

Praktikum Mechatronische Messsysteme

Wintersemester 2019/2020

Protokoll zum

Versuch 1: Konfokale Mikroskopie



Betreuerin: Beate Dutschk

Gruppe B

Zhicong Wu

Haowei Xi

Jianping Zhang

Inhaltsverzeichnis

Aufgabe 1: Das konfokale Prinzip.....	1
Konfokalmikroskop.....	1
Das konfokale Prinzip.....	1
Strahlengang von der Lichtquelle zum Präparat.....	2
Strahlengang vom Präparat zur Detektionslochblende.....	2
Aufgabe 2: Grundlagen.....	3
Aufgabe 3: Oberflächentopografie.....	5
Aufgabe 4: Verbesserung.....	8
Aufgabe 5: Mehrfachaufnahme.....	11
Literaturverzeichnis.....	13
Anhang.....	14

Aufgabe 1: Das konfokale Prinzip

Konfokalmikroskop

Ein Konfokalmikroskop ist ein spezielles Lichtmikroskop. Im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie wird nicht das gesamte Präparat beleuchtet, sondern zu jedem Zeitpunkt nur ein Bruchteil davon, in vielen Fällen nur ein kleiner Lichtfleck. Diese Beleuchtung wird Stück für Stück über das Präparat gerastert. Im Mikroskop entsteht also zu keinem Zeitpunkt ein vollständiges Bild.

Die Lichtintensitäten des reflektierten oder durch Fluoreszenz abgegebenen Lichtes werden folglich nacheinander an allen Orten des abzubildenden Bereiches gemessen, so dass eine anschließende Konstruktion des Bildes möglich ist. Im Strahlengang des detektierten Lichts ist eine Lochblende angebracht, die Licht aus dem scharf abgebildeten Bereich durchlässt und Licht aus anderen Ebenen blockiert. Dadurch gelangt nur Licht aus einem kleinen Volumen um den Fokuspunkt zum Detektor, so dass optische Schnittbilder mit hohem Kontrast erzeugt werden, die fast nur Licht aus einer schmalen Schicht um die jeweilige Fokusebene enthalten.

Das konfokale Prinzip

In einem Konfokalmikroskop wird eine punktförmige Lichtquelle in das Präparat abgebildet. Von der so beleuchteten Stelle wird Licht durch das Objektiv auf eine Lochblende fokussiert, bevor es den Detektor erreicht. Der Punkt in der Mitte der Lochblende und der Beleuchtungspunkt im Präparat sind dabei konfokal zueinander, das heißt, sie sind gleichzeitig im Fokus.

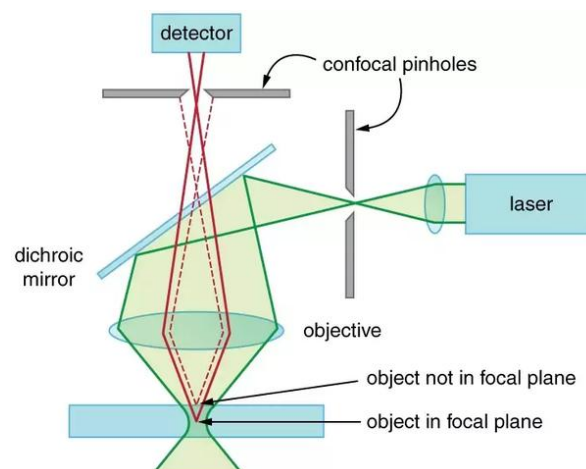


Abbildung 1: Schemazeichnung des konfokalen Prinzips

Strahlengang von der Lichtquelle zum Präparat

Das von der Lichtquelle kommende Licht (in der Schemazeichnung grün) wird zunächst in die Anregungslochblende fokussiert, um eine punktförmige Lichtquelle zu erzeugen.

Die Beleuchtung wird auf einen Strahlteiler weitergeleitet. Bei Weißlichtmikroskopie wird ein halbdurchlässiger Spiegel eingesetzt, der einen ausreichenden Anteil der Beleuchtung zum Präparat spiegelt. Soll Fluoreszenz im Präparat nachgewiesen werden, wird ein dichroitischer Spiegel eingesetzt, der das Anregungslicht spiegelt, das Fluoreszenzlicht aber durchlässt. Schließlich wird durch das Objektiv im Präparat ein verkleinertes Bild der Anregungslochblende projiziert. Aufgrund der Beugung entsteht am Fokuspunkt ein Beugungsscheibchen (genauer: eine Punktspreizfunktion) und kein tatsächlicher Punkt.

Strahlengang vom Präparat zur Detektionslochblende

Vom beleuchteten Punkt im Präparat geht das nachzuweisende Licht aus (Rote durchgezogene Linie in der Schemazeichnung). Dabei kann es sich um reflektiertes Licht oder um Fluoreszenz handeln.

In den meisten Präparaten wird Licht nicht nur vom tatsächlich beleuchteten Punkt im Präparat ausgesandt, sondern auch von Stellen darüber oder darunter (rot gepunktete Linie in der Schemazeichnung). Beispielsweise werden Fluoreszenzfarbstoffe auch in Ebenen über und unter der Schärfenebene angeregt.

