

Optische Mikroskopie im Sub-Wellenlängenbereich

Es gibt viele Fragenstellungen in Biologie und Medizin in denen mikroskopische Bilder von strukturellen Details auf einer Längenskala benötigt werden, die weit unter der Wellenlänge λ des zur Beobachtung eingesetzten sichtbaren Lichtes ($\lambda \approx 0.5 \mu\text{m}$) liegt. Wie hier optische Mikroskopie eingesetzt werden kann soll im Folgenden diskutiert werden.

Von der Behandlung der Auflösung eines Mikroskops nach Helmholtz wissen wir, dass zwei leuchtende kleine Objektpunkte gerade dann noch klar getrennt nachgewiesen werden können, wenn deren Abstand d ausreichend groß ist und der folgenden Bedingung genügt (siehe im Buch Kap. 4.5.1).

$$(1) \quad d \geq 0,61 \frac{\lambda}{A_{\text{num}}} = 1,22 \frac{\lambda \cdot f}{n \cdot D}$$

A_{num} ist dabei die Numerische Apertur des Objektivs. A_{num} ist praktisch immer kleiner als 1,5. Bedingung Gl. (1) wurde aus der Tatsache abgeleitet, dass die beiden Objektpunkte nur dann getrennt beobachtbar sind, wenn sich deren Bilder (Beugungsscheibchen) nach Abbildung durch die Objektivlinse (Brennweite f) und Beugung an deren Umrandung (Durchmesser D) um mehr als den Beugungsscheibchendurchmesser (volle Halbwertsbreite, FWHM) unterscheiden. Die Objektpunkte liegen dabei in einem Medium mit Brechungsindex n (wir verwenden hier im folgenden immer $n = 1$). Während das Auflösungsvermögen nach Helmholtz die Unterscheidbarkeit zweier Punktlichtquellen beinhaltet, behandelt das Auflösungsvermögen nach Abbe die Sichtbarkeit von räumlichen Strukturen eines Objektes. Beide Kriterien liefern Auflösungsvermögen im Bereich einer halben Wellenlänge für die klar definierten Rahmenbedingungen. Sie schließen jedoch nicht aus, dass man unter anderen experimentellen Bedingungen und bei anderer Definition des Auflösungsvermögens wesentlich kleinere strukturelle Details mit sichtbarem Licht beobachten kann.

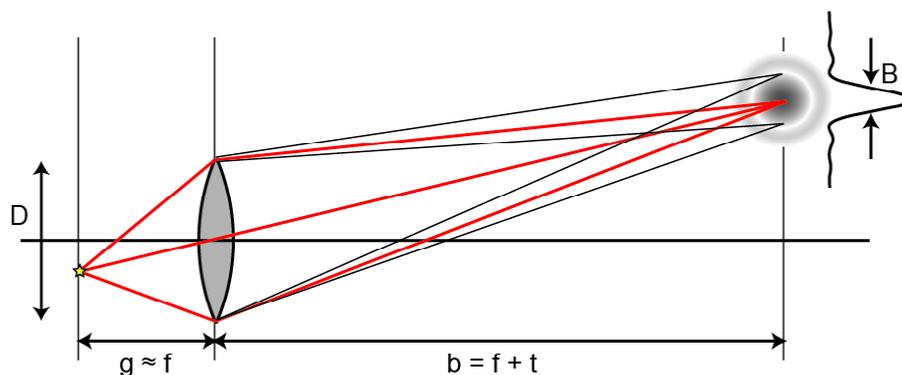


Abb. 1: Abbildung eines Objektpunktes in die Zwischenbildebene. Durch Beugung an der Umrandung des Objektivs entsteht ein Beugungsscheibchen mit Durchmesser B .

In einem ersten Beispiel wollen wir den Fall behandeln, dass in dem zu beobachteten Volumen nur eine einzelne Punktlichtquelle vorhanden ist, deren Position mit höchster Präzision bestimmt werden soll. Dies kann zum Beispiel dadurch realisiert werden, dass man einzelne Moleküle in sehr kleiner Konzentration in der Probe verteilt hat, die bei Beleuchtung Fluoreszenzlicht emittieren und deren Beugungsscheibchen nicht überlappen. Die Abbildung einer Punktlichtquelle durch das Objektiv führt – aufgrund der Beugung an der

Objektivumrandung – zu einem Beugungsbild in der Zwischenbildebene, dessen Durchmesser B (FWHM) mit dem kleinsten auflösbaren Abstand d über die Vergrößerung des Objektivs V_{obj} verknüpft ist:

$$(2) \quad B = 1,22 \frac{\lambda}{D} b \approx 1,22 \frac{\lambda}{D} V_{obj} f = V_{obj} d$$

