



Versuchsanleitung: **IQ18 SLOT**

SCANNING LASER OPTICAL TOMOGRAPHY

Wintersemester: 2014/2015

erstellt von Friso Öhlschläger und Frederik Hahn, überarbeitet von Lena Nolte
Betreuung: Georgios Antonopoulos & Lena Nolte



für das Laborpraktikum Atom- und Molekülphysik
der Leibniz Universität Hannover

Zusammenfassung

In dieser Versuchsbeschreibung geben wir Ihnen einen kurzen Überblick über den Begriff der Tomografie. Die Scanning Laser Optical Tomography (SLOT), soll in diesem Versuch näher untersucht und erforscht werden.

Dazu gehören natürlich auch einige Sicherheitsanweisungen, die Sie bei Ihrer Arbeit im Labor zu Ihrem eigenen Schutz beachten sollten und auf die wir Sie im zweiten Kapitel hinweisen möchten. Außerdem sollten Sie sich vor der Durchführung im Labor über ein paar wichtige Grundlagen und Begriffe informieren, die immer wieder in dem Kontext zu SLOT auftauchen. Diesen Hintergrund zu SLOT werden wir im dritten Kapitel einführen.

Im vierten Kapitel geht es dann los mit dem Versuch SLOT. Dazu werden zunächst die zum Aufbau gehörigen Bauteile und Komponenten erklärt. Am Arbeitsplatz finden Sie auch einen Rechner mit entsprechender Software, die für diesen Versuch entwickelt wurde. Dazu geben wir Ihnen hier eine kurze Bedienungsanleitung. Anschließend finden Sie die Aufgaben, die im Rahmen dieses Fortgeschrittenenpraktikums zu bewältigen sind.

Für weitere Informationen finden Sie im letzten Kapitel weitere Literatur, mit der Sie sich näher zu diesem Versuch beschäftigen können.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Tomografie	2
1.2	Scanning Laser Optical Tomography (SLOT)	2
2	Sicherheitsmaßnahmen	2
3	Grundlagen und Hintergrund	4
3.1	Wichtige physikalische Begriffe	4
3.2	Die Theorie von SLOT	4
4	Der Versuch - SLOT	5
4.1	Der Aufbau	5
4.2	Die Software	5
4.3	Bedienungsanleitung SLOT-Control	5
4.4	Die Aufgaben	9
5	Beispielmessung Zahn	10
5.1	Rekonstruktion einer Aufnahme mit IMOD	10
5.1.1	Kommandozeileneingabe	10
5.1.2	Rekonstruierte Aufnahmen	11
6	Weiterführende Literatur und Quellen	13
6.1	Literatur	13
6.2	Internetquellen	13

1 Einleitung

In diesem Versuch im Rahmen des Fortgeschrittenenpraktikums der Vorlesung »Atom- und Molekülphysik« geht es um ein spezielles dreidimensionales Tomografie-Verfahren, das mit Lasern verschiedener Wellenlängen arbeitet und über drei physikalische Kontrastmechanismen verfügt: **Streuung**, **Absorption** und **Fluoreszenz**. Im Folgenden erhalten Sie einen kurzen Überblick, der Sie mit dem Begriff der Tomografie bekannt macht und das Verfahren **SLOT** vorstellt.

1.1 Tomografie

Tomografie ist ein allgemeiner Begriff für ein bildgebendes Verfahren. Tomographieverfahren setzen ein dreidimensionales Objekt in eine Vielzahl zweidimensionaler Schnitte (Tomogramme) durch das Objekt um. Auf diese Weise ist es möglich Scheiben aus dem Objekt heraus zu schneiden ohne das Objekt an sich zu berühren oder gar zu zerstören. Mit diesen Schnittbildern kann also die innere Struktur eines Objekts untersucht werden. Aus einer Serie dieser Bilder kann eine dreidimensionale Rekonstruktion der Probe errechnet und als ausgedehntes Volumen dargestellt werden.

Die Tomografie findet häufigen Einsatz in der Medizin. Beispiele sind die Computertomografie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT). Aber auch in anderen Bereichen wird mit tomografischen Methoden gearbeitet, beispielsweise in den Geowissenschaften (Seismische Tomografie) und auch in der Physik (Optische Kohärenztomographie (OCT), SPIM, acousto-optical tomography, Optical Projection Tomography und Scanning Laser Optical Tomography).

1.2 Scanning Laser Optical Tomography (SLOT)

Auf Basis der OPT wurde nun ein relativ junges Verfahren entwickelt, das im Folgenden vorgestellt wird und das Kernthema dieses Praktikumsversuchs bildet.

Funktionsweise: SLOT basiert auf einem x-y-Scanner-System mit zwei Silberspiegeln, das den fokussierten Laser über die Probe leitet. Der Fokus liegt durch die Abbildungsoptik genau in der Probenkammer. Dort befindet sich eine Küvette gefüllt mit Wasser oder Glycerin, in der sich beispielsweise eine Kapillare mit der Probe befindet. Ein Motor lässt die Kapillare rotieren. Das transmittierte Laserlicht wird von einer Photodiode hinter der Probenkammer aufgefangen.

