiv stört. Dies resultiert aus der Verwendung des schmalbandigen Interferenzfilters vor dem Detektor. Alle Messungen konnten unter normalen Raumlichtbedingungen durchgeführt werden, eine Abdunkelung des Raumes oder der Probe ist nicht erforderlich.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Das hier vorgestellte Verfahren zur dreidimensionalen Strukturaufklärung eröffnet viele neue Anwendungsbereiche. Überall dort, wo Untersuchungsobjekte nicht passend mit Fluoreszenzmarkern angefärbt werden können, ermöglicht dCAM einen mikroskopischen Einblick in den inneren Aufbau der Objekte.

Außerdem erhält man einen einfachen experimentellen Zugang zur Bestimmung der Lebensdauer angeregter Absorbensenden, insbesondere langlebiger Energiezustände der Absorbermoleküle. Als Ausblick



kann hierzu noch angefügt werden, dass grundsätzlich die Möglichkeit besteht, auch diese Lebensdauermessungen räumlich aufgelöst durchzuführen.

In Zukunft sollte es darüber hinaus möglich sein, weit mehr Farbkanäle unabhängig voneinander zu bestimmen, als dies mit konventionellen Fluoreszenz-Mikroskopen möglich ist. Bei den klassischen Verfahren ist das „Übersprechen“ der einzelnen Fluoreszenz-Signale in andere Detektionskanäle ein großes Problem, wenn es darum geht, mehrere Struktureinheiten unabhängig voneinander abzubilden. Beim dCAM-Verfahren lässt sich quasi jede zur Verfügung stehende Laserwellenlänge als unabhängiger Farbkanal codieren und damit als Informationsquelle nutzen.

## Literaturhinweise:

- [1] R. Bornemann, I. Gregor, E. Thiel, „*Konfokale 3D-Scanning Absorption*“, Deutsches Patent DE 10231543
- [2] R. Bornemann, E. Thiel, „*Single molecule level absorption spectroscopy in solution*“, in: J. Greve, G.J. Puppels and C. Otto (ed.), *Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions* (1999) 683
- [3] Bild 4 wurde erstellt mit der Software **Imaris**® der Firma Bitplane AG, Zürich, [www.bitplane.com](http://www.bitplane.com)

## Ansprechpartner:

Rainer Bornemann  
Lichttechnisches Institut  
AG Visuelle  
Informationstechnik  
und Optoelektronik  
Universität Karlsruhe (TH)  
Kaiserstraße 12  
D-76131 Karlsruhe  
Tel. 0721/608-2547  
Fax 0721/358149  
[rainer.bornemann@lti.uni-karlsruhe.de](mailto:rainer.bornemann@lti.uni-karlsruhe.de)  
Internet: [www.lti.uni-karlsruhe.de](http://www.lti.uni-karlsruhe.de)



PD Dr. Erwin Thiel  
NRW-Zentrum für  
Sensorsysteme (ZESS)  
Mikro- und nanoptische  
Sensorik  
Universität Siegen  
Paul-Bonatz-Str. 9-11  
D-57068 Siegen  
Tel. 0271/740-4478  
Fax 0271/740-2883  
eMail: [e.thiel@zess.uni-siegen.de](mailto:e.thiel@zess.uni-siegen.de)  
Internet: [www.zess.uni-siegen.de](http://www.zess.uni-siegen.de)



[www.photonik.de](http://www.photonik.de) ▶ Webcode 1025