

Lichtmicroscopie voorbij de diffractielimiet: op weg naar 100 nm resolutie

*Rob Hendriks,
Philips Natuurkundig Laboratorium
Prof. Holstlaan 4, 5656 AA Eindhoven*

Lichtmicroscopie is een oud vakgebied, waaraan in het verleden vanuit Nederland een belangrijke bijdrage is geleverd. Het was echter een Duitser (Ernst Abbe) die ruim een eeuw geleden de theoretische basis legde. Hij liet zien hoe diffractie van licht in het voorwerp en aan de objectieflens de resolutie van het beeld bepalen. Bovendien definieerde hij de eisen waaraan een lens moet voldoen om de optimale resolutie te behalen. Deze resolutie wordt de diffractielimiet genoemd, en hiervoor moet de lens vrij zijn van lensfouten zoals chromatische en spherische aberratie. Door Abbe's werk werd in een goede microscoop de resolutie puur bepaald door fysische parameters, zoals golflengte van het gebruikte licht, en de Numerieke Aperatuur van de lens.

Volgens Abbe's theorie is de minimale grootte van structuren die nog waarneembaar zijn met een microscoop evenredig met λ / NA_{obj} . Hier is λ de golflengte van het gebruikte licht, en NA_{obj} de Numerieke Aperatuur van het objectief. Beperkingen in de resolutie ontstaan doordat NA zelden groter is dan 1.4. Daarnaast is het zo dat de scherptediepte (de dikte van de laag waarin voorwerpen in focus zijn) snel afneemt bij toenemende NA. Voorwerpen die zich buiten de scherptediepte bevinden dragen niet bij aan de afbeelding, maar geven wel een vage achtergrond. Iedereen die wel eens een microscoop heeft scherpgesteld weet dat het voor de intensiteit van het signaal niet uitmaakt of het voorwerp

in- of uit-focus is: alleen de "scherpte" varieert. Het gegeven dat objecten buiten het focale vlak van de microscoop een bijdrage geven aan de achtergrond vormt een beperking bij bekijken van driedimensionale structuren. Uit-focus objecten kunnen zoveel licht genereren dat de in-focus structuur wordt overstraald.

In recente ontwikkelingen wordt geprobeerd de beperkingen van optische microscopie te verminderen. Aan de ene kant zijn er natuurlijk nabije veld technieken, waarbij geen gebruik meer wordt gemaakt van een objectieflens. Ook in de verre veld microscopie worden echter pogingen gedaan om Abbe's resolutielimiet te omzeilen. Voor nieuwe technieken is met een gegeven NA de resolutie beter dan de klassieke diffractielimiet, en is het bovendien mogelijk om "optische doorsnijdingen" te maken. Dit wil zeggen dat het mogelijk is een vlak uit een object scherp af te beelden, terwijl het licht dat niet uit het focale vlak komt sterk wordt verzwakt. De bekendste, en meest ontwikkelde, van deze nieuwe technieken is de confocale microscopie. Op dit principe gebaseerde microscopen zijn inmiddels gemeengoed in biologische laboratoria. Een ander nieuw principe is multi-foton microscopie. Ook deze microscopen zijn tegenwoordig commercieel verkrijgbaar. Naast deze, inmiddels geaccepteerde, technieken zijn er ontwikkelingen die op dit moment in laboratoria gerealiseerd worden. In de rest van dit artikel worden eerst de principes achter

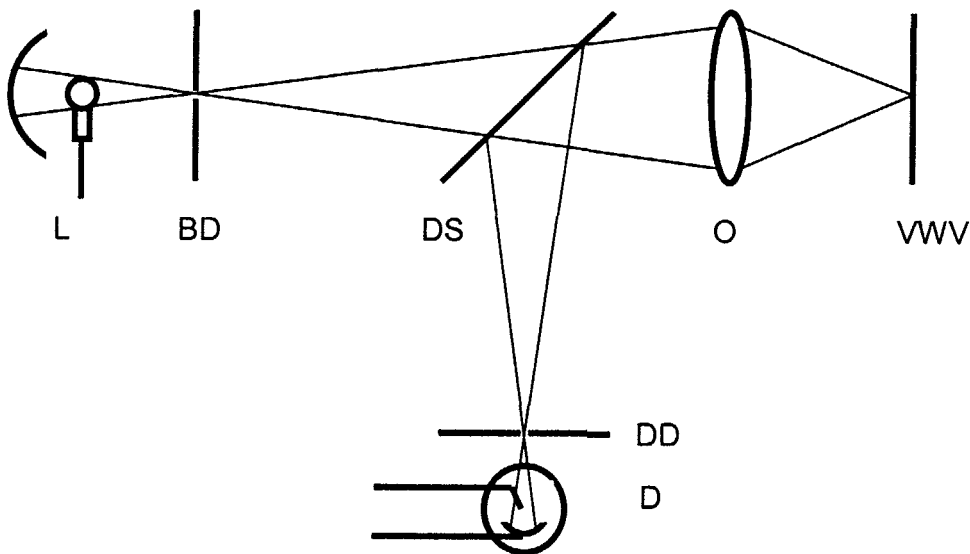
confocale en multi-foton microscopie besproken, waarna twee meer recente ontwikkelingen worden uitgelicht, 4π -microscopie en STED-microscopie.