Häufig wird die Probe durch den Laser zur Fluoreszenz angeregt. Das durch diese Fluoreszenz ausgesendete Licht wird mit einem Linsensystem bestehend aus zwei plankonvexen Linsen mit einem dazwischen liegenden Fluoreszenz-Filter gesammelt und auf die sensitive Fläche eines PMT (Photomultiplier, engl. photomultiplier tube) geleitet. Die Auflösung der Aufnahmen kann mit der Software noch innerhalb der durch den Aufbau gegebenen Grenzen angepasst werden kann.

In Abbildung 1 kann der Vergleich einer solchen Transmissions- und Fluoreszenzmessung betrachtet werden. Die Probe besteht aus Agarose mit Fluoreszenzkügelchen (Volumenanteil von 25 : 10000).

Gelegentlich ist man interessiert an Proben, die nicht transparent zu sein scheinen. Vor Beginn eines solchen Scans muss die Probe aufgeklärt werden, d.h. sie wird transparenter gemacht, um für eine gute Transmission zu sorgen. Ein Beispiel hierfür ist die Untersuchung eines menschlichen Zahns, auf die später noch einmal genauer eingegangen wird.

2 Sicherheitsmaßnahmen

Wenn Sie im Rahmen dieses Praktikums im Labor arbeiten, müssen Sie natürlich aus Sicherheitsgründen einige Vorschriften kennen und beherzigen. Lesen Sie dazu bitte die Dokumente:

- Laborordnung Labor 20
- Sicherheitsanweisungen für HiWis, Praktikanten und Studenten sowie

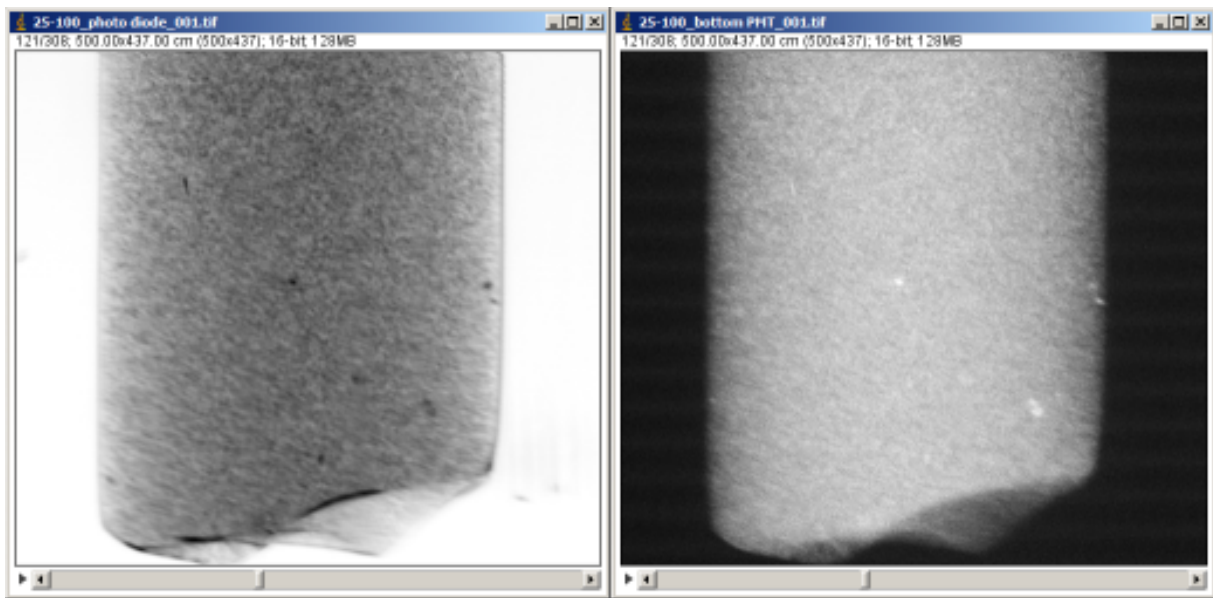


Abbildung 1: Vergleich der Transmissions- und Fluoreszenzmessung

- SLOT | Dos & Don'ts

Diese Dokumente bekommen Sie von Ihrem Betreuer noch vor Beginn der Laborarbeiten. Eine weitere, notwendige und wichtige Maßnahme, um Ihre Sicherheit zu gewährleisten, ist die **Laserschutzseinweisung**. Diese erhalten Sie von Ihrem Betreuer bzw. von dem zuständigen Sicherheitsbeauftragten des LZH und/oder in der Vorlesung.

Im Labor sind einige Vorschriften zu beachten (z.B. im Bezug auf Laserschutzbrillen, Laserwarnleuchte, Laserschutzvorhang etc.). Die genauen Maßnahmen erfahren Sie vor Ort.

3 Grundlagen und Hintergrund

In diesem Kapitel geht es um ein paar physikalische Begriffe, die bei SLOT eine wichtigere Rolle spielen. Außerdem wird ein kurzer Blick auf die Theorie geworfen, die hinter diesem Versuch steckt.

3.1 Wichtige physikalische Begriffe

Über folgende Begriffe, die Sie wahrscheinlich schon einmal gehört haben, sollten Sie Bescheid wissen und „handhaben“ können. Mit den Begriffen werden Sie verstehen wie der Versuchsaufbau funktioniert, können tiefergehende Fragen verstehen und sich überlegen, wie Einstellungen im späteren Verlauf der Versuchs gewählt werden sollten, um bessere Aufnahmen zu erzielen.

