

Digitale Kamerasysteme in der Mikroskopie



Der Dschungel von digitalen Kamerasystemen in der Mikroskopie bezüglich Auflösung, Empfindlichkeit und Auslesegeschwindigkeit ist groß. Eine Vielzahl von verschiedenen Anwendungsbereichen in der Biologie, Medizin und Materialwissenschaft erfordern die Auswahl der richtigen Technologie. In den letzten 10 Jahren haben sich digitale Kamerasysteme bei fast allen Anwendungen am Forschungs- und Routinemikroskop durchgesetzt. Obgleich von den heute meist verwendeten Systemen über 90% auf CCD-Detektoren zurückgreifen, steht der Anwender einem nahezu unüberschaubaren Angebot gegenüber. Unterschiedliche Verfahren, z.B. bei der Farberzeugung, verwirrende Pixelzahlen und eine Vielzahl uneinheitlicher Spezifikationen machen einen Vergleich sehr schwer. Welches Kamerasystem eignet sich am Besten zur Aufnahme- und Archivierung von Bilddaten in der Durchlicht, Auflicht- oder Fluoreszenzmikroskopie? Beim Studieren von Fachbeiträgen und Fachzeitschriften werden oft die beschriebenen digitalen Kamerasystem als höchstauflösend, höchstempfindlich bzw. das Beste für Ihre Anwendung, beschrieben. Doch der Anwender wird mit den technischen und preislichen Unterschieden der Kameras oft alleine gelassen. Wie bringen wir Licht in das Dunkel der richtigen Selektion, was können hilfreiche Auswahlkriterien sein?

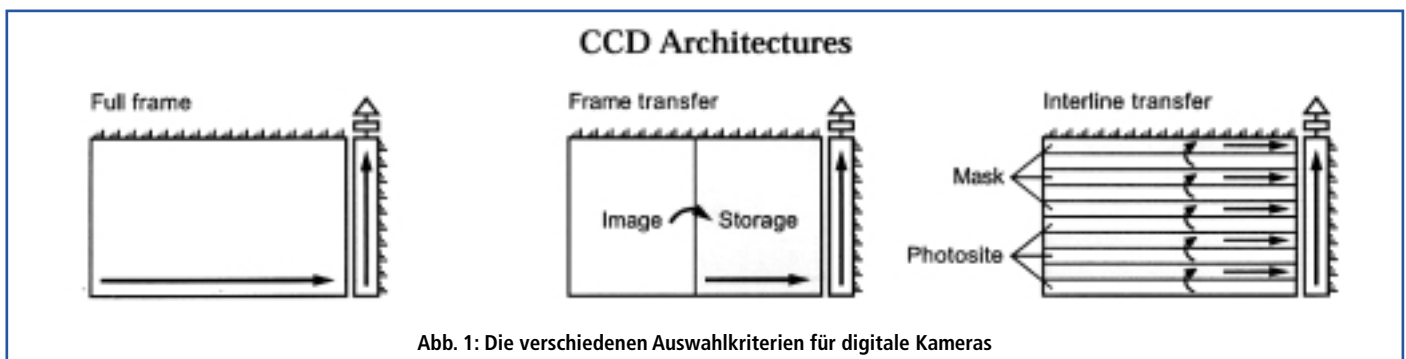


Worin liegen die Unterschiede von digitalen Kameras und was sind die Auswahlkriterien ?

- Farbe- oder Monochrom CCD Kamera
- Ausleseverfahren: Full-Frame, Frame-Transfer, Interline (Abb. 1)
- Auslesegeschwindigkeit: Bildwiederholraten, Realtime Darstellung, Time Lapse Bildfolgen
- Anzahl von physikalischen Pixel des CCD Sensors (ohne Interpolation und Pixel Shift): wie groß ist das Bildfeld
- Größe der CCD Pixel, örtliche Auflösung
- Empfindlichkeit, Quanteneffizienz: Lichtumwandlung von Photonen in Elektronen
- Ausleserauschen des CCD Sensor bzw. Signal / Noise Verhältnis
- Physikalische Dynamik: Verhältnis von maximalem Ladungsvermögen des einzelnen CCD Pixel zur Elektronenempfindlichkeit
- Kühlung des CCD Sensors zur Dunkelstrom Reduzierung