Das von diesen Punkten kommende Licht wird jedoch nicht in der Zwischenbildebene, sondern in davor oder dahinter liegenden Ebenen zu einem Punkt vereint, so dass die Lichtstrahlen von diesen Punkten in der Zwischenbildebene als Strahlkegel vorliegen. Der überwiegende Teil dieser Strahlkegel wird deshalb durch die Lochblende blockiert, so dass am Detektor nur sehr wenig Licht ankommt, das nicht vom Fokuspunkt im Präparat ausgesandt wurde.

Optische Information, die nicht aus dem Fokuspunkt des Präparats kommt, wird somit doppelt unterdrückt: Erstens wird sie nicht „abgefragt“, da die Beleuchtungsintensität außerhalb des Fokus schwach ist, und zweitens wird Licht von außerhalb des Fokuspunkts an der Lochblende fast vollständig blockiert. Dadurch werden eine deutliche Kontrastverbesserung und auch eine etwas bessere Auflösung erzielt.

Aufgabe 2: Grundlagen

Das Ziel der Aufgabe ist die Anfertigung eines konfokalen z-Stack. Zur Erzielung müssen wir zuerst eine Probe und einen geeigneten Bereich mit einer charakteristischen Oberflächenstruktur auswählen. Hier wählen wir eine 1-cent Münze und die ausgewählte Bereich ist das rote Rechteck wie folgt:

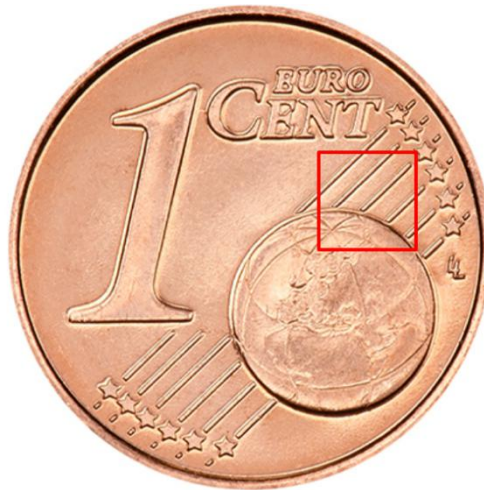


Abbildung 2: 1-Cent Münze(keine Münze im Praktikum)und die ausgewählte Bereich(rotes Rechteck)

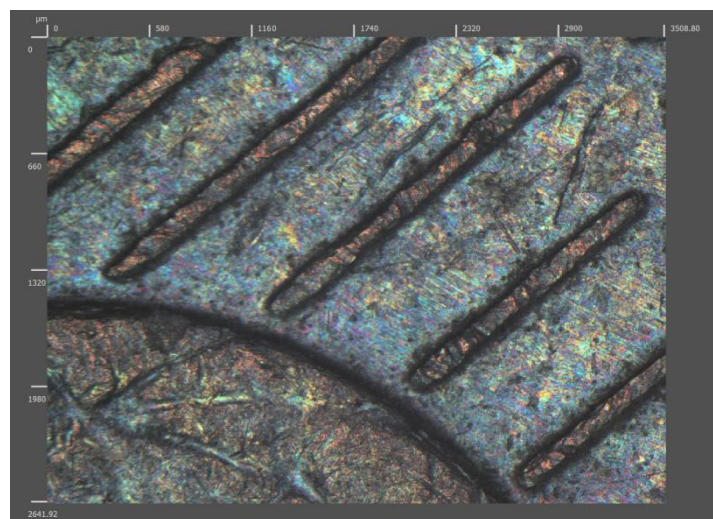


Abbildung 3: Oberflächendarstellung der ausgewählten Bereich

Dann bestimmen wir die Werte für die z-Ebenen. Dazu variieren wir die Höheneinstellung im Modus "Slit Confocal" bis der abgebildete Bereich unscharf wird. Dadurch kriegen wir die Höhebereich, nämlich einen größten Wert und einen kleinsten Wert auf der z-Koordinate. In diesem Praktikum ist die Bereich ca. 300um und deshalb setzen wir 31 Ebenen für die Probe. Anhand der Anzahl an z-Ebenen erstellen wir eine txt-Datei zum Einrichten

von Koordinaten für eine konfokale Messung mit Leica DCM8.

Die Beleuchtung muss angemessen sein, um eine Oberfläche besser zu darstellen. Wenn die Leuchtdichte zu hoch ist, nimmt die Intensität zu und für vielen Pixeln ist 255 und können wir die Position auf der z-Koordinate nicht entscheiden. In diesem Praktikum setzen wir die Beleuchtung ca.10%. Dann wir schreiben ein SMR(single measurement recipe) für die Einzelaufnahmen und anschließend ein MMR(multiple measurement recipe), das all Aufnahmen unter Verwendung des SMR erstellt. Dadurch erstellen wir konfokale Einzelaufnahmen jeder z-Ebene(.plu-Dateien), die mithilfe von einem Code zur Auswertung mit Matlab verwendet werden. Die Rohdaten sind eine 3 dimensionale Matrix($1360 \times 1024 \times 31$). Der Code befindet sich im Anhang in der Zelle.