- Numerische Apertur
- Brechungsindex
- Schärfentiefe
- Gaußsche Optik
- Mikroskop
- Fokus
- Fluoreszenz
- Absorption
- Transmission

3.2 Die Theorie von SLOT

Die Signalerfassung von SLOT basiert auf Integration von Strahlen durch die Probe. Bei dieser sogenannten Radontransformation wird eine zweidimensionale Funktion $f(x, y)$ entlang einer Schar von Linien, die über ihren Abstand p zum Ursprung und ihren Winkel ϕ zur y -Achse definiert sind, integriert (Integrationsparameter s). Die Radontransformation ist invertierbar.

$$\text{lin}_{p,\phi} = \begin{pmatrix} p \cos \phi - s \sin \phi \\ p \sin \phi + s \cos \phi \end{pmatrix} \quad (3.1)$$

Als Radontransformierte dieser Linienschar erhalten wir:

$$R(p, \phi) = \int_{-\infty}^{+\infty} ds f(p \cos \phi - s \sin \phi, p \sin \phi + s \cos \phi) \quad (3.2)$$

(Beispielhafte Erläuterung zu den folgenden Begriffen auch in Abschnitt 5):

- Radon-Transformation
- Sinogramm
- Rekonstruktion der Aufnahmen mittels Software (IMOD, Fiji)

4 Der Versuch - SLOT

4.1 Der Aufbau

Der Versuchsaufbau ist in den Abbildungen 2 und 3 zu erkennen.

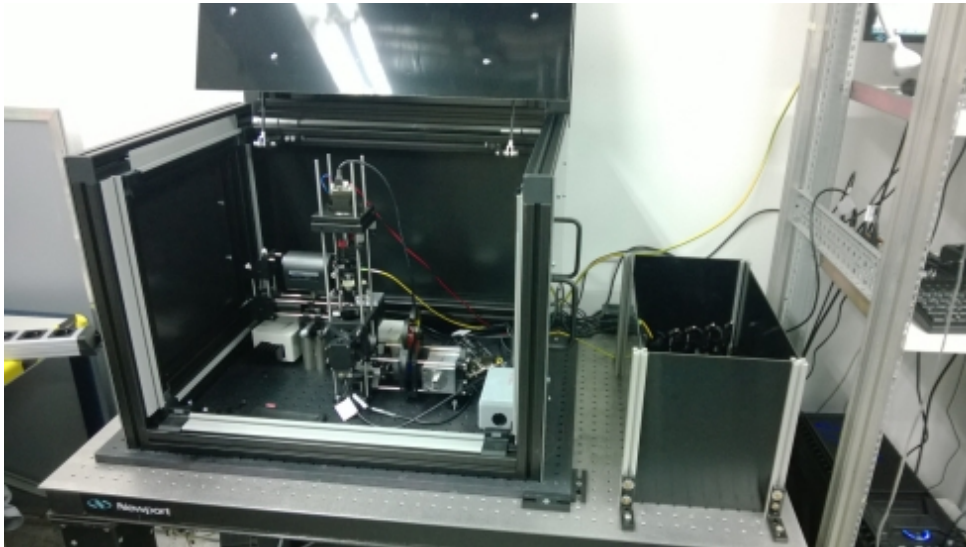


Abbildung 2: Übersicht FP-SLOT

Die Funktionsweise wird deutlich, indem wir den Weg des eingekoppelten Laserstrahls verfolgen. Die folgenden Bauteile werden in der angegebenen Reihenfolge durchlaufen:

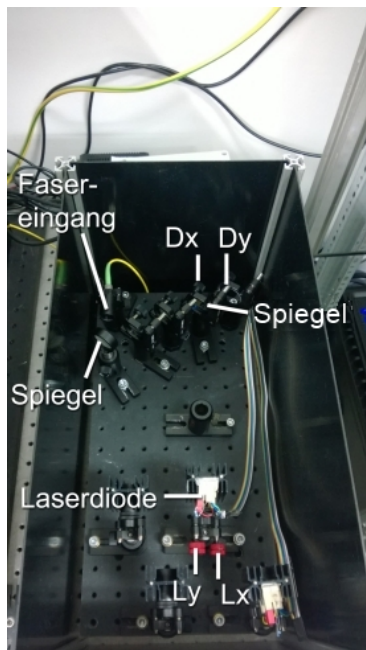
1. Glasfaser
2. motorisiertes Zoomobjektiv
3. y-Scanner
4. Steinheil-Tripletts
5. x-Scanner
6. Abbildungslinse
7. Probenkammer
8. Blende und Photodiode beziehungsweise
9. Glasfaserbündel, Filterrad und PMT

4.2 Die Software

Zur Versuchsdurchführung gehört neben den handwerklichen Tätigkeiten auch das Bedienen der zum Versuch gehörenden Software, die auf dem Rechner am Arbeitsplatz im Labor installiert ist. Dazu geben wir Ihnen hier eine kurze Bedienungsanleitung.