Generelles zur Brillanz von Bilder

Die Bildqualität hängt nur zu einem Teil von der Anzahl der verwendeten Bildpunkte ab. Dies wird fälschlicherweise oft mit der Auflösung gleichgesetzt. Was vergessen wird, ist die Photonenstatistik. CCD's arbeiten eigentlich mit sehr kleinen Signalen, was ja auch der Empfindlichkeit zuträglich ist. Schwache Lichtsignale sind jedoch mit einer höheren Fluktuation versehen, d.h. die Intensität schwankt von Aufnahme zu Aufnahme, aber auch von Pixel zu Pixel. Im Bild drückt sich das als Rauschen aus, Details verschwimmen, die Größe gerade noch unterscheidbarer Objekte liegt deutlich über der theoretischen Grenze von 3 Pixeln.



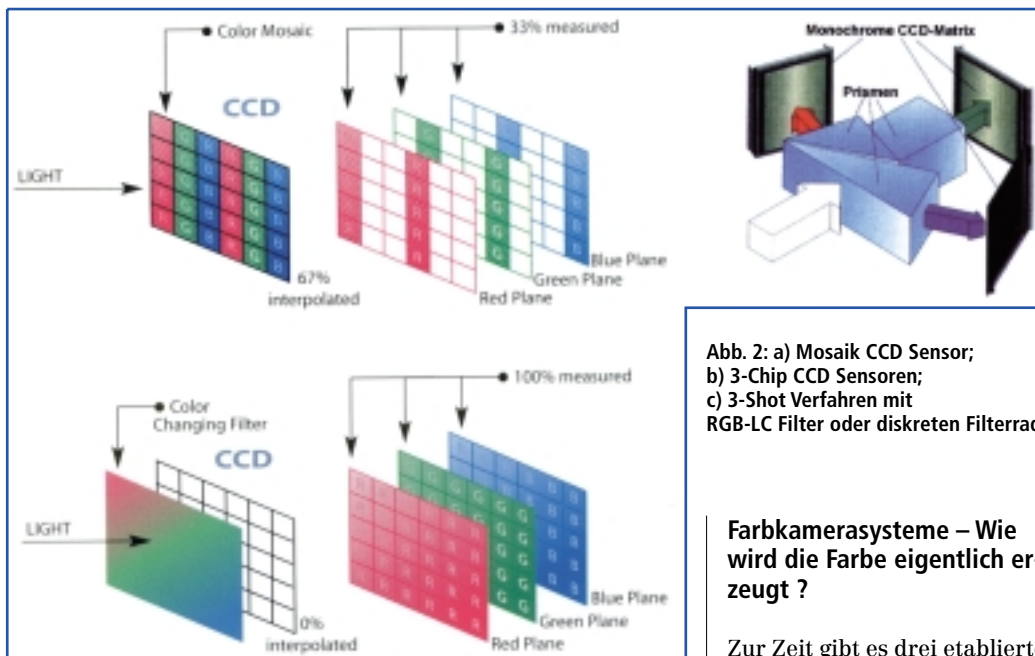


Abb. 2: a) Mosaik CCD Sensor;
b) 3-Chip CCD Sensoren;
c) 3-Shot Verfahren mit RGB-LC Filter oder diskreten Filterrad