Aufgabe 3: Oberflächentopografie

Die Topographie wird aus dem Intensitätssignal in jedem Punkt des Sichtfeldes berechnet. Das theoretische konfokale Signal kann durch:

$$I \propto \text{sinc}^2(az) \quad (1)$$

beschrieben werden. Wobei I die Intensität, a ist eine Konstante und z ist der Abstand zwischen dem Fokus und dem Objekt. In diesem Fall gibt das Intensitätsmaximum die Position der Probe auf der z -Koordinate an. Die Verwendung einer Schwelle ist ein guter Kompromiss zwischen der Robustheit gegenüber Rauschen und der Vermeidung von Effekten durch Signalverzerrungen. Alle Intensitätswerte, die diese Schwelle nicht überschreiten, werden vernachlässigt. In diesem Praktikum setzen wir die Schwelle des Intensitätswerts $0.5 I_0$, wobei bezeichnet I_0 das Intensitätsmaximum.

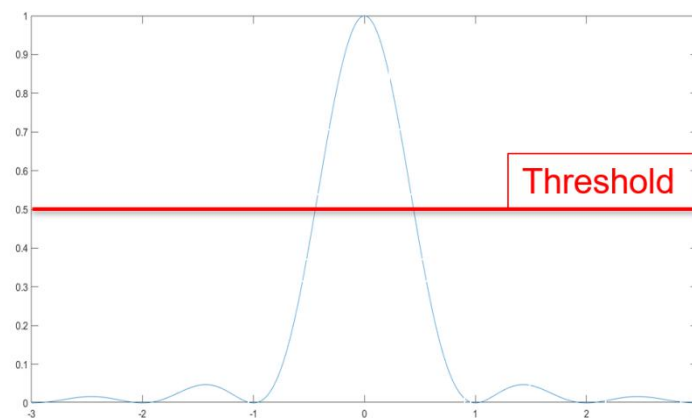


Abbildung 4: Theoretische konfokale Signal

Um die Höhe von I zu bestimmen, stehen verschiedene Algorithmen zur Verfügung. Die schnellste Methode zur Bestimmung der Höhe besteht in der Suche nach der z -Position des höchsten Intensitätswerts

$$h = z_i |_{\max\{I_i\}} \quad (2)$$

Dieser Algorithmus weist die höchste Empfindlichkeit für zufälliges Rauschen auf und die Topografie ist wie folgt.

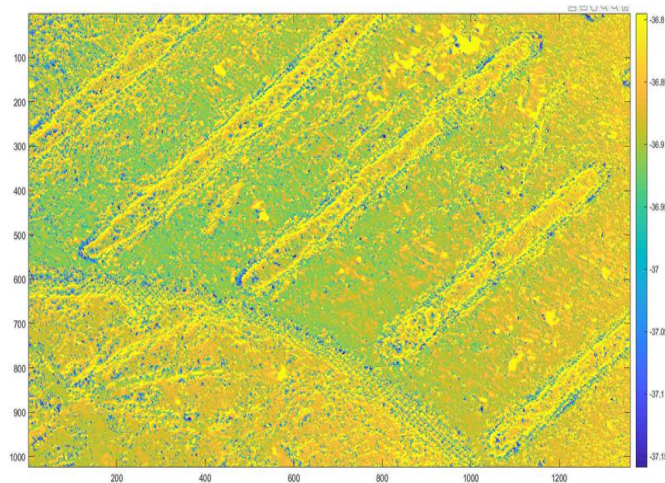


Abbildung 5: Die Topografie durch Methode "Maximum"

Wir benutzen noch eine Parabel, die Intensitätskurve anzupassen. Zur Schätzung des Signals wird die Anpassung der kleinsten Quadrate einer Parabel angewendet. Die Berechnungszeit dieses Algorithmus ist jedoch ziemlich lang.

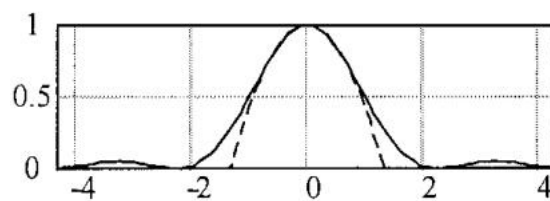


Abbildung 6: Anpassung der Parabel zu $I = \text{sinc}^2(az)$

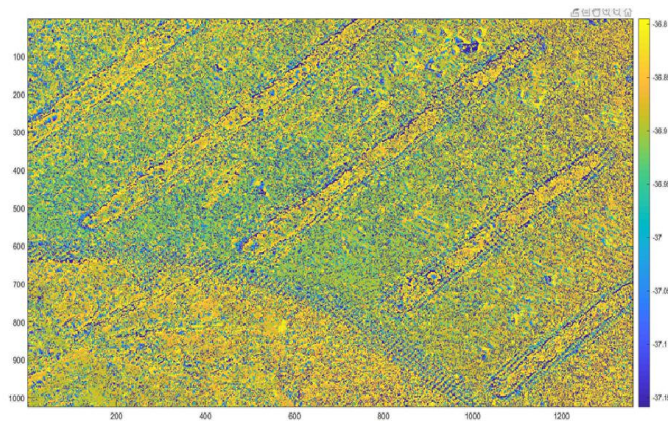


Abbildung 7: Ergebnis der Anpassung der kleinsten Quadrate einer Parabel

Am Ende berechnen wir "Center of Mass" zur Bestimmung der Höhe.

$$C = \frac{\sum zI(z)}{\sum I(z)} \quad (3)$$

Dieser Algorithmus ist im Vergleich zur parabolischen Anpassung viel schneller und liefert ein besseres Ergebnis.