4.3 Bedienungsanleitung SLOT-Control

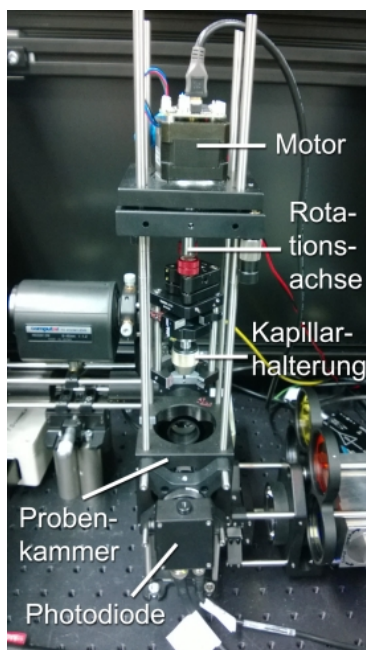
Die Anwendung Slot-Control besteht aus einigen Modulen, die in Fenstern separat voneinander zu bedienen sind. Im Folgenden werden die einzelnen Bedienelemente vorgestellt.



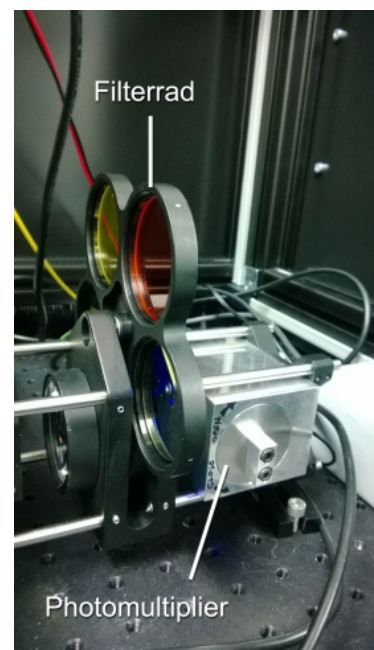
(a) 1: Einkopplung der Laserdioden



(b) 2: Teleskop und Scanner



(c) 3: Turm mit Rotationsachse



(d) 4: Filterrad und PMT

Abbildung 3: Module des Versuchsaufbaus

- *Laser-Ansteuerung* (Abb. 4): In diesem Fenster können alle verbauten Laserdioden einzeln an und aus geschaltet werden. **Achtung:** Ist eine Laserdiode eingeschaltet, so führt ein Wechsel der Diode (Wellenlänge) unmittelbar dazu, dass der zweite Laser eingeschaltet wird. Der on/off Schalter ist unabhängig von der ausgewählten Diode!

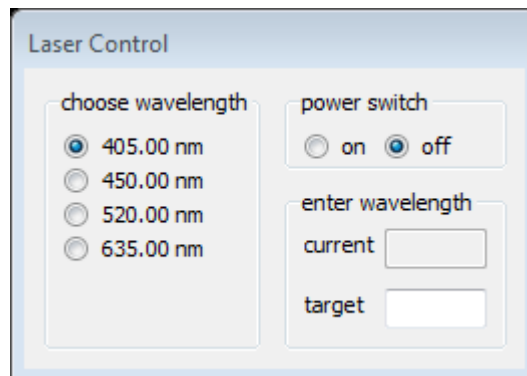


Abbildung 4: Laser-Ansteuerung

- *Live-Capture* (Abb. 5): Für diesen Versuch ist lediglich der mittlere Button relevant. Durch Starten des Live-Capture-Modus können die derzeitigen „Sichtfelder“ von PMT und Photodiode betrachtet werden. Die Bild-Aktualisierungsrate und Auflösung ist durch das Bildaufnahmefenster bestimmt. **Achtung:** Werden Aufnahmeeinstellungen verändert solltet ihr den Live-Capture-Modus beenden, da das Programm ansonsten dazu neigt abzustürzen.

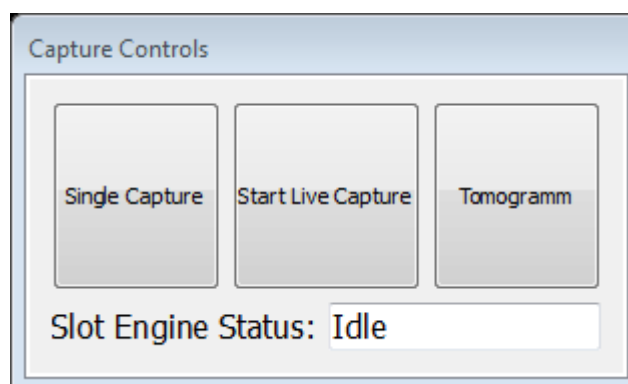


Abbildung 5: Live-Capture

- *Bildaufnahmefenster* (Abb. 6): Hier kann die gewünschte Auflösung eingestellt werden. Das Programm schlägt eine Integrationszeit der Aufnahmen (in Klammern bei „total scan time“) vor, es ist jedoch möglich diese manuell anzupassen.
- *Detektorfenster* (Abb. 7a): Für Photo Diode und PMT gibt es jeweils ein Fenster in dem das aufgenommene Bild dargestellt wird. **Achtung:** Zu Beginn solltet hier immer der „show saturation“ Button aktiviert sein. Eine mögliche Übersteuerung von PMT und Photo Diode wird dann in grün oder rot an den entsprechenden Pixeln dargestellt. Außerdem kann hier kann die Verstärkungsspannung des PMT eingestellt werden. Bei geöffnetem Gehäuse muss der Regler auf Null stehen!
- *Motor-Ansteuerung* (Abb.7b): In diesem Fenster kann die Rotation des Motors eingestellt werden. Es kann die Geschwindigkeit der Rotation verändert und eine gewünschte Position eingestellt werden. Dabei spielt es keine Rolle ob der visuelle Regler verwendet oder die Gradänderung mit der Tastatur eingegeben wird. **Achtung:** Den Stecker für den Motor erst einstecken, wenn die USB-Verbindung hergestellt ist!

