

Confocale Scanning Laser Microscopy; Drie-Dimensionale beeldvorming en Toepassingen in de Biologie.

G.J. Brakenhoff, H.T.M. van der Voort, E.A. van Spronsen, J.A.C. Valkenburg en N. Nanninga.

Vakgroep Electronenmicroscopie en Moleculaire Cytologie, Universiteit van Amsterdam, Plantage Muidergracht 14, 1018 TV Amsterdam

Samenvatting

De confrontale microscoop dankt zijn 3-afbeeldingskwaliteiten aan het vermogen tot het maken van "optische coupes". Naast deze 3-dimensionale eigenschappen beschikt een confocale microscoop over een hoger oplossend vermogen dan met conventionele lichtmicroscopie bereikt kan worden. Na een beschrijving van het principe van het instrument zal dit gedemonstreerd worden aan de hand van diverse objecten. Tenslotte worden enkele benaderingen van optische scanning microscopie met elkaar vergeleken en hun wederzijdse merites belicht.

Inleiding

De confocale scanning laser microscoop is voortgekomen uit de behoefte om biologische objecten waar te kunnen nemen bij een hogere resolutie dan mogelijk is met conventionele lichtmicroscopie, terwijl het object toch in zijn natuurlijk, waterig milieu gelaten kan worden. Bij observatie via de electronenmicroscop (EM) is wél een hoog oplossend vermogen aanwezig, maar de morfologische veranderingen die optreden bij het prepareren van het object voor electronenmicroscopie (chemische fixatie, onttrekking van water, inbedding en ultramicrotomie) zijn vaak zodanig, dat het in diverse gevallen onmogelijk is om op basis van electronenmicroscopische beelden een betrouwbare uitspraak te doen over de *in vivo* morfologie. Een tweede punt van onderscheid, is dat in EM secties van ge-

sneden materiaal, dikten tot ongeveer 1 μm toelaatbaar zijn, terwijl in de confocale lichtmicroscoop "dikke" (tot ca. 50 μm) plakken materiaal onderzocht kunnen worden. Dit dankzij het vermogen tot het maken van "optische coupes". In de confocale afbeelding kunnen dan onafhankelijke beelden van de diverse lagen in het object verkregen worden met een onderlinge afstand van ca. 0.7 μm . Deze vormen dan vervolgens de basis voor de driedimensionale beeldvorming zoals hieronder beschreven

Confocale beeldvorming

Het principe van confocale microscopie is aangegeven in Fig. 1 en is eerder beschreven door Sheppard (1977) en Brakenhoff *et al.* (1979). Indien de eigenschappen van de geschikte optica door diffractie effecten bepaald zijn, kan theoretisch worden aangetoond dat een dergelijk confocaal systeem fundamenteel betere afbeeldende eigenschappen heeft dan conventionele microscopie: een eigenschap die zowel in transmissie als in reflectie geldig is (Sheppard, 1977).

Confocale microscopie is pas dan echt van waarde wanneer het gecombineerd wordt met microscoop objectieven met een maximale numerieke apertuur (N.A.), aangezien anders klassieke microscopie met wél maximale N.A. de gewenste extra resolutie zou geven. Dit betekent dat voor toepassingen van het confocale principe in de biolo-

gie immersie optiek ($NA = 1.3$ tot 1.4) noodzakelijk is. Wij hebben aangetoond (Brakenhoff, 1977) dat de theoretische ver-wachte (lineaire) resolutieverbetering van 1.4 in confocale microscopie inderdaad ge-realiseerd kan worden met gebruikmaking van objectieven met $N.A. = 1.3$. Werkend met kortgolvig licht ($325 - 440$ nm) resul-teert deze verbetering in waargenomen punt responsen met een breedte van $140-150$ nm. Bij langere golflengten is de respons naar verhouding breder. Deze reductie van de responsbreedte treedt ook

op in de z-richting langs de optische as, hetgeen inhoudt dat het door de micro-scoop afgebeeld volume element $1/4$ tot de $3e$ macht, ofwel ca. $3x$ kleiner is dan funda-menteel mogelijk in klassieke microscopie. Een confocale microscoop kan zodoende een factor 3 meer informatie verkrijgen van een preparaat. Daarnaast heeft de microscoop een hoog dynamisch bereik (verhouding tussen hoogste en laagste voorkomende intensi-teit in het beeld). Licht dat verstrooid wordt aan de diverse oppervlakken van lenzen