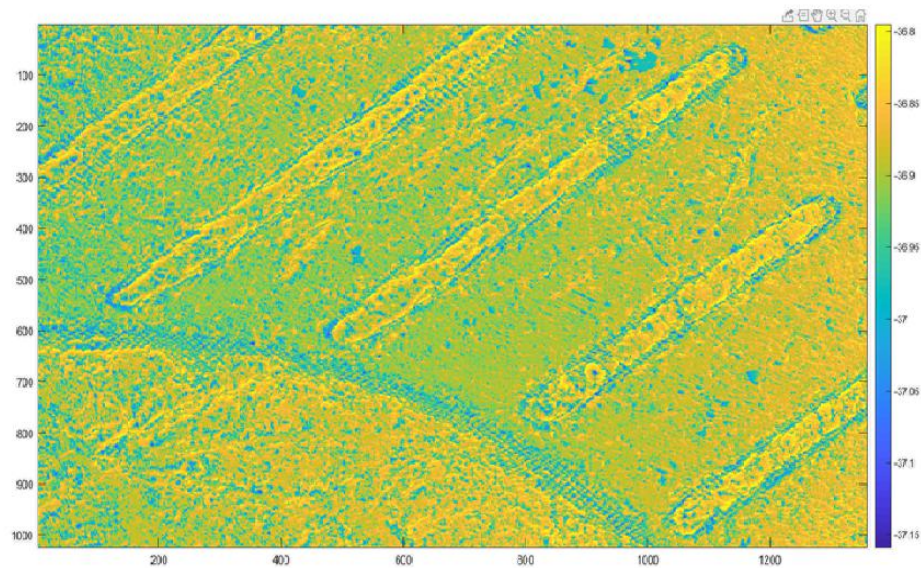
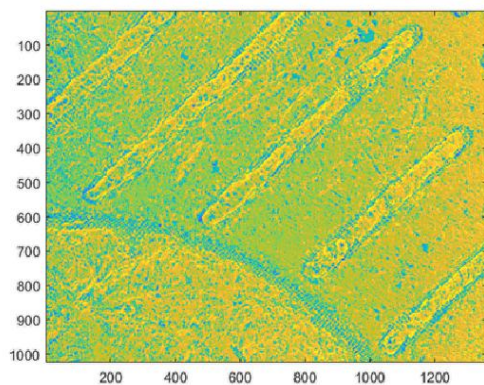
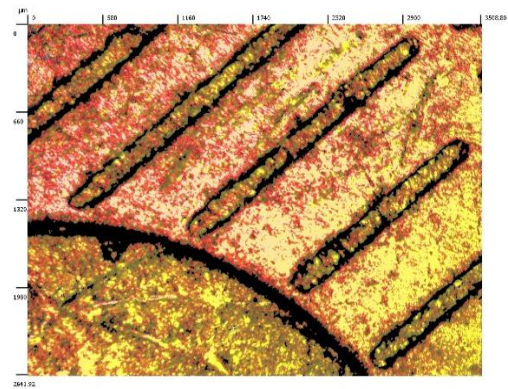


Abbildung 8: Ergebnis durch den Algorithmus "Center of Mass"

Das COM-Algorithmus liefert das beste Ergebnis und wir vergleichen die Topografie mit dem im Vorfeld aufgenommenen aus der Software.



(a)



(b)

**Abbildung 9: (a) die durch COM aufgenommene Topographie
(b) die von Leica Software gestellte Topographie**

Aufgabe 4: Verbesserung

Das COM-Algorithmus in Aufgabe 3 liefert die beste Schätzung der Topografie, deshalb führen wir die Verbesserung auf das Ergebnis von COM.

Um die Topografie zu verbessern, muss man die schlechten Punkte auf die Topografie entfernen und anschließend interpolieren. Störung, Vibration während der Messung, Überbelichtung und steile Kanten u.a. können zu schlechten Punkten führen.

Die Intensitätskurve eines schlechten Punktes ist von der eines normalen Punktes stark abweichend, dadurch können wir die schlechten Punkte aussortieren. Auf die Topografie suchen wir zuerst die unstetigen und außergewöhnlichen Bereiche, die wahrscheinlich schlechte Punkte enthalten. Solche Bereiche sind mit roten Rechtecken in Abbildung 10 gekennzeichnet.