- *Speichern einer Aufnahme* (Abb.7c): Das Eingabefenster ist selbsterklärend. Es sollten möglichst viele Informationen eingetragen werden, das erleichtert die spätere Auswertung. **Achtung:** Bevor die Aufnahme gestartet wird, muss der Live-Capture-Modus beendet werden!

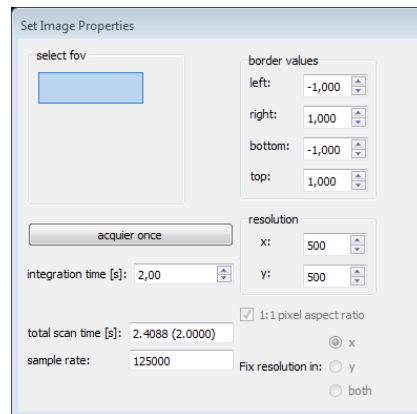
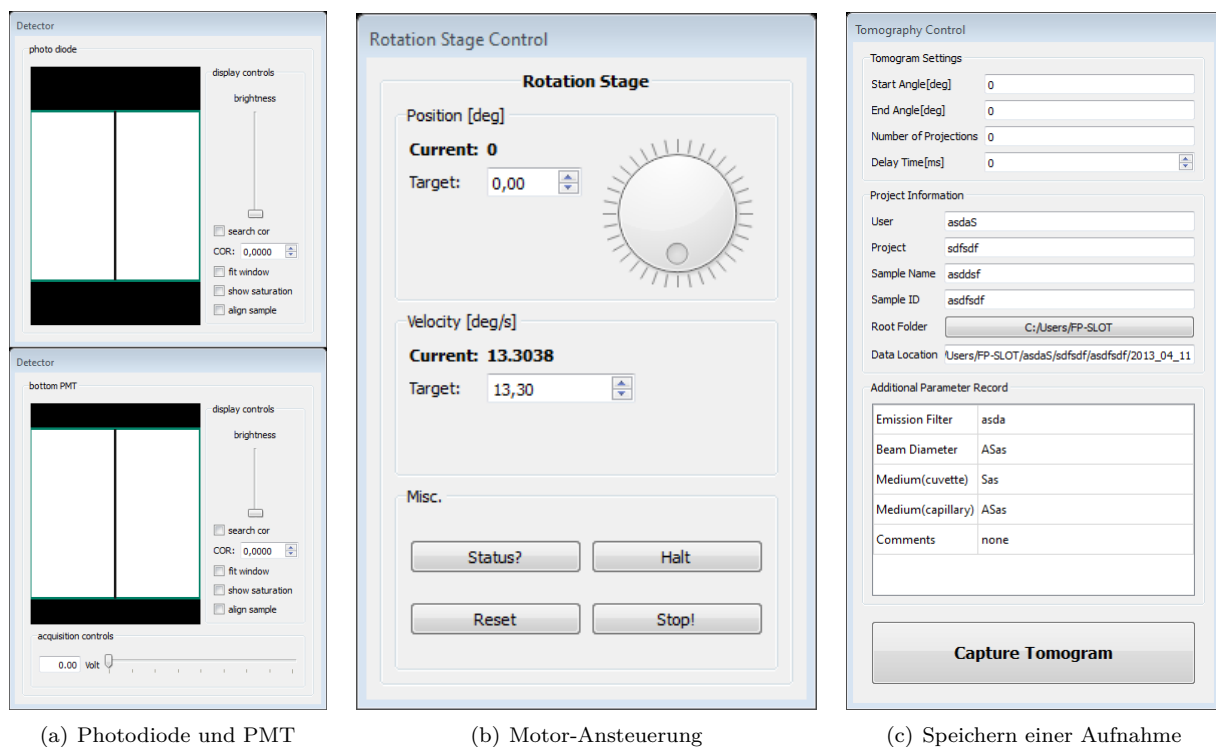


Abbildung 6: Bildaufnahmefenster



(a) Photodiode und PMT

(b) Motor-Ansteuerung

(c) Speichern einer Aufnahme

Abbildung 7: Fenster SLOT-Control

4.4 Die Aufgaben

Part 1 | Justage

- Lichtquelle
 - Justage: Überlagerung der Strahlen und Einkopplung in den Faserkern
 - Zusätzliche Hilfsmittel: Webcam
- Rotationsachse
 - Verkipfung in Richtung optische Achse
 - Verkipfung parallel zur Scanebene

Part 2 | Charakterisierung

- Bestimmung des Auflösungsvermögen mithilfe des USAF-Target. Modulationstransferfunktion bestimmen unter Variation von
 - Wellenlänge
 - Strahldurchmesser
 - Fokussierung
- Berücksichtigung des Abtasttheorems (Nyquist)

Part 3 | Anwendung

- Testprobe Heuschreckengehirn: Aufnahme ...
 - ...mit verschiedenen Kontrastmechanismen
 - ...für verschiedene Pixelzahlen (Berücksichtigung von Nyquist)
 - ...bei verschiedenen Fokussierungen
 - ...mit verschiedenen Strahldurchmessern
 - ...mit verschiedenen Rotationsbereichen bzw. mit unterschiedlicher Anzahl an Rotationen
 - ...mit verschiedenen Integrationszeiten → Signal vs. Rauschen berechnen

Achtung: Wird eine Variable verändert, so sollten alle anderen konstant gehalten werden.
Ausnahme: Wie könnten verschiedene Rotationsbereiche verschiedene Fokussierungen verlangen?

