

Acquisition Pitfall examples

● 光学的:球面収差、Z 軸の歪

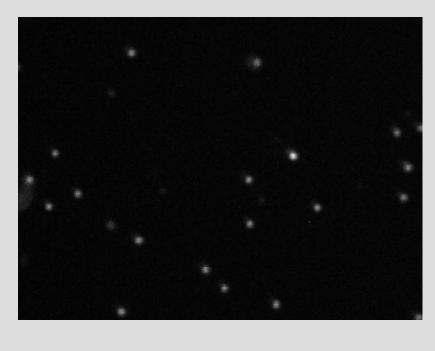
85 (5)

894

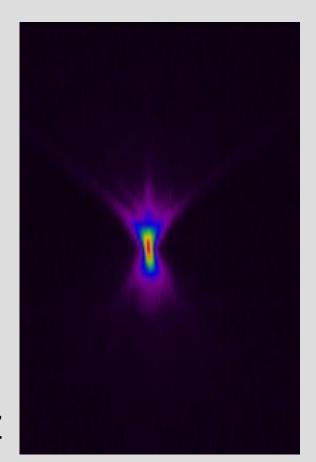
- 機械的: ドリフト、動作、スキャニング
- 検出: クリッピング、アンダーサンプリング、褪色、 ブラックレベル

Experimental PSF includes all physical deviations

ビーズ画像

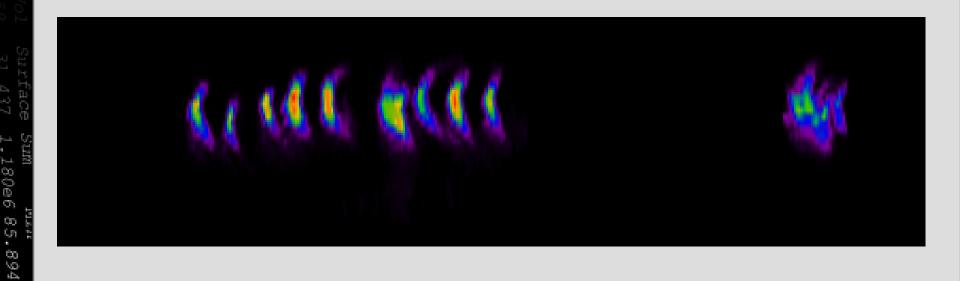


894



XZ

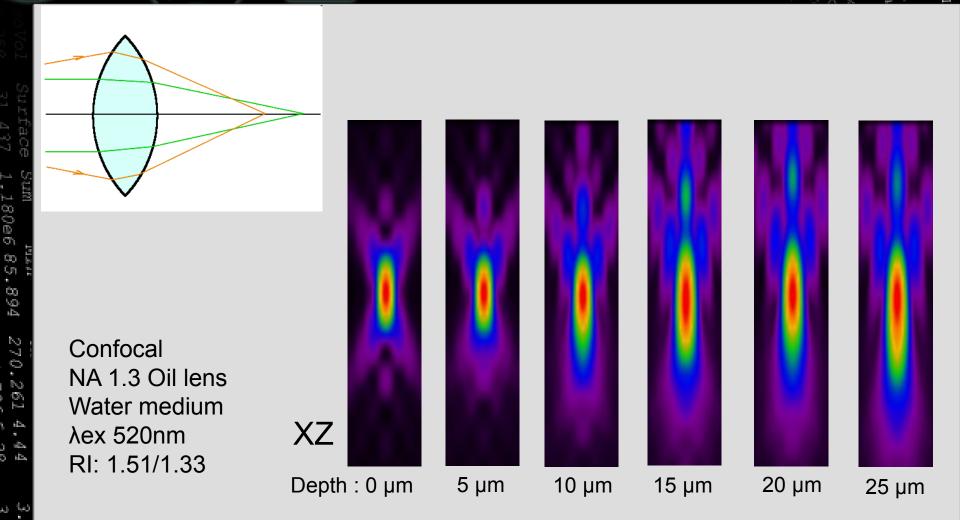
Microscope misalignments



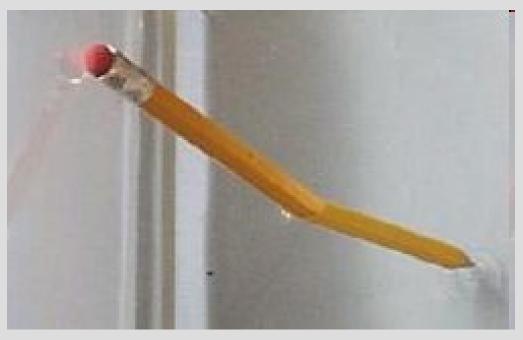
解決策:

- 1. 顕微鏡アライメントの改善
- 2. 測定した PSF を使うデコンボリューション処理

Spherical Aberration



Geometrical distortion The fishtank effect

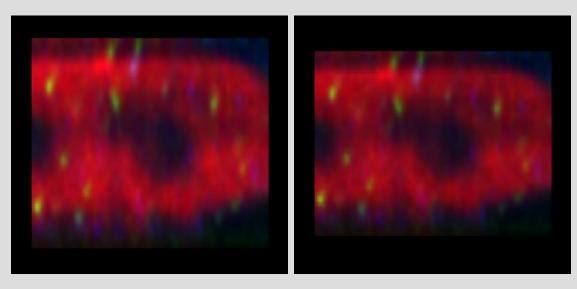


空気から水への屈折率ミスマッチ:対象物は、軸方向に縮みます。

対象物は、光軸に沿ってある距離(zステップ)を移動しますが、 焦点は、実際の異なるステップでサンプル内に移動します。

Geometrical distortion

デコンボリューション処理した 3D コンフォーカル画像の XZ 画面

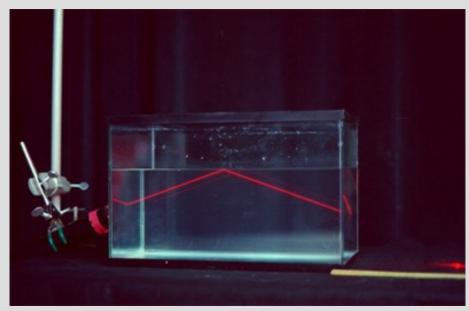


左: 屈折率ミスマッチの油と水(1.51/1.33)による伸びた画像。

右: 1.13 で Z サンプリングを除算した歪みを補正後の画像。

Huygens は、この歪みを自動的に補正しません。

Total internal reflection



http://www.fas.harvard.edu/~scdiroff/



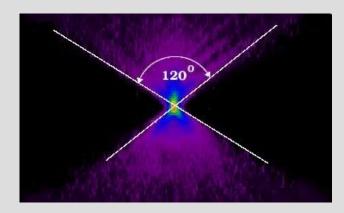
http://en.wikipedia.org/wiki/Total_internal_reflection#Critical_angle

 $NA = n \sin \alpha$

(n: RI lens or medium)

Total internal reflection truncates effective NA

開口数は、xz あるいは、yz 画像の PSF 円錐の角度から評価することができます。



 $NA = n \sin \alpha$

 $NA = 1.5 \times \sin 60 = 1.3$

落とし穴: 媒質の屈折率は、有効な NA を切り捨てます。

How to minimize spherical aberration

解決策:

画像取得時

- 1. 屈折率ミスマッチを最小化します。
- 2. 画像取得の Z 範囲を減少します。

画像取得後

- 1. Huygens に正しい屈折率パラメータを入力する。
- 2. Huygens の理論的な PSF (深さ依存)を使用する。
- 3. カバーガラスポジショナーを使用して、第 1 番目の画像面のスタートを 設定します。
- 4. 幾何学的な歪み: z サンプリングを補正します。

Excitation Fill Factor

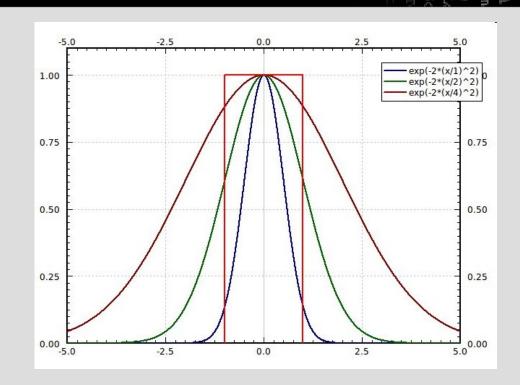
赤い矩形:対物レンズの瞳

青いカーブ: overfill factor 1

緑色カーブ: overfill factor 2

赤色カーブ: overfill factor 4

270.261



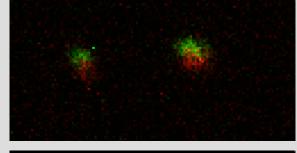
overfill factor 1 でビーム端強度は、最大値の 1/e^2 = 0.14です。