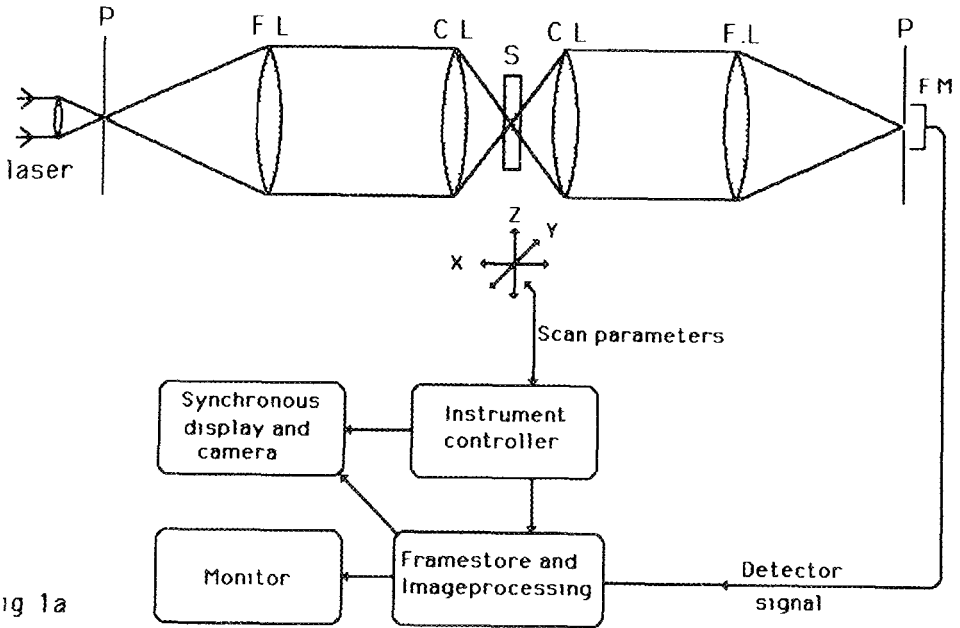


Fig 1a

Fig 1

In confocale microscopie wordt hetzelfde punt in het object (confocale punt) dat belicht wordt vanuit de laser belichte pinhole, precies afgebeeld op de detectiepinhole. Dit punt wordt confocaal genoemd, aangezien in dit punt de belichtingspinhole en de detectiepinhole een gezamenlijke focus hebben. Het object wordt mechanisch door dit confocale punt gescand, de lichtintensiteit die op de detector valt, modulerend. Deze moduleert vervolgens de intensiteit van de kathode straalbuis waarop het uiteindelijke beeld gevormd wordt. Transmissie CSLM kan gecombineerd worden met reflectie of fluorescentie confocale microscopie.

Afkortingen S = specimen, CL = confocale lens, FL = veld lens, P = pinhole, FM = fotomultiplier

en spiegels plus hetgeen dat door de uit-focus delen van het preparaat verstrooid wordt, beperkt in gewone microscopie dit bereik tot ca. 100, terwijl in confocale microscopie een factor 10 000 bereikt kan worden. Dit wordt veroorzaakt door het feit dat slechts licht van het in de confocale microscoop afgebeelde vlak met goede efficiency de detector pinhole kan passeren en bijdragen aan het beeldvormend signaal. Experimenteel gerealiseerde resolu-

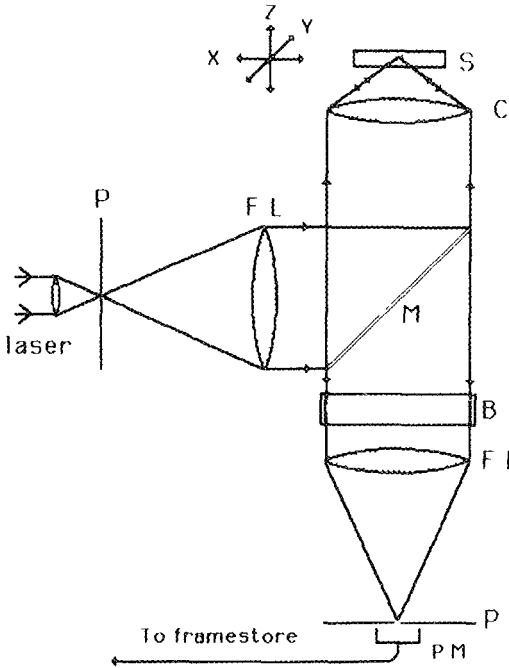


Fig 1b
Optisch arrangement voor fluorescentie/reflectie microscopie. M is een gewone bundeldivergerende spiegel bij reflectiemicroscopie en een dichroïde spiegel bij fluorescentiemicroscopie. In reflectiemicroscopie is de blocking filter (BF) afwezig. Een specifiek aantrekkelijk punt van deze opstelling is dat het object van boven af goed toegankelijk is. Iets dat manipulatie van dat object gedurende de afbeelding mogelijk maakt.

ties in de transmissie mode hangen af van de golflengte λ en lopen van 196 nm bij $\lambda = 633$ tot ca. 130 nm bij $\lambda = 325$ nm, (Brakenhoff, 1979; Brakenhoff, 1980).

Fluorescentie/Reflectiemicroscopie

Fig. 1b toont het optisch arrangement in deze gevallen. Zoals direct inzichtelijk is uit vergelijking van Fig. 1a en 1b is het confocale principe hier ook van toepassing: het objectief vervult nu de taak van zowel het verlichtings- als het detectie objectief in transmissie CSLM. Eén aspect dient speciaal benadrukt te worden: zoals reeds boven opgemerkt is, onderdrukt het gebruik van een pinhole in het detectiesysteem in sterke mate bijdragen van de off-focus delen van het object. Dit resulteert erin dat in confocale scanning fluorescentie microscopie als het ware een "optische coupe" gesneden wordt uit het object. In conventionele fluorescentie microscopie leiden deze "off-focus" bijdragen vanuit het object vaak tot overstraling en vervaging van kleine objectstructuren. Typische resoluties zoals door ons gerealiseerd in fluorescentie scanning microscopie zijn een transversaal de optische as oplossend vermogen van ca. 200 nm en langs deze as van ca. 700 nm. Dit laatste is dus de effectieve dikte van een optische sectie. Deze waarden gelden bij excitatie bij 483 nm, fluorescentiedetectie boven 520 nm, en een detectie pinhole met een maat, teruggeprojecteerd in het objectvlak, van 400 nm.

Instrument opbouw

Het instrument bestaat uit de volgende vier onderdelen:

- de mechanische scaneenheid samen met de confocale optiek
- het optisch bord met laser systeem en detector arrangement
- het instrument besturingssysteem
- het beeldbewerkingssysteem

ad a) De opstelling van de confocale optiek en geleiding van de mechanische scanbeweging is een zeer kritisch onderdeel van de microscoop. De stabiliteit en