Confocale microscopie

De confocale microscop is eind jaren '50 uitgevonden door Marvin Minsky van Harvard [Minsky 1975]. De voordelen van een confocale microscop zijn de verbeterde resolutie, en de mogelijkheid tot het maken van "optische doorsnijdingen". De prijs die betaald wordt voor deze voordelen is de toegenomen complexiteit. Tegenwoordig is een confocale microscop een standaard hulpmiddel voor met name biologen. Het optisch principe van een confocale microscop is echter veel wijder verbreid. Het optisch deel van elke Cd-speler is feitelijk een confocale microscop die een "afbeelding" maakt van een CD. De elektronica die dit "beeld" interpreteert en om-

vormt tot muziek is natuurlijk specifiek voor een Cd-speler.

In Fig. 1 wordt schematisch het principe achter de confocale microscop uitgelegd. Essentieel is dat een puntbron wordt afgebeeld op een punt in het voorwerp, en dat dit punt weer wordt afgebeeld op een punt-detector: de puntbron, het voorwerp en de puntdetector zijn ten opzichte van elkaar confocaal gepositioneerd. De verhoogde resolutie ontstaat doordat de hoge NA van het objectief tweemaal gebruikt wordt in het afbeeldingsproces, éénmaal om de bron af te beelden, en éénmaal om op de detector af te beelden¹. Licht dat door fluorescentie ontstaat buiten het voorwerpsvlak wordt niet perfect afgebeeld op de puntdetector, en wordt daarom veel minder efficiënt gedetecteerd. De diepte waarbinnen nog scherp wordt afgebeeld op de detector is gelijk aan de diepte waar-



Figuur 1:

Schema van een confocal microscop: L = Lichtbron, BD = Brondiafragma (effectieve puntbron), DS = Dichroische spiegel (scheidt excitatie van fluorescentie), O = Objectief, VWV = Voorwerpsvlak, DD = Detectordiafragma (effectieve puntdetector), D = Detector [Minsky 1975].

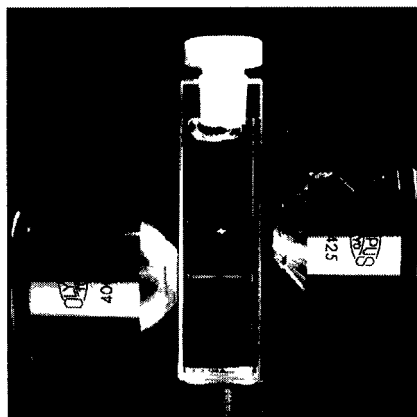
binnen bij conventionele microscopie een scherpe afbeelding wordt gemaakt. Objecten die zich buiten deze scherptediepte bevinden zullen niet bijdragen aan de achtergrond en kunnen de scherp af te beelden structuur dus niet overstralen. Een confocale microscoop is uitermate geschikt voor het maken van optische doorsnijdingen.

In het schema van Fig. 1 wordt een "afbeelding" gemaakt van een enkel punt. Om een voorwerp volledig af te beelden moet dit gescand worden. In het oorspronkelijke patent van Minsky gebeurt dit door het voorwerp te bewegen ten opzichte van de microscoop (zoals dit nu nog gebeurt in de Cd-speler, waar de disk onder de lichtspot door beweegt). Tegenwoordig is het gebruikelijk om met behulp van spiegels de lichtspot over het voorwerp te bewegen. In tegenstelling tot conventionele microscopie, waar de beeldpunten parallel worden opgenomen, worden bij een confocale microscoop de punten sequentieel gescand. Het opgenomen beeld wordt achteraf door een computer zichtbaar gemaakt. De complexiteit van een confocale microscoop ontstaat uit de noodzaak om de lichtspot ten opzichte van het voorwerp te scannen, en uit de bewerkingen die nodig zijn om het beeld te visualiseren. Bij deze stappen is elektronica (meestal in de vorm van een PC) onmisbaar. Een ander punt is dat de helderheid van de lichtbron bij een confocale microscoop een veel grotere rol speelt dan in conventionele microscopie. De opmars van confocale microscopie kan dan ook niet los worden gezien van de ontwikkeling van de laser die als heldere lichtbron gebruikt wordt.