落とし穴: 充填比の減少は、有効な NA を低下させます。



2 チャネル画像

Raw



deconvolved

894



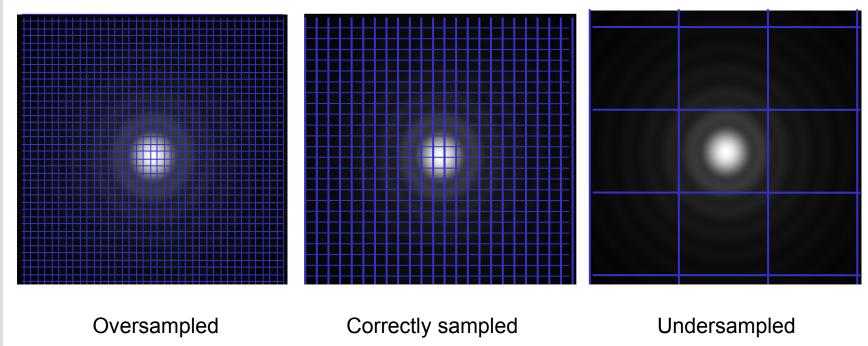
- <u>解決策</u>:
 1. アポクロマートレンズを使用する。
 2. 適切な蛍光標識を使用する。
 3. Huygens の色補正で補正する。

Huygens の色補正で補正された画像



Detection pitfall: Undersampling

Airy disk にサンプリングを適合



9908

 $\zeta_{\mathcal{F}_1}$

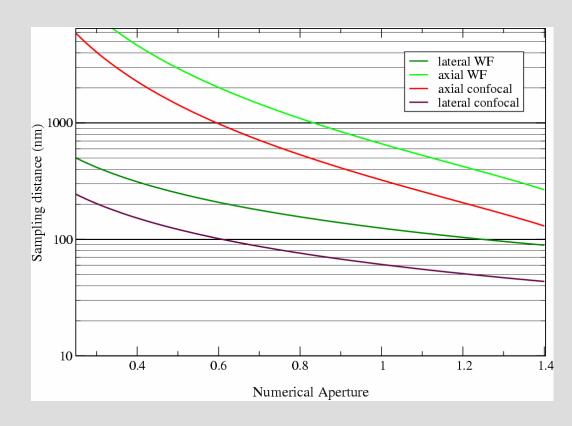
894

support.svi.nl/wiki/NyquistCalculator

Acquisition note

- Nyquist ratio に従ったサンプリング
 - 顕微鏡が対象物について伝えるすべての情報を取得するために、顕微鏡が伝えることができる最も高い周波数の 2 倍のサンプル周波数を使用する必要があります。
 - 以下に依存します:
 - 顕微鏡タイプ
 - 開口数(NA)
 - 波長

Nyquist sampling



9908

85.

894

270.261 4.44

経験則:

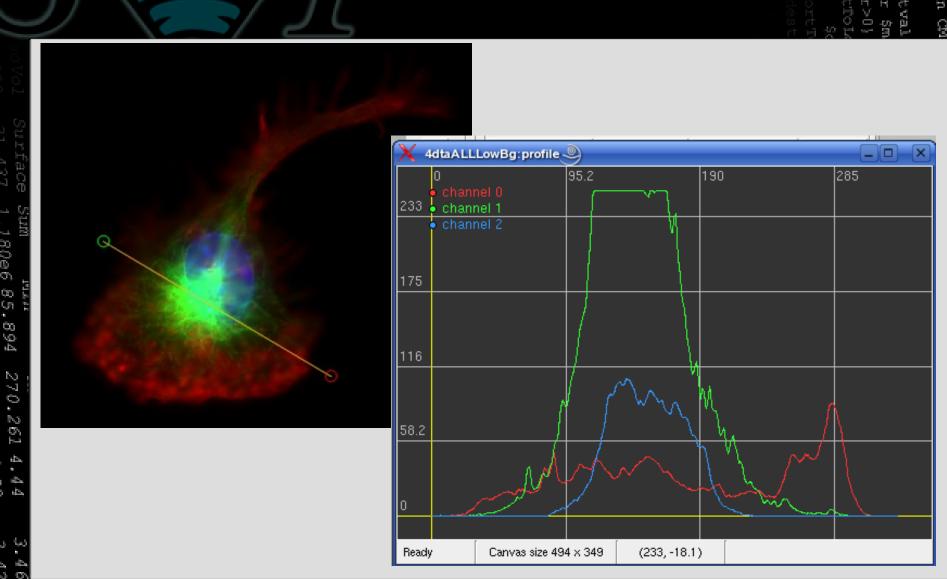
Confocal, Nipkow

Lateral: 50nm to 80 nm Axial: 150nm to 200nm

Widefield

Lateral: 100nm to 130 nm Axial: 200nm to 300 nm

Clipping is information loss

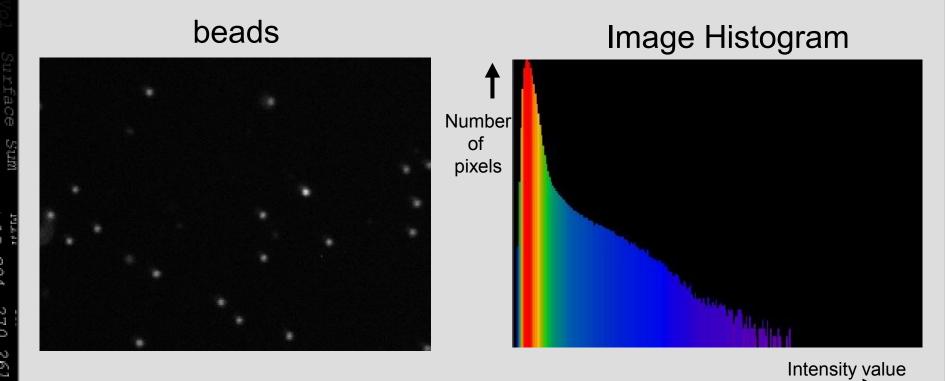


1*80*e6

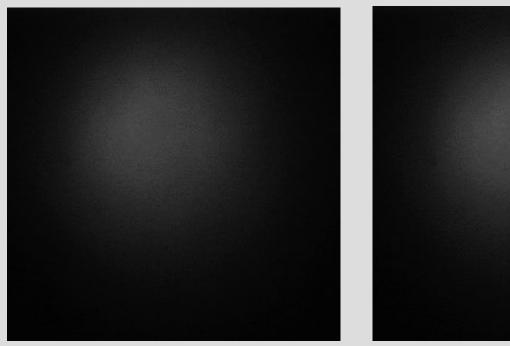
85.

894

Detection pitfall: blacklevel



Intensity fluctuations Bleaching, illumination instability



Widefield raw data

894

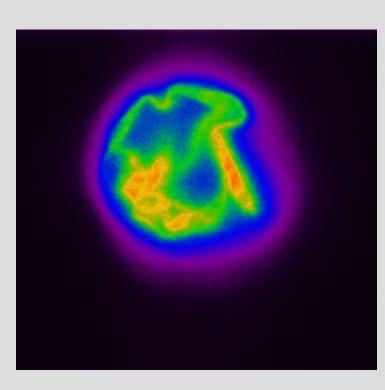


flux equalized.

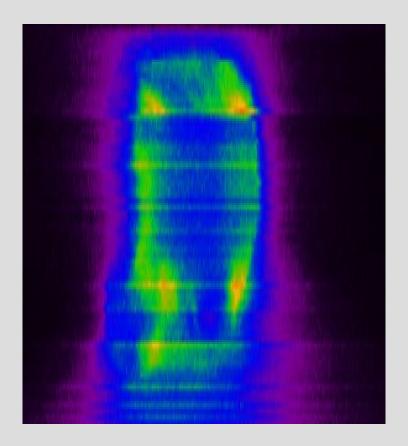
Courtesy of Dr. Olivier Renaud (PFID, Inst. Pasteur, Paris) http://www.pfid.org/AUTOMATION

Sample motion

Beware also of (thermal) drift, and steppers or scanners jumps!



XY slice



XZ slice

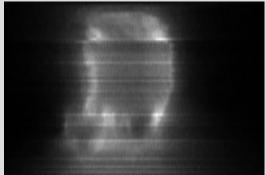
Deconvolution of ZDF data

http://www.pfid.org/AUTOMATION/

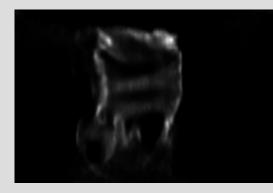


85.894

270.261 4.44

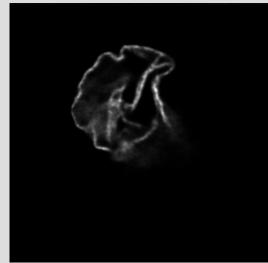


Deconvolved + z drift corrected



XZ slice at Y = 175;





XY slice at Z=19.



Important factors

1. PSF

1*80e6*

85.

894

- 2. 適切なサンプリング
- 3. クリッピングを回避
- 4. 復元パラメータ