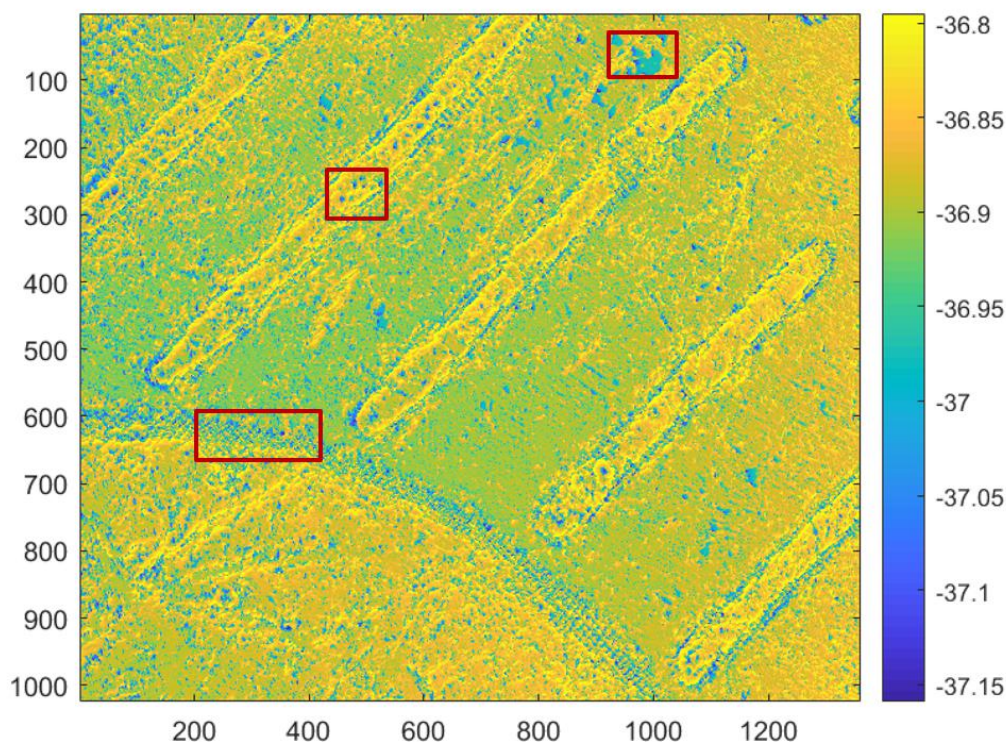


Abbildung 10: Bereiche, in denen es schlechte Punkte gibt

Dann überprüfen wir die Intensitätskurve der Punkte in solchen Bereichen. Es gibt 3 typische falsche Intensitätskurve, die sind in Abbildung 11 zu sehen.

Die Kurve 11(a) handelt sich um Überbelichtung, weil zu viele Z-Positionen den maximalen Intensitätswert 255 besitzen. Auf diesen Fall ist keine Information zu der Tiefe dieses Punktes vorhanden.

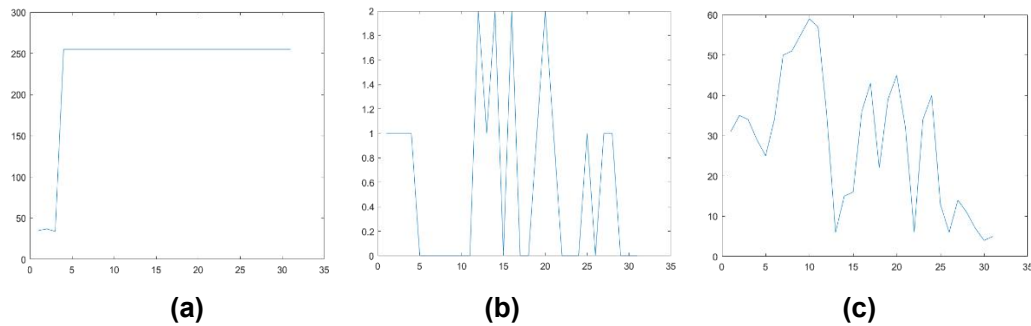


Abbildung 11: Intensitätskurve der schlechten Punkte

Die Kurve 11(b) ist aus einem Punkt an der Kante. Weil die Kante sehr steil und nicht horizontal ist, deshalb wird das Licht nicht vertikal widergespiegelt und es geht dann kaum Licht durch das Pinhole in dem Mikroskop. Die Intensität ist dann sehr gering.

Die Kurve 11(c) ist wahrscheinlich wegen Störung oder Vibration verursacht. Die Spitze ist nicht eindeutig und die Tiefeschätzung wird verfälscht.

Nach der Festlegung des Musters der Intensitätskurve des schlechten Punkts können wir die Kriterien für die Identifizierung eines schlechten Punkts entwickeln.

Für jeden Punkt auf die Topografie, betrachten wir sein Intensitätsvektor. Das erste Kriterium lautet, falls es mehr als 2 Intensitätswerte, die gleich 255 sind, gibt, ist der Punkt schlecht. Mit diesem Kriterium werden die überbelichteten Punkte entfernt.

Das zweite Kriterium ist, dass der Punkt, dessen Varianz der Intensität kleiner als 2 ist, wird als schlechten Punkt identifiziert. Die Punkte an der steilen Kante werden dadurch entfernt.

Dann führen wir ein Parabel-Fit durch und berechnen den mittleren quadratischen Fehler zwischen die Parabel und den Intensitätswerten. Falls der quadratischen Fehler größer als 350 ist, entfernen wir den Punkt. Das ist Kriterium 3. Damit entfernen wir die von Rauschen und Vibration verfälschten Punkte.