- Optional: Eigene Proben aufklaren und messen (Bitte frühzeitig im Praktikum anmerken!)

5 Beispielmessung Zahn

Exemplarisch wird im Folgenden die Tomographie eines menschlichen Zahns erläutert: Zähne scheinen zunächst nicht für die Erfassung mittels SLOT geeignet, da sie das Umgebungslicht stark streuen und daher nicht transparent erscheinen. Dennoch ist es möglich Transmissionsaufnahmen von Zähnen zu erstellen, indem die Probe zunächst aufgeklärt wird. Die von der Photodiode aufgenommenen Bilder sind in Abbildung 8 dargestellt (Darstellung mit *ImageJ/Fiji*).

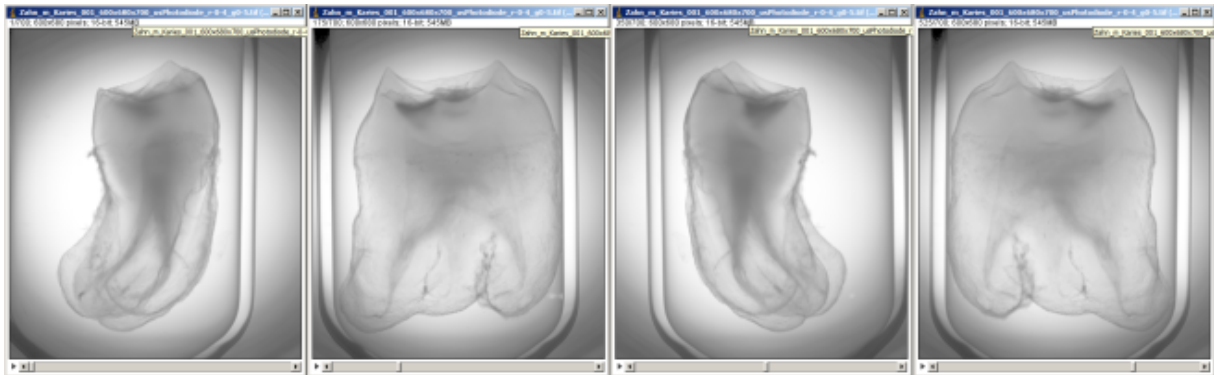


Abbildung 8: Aufnahme eines von Karies befallenen Backenzahns

Es ist nun mithilfe von IMOD möglich aus dieser Aufnahme im *.tif*-Format virtuelle Schnitte durch die Probe zu berechnen. Das Programm greift dabei auf die oben beschriebene Radontransformation zurück.

5.1 Rekonstruktion einer Aufnahme mit IMOD

5.1.1 Kommandozeileingabe

- Um die aufgenommenen Daten zu rekonstruieren wird wie bereits erwähnt *IMOD* und *Fiji* (oder *ImageJ*) benötigt
- Nach Installation muss „Deinterlace_.class“ in den Plugin Ordner von Fiji kopiert werden
- Bevor ihr mit Fiji arbeitet müsst ihr unter Edit>Options>Input/Output einen Haken bei „Save TIFF and raw in Intel byte order“ setzen
- Durch Drag & Drop kann eine Aufnahme in Fiji geladen werden
- Führe den Deinterlace durch
- Speicher die Korrigierte Datei unter einem neuen Namen als Tif-Datei **Achtung: Für die spätere Rekonstruktion darf kein Leerzeichen im Pfad-/Dateiname sein.**
- Öffne den Terminal (z.B. cmd.exe) und gehe in den Ordner in dem deine zu rekonstruierende Datei liegt. (Um den Ordner/Pfad zu wechseln verwendet den Befehl: cd .. (siehe Abbildung 9).)
- *tilt* kann nur MRC-Dateien verarbeiten. Deshalb muss die Tif-Datei mit Hilfe von *tif2mrc* in eine MRC-Datei konvertiert werden (Kommandozeile: `tif2mrc „SLOT_PMT.tif“ „SLOT_PMT.mrc“`) (siehe Abb. 9)
- Führe *tilt* aus. Dafür wird die Kommandozeile nach folgendem Prinzip geschrieben:
`tilt -thickness „Nx“ -offset „0 Δx“ -tiltfile „winkel.txt“ -input „SLOT_PMT.mrc“ -output „SLOT_PMT_rec.mrc“ -slice „y1 y2“` (siehe Abb. 9)
 Dieses Programm braucht einige Informationen über die Datei um sie erfolgreich zu rekonstruieren:
 - Nx = Anzahl der Pixel in x-Richtung

