



Doctoral Thesis

Super-resolution fluorescence microscopy by structured light illumination

Author(s):

Frohn, Jan Tillman

Publication Date:

2000

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004064016> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH No. 13916

Super-Resolution Fluorescence Microscopy by Structured Light Illumination

Dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH

for the degree of
Doctor of Technical Sciences

presented by
Jan Tillman Frohn
Dipl. Phys.
born February 28, 1971
citizen of Germany

accepted on recommendation of
Prof. Dr. A. Stemmer, examiner
Prof. Dr. H. J. Tiziani, co-examiner

Zurich, 2000

Abstract

Optical far-field microscopes are essential tools for investigations in many disciplines in science and engineering. They combine convenient sample preparation with high imaging speed. Furthermore, the underlying physics of image formation in light microscopes are deeply understood. Therefore, image interpretation is much more evident than particularly in scanning probe techniques. Fluorescence microscopy additionally takes advantage of very specifically staining individual components of the object. Today, fluorescence microscopy has a large number of applications in biology and medicine.

Unfortunately, the resolution of optical far-field instruments is limited by the well known Rayleigh criterion. It predicts that two points cannot be distinguished if their lateral distance falls below approximately 240 nm in case of green light and oil-immersion objectives. During the last decade, various efforts have been undertaken to enhance the resolution of optical microscopes. The most common advancement in light microscopy is the confocal scanning microscope. By scanning a diffraction limited light spot through the specimen, the confocal microscope increases the lateral resolution by a factor of 1.5 under ideal conditions and, in addition, drastically enhances the optical sectioning capability.

In this thesis, a method called harmonic excitation light microscopy (HELM) is described which allows one to more than double the lateral resolution in fluorescence microscopy by illuminating the spec-

imen with a mesh-like interference pattern and electronic postprocessing of the images. The employed interference pattern covers the full field of view and can be shifted in two dimensions relative to the specimen by piezo actuators. Five images for different positions of the pattern are recorded by a camera. From these five images, additional information not accessible in conventional fluorescence microscopy can be extracted by an algebraic approach.

A setup producing harmonic excitation patterns in the object plane of a microscope by interference of laser beams has been realized. Images of artificial as well as biological samples show that HELM achieves a true optical resolution of approx. 100 nm. Therefore, HELM even outperforms the lateral resolving power of CFM by a factor of more than 1.5 and, additionally, avoids disadvantages of scanning methods.

A further part of the thesis deals with a three-dimensional extension of HELM. Basically, three-dimensional imaging is possible by stepping the focus through the object and acquiring a stack of two-dimensional images. However, the axial resolving power of conventional as well as confocal microscopes is far below the lateral one. By numeric simulations, a three-dimensional HELM device is shown to achieve an unrivaled resolution of approx. 100 nm laterally as well as axially. Since the system requirements for three-dimensional HELM are similar to those of confocal devices, it is expected that such systems could become a superior alternative to confocal ones, even from a commercial point of view.

Kurzfassung

Optische Fernfeldmikroskope sind unerlässliche Werkzeuge für Untersuchungen in vielen Gebieten von Forschung und Technik. Sie kombinieren einfache Probenpräparation mit hoher Abbildungsgeschwindigkeit. Außerdem sind die physikalischen Grundlagen der Bildentstehung in Fernfeldmikroskopen gut verstanden. Das macht die Bildinterpretation wesentlich einfacher als beispielsweise bei Rastersondenverfahren. Darüberhinaus ermöglicht die Fluoreszenzmikroskopie, einzelne Komponenten der Probe mit hoher Spezifität anzufärben. Auf Grund dieser Eigenschaft besitzt sie ein breites Anwendungsspektrum in Biologie und Medizin.

Leider ist das Auflösungsvermögen von optischen Fernfeldmikroskopen durch das bekannte Rayleighkriterium begrenzt. Es besagt, daß im Fall von grünem Licht und Ölimmersionsobjektiven zwei Punkte nicht unterschieden werden können, wenn ihr seitlicher Abstand kleiner als ungefähr 240 nm wird. Während des letzten Jahrzehnts sind viele Anstrengungen unternommen worden, um das Auflösungsvermögen von optischen Mikroskopen zu erhöhen. Die bekannteste Weiterentwicklung ist das konfokale Mikroskop. Indem beim konfokalen Mikroskop die Probe mit einem beugungsbegrenzt kleinen Lichtfleck abgerastert wird, kann einerseits die seitliche Auflösung um einen Faktor von maximal 1.5 erhöht und andererseits die Tiefenauflösung drastisch verbessert werden.

In dieser Arbeit wird eine Methode, genannt "harmonic excita-

tion light microscopy" (HELM), beschrieben, die es ermöglicht, die seitliche Auflösung von Fluoreszenzmikroskopen mehr als zu verdoppeln, indem die Probe mit einem gitterartigen Interferenzmuster beleuchtet wird und die aufgenommenen Bilder anschließend digital weiterverarbeitet werden. Das Interferenzmuster deckt das volle Gesichtsfeld ab und kann mittels Piezostellgliedern relativ zur Probe zweidimensional verschoben werden. Fünf Bilder für verschiedene Stellungen des Musters werden mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Aus diesen Bildern können zusätzliche Objektinformationen, welche mit normaler Fluoreszenzmikroskopie nicht zugänglich wären, mit einem algebraischen Ansatz rekonstruiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein System aufgebaut, welches ortsharmonische Beleuchtungsmuster mittels Interferenz von Laserstrahlen erzeugt. Bilder von sowohl künstlichen als auch biologischen Proben beweisen, daß HELM eine optische Auflösung von ungefähr 100 nm erreicht. Folglich übertrifft HELM das seitliche Auflösungsvermögen des konfokalen Mikroskops immer noch um einen Faktor von mehr als 1.5 und vermeidet außerdem die Nachteile von rasternden Verfahren.

Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigt sich mit einer dreidimensionalen Erweiterung von HELM. Grundsätzlich ist dreidimensionale Mikroskopie möglich, indem man einen Stapel von zweidimensionalen Bildern aufnimmt, während man den Fokus axial durch die Probe wandern lässt. Allerdings bleibt die axiale Auflösung sowohl des konventionellen als auch des konfokalen Mikroskops deutlich hinter der seitlichen Auflösung zurück. Numerische Simulationen zeigen, daß das Auflösungsvermögen eines dreidimensionalen HELM-Aufbaus sowohl seitlich als auch axial ungefähr 100 nm beträgt. Da die Systemanforderungen für ein solches Gerät denjenigen für konfokale Mikroskope ähneln, wird erwartet, daß ein dreidimensionales HELM-System eine überlegene Alternative zum konfokalen Mikroskop sein könnte, auch unter kommerziellen Gesichtspunkten.