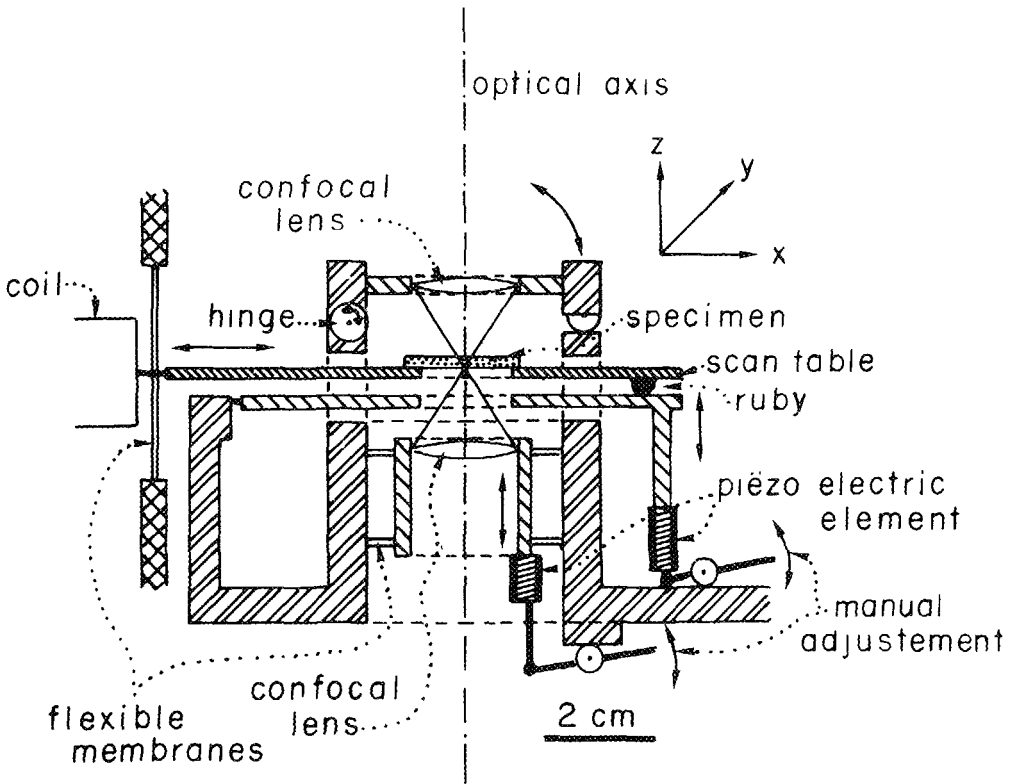


Fig 2

Schematische doorsnee van het gebruikte mechanisch scansysteem. Het specimen, geplaatst op de scantafel, wordt mechanisch gescand in de ruimte tussen de beide confocale lenzen. De objecthoogte ofwel Z-positie wordt bepaald door de "schaats" beweging van een aan de tafel bevestigde robijn over een zeer vlakgeslepen hardmetalen plaat. De bewegingen in de X (getekend) en de Y richting (niet getekend) worden geleid door membranen die zeer flexibel zijn in de scanrichting, maar zeer stijf in het vlak loodrecht hierop. De uiteindelijke precisie van de scanbeweging is ongeveer 20 nm, d.w.z. één orde beter dan het door de diffractie eigenschappen van de optiek begrensd oplossend vermogen (tot 140 nm). De confocale lenzen zijn immersie objectieven met hoge numerieke apertuur ($NA \approx 1.3$). Voor het inbrengen van het object kan de boven confocale lens opgeklapt worden, roterend rond het aangegeven draaipunt (Linge). Zowel de onder confocale lens als de hardmetalen scanplaat kunnen in de hoogte worden ingesteld met een combinatie van een grove voorinstelling met hand en een fijn controle met piezo-electrische elementen.

de herhaalbaarheid van de scanbeweging dienen aanzienlijk beter te zijn dan de verwachte optische resoluties van 100 tot 200 nm. Via een benadering geschetst in Fig. 2 zijn wij erin geslaagd een herhaalbaarheid van de relatieve scanpositie van scan tot scan te bereiken van 10 tot 20 nm. Essentieel in het ontwerp van de scanner is het zo klein mogelijk houden van de afstanden tussen de diverse onderdelen die niet ten opzichte van elkaar mogen bewegen. Op deze wijze wordt de invloed van thermische drift en trillingen van buitenaf effectief geminimaliseerd. Verder wordt de scantafel positie gemeten met piezo-electrische sensors Het signaal van deze sensors wordt via een terugkoppeling gebruikt om

de gewenste scanbeweging tot stand te brengen, onafhankelijk van de mechanische resonantie van het systeem

ad b) Het confocale optische systeem/scan unit is gemonteerd op een verticaalstaand, trillingsgedempt optisch bord, waarop ook de belichtings- en detectie optiek is bevestigd (Fig. 3). Wij kunnen met de daar gebouwde opstelling zowel in fluorescentie/reflectie werken als in beide modes tegelijk. De gekozen laser golfengte hangt af van de gewenste resolutie, de absorptiekenmerken van het object, of in het geval van fluorescentie microscopie van de vereiste excitatiegolfengte van de gebruikte fluorochroom De ontwikkelingen op lasergebied maken het op het moment