- Δx = offset der Rotationsachse; bei $\Delta x = 0$ geht tilt davon aus, dass die Rotationsachse genau in der Mitte des Bildes liegt. Ist dies nicht der Fall werden in dem rekonstruierten Bild so genannte Ringartefakte erzeugt (siehe unten). Um diese zu minimieren gibt der offset an um wieviele Pixel die Rotationsachse von der Bildmitte verschoben ist.
 - Eine Datei, welche für jedes aufgenommene Bild den entsprechenden Rotationswinkel angibt (z.B. Winkel.txt; hier sollen alle Winkel untereinander aufgelistet sein; bei Dezimalzahlen mit einem Punkt abtrennen). INFO: Die SLOT Software nimmt immer 2 Bilder mehr auf als Ursprünglich angegeben. Sollte die Probe beispielsweise unter 500 Winkeln abgebildet werden wird anschließend zusätzlich eine Aufnahme bei 360° und eine Aufnahme bei 0° (also eine komplette Drehung zurück) aufgenommen. Die letzten beiden Bilder sind also identisch zu dem ersten aufgenommenen Bild.
 - Eine Eingangsdatei (z.B. SLOT_PMT.mrc). Bei dieser Datei soll der Deinterlace schon korrigiert sein.
 - Der Name der rekonstruierten Datei (z.B. SLOT_PMT_rec.mrc)
 - Optional: Einen Ebenenbereich $y_1 - y_2$ der rekonstruiert werden soll. *tilt* beschränkt die Rekonstruktion dann auf eine Ebene, was enorm zeitsparend ist.
 - Der Befehl -slice „ $y_1 y_2$ “ ist dabei optional. Wenn eine NVIDIA Grafikkarte zur Verfügung steht sollte -UseGPU 0 angehängt werden. Dadurch wird die benötigte Berechnungszeit verkürzt.
 - Eine detaillierte Beschreibung aller Eingabeoptionen ist zu finden unter:
<http://bio3d.colorado.edu/imod/doc/man/tilt.html>
- Wenn alles richtig eingegeben wurde habt ihr nach etwas Rechenzeit ein rekonstruiertes Bild.

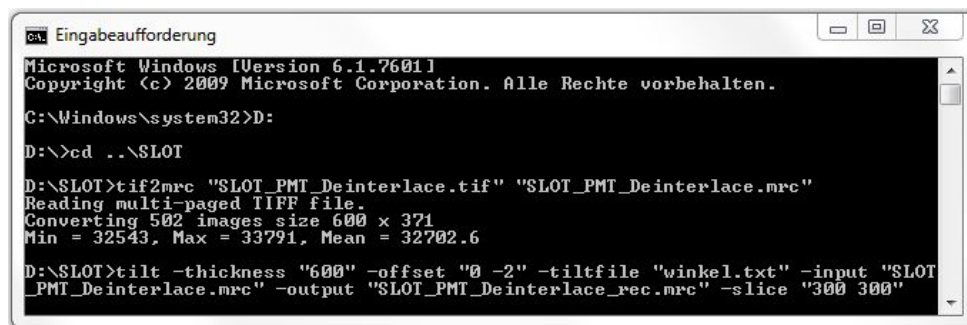


Abbildung 9: Beispielergabe cmd-Terminal. Hier wird nur Ebene 300 rekonstruiert.

5.1.2 Rekonstruierte Aufnahmen

Wird wie oben beschrieben vorgegangen, so erhalten wir die folgenden Tomogramme in Abbildung 10:

Zwar ist in diesen Bildern bereits zu erahnen wie Schnitte durch den Zahn aussehen, die Aufnahmen sind jedoch offensichtlich mit einem systematischen Fehler belegt. So werden aus eigentlich scharfen Strukturen Ringe. Dies kommt dadurch zustande dass die Rotationsachse nicht korrekt an *tilt* übertragen wurde. Wie bereits erwähnt erwartet *tilt* die Rotationsachse in der Mitte des Bildes ($\Delta x = 0$). Ist diese aber um einige Pixel im Bild nach rechts oder links verschoben entstehen solche Ringartefakte. Damit dieses nicht erst nach der Rekonstruktion einer gesamten Aufnahme auffällt sollte zunächst für eine Ebene oben und unten im Bild (die aber trotzdem das Objekt beinhaltet) mehrere Rekonstruktionen für verschiedene Δx durchgeführt werden um zu sehen wann diese Ringartefakte am kleinsten sind. Ist für die obere und untere Ebene der gleiche Offset bestimmt worden, kann dieser für die Rekonstruktion der gesamten Aufnahme verwendet werden. Ein unterschiedlicher Wert für beide Offsets bedeutet, dass die Rotationsachse nicht nur verschoben sondern auch verkippt ist. Diese Verkipfung kann mit Hilfe der beiden Offset-Werte in *Fiji* korrigiert werden.