Für einen Gegenstandspunkt in der Gegenstandsebene am Ort (x, y) wird dieses Beugungsbild in der Zwischenbildebene an der Position $(X, Y) = (V_{obj} \cdot x, V_{obj} \cdot y)$ positioniert sein. Registriert man nun das Beugungsbild, d. h. dessen Intensitätsverteilung in der X-, Y-Ebene mit hoher Präzision, so kann man den Ort des Maximums des Beugungsbildes wesentlich genauer bestimmen, als es der Halbwertsbreite B des Beugungsbildes entspricht. Für ausreichend rauscharme Messungen kann man dabei Verbesserungen von mehr als 100-fach erreichen. Als Konsequenz ist die Lage des Objektpunktes wesentlich genauer bestimmt als es dem Auflösungsvermögen d nach Helmholtz (siehe Gl. (1)) entspricht. Die Zusatzinformation – es gibt nur ein punktförmiges Objekt im beobachteten Bereich – erlaubt es dessen Lage sehr genau festzulegen. Eine Kontrolle, dass das beobachtete Objekt in der Tat nur ein einzelnes sehr kleines Objekt ist, lässt sich durch Vergleich der beobachteten Beugungsfigur mit dem theoretischen Beugungsbild eines Punktobjektes erhalten.

In der Praxis kann mit dem hier vorgestellten Verfahren der Ort eines einzelnen leuchtenden Objektes mit höchster Präzision bestimmt werden. Wiederholt man diese Einzelmessungen, so kann man auch die Bewegung des Objektes verfolgen. In biologischen Anwendungen sind die leuchtenden Objekte sehr kleine Bausteine (Proteine, Makromoleküle) die mit fluoreszierenden Farbstoffmolekülen markiert sind und mit Licht passender Wellenlänge zum Leuchten angeregt werden. Mit dieser Methode ist es mit markierten (künstlichen) Viren möglich, deren Bahn beim Eindringen in Zellen mit einer Präzision weit unter 500 nm zu verfolgen. Ebenso kann man mit dieser Technik den aktiven Transport von Fluoreszenzmarkierten Proteinen in Bakterienzellen beobachten.

In den letzten Jahren wurden weitere Methoden für Mikroskopie mit erhöhter Auflösung entwickelt. Zum einen handelt es sich dabei um Methoden, die in der einen oder anderen Form die Bildgebung auf die Beobachtung einzelner leuchtender Systeme mit sehr kleinem Durchmesser zurückführen (z.B. PALM = photo-activated localization microscopy, STORM = stochastic optical reconstruction microscopy) oder um Methoden, bei denen optische Nichtlinearitäten zur Verschärfung der Beugungsfiguren eingesetzt werden. Das hier zugrunde liegende Prinzip soll kurz besprochen werden. In Kapitel 4.7 des Buches wurde gezeigt, dass die dielektrische Polarisierung nicht nur linear vom elektrischen Feld abhängig ist, sondern dass (vor allem bei hohen Lichtintensitäten) die Polarisierung von höheren Potenzen des elektrischen Feldes abhängen kann. Analog gibt es auch bei Lichtabsorption nichtlineare Vorgänge (z. B. Mehrquantenabsorption), bei denen die Anregung der Proben von höheren Potenzen der Lichtintensität abhängig ist. Ebenso kann eine ausgeprägte Nichtlinearität auch beim Ausbleichen der Absorption aufgrund intensiver Lichteinstrahlung (siehe Kapitel 5.2.8) oder stimulierter Emission erreicht werden. Verwendet man nun zur Beleuchtung der Probe diese nichtlinearen Effekte, so kann eine erhebliche Verkleinerung des Anregungsbereichs verglichen zum klassischen Beugungsscheibchen erreicht werden. In Bild 2a ist dies durch den Vergleich eines Beugungsprofils für die Anregung von 1-Photonen (normale Absorption), 2 und 6 Photonenprozessen gezeigt. Eine Verschärfung tritt nicht nur in der Nähe eines Maximums der Beleuchtungsintensität auf, sondern kann auch (bei geeigneter Nichtlinearität) in der Nähe von Nullstellen (z. B. bei einem Laser mit höheren

Moden) erreicht werden. Dies wird im Rahmen der STED-Mikroskopie (STED = stimulated emission depletion) eingesetzt.

