

Rein optisches Image-Scanning-Mikroskop

Die Erfindung ermöglicht es, Image Scanning Mikroskopie (ISM) auf einfache Weise rein optisch durchzuführen. Das aufgenommene Bild muss nicht mehr aus vielen einzelnen Aufnahmen am Computer rekonstruiert werden, sondern entsteht direkt auf dem Kamerachip. Die Erfindung ist sowohl für konfokale Mikroskopie als auch für die Zwei-Photonen-Mikroskopie geeignet.

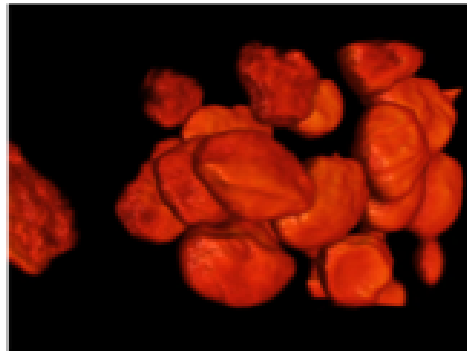
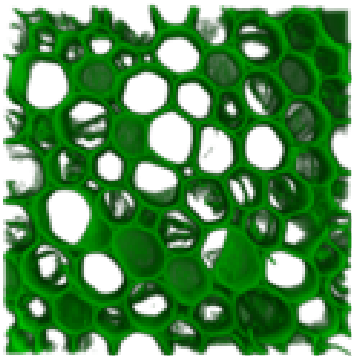
Problemstellung

Image Scanning Mikroskopie ist ein Verfahren, das in den letzten Jahren entwickelt wurde und die laterale Auflösung um etwa einen Faktor 1.6 im Vergleich zu konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopen (CLSM) verbessern kann. Das Verfahren basiert auf einem ähnlichen Prinzip wie die Auflösungsverbesserung durch strukturierte Beleuchtung.

Der Nachteil von ISM bestand bislang darin, dass für jede Rasterposition des Anregungslasers ein Bild auf dem Kamerachip ausgelesen werden musste. Anschließend wurde aus diesen Aufnahmen das finale Bild errechnet. Zwar lieferte ISM so eine deutlich höhere Auflösung als CLSM-Setups, war aber auch wesentlich langsamer.

Einige neuere Entwicklungen haben gezeigt, dass es möglich ist, ISM auch rein optisch durchzuführen (Optical Photon Reassignment - OPRA). Allerdings ist der apparative Aufwand von OPRA hoch und es ist schwierig, dies an bestehenden CLSM-Setups nachzurüsten. Darüber hinaus sind bisherige Ausführungsformen von rein optischen ISM-Verfahren nur sehr bedingt für die Zwei-Photonen-Mikroskopie geeignet, da sich Anregungs- und Emissionslicht einen Strahlengang teilen - gegenwärtig sind aber Optiken, die sowohl für infrarotes, als auch für sichtbares Licht optimiert sind, nicht verfügbar.

Unsere Lösung



Left:
Autofluorescence *Convallaria* test sample.
Right:
DAPI stained nuclei.
(Source: Ingo Gregor, SUG)

Das erfindungsgemäße ISM-Verfahren vermeidet die dargestellten Nachteile, indem das vollständige Bild bereits auf dem Kamerachip erzeugt wird. Dadurch entfällt sowohl die computergestützte Rekonstruktion, als auch die Notwendigkeit, den Kamerachip für jede Scanposition auszulesen. Das Verfahren ist dadurch deutlich schneller.

Im Vergleich zu bisherigen rein optischen Umsetzungen der ISM-Grundidee wird ISM hier verwirklicht, indem der Abstand zwischen zwei Scanpositionen auf dem Kamerachip verdoppelt wird. Es reicht daher aus, das Emissionslicht ein zweites Mal mit einem weiteren Scanspiegel unter dem doppelten Winkel abzulenken. Es ist aber sogar möglich auf diesen zweiten Scanspiegel zu

verzichten und für die zusätzliche Ablenkung den ursprünglichen Scanspiegel zu nutzen, beispielsweise, indem der Ausbreitungswinkel des Emissionslichtes mit Hilfe einer 2f-Optik umgekehrt wird. Dadurch kann das Verfahren mit einem Minimum an zusätzlichen optischen Komponenten (Strahlteiler und zwei Linsen) realisiert werden. Es ist somit ideal geeignet um bestehende CLSM-Setups auf einfache Weise zu ergänzen.