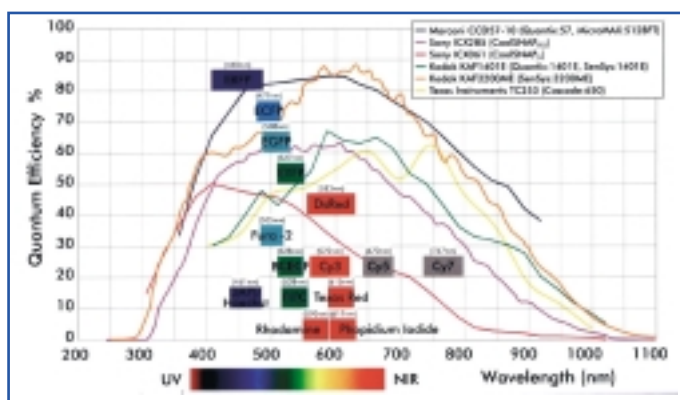


Abb. 3: Spektrale Empfindlichkeit QE-

Im folgenden Artikel soll hauptsächlich darauf eingegangen werden wann und für welche Anwendungen Farb-

kameras sinnvoll eingesetzt werden und in welchen Fällen monochrome Kamerasystem die ideale Lösung sind.

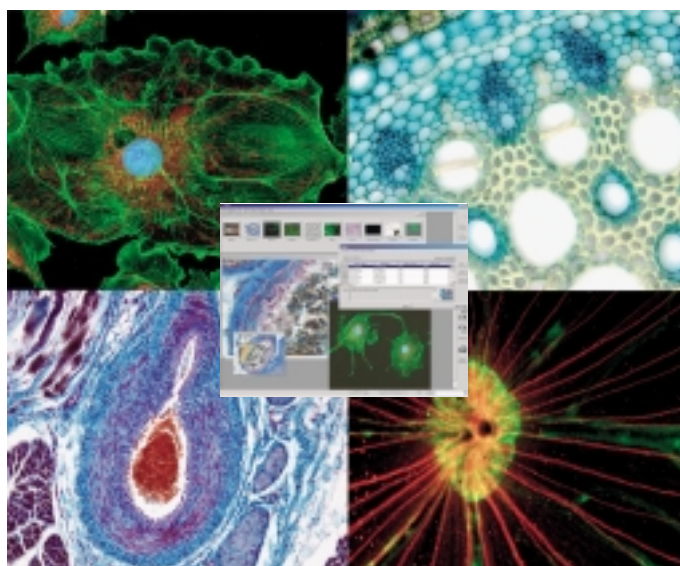


Abb. 4: Beispiel verschiedener RGB Bilder in Histologie und Fluoreszenz

den. Für große Chips mit hohen Pixelzahlen gibt es hier rein geometrisch-optische Limitierungen. Daher gibt es zur Zeit nur wenige Modelle auf dem Markt

- 3-Shot Methode (Abb. 2c): Es wird nacheinander mittels Farbfilter pro Kanal ein Bild mit voller Auflösung aufgenommen. Diese Verfahren bieten eine etwas geringere Zeitauflösung, die volle räumliche Auflösung des Sensors bleibt erhalten. Intelligente Lösungen bieten zudem die Möglichkeit, von vornherein nur ein oder zwei Filter (rot, grün oder blau) zu aktivieren bzw. softwaremäßig zu selektieren, was in Fluoreszenz- oder Phasenkontrastanwendungen eine Art Monochrom-Betrieb erlaubt.

Monochrome Kamerasysteme

- frontilluminated CCD
- backilluminated CCD
- transparente ITO-Gate Technologie

Zur Zeit gibt es drei etablierte Methoden der Farberzeugung:

- Mosaik CCD Sensor
- 3-Chip CCD Sensoren
- 3-Shot Verfahren mit RGB-LC Filter oder diskreten Filterrad

Mosaik-CCD Methode (Abb. 2a): Die Pixel des CCD-Sensors sind aufgeteilt in rot-grün- und blauempfindliche Elemente. Die bei jedem Farbkanal auftretenden Informationslücken müssen durch Interpolation oder durch mehrfaches Abscannen gefüllt werden. CCD Sensoren können prinzipiell in einem Vorgang mit der Farbinformation ausgelesen werden. Die tatsächliche Auflösung wird dadurch verringert. Die angebotenen Systeme mit Micro-Scanning (Piezo oder Optoelektronisch) können hier Abhilfe schaffen, verlieren dann aber die Zeitauflösung. Spezielle Interpolations-Algorithmen sind eine Alternative zur Auflösungsverbesserung im Vergleich zu Micro-Scanning Systemen jedoch ohne zeitliche Verschlechterung. Bei schnell bewegten Objekten gibt es da manchmal keine Alternative.