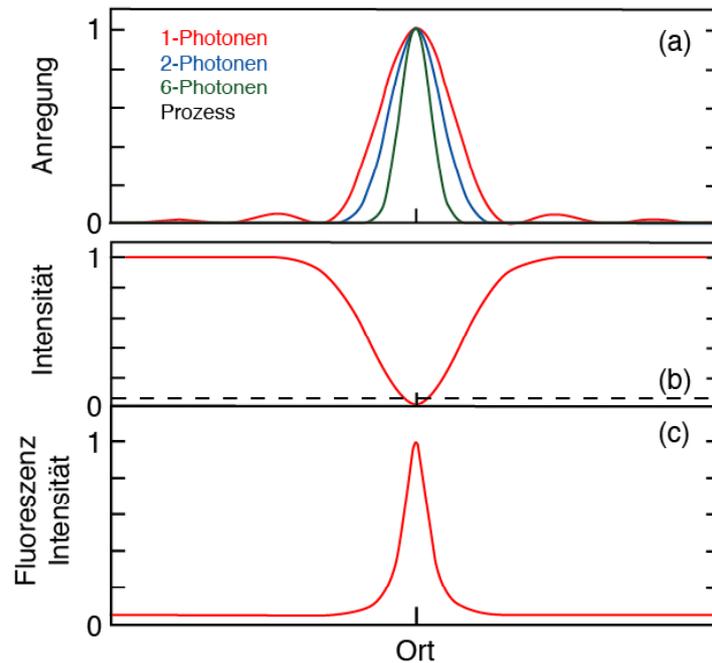


Abb. 2: (a) Verschmälerung der angeregten Probenbreite bei Beleuchtung mit einem Beugungsscheibchen unter Einsatz von Ein- und Mehrphotonen-Absorption. (b) Wird bei STED-Mikroskopie ein Lichtbündel mit zentraler Nullstelle für die Abregung der fluoreszierenden Moleküle einer Probe verwendet, so erhält man Fluoreszenz nur aus einem sehr eingeschränkten Bereich (c).

Bei der STED-Mikroskopie regt ein erstes Laserbündel (im Fokus des Mikroskopobjektivs) alle vorliegenden Farbstoffmoleküle an, die nach Anregung fluoreszieren können und deren Fluoreszenz beobachtet wird. Mit dieser Beleuchtung allein, wird noch keine Verbesserung des Auflösungsvermögens erreicht; man erhält das Fluoreszenzbild des Objektes. Zur Auflösungsverbesserung wird nun zusätzlich ein zweites Laserbündel eingestrahlt, mit dem Farbstoffmoleküle aus dem fluoreszierenden Zustand entfernt werden. Dies kann z. B. durch stimulierte Emission erfolgen¹. Die Intensitätsverteilung des Lichtes des zweiten, ausbleichenden Lichtbündels wird nun so gewählt, dass im Idealfall nur noch aus einem kleinen Bereich im Zentrum Fluoreszenz-Emission erfolgt. Dies kann erreicht werden, wenn Lichtbündel 2 dort eine Nullstelle der Intensität vorliegt, wie es in Abb. 2b angedeutet ist. Durch die höhere Intensität in anderen Bereichen wird dort die Emission ausgeschaltet, nur in der unmittelbaren Nähe der Nullstelle bleibt die Fluoreszenz erhalten. In Bild 2c ist die Besetzung des fluoreszierenden Zustands für den Fall der stimulierten Emission berechnet. Die Intensität des abregenden Lichtes ist dabei so gewählt, dass bei der Intensität I_S (gestrichelte Linie) die Besetzung gerade auf den halben Maximalwert abgeklungen ist. Nur in einem engen Bereich um das Zentrum erfolgt nun Lichtemission. Der emittierende Bereich kann für kleine Werte von I_S sehr viel kleiner sein, als es dem Helmholtzschen oder Abbeschen Auflösungsvermögen entspricht.

Es soll zum Abschluss nochmals betont werden, dass mit optischer Mikroskopie in der Tat strukturelle Details von kleiner 10 nm, d. h. weit unter den verwendeten Wellenlängen

¹ Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz schaltbarer Farbstoffmoleküle, deren Fluoreszenz durch das zweite Lichtbündel verändert (z. B. ausgeschaltet) wird.

beobachtet werden können. Das Vorhandensein dieser erhöhten Auflösung bedeutet aber nicht, dass die klassischen Formeln des Auflösungsvermögens nach Helmholtz bzw. Abbe nicht korrekt sind und hier die Grundlagen der Optik korrigiert werden müssten. Bei der Anwendung der bekannten Formeln zur Auflösung in der Mikroskopie ist jedoch die jeweilige Definition des Auflösungsbegriffs korrekt anzuwenden. Populäre Vereinfachungen müssen immer auf ihren Wahrheitsgehalt überprüft werden. Aussagen der Art, dass man „mit dem Mikroskop keine Objekte kleiner als die Wellenlänge sehen kann“ sind ganz einfach falsch.

Weitere Informationen zur Mikroskopie und zu modernen Mikroskopieverfahren finden Sie unter:

<http://en.wikipedia.org/wiki/Microscopy#NSOM>