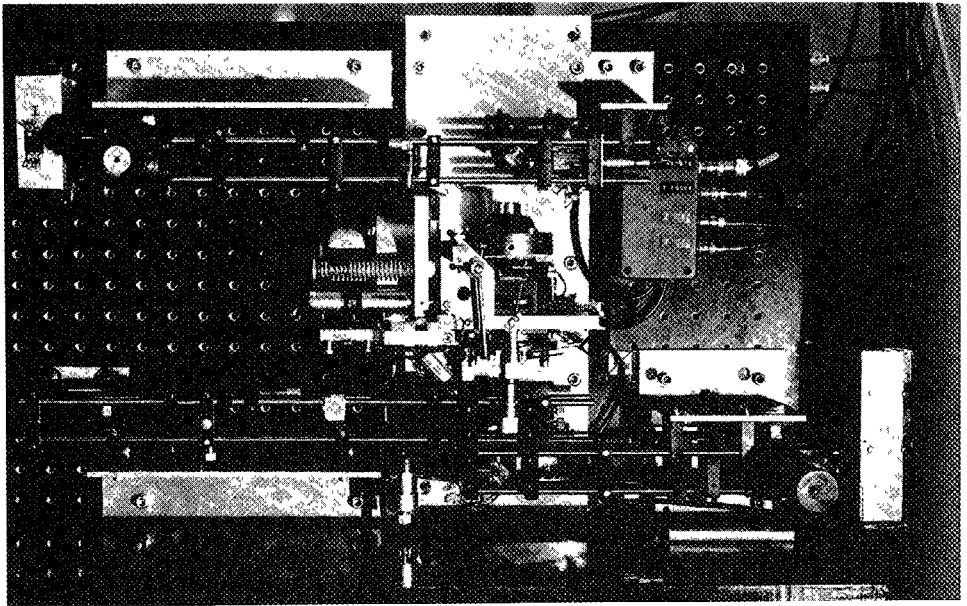


Fig 3

Foto van het optisch bord met confocale optiek/scaneenheid gemonteerd (centrum) De lichtbundel van de laser geplaatst aan de achterzijde van het bord, bereikt de belichtingsoptiek via een opening in het bord en komt de opstelling binnen aan de linkeronderzijde Na passage van de belichtingspinhole wordt het licht van onder ingespiegeld in de confocale optiek Na passeren van het specimen bereikt het licht (voor de transmissie mode) de linksboven geplaatste combinatie detectiepinhole/fotomultiplier detector Bij werken in de fluorescentie/reflectie mode wordt het terugkerend licht gebruikt, dat dan ontvangen wordt op de rechtsonder geplaatste/fotomultiplier detector

mogelijk vrijwel elke gewenste golf lengte te genereren, zij het vaak tegen aanzienlijke kosten. Gelukkig zijn voor de meeste gebruikte fluorescentie excitatiegolflengten (Fluoresceïne, 480 nm en Rhodamine 520 nm) goedkope luchtgekoelde Argon-ion lasers zeer geschikt.

ad c) In het huidige systeem wordt de directe instrumentsturing uitgevoerd met behulp van een eenvoudig 8-bits processor (Rockwell 6502). In onze benadering gebruiken wij deze processor om via de bus een aantal autonoom-opererende analoge circuits van de instelwaarde te voorzien. Bijvoorbeeld de analoge scancircuits genereren voortdurend de noodzakelijke wisselstromen voor de scanspoelen, nadat de scanamplitude en frequentie op een bepaalde waarde zijn gezet door de computer. Hoewel de microscoop in principe bediend zou kunnen worden met behulp van een toetsenbord van de terminal, hebben wij toch gekozen voor een bediening via een klein console met potentiometers en schakelaars, waarvan de waarde en instelling wordt uitgelezen door de eerdergenoemde 8-bits processor. De instrumentsoftware genereert vervolgens de benodigde stuurcommando's. Daarnaast zijn op dit niveau enkele faciliteiten ingebouwd als een automatische aligneringsroutine voor confocale condities en een automatische detectiegevoeligheidsregeling.

ad d). Het beeldbewerkingssysteem van de CSLM is gebaseerd op een door het NIKHEF (Nederlands Instituut voor Kernfysica en Hoge Energie Fysica) ontwikkeld microprocessor systeem met de naam FAMP (Fast Amsterdam Multi Processor). Dit systeem bestaat uit een Motorola 68000 microprocessor met ca. 1 Mbyte geheugen, een hard disk (Winchester) capaciteit van 40 Mbyte, een tape backup eenheid en een aantal modules voor het weergeven en vastleggen van beelden.

Het beeldbewerkingssysteem ontvangt de beeldgegevens van de microscoop in een z.g. frame store, welke een variabele maat kan hebben, i.e. 512 x 512 of 256 x 256 by-

tes. De laatste maat wordt vooral gebruikt voor het opslaan van de basisbeelden voor 3-D beeldbewerking (zie onder). Om het werken met dit systeem te vergemakkelijken, hebben wij het zogenaamde Midos operating systeem geschreven. Het is zeer geschikt voor beeldbewerkingsoperaties, omdat de file structuur en file opslag programmatuur rekening houdt met de eisen van het snel lezen en schrijven van de omvangrijke beelddata van en naar de Winchester schijven. Ook is dit systeem in staat reeds gecompileerde programma's met elkaar te verbinden ("to link"). Daardoor kunnen de diverse programma onderdelen onafhankelijk ontwikkeld worden op

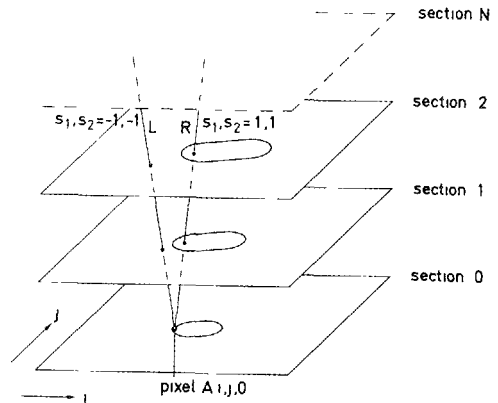


Fig 4

In het algoritme voor het maken van stereoscopische beeldparen gaan wij uit van de data van een serie beelden van secties verkregen op verschillende hoogten. Langs de "kijklijnen" L en R kennen wij het maximum van de gevonden waarden langs die kijklijn toe aan het corresponderende beeldpunt in het stereoscopische beeldpaar. Dus de waarden van een beeldpunt $L_{i,j}$ ($i, h \in 0 \dots 255$) is het maximum van de beeldpuntwaarden $A_{i, j, k} + s_1 k, j + s_2 k, k$ ($K \in 0 \dots N-1$, N is het aantal beeldsecties waarbij $A_{i, j, k}$ een beeldpunt in sectie k aanduidt met coördinaten i, j).

een apart systeem, zonder gebruik te maken van de apparatuur hetgeen gebruikers zou storen

Toepassingsprogramma's binnen Midos

Binnen het bovengenoemd systeem hebben wij onder meer de volgende programma's ontwikkeld.