NaN	0.0084%
Kriterium 1	9.6852%
Kriterium 2	5.0131%
Kriterium 3	21.8852%
Gute Punkte	70.4830%

Tabelle 1: Die Rate der durch die 3 Kriterien jeweils aussortierten Punkte und die Rate der überlebenden brauchbaren Punkte.

Die Tabelle 1 zeigt wie viel Prozent der Punkte durch die 3 Kriterien aussortiert werden und wie viel Prozent der Punkte noch brauchbar sind. Die Abbildung 12 zeigt die schlechten Punkte (mit dunkel blau gezeichnet) auf die Topografie.

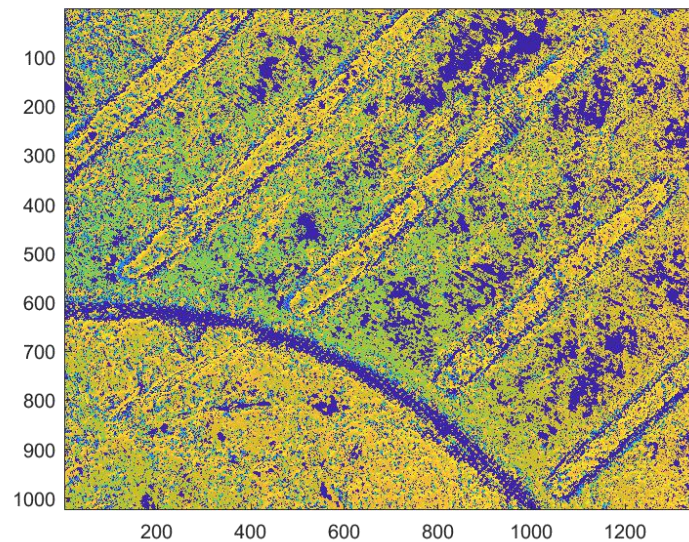
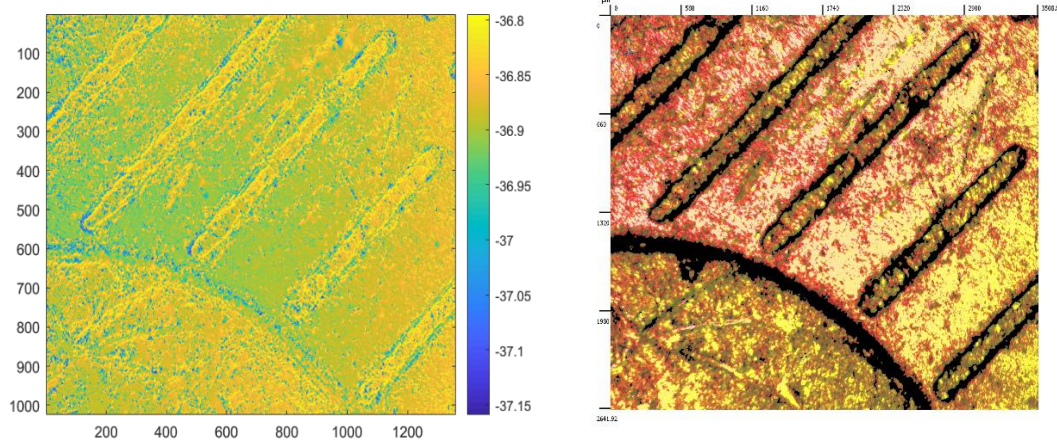


Abbildung 12: schlechte Punkte auf die Topografie

Dann führen wir eine lineare Interpolation, um die Tiefe der schlechten Punkte zu schätzen. Das Ergebnis ist in Abbildung 13(a) zu sehen. In Abbildung 13(b) steht die von Leica Software gelieferte Topografie zum Vergleich.



(a)

(b)

Abbildung 13: (a) die durch Interpolation verbesserte Topografie

(b) die von Leica Software gestellte Topografie

Aufgabe 5: Mehrfachaufnahme

Wir führen die gleiche Aufnahme zehnmal nacheinander durch. Dann erstellen wir 10 Topografien mittels COM-Algorithmus. Die Topografien sind in Abbildung 14 zu sehen.