Multi-foton microscopie

De speciale eigenschappen van een confocale microscoop ontstaan doordat een ruimtelijk filter (de puntdetector) al het licht onderdrukt dat ontstaat buiten het confocale punt in het voorwerp. Een alternatieve benadering is om alleen licht te genereren in dit confocale punt. Dit is de benadering

die gekozen wordt bij multi-foton microscopie [Denk 1990].



Figuur 2:

Vanuit het linker objectief wordt de fluorescerende vloeistof aangestraald met groen licht, dat via de gebruikelijke één-foton absorptie fluorescentie kan aanslaan. Door het rechter objectief komt infra-rood licht, dat alleen door multi-foton absorptie fluorescentie kan veroorzaken. Het is duidelijk te zien dat één-foton fluorescentie overal in de bundel plaatsvindt, terwijl multi-foton fluorescentie alleen in het focus van de excitatie bundel zichtbaar is.

Het standaard beeld bij fluorescentie is dat een molecuul één foton absorbeert, en na interne relaxatie één foton uitzendt. Bij multi-foton fluorescentie wordt het molecuul geëxciteerd door simultane absorptie van twee of meer fotonen. In een concreet voorbeeld zou een molecuul twee fotonen bij ongeveer 800 nm kunnen absorberen in plaats van één foton bij 400 nm. De efficiëntie van multi-foton absorptie hangt af van de fotondichtheid, en daarmee van de lichtintensiteit. Om voldoende fluorescentie te genereren wordt in multi-foton microscopie meestal gebruik gemaakt van gepulste lasers. De gebruikte pulslengte varieert van minder dan 100 femtoseconde tot enkele picoseconden. Door de hoge piekintensiteit van gepulste lasers is de efficiëntie van de excitatie veel hoger.

Het basisprincipe achter multi-foton microscopie is gebaseerd op de niet-lineaire relatie tussen de excitatie-intensiteit en de hoeveelheid fluorescentie die gegenereerd wordt. Bij twee-foton fluorescentie schaalt de fluorescentie intensiteit bijvoorbeeld kwadratisch met de excitatie. Omdat de lichtintensiteit het hoogst is in het focus van een bundel, zal multi-foton fluorescentie dus met name daar plaatsvinden. Dit effect, geïllustreerd in Figuur 2, leidt automatisch tot het maken van optische doorsnijdingen. Om in te zien dat de niet-lineariteit ook een resolutie verbetering tot gevolg heeft kan worden opgemerkt dat de efficiëntie waarmee fluorescentie aangeslagen wordt aan de rand van de excitatie-spot lager is dan in het centrum (aan de rand is de intensiteit immers lager). De "breedte op halve intensiteit" van de spot waaruit fluorescentie ontstaat zal daarom kleiner zijn dan de "breedte op halve intensiteit" van de excitatie-spot, hetgeen direct leidt tot een hogere resolutie.

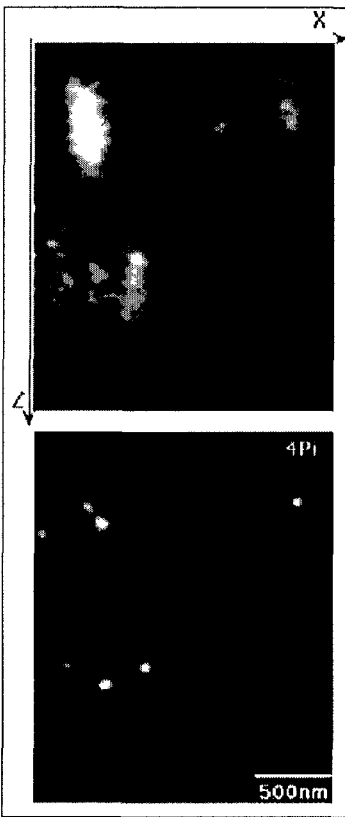
De optische eigenschappen van een multi-foton microscoop zijn vergelijkbaar met die van een confocale microscoop: verhoogde resolutie en de mogelijkheid tot het maken van optische doorsnijdingen. De voordelen van multi-foton microscopie zijn dat er gebruik kan worden gemaakt van langere golflengtes voor de excitatie en dat de fluorescentie in een beperkt volume wordt gegenereerd. De langere golflengte is een voordeel omdat deze minder last heeft van verstrooiingen en absorptie dan kortere golflengtes, hetgeen betekent dat de penetratiediepte groter is. Omdat absorptie in principe kan leiden tot fotoschade (bijvoorbeeld een fotochemische reactie) is het met name in levend biologisch materiaal van belang om het gebied waarin licht-absorptie plaatsvindt zoveel mogelijk te beperken. Bij multi-foton microscopie wordt alleen fluorescentie gegenereerd in focus van de excitatiebundel, het volume waarbinnen schade kan optreden is dus tot een minimum beperkt