a) *Continue beeld.* Naast de directe beelden synchroon met de mechanische af-tasting, kunnen binnen Midos de beeld-data geschreven worden in een video-buffer van waaruit vervolgens een continu 60 Hz herhalingsfrequentie flikkervrij observatiebeeld gemaakt wordt. Deze videobuffer kan ook gebruikt worden voor middeling van opeenvolgende beelden via het zog "rolling average" principe met een instelbare realisatietijd

b) *Spatiele filters* zoals mediaan, Gaussisch met diverse middelingsgebieden zijn beschikbaar. Speciaal van nut is een lokaal contrastfilter met behulp waarvan niet slechts beeldcontrasten kunnen worden versterkt, maar waarmee ook lokale contrasten kunnen worden geoptimaliseerd. Dit resulteert in de mogelijkheid om in beelden waarin zowel lichte als donkere partijen voorkomen, elk met daarin een substructuur, deze zo weer te geven dat al deze substructuren in het uiteindelijke beeld aanwezig zijn

c) *Drie-dimensionale beeldverwerking.* Het optische coupe-snijdend vermogen van het instrument (zie onder) maakt het zeer wenselijk via een routine automatisch een serie beelden van verschillende hoogten te kunnen registreren. In feite wordt dan een 3-dimensionale afbeelding gemaakt van de ruimtelijke verdeling binnen het microscopisch preparaat naar een in het computergeheugen gedefinieerd 3-dimensionaal array. Het algoritme dat deze "afbeelding" naar de computer verzorgt, is in staat in ca. 80 sec de data van 16 beelden van 256 x 256 pixels van verschillende hoogten in te lezen in de computer. Dankzij de uitstekende mechanische scanstabiliteit

zijn deze beelden perfect gealigneerd t.o.v. elkaar

d) *Drie-dimensionale beeldvorming.* De 3-D beeldgegevens kunnen op vele wijzen worden gerepresenteerd. Wij hebben in eerste instantie gekozen voor het in Fig. 4 beschreven algoritme via welke stereoscopisch-waarneembare beelden verkregen worden vanuit een door de gebruiker te kiezen kijkrichting. Door een geschikte keuze van de waarden s_1 en s_2 (zie Fig. 4) kan het object vanuit de optimale kijkhoek stereoscopisch worden bekeken voor het zichtbaar maken van een bepaalde structuur

Resultaten van confocale microscopie

Fig. 5 en 6 geven een tweetal voorbeelden van beelden verkregen in transmissie. Als toevoeging aan de elders gepubliceerde resultaten '(Brakenhoff 1979) aan puntobjecten, demonstreert Fig. 5 dat een de facto oplossend vermogen van ca. 150 nm behaald kan worden. Bovendien zijn er in de afbeelding geen artefacten waar te nemen bij deze resolutiegrens. In Fig. 6 zien wij een vergelijking tussen standaard fasecontrast en confocale scanning microscopie aan een bacterie. Het CSLM beeld laat binnen de bacterie een fijne, koordachtige structuur zien die geassocieerd is met het nucleoplasma (DNA). Ook hier zien wij dat de kleinste zichtbare structuur overeenkomt met een responsbreedte van 150 nm gemeten aan de puntobjecten. Fig. 7 en 8 tonen resultaten verkregen in reflectie, respectievelijk fluorescentie van een tweetal biologische objecten.

In beide gevallen zijn 8 subbeelden (optische secties) genomen op een onderlinge afstand van 0.8 μm . De getoonde stereoscopische beelden zijn samengesteld volgens de hierboven beschreven algoritmen. Zij stellen ons in staat een direct inzicht te krijgen in de ruimtelijke organisatie van de onderzochte structuren.