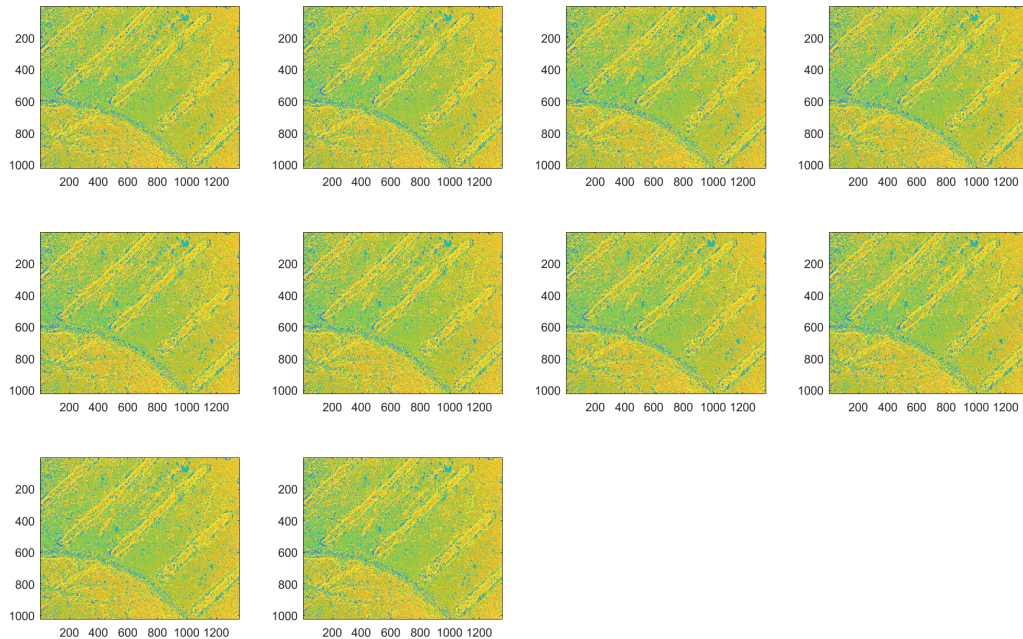


Abbildung 14: 10 Topografien aus Mehrfachaufnahme

Dann berechnen wir den Mittelwert und die Varianz der Topografien. Die gemittelte Topografie weist theoretisch weniger Rauschen auf, aber die Verbesserung ist nicht erkennbar auf das Bild.

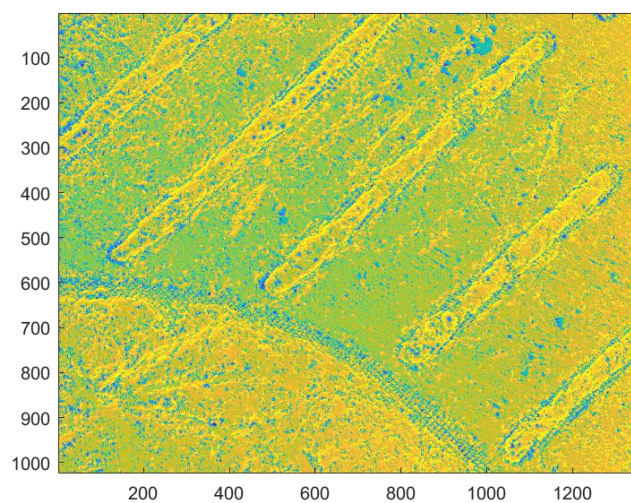


Abbildung 15: gemittelte Topografie

Die Punkte an der Kante besitzen höhere Varianz, da die Intensität der Punkte

an der Kante ist sehr gering und die Tiefeschätzung ist deshalb fast gleich verteilt auf die Z-Messungsbereich.

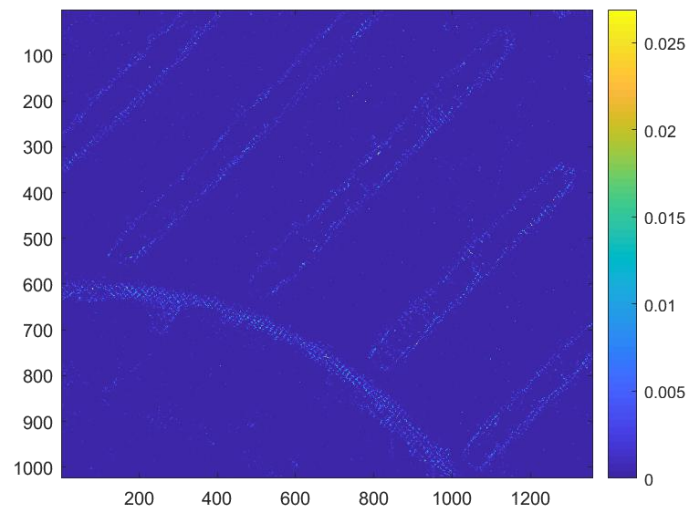


Abbildung 16: Varianz der Topografien

Literaturverzeichnis

[A.K.Ruprecht, T.F.Wiesendanger u. H.J. Tiziani: Signal evaluation for high-speed confocal measurements, Appl. 41(35)]

[Rahives, B. Roth u. E. Reithmeier: Confocal signal evaluation algorithms for surface metrology and numerical efficiency. Applied Optics 56 (2017) 21, S.59205926]

[Leach: Optical Measurement of Surface Topography, 1. Auflage, Springer, 2011]

[P. Keferstein, M. Marxer: Fertigungsmesstechnik, 8. Auflage, Springer,2015]

[Beyerer, F. Puente León, C.Frese: Automatische Sichtprüfung, Springer,2012]

[Wiki Konfokalmikroskop <https://de.wikipedia.org/wiki/Konfokalmikroskop>]

