

# Grundlagen der konfokalen Laserscanning Mikroskopie

Die konfokale Laserscanning Mikroskopie hat in der Biologie und Medizin eine zentrale Bedeutung erlangt. Gegenüber der konventionellen Mikroskopie erhält man einen wesentlich besseren Kontrast und eine höhere Nachweisempfindlichkeit. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, Schichtaufnahmen aus verschiedenen Probentiefen zu machen und so ein dreidimensionales Bild zu konstruieren. Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie wurde erstmals in einem amerikanischen Patent aus dem Jahre 1957, das an M. Minsky vergeben wurde, beschrieben.<sup>1</sup>

Prof. Dr. Axel Donges/Isny im Allgäu

■ Damals – der Laser war noch nicht erfunden – fehlte es allerdings an den notwendigen starken Lichtquellen, sodass es noch zehn Jahre dauerte, bis Aufnahmen ausreichender Bildqualität veröffentlicht wurden.<sup>2</sup> In den 70er-Jahren wurde die Entwicklung des konfokalen Mikroskops stark vorangetrieben, sodass seit Mitte der 80er-Jahre ausgereifte Systeme zur Verfügung stehen. Die Anwendungen der konfokalen Mikroskopie sind sehr vielfältig. Die konfokale Mikroskopie hat sich vornehmlich in der Biologie und der medizinischen Forschung durchgesetzt. Aber auch im industriellen Anwendungsbereich – z.B. Rauigkeitsmessung, Vermessung dreidimensionaler Mikrohärteneindrücke, Schichtdickenmessung – hat die konfokale Mikroskopie große Bedeutung gewonnen. Die zahlenmäßig größte Anwendung hat das Prinzip der konfokalen Mikroskopie bei den CD-Playern bzw. CD-ROM-Laufwerken erfahren.<sup>3</sup>

## Geometrisch-optische Betrachtung

Das Grundprinzip der konfokalen Mikroskopie zeigt Abbildung 1: Eine Punktlichtquelle P wird mit einem Objektiv abgebildet. Die Punktlichtquelle wird durch eine kleine Lochblende, auf die ein Laserstrahl fokussiert wird, realisiert. Meist wird ein Argon-Ionen- oder HeNe-Laser eingesetzt. Liegt der Bildpunkt Q – wie in Abbildung 1 links dargestellt – auf dem zunächst unendlich dünn angenommenen Objekt, so wird der Punkt Q umgekehrt wieder in P bzw. wegen des Strahlteilers in P' abgebildet. Im Punkt P' befindet sich ein Punktdetektor, der das vom Objekt diffus reflektierte Licht oder das vom Objekt emittierte Fluoreszenzlicht nachweist. Der Punktdetektor wird praktisch durch eine kleine Lochblende realisiert, die die aktive Fläche des Detektors verringert. Durch Verschieben des Objekts senkrecht zur optischen Achse kann die Oberfläche Punkt für Punkt abgetastet werden. Auf diese Weise lässt sich ein zweidimensionales Bild gewinnen. Betrachten wir nun den Fall, dass das Objekt in Richtung der optischen Achse verschoben wurde, das Objekt sich also in Abbildung 1 in Position b) oder c) befindet. Die

Punktlichtquelle P wird nun unscharf auf das Objekt „abgebildet“. Anschließend wird der Beleuchtungsfleck Q nochmals unscharf in die Ebene des Punktdetektors „abgebildet“. Als Folge sinkt die vom Punktdetektor nachgewiesene Lichtleistung drastisch ab. Licht, das von außerhalb der Bildebene der Lichtquelle stammt, wird somit praktisch nicht registriert. Von dreidimensionalen Objekten lassen sich mit einem konfokalen Mikroskop optische Schnitte anfertigen. Objektteile, die außerhalb der Bildebene der Lichtquelle liegen, werden ausgeblendet und nicht – wie bei der konventionellen Mikroskopie – unscharf abgebildet. Es können optische Schnitte in verschiedenen Tiefen durchgeführt und so dreidimensionale Datensätze des Objekts gewonnen werden.

## Auflösungsvermögen

Wie beim konventionellen Mikroskop wird auch beim konfokalen Mikroskop das Auflösungsvermögen durch die Beugung begrenzt. Unter dem Auflösungsvermögen  $\Delta r$  wird der kleinstmögliche Abstand zweier Objektpunkte verstanden, bei dem die beiden Punkte gerade

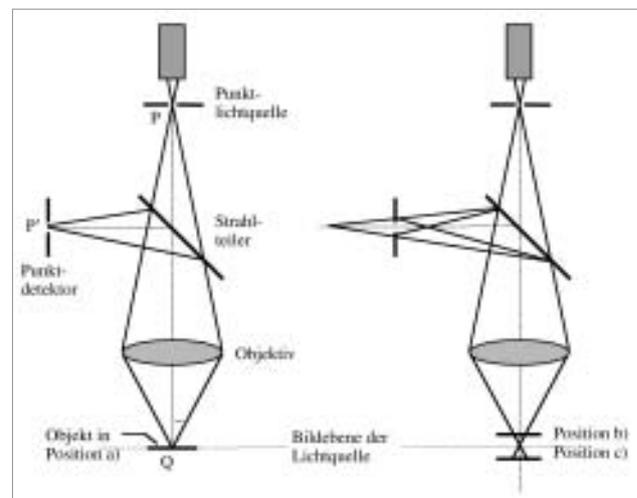


Abb.1: Prinzip der konfokalen Mikroskopie.