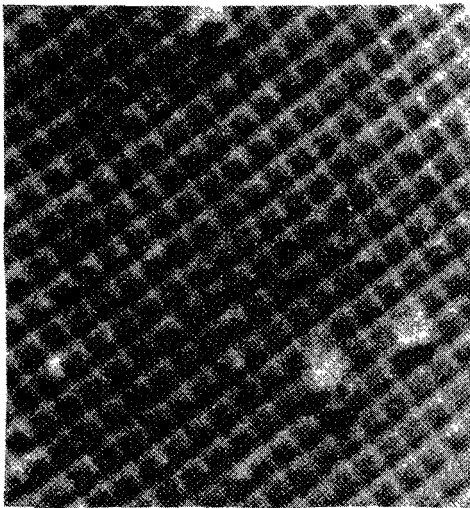


$\lambda = 442 \text{ nm}$

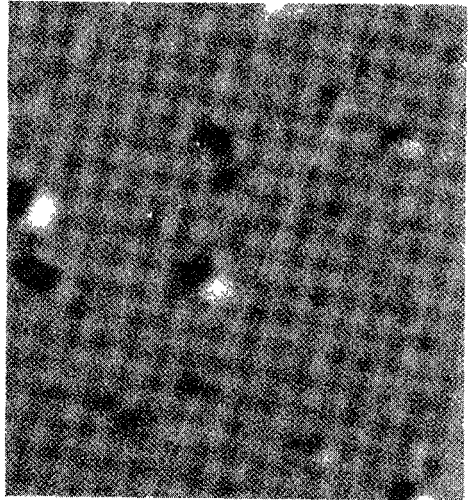


$\lambda = 633 \text{ nm}$

CSLM



CSLM $\lambda = 325 \text{ nm}$ normal LM



GRATING DISTANCE 463 nm

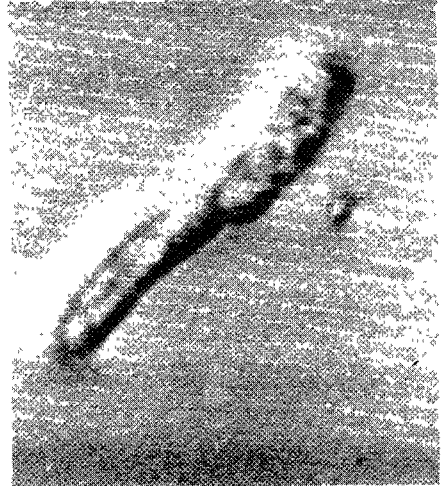
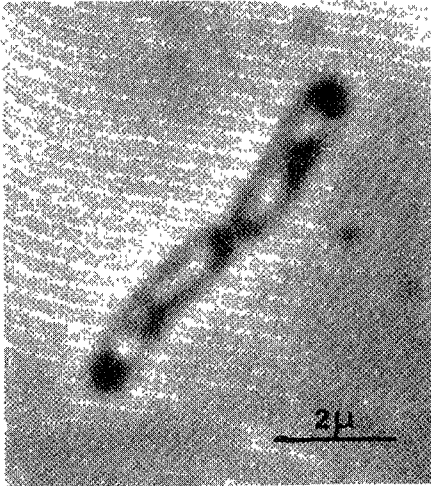
Fig 5

Replica van een wafeltype rooster met een roosterafstand van 463 nm, afgebeeld in gewone microscopie en CSLM bij een 3-tal golflengten. Alle beelden zijn van dezelfde replica terwijl die afgebeeld bij 633 en 442 nm van hetzelfde gebied in de replica afkomstig zijn.

Als laatste figuur tonen wij een compilatiefoto die de diverse aspecten van deze vorm van microscopie goed illustreert. Het beeld van het groenwier *Spirogyra* in gewone microscopie toont dat de off-focus delen van het object bijdragen tot het beeld, zij het onscherp. In confocale microscopie zien wij dat deze bijdragen effectief onderdrukt worden (zie inzet). Samenvattend kunnen wij, op basis van beelden met een kortere scherptediepte dan in gewone microscopie in de confocale microscoop, gekoppeld aan een computer, komen tot een samengesteld beeld met een zeer grote scherptediepte.

Discussie

Wij willen in deze discussie voornamelijk ingaan op de verschillende aspecten van scanning lichtmicroscopie. De diverse benaderingen zoals die recentelijk gerealiseerd zijn, kunnen onderverdeeld worden langs de scheidslijnen off-axis *versus* on-axis en confocaal *versus* niet-confocaal. Wij spreken van off-axis scanning wanneer bij het scannen het object afgetast wordt door een bewegende lichtbundel. Deze bundel adresseert objectpunten die al of niet (ver) van de optische as liggen. Wij spreken van on-axis wanneer de lichtbundel stationair is en uiteraard op de optische



LM

CSLM $\lambda=442\text{ nm}$

live *E. Coli* (BSA-sol. $n=1.385$)

Fig 6

Levende *E. coli* bacterie afgebeeld links bij gewone Zernike fase-contrast en b) dezelfde bacterie ongeveer 20 minuten later in amplitue- of absorptie contrast in de CSLM ($\lambda = 442\text{ nm}$). De bacterie is ingebed in een BSA (Bovine Serum Albumine) oplossing van $n = 1.385$, aangepast voor fysiologische compatibiliteit met de levende bacterie. Het beeld is contrastversterkt van een oorspronkelijk contrast van 5%.

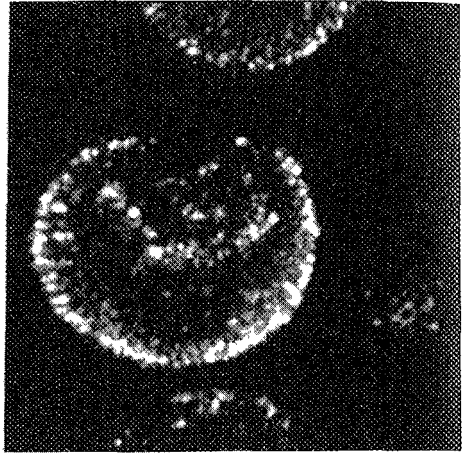
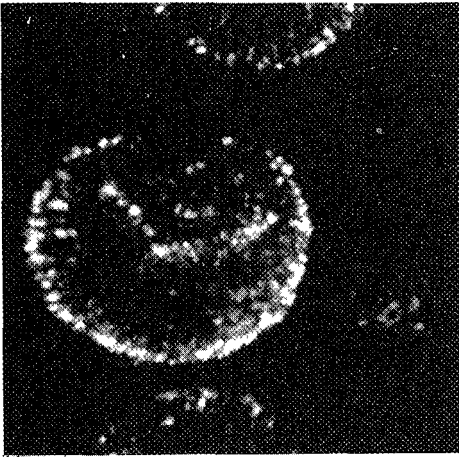


Fig 7

Stereoscopisch beeldpaar van de buitenwand van de sporen van een *Polytridium commune*, opgenomen in reflectie bij een golflengte van 482 nm. Vooral de op de buitenwand aanwezige stekels met onderlinge afstanden tot 200 nm dragen bij tot het reflectiesignaal. Een hulp bij het stereoscopisch waarnemen van dit paar is een vel papier tussen de twee beelden te houden en elk oog één beeld aan te bieden. U kunt in dit stereopaar de omtrekken zien van een bolvormige structuur met een flinke "deuk" in naar de waarnemer gekeerde gedeelte. De diameter van de bol is ongeveer 5 μm .