- 3-Chip CCD Methode (Abb. 2b): Das Licht wird über ein Strahlteilerprisma und drei Farbfilter auf drei identische CCDs verteilt. Da das Filtern erst nach der Teilung erfolgt, ist auch dieses Verfahren mit hohen Lichtverlusten verbun-

Wegen der höheren Empfindlichkeit von monochromen CCD Sensoren, limitiert nur im wesentlichen von der Quanteneffizienz des entsprechenden CCD-Sensors, werden diese Kamertypen schwerpunktmäßig für die Fluoreszenz-Mikroskopie verwendet. Einzelne Fluoreszenzfärbungen emittieren in einem beschränkten Spektralbereich, der durch einen Bandpassfilter im Mikroskop bestimmt wird. Innerhalb dieses Bandpasses liegt keinerlei spezifische Information, außer der Intensität. Warum soll dann die Farbe dieses Bandpasses mit einer Farbkamera gemessen werden und ein erheblicher Verlust an Signal durch Farbfilter in Kauf genommen werden? Die vermeintlich echte Farbe des Signals (eigentlich nur die des Bandpassfilters), kann ohne Probleme per Software mittels Lookup-Tabelle erzeugt werden. Messtechnisch ist dies vollkommen zulässig. Analog gilt dies auch für Mehrfach-



färbungen z.B. Dapi, FITC oder Rhodamin, so sie denn mit getrennten Filtersätzen gemessen werden. Quantitative Auswertungen, wie Kollokalisierung oder Positiv-Negativ Kontrollen lassen sich an den unverrechneten Monochrom-Daten in der Regel wesentlich leichter durchführen.

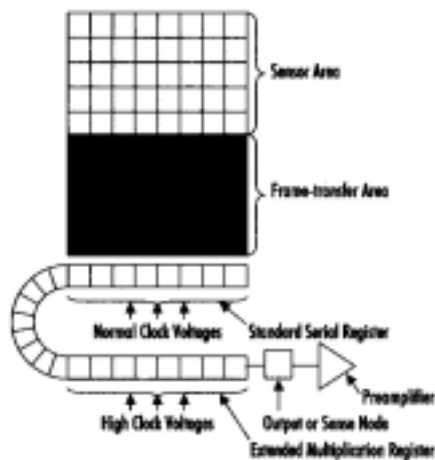


Abb. 5: „On-Chip Multiplication Gain“

„On-chip Multiplication Gain“

Die neue CCD-Technologie „On-Chip Multiplication Gain“ basiert auf der neuen „impact ionization“ Technologie. Durch eine zusätzliche Verstärkung der Elektronen bereits in einem verlängerten Schieberegister des CCD können Emp-

findlichkeiten bis in den Einzelphotonenbereich erreicht werden.

Aufwendige und teure Bildverstärkerkameras sind somit überholt bei besserer örtlicher Auflösung von 7,4 μm und höherer QE bis zu 60%.

Typische Anwendungen sind:

- SMF – Single Molecule Fluorescence
- Single Molecule Tracking
- Live Cell Imaging
- TIRF – Total Internal Reflection Microscopy
- Fast Kinetic Studies
- Particle Tracking

Die Autoren

Dipl.-Phys. Norbert Gulde
Applikationsspezialist

Helmut Wurm
Geschäftsführer

VisiTron Systems GmbH
Gutenbergstr. 9
82178 Puchheim
Fax: 089/890245-18
info@visiTron.de
www.visiTron.de

Easy Info Nr. • 000

VISITRON
SYSTEMS GmbH

Imaging · Mikroskopie

Gutenbergstraße 9 · D-82178 Puchheim
Tel.: 089/8902450 · Fax: 089/89024518