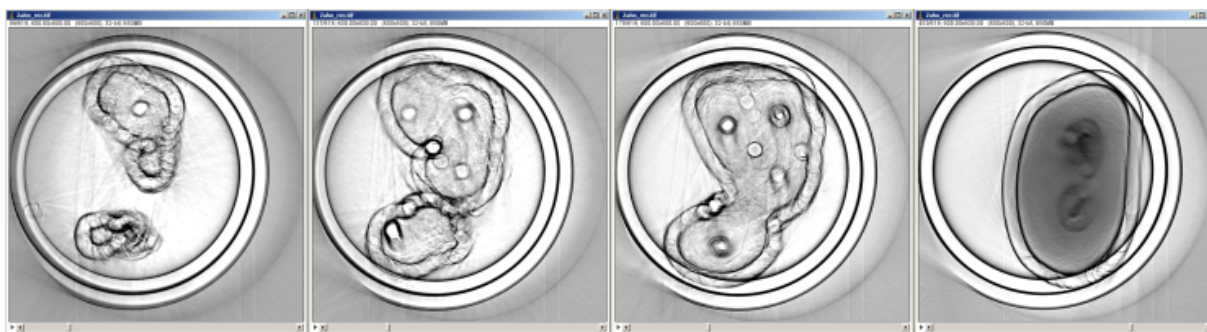


Abbildung 10: Fehlerbehaftete Rekonstruktion

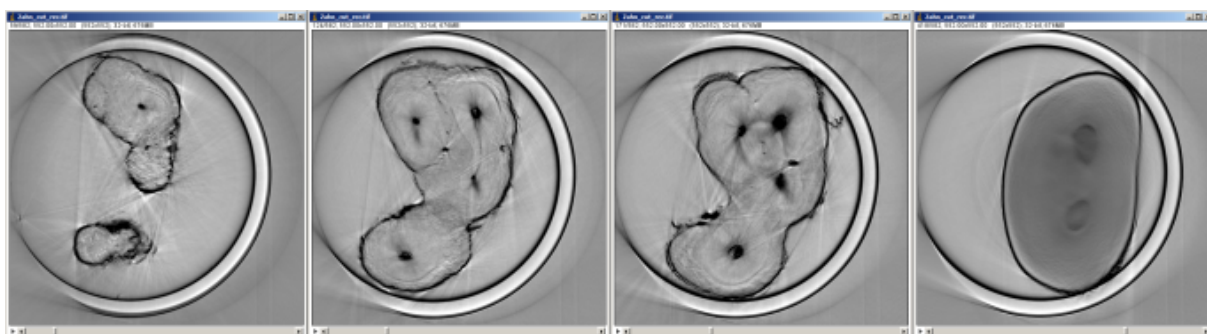


Abbildung 11: Gelungene Rekonstruktion

Es ist mit *Fiji* möglich auch in anderen Winkeln Schnitte durch die Probe zu betrachten. Weitere Screenshots für die oben rekonstruierte Aufnahme sind in Abbildung 12 dargestellt.

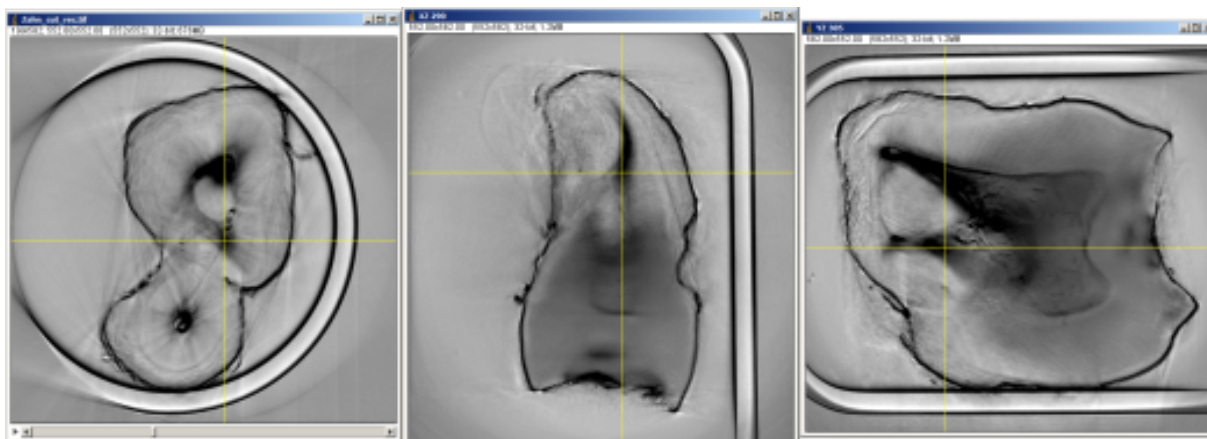


Abbildung 12: Orthogonale Schnitte durch die Probe

6 Weiterführende Literatur und Quellen

6.1 Literatur

- Wolfgang Demtröder, Experimentalphysik 2 (Elektrizität und Optik)
- R.-A. Lorbeer et al.: Highly efficient 3D fluorescence microscopy with a scanning laser optical tomograph, 2011, Optics Express, OSA, <http://www.opticsinfobase.org/oe/viewmedia.cfm?uri=oe-19-6-5419&seq=0>;
- J. Sharpe et al.: Optical Projection Tomography as a Tool for 3D Microscopy and Gene Expression Studies, 2002, Science;
- R.-A. Lorbeer et al.: Dreidimensionale und effiziente Erfassung mesoskopischer Proben, 2013, Bio-Photonik
- A. C. Kak and Malcolm Slaney, Principles of Computerized Tomographic Imaging, IEEE Press, 1988.

6.2 Internetquellen

- Fiji, <http://fiji.sc/Fiji>
- IMOD, <http://bio3d.colorado.edu/imod/doc/guide.html> („tilt“)