Een multi-foton microscoop is bij uitstek geschikt om afbeeldingen te maken van levend materiaal, zoals bijvoorbeeld cellen. Voor deze toepassing hebben verschillende fabrikanten modellen op de markt. Vaak is de multi-foton optie nog een "add-on" bij een confocale microscoop. In technische uitvoering is het belangrijkste verschil tussen confocale en multi-foton microscopie dat bij de laatste vaak een gepulste laser als lichtbron nodig is. Aan de detectie zijde is een multi-foton microscoop weer eenvoudiger, omdat er geen afbeelding hoeft te worden gemaakt op een punt-detector. Alle fluorescentie kan worden gedetecteerd om dat het intrinsiek duidelijk is dat deze is ontstaan in het focus van de laserbundel.

4 π -microscopie

Een nadeel van zowel confocale als ook multi-foton microscopie is dat de resolutie in de axiale richting slechter is dan in de laterale richting. Het spotje waarin bij twee-foton microscopie fluorescentie wordt opgewekt is sigaarvormig. Dit probleem kan worden aangepakt door de NA van de objectief-lens te verhogen. Gegeven het feit dat hoge NA objectieven nu al ongeveer 30% van de totale ruimtehoek afdekken loopt deze benadering tegen technische en fysieke grenzen aan. De oplossing kan worden gezocht in het gebruik van meerdere objectieven die coaxiaal tegenover elkaar geplaatst zijn. Dit vergroot de effectieve NA voor de axiale richting. Doordat nu licht over bijna de volledige ruimtehoek wordt ingevangen draagt deze methode de naam 4 π -microscopie [Hell 1992].

Wanneer het sample van twee kanten coherent belicht wordt ontstaat een staande golf tussen de objectieven. De lengte van het centrale maximum van deze staande golf is gelijk aan de helft van de gebruikte golflengte, wat veel kleiner is dan de axiale lengte van de focale spot van een enkel objectief. Omdat de staande golf niet bestaat uit slechts een centraal maximum,



Figuur 3:

Groepjes van 110 nm grote fluorescente bolletjes opgenomen met een twee-foton microscoop (boven) en een 4π -microscoop (onder). Uit de vergelijking blijkt een fundamentele toename van de drie-dimensionale resolutie tot ongeveer 100 nm in alle dimensies (afbeelding S.W. Hell [Hell 2000]).

maar ook nog verschillende secundaire maxima, is het focale volume groter dan alleen de centrale spot. Het interferentie-effect reduceert het focale volume met een factor 2 ten opzichte van confocale of twee-foton microscopie. Uit symmetrie overwegingen is te zien dat hetzelfde effect wordt bereikt wanneer de detectie coherent plaatsvindt door beide objectieven. In verschillende experimenten die zijn uitgevoerd wordt het 4π -principe toegepast op

de excitatie, de detectie of op beide tegelijkertijd.

Wanneer een beeld wordt opgenomen veroorzaken de secundaire maxima artefacten in het beeld. Deze kunnen worden weggelaten door eenvoudige beeldbewerking, waarna de resolutie bepaald wordt door de grootte van de centrale lichtspot. Op deze wijze kunnen afbeeldingen worden gemaakt met resolutie van 100 tot 150 nm in alle drie dimensies (zie Fig. 3). Door gebruik te maken van gedetailleerde kennis over de lichtverdeling in het focale punt kan met behulp van beeldreconstructie-algoritmes de resolutie nog verder verbeterd worden tot beneden 100 nm.