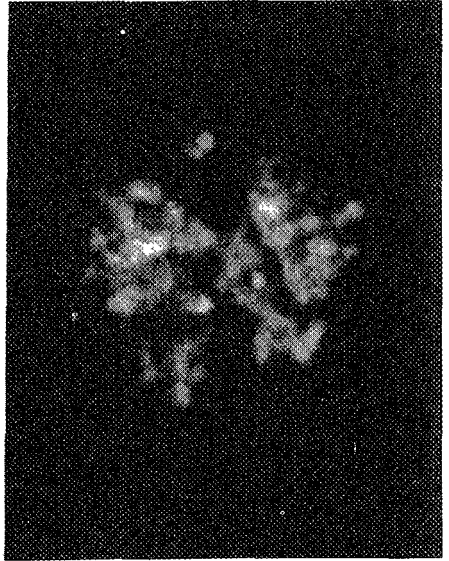
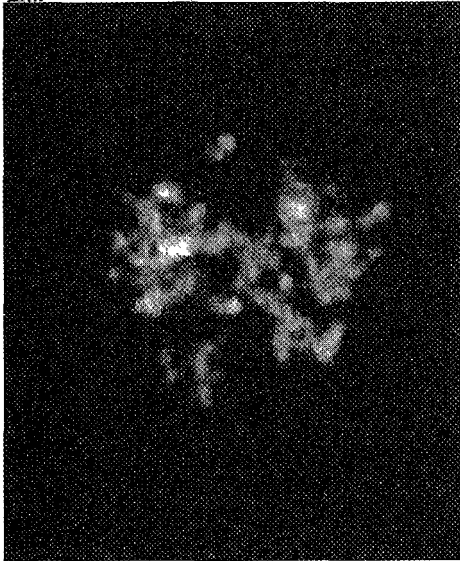


Fig. 8

Stereoscopisch beeldpaar van de kern van een muis neuroblastoma 2A cel. Het beeld toont de structuur van de chromosomen in de vroege anafase. Fluorescentiebeeld (excitatie 482 nm, detectie 510 nm) na kleuring met mithramycine. Vrijwel verticaal, iets naar links hellend, midden door de getoonde structuur loopt het zgn. equatorvlak, aan weerszijden waarvan de kern zich aan het delen is. Afmeting van de getoonde structuur is ca. 15 μm . Preparaat van W. A. M. Linnemans, Vakgroep Moleculaire Celbiologie, Rijksuniversiteit Utrecht.

as loop, en het object wordt bewogen t.o.v. de lichtspot.

Beide benaderingen hebben gemeen

- a) dat de uitkomende gegevens kwantitatief zijn en zeer geschikt zijn als uitgangsmateriaal voor latere beeldbewerking.
- b) dat alleen dat punt van het object dat bekeken wordt, blootgesteld wordt aan de stralingsbelasting
- c) dat detectors gebruikt kunnen worden met een aanzienlijk hogere quantumefficiency dan bij de gewone microscopie gebruikelijke fotografische methoden.
- d) dat de vergroting continu gevarieerd kan worden via de scan-parameters.

Specifiek voor on-axis microscopie met mechanische scanning van het object is:

- 1) dat de gebruikte optiek slechts optimaal hoeft te zijn op de optische as en derhalve eenvoudiger en daarom goedkoper kan zijn.
- 2) dat de afbeeldende condities voor elk beeldpunt volkomen identiek zijn, wat voor bepaalde beeldbewerkingsoperaties van groot voordeel kan zijn.
- 3) er zijn geen optische beperkingen aan de grootte van het beeldveld; deze wordt bepaald door de uitslag van de mechanische scan, zo is een beeldveld van 1 bij 1 mm met een immersie-objectief mogelijk
- 4) het scanvlak behoeft noch vlak te zijn, noch loodrecht op de optische as te liggen. Er is een scanvrijheid in de x, y én z richting
- 5) Zowel de amplitude als de fase (met een interferentie opstelling) in elk beeldpunt kunnen geregistreerd worden.

Confocale scanning microscopie voegt hier aan toe:

- a. een fundamentele verbetering in de resolutie
- b. een groot dynamisch bereik
- c. wellicht het belangrijkste (speciaal in fluorescentie) het vermogen tot het snijden van optische coupes

In tegenstelling tot de opstelling zoals in dit artikel beschreven, zijn de meeste benaderingen tot nu toe gebaseerd op een off-axis scanning door de lichtbundel te laten bewegen met spiegels of acoustische cellen (Zeiss Laserscan, zie artikel elders in dit nummer. Ook komt het gebruik van meervoudige pinholes in een van de Nipkovschijf afgeleide opstelling voor (Petran, 1985). Op het moment van schrijven is de Zeiss Laserscan niet confocaal.

De microscoop van Petran is in beperkte mate confocaal omdat de gebruikte pinholes, om redenen van lichte efficiency, te groot zijn voor het bereiken van een goed confocaal effect.

Tot slot willen wij ingaan op de snelheidsaspecten van de diverse systemen. Waar wij een door de mechanische scan gelimiteerde, beeldopbouw snelheid hebben, kunnen in de off-axis scanning mode televisiefrequenties bereikt worden. Dit laatste slechts als de (dure) scanmethode van afbuigstelsel op basis van een roterend polygoon wordt toegepast. Bij mechanische scanfrequenties van 100-150 Hz, kunnen wij momenteel beeldopbouw tijden realiseren van 0.5 tot 3 sec. per beeld, afhankelijk van het aantal beeldlijnen per beeld. Volgens onze informatie bereikt de Zeiss Laserscan een vergelijkbare snelheid (2 sec. over een 512 lijnen beeld)

Voor de vele toepassingen in de biologie, met name in fluorescentie, moeten per beeldpunt een voldoende aantal fotonen verzameld worden om de gewenste signaal/ruis verhouding in het beeld te realiseren. Hieruit vloeien dan totale beeldacquisitie tijden voort die voor beide genoemde systemen niet erg verschillend zijn. Als concreet voorbeeld zouden wij willen noemen de situatie in onze microscoop, waarbij de volgende condities als zeer praktisch worden ervaren. Bij het maken van de optische coupes wordt in 5 sec. een 256 lijnen beeld opgebouwd voor elke coupe. Een typische serie nodig voor stereoscopische beeldbewerking bestaat uit 6 tot 12 coupes en kost derhalve wat minder dan een mi-