Anhang

%% Aufgabe 2: die Rohdaten einlesen und speichern

```
folder =  
'D:\sem.3\praktikum\1\b1112_11_Dec_2019_17_28_27_11_Dec_2019\';  
sub_folder = dir(fullfile(folder, '*p*'));  
readfiles = dir(fullfile(folder, '**/*.plu'));  
x_size = 1360;  
y_size = 1024;  
total_pixels = x_size * y_size;  
layers = 31;  
rep = 10; % zehnfach Aufnahmen  
data = zeros(y_size, x_size, layers, rep);  
  
for i = 1:layers  
    full_folder = strcat(folder, sub_folder(i).name, '\');  
    for j = 1:rep  
        temp = ReadPLU(strcat(full_folder, readfiles(j).name));  
        data(:, :, i, j) = temp.image;  
    end  
end  
ddata = squeeze(data(:, :, :, randi(10))); % eine einzelne Messung extrahieren  
data1 = data(:, :, :, 1:rep/2);  
data2 = data(:, :, :, rep/2+1:rep);  
save('mehr1', 'data1');  
save('mehr2', 'data2');
```

%% Aufgabe 3: Oberflächentopografie

%% COM

```
data2 = ddata;  
threshold = max(data2, [], 3) * 0.5;  
idx = true(y_size, x_size, layers);  
for i = 1:layers  
    data2(:, :, i) = data2(:, :, i) - threshold;  
    idx(:, :, i) = data2(:, :, i) <= 0;  
end  
data2(idx) = 0;  
summed_image = sum(data2, 3);  
weighted_image = zeros(y_size, x_size);  
for i = 1:layers  
    weighted_image = weighted_image + data2(:, :, i) .* z(i);  
end  
com = weighted_image ./ summed_image;
```

```

figure
imagesc(com);
colorbar;

%% Maximum-Methode
[~,idx] = max(ddata,[],3);
max_inten_method = z(idx);

%% Parabel-Fit
para_fit = zeros(y_size, x_size);
e = zeros(y_size, x_size);
num_points = zeros(y_size, x_size);
alpha = 0.5;
for i = 1:x_size
    for j = 1:y_size
        intensity = ddata(j,i,:);
        idx = intensity >= max(intensity) * alpha;
        int_after_thre = squeeze(intensity(idx));
        num_points_temp = length(int_after_thre);
        num_points(j,i) = num_points_temp;
        if num_points_temp >= 4 && num_points_temp < 12
            z_after_thre = z(idx);
            p = polyfit(z_after_thre, int_after_thre, 2);
            poly_val = polyval(p, z_after_thre);
            [~,max_idx] = max(poly_val);
            para_fit(j,i) = z_after_thre(max_idx);
            e(j,i) = sum((poly_val-int_after_thre).^2);
        else
            para_fit(j,i) = NaN;
            e(j,i) = inf;
        end
    end
end
end
%% die Intensitätskurve aufzeichnen
for i = 538:540
    for j = 558:565
        figure
        plot(1:layers, squeeze(ddata(i,j,:)));
    end
end
end
%% Aufgabe 4: Verbesserung
%% die schlechten Punkte entfernen
img = com;

```

```

data_sum = sum(ddata, 3);
var_data = var(ddata, [], 3);
bp1 = isnan(img);
bp2 = sum(ddata >= 255, 3) >= 3 ;
bp3 = var_data < 2;
mqf = e./(num_points.^0.8);
bp4 = mqf > 350;
bad_point = (bp1|bp3|bp2| bp4);
good_point = ~bad_point;
S = sprintf( ...
    'bp1: %0.4f%% \nbp2: %0.4f%% \nbp3: %0.4f%% \nbp4: %0.4f%%
\n good_point: %0.4f%%', ...
    sum(bp1,'all')/total_pixels*100,sum(bp2,'all')/total_pixels*100, ...
    sum(bp3,'all')/total_pixels*100,sum(bp4,'all')/total_pixels*100, ...
    sum(good_point,'all')/total_pixels*100);
disp(S);
figure
img(bad_point) = NaN;
imagesc(img);
colorbar;
%% Interpolation
[x,y] = meshgrid(1:x_size,1:y_size);
[xq,yq] = meshgrid(1:x_size,1:y_size);
v = img(good_point);
x = x(good_point);
y = y(good_point);
img_inter = griddata(x,y,v,xq,yq,'linear');
figure
imagesc(img_inter);
colorbar;
%% Aufgabe 5: Mehrfachaufnahme
%% die gespeicherte Daten laden
load mehr1.mat
load mehr2.mat
z = textread('Muenze.txt', '%*f %*f %f', 'headerlines', 2);
data = cat(4, data1, data2);
clear data1
clear data2

%% COM Algorithmus
com_mehr = zeros(y_size,x_size,rep);
for t = 1:rep
    data2 = squeeze(data(:,:,t));
    threshold = max(data2,[],3) * 0.5;

```

```

idx = true(y_size, x_size, layers);
for i = 1:layers
    data2(:, :, i) = data2(:, :, i) - threshold;
    idx(:, :, i) = data2(:, :, i) <= 0;
end
data2(idx) = 0;
summed_image = sum(data2, 3);
weighted_image = zeros(y_size, x_size);
for i = 1:layers
    weighted_image = weighted_image + data2(:, :, i) .* z(i);
end
com = weighted_image ./ summed_image;
com_mehr(:, :, t) = com;
subplot(3, 4, t)
imagesc(com);
end
%% Mittelwert
mean_mehr = mean(com_mehr, 3);
figure
imagesc(mean_mehr);

%% Varianz
var_mehr = var(com_mehr, 1, 3);
figure
imagesc(var_mehr);
colorbar;

```