STED-microscopie

Het principe achter multi-foton microscopie berust op het feit dat er een niet-lineaire relatie is tussen de aangeboden excitatie-intensiteit, en de hoeveelheid uitgezonden fluorescentie. Deze niet-lineariteit leidt tot zowel de verhoogde resolutie als ook tot het maken van optische doorsnijdingen. In "Simulated Emission Depletion Microscopy" (STED-microscopie) worden niet-lineaire effecten nog verder uitgebuit om de resolutie te verbeteren [Klar 2000].

Bij STED wordt door een excitatiepuls eerst fluorescentie aangeslagen, vervolgens wordt aan rand van het excitatie-spotje fluorescentie letterlijk uitgedoofd door een depletiepuls. De eigenschappen van deze puls zijn zodanig dat ter plekke van de puls gestimuleerde emissie plaatsvindt en fluorescentie wordt onderdrukt. Spectraal gezien bevindt de depletiepuls zich aan de rode kant van het emissie spectrum, zodat deze het fluorofoor niet meer kan exciteren. De fluorescentie die wordt gebruikt om een afbeelding te maken wordt gemeten ná de depletiepuls, en ontstaat alleen op plekken waar geen uitdoving heeft plaatsgevonden. De relatie tussen de intensiteit van de depletiepuls en de mate van uitdoving is in hoge mate niet-lineair. Je zou kunnen zeggen dat wanneer

de depletie-intensiteit boven een zekere drempelwaarde uitkomt de fluorescentie volledig wordt uitgedoofd, terwijl voor lagere intensiteit de fluorescentie vrijwel intact blijft. Na de depletiepuls kan er dus alleen nog fluorescentie ontstaan in gebieden waar de intensiteit van de depletiepuls beneden deze drempelwaarde lag. Door nu het depletiespotje een speciale vorm te geven, bijvoorbeeld een "doughnut" vorm (ring van licht met donkere spot in het midden) kan fluorescentie aan de rand van de excitatiespot worden onderdrukt. Door de intensiteit van de depletiepuls te verhogen wordt het centrale gebiedje waarbinnen de intensiteit beneden de drempelwaarde was (en dus het gebied dat nog fluoresceert) steeds kleiner.

In experimenten is de grootte van het spotje dat nog fluoresceerde beperkt tot 100 nm in drie dimensies. De technische complexiteit van de opstelling zit in het feit dat twee pulsen (de excitatie- en de depletiepuls) synchroon moeten worden aangeboden. Bovendien moeten beide bundels in de microscoop op hetzelfde punt gefocuseerd worden. Voordelen ten opzichte van bijvoorbeeld 4π -microscopie zijn dat het object maar van één kant optisch toegankelijk hoeft te zijn. In de praktijk speelt een belangrijke rol dat voor succesvol toepassen van de techniek kennis nodig is over processen die zich afspelen in het fluorofoor dat wordt afgebeeld. Wanneer parameters zoals pulslengte en spectrum niet goed zijn, kan de depletiepuls zelf fluorescentie aanslaan, hetgeen de resolutie verslechtert in plaats van verbetert.

Uit de hier geschetste ontwikkelingen kan worden geconcludeerd dat Abbe's diffractie limiet bij lange na niet de uiteindelijke resolutielimiet voor verre veld microscopie is. De resolutiewinst komt voort uit ofwel een verhoging van de effectieve numerieke apertuur (confocale en 4π -microscopie), ofwel het gebruik van niet-lineaire optische effecten (twee-foton en STED-microscopie). Voor alle benaderingen geldt dat de recente vooruitgang mogelijk wordt gemaakt door enerzijds het beschikbaar komen van geavanceerde lasers als lichtbronnen, en anderzijds door het beschikbaar komen van rekenkracht in de vorm van moderne PC's.

Referenties

- [Denk 1990] "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy", Denk, J. Strickler, W.W. Webb, *Science*, April 1990, pp. 73-76.
- [Hell 1992] "Properties of a 4π -confocal microscope", S.W. Hell, E.H.K. Stelzer, *J. Opt. Soc. Am. A* 9, 2159 (1992).
- [Hell 2000] <http://www.mpibpc.gwdg.de/inform/25years/Hell.html>
- [Klar 2000] "Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission", T.A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, S.W. Hell, *PNAS* vol. 97(15), pp. 8206-8210 (2000).
- [Minsky 1975] U.S. Patent # 3013467, Microscopy apparatus
- [Pawley 1995] "Handbook of biological confocal microscopy", J.B. Pawley, Plenum Press (1995).