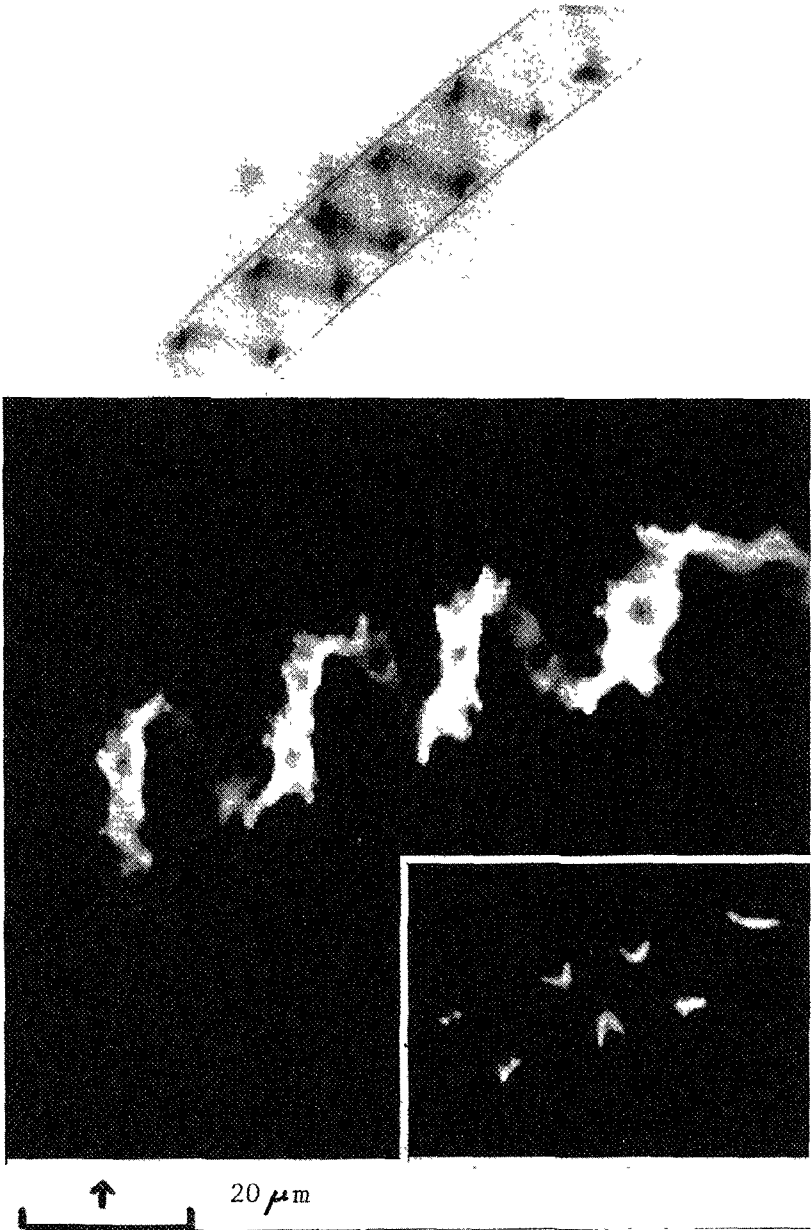


Fig. 9

Boven een opname van de groenalg *Spirogyra* in gewone microscopie. Onder het fluorescentiebeeld in autofluorescentie van hetzelfde organisme (excitatie $\lambda = 482 \text{ nm}$). Wij zien de signaalvormige structuur van de chloroplast waarin het fluorescerende chlorophyl gelokaliseerd is. De inzet toont een optische sectie door dit object, terwijl het hoofdbeeld (een beeld van een stereopaar) de structuur over een diepte van ca. $14 \mu\text{m}$ toont.

nuut aan tijd. Vaak passen wij nog een zekere integratie toe via de "rolling average" methode vanwege signaal/ruis redenen waardoor de tijd een factor 2 tot 4 langer wordt. Naar onze mening vormen bij toepassing in de biologie de wat langzamere scansnelheden van de mechanische scan geen beperking. Een analogie doet zich voor met de Scanning Electronmicroscop (SEM). Daar waar in de SEM door lage massa van de electronen moeiteloos TV scansnelheden gerealiseerd kunnen worden, wordt toch voor de opbouw van een beeld dat gefotografeerd wordt, 20, 40 sec, of nog langer genomen, uitsluitend vanwege redenen van signaal/ruis verhouding. Ter conclusie mogen wij stellen dat de hier beschreven confocale scanning microscop optisch optimaal is en dankzij de aangekoppelde computersystemen unieke ruimtelijke beelden kan opleveren. Onze apparatuur is ontwikkeld met het oog op toepassingen in biologisch en medisch onderzoek. Het gebruik dat nu door diverse bezoekers vanuit deze richting en ook uit de voedselindustrie wordt gemaakt, geeft ons reden te veronderstellen dat dit type microscop daar een brede toepassing zal vinden.

Literatuur

- Brakenhoff, G J., Blom, P., Barends, P. Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses. *J. Microsc.* 117: 219-232 (1979)
- Brakenhoff, G J., Binnerts, J.S., Wol-dringh, C.L. Developments in high resolution confocal scanning light microscopy (CSLM). In: *Scanned Image Microscopy*, (ed. E.A. Ash), Academic Press, London 1980, pp. 183-200.
- Petran, M., Hadrawsky, N. and Boyde, A. The tandem reflection light microscope. *Scanning* 7: 97-108 (1985)
- Sheppard, C.J.R., Choudhury, A. Image formation in the scanning microscope. *Opt. Acta* 24, 1051-1073 (1977).
- Valkenburg, J.A.C., Woldringh, C.L., Brakenhoff, G.J., Van der Voort, H.T.M. and Nanninga, N. Confocal scanning light microscopy of the *Escherichia coli* Nucleus. comparison with phase-contrast and electron microscope images. *J. Bacteriol.* 188 (1985).
- Wijnaends van Resandt, R.W., Marsman, H.J.B., Kaplan, R., Davoust, J., Stelzer, E.H.K., Sticker, R. Optical fluorescence microscopy in 3 dimensions. *J. Microsc.* 138: 29-34 (1985).