Darüber hinaus kann der Emissionsstrahlengang auch von dem Anregungsstrahlengang entkoppelt werden. Die Optiken des Emissionsstrahlenganges können dadurch auf die Emissionswellenlänge optimiert werden. Diese Umsetzung eignet sich somit besonders für die Zwei-Photonen-Mikroskopie.

Vorteile

Zusätzlich zu der für ISM typischen Auflösungsverbesserung um den Faktor 1.6, die ohne weitere Einschränkungen des Setups erzielt wird, etwa auf bestimmte Fluorophore, bietet das hier vorgestellte Verfahren folgende Vorteile:

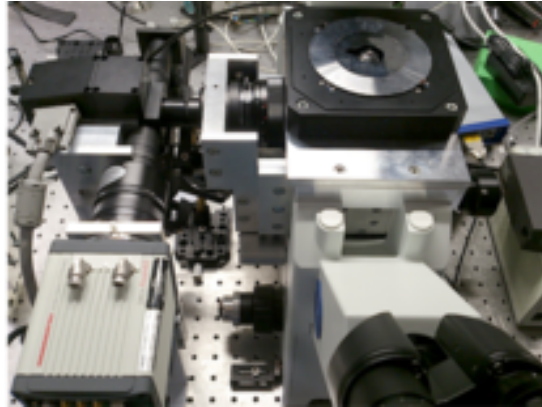
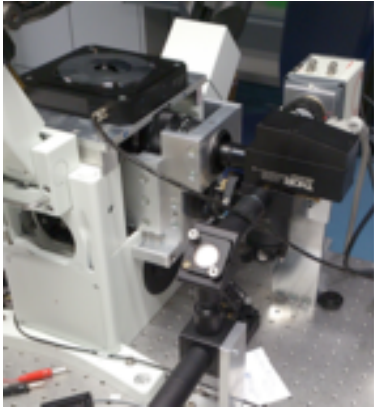
- Rein optische Umsetzung, die Integration erfolgt bereits vollständig auf dem Kamerachip, damit sind hohe Bildwiederholungsraten möglich.
- Nur wenige zusätzliche optische Komponenten notwendig. Bestehende CLSM-Systeme können leicht nachgerüstet werden, ohne deren normalen Funktionsmodus einzuschränken.
- Kein zweiter Scanspiegel notwendig, somit bestehen keine Synchronisationsprobleme der Scanner.
- Anregung und Emission können entkoppelt werden. Die Justage wird vereinfacht, das System ist auch für die Zwei-Photonen-Mikroskopie geeignet.

Anwendungsbereiche

Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie. Sowohl als Ergänzung für konfokale Laser-Scanning-Mikroskope als auch für die Zwei-Photonen-Mikroskopie. Bestehende Systeme können leicht durch ein Umlenckmodul nachgerüstet werden.

Entwicklungsstand

Sowohl ein Ein-Photonen Aufbau als auch eine Zwei-Photonen Umsetzung wurden in der Arbeitsgruppe des Erfinders realisiert und zeigten die erwartete Auflösungsverbesserung.



2-Photon ISM
(Quelle: Ingo Gregor, SUG)

Patentsituation

DE Patent erteilt: [DE102013017468B4](#)
DE Teilanmeldung erteilt: [DE102013022538B3](#)
US Patentanmeldung: [US20160246042A1](#)

Patentinhaber: Georg-August-Universität Göttingen Stiftung Öffentlichen Rechts

Weiterführende Informationen

Grundlagen ISM:
[Image Scanning Microscopy](#)
DOI: 10.1103/PhysRevLett.104.198101
Claus B. Müller und Jörg Enderlein
Physical review letters 104.19 (2010): 198101.

Kontakt

Dr. Cornelia Strauß
Patentmanagerin Physik & Technik
E-Mail: cstrauss@sciencebridge.de
Tel.: +49 (0) 551 30 724 153
Referenz: CPA-1678-SUG
www.